

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Epigenetik von Epstein-Barr Virus:
Regulation viraler Gene in der frühen Phase
der Infektion**



Von

Markus Kalla

München, Oktober 2007

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Epigenetik von Epstein-Barr Virus: Regulation viraler Gene in der frühen Phase der Infektion“

von mir ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, im Oktober 2007

Markus Kalla

Dissertation eingereicht am	30.10.2007
1. Gutachter	Prof. Dr. Dirk Eick
2. Gutachter	Prof. Dr. Heinrich Leonhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	28.05.2008

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	7
1.1 Das Epstein-Barr-Virus	7
1.1.1 Biologische Relevanz	8
1.1.2 Vermehrungszyklus	9
1.1.2.1 Latenz	10
1.1.2.2 Der lytische Zyklus	12
1.2 In vitro Systeme	22
1.2.1 Epithel-Zell-Systeme	22
1.2.2 B-Zell-Systeme.....	22
1.3 Reaktivierung des lytischen Zyklus in vitro.....	23
1.3.1 Reaktivierung durch Stimuli der BCR-Signalkaskade	25
1.3.2 Reaktivierung durch Stimuli der TGF- β Signalkaskade	27
1.3.3 Induktion des lytischen Zyklus durch Chemikalien	27
1.4 Inhibitoren des lytischen Zyklus	28
1.5 Aufgabenstellung	29
2. MATERIAL.....	31
2.1 Zelllinien und Bakterienstämme	31
2.1.1 Zelllinien	31
2.1.2 Bakterienstamm	31
2.2 Plasmide.....	32
2.3 Antikörper, Enzyme und Proteine	33
2.4 Oligonukleotide	34
2.5 Zellkulturmedien und Zusätze	35
2.5.1 Medien für prokaryontische Zellen	35
2.5.2 Zellkulturmedium und Zusätze für die Kultivierung eukaryontischer Zellen	36
2.6 Kits und Standards.....	36
2.7 Chemikalien, Stammlösungen und sonstiges	37
2.7.1 Chemikalien, Geräte und Software.....	37
2.7.2 Stammlösungen und Puffer.....	39
3. METHODEN.....	42
3.1 Bakterienkultur	42
3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien.....	42

3.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	42
3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen.....	43
3.2.1 Zellkulturbedingungen	43
3.2.2 Transiente Transfektion von Zellen und Generierung infektiöser Viruspartikel	43
3.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz rekombinanter EBVs	44
3.2.4 Immunfluoreszenzanalysen	45
3.3 RNA-Arbeitstechniken.....	45
3.3.1 Isolierung gesamtzellulärer RNA	46
3.3.2 Quantitative und qualitative RNA-Analytik	47
3.3.3 Reverse Transkriptase (RT)-PCR	48
3.4 DNA-Arbeitstechniken.....	49
3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	49
3.4.2 Endotoxinfreie Plasmidpräparation.....	50
3.4.3 Präparation von maxi-EBV-Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	51
3.4.4 Genomweite <i>de novo</i> CpG-Methylierung der maxi-EBV-DNA	52
3.4.5 PCR-Analysen.....	53
3.4.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese	54
3.5 Microarray spezifische Arbeitsmethoden	55
3.5.1 Planung der HKG-Kontrollen	55
3.5.2 Planung des genomweiten EBV-Microarrays	55
3.5.3 Ligation von PCR-Fragmenten und pCR2.1-Vektor.....	55
3.5.4 Reinigung von PCR-Produkten.....	56
3.5.5 Quantifizierung der PCR-Produkte	56
3.5.6 Spotten des EBV-Microarrays.....	57
3.5.7 Markierung der mRNA.....	57
3.5.8 Hybridisierung	57
3.5.9 Lesen und Auswerten des EBV-Microarrays	58
4. ERGEBNISSE.....	59
4.1 Das Transfektionssystem	60
4.1.1 Versuchsaufbau	60
4.1.1.1 Das maxi-EBV-Konstrukt p2089	60
4.1.1.2 Zelllinien	61
4.1.1.3 Expressionsplasmide	62
4.1.1.4 Nachweis transfizierter EBV-DNA.....	63
4.2 Analyse der Genexpression und Virusneusynthese.....	64
4.2.1 Expressionsnachweis lytischer Genprodukte durch Immunfluoreszenz.....	65
4.2.1.1 Kontrollexperimente – Induktion des lytischen Zyklus in stabil EBV-transfizierten HEK293-Zellen.....	65

4.2.1.2 BZLF1-Expression in transient transfizierten HEK293-Zellen ist nicht ausreichend für die Induktion des lytischen Zyklus	67
4.2.1.3 Nachweis lytischer Genprodukte durch transiente Transfektion von CpG-methylierter EBV-DNA.....	68
4.2.1.4 Ektopische Expression von Rta induziert die Transkription lytischer EBV-Gene.....	70
4.2.2 RT-PCR-Analyse ausgewählter Transkripte lytischer Gene.....	71
4.2.2.1 Kontrolle der Kontamination mit genomischer DNA	72
4.2.2.2 Spontane Expression von BZLF1	73
4.2.2.3 Ektopische Expression von BZLF1 kann BRLF1 und BALF4 induzieren	74
4.2.2.4 Nachweis lytischer Genprodukte nach transienter Transfektion von CpG-methylierter EBV-DNA.....	74
4.2.2.5 Ektopische Expression von Rta induziert die Transkription lytischer EBV-Gene.....	74
4.2.3 Nachweis und Quantifizierung der Virusneusynthese	75
4.2.3.1 Kontrollexperimente - Infektion von BBLs mit 2089-Wildtyp-EBV	75
4.2.3.2 Virusneusynthese nach CpG-Methylierung des EBV-Genoms und Kotransfektion von BZLF1 bzw. BRLF1	75
4.2.3.3 Analyse der transformierten B-Blasten.....	77
4.2.3.4 Kotransfektion einer <i>de novo</i> Methyltransferase führt zur Virusneusynthese	78
4.2.3.5 Proteintransduktion der M.SssI-Methyltransferase resultiert in der Neusynthese von Viren.....	80
4.3 Herstellung eines genomweiten EBV-Microarrays.....	82
4.3.1 Erstellen einer genomischen Bibliothek	85
4.3.1.1 Planung und PCR-Amplifikation der HKG-Kontrollen.....	85
4.3.1.2 Generierung zweier unabhängiger Sets an dachziegelartig überlappenden PCR-Produkten aus dem EBV-Genom	85
4.3.1.3 Klonierung problematischer PCR-Produkte in den pCR2.1-Vektor.....	89
4.3.1.4 PCR-Amplifikation klonierter subgenomischer EBV-Produkte	89
4.3.2 Reinigung der PCR-Produkte	90
4.3.3 Quantifizierung der PCR-Produkte	90
4.3.4 Spotten des EBV-Microarrays.....	91
4.3.5 Fluoreszenz Markierung der RNA	94
4.3.6 Hybridisierung und Lesen des EBV-Microarrays.....	94
4.3.7 Qualitätskontrolle – Expressionsprofil von EBV in ausgewählten Zelllinien	98
4.3.7.1 Bestimmung der Spezifität durch Hybridisierung mit aRNA EBV-negativer Zelllinien: BJAB und DG75.....	98
4.3.7.2 Genomweites Expressionsprofil der latent EBV-infizierten Zelllinie LCL721	99
4.3.7.3 Genomweites Expressionsprofil viraler Transkripte der Zelllinie B95.8.....	100
4.3.7.4 Genomweites Expressionsprofil von EBV in stabil transfizierten Epithelzellen.....	102
4.3.8 Expressionsprofil von EBV nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen.....	102
5. DISKUSSION.....	106

5.1 Etablierung des Transfektionssystems in HEK293-Zellen.....	108
5.2 Eine epigenetische Modifikation ist für die Kontrolle der latenten und lytischen Phasen von EBV verantwortlich.....	108
5.2.1 Spontane Expression von BZLF1 resultiert nicht in der Induktion des lytischen Zyklus ...	108
5.2.2 Die ektopische Expression von BZLF1 bewirkt die Induktion von wenigen lytischen Genen	109
5.2.3 Das Fehlen von Methylierungsmustern bewirkt den Block in der abortiv lytischen Phase	109
5.2.4 Eine rasche CpG-Methylierung ist entscheidend für einen initialen lytischen Zyklus.....	110
5.2.5 In HEK293-Zellen ist die Methylierung von Rp essentiell für die Induktion der lytischen Phase	111
5.3 Der biphasische Vermehrungszyklus von EBV wird durch epigenetische Mechanismen gesteuert.....	113
5.4 Microarray, eine Methodik um das Expressionsprofil viraler Gene aufzudecken	114
5.4.1 Genomweite EBV-Microarrays	115
5.4.2 Expressionsprofil von EBV in ausgewählten Zelllinien	117
5.4.3 Expressionsprofil von EBV nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen	118
5.5 Ausblick	120
6. ZUSAMMENFASSUNG	122
7. ABKÜRZUNGEN	124
8. LITERATUR.....	127
Anhang.....	143
Danksagung.....	192
Lebenslauf	193

1. EINLEITUNG

1.1 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), auch als Humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnet, gehört zur Familie der γ -Herpesviren. Es ist ein doppelsträngiges DNA-Virus mit einer Genomgröße von 172kb, das etwa 80-100 unterschiedliche Proteine kodiert. EBV wird von der WHO als Karzinogen eingestuft; dies bedeutet, dass *in vivo* humane Tumore bekannt sind, deren Entstehung mit EBV assoziiert werden (Kieff and Rickinson, 2001; Rickinson and Kieff, 2001). Das Besondere an EBV und anderen Herpesviren ist, dass sie nach primärer Infektion im Wirtsorganismus lebenslang persistieren können. Dabei liegt das EBV-Genom im Zellkern infizierter Zellen in der Regel als extrachromosomales Episom vor. Diesen Zustand der viralen Infektion, in dem keine Virusneusynthese stattfindet, bezeichnet man Latenz. In der Latenz repliziert die virale DNA synchron mit dem Zellzyklus; der plasmidale Replikationsursprung (oriP) des EBV integriert als Replikator das EBV-Genom in die Replikationsmaschine der Zelle (Kieff and Rickinson, 2001; Rickinson and Kieff, 2001). Abhängig von der infizierten Zellart liegen zwischen zwei und 250 Kopien des EBV-Genoms in der latent infizierten Zelle vor (Sugden et al., 1979).

Die Virusneusynthese findet in der sog. lytischen Phase statt. In dieser Phase der viralen Vermehrung wird das EBV-Genom vielhundertfach amplifiziert und in linearer Form in die Nukleokapside eingebaut, die die Struktur eines Ikosaeder besitzen. Die Virus-Kapsid-DNA ist nicht mit Histonen assoziiert und weist keine zelluläre Modifikation wie zum Beispiel Methylierungen des Nukleotids Cytosin auf (Dyson and Farrell, 1985; Robertson et al., 1996; Shaw et al., 1979). Bei der Freisetzung von EBV aus der Wirtszelle kommt es zu einer Umhüllung des Nukleokapsids mit der zellulären Zytoplasmamembran, in der virale Glykoproteine eingelagert sind. Zusätzlich befindet sich zwischen Nukleokapsid und Hüllmembran ein proteinhaltiger, amorpher Spalt, das Tegument (Kieff and Rickinson, 2001; Rickinson and Kieff, 2001).

1.1.1 Biologische Relevanz

EBV besitzt einen sehr engen Wirts- und Zelltropismus und infiziert fast ausschließlich menschliche Zellen. Mehr als 90% der Bevölkerung weltweit sind mit diesem Herpesvirus infiziert. Zum ersten Mal wurde EBV von Anthony Epstein und Yvonne Barr aus Zellen eines Burkitt-Lymphoms (BL) isoliert (Epstein et al., 1964). Seit 1968 ist bekannt, dass EBV der Erreger der Infektiösen Mononukleose ist, eine selbstlimitierende lymphoproliferative Erkrankung, die auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt wird. Sie ist die Folge einer Erstinfektion mit EBV im Erwachsenenalter. Die Mehrzahl der Erstinfektionen findet jedoch im Kindesalter bei engem Kontakt mit bereits Infizierten durch Tröpfcheninfektion statt, sie läuft im kindlichen Alter jedoch meist inapparent ab (Faulkner et al., 2000; Kieff and Rickinson, 2001; Rickinson and Kieff, 2001).

EBV infiziert effizient zwei menschliche Zellarten, Epithelzellen und B-Lymphozyten (Rickinson and Kieff, 2001; Sixbey et al., 1984). Da in dem umgebenden Gewebe von Epithelzelltumoren (Nasopharynxkarzinom, Haarzelleukämie) ein hoher Virustiter zu finden ist, wird davon ausgegangen, dass die lytische Vermehrung vorrangig in Epithelzellen stattfindet (Kieff and Rickinson, 2001; Rickinson and Kieff, 2001). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch *in vitro* Experimente mit Plattenepithelzellen, welche spontan Viruspartikel produzieren (Sixbey et al., 1983). Jedoch gibt es keinen eindeutigen Beleg dafür, dass EBV in gesunden Individuen in Epithelzellen des Oropharynx freigesetzt wird. So konnte EBV weder in Mandeln von Erstinfizierten noch persistent infizierten Personen gefunden werden. Im Gegensatz dazu sind die latente wie auch lytische Phase des EBV in B-Lymphozyten dokumentiert (Anagnostopoulos et al., 1995; Karajannis et al., 1997; Niedobitek et al., 1997; Tao et al., 1995). Außerdem können Epithelzellen *in vitro* nur unzureichend mit EBV infiziert werden, von Ausnahmen abgesehen (Feederle et al., 2007). Faulkner und Kollegen gehen deshalb davon aus, dass die unmittelbare Nähe von lymphoidem und epithelalem Gewebe im Oropharynx eine direkte Infektion von B-Lymphozyten durch EBV ermöglicht (Faulkner et al., 2000). Die Frage, ob EBV für die Virusneusynthese tatsächlich Epithelzellen benötigt, ist aber weiterhin unbeantwortet. Sicher ist, dass EBV *in vivo* und *in vitro* B-Lymphozyten sehr effizient infiziert und wachstumstransformiert. Nahezu alle EBV-

infizierten B-Zellen sind latent infiziert; sie stellen wahrscheinlich das Virusreservoir *in vivo* dar.

1.1.2 Vermehrungszyklus

EBV besitzt einen biphasischen Infektionszyklus, der aus einer latenten und einer lytischen, replikativen Phase besteht. Die Infektion von B-Zellen findet hauptsächlich durch die Interaktion zwischen dem EBV Glykoprotein gp350/220 und dem komplementären Oberflächenmolekül CD21 auf der Zelloberfläche statt (Nemerow et al., 1987). Zusätzlich ermöglicht die Interaktion zwischen dem EBV Glykoproteinkomplex gp85-gp25-gp42 und dem Humanen Leukozyten Antigen (HLA) Klasse II Molekül die Endozytose des Virions (Borza and Hutt-Fletcher, 2002; Sinclair and Farrell, 1995). Der erste Kontakt zwischen EBV und B-Lymphozyt findet wahrscheinlich im Oropharynx statt (Faulkner et al., 2000). EBV bewirkt eine massive Proliferation der infizierten Zellen, wobei die Präsentation von latenten EBV-Antigenen auf der Oberfläche der infizierten B-Zelle zu einer starken T-Zell-Antwort führt. Daher rühren auch die typischen Symptome einer infektiösen Mononukleose; Schwellung der Hals-Lymphknoten, Fieber und Mattheit. Bei Menschen mit einer intakten Immunabwehr werden die infizierten, proliferierenden B-Zellen durch zytotoxische T-Zellen weitgehend beseitigt. Es kommt zur Genesung. Werden naive B-Zellen durch EBV transformiert, differenzieren sie im Keimzentrum zu Gedächtnis-B-Zellen; dieselben Zellen, die auch bei einer asymptomatischen Infektion im Kindesalter transformiert werden. In diesen persistiert EBV ein Leben lang in latenter Form (Babcock et al., 1998; Miyashita et al., 1995). Durchschnittlich eine von 50.000 B-Zellen in PBMCs gesunder seropositiver Individuen ist EBV positiv (Miyashita et al., 1995; Tierney et al., 1994). Die latent infizierten Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren zwischen dem Waldeyerschen Ring und dem peripheren Blut, werden aber vom Immunsystem nicht erkannt, da sie keine latenten EBV-Antigene präsentieren (Laichalk et al., 2002). Zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus kommt es *in vivo* z.B. durch eine Antigenantwort, während der die infizierte Gedächtnis-B-Zelle zu einer Plasma-Zelle differenziert. In diesen Zellen findet *in vivo* das lytische Replikationsprogramm statt (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005; Thorley-Lawson and Gross, 2004). In Abbildung 1.1 ist die Interaktion zwischen EBV und dem Wirtsorganismus schematisch dargestellt.

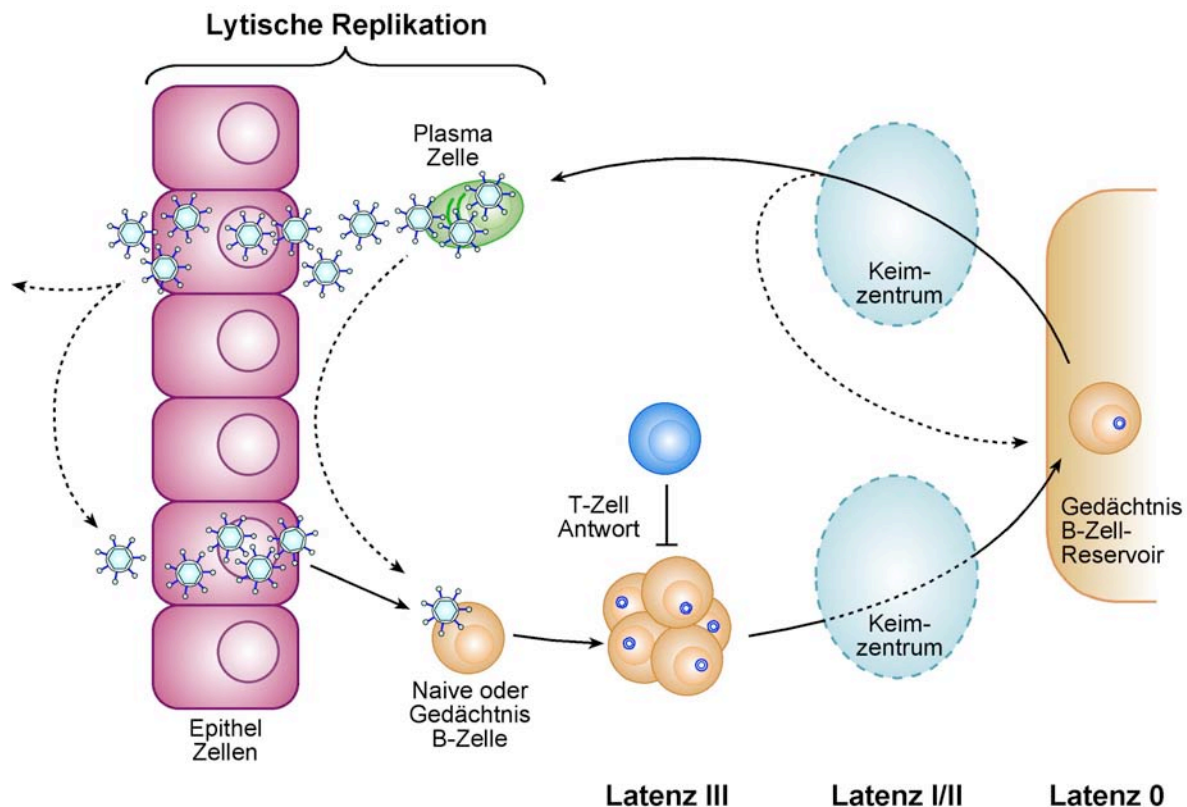


Abb. 1.1.: Interaktion zwischen EBV und Wirtsorganismus

Als Ort der primären Infektion mit EBV werden die Zellen des Oropharynx vermutet. Eine Infektion von B-Zellen findet in dem nahe gelegenen, die Mandeln umgebenden lymphatischen Gewebe statt. Die infizierten B-Zellen werden von EBV wachstumstransformiert und exprimieren eine Anzahl spezifischer latenter EBV-Gene. Der Großteil der proliferierenden B-Zellen (Latenz III) wird durch eine primäre, spezifische T-Zell Antwort gegen latente Antigene beseitigt. Einige infizierte B-Zellen entgehen der Eliminierung und etablieren ein Reservoir an EBV-infizierten Gedächtnis B-Zellen (Latenz 0). EBV-infizierte, ruhende B-Zellen können an Keimzentrumreaktionen beteiligt werden, sodass es zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus und zu einer Differenzierung zur Plasmazelle kommen kann. Wandert die Plasmazelle in den Bereich des Oropharynx und synthetisiert dort Nachkommenviren, kann eine lytische Replikation von EBV in permissiven epithelialen Zellen folgen. Diese geben kleine Mengen an EBV in den Oropharynx ab. Es kann aber auch zu einer erneuten Infektion von naiven und/oder Gedächtnis B-Zellen kommen (adaptiert nach Young and Rickinson, 2004).

