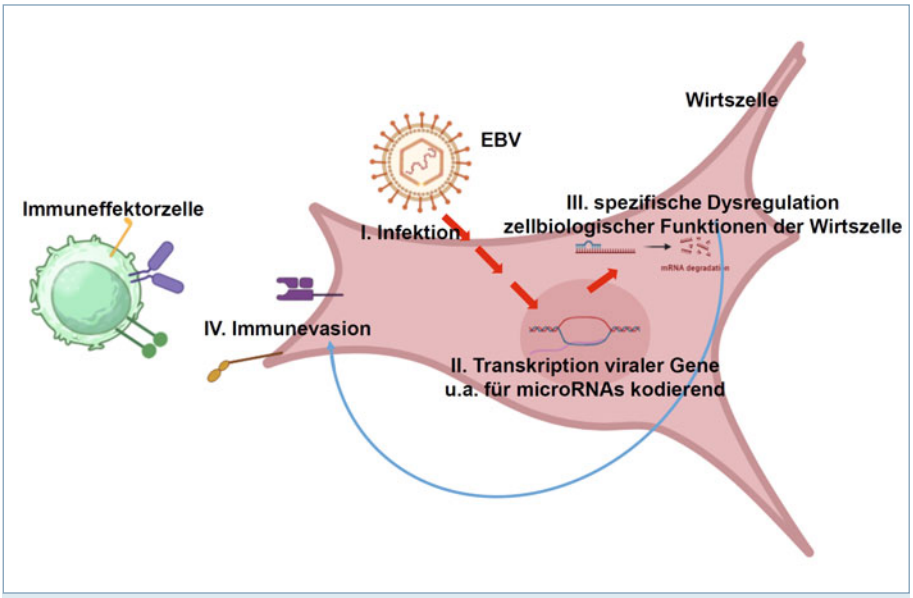
Transkriptomanalysen

RNA-Sequenzierung zur Analyse Epstein-Barr-Virus-codierter microRNAs

TIM HOHMANN[1], SIMON JASINSKI-BERGNER[2]
1 INSTITUT FÜR ANATOMIE UND ZELLBIOLOGIE, MEDIZINISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG
[2] INSTITUT FÜR PHYSIOLOGIE, MEDIZINISCHE HOCHSCHULE BRANDENBURG (MHB) – THEODOR FONTANE, BRANDENBURG AN DER HAVEL

The RNA species of microRNAs represents an important component of post-transcriptional gene regulation. Herpes viruses, including the Epstein-Barr virus, encode their own microRNA genes, which play a relevant role in crucial cellular processes, including immune evasion, but also in the malignant transformation of host cells. Modern transcriptome analyses, including RNA sequencing, contribute significantly to the identification of these direct and indirect molecular regulatory relationships.