1.1.2.1 Latenz

Während der Latenz liegt das EBV-Genom als zirkulär geschlossenes Episom im Zellkern vor und exprimiert eine geringe Anzahl viraler Gene. Das EBV-Genom in latent infizierten Zellen ist wie die chromosomale DNA der Wirtszelle in Nukleosomen verpackt (Dyson and Farrell, 1985; Robertson et al., 1996; Shaw et al., 1979). Das EBV-Genom repliziert gemeinsam mit der zellulären DNA einmal pro S-Phase (Adams, 1987) und wird während der Mitose auf die Tochterzellen verteilt (Kirchmaier and Sugden, 1995). Für die Aufrechterhaltung der viralen DNA werden ausschließlich das virale *cis*-Element *oriP* und das virale Protein EBNA-1 benötigt (Yates et al., 1984; Yates et al., 1985). Die Modifikation des viralen Genoms durch

Methylierung von CG-Dinukleotiden spielt bei der Regulation der viralen Genexpression eine wichtige Rolle (Ambinder et al., 1999; Day et al., 2007; Minarovits et al., 1991; Park et al., 2007; Robertson et al., 1996). Zusätzlich ist die Repression der viralen Genexpression wichtig, um einer Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen (Ambinder et al., 1999). So scheint die Methylierung der EBV-DNA ein wichtiger Teil des Lebenszyklus von EBV *in vivo* zu sein.

Die unterschiedlichen Expressionsmuster von latenten EBV-Genen sind mit verschiedenen Typen der Latenz assoziiert. Diese können *in vitro* durch Infektion von primären B-Zellen (Latenz III, Wachstumsprogramm) oder in Zelllinien EBV-assoziiierter Tumore (Latenz I und II) beobachtet werden (Kieff and Rickinson, 2001; Rickinson and Kieff, 2001). Nach primärer Infektion von B-Zellen mit EBV wird nur eine sehr geringe Zahl an viralen Genen exprimiert (siehe auch Abbildung 1.2). Die Proteine latenter Gene werden für die Transformation der infizierten Zelle und die Aufrechterhaltung des viralen Genoms in der Zelle benötigt. Während der proliferativen Phase (Latenz III) kommt es zur Entstehung von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs), in denen sechs EBV-nukleäre-Proteine (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und EBNA-LP) und drei latente Membranproteine (LMP-1, LMP-2A und -2B) exprimiert werden. Zusätzlich werden in dieser Phase nicht-kodierende kleine RNAs (ncRNAs) detektiert (EBERs und Transkripte der BamHI-A-Region) (Thorley-Lawson, 2001). Bedingt durch die fortschreitende Methylierung des EBV-Genoms kommt es zu einem Promotorwechsel (Kintner and Sugden, 1981; Woisetschlaeger et al., 1990). So wird die Transkription der latenten Gene in frisch infizierten B-Zellen vom W-Promoter (Wp) gesteuert. In länger etablierten LCLs wird dieser jedoch stark methyliert (62-82%), sodass die Regulation latenter Gene von dem unmethylierten C-Promotor (Cp) übernommen wird (Altmann et al., 2006; Tierney et al., 2000). Dadurch kommt es zu einer eingeschränkten Expression latenter Gene. In der Latenz II werden ausschließlich EBNA-1, LMP-1, LMP-2A und EBV-kodierte RNAs (EBERs) exprimiert (Babcock and Thorley-Lawson, 2000). Es wird davon ausgegangen, dass die beiden LMPs die nötigen Signale produzieren, die für die Keimbahnreaktion und Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen benötigt werden (Casola et al., 2004). Bei zunehmender Methylierung des EBV-Genoms findet aber auch eine Repression des Cp statt, sodass während der Latenz I nur noch das EBNA1-Protein exprimiert wird, das für die Erhaltung des viralen Genoms in der Zelle

unerlässlich ist. Die Expression des EBNA-1 Gens erfolgt nun durch den Q-Promotor (Qp) (Nonkwelo et al., 1996; Schaefer et al., 1995). Dieser Zustand ist im Gedächtnis-B-Zell Reservoir gesunder Individuen vorhanden. Es findet keine Immunantwort gegen die nicht proliferierenden, infizierten B-Zellen statt. Im Gegensatz dazu werden in der äußerst selten vorkommenden Variante der Latenz 0 ausschließlich die EBERs detektiert.

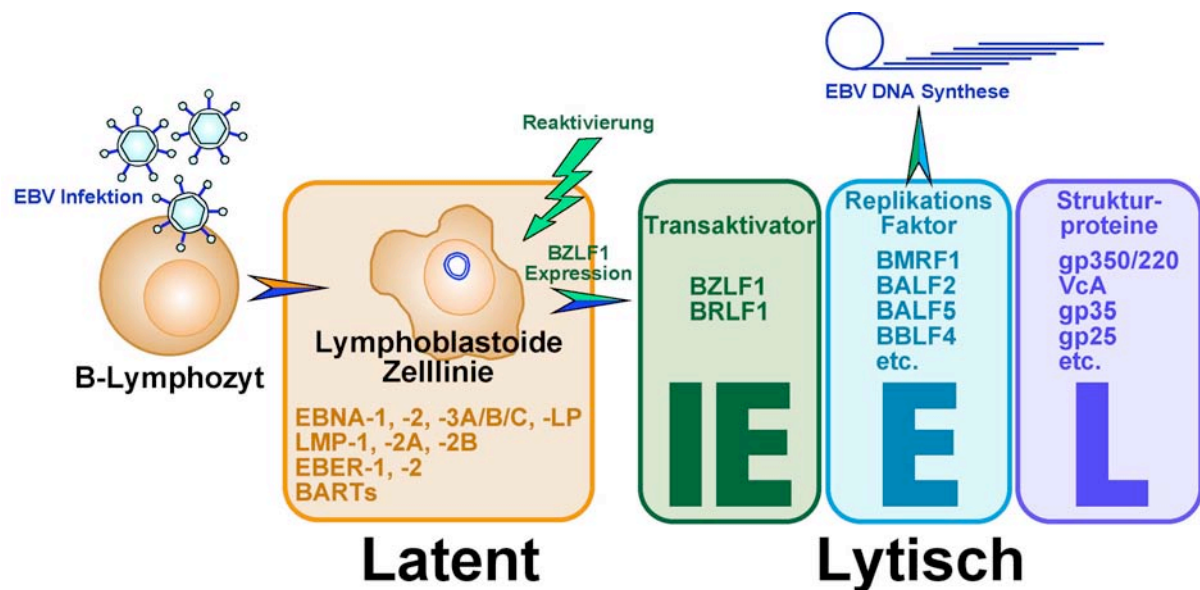


Abb. 1.2: Der Vermehrungszyklus von EBV

Die Infektion mit EBV führt zu Proliferation und Wachstumstransformation der infizierten B-Zelle. Die so entstehende Lymphoblastoide-Zelllinie (LCL) exprimiert eine limitierte Anzahl von EBV-Genen, die typisch für die Latenz III ist: sechs nukleäre-Proteine (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, und EBNA-LP), drei Membranproteine (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) und nicht-kodierende RNAs (EBERs, BARTs). Diese Genprodukte treiben die infizierte B-Zelle in den Zellzyklus, halten die Proliferation aufrecht und verhindern die Apoptose. Das EBV-Genom liegt im Zellkern der infizierten Zelle als histonverpacktes, episomales Plasmid vor. Die Reaktivierung der lytischen Phase beginnt immer mit der Expression der beiden lytischen 'immediate-early'-Gene (IE) BZLF1 und BRLF1. Die beiden Gene kodieren für zwei Transkriptionsfaktoren, die virale Promotoren aktivieren und so zu einer geordneten viralen Genexpression führen: Aktivierung der 'early' (E) Genexpression resultiert in DNA-Replikation, gefolgt von der Expression der 'late' (L)-Gene, die v.a. virale Strukturproteine kodieren. Im produktiven lytischen Zyklus wird das EBV-Genom durch die virale Replikationsmaschine 100-1000fach amplifiziert (adaptiert nach Tsurumi et al., 2005).

1.1.2.2 Der lytische Zyklus

Die Replikation der EBV-DNA findet in spezifischen Regionen des Nukleus, den sog. Replikations-Kompartments, statt. Hier werden mehrere Replikationsrunden durch den lytischen Replikationsursprung (oriLyt) initiiert (Fixman et al., 1995; Hammerschmidt and Sugden, 1988) und das EBV-Genom 100 bis 1000fach amplifiziert. Nach Initiation des lytischen Zyklus in B-Zellen oder Epithelzellen liegt das EBV-Genom in linearer, unmodifizierter Form vor (Zalani et al., 1996).

Die Reaktivierung der lytischen Phase beginnt immer mit der Expression der beiden viralen lytischen Schlüsselgene BZLF1 und BRLF1. Sie gehören zur Klasse der 'immediate early' (IE)-Gene, deren Promotoren in Abwesenheit der viralen *de novo* Proteinsynthese aktiviert werden. Es ist jedoch weiterhin fraglich, ob BRLF1 wirklich in die Klasse der IE-Gene einzuordnen ist (Amon et al., 2004; Flemington et al., 1991). BZLF1 und BRLF1 kodieren für zwei Transkriptionsfaktoren, die virale und spezielle zelluläre Promotoren (siehe S. 18 und 21) aktivieren. Dies führt zu einer geordneten viralen Genexpression: (i) Aktivierung der 'early' (E)-Gene, deren Produkte die virale lytische DNA-Replikation veranlassen und daran mitwirken; (ii) Expression der 'late' (L)-Gene, die v.a. virale Strukturproteine kodieren (Yates et al., 1984) (siehe Abbildung 1.2). Dabei wirken BZLF1 und BRLF1 individuell und synergistisch, um diejenigen Genen zu aktivieren, die für die lytische Phase und Virusproduktion von Nöten sind.

Die Rolle der beiden IE-Gene konnte mit Hilfe von EBV-Mutanten bestimmt werden. Feederle *et al.* zeigte, dass jedes der beiden Gene bestimmte Aufgaben in der viralen lytischen Phase übernimmt, jedoch keines alleine fähig ist, den kompletten lytischen Zyklus zu aktivieren. So werden etliche Gene entweder durch das BZLF1-Protein Zta oder durch das BRLF1-Protein Rta induziert. Deshalb sind beide Gene für die vollständige Induktion des lytischen Zyklus unbedingt erforderlich (Feederle et al., 2000). Jedoch gibt es interessante Unterschiede in den Mechanismen, wie BZLF1 und BRLF1 die lytische Phase initiieren.

BZLF1

Bei Studien an dem defekten EBV-Genom der BL-Zelllinie P3HR-1 fanden Countryman und Kollegen, dass die Induktion des lytischen Zyklus durch das IE-Protein Zta kontrolliert wird (Countryman et al., 1987; Countryman and Miller, 1985). Unabhängig davon konnte auch Takada *et al.* das Zta-kodierende Gen BZLF1 identifizieren (Takada et al., 1986). Jedoch muss für eine erfolgreiche Induktion des lytischen Zyklus *in vitro* eine stabil latente Situation vorhanden sein (Chevallier-Greco et al., 1986).

Das auch unter den Namen ZEBRA, Z oder EB1 bekannte Zta-Protein wird von dem viralen Gen BZLF1 kodiert. Zta ist ein 245 Aminosäure (aa) großes Protein, das in fünf funktionelle Regionen unterteilt werden kann: (i) eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TA; aa 1-167), (ii) eine regulatorische Domäne (aa 168-

177), (iii) eine zentrale DNA-Binde-Domäne (DNA; aa 178-194), (iv) eine „coiled-coil“ Dimerisierungsdomäne (DIMER; aa 195-227) und (v) eine zusätzliche Aktivierungsdomäne (aa 228-245) (siehe Abbildung 1.3) (Chang et al., 1990; Chi and Carey, 1993; Countryman and Miller, 1985; Farrell et al., 1989; Flemington and Speck, 1990c; Flemington et al., 1992; Kouzarides et al., 1991).

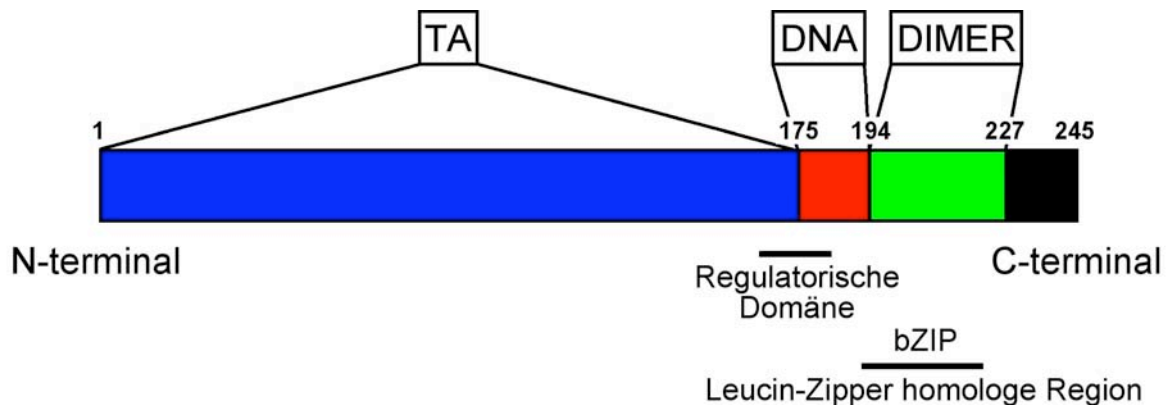


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Zta

Dargestellt ist das gesamte Zta-Protein mit seinen Domänenstrukturen und deren Aminosäurekoordinaten. Die drei wichtigsten Domänen sind hervorgehoben: die Transaktivierungsdomäne (TA) in blau, die DNA-Binde-Domäne (DNA) in rot und die Dimerisierungsdomäne (DIMER) in grün. Die Position der regulatorischen Domäne sowie die Leucin-Zipper homologe Region (bZIP) sind vermerkt.

Da die DNA-Binde-Domäne und die Dimerisierungsdomäne von Zta teilweise mit der bZIP ('basic leucine zipper') Domäne der zellulären Transkriptionsfaktoren (TF) c-Fos/c-Jun (AP-1 Familie) oder C/EBP α übereinstimmt, wird Zta den bZIP-Proteinen zugeordnet (Farrell et al., 1989; Kouzarides et al., 1991). bZIP-Proteine interagieren als Dimer und binden nur als solches die DNA mit der jeweiligen bZIP-Domäne (Busch and Sassone-Corsi, 1990; Kouzarides and Ziff, 1989). Interessanterweise erkennt Zta viel mehr DNA-Bindestellen als die anderen bZIP-Proteine, da es mehr Kontakte mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA knüpft (Petosa et al., 2006), es bindet jedoch im Vergleich zu anderen bZIP-Proteinen DNA mit geringer Affinität (Hicks et al., 2003; Hicks et al., 2001). Desweiteren fehlt Zta das für bZIP-Proteine typische Wiederholungsmotiv an Leuzinresten (Chang et al., 1990; Farrell et al., 1989; Flemington and Speck, 1990c; Kouzarides et al., 1991). Durch ein Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen binden zwei Zta-Monomere aber dennoch DNA als Dimer. Gleichzeitig bewirken fünf hydrophobe Aminosäureseitenketten innerhalb des Bindemotivs jedes Monomers, dass Zta keine Heterodimere mit zellulären bZIP-Proteinen bilden kann (Petosa et al., 2006).

Durch die direkte Interaktion mit ZREs (Z α -responsiven Elementen) kann Z α die Transkription von viralen, zellulären und rekombinanten DNAs initiieren. Dabei vermittelt der aminoterminal Bereich des Proteins (TA) die transkriptionelle Aktivität (Farrell et al., 1989; Flemington et al., 1992; Urier et al., 1989). Zusätzlich bindet Z α an TPA-responsive Elemente (TRE), die mit den AP-1 Bindestellen von c-Fos/c-Jun identisch sind (Farrell et al., 1989; Lieberman et al., 1990; Packham et al., 1990; Urier et al., 1989). Auch wenn ZRE- und TRE-Motive Homologien aufweisen, werden ZREs nicht von zellulären AP-1 Transkriptionskomplexen erkannt (Lieberman et al., 1990).

Die Transkription des BZLF1-Gens wird von dem BZLF1-Promotor Z β reguliert. Das Ergebnis ist ein 0,9kb großes Transkript, das aus drei Exons besteht. Es konnte aber auch eine Spleißvariante detektiert werden, in der das zweite Exon fehlt (Lau et al., 1992). Dies ist von besonderer Interesse, da dieses Exon die DNA-Binde-Domäne enthält. Jedoch ist die Funktion dieser Splicevariante während der lytischen Phase nicht geklärt.

Es existieren mehrere zelluläre Proteine, die Z β transkriptionell aktivieren oder inhibieren können. Dabei spielt die Region -221 bis -12 aa 'upstream' vom BZLF1 Transkriptionsstart eine wichtige Rolle, da sie mehrere *cis*-aktive Motive enthält (ZI-ZV) (Abbildung 1.4). Diese sind für die Erhaltung einer niedrigen „basalen“ Expression während der Latenz und einer starken Aktivierung während der lytischen Phase verantwortlich (Daibata et al., 1994). Die ZI-Domäne besteht aus vier Motiven, ZIA bis ZID. Diese sind für die Reaktivierung der lytischen Phase essentiell, da sie die Transkription von BZLF1 durch Binden zellulärer Faktoren (MEF2D und Sp1/Sp3) initialisieren (Flemington and Speck, 1990d; Liu et al., 1997a; Liu et al., 1997b; Shimizu and Takada, 1993). Die ZII-Domäne besitzt eine Variante des CRE-Motivs (TGACATCA) und bindet ATF1, ATF2, CREB und c-Jun. Zusätzlich besitzt ZII ein SRE-ähnliches Motiv, sodass Smad3/Smad4-Dimere Z β aktivieren können (Liang et al., 2002; Liu et al., 1998; MacCallum et al., 1999; Ruf and Rawlins, 1995; Wang et al., 1997b). Die dritte Domäne ZIII wird in zwei Motive, ZIIIA und ZIIIB, unterteilt. Beide bestehen aus ZREs, die von Z α selbst erkannt werden und bei der positiven Autoregulation von BZLF1 wichtig sind (Binne et al., 2002; Flemington and Speck, 1990a; Lieberman et al., 1990). Zusätzlich kann aber der zelluläre TF C/EBP α an ZIIIB binden (Wu et al., 2003; Wu et al., 2004). Es wurde auch ein negatives Element, ZV, in Position -17 bis -12 beschrieben, das durch ZEB ('zinc-finger E-box

binding protein') gebunden wird (Binne et al., 2002; Kraus et al., 2001; Kraus et al., 2003). Außerdem existieren weiter distal (-554 bis -221) negative Elemente, die z.B. durch den zellulären TF YY1 gebunden werden (Liu et al., 1998; Montalvo et al., 1995; Montalvo et al., 1991; Schwarzmann et al., 1994). Abbildung 1.4 zeigt einen Überblick über den BZLF1-Promotor Zp, seine bekannten proximalen regulatorischen Elemente und die sie bindenden zellulären Faktoren.

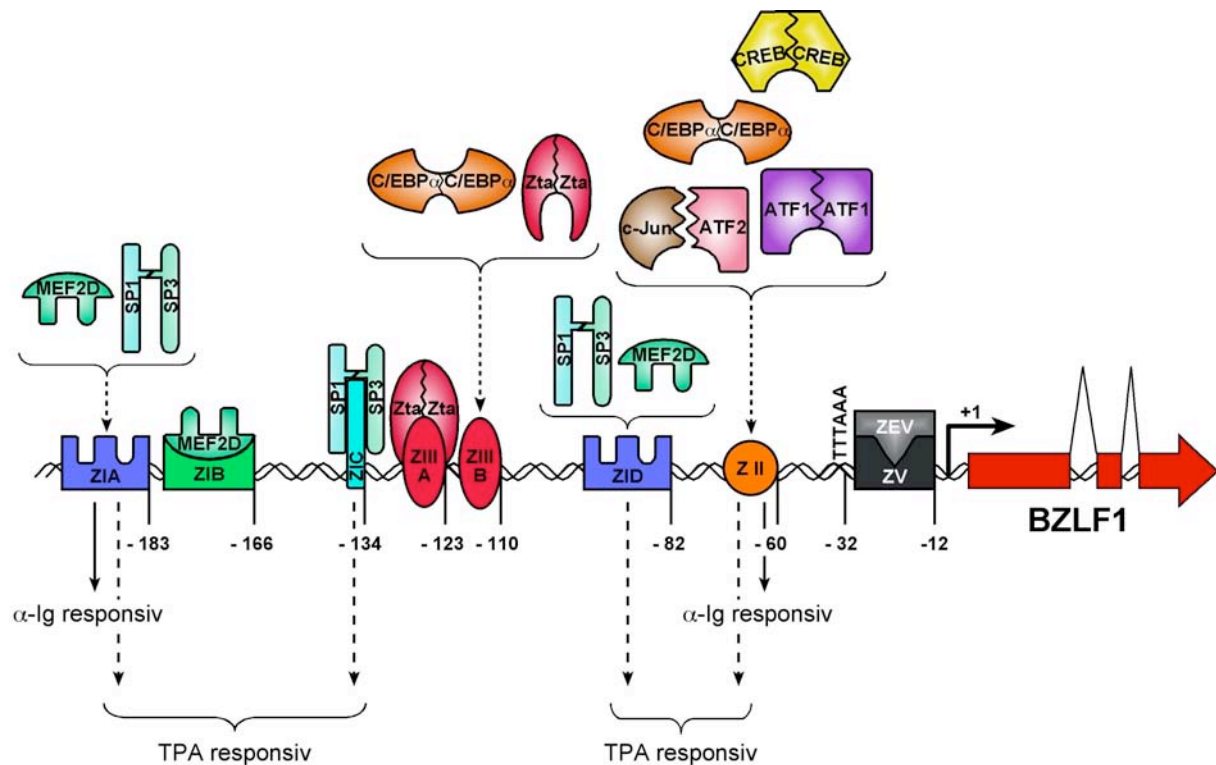


Abb. 1.4.: Der BZLF1-Promotor Zp

Vereinfachte schematische Darstellung des BZLF1-Promotors Zp mit den bekannten proximalen regulatorischen Elementen. Die regulatorischen Elemente sind mit ihren Aminosäurekoordinaten im Verhältnis zum Transkriptionsstart angegeben (nicht skaliert). Es existieren drei Gruppen an positiv-regulierenden Elementen: ZI (A-D) sind AT-reiche Elemente, die Sp1, Sp3 und MEF2D binden; ZII ist eine dem CRE/AP-1-Bindemotiv homologe Region und bindet verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren; ZIIIA und B sind Zta-responsive Elemente (ZREs) und spielen v.a. bei der Selbstaktivierung von BZLF1 eine wichtige Rolle. ZEV ist als Repressor der BZLF1-Transkription bekannt und bindet an ZV. ZIA und ZII gelten als wichtige Elemente für die Induktion des lytischen Zyklus nach α-Ig Quervernetzung. Als TPA-responsive Elemente sind ZIA, ZIC, ZID und ZII beschrieben.

Zta erfüllt viele Funktionen während des lytischen Zyklus: (i) es aktiviert die Transkription viraler Gene durch direktes Binden ihrer Promotoren, z.B. den BRLF1-Promotor Rp (Holley-Guthrie et al., 1990; Ragoczy and Miller, 1999), (ii) es aktiviert die Transkription von 'early'-Genen gemeinsam mit Rta; (iii) es inhibiert die transkriptionelle Aktivität von Rta an 'late'-Genen in der frühen Phase des lytischen

Zyklus; (iv) es fungiert als viraler Bestandteil der Replikationsmaschine (Fixman et al., 1992; Schepers et al., 1993) (siehe Abbildung 1.5).

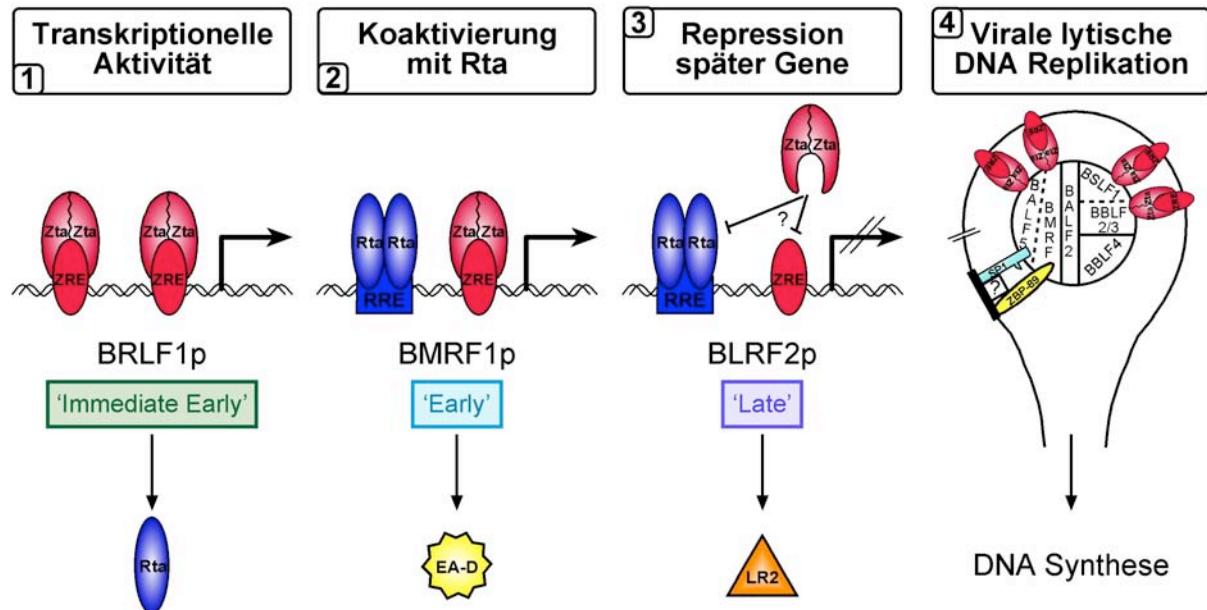


Abb. 1.5: Verschiedene Eigenschaften des EBV-Proteins Zta

Transkriptionelle Aktivität durch direkte Bindung an Sequenzen (ZREs) in Promotoren von Zielgenen (1). Aktivierung der BMRF1 Transkription gemeinsam mit Rta, durch Binden des BMRF1-Promotors (2). Repression transkriptioneller Effekte Rta's am BLRF2-Promotor (3). Beteiligung an der lytischen DNA-Replikation durch Interaktion mit dem BBLF4-BDLF1-BBLF2/3-Komplex und Binden des oriLyt (4) (übernommen aus Miller et al., 2007).

Es sind virale Gene bekannt, deren transkriptionelle Aktivierung ausschließlich durch Zta erfolgt. Dabei bindet Zta an ZREs oder AP-1 ähnlichen Motiven in den Promotoren der Zielgene. Das wohl bedeutendste Gen, das durch direktes Binden von Zta transaktiviert wird, ist BRLF1. Zusätzlich konnte eine transaktivierende Funktion bei BMRF1, BBLF1 und oriLyt gezeigt werden (Feederle et al., 2000; Holley-Guthrie et al., 1990; Schepers et al., 1996). Interessanterweise kann Zta auch die eigene Transkription aktivieren, indem es direkt an ZREs im Zp bindet oder indirekt den MAP-Kinase-Signalweg induziert (siehe Kapitel 1.3). Zta besitzt aber auch reprimierende Eigenschaften. So unterbindet Zta die durch Rta regulierte Expression des 'late'-Gens BLRF2 (Giot et al., 1991; Ragoczy and Miller, 1999). Jedoch ist die biologische Funktion dahinter weiterhin unklar.

Zta ist ein multifunktionelles Protein, das nicht nur als Transkriptionsfaktor fungiert, sondern auch die virale lytische Replikation von EBV einleitet. Dabei bindet Zta mit der DNA-Binde-Domäne an ZREs im oriLyt und initiiert die DNA-Replikation mit Hilfe der Transaktivierungsdomäne (Schepers et al., 1993). Für die Regulation der lytischen Replikation bildet Zta einen Komplex mit Produkten von sechs weiteren viralen Genen (BALF5, BMRF1, BALF2, BBLF4, BSLF1, BBLF2/3) und zwei

zellulären TFs (ZBP-89, Sp1) (Baumann et al., 1999), dargestellt in Abbildung 1.5 (Zusammenfassung in Tsurumi, 2001).

Zusätzlich beeinflusst Zta zelluläre Signalwege: (i) es aktiviert MAP-Kinasen wie p38 und JNK (Adamson et al., 2000); (ii) es reguliert den Zellzyklus (Cayrol and Flemington, 1996a; Cayrol and Flemington, 1996b; Flemington, 2001; Wu et al., 2003); (iii) es besitzt immunmodulatorische Eigenschaften durch Inhibierung der Interferone TNF- α und NF- κ B (Adamson et al., 2000; Morrison and Kenney, 2004; Morrison et al., 2004; Morrison et al., 2001). Zta kann mit mehreren zellulären Proteinen interagieren und z.T. deren Transkription regulieren oder ihre Funktion für eigenen Zwecke nutzen. So wird z.B. die c-Fos Expression durch Binden eines AP-1 Motivs in dessen Promoter induziert (Flemington and Speck, 1990b). Es wurde auch gezeigt, dass Zta den Zellzyklus reguliert, indem es mit der p65-Untereinheit von NF- κ B, mit dem 'Retinoic acid receptor' (RAR) und dem Tumorsuppressorprotein p53 interagiert (Gutsch et al., 1994a; Sista et al., 1993; Zhang et al., 1994). Dabei unterbricht Zta in verschiedenen Epithelzelllinien den Zellzyklus in G₀/G₁ durch Induktion des p53 Proto-Oncogens, durch Interaktion mit dem zellulären 'CCAAT/enhancer binding protein' C/EBP α und den cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Inhibitoren p21/WAF-1/CIP-1 und p27/KIP-1 (Cayrol and Flemington, 1996a; Cayrol and Flemington, 1996b; Rodriguez et al., 1999; Wu et al., 2003; Wu et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass es zwei Gründe dafür gibt, warum EBV den Zellzyklus steuert, wenn es die lytische Phase durchläuft: (i) die Expression zellulärer Gene, die für die virale DNA-Replikation benötigt werden, wird sichergestellt; (ii) die Mitose wird verhindert, solange die lytische Phase noch nicht vollendet ist. Sinclair *et al.* gibt einen guten Überblick über die Interaktionen von Zta mit zellulären Genen (Sinclair, 2003).

BRLF1

Das zweite virale Gen, das bei der Induktion des lytischen Zyklus eine entscheidende Rolle spielt, ist BRLF1. Das vollständige lytische Programm kommt nur zustande, wenn beide IE-Proteine, Zta und Rta, exprimiert werden (Shimizu et al., 1989). Jedoch kann Rta, im Gegensatz zu Zta, den vollständigen lytischen Zyklus nur in bestimmten Zellarten initiieren (Countryman and Miller, 1985; Ragoczy et al., 1998; Rooney et al., 1988; Takada et al., 1986; Zalani et al., 1996).

Das von BRLF1 kodierte Protein Rta ist im Nukleus und im Zytoplasma präsent (Darr et al., 2001; Hsu et al., 2005). Es besteht aus 605 aa und besitzt keine bisher bekannten zellulären Homologe. Die Funktionen von drei Bereichen des Proteins sind definiert: der N-Terminus besitzt eine überlappende DNA-Binde- (aa 1-280) und Dimerisierungsdomäne (aa 1-232) und die Transaktivierungsdomäne befindet sich am C-terminalen Bereich (aa 520-605) (siehe Abbildung 1.6) (Manet et al., 1991).



Abb. 1.6: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von Rta

Dargestellt ist das gesamte Rta-Protein mit seinen Domänenstrukturen und deren Aminosäurekoordinaten. Die DNA-Binde-Domäne (rot), die Dimerisierungsdomäne (grün) und die Transaktivierungsdomäne (blau) sind gezeigt.

Rta ist ebenso wie Zta ein Transkriptionsfaktor, der als Homodimer an DNA bindet. Dabei aktiviert es die Transkription von Zielgenen auf zwei unterschiedliche Arten. Einerseits bindet Rta in Promotoren von Zielgenen mit hoher Spezifität an GC-reiche Motive, sog. RREs ('Rta-responsive element') (Gruffat et al., 1992; Gruffat et al., 1990; Gruffat and Sergeant, 1994). Andererseits kann die Transkription von Zielgenen, die keine RREs besitzen, durch indirekte Mechanismen eingeleitet werden. Dabei sind mindestens drei Beispiele bekannt: (i) Rta aktiviert Zp indirekt durch den MAP-Kinase-Signalweg (siehe auch Kapitel 1.3) (Adamson et al., 2000); (ii) Rta reguliert den eigenen Promotor Rp durch Sp1/Sp3 Elemente (Ragoczy and Miller, 2001); (iii) Rta aktiviert die EBV DNA-Polymerase (BALF5) durch USF und E2F-Bindemotive (Liu et al., 1996).

Der BRLF1-Promotor Rp aktiviert die Expression von BRLF1, das aus einem Exon besteht. Neben Rta (2,9kb) können aber auch weitere Produkte entstehen, die aus kodierenden Bereichen von BZLF1 und BRLF1 bestehen (Manet et al., 1989). Rp besitzt einige regulatorische *cis*-aktive Elemente im Bereich -279 bis +4 aa relativ zum Transkriptionsstart von BRLF1 (Abbildung 1.7). Es existiert eine Bindestelle für den zellulären TF NF1 und zwei Bindestellen für YY1, wobei eine davon direkt auf dem Transkriptionsstart liegt und so womöglich eine starke repressorische Wirkung

hat. Zusätzlich befinden sich zwei Bindestellen für die zellulären TFs Zif268 (Egr1) und Sp1/Sp3 im Rp. Durch die beiden Sp1-Motive kann Rta den eigenen Promotor regulieren, wobei die proximale Sp1-Domäne v.a. bei der Autoregulation in Abwesenheit von Zta wichtig ist (Flemington and Speck, 1990a; Glaser et al., 1998; Liu and Speck, 2003; Ragoczy and Miller, 2001; Sinclair et al., 1991; Zalani et al., 1997; Zalani et al., 1995; Zalani et al., 1992). Durch Binden an ZRE-Motive (ZRE1-3) in latent infizierten Zellen aktiviert Zta den Rp, sodass beide Proteine gemeinsam die gesamte lytische Kaskade initialisieren können (siehe Kapitel 1.3). Bhende und Kollegen haben 2004 das dritte ZRE (ZREIII) entdeckt, das von Zta ausschließlich in CpG-methyliertem Zustand gebunden wird. Im Vergleich dazu wird ZREII in methylierten und unmethyliertem Zustand gebunden, ZREI enthält kein methylierungssensitives CpG-Motiv (Bhende et al., 2004; Bhende et al., 2005). DNA-Methylierung könnte v.a. in latent infizierten Zellen wichtig sein, da dort das EBV-Genom zum größten Teil methyliert vorliegt (siehe Kapitel 1.1.2.1).

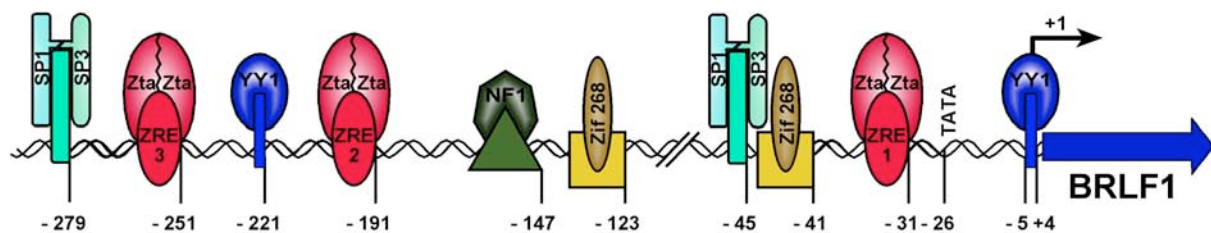


Abb. 1.7.: Der BRLF1-Promotor Rp

Vereinfachte schematische Darstellung des BRLF1-Promotors Rp mit den bekannten proximalen regulatorischen Elementen. Die regulatorischen Elemente sind mit ihren Aminosäurekoordinaten im Verhältnis zum Transkriptionsstart angegeben (nicht skaliert). In Rp existieren Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren wie SP1, YY1 und Zif268 (Egr1). Durch das Sp1 Element wird die Selbstaktivierung von Rp durch Rta vermittelt. ZRE1-3 sind Zta-responsive Elemente und spielen bei der Induktion des Rp durch Zta eine wichtige Rolle.

Ebenso wie Zta aktiviert Rta die Transkription viraler Gene. Dabei können drei Gruppen unterschieden werden: (i) Gene die durch Rta unabhängig von Zta aktiviert werden (z.B. BMLF1 oder BaRF1) und (ii) Gene die gemeinsam mit Zta durch Binden der Zielpromotoren aktiviert werden (z.B. BMRF1 oder BHLF1) (Chen et al., 2005; Chevallier-Greco et al., 1986; Cox et al., 1990; Francis et al., 1999; Holley-Guthrie et al., 1990; Quinlivan et al., 1993). Eine Übersicht über sämtliche virale Gene, deren Expression in RAJI-Zellen unmittelbar durch Rta reguliert wird, haben Lu und Kollegen 2006 mit Hilfe eines genomweiten EBV-Microarrays aufgestellt (Lu et al., 2006). Es existiert eine weitere Gruppe von viralen Genen (iii), deren Expression indirekt von Rta gesteuert wird, da sie keine RREs in ihren Promotoren besitzen (z.B. BZLF1 oder BALF5). Dabei steuert Rta die Aktivität von zellulären TFs durch Protein-

Protein Interaktionen und durch Aktivieren von Signalwegen, die zu posttranskriptionellen Modifikationen der zellulären TFs führen (Adamson et al., 2000; Chang et al., 2004c; Liu et al., 1996; Ragoczy and Miller, 2001). Die TFs binden im Promotor von viralen Zielgenen und aktivieren diese (Furnari et al., 1992). Jedoch besitzt die transkriptionelle Aktivität von Rta einen gewissen Zelltropismus. So kann Rta in RAJI-Zellen weder Zp noch Rp aktivieren. Im Gegensatz dazu ist Rta in HH514-16-Zellen fähig, beide Promotoren zu aktivieren (Ragoczy and Miller, 1999). Möglicherweise aktiviert Rta den eigenen Promotor Rp v.a. in einem EBV-positiven Zellhintergrund, wohingegen Zta für die Aktivierung von Rp eher in einem EBV-negativen Zellhintergrund verantwortlich ist (Ragoczy et al., 1998). Dieser Zelltropismus kann auch bei der Aktivierung von 'early'-Genen beobachtet werden. Die BMRF1 Aktivierung in lymphoiden Zellen wird z.B. durch Zta und Rta reguliert; im Gegensatz zu Epithelzellen, in denen ausschließlich Zta für die Induktion der BMRF1-Expression verantwortlich ist (Chang et al., 2004b).