DOI: 10.1007/s12268-025-2385-0
© The Author(s) 2025

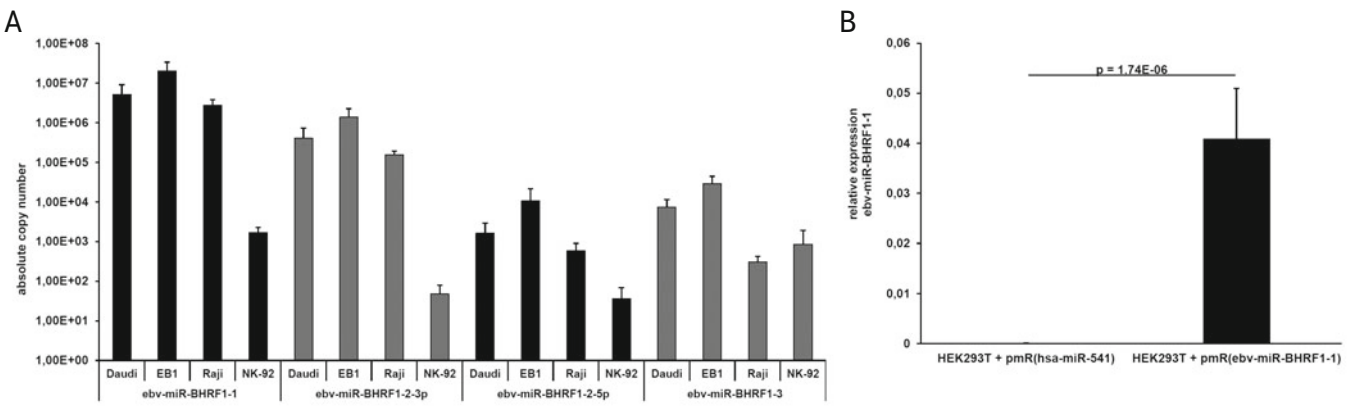


▲ **Abb. 1:** Bedeutung der EBV-codierten Moleküle für die Immunevasion – einschließlich viraler microRNAs. EBV-infizierte Zellen (I) exprimieren in Abhängigkeit der EBV-Lebensphase unterschiedliche viral codierte Moleküle, z. B. virale Proteine, Peptide, lange nicht codierende RNAs und microRNAs (II). Es folgt eine spezifische Dysregulation zellbiologischer Funktionen der Wirtszelle, u. a. Störung der Antigenprozessierung und -präsentation bzw. allgemeine Verminderung von HLA-Ia-Molekülen auf der Zelloberfläche und parallele Induktion immunmodulatorischer Moleküle, u. a. PD-L1- und HLA-Ib-Moleküle membranständig sowie sezerniert (III). Außerdem werden antiinflammatorische Zytokine induziert und proinflammatorische/antivirale-Zytokine sowie stressinduzierte Signalmoleküle (MICA/B, ULBP1–6) inhibiert. Insgesamt wird eine effektive Immunevasion etabliert (IV) – einschließlich Erhöhung der Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion, z. B. Apoptoseinduktion durch Immuneffektorzellen. Aktuelle Forschung untersucht die beteiligten zellulären Signalwege der EBV verursachten malignen Transformation.

■ Wissenschaftliche Studien zur Analyse der funktionalen Bedeutung der kleinen einzelsträngigen nicht codierenden microRNAs, insbesondere im Hinblick auf die Tumorbiologie einschließlich der Immunevasion, repräsentieren unseren langjährigen Forschungsschwerpunkt. MicroRNAs binden Sequenz-spezifisch an mRNAs, präferenziell, aber nicht ausschließlich, am 3‘-UTR, was zur translationalen Inhibierung und meistens zum Abbau der jeweiligen mRNA führt. Damit stellen microRNAs einen wichtigen Teil der posttranskriptionalen Genregulation dar. Die Länge der microRNAs liegt in der Regel zwischen 21 und 23 Nukleotiden. Die Sequenz-spezifische Bindung zwischen microRNA und Ziel-mRNA ist von Missmatch-Paarungen, Beulen sowie Wobble-Basen-Paarungen gekennzeichnet, was belastbare *in silico*-Vorhersagen erschwert [1].

Die Rolle von microRNAs bei Tumorerkrankungen

Tatsächlich konnten wir in der Vergangenheit demonstrieren, dass verschiedene microRNAs, welche alle am 3‘-UTR eines gemeinsamen Zielgenes an unterschiedlichen Positionen binden, dies mit unterschiedlichen Affinitäten machen, sodass einzelne regulatorische microRNAs entweder als *fine tuner* oder sogar als *key regulator* für eine einzelne mRNA fungieren können. Für die gesamte posttranskriptionale Genregulation dieser Ziel-mRNA in der Zelle ergeben sich somit additive Effekte verschiedener microRNAs. Dies ist ebenfalls ein wichtiger Aspekt, denn eine einzelne microRNA kann verschiedene Ziel-mRNAs regulieren, aber offensichtlich mit unterschiedlichen Affinitäten [2]. In Abhängigkeit der Zielgene einer microRNA und unter Beachtung ihrer möglicherweise veränderten Expression bei einer pathologischen Veränderung, beispielsweise nach maligner Transformation, lassen sich bestimmte microRNAs auch funktionell unterteilen, z. B. in tumorsuppressive oder onkogene microRNAs [3]. In der Vergangenheit konnten wir für mehrere tumorsuppres-