Auch bei Rta wurde beobachtet, dass eine Interaktion mit und Regulation von zellulären Proteinen stattfindet. Dabei scheint die Interaktion und Regulation des zellulären TF Sp1 sehr wichtig zu sein, da dieser Faktor in der Regulation von verschiedenen zellulären Genen eine entscheidende Rolle spielt. Dies schließt Gene ein, die ihre Funktion im Bereich der Zelldifferenzierung (Marin et al., 1997), Methylierung (Boyes and Bird, 1991), Oncogenese (Lee et al., 2002) oder als Haushaltsgene (HKG) (Suske, 1999) ausüben. Chang und Kollegen haben gezeigt, dass Rta nicht direkt mit Sp1 interagiert, um die Expression viraler Gene zu ermöglichen. Vielmehr bildet es zusammen mit dem Sp1-bindenden Protein 'MBD1-containing chromatin-associated factor 1' (MCAF1) den Sp1-MCAF1-Rta Komplex an Sp1-Bindemotiven von Zielpromotoren. Dadurch wird die Sp1-vermittelte Transkription gesteigert, was u.a. zur Aktivierung weiterer zellulärer Gene führt (z.B. p16 und p21) (Chang et al., 2005). Weitere bekannte zelluläre Proteine, deren Expression durch Rta reguliert werden, sind das Proto-Oncogen c-Myc (Gutsch et al., 1994b), das TATA-Bindeprotein TFIID (Manet et al., 1993) und das CREB-Bindeprotein CBP (Swenson et al., 2001).

Ebenso wie Zta ist auch Rta an der Regulation der viralen DNA Replikation beteiligt. Im Gegensatz zu Zta interagiert Rta aber nicht mit oriLyt, sondern mit dem Retinoblastoma-Protein (pRb), was zu einer Freisetzung von E2F führt. Die Interaktion hat vermutlich zweierlei funktionelle Konsequenzen: (i) E2F aktiviert

bestimmte virale Promotoren wie z.B. BALF5; (ii) E2F vermittelt den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Swenson et al., 1999). Es wurde aber auch beobachtet, dass Rta von zellulären Proteinen modifiziert wird. Durch posttranslationale Modifikation mehrerer Lysine durch SUMO-1 wird die transkriptionelle Aktivierung von RREs verstärkt (Chang et al., 2004a).

1.2 *In vitro* Systeme

Da innerhalb der Familie der Säugetiere ausschließlich mit dem Menschen nahe verwandte Primaten mit EBV infiziert werden können, werden Tierversuche nur sehr begrenzt eingesetzt. Aus diesem Grund werden v.a. Zelllinien, die aus EBV-positiven Tumoren hervorgehen, für die Untersuchung von EBV und dessen Lebenszyklus verwendet. In diesen Zelllinien können die meisten Latenzzustände *in vitro* untersucht werden.

Für den Vorgang der Infektion mit EBV *in vitro* stellen Epithelzellen kein geeignetes Zellsystem dar. Sie werden durch EBV nicht vollständig transformiert; eine epitheliale Zelllinie (HEK293) kann aber die Virusproduktion unterstützen. Transformierende Eigenschaften des EBV werden in humanen B-Zellen beobachtet. Die B-Zelltransformation ist das einzige *in vitro* Modell für EBV, das auch die Untersuchung der herpesviralen Latenz erlaubt.

1.2.1 Epithel-Zell-Systeme

Als Epithel-Zell-System wird von uns die HEK293-Zelllinie verwendet. Sie ist eine humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch Einführung der Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977). HEK293-Zellen können *in vitro* mit EBV-Plasmid-DNA stabil transfiziert werden. In diesen Zellen etabliert EBV eine quasi latente Infektion, die durch transiente Transfektion eines BZLF1 Expressionsplasmids in die lytische Phase und die Virusproduktion übergeht.

1.2.2 B-Zell-Systeme

Primäre B-Zellen werden nach Infektion mit EBV wachstumstransformiert, sog. lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) entstehen *in vitro*. LCLs können von jedem B-Zellspender generiert werden, sodass eine große Zahl unterschiedlicher LCLs existiert. Die B95.8-Zelllinie ist von großem Interesse, da diese EBV-positive

Marmoset-LCL sowohl lytische als auch latente Gene exprimiert. Zwischen 0-5% bzw. 2-10% (unterschiedliche Angaben) der B95.8-Zellen sind immer lytisch aktiv und produzieren Virus. Diese Rate kann mit TPA auf 25% gesteigert werden. B95.8-Zellen besitzen ca. 20 bzw. 40 (unterschiedliche Angaben) EBV-Genome pro Zelle (Miller and Lipman, 1973; Miller et al., 1972; zur Hausen et al., 1978).

1.3 Reaktivierung des lytischen Zyklus *in vitro*

Der lytische Zyklus kann in latent infizierten Zellen auf verschiedenen Arten induziert werden. Dazu zu zählen ist die Quervernetzung des BCR mit α -Ig, die Präsentation von TGF- β (Bauer et al., 1982a; Bauer et al., 1982b; di Renzo et al., 1994; Fahmi et al., 2000; Takada, 1984; Takada and Ono, 1989) oder Chemikalien wie TPA und n-Butyrat. Die Induktion des lytischen Zyklus auf Ebene der Promotoren läuft in mehreren Stufen ab: (i) Durch Signaltransduktion z.B. vom B-Zell-Rezeptor (BCR) vermitteln exogene Faktoren (Sp1/Sp3, MEF2D) aktivierende Signale durch Binden der ZI Domänen im Zp. Dies führt zu einer geringen Expression des BZLF1-Proteins Zta. (ii) Zta kann durch Binden der ZIII Domänen den eigenen Promotor Zp stimulieren. Dies resultiert in erhöhter BZLF1 Expression. (iii) Durch die größere Transkriptmenge ist Zta nun in der Lage, den BRLF1-Promotor Rp zu aktivieren, indem Zta direkt an ZREs im Rp bindet (Flemington and Speck, 1990a; Flemington et al., 1991; Liu et al., 1998; Shimizu and Takada, 1993; Speck et al., 1997). (iv) Rta induziert den lytischen Zyklus auf indirekte Art durch Rekrutieren zellulärer TFs. Die Aktivierung von Rp durch Rta wird dabei durch zwei Signalwege gesteuert, den 'mitogen-activated protein' (MAP)-Kinase-Signalweg (p38 und 'c-Jun N-terminal kinase' JNK) und den 'phosphatidylinositol 3' (PI3)-Kinase-Signalweg (Darr et al., 2001). Die nach Phosphorylierung aktivierten TFs Sp1 und Sp3 binden als Heterodimer an entsprechende Motive im Rp. Dies führt zu einer weiteren transkriptionellen Aktivierung von Rp. (v) Auch die Aktivierung von Zp durch Rta wird durch zelluläre TFs vermittelt, jedoch findet die Aktivierung von Zp wohl ausschließlich über den MAP-Kinase-Signalweg statt (Darr et al., 2001). Dabei phosphorylieren und aktivieren die MAP-Kinasen p38 und JNK zelluläre TFs (Adamson et al., 2000; Derijard et al., 1994; Gupta et al., 1995; van Dam et al., 1995). Die Aktivierung des Zp wird durch Binden des CRE-Motivs in der ZII Bindedomäne vermittelt. Dieses Motiv wird von CREB, ATF-1, ATF-2 und c-Jun

gebunden (Adamson et al., 2000; Liu et al., 1998; Wang et al., 1997b). CREB und ATF-1 werden v.a. durch 'Protein Kinase A' (PKA) (Gonzalez and Montminy, 1989; Rehfuss et al., 1991) modifiziert, wohingegen ATF-2 und c-Jun durch p38 und JNK phosphoryliert und aktiviert werden (Derijard et al., 1994; Gupta et al., 1995; Kyriakis et al., 1994; Raingeaud et al., 1995). Auch Zta ist in der Lage die zelluläre MAP-Kinasen p38 und JNK zu aktivieren. Jedoch bewirkt Zta wohl ausschließlich die Phosphorylierung von ATF-2 und c-Jun, die als Heterodimer an ZII binden (Adamson et al., 2000; Hai and Curran, 1991). Die beiden Bindedomänen ZII und ZIIIB im BZLF1-Promotor werden zusätzlich durch den zellulären Faktor C/EBP α gebunden, der durch Rta an den BZLF1-Promotor rekrutiert wird. Es ist jedoch nicht klar, ob C/EBP α als Homodimer oder Heterodimer (mit CREB, AP1 oder ATF) an Zp bindet (Wu et al., 2003; Wu et al., 2004). In Abbildung 1.8 sind schematisch die Schritte dargestellt, die zur transkriptionellen Aktivierung der beiden IE-Gene BZLF1 und BRLF1 führen.

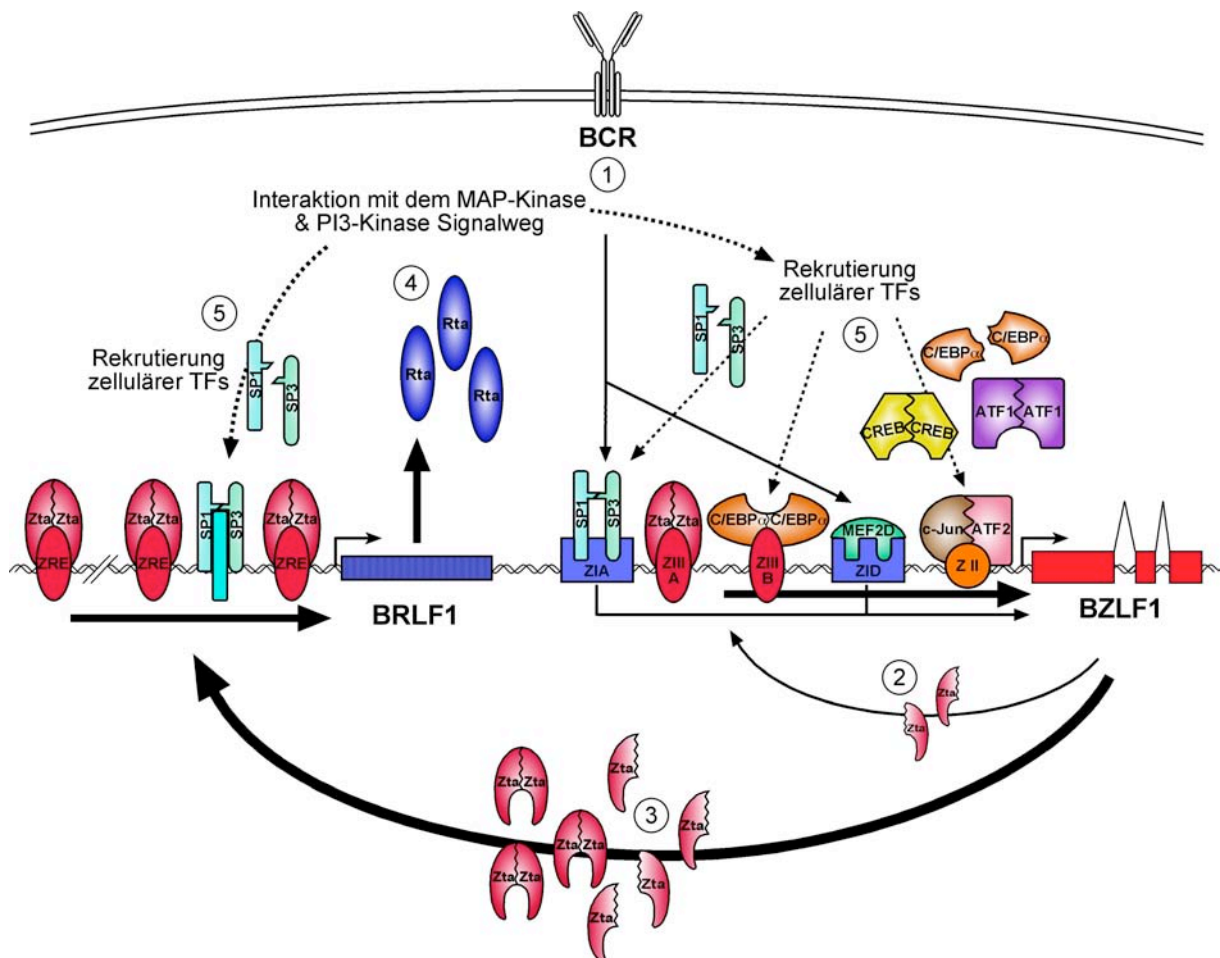


Abb. 1.8: Autokatalytische und wechselseitige Aktivierung von BZLF1 und BRLF1

Nach Quervernetzung des BCR (1) und Signaltransduktion binden zelluläre Transkriptionsfaktoren an ZI- und ZII-Motive im BZLF1-Promotor Zp. Dies resultiert in einer Expression von Zta auf niedrigem Niveau (2), das an die beiden ZREs (ZIIIA- und B-Motiv) im Zp bindet. Es folgt eine verstärkte Transkription von BZLF1 (3). Zta bindet an ZREs im BRLF1-Promotor Rp und bewirkt dessen

Transkription. Im Gegensatz zu Zta, welches seine transkriptionelle Aktivität durch direkte Interaktion mit Zielmotiven (ZREs) im Rp katalysiert, initialisiert das BRLF1-Protein Rta die Transkription von Zp auf indirekte Art. Rta interagiert mit zellulären Signalwegen (4), welche Transkriptionsfaktoren (TFs) zu den beiden Promotoren Zp und Rp rekrutieren (5). Rp wird durch Bindung von Sp1/Sp3 Heterodimere aktiviert. Zp wird an mehreren Motiven von verschiedenen zellulären TFs gebunden.

1.3.1 Reaktivierung durch Stimuli der BCR-Signalkaskade

Die BL-Zelllinie Akata ist ein Modellsystem für die Aktivierung der lytischen Phase des EBV. Diese Zelllinie exprimiert das Oberflächenimmunglobulin Klasse G. Durch Quervernetzung des BCR mit α -IgG Antikörpern kann das Binden von Antigenen imitiert und so die lytische Phase induziert werden (Takada, 1984; Takada and Ono, 1989). Dabei werden drei Signalwege aktiv: (i) der PLC γ -Signalweg, (ii) der Rho-Signalweg und (iii) der Ras/PI3-K-Signalweg (Abbildung 1.9).

Die frühen Ereignisse in der BCR-vermittelten Signalkaskade beinhalten folgende Schritte: das Quervernetzen des BCR führt zu einer schnellen Aktivierung der zytoplasmatischen 'Protein Tyrosinkinase' (PTK) Syk, die für die Phosphorylierung der ITAM-Motive in den zytoplasmatischen Domänen des BCR Korezeptorkomplexes Ig α und Ig β verantwortlich ist. Im Weiteren wird die Tyrosinkinase Lyn durch Phosphorylierung aktiviert, was zu einer Stimulierung von Adaptor- und Effektormolekülen verschiedener Signalwege führt (Zusammenfassung in Campbell, 1999; Kurosaki, 1999; Tamir and Cambier, 1998; Tsubata and Wienands, 2001). Im PLC γ -Signalweg wird Btk direkt durch Syk aktiviert. Es resultiert eine Erhöhung des intrazellulären Calciumniveaus, was zur Folge hat, dass 'Myocyte enhancer factor 2D' (MEF-2D)-Proteine durch das Zusammenspiel von Kinasen (CaMK, Erk5, etc.) und Phosphatasen (Calcineurin) dephosphoryliert und aktiviert werden (Bryant and Farrell, 2002; Dunn et al., 2000; Dunn et al., 2001; Kato et al., 2000; Li et al., 2001; Ornatsky and McDermott, 1996). MEF-2D-Proteine binden an ZIA- und ZIB-Motive im Zp (Liu et al., 1997b). Da Zp durch eine repressive Chromatinstruktur inaktiv gehalten wird, bewirkt die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen (HATs) durch dephosphorylierte MEF-2D-Proteine eine Aktivierung des Zp (Gruffat et al., 2002; Lu et al., 2000a; Lu et al., 2000b; Miska et al., 1999). Somit reagiert Zp direkt auf Änderungen des intrazellulären Calciumniveaus (Daibata et al., 1994). Zusätzlich wird NFAT von Calcineurin dephosphoryliert. MEF-2D und NFAT zusammen binden die Histonacetylase p300, sodass es zu einer weiteren Entspannung in der Chromatinstruktur kommt (Youn et al., 2000; Youn and Liu, 2000). Auch im Rho-Signalweg wird Vav durch

Phosphorylierung aktiviert. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade kommt es zur Aktivierung der beiden MAP-Kinasen p38 und JNK. Diese sind zusammen mit den 'extracellular-signal-regulated kinases' (ERKs) aus dem Ras/PI3-K-Signalweg für das zweite Schlüsselereignis in der lytischen Induktion verantwortlich: die Phosphorylierung und somit Aktivierung der zellulären TFs CREB, ATF-2, ATF-1 und c-Jun (Amon and Farrell, 2005; Campbell, 1999). Diese binden an das ZII-Bindemotiv im Zp und aktivieren dadurch ebenfalls die Transkription von BZLF1.

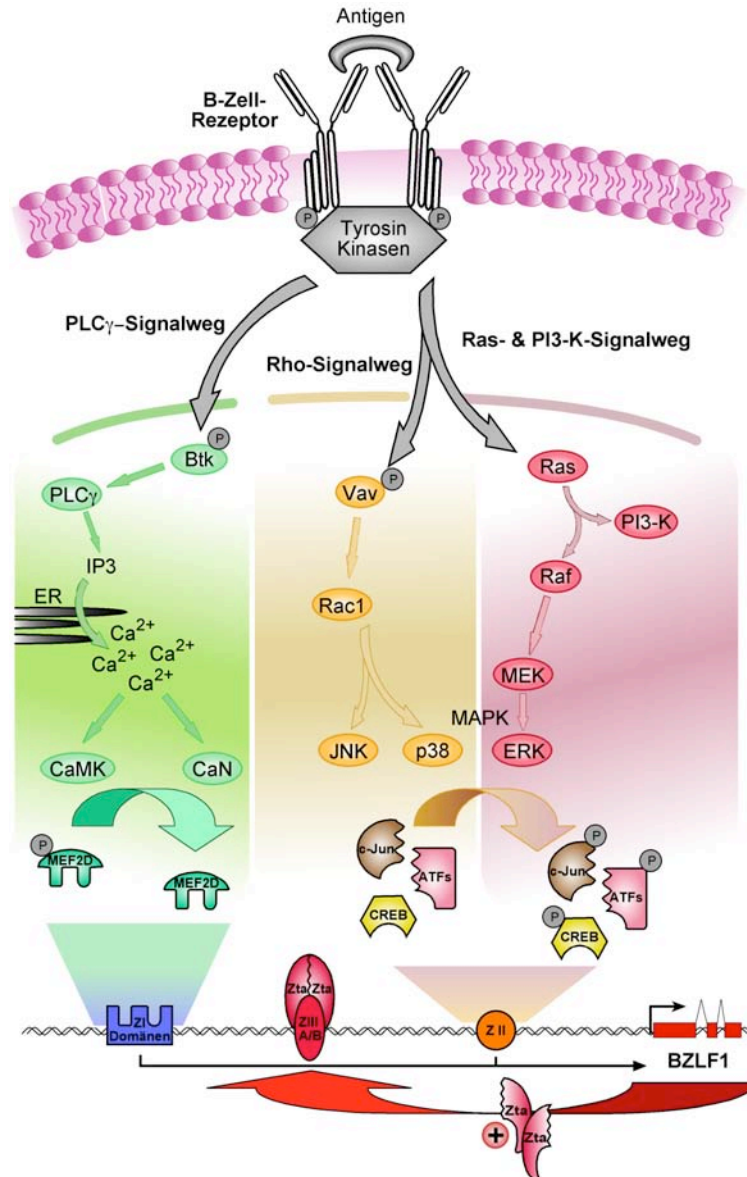


Abb. 1.9: Signalwege des B-Zell-Rezeptors, die zur Aktivierung des Zp führen

Nach Quervernetzung der Membranimmunglobuline durch Antigene (oder *in vitro* durch α -Ig Antikörper) kommt es zur Aktivierung des B-Zell-Rezeptors (BCR). Verschiedene Moleküle des BCR werden durch Tyrosinkinasen phosphoryliert. Das Zusammenspiel von drei BCR-abhängigen Signalkaskaden resultiert in der Rekrutierung verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren. Diese können durch Binden spezifischer Promotorelemente im Zp die BZLF1 Transkription initiieren. Ein Schlüsselereignis ist die Phosphorylierung von CREB, ATF und anderen zellulären TFs sowie die Dephosphorylierung von MEF2D. Dies resultiert in einer Histonacetylierung und Auflockerung der Chromatinstruktur. Das BZLF1-Genprodukt Zta aktiviert den eigenen Promoter durch Binden des ZIIA/B-Motivs (ZREs) (teilweise übernommen aus Amon and Farrell, 2005; Campbell, 1999).