▲ **Abb. 2:** Exemplarische Darstellung der qPCR-Analyse. **A**, Expression EBV-codierter microRNAs des BHRF-Clusters in EBV positiven Proben (Mittelwert und Standardabweichung). **B**, Validierung des spezifischen Überexpressionsplasmids für weiterführende Experimente nach transienter Transfektion in EBV-negativen HEK293T-Zellen.

sive microRNAs zeigen, dass diese durch direkte Bindung an die mRNA verschiedene immunmodulatorische Moleküle regulieren. In verschiedenen humanen Tumorerkrankungen waren diese tumorsuppressiven microRNAs deutlich herunterreguliert, sodass diese Tumorzellen einen Vorteil bei der Umgehung der Immunüberwachung haben. Außerdem konnten wir zeigen, dass solche tumorsuppressiven microRNAs ebenfalls mRNAs von Zielgenen kontrollieren, welche die Zellproliferation und Apoptoseinduktion regulieren. Dadurch hatten diese Tumorzellen nicht nur einen selektiven Vorteil durch Expression der immunmodulatorischen Moleküle, sondern ebenfalls eine erhöhte Zellproliferation und Resistenz gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose [4, 5].

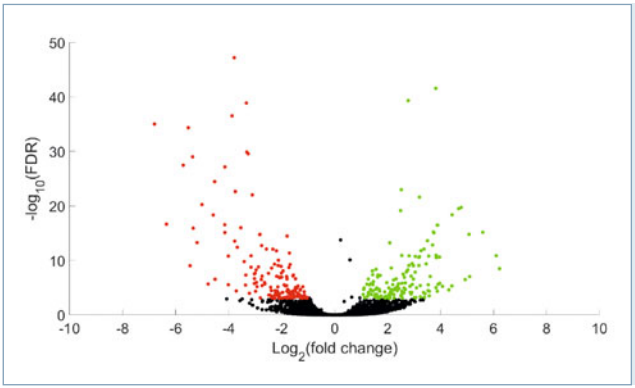
EBV-microRNAs

Interessanterweise haben wenige Viren eigene microRNA-Gene in ihrem Genom. Dazu zählen u. a. die Herpesviren, z. B. das Epstein-Barr-Virus (EBV), welches ein onkogenes Potenzial besitzt. Das Genom von EBV umfasst ca. 172.000 Basenpaare und codiert für virale Proteine, Peptide und lange nicht codierende RNAs sowie virale microRNAs. Diese Virus-codierten Moleküle leisten einen wichtigen Beitrag für die Etablierung des Virus in der Wirtszelle, einschließlich Immunevasion und maligner Transformation (**Abb. 1**). Die EBV-codierten microRNA-Gene sind im EBV-Genom als Cluster organisiert. So werden im BART1-microRNA-Cluster 14 microRNAs, im BART2-Cluster 26 microRNAs und im BHRF-Cluster 4 microRNAs codiert. Die Genexpression von EBV variiert sehr stark in den einzelnen latenten oder lytischen Lebensphasen, jedoch werden die viralen microRNAs bereits in der Latenzzeit exprimiert, was im Hinblick auf die Immunevasion wahrscheinlich essenziell ist. Tatsächlich konnten wir kürzlich die direkte Interaktion zwischen der ebv-miR-BART7-3p und der mRNA codierend für das antivirale Zytokin Interferon λ 3 (IFNL3) nachweisen [6]. Diese Interaktion bewirkt, dass das funktionell aktive antiviral wirkende Protein IFNL3 in den Virus-infizierten Zellen des Oropharynx, wo dieses Zytokin physiologisch exprimiert werden würde, gar nicht erst translatiert wird.

EBV-microRNAs in Lymphomen und Modellvalidierung

Zur weiterführenden Untersuchung der Bedeutungen dieser viral codierten microRNAs entschlossen wir uns zuerst, alle EBV-microRNAs hinsichtlich ihrer Expression in Lymphomzellen zu charakterisieren. Es konnten die folgenden vier EBV-codierten microRNAs identifiziert werden, welche in allen untersuchten Proben eine besonders abundante Expression aufweisen: ebv-miR-BART1, -BART4, -BART17 und -BHRF1-1 (**Abb. 2A**).