1.3.2 Reaktivierung durch Stimuli der TGF- β Signalkaskade

Einige BL-Zelllinien können auch durch Behandeln mit TGF- β 1 lytisch reaktiviert werden. Jedoch gibt es auch etliche BL-Zelllinien, in denen dieser Signalweg defekt ist (Fahmi et al., 2000; Inman and Allday, 2000). Der Effekt von TGF- β 1 auf BZLF1 wird durch den MAPK-Signalweg vermittelt (Fahmi et al., 2000). Dabei sind Smads die Effektorproteine, die Signale von TGF- β 1 aus der Plasmamembran zum Nukleus transduzieren (Dennler et al., 1998; Heldin et al., 1997; Massague and Weis-Garcia, 1996). Die TFs werden durch die MAP-Kinasen JNK, p38 und ERK phosphoryliert und aktiviert (Adachi-Yamada et al., 1999; Atfi et al., 1999; Axmann et al., 1998; Hannigan et al., 1998; Hocevar et al., 1999; Wang et al., 1997a; Yamaguchi et al., 1995). Auch PKCs scheinen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion durch TGF- β 1 zu spielen (Halstead et al., 1995; Saltis and Bobik, 1996; Suzuki et al., 1995).

1.3.3 Induktion des lytischen Zyklus durch Chemikalien

Es existieren einige Chemikalien, mit denen der lytische Zyklus in bestimmten latent infizierten Zellen induziert werden kann. Dabei bewirken alle aktivierenden Substanzen die Expression einer der beiden lytischen IE-Gene BZLF1 oder BRLF1, dieses Ziel wird jedoch von den verschiedenen chemischen Verbindungen auf unterschiedliche Art erreicht. Phorbolster wie TPA bewirken die lytische Induktion durch Aktivierung verschiedener PKCs (Nishizuka, 1984; zur Hausen et al., 1978). Dabei wird Zp durch zwei TPA-responsive Elemente (TREs) aktiviert (Flemington and Speck, 1990d) (siehe auch Abbildung 1.4). N-Butyrat und Trichostatin A (TSA) hingegen wirken als Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren und ermöglichen durch Acetylierung der Histone die Aktivierung der Genexpression (Chang and Liu, 2000; Davie, 2003; Jenkins et al., 2000; Kallin et al., 1979; Luka et al., 1979; Saemundsen et al., 1980). Deren Signaltransduktion läuft vermutlich über einen PKC-unabhängigen Weg ab (Gradoville et al., 2002). Auch mit Inhibitoren von zellulären DNA-Methyltransferasen, z.B. 5-Azacytidin kann das Ziel der lytischen Reaktivierung erreicht werden (Ben-Sasson and Klein, 1981; Chan et al., 2004). Weitere bekannte Stimuli sind Calciumionophore, die das intrazelluläre Calciumniveau drastisch erhöhen (Faggioni et al., 1986).

Teilweise ungeklärt ist jedoch, welche Signalkaskaden bei der chemischen Induktion mit unterschiedlichen Substanzen den Stimuli transduzieren. Auch ist die chemische Induktion des lytischen Zyklus nicht in allen Zelltypen mit denselben Substanzen möglich (Gradoville et al., 2002). Eine weitere unbeantwortete Frage bleibt, warum nach Behandlung von Zelllinien mit lytisch induzierenden Substanzen nur eine Subpopulation der Zellen lytisch reaktiviert wird und nie die gesamte Population.

1.4 Inhibitoren des lytischen Zyklus

Die Expression von Zp und Rp wird auf unterschiedliche Art reguliert. Dazu zählt die Kontrolle der Transkription durch mehrere positive und negative *cis*-aktive Elemente ebenso wie posttranslative Modifikationen und Protein-Protein Interaktionen.

Es sind sowohl zelluläre als auch virale Gene bekannt, die eine Aktivierung der viralen IE-Gene unterbinden. Dafür verantwortliche zelluläre TFs wurden in Kapitel 1.1.2.2 im Rahmen der Beschreibungen der Bindedomänen für die beiden IE-Promotoren Zp und Rp erläutert. Jedoch existieren auch latente virale Gene, die indirekt zur Repression des Zp beitragen. Die LMP-2-Proteine unterbinden eine Reaktivierung durch Blockieren der transmembranen Signaltransduktion des BCRs. LMP-2A verhindert nach Quervernetzung des BCR in EBV-infizierten und LMP-2A positiven Zellen die Aktivierung von wichtigen Kinasen (Lyn, Syk, PI3-Kinase, Vav, MAPK, etc.) (Miller et al., 1994a; Miller et al., 1994b; Miller et al., 1993). Das ist auch der Grund, warum in Experimenten, in denen die Signalkaskaden nach Quervernetzung des BCR mit α -Ig untersucht werden, die BL-Zelllinie Akata verwendet wird. Diese exprimiert keine LMP-Proteine (Daibata et al., 1990; Takada, 1984; Takada and Ono, 1989). Auch LMP-1 inhibiert die Reaktivierung des lytischen Zyklus, allerdings ist der Mechanismus weitestgehend unverstanden (Adler et al., 2002). Außerdem lässt die Lokalisation des BZLF1-Gens auf dem einen Strang der DNA, und das latente EBNA-1 Gen auf dem komplementären Strang vermuten, dass hier eine Regulation durch „antisense“ RNA stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass die BZLF1-Expression durch posttranskriptionelle Mechanismen kontrolliert wird (Prang et al., 1995). Widersprüchlich dazu sind jedoch Arbeiten von Jenkins *et al*, die gegen die Hypothese der „antisense“ Transkription sprechen (Jenkins et al., 2000).

Zusätzlich zur transkriptionellen Kontrolle wird Zta auch durch posttranslative Modifikationen wie Phosphorylierung reguliert (Daibata et al., 1992). Ebenso kann die transaktivierende Eigenschaft von Zta durch Protein-Protein Interaktionen reprimiert werden. Proteine, denen diese Fähigkeit zugesprochen wird, sind RAZ (Furnari et al., 1994), virale ZAP-Proteine (Katz et al., 1992), c-Myb (Kenney et al., 1992), 'Retinoic acid' (Sista et al., 1993) und p53 (Zhang et al., 1994).

Die Chromatinstruktur in der latenten Phase trägt vermutlich auch zur Repression der Zp- und Rp-Promotoraktivität bei (Binne et al., 2002; Jenkins et al., 2000).

1.5 Aufgabenstellung

Die virale Genexpression in der frühen Phase der Infektion von primären B-Zellen unterscheidet sich drastisch von der in der späten Phase. Während die späte, latente Phase in EBV-infizierten B-Zellen *in vitro* sehr gut untersucht und von der Expression der viralen EBNA- und LMP-Gene geprägt ist, sind die Ereignisse innerhalb der ersten Stunden und Tage nach der Infektion mit EBV weitgehend unbekannt. Nur sehr wenige Arbeiten zeigen, dass initial in den ersten Stunden nach Infektion auch lytische Gene hoch exprimiert werden (Altmann and Hammerschmidt, 2005; Wen et al., 2007; Zeidler et al., 1997). Die Expression lytischer Gene in der frühen Phase der EBV-Infektion ist überraschend, da die infizierten Zellen die Virussynthese nicht unterstützen und auch keine Nachkommenviren freisetzen (eigene unpublizierte Daten und Sugden, 1984). Es scheint, dass die initiale Genexpression einem abortiven lytischen Zyklus entspricht. Warum es in neu infizierten B-Zellen zunächst zu keiner Synthese von Nachkommenviren kommt und warum die EBV-Neusynthese ausschließlich in latent infizierten Zellen stattfindet, ist nicht verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, diesen Fragen nachzugehen. Es sollten die Ursachen für die Restriktion in der abortiv lytischen Phase aufgedeckt und diejenigen Faktoren identifiziert werden, die für dieses Phänomen verantwortlich sind. Als methodische Grundlage diente ein epitheliales Zellsystem. HEK293-Zellen können *in vitro* mit genomischer EBV-DNA transfiziert werden, sie unterstützen die latente Phase des EBV. In stabil transfizierten HEK293-Zellen kann die lytische Phase durch Expressionsplasmide für BZLF1 und BRLF1 effizient induziert werden.

In meiner Arbeit wurden HEK293-Zellen transient mit genomischer EBV-DNA transfiziert und ausgewählte virale Transkripte analysiert. Als veränderbare Parameter wurden Expressionsplasmide für BZLF1 und BRLF1 eingeführt und der Einfluss der CpG-Methylierung des EBV-Genoms untersucht. Zur Analyse wurden verschiedene Nachweismethoden herangezogen: (i) Nachweis viraler Transkripte durch RT-PCR; (ii) Nachweis viraler lytischer Proteine durch Immunfluoreszenzanalysen; (iii) Nachweis funktioneller Nachkommenviren durch Infektion und Transformation von B-Blasten.

Neben diesen Analysen sollte zusätzlich eine genomweite Bestandsaufnahme aller EBV-Gene stattfinden, die in den verschiedenen Phasen der EBV-Infektion, also in latent infizierten und lytisch induzierten Zelllinien, exprimiert werden. Die Bestandsaufnahme zielte darüber hinaus auf jene Gene ab, die in der abortiv lytischen Phase exprimiert werden. Zur zeitgleichen Analyse aller EBV-Gene wurde im Rahmen dieser Arbeit ein cDNA-Microarray erstellt, der das gesamte EBV-Genom dachziegelartig überlappend umfasst. Auf die Planung und Herstellung des Microarrays sowie die Überprüfung seiner Qualität wird ausführlich eingegangen. Abschließend konnte ein Set an viralen Genen definiert werden, das nach transienter Transfektion von methylierter p2089-maxi-EBV-DNA und dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 in der lytischen Phase exprimiert wird.

2. MATERIAL

2.1 Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.1 Zelllinien

Sämtliche verwendete Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung für Genvektoren.

Name	Eigenschaft
B95.8	Durch EBV-Infektion von Krallenaffen-PBMCs entstandene lymphoblastoide Zelllinie (Miller et al., 1972)
B-Blasten	Wachstumstransformierte EBV-neg. B-Zellen (LenL5-Zelllinie), aus PBMCs gesunder humaner Spender unter Stimulation von CD40L-Fibroblastenzellen und 2ng/ml IL-4 generiert (freundlicherweise von Andreas Moosmann zur Verfügung gestellt)
BJAB	Humane EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie
DG75	Humane EBV-negative Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Ben-Bassat et al., 1977)
HEK293	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch Einführung der Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (Graham et al., 1977)
HEK293/2089	HEK293-Zelllinie mit stabil transfiziertem maxi-EBV-Plasmid p2089 (Delecluse et al., 1998)
HEK293/TR ⁻	HEK293-Zelllinie mit stabil transfiziertem maxi-EBV-Plasmid p2114 (Delecluse et al., 1999)
LCL721	EBV-transformierte humane B-Zelllinie (lymphoblastoide Zelllinien)

2.1.2 Bakterienstamm

Für die Klonierung der problematischen PCR-Produkte in den pCR2.1-Vektor im Rahmen der EBV-Microarrayherstellung, wurde der DH5 α *Escherichia coli*-Stamm verwendet: F⁻, lac⁻, recA1, endA1, hsdR17, $\Delta(lacZYA^{-}argF)$, U169, F80lacZ Δ M15, supE44, thi⁻1, gyrA96, relA1 (Hanahan, 1985).

2.2 Plasmide

Die folgende Auflistung zeigt alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Sie stammen aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren.

Name	Eigenschaft
p56.2	BamHI -C- Fragment von B95.8 in pKan2 Vector
p509	Expressionsplasmid für BZLF1, CMV-Promotor getrieben
p523	Subklon mit Deletion der NotI-Wiederholungen
p2089	Wildtyp maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit zusätzlichen Markergenen für eGFP und Hygromycinresistenz in B95.8 DNA
p2130	BRLF1 in pRKV-Plasmid, CMV-Promotor getrieben
p2657.19	Subklon des EBNA-1 Gens mit Deletion der Gly-Ala-Wiederholungen
p2670	Expressionsplasmid für BALF4, CMV-Promotor getrieben
p3663.1	M.SssI-Methyltransferasegen in pRK5 Vektor, CMV-Promotor getrieben

Sämtliche Plasmide, die bei der Klonierung der problematischen PCR-Produkte im Rahmen der EBV-Microarrayherstellung entstanden sind, sind im Anhang aufgelistet (Tabelle B).

2.3 Antikörper, Enzyme und Proteine

Antikörper			
Spezifität	Spezies, Isotop, sonstiges	Bezugsquelle	Verdünnung
α -EA-D	Maus, MAB818, IF	Chemicon	1:1000
α -gp350/220	Maus, 72A1, Hybridom, IF	E. Kremmer, GSF	unverdünnt
α -Rta	Maus, 5A9 bzw. 8C12, IF	E. Drouet, Grenoble	1:1000
α -VcAgp125	Maus, MAB8184-L2, IF	Chemicon	1:1000
α -Zta	Maus, BZ1, Hybridom, IF	E. Kremmer, GSF	1:1
α -Maus IgG	Ziege, Cy3-gekoppelt, IF	Dianova	1:200

IF = Immunfluoreszenz

Enzyme und Proteine	
Name	Bezugsquelle
Agel	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNaseI – Amplification Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie, München
M.Sssl-Methyltransferase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Sigma-Aldrich, München
rRNasin RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase und Puffer	Promega, Mannheim

2.4 Oligonukleotide

Die Synthese der hier aufgelisteten Oligonukleotide wurde bei den Firmen Metabion (München) und Sigma (Taufkirchen) in Auftrag gegeben.

Primername	Gen	Produktgröße (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
b-act	β-Actin	900/ 463	CACCCTGTGCTGCTCACCGAGGCC	24	69.3	70.8
			ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATGA	24	62.4	50.0
Cam	Chloram- phenicol	294	GGAGTGAATACCACGACGATTTCC	24	57.6	50.0
			TTCTGCCGACATGGAAGCCATC	22	60.7	54.5
EA-D/EG	BMRF1	638	AGCGACAGGCTGAGGAACG	19	55.2	63.2
			CTGGAGTGGCTGGGAATGG	19	55.1	63.2
GFP/F4B8	GFP	218	GCTTGTGCCCCAGGATGTTG	20	57.5	60.0
			GCAGTGCTTCAGCCGCTACC	20	57.3	65.0
gp220/F23B25	BLLF1	164	GTCACCTGTGTTATATTTTCACCACTTTC	29	56.7	37.9
			CCTACCAACCTCACCGCACC	20	56.6	65.0
LMP1/MX	BNLF1	628	AGCAATAATGAGCAGGATGAGG	22	52.7	45.5
			AGGATGGAACACGACCTTGAG	21	53.0	52.4
R/F11B10	BRLF1	225	CTGTTCCAGTTCCGCCGC	18	56.3	66.7
			AGTCTCCCGAGCCCGACC	18	56.1	72.2
VcA/F8B11	BALF4	240	CTGGGGGGTGAGGAAGTCG	19	56.5	68.4
			CAACACAACCGTGGGCATAGAG	22	56.8	54.5
Z/F2B2	BZLF1	310/ 185	AAGCCACCCGATTCTTGTATCG	22	56.9	50.0
			CAGCAGCAGCAGTGGTGTGTTG	21	56.7	57.1

Tab. 2.1: Auflistung verwendeter Primer

Sequenzspezifische Primer für den Nachweis rekombinanter maxi-EBV-DNA und ausgewählter lytischer Transkripte nach Induktion des lytischen Zyklus. Angegeben sind die Bezeichnung und die Größe des PCR-Produkts, der Genname, die Primersequenzen und die primerspezifischen Eigenschaften.

Primer zum Nachweis von rekombinanten maxi-EBV-DNAs in wachstumstransformierten B-Blasten: GFP, Chloramphenicol, BNLF1. Spezifische Primer zum Nachweis von Transkripten ausgewählter lytischer Gene mittels RT-PCR: BZLF1, BRLF1, BMRF1, BLLF1, BALF4, β-Actin. Sämtliche Primer, die bei der Generierung der überlappenden PCR-Produkte für den genomweiten EBV-Microarray verwendet wurden, sind bei der Firma MWG (Martinsried) und Metabion (München) synthetisiert worden und im Anhang (Tabelle A und B) aufgelistet.

2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

2.5.1 Medien für prokaryontische Zellen

LB-Medium

- 1% Trypton
- 0,5% Hefeextrakt
- 0,5% NaCl

LB-Agarplatten

- 1l LB-Medium
- 15g Bacto-Agar

SOB-Medium

- 2% Trypton
- 0,5% Hefeextrakt
- 10mM NaCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM MgSO₄

SOC-Medium

- 2% Trypton
- 0,5% Hefeextrakt
- 10mM NaCl
- 10mM MgCl₂
- 10mM MgSO₄
- 0,2% Glucose

2.5.2 Zellkulturmedium und Zusätze für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

Artikel	Bezugsquelle
Fötale Kälbermedium (FCS)	PAA, Cölbe
HEPES	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zellkulturmedium Optimem I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zellkulturmedium RPMI 1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.6 Kits und Standards

Artikel	Eigenschaft	Bezugsquelle
CyDye Post-Labeling reactive Dye Packs	NHS-Cy3 und NHS-Cy5 Fluorochrome	GE Healthcare, Freiburg
EndoFree PlasmidPrep	Endotoxinfreie Präparation von Expressionsplasmiden	Qiagen, Hilden
ExpressArt® mRNA Amplification Kit	Markierung von mRNA mit Fluoreszenzfarbstoffen	AmpTec, Hamburg
NucleoSpin Extract II Kit	Isolierung von DNA und PCR-Produkten aus Agarosegelen	Macherey-Nagel, Düren
PicoGreen dsDNA Quantitation Kit	Quantifizierung von DNA im 96-Lochplatten Maßstab	Molecular Probes, Niederlande
RNeasy Mini Kit und QIAshredder	Isolierung von gesamt RNA aus Zellen	Qiagen, Hilden
SpotReport Alien Amine Oligo Array Validation System	Spike-in Kontrollen für Microarrays	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
SuperScript™ III First-Strand	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Artikel	Eigenschaft	Bezugsquelle
The Original TA Cloning® Kit	pCR 2.1 Vector für die Klonierung von PCR-Produkten	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QIAamp DNA Mini Kit	Isolierung genomischer DNA aus Zellen	Qiagen, Hilden

2.7 Chemikalien, Stammlösungen und sonstiges

2.7.1 Chemikalien, Geräte und Software

Bezugsquelle	Artikel
ABgene, Hamburg	Adhesive Plate Seals
Accelrys, Cambridge, UK	MacVector 9.0
A. Hartenstein, Würzburg	Neubauer-Zählkammer
AppliChem, Darmstadt	DNA-ExitusPlus
Applied Biosystems, Darmstadt	RNaseZap
Beckmann Coulter, Heidelberg	Zentrifuge Avanti J-25, Zentrifuge Avanti-26XP, Ultrazentrifuge L8-70M und XL-70, Coulter Particle Counter Z1
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	Plastik-Reagenzgefäße, Zellkulturflaschen, 96 und 6 Loch Platten
Brand, Wertheim	Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml
B. Braun, Melsungen	Einmalspritzen steril – unterschiedliche Größen
Carl Roth, Karlsruhe	Phenol
Coulter Electronics GmbH, Krefeld	Particle Counter Z-serie
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton
Eppendorf Gerätebau, Hamburg	Reaktionsgefäße verschiedener Größe, Tischzentrifuge 5415R, Thermomixer comfort, Mastercycler personal

Bezugsquelle	Artikel
Hoechst, Frankfurt	Hoechst-Farbstoff H33342
IMGM, Martinsried	Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA-Proben am 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
Improvision, Tübingen	Openlab 3.1.5
ISI Researchsoft, Carlsbad, USA	EndNote 8.0
Kendro Laboratory Products, USA	Sorvall Ultracrimp tubes 11,5ml und 35ml
Macromedia, München	FreeHand MX
Medco, München	Markierte Objektträger-8 Loch
Merck, Darmstadt	Calciumchlorid (CaCl ₂), Cäsiumchlorid (CsCl), Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glucose, Glycerin, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumacetat (KAc), Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Magnesiumsulfat (MgSO ₄), Natriumacetat (NaAc), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid (NaOH), Paraformaldehyd (PFA), Salzsäure (HCl), Xylencyanol
Millipore, Schwalbach	MultiScreen PCR _μ 96 Filter Platten
New England Biolabs, Frankfurt	Größenstandards für Agarosegele
Nunc GmbH, Wiesbaden	Impfösen, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 96 und 6 Loch Platten
Ociumum & Isogen Biosolutions, Indien & Niederlande	Spotten des EBV-Microarrays, Hybridisierung
PAA, Cölbe	HygromycinB (<i>Hyg</i>)
PE Biosystems, Weiterstadt	PCR-Reaktionsgefäße
Peqlab, Erlangen	Elektrophorese-Kammern, Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), dNTPs
Schleicher & Schuell, Dassel	Filterereinheit 0,8μm und 1,2μm

Bezugsquelle	Artikel
Schott, Mainz	Glasware
Sequiserie, Vaterstetten	DNA-Sequenzierung
Sigma-Aldrich Chemie, München	Ampicillin (<i>Amp</i>), β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Chloramphenicol (<i>Cm</i>), Dimethylsulfoxid (DMSO), Polyethylenimin (PEI)
Stratagene, Heidelberg	Robocycler Gradient 96
Thermo Scientific, USA	Heraeus multifuge 3L-R
Wallac, Finnland	Victor ² -1420 Multilabel Counter
Zeiss, Göttingen	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M, Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40C

2.7.2 Stammlösungen und Puffer

Die bei der Arbeit mit Bakterien und Nukleinsäure verwendeten Lösungen und Medien wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die Aufbewahrung der Lösungen bei Raumtemperatur (RT).

Agarose-Auftragspuffer

1mg/ml Bromphenolblau

1mg/ml Xylencyanol

50% Sucrose

Ampicillin (*Amp*)-Stammlösung

100mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

Aufbewahrung bei -20°C

Chloramphenicol (*Cm*)-Stammlösung

34mg/ml in Ethanol, sterilfiltriert

Aufbewahrung bei -20°C

CsCl-Lösung

1,55g/ml CsCl

Lösungen für die Präparation von maxi-EBV-Plasmid-DNALösung I

50mM Glucose

25mM Tris-HCl, pH 8

10mM EDTA

Mit H₂O auf 1l Endvolumen auffüllen

Bei RT aufbewahren

Lösung II

0,2M NaOH

0,1% SDS

Mit H₂O auf 1l Endvolumen auffüllen

Frisch ansetzen

Lösung III

600ml KAc [5M]

115ml Eisessig (kalt)

285ml H₂O

Bei 4°C aufbewahren

Spezial TE

50mM Tris-HCl, pH 8

20mM EDTA

Mit H₂O auf 1l Endvolumen auffüllen

Auf pH 8 einstellen und bei RT aufbewahren

PBS (10x), pH 7,0

8% NaCl

0,2% KCl

1,4% Na₂HPO₄0,2% KH₂PO₄

PFA, 4%

40mg/ml in 50ml H₂O erhitzen (nicht kochen), mit NaOH lösen, mit 10ml 10xPBS und 40ml H₂O auf Endvolumen auffüllen, ungelöste Brocken über Faltenfilter filtrieren, über Nacht bei 4°C inkubieren, bei 4°C für ca. einen Monat haltbar

Phenol (mit Wasser gesättigt)

Kristallines Phenol ≥ 99 % wird bei 65°C im Wasserbad geschmolzen und mit ½ Vol. Wasser gemischt. Aufbewahrung bei 4°C, lichtgeschützt

Phenol/ Chloroform

Mit Wasser gesättigtes Phenol wird im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt. Aufbewahrung bei 4°C, lichtgeschützt

TAE-Laufpuffer

1mM EDTA
20mM Essigsäure
40mM Tris

TBE-Laufpuffer

2mM EDTA
89mM Tris
89mM H₃BO₃

TE-Puffer

1mM EDTA
10mM Tris/HCl pH8,0

3. METHODEN

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur Selektion auf Resistenz gegen Antibiotika wurde dem LB-Medium Ampicillin (100µg/ml) oder Chloramphenicol (30µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über einen längeren Zeitraum wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 50% Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

3.1.2 Transformation von *E. coli*

Der *E. coli* Bakterienstamm DH5α wurde für die Herstellung chemokompetenter Bakterien verwendet. Eine Einzelkolonie wurde in 5ml SOB-Medium über Nacht (o/n) bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde 1-2ml der o/n Kultur in 30ml SOB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 angezogen. Die Bakterienkultur wurde bei 4°C für 10min abzentrifugiert und in 10ml TFB-Puffer auf Eis für 10min inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Bakterien in 2,4ml TFB-Puffer aufgenommen. Die kompetenten Zellen können mit Glycerin versetzt und nach Aliquotieren bei -80°C aufbewahrt werden.

Für die Transformation mit DNA wurde 200µl kompetente Bakterienkultur mit 10µl Ligationsansatz und 7µl DMSO durch Vortexen gemischt und sofort auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 42°C für 2min inkubiert. Die phänotypische Expression erfolgte nach Zugabe von 1ml SOC-Medium für 30-60min bei 37°C. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 100µl Medium aufgenommen und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika (Ampicillin) und 40-50µl X-Gal ausplattiert. Die Inkubation erfolgte o/n bei 37°C. Um eine gute Farbintensität (Indigo-Blau) zu erhalten, wurden die Platten für mind. zwei Stunden bei 4°C aufbewahrt, bevor einzelne Kulturen gepickt wurden.

3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10% Kälberserum, 100µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicilin, 1mM Natriumpyruvat und 5mM HEPES versetzt. Stabile maxi-EBV-Zelllinien wurden zur Aufrechterhaltung des episomalen Plasmids mit 100µg/ml Hygromycin kultiviert.

Die Zelllinien B95.8, LCL721, DG75 und BJAB wurden in Suspension gehalten und abhängig von der Zelllinie in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 alle 2-3 Tage mit frischem Medium verdünnt. Die adhärente HEK293-Zelllinie und deren Derivate HEK293/2089 und HEK293/TR⁻ wurde alle 2-3 Tage 1:10 verdünnt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Partikelzählers der Firma Coulter nach Angaben des Herstellers.

3.2.2 Transiente Transfektion von Zellen und Generierung infektiöser Viruspartikel

Ein experimenteller Ansatz umfaßte Zellen bzw. Kulturüberstände von jeweils zwei Kultureinheiten einer 6-Loch-Platte. Je Kultureinheit einer 6-Loch-Platte wurden 5×10^5 HEK293-Zellen in 2ml Standardmedium ohne Antibiotika ausplattiert. Nach ca. 12 Stunden wurde das Medium durch 1ml Optimem ohne jegliche Zusätze ersetzt. Die Zellen wurden während des folgenden Ansetzens der Transfektionsreagenzien weiter inkubiert. Für einen Versuchsansatz (entsprechend zweier Kultureinheiten einer 6-Loch-Platte) wurden 5µg p2089 maxi-EBV-DNA mit je 0,5-1µg der Expressionsplasmid-DNA (BZLF1 – p509; BRLF1 – p2130) in 1ml Optimem aufgenommen und gemischt. Parallel wurde in einem separaten Reaktionsgefäß je Versuchsansatz 12µl des Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) mit 1ml Optimem gemischt. Die beiden gemischten Ansätze von DNA/Optimem und PEI/Optimem wurden vereint und 15min lang bei RT inkubiert. Das Optimem-Medium auf den Zellen wurde abgenommen und der Transfektionsansatz (DNA/PEI/Optimem) mit 1ml je Kultureinheit einer 6-Loch-Platte verteilt. Nach 4-5 Stunden wurde je Kultureinheit einer 6-Loch-Platte 1ml frisches Medium ohne

Antibiotika zugegeben. Nach dreitägiger Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet sofort auf Eis gelagert. Die Zellen wurden für Immunfluoreszenz- und RT-PCR Analysen sowie für Microarray-Experimente weiter verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde filtriert (Porengröße 0,8-1,2µm), um Zelltrümmer abzutrennen. Die Überstände können mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden. In diesen befindet sich nach erfolgreicher Induktion des lytischen Zyklus infektiöse Viruspartikel.

In den stabilen maxi-EBV-Zell-Klone HEK293/2089 und HEK293/TR⁻ kann der lytische Zyklus durch transiente Transfektion des p509 Expressionsplasmids induziert werden. Im Gegensatz zur HEK293/2089-Zelllinie setzt die HEK293/TR⁻-Zelllinie aber keine infektiösen Viren frei, da dem rekombinanten EBV-Genom die viralen Verpackungssequenzen fehlen. Aus diesem Grund wurde die Zelllinie HEK293/TR⁻ ausschließlich mit dem Expressionsplasmid für BZLF1 (p509) transfiziert. Die HEK293/2089-Zelllinie wurde sowohl mit p509 als auch mit dem Expressionsplasmid für BALF4 (p2670) transfiziert, da es zu einer Erhöhung des Virustiters beiträgt.

3.2.3 Bestimmung der Transformationseffizienz rekombinanter EBVs

Der Nachweis der Virusneusynthese wurde durch Kokultivierung von B-Blasten (LENL5, persönliche Mitteilung Dr. A. Moosmann) mit Überständen der transfizierten HEK293-Zellen erbracht. Je Versuchsansatz wurden 6ml virushaltiger Zellkulturüberstand mit 5×10^6 B-Blasten gemischt. Es wurde mit frischem Medium ohne Antibiotika auf 11ml Endvolumen aufgefüllt. Je Versuch wurden 200µl des Ansatzes auf 48 Vertiefungen einer 96-Loch-Platte verteilt. Drei Tage nach Beginn der Kokultivierung wurden 100µl Medium durch die gleiche Menge frischen Mediums ersetzt. Einmal wöchentlich wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach sechs Wochen wurde der Anteil infizierter B-Blasten durch Auszählen der Kulturgefäße mit proliferierenden, GFP-exprimierenden LCLs bestimmt. Eine Auswahl der LCLs wurde weiter expandiert und deren genomische DNA für PCR-Analysen isoliert.

3.2.4 Immunfluoreszenzanalysen

Die Expression lytisch induzierter EBV-Proteine wurde durch Immunfärbung nachgewiesen. Dabei wurde die Expression von Zta, Rta, EA-D, VcAgp125 und gp350/220 betrachtet.

Transient transfizierte HEK293-Zellen sowie Zellen der Kontrollzelllinien HEK293/TR⁻ und B95.8 wurden in 4°C kaltem 1xPBS gewaschen, je 5x10⁴ Zellen auf einem Loch eines markierten Objektträgers (8-Loch) unter Wärme getrocknet und für 20min fixiert. Die für die Fixierung verwendete Substanz hängt von dem nachzuweisenden Protein ab. Zellen in denen Zta, Rta und VcAgp125 nachgewiesen werden sollte, wurden mit Aceton fixiert. Zellen in denen gp350/220 Expression analysiert werden sollte, mit einer 1:1 Mischung von Aceton:Methanol. Der EA-D Nachweis erfolgte nach Fixierung mit einer 1:2 Mischung aus Methanol:PFA (4%). Die Objektträger wurden anschließend für 10min in 1xPBS gewaschen und nach Trocknen bei 4°C aufbewahrt. Die Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern erfolgte bei RT für 60-75min in einer feuchten Kammer (erhöhte Luftfeuchtigkeit durch Wasser auf dem Boden eines geschlossenen Gefäßes). Der gp350/220 spezifische Antikörper wurde unverdünnt eingesetzt. α -Zta wurde in einer 1:1 Verdünnung mit 1xPBS vorbereitet. α -Rta, α -EA-D und α -VcAgp125 wurden in einer 1:1000 Verdünnung verwendet. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger mit 1xPBS in einer Hellendal-Färbekammer wurden die Zellen mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper für weitere 60-75min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit 1xPBS gewaschen und die Zellen in einer Lösung aus Glycerin mit 5% PBS (1x) eingebettet. Die Zellen wurden mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) analysiert und mit einer an dem Mikroskop installierten Kamera und der Software „Openlab 3.1.5“ (Improvision) dokumentiert.

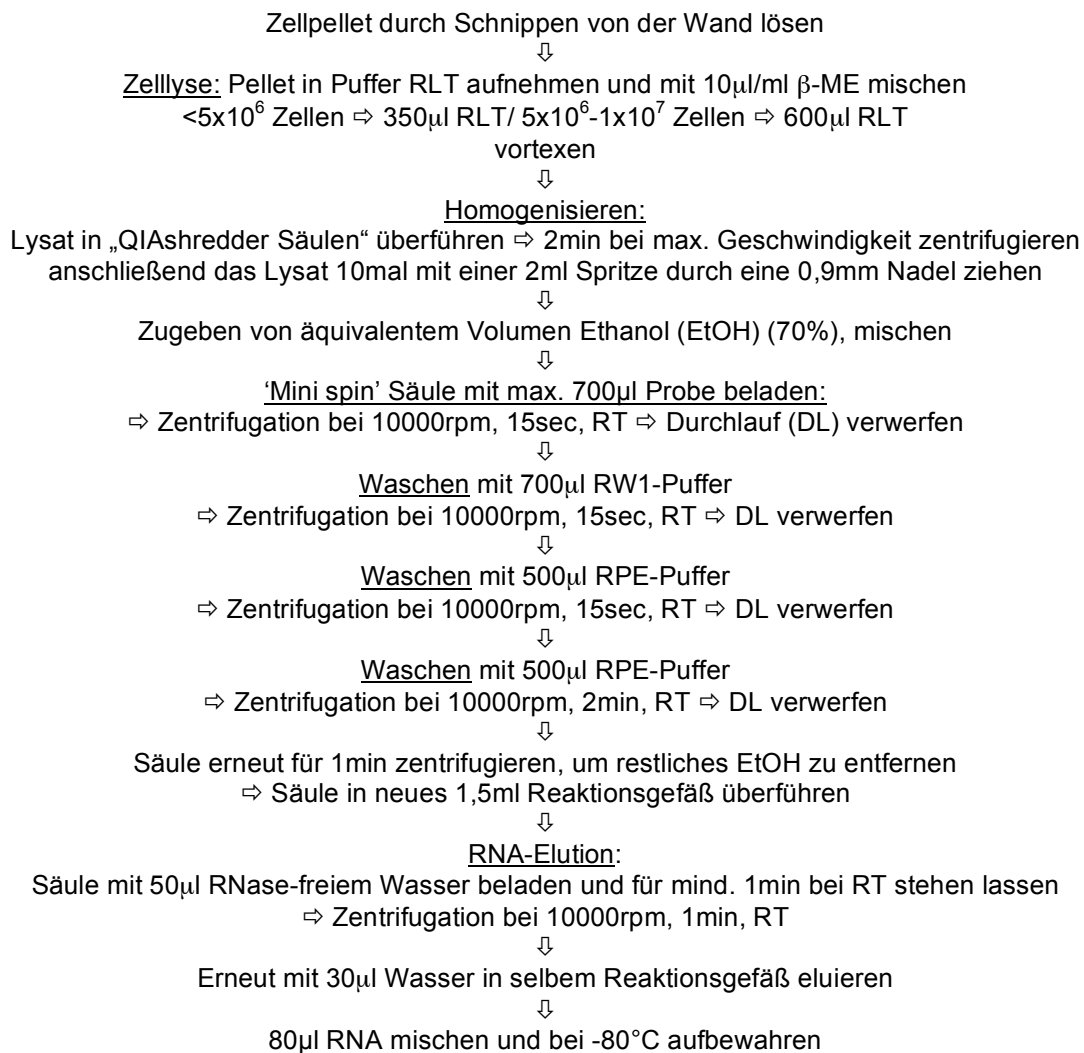
3.3 RNA-Arbeitstechniken

RNA ist gegenüber der Degradation durch ubiquitär vorliegende Ribonukleasen (RNasen) sehr empfindlich. Da die Qualität der RNA v.a. bei Microarrayexperimenten entscheidend ist, wurden während der Arbeiten mit RNA folgende Maßnahmen beachtet:

- Tragen von Handschuhen
- Behandeln des Arbeitsplatzes mit 1% Hypochlorid oder RNaseZap (Ambion) und DNA-ExitusPlus (AppliChem) vor jeder Arbeit
- Verwendung RNase-freier Materialien und Reagenzien
- Lagerung der RNA während der Arbeit auf Eis, ansonsten bei -80°C

3.3.1 Isolierung gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden. Alle Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits. Ausschließlich die „QIAshredder Säulen“ mussten zusätzlich von Qiagen bezogen werden. Nachfolgend ist das Protokoll schematisch aufgeführt.



3.3.2 Quantitative und qualitative RNA-Analytik

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mit dem „NanoDrop ND-1000“ Spektrophotometer (Pheqlab). Für die Bestimmung der RNA-Konzentration ist 1,5µl RNA-Lösung ausreichend. Die Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Zusätzlich kann mit dem „NanoDrop-Spektrophotometer“ das Absorptionsspektrum graphisch dargestellt werden (Abbildung 3.1). Dies ermöglicht das Detektieren von Verunreinigungen der RNA-Probe mit Lösungsmitteln oder Proteinen.

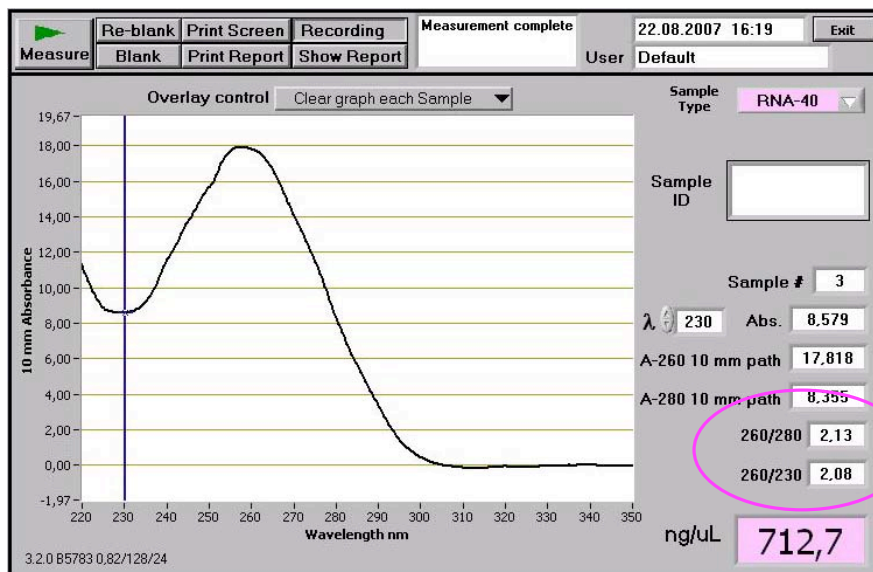


Abb. 3.1: Bestimmung der RNA Reinheit- und Konzentration mit dem NanoDrop® – Spektrophotometer

Analyse einer RNA-Probe an Hand des Absorptionsspektrums. Die Absorptionsquotienten 260/280 und 260/230 geben Aufschluss über die Reinheit der RNA. Gemessen wurde 1,5µl RNA-Lösung. Konzentration = 712,7ng/µl; $OD_{260/280} = 2,13$; $OD_{260/230} = 2,08$; Abszissenachse: Wellenlänge in nm; Ordinatenachse: 10mm Absorption.

Reine RNA besitzt einen Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} von 1,9-2,1. Mögliche Verunreinigungen mit Lösungsmitteln aus der RNA-Extraktion können mittels des Absorptionsquotienten A_{260}/A_{230} detektiert werden. Für reine RNA sollte dessen Verhältnis 2 nicht unterschreiten.

Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde bei der Firma IMGM (Martinsried) am Agilent-2100-Bioanalyser ermittelt (Abbildung 3.2). Für RT-PCR Analysen und Experimente mit dem EBV-Microarray wurden ausschließlich RNA-Proben verwendet, die einen RIN-Wert ('RNA integrity number') von ≥ 7 besitzen.