Für die Transkriptomanalysen mittels RNA-Sequenzierung wurden im nächsten Schritt entsprechende Überexpressionsvektoren kloniert und mittels transienter Transfektion in EBV-negativen humanen Zellen transfiziert, um vergleichbare Expressionswerte wie in EBV-positiven *in vivo*-Proben zu erzielen und via qPCR-Analyse validiert (**Abb. 2B**). Eine erfolgreiche Plasmidtransfektionseffizienz wurde nach der Transfektion mittels Durchflusszytometrie kontrolliert, da das verwendete Plasmid zusätzlich für das fluoreszierende m-cherry-Protein codiert. Des Weiteren bietet die Verwendung von embryonalen HEK293T-Zellen einen weiteren wichtigen Vorteil. EBV korreliert mit verschiedenen Tumorerkrankungen. Insbesondere das nasopharyngeale Karzinom (NPC) und das Burkitt-Lymphom (BL) werden durch EBV-Infektion induziert [7]. Für das NPC gibt es noch keine Modelzelllinie. Außerdem sollte ganz gezielt eine Zelllinie verwendet werden, die noch keine maligne Transformation durchgemacht hat und über folgende physiologische Eigenschaften verfügt: intakter Metabolismus, Proliferation, Zellmigration, Apoptoseregulation, Antigen-Prozessierung und -Präsentation, intakte Expression von Genen involviert im angeborenen oder adaptiven Immunsystem, allgemeine genomische Stabilität, einschließlich physiologischer Expression von Tumorsuppressorgenen/Onkogenen etc. – alles Parameter, die nach maligner Transformation verändert vorliegen. Dies bedeutet, dass als geeignetes Zellsystem primäre B-Zellen am geeignetsten wären. Jedoch haben wir uns aus verschiedenen Gründen dagegen entschieden. In erster Linie sind es Gründe der Vergleichbarkeit: verschiedene Spender, nicht zu unterschätzende Unterschiede zwischen verschiedenen Passagenzahlen, mangelnde Vergleichbarkeit von primären



◀ **Abb. 3:** Beispielhafte Darstellung einer Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung in Form eines Volcano-Plots der statistisch signifikant herunterregulierten (rot) und hochregulierten (grün) Zielgene nach ebv-miR-BHRF1-Überexpression im Vergleich zur überexprimierten Kontroll-microRNA.

B-Zellen und Epithelzellen des Oropharynx und damit zum NPC sowie schwierige Transfizierbarkeit primärer B-Zellen *per se*.

RNA-Sequenzierung und Analyse von EBV-microRNA überexprimierenden Zellen

Die RNA-Sequenzierung erfolgte in der Core Unit DNA-Technologien (Universität Leipzig) durch PD Dr. Knut Krohn. Eine separate Überexpression der vier verschiedenen abundantesten EBV-microRNAs im Vergleich zur Überexpression einer Kontroll-microRNA resultierte in einer großen Anzahl statistisch signifikant dysregulierter Zielgene. So führte die Überexpression der ebv-miR-BART1 zu 160 bzw. 137 statistisch signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Genen. Vergleichbare Zahlen ergaben sich bei ebv-miR-BART4 (hoch n = 139, runter n = 165), bei ebv-miR-BART17 (hoch n = 167, runter n = 225) und bei ebv-miR-BHRF1-1 (hoch n = 167, runter n = 178). Insgesamt wurden bei allen vier verschiedenen Überexpressionen 933 verschiedene humane Zielgene statistisch signifikant dysreguliert (**Abb. 3**).

Ziel dieser Arbeit war es, tumorimmunologisch bzw. tumorbiologisch relevante Zielgene zu identifizieren, die direkt oder indirekt durch diese EBV-codierten microRNAs dysreguliert werden. Eine folgende *annotation clustering*-Analyse unter Verwendung der Datenbank https://pantherdb.org (Stand 01.04.2024; [8]) ergab, dass die Überexpression aller vier verschiedenen EBV microRNAs statistisch signifikant Wachstumsfaktoren-Signalwege dysregulieren, wie die WNT-, EGF-, FGF- und PDGF-Signalkaskaden, jedoch jeweils zu einem unterschiedlichen Grad. Außerdem waren ebenfalls noch zellbiologische Prozesse dysreguliert, die

Hier steht
eine Anzeige.