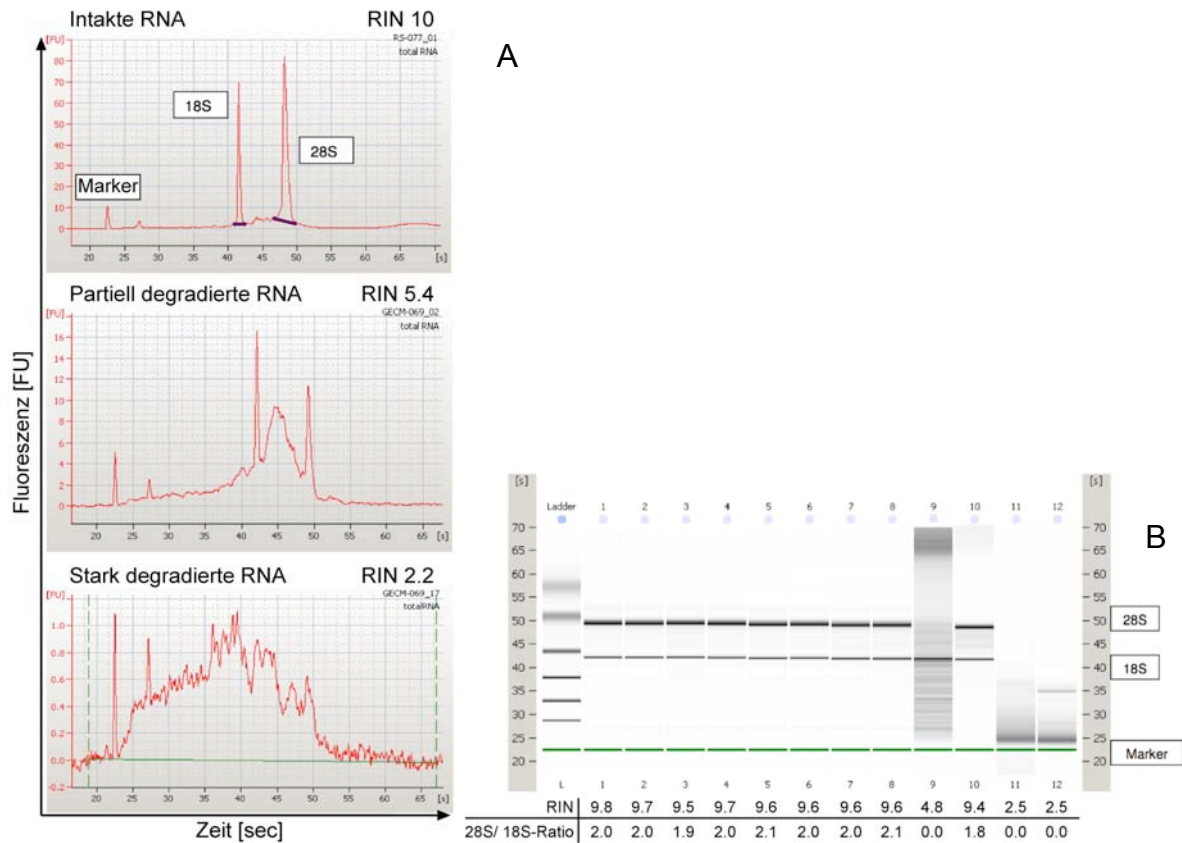


Abb. 3.2: RNA-Qualitätskontrolle

Gesamt-RNA-Proben wurden durch die Firma IMG (Martinsried) am 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) kapillarelektrophoretisch analysiert. Die Proben werden auf einem RNA 6000 Nano LabChip (Agilent) vermessen. Bei der Messung erfolgt eine Trennung nach Fragmentgröße. In einem Elektropherogramm (A) wird das Ergebnis dargestellt. Als Kennzahl für die RNA-Integrität dient die sog. RIN ('RNA integrity number'), die auf einer Skala von 1-10 liegt. Ein RIN-Wert von 10 steht für hervorragende RNA-Qualität ohne Zeichen eines Abbaus. Ein RIN-Wert gegen 1 zeigt massiv degradierte RNA. In die Berechnung der RIN geht das Verhältnis 28S/18S-rRNA sowie der gesamte Profilverlauf des Elektropherogramms ein. Die Daten können in ein virtuelle Gelbild (Densitometrie-Blot) umgewandelt werden (B).

3.3.3 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

RNA wurde zu Beginn für 90min bei 37°C mit „DNaseI – Amplification Grade“ (Invitrogen) inkubiert, um Kontaminationen mit genomischer DNA zu beseitigen. Die DNase wird anschließend für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Reagenz	Volumen/Probe
RNA	1µg
Puffer [10x]	1µl
DNase I [1U/µl]	1µl
rRNasin RNase Inhibitor [40U/µl]	0,5µl
Mit RNase-freiem H ₂ O auf 10µl Endvolumen auffüllen	

Die reverse Transkription der mRNA erfolgte mit dem „SuperScript™ III First-Strand“ cDNA Kit von Invitrogen. Im Folgenden ist das Protokoll aufgeführt.

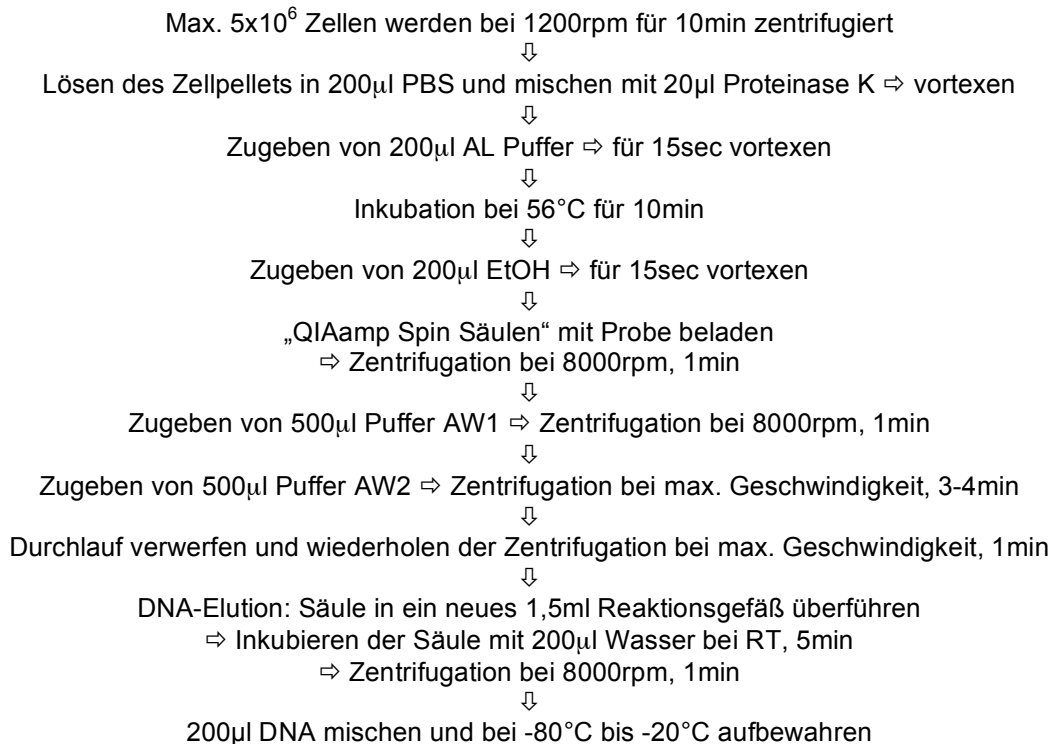
Reagenzien	Reaktion/ Temp./ Zeit
1µg RNA (max. 8µl) + 1µl Oligo(dT) Primer + 1µl dNTPs	Denaturierung bei 65°C für 5min
Inkubation auf Eis für mind. 1min	
+ 2µl 10x RT-Puffer + 4µl MgCl ₂ [25mM] + 2µl DTT [0,1M] + 1µl RNaseOUT™ + 1µl SuperScript™ III RT	cDNA-Synthese bei 55°C für 50min
Termination bei 85°C für 5min	
+ 1µl RNase H	Beseitigung der RNA bei 37°C für 20min
Für die PCR-Amplifikation wurde 1µl cDNA eingesetzt	

3.4 DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook et al., 1989). Die Techniken beinhalten u.a. die Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung bzw. Isolierung von DNA-Fragmenten in/aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Ligierung freier DNA-Enden, Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse oder durch Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Gradienten, etc.

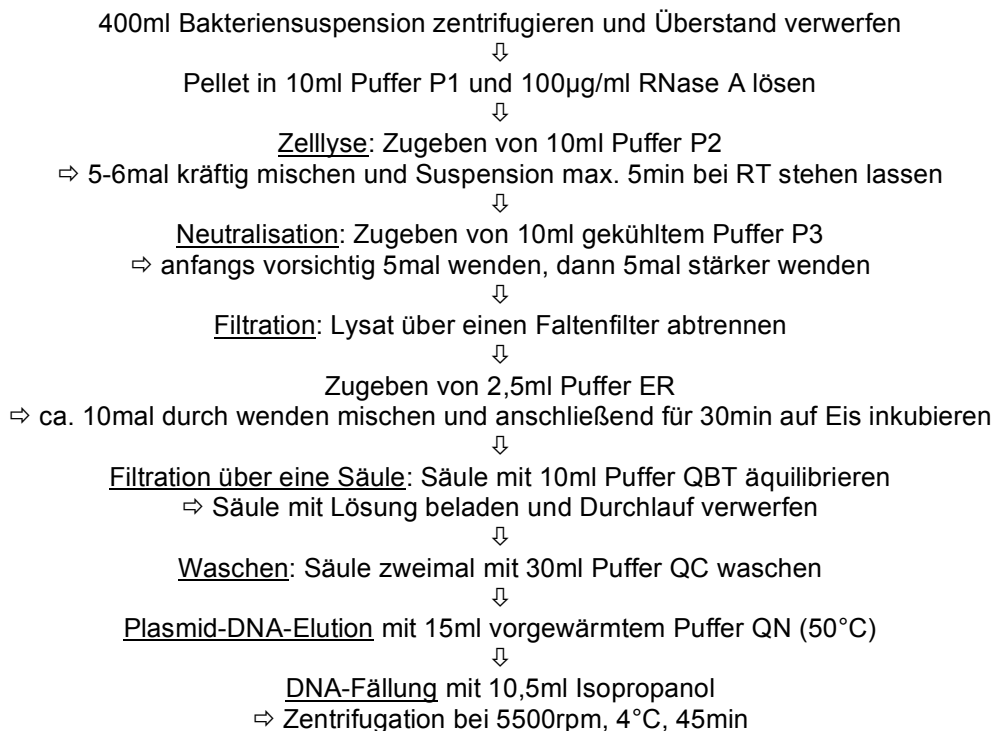
3.4.1 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem „QIAamp DNA Mini Kit“ von der Firma Qiagen, Hagen. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits. Nachfolgend ist das Protokoll schematisch aufgeführt.



3.4.2 Endotoxinfreie Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation mit der sämtliche Expressionsplasmide hergestellt wurden, erfolgte mit der „EndoFree PlasmidPrep“ von der Firma Qiagen, Hagen. Bei dieser Präparation werden störende prokaryontische Endotoxine entfernt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits. Nachfolgend ist das Protokoll schematisch aufgeführt.



↓
Waschen mit 5ml 70% EtOH
⇒ Zentrifugation bei 5500rpm, RT, 15min
↓
Pellet über Kopf für mind. 5min trocknen und anschließend in 200µl TE aufnehmen
⇒ bei 4°C aufbewahren

3.4.3 Präparation von maxi-EBV-Plasmid-DNA aus *E.coli*

Da die Qualität und Reinheit der p2089-DNA bei Transfektionsexperimenten eine wichtige Rolle spielen, wurde an einem entsprechenden Protokoll gearbeitet, um die selbst gestellten Vorgaben zu gewährleisten. Der Präparation folgte immer eine Auftrennung der DNA mit einem Cäsiumchlorid (CsCl) Dichtegradienten.

Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte in modifizierter Form nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989). Eine Einzelkolonie des zu vermehrenden Bakterienklons wurde in 6ml LB-Medium für 8-10 Stunden kultiviert. Jeweils 1ml dieser Vorkultur wurde auf 6x400ml LB-Medium verteilt und mit 24ml NaCl-Lösung [5M] o/n bei 30°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Bakterien wurden bei 4000rpm, 20°C für 15min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Lösen der sechs Pellets erfolgte mit 10ml Lösung I durch Vortexen. Nach vollständigem Lösen der Pellets wurde auf 45ml Endvolumen mit Lösung I aufgefüllt. Nach Zugabe von 10mg Lysozym je Gefäß und mischen durch Wenden wurde für 5-10min auf Eis inkubiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 58ml Lösung II, fünfmaligem Wenden und Inkubation für max. 5min auf Eis. Mit 70ml Lösung III wurde die Reaktion neutralisiert. Dabei war es wichtig, anfangs vorsichtig ca. 5-8mal und anschließend weitere 6-10mal etwas kräftiger zu wenden. Die Bakterienlösung wurde für mind. 30min auf Eis inkubiert und anschließend der Zelldebris bei 9000rpm, 4°C für mind. 20min pelletiert. Durch Filtrieren über Gaze und einen Faltenfilter wurde restliches Zellmaterial entfernt. Die Lösungen wurden vereint und auf vier 500ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,75 Vol.% Isopropanol. Nach Zugabe von Isopropanol wurde kräftig gemischt, für ca. 20min bei RT inkubiert und anschließend die DNA durch Zentrifugieren bei 9000-10000rpm, 20°C für 45min pelletiert. Dem Waschen der DNA mit 200ml 80% EtOH folgte erneutes Zentrifugieren bei 9000rpm, 20°C für 20min. Das DNA-Pellet wurde für mind. 5min bei RT über Kopf getrocknet. Wenn nötig wurden EtOH-Reste mit einer Pipette entfernt. Insgesamt 40ml spez. TE wurden nach Pelletgröße auf die vier Reaktionsgefäße verteilt und die Pellets durch vorsichtiges Schwenken auf einem Schüttler gelöst. Der Inhalt der vier Reaktionsgefäße wurde vereint und mit 400µg

RNase A für 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Proteinase K-Verdau (1-2mg) für 45min bei 50°C. Die DNA wurde auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und in mehreren Schritten bei 50°C mit CsCl versetzt. Nach vollständigem Lösen des CsCl wurde diese Mischung auf zwei Ultrazentrifugationsröhrchen (Sorvall, 35ml) verteilt. Nach Zugabe von je 1,5ml Ethidiumbromid (1%; C. Roth) wurde mit 1,55g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge für 72h bei 38000rpm und 20°C in einem 70.1 TI-Festwinkelrotor. Nach dieser Zeit wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (365nm) sichtbar gemacht und die unteren Banden, die der 'supercoiled'-Plasmid-DNA entsprachen, mit einer Einmalkanüle (2,1x38mm, BOVI•VET) abgezogen. Die Plasmid-DNA-Mischung wurde in ein neues 11,5ml UZ-Röhrchen überführt und mit 0,5ml Ethidiumbromid und 1,55g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation in einem 70 TI-Festwinkelrotor für 48-72h bei 38000rpm wurde wieder die 'supercoiled'-Plasmid-DNA abgezogen. Das restliche Ethidiumbromid wurde durch Zugabe von CsCl-gesättigtem Isopropanol aus der Plasmid-DNA-Mischung extrahiert. Nach DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die EBV Plasmid-DNA in TE-Puffer aufgenommen und durch langsames Wenden für mehrere Tage gelöst.

3.4.4 Genomweite *de novo* CpG-Methylierung der maxi-EBV-DNA

Die *in vitro* CpG-Methylierung der p2089-DNA erfolgte mit der *de novo* Methyltransferase M.SssI (Fermentas). Die Menge an M.SssI Methyltransferase und S-Adenosylmethionin (SAM), das als Methylgruppendonor für die Methylierung der EBV-DNA essentiell ist, kann mittels der Angaben des Herstellers berechnet werden. Da das vorgegebene Reaktionsvolumen für die *in vitro* Methylierung der EBV-DNA nicht eingehalten werden konnte (bedingt durch die niedrige DNA-Konzentration), wurde das Protokoll für größere Volumina und EBV-DNA modifiziert. Dies beinhaltet ebenfalls eine Änderung der einzusetzenden Menge an Puffer, M.SssI und SAM. Im Folgenden ist das Protokoll aufgeführt.

Reagenz	Probenmenge
DNA	1µg
NEB II Puffer	3,33µl
M.SssI [4U/µl]	1,16µl
SAM [32mM]	0,6µl
Wasser	Auf 30µl Endvolumen auffüllen
Inkubation bei 37°C für 4 Std.	

Die Kontrolle der CpG-Methylierung wurde durch Verdau der DNA mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym Agel erbracht. Dieses Enzym kann methylierte CpG-Motive nicht schneiden. In Abbildung 3.3 ist das Verdauemuster von Agel dargestellt.

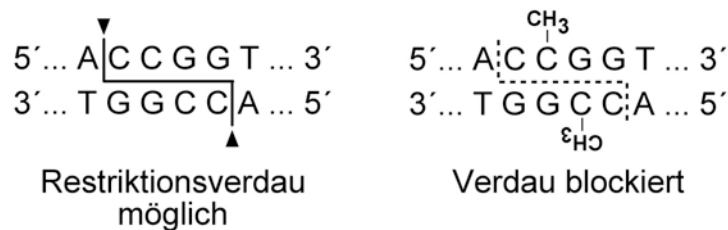


Abb. 3.3: Verdauemuster von Agel

Gezeigt ist das Verdauemuster von Agel. Sind bestimmte CpG-Motive der DNA methyliert, ist Agel nicht in der Lage, die DNA an dieser Stelle zu schneiden.

3.4.5 PCR-Analysen

Taq-RNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Promega bezogen und die PCR-Analysen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR wurde in einer speziellen PCR Maschine (Robocycler Gradient 96) durchgeführt. Dabei richtete sich das Temperaturprofil der PCR nach den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Für problematische PCR-Produkte wurde die optimale Schmelztemperatur mittels der Temperaturgradientenfunktion des Robocyclers ermittelt. Der Reaktionsansatz für eine PCR setzt sich wie folgt zusammen.

Reagenz	Volumen/Probe
DNA [50ng/ml]	1µl
Taq-Polymerase Puffer [10x]	5µl
MgCl ₂ [25mM]	5µl
DMSO	0-6%
dNTP-Mix [je 10mM]	2µl
Primer [20mM]	je 5µl
Taq-DNA-Polymerase [5U/ml]	0,2µl
Mit H ₂ O auf 50µl Endvolumen auffüllen	

Die Proben wurden nach folgendem Protokoll behandelt.

Temperatur und Zeit	Reaktion
95°C/ 4min	Denaturierung
Die 3 folgenden Schritte wurden 30-35mal wiederholt	
95°C/ 1min	Denaturierung
48°C-63°C/ 1min	Annealing
72°C/ 2,5min	Elongation
72°C/ 3-6min	Elongation
4°C	

Für die Amplifikation der PCR-Produkte für den EBV-Microarray wurde mit einem Endvolumen von 50-100µl je PCR-Reaktion gearbeitet. Sonstige PCR-Analysen wurden mit 20µl Endvolumen durchgeführt.

3.4.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Fragmente wurden je nach Größe in Agarosegelen geeigneter Konzentration aufgetrennt. Die Agarosegelkonzentration betrug zwischen 0,8% bei maxi-EBV-DNA und 1,5% bei PCR-Produkten. Als Laufpuffer diente 1xTAE bei maxi-EBV-DNA und 1xTBE bei PCR-Produkten. Sichtbarmachen der Nukleinsäuren erfolgte durch

Versetzen des Agarosegels mit Ethidiumbromidlösung (40ng/ml). Das in die Nukleinsäure inkorporierte Ethidiumbromid wird unter UV-Licht (365nm) sichtbar gemacht.