Springer

Apoptose und Inflammation betreffen, sowie Gene, die eine maßgebliche Rolle bei der Tumorentstehung und -migration spielen. Insgesamt stach dabei die Bedeutung der ebv-miR-BHRF1-1 hervor. Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse wurden frei verfügbare klinische cDNA-Microarary-Datensätzen von BL-Patienten bzw. von gesunden humanen primären B-Zellen verglichen und die Effekte dort bestätigt. Insgesamt lässt sich durch diese Daten über eine bedeutende Rolle von EBV induzierter microRNA sowohl für die Immunevasion als auch in klinisch-biologisch relevanten Eigenschaften von Tumoren – wie der Chemoresistenz, Migration etc. – spekulieren, deren genaue Rolle und Ausmaß Ziel weiterer Studien sein sollte.

Danksagung

Wir möchten uns bei unseren nationalen und internationalen Kooperationspartnern, Kollegen sowie den beteiligten Drittmittelgebern Monika Kutzner Stiftung (S.J.-B.) und Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, JA 3192/1-1, 496182670, S.J.-B.) bedanken.

Literatur

[1] Martin HC, Wani S, Steptoe AL et al. (2014) Imperfect centered MIRNA binding sites are common and can mediate repression of target mrnas. Genome Biology 15, DOI: 10.1186/gb-2014-15-3-r51
[2] Jasinski-Bergner S, Stoehr C, Bukur J et al. (2016) Identification of novel micrornas regulating HLA-G expression and investigating their clinical relevance in renal cell carcinoma. Oncotarget 7: 26866–26878
[3] Jasinski-Bergner S, Mandelboim O, Seliger B (2014) The role of micrornas in the control of innate immune response in cancer. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 106, DOI: 10.1093/jnci/dju257
[4] Jasinski-Bergner S, Stehle F, Gonschorek E et al. (2014) Identification of 14-3-3β gene as a novel Mir-152 target using a proteome-based approach. Journal of Biological Chemistry 289: 31121–31135
[5] Jasinski-Bergner S, Stoehr C, Bukur J et al. (2015) Clinical relevance of mir-mediated HLA-G regulation and the associated immune cell infiltration in renal cell carcinoma. OncoImmunology 4, DOI: 10.1080/2162402x.2015.1008805
[6] Blümke J, Bauer M, Vaxevanis C et al. (2023) Identification and characterization of the anti-viral interferon lambda 3 as direct target of the Epstein-barr virus microrna-BART7-3p. OncoImmunology 12, DOI: 10.1080/2162402x.2023.2284483
[7] Bauer M, Jasinski-Bergner S, Mandelboim O et al. (2021) Epstein–Barr virus–associated malignancies and immune escape: The role of the tumor microenvironment and tumor cell evasion strategies. Cancers 13: 5189
[8] Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A et al. (2021) panther: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. Protein Science 31: 8–22

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de.

Korrespondenzadresse:
Dr. Simon Jasinski-Bergner
Institut für Physiologie
Medizinische Hochschule Brandenburg (MHB)
Hochstraße 29
D-14770 Brandenburg an der Havel
simon.jasinski-bergner@mhb-fontane.de

AUTOREN

Tim Hohmann
2006–2012 Studium der Physik an der Universität Leipzig. **2012–2018** Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Prof. Dr. F. Dehghani, Universität Halle-Wittenberg. **Seit 2018** PostDoc und Lehrassistent für Anatomie, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Prof. Dr. F. Dehghani, Universität Halle-Wittenberg mit Forschungsschwerpunkt Hirntumorbiomechanik und -migration sowie Data Science.

Simon Jasinski-Bergner
2004–2015 Studium Biochemie (Diplom) und Promotion. **2015–2018** PostDoc und Lehrassistent für makroskopische und mikroskopische Anatomie sowie Neuroanatomie, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Prof. Dr. H. Kielstein. **2019–2022** PostDoc am Institut für Medizinische Immunologie, Prof. Dr. B. Seliger. **2022–2024** Arbeitsgruppenleiter am Institut für Translationale Immunologie, Prof. Dr. B. Seliger. Seit **2024** Laborleiter am Institut für Physiologie von Prof. Dr. O. Grisk.