3.5 Microarray spezifische Arbeitsmethoden

3.5.1 Planung der HKG-Kontrollen

Die verwendeten mRNA-Sequenzen der Haushaltsgene (HKGs) wurden aus der Internet-Datenbank NCBI entnommen. Sequenzspezifische Primer wurden mit der Software MacVector 9.0 von Accelrys selektiert. Sämtliche HKG-Produkte wurden aus cDNA humaner Epithelzellen amplifiziert und besitzen eine Produktgröße von 500-700nt. Eine Liste der 28 HKGs mit ihrem im Array verwendeten Kürzel, ihrem Gen-Namen, der spezifischen 'Accession-Number', der Länge des PCR-Produkts und der Primersequenzen befindet sich im Anhang (Tabelle C).

3.5.2 Planung des genomweiten EBV-Microarrays

Sämtliche sequenzspezifischen Primerpaare für den EBV-Microarray wurden mit der Software MacVector 9.0 (Accelrys) berechnet. Das gesamte EBV-Genom wurde dachziegelartig überlappend in 285 Produkte aufgeteilt und mit Hilfe der PCR-Technologie in dem Robocycler Gradient 96 (Stratagene) amplifiziert. Die PCR-Produkte besitzen eine Fragmentgröße von 500-700nt.

3.5.3 Ligation von PCR-Fragmenten und pCR2.1-Vektor

Bei insgesamt 78 EBV-Abschnitten konnten keine spezifischen PCR-Produkte mit der EBV-Template-DNA hergestellt werden. Diese PCR-Produkte wurden in einem 1,5% präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und die möglicherweise korrekte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in eine 1ml Spritze überführt und durch eine 20Gx1,5" Kanüle gedrückt. Nach Zugabe von identischem Volumen an Phenol-Chlorophorm werden folgende Schritte dreimal wiederholt: (i) Vortexen der Mischung, (ii) Lagern für 5min in Trockeneis, (iii) Zentrifugieren bei 13200rpm und RT für 10min. Die obere Phase, in der die DNA gelöst ist, wird abgenommen und das Volumen mit Isobutanol auf 200µl reduziert. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 20µl NaAc [3M] und 500µl EtOH [80%] und Mischen. Nach 5min auf Eis wird bei 13200rpm für 10min zentrifugiert und das EtOH im Überstand komplett

entfernt. Das trockene Pellet wird in 10µl 1xTE-Puffer gelöst. Die Ligation des PCR-Produkts mit dem pCR2.1-Vektor aus dem „Original TA Cloning® Kit“ von Invitrogen erfolgt o/n bei 14°C. Der Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen.

Reagenz	Volumen
Ligase Puffer [10x]	1µl
'High Concentrated' T4 Ligase [10U/µl]	0,2µl
pCR2.1-DNA	1µl
Proben-DNA	2µl
Mit H ₂ O auf 10µl Endvolumen auffüllen	

3.5.4 Reinigung von PCR-Produkten

Nach PCR-Amplifikation der Produkte für den EBV-Microarray wurden sämtliche verbliebenen Primer, dNTPs und Salze mit Hilfe der „MultiScreen PCR_{µ96} Filter-Platten“ von Millipore entfernt. Dabei wurde strikt nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

3.5.5 Quantifizierung der PCR-Produkte

Die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde mit dem „PicoGreen dsDNA Quantitation Kit“ von Molecular Probes im 96-Loch-Maßstab durchgeführt. Die verwendeten Lösungen, die Referenz-DNA und die Proben-DNAs wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die PCR-Proben wurden in einer „96-Loch-Microfluor-Platte“ (Dynatech) angesetzt. Dieses Vorgehen ermöglicht es, dass Proben-DNA und PicoGreen Reagenz lichtgeschützt reagieren können. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte in einem „Victor²-1420 Multilabel Counter“ (Wallac) bei einer Anregung bei ~480nm und der Emission bei ~520nm. Für die Berechnung der Standardgeraden wurden sieben Messwerte zwischen 0 und 1ng/µl herangezogen. Mit Hilfe der Standardgeraden kann die DNA-Konzentration der PCR-Proben berechnet werden.

3.5.6 Spotten des EBV-Microarrays

Die HKGs-Produkte wurden so auf dem Array angeordnet, dass sie als Markierungspunkte ('guidance spots') in den Ecken eines Rasters ('grid') platziert sind. Somit ist jederzeit ein geometrisches Muster erkennbar. Alle PCR-Proben wurden nach einem bestimmten Schema auf zwei 384-Loch-Platten (X7020, Genetix) verteilt (siehe Anhang, Tabelle D und Spotanordnung auf S. 162). Das Schema resultiert aus der Anzahl an verwendeten Nadeln beim Spotten. Es wurde mit 2x4 Nadeln in einem 9x9 Raster gespottet. Das Spotten erfolgte bei der Firma „Ocimum Biosolutions“ im Kontakt-Verfahren mit gespaltenen Nadeln, sog. 'split-pins', auf Epoxid-beschichtete Objektträger. Bei 10% der gespotteten Arrays wurde von der Firma „Ocimum Biosolutions“ eine Qualitätskontrolle durchgeführt.

3.5.7 Markierung der mRNA

Fluoreszenz-markierte antisense RNA (aRNA) wurde mit dem „ExpressArt[®] mRNA Amplification Kit“ von AmpTec hergestellt. Zu Beginn wurden Gesamt-RNA Extrakte für 15min bei 37°C mit „DNase I – Amplification Grade“ (Invitrogen) behandelt, um den Hintergrund an genomischer DNA zu verringern. Anschließend wurde die DNase bei 65°C für 10min hitzeinaktiviert. Das Umschreiben der mRNA in ds cDNA und die *in vitro* Transkription der antisense RNA (aRNA) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Fluoreszenzmarkierung der amplifizierten aminoallyl-markierten aRNA wurden NHS-Cy3- oder NHS-Cy5-Fluorochrome des „CyDye Post-Labeling Reactive Dye Packs“ (Amersham) verwendet. Das Fließschema in Abbildung 4.20 (Kapitel 4.3.5) zeigt das Umschreiben der mRNA in aminoallylmarkierte aRNA.

3.5.8 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Fluoreszenz-markierten aRNA-Zielstrukturen erfolgte in einer „Tecan HS4800Pro“ bei der Firma „Ocimum Biosolutions“. Dabei binden die aRNA-Zielstrukturen an die auf dem Array gespotteten komplementären Proben. Bedingt durch den hohen GC-Gehalt des EBV-Genoms (ca. 60%) und den Hybridisierungspuffer wurde die Hybridisierung bei 60°C durchgeführt. Durch anschließendes Waschen des Arrays mit drei unterschiedlichen Waschpuffern wurden ungebundene bzw. schwach gebundene Zielstrukturen entfernt. Im Folgenden ist das verwendete Hybridisierungsprogramm aufgeführt.

Reaktion		Zweck
Waschen	30°C, 20sec	Reinigung der Station und Hybridisierungskammer
Injektion des Puffers	30°C	Einführen von Hybridisierungspuffer
Prähybridisierung	30°C, 5min	Einstellen der Hybridisierungskammer
Injektion der Probe	60°C	Einführen der Probe, gelöst in Hybridisierungspuffer
Hybridisierung	60°C, 16Std., Schüttelfrequenz - Medium	Komplementäre Zielstrukturen binden an Proben auf dem Array
Waschen	30°C, 1min	Drei aufeinander folgende Waschschrte mit verschiedenen Waschpuffern: 1) 2x SSC, 0,1% SDS 2) 1x SSC 3) 0,5x SSC
Trocknen der Slides	30°C, 3.30min	Trocknen des Arrays mit Stickstoff
Reinigung der Apparatur		

3.5.9 Lesen und Auswerten des EBV-Microarrays

Das Auslesen des Arrays erfolgte bei „Ocimum Biosolutions“ mit einem „Affymetrix 428 Array Scanner“. Dabei misst der Scanner die Fluoreszenzintensität jedes Farbstoffs (Cy3 oder Cy5) in jedem Spot auf dem Array und erstellt aus den Daten eine 16-bit Bilddatei im TIFF-Format. Die Aufnahmen erfolgten mit der „ImaGene-Software“ (Biodiscovery) bei „Ocimum Biosolutons“. Anschließend folgte die Hintergrundkorrektur und Grundnormalisierung der Daten mit der „MAVI-Software“ (MWG Biotech), ebenfalls durch „Ocimum Biosolutons“. Dabei wurde der lokale Hintergrund jedes Spots abgezogen und die Signalintensität an Hand interner Kontrollen (HKG-Spots) normalisiert. Im Anschluss wurde der allgemeine Hintergrund des Arrays an Hand aller Negativ-Kontrollen bestimmt und von den Signalintensitäten sämtlicher Spots abgezogen. Signale verschiedener aRNA-Proben wurden analysiert und das Verhältniss ('ratio') der Proben zueinander ermittelt. Eine zweifache oder größere Änderung im Vergleich zur Referenzprobe wurde bei einmalig durchgeführten Experimenten als Schwellenwert definiert. Nach Bilden des arithmetischen Mittelwerts aus mehreren identischen Experimenten wurde der Schwellenwert auf 1,5 verringert.

4. ERGEBNISSE

– Übersicht –

Nach Infektion von B-Zellen mit EBV werden initial die beiden viralen 'immediate-early'-Gene BZLF1 und BRLF1 exprimiert. Obwohl die Genprodukte von BZLF1 und BRLF1, Zta und Rta, als molekulare Schalter den lytischen Zyklus initialisieren können, findet in infizierten, primären B-Zellen zunächst keine Virusneusynthese statt. Diese Situation bezeichnen wir als 'abortiv lytischen' Zyklus. Stattdessen werden in diesen Zellen mehrere latente Gene exprimiert, die *in vitro* zur Transformation der Zellen führen und die für die Aufrechterhaltung des viralen Genoms unerlässlich sind. Auch in epithelialen Zellen werden *in vitro* nach Infektion oder nach Transfektion der viralen DNA keine Nachkommenviren generiert; EBV etabliert sich in diesen Zellen ebenfalls ausschließlich in latenter Form. Die ektopische Expression von BZLF1 oder BRLF1 induziert in latent infizierten (bzw. transfizierten) Zelllinien im Gegensatz zu neu infizierten (bzw. transfizierten) Zellen den vollständigen lytischen Zyklus, der zur Freisetzung von infektiösen Nachkommenviren führt.

Aufgabe und Ziel dieser Arbeit war es, die Ursache für die Restriktion in der abortiv lytischen Phase aufzudecken, um diesen Block auch gezielt überwinden zu können. Wenn möglich sollte der (oder die) verantwortliche Faktor(en) identifiziert werden, der (die) für dieses Phänomen verantwortlich ist (sind). Dieses Ziel wurde erreicht. Im **ersten** Abschnitt der Ergebnisse beschreibe ich zunächst das von mir entwickelte Modellsystem, mit dem alle Versuche durchgeführt wurden. Es baut auf der epithelialen Zelllinie HEK293 auf, in die ca. 180kbp-große genomische EBV-DNA zusammen mit Expressionsplasmiden für BZLF1 und/oder BRLF1 transient transfiziert wurde. Zusätzlich wird in diesem Abschnitt auf die Optimierung des Modellsystems selbst eingegangen. Der **zweite** Abschnitt beschäftigt sich mit der Analyse der Genexpression und Virusneusynthese in diesem Modell. In einem Fließschema (Abbildung 4.2) werden die verschiedenen Nachweismethoden veranschaulicht, mit deren Hilfe lytische Genprodukte und Nachkommenviren detektiert wurden. Die Expression ausgewählter lytischer Gene wurde mit Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen belegt und der Nachweis der Neusynthese von Virionen wurde durch Transformation infizierter B-Blasten erbracht. Der **dritte** Abschnitt meiner Arbeit beschreibt die Etablierung und Validierung eines genomweiten EBV-Microarrays. Die Planung und Herstellung des Microarrays und

die Überprüfung seiner Qualität stehen im Mittelpunkt dieses Abschnitts. Abschließend wurde die Expression viraler Gene in unterschiedlichen Versuchsansätzen analysiert, um die Sets an viralen Genen zu definieren, die (i) in der viralen Latenz, (ii) in der abortiv lytischen Phase oder (iii) im lytischen Zyklus exprimiert werden. Der Vergleich der Expression viraler Gene in diesen Phasen sollte jene Schlüsselgene identifizieren, die für die Restriktion in der abortiv lytischen Phase entscheidend sind.

4.1 Das Transfektionssystem

4.1.1 Versuchsaufbau

– Übersicht –

Das verwendete Modellsystem besteht aus der Epithelzelllinie HEK293, dem EBV-Genom in Form eines rekombinanten Plasmids (maxi-EBV-DNA) und zwei verschiedenen Expressionsplasmiden für virale lytische Gene. Unterschiedliche Kombinationen von unmodifizierter oder modifizierter, aus *E.coli* gewonnener maxi-EBV-DNA mit Expressionsplasmiden wurden verwendet. Die Zellen wurden transient transfiziert und die virale Genexpression mit verschiedenen Methoden untersucht.

4.1.1.1 Das maxi-EBV-Konstrukt p2089

Abbildung 4.1 zeigt eine schematische Darstellung des p2089-maxi-EBV-Plasmids. p2089 ist ein rekombinantes EBV-Genom, das das Wildtyp-EBV-Genom von B95.8 umfasst. Zusätzlich kodiert p2089 für weitere Gene, die eine Selektion der EBV-DNA ermöglichen oder die, wie das „green fluorescent protein“ (GFP), als phänotypischer Marker in transfizierten und infizierten Zellen dienen.

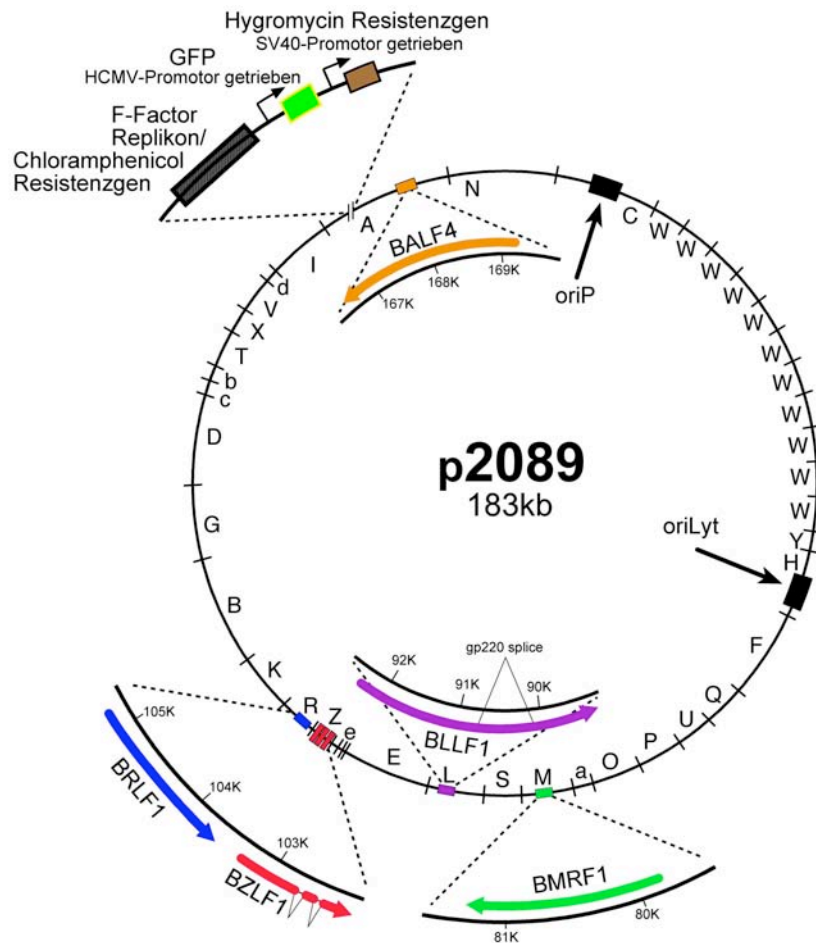


Abb. 4.1: Karte des maxi-EBV-Plasmids p2089

Das maxi-EBV-Plasmid p2089 umfasst das Genom des EBV Prototypvirus B95.8. Durch den Einbau des F-Faktors wird die Amplifikation in *E. coli* sichergestellt und durch das Chloramphenicol Resistenzgen eine erfolgreiche Selektion ermöglicht. GFP und das Hygromycin-Resistenzgen dienen der Selektion in eukaryontischen Zellen. Herausgestellt ist die Lage fünf paradigmatischer lytischer Gene, deren Transkripte in dieser Arbeit als Nachweis der Genexpression in der lytischen Phase dienen.

4.1.1.2 Zelllinien

B95.8 geht auf Krallenaffen-B-Zellen zurück, die durch EBV-Infektion in eine lymphoblastoide Zelllinie transformiert wurden (Miller et al., 1972). Der Großteil der B95.8-Zellen ist latent mit EBV infiziert, während 5-10% der B95.8-Zellen spontan den lytischen Zustand unterstützen (zur Hausen et al., 1978). Diese Zelllinie wurde als Positivkontrolle für Immunfluoreszenz- und RT-PCR Analysen verwendet.

Die HEK293-Zelllinie ist eine humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie. In dieser Zelllinie wurde nach transienter Transfektion von maxi-EBV-DNA die virale Genexpression untersucht, um die Restriktion im abortiv lytischen Zyklus zu definieren.

In meiner Arbeit wurden zwei weitere, bereits stabil mit EBV transfizierte HEK293-Zelllinien als Kontrollen verwendet. In diesen Zellen repliziert das maxi-

EBV-Plasmid extrachromosomal, sodass ein der latenten EBV-Infektion entsprechender Zustand entsteht. Eine spontane Produktion von Viruspartikeln findet im latenten Zustand in diesen Zellen nicht statt. Der Übergang vom latenten in den produktiven lytischen Zustand kann aber durch die transiente Expression des viralen Transaktivators BZLF1 in stabil mit EBV transfizierten Zelllinien induziert werden (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

Nach Induktion der lytischen Phase setzt die HEK293/2089-Zelllinie Viren frei, die effizient humane primäre B-Lymphozyten infizieren und transformieren (Delecluse et al., 1998). Diese Viren können sehr sensitiv durch die Infektion von B-Blasten mit Zellkulturüberständen von transient transfizierten HEK293-Zellen detektiert werden. EBV-infizierte B-Blasten wachsen in der Zellkultur als LCLs aus.

Die HEK293/TR⁻-Zelllinie ist mit dem maxi-EBV-Plasmid p2114 stabil transfiziert (Delecluse et al., 1999). Nach Induktion des lytischen Zyklus in dieser Zelllinie kommt es zur Expression aller lytischen Gene. Im Gegensatz zur HEK293/2089-Zelllinie setzt die HEK293/TR⁻-Zelllinie aber keine infektiösen Viren frei, da dem rekombinanten EBV-Genom die viralen Verpackungssequenzen fehlen. Diese Zelllinie diente als Positivkontrolle der lytischen Genexpression in Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen.

4.1.1.3 Expressionsplasmide

BZLF1 und BRLF1 sind die essentiellen molekularen Schalter, deren Expression für die Initiation des lytischen Zyklus unerlässlich sind (Countryman et al., 1987; Countryman and Miller, 1985; Feederle et al., 2000; Shimizu et al., 1989). So aktivieren deren Genprodukte Zta und Rta die Promotoren des eigenen und des jeweils anderen Gens sowie die weiterer lytischer Gene (Chen et al., 2005; Chevallier-Greco et al., 1986; Cox et al., 1990; Feederle et al., 2000; Francis et al., 1999; Holley-Guthrie et al., 1990; Quinlivan et al., 1993). Durch diese Interaktion kommt es zum Ablauf des vollständigen lytischen Zyklus und zur Virusneusynthese in latent infizierten bzw. stabil transfizierten Zellen.

Von den Expressionsplasmiden p509 und p2130 wird BZLF1 bzw. BRLF1 konstitutiv durch den CMV-Promotor transkribiert. Die ektopische Expression von BZLF1 und/oder BRLF1 wurde in transienten Transfektionen zusammen mit maxi-EBV-DNA benutzt, um den Block der abortiv lytischen Phase zu untersuchen.

4.1.1.4 Nachweis transfizierter EBV-DNA

Die effiziente Induktion des lytischen Zyklus hängt in erster Linie von der DNA-Transfektionseffizienz ab. Deshalb wurde während dieser Arbeit versucht, folgende Parameter zu optimieren: (i) Zahl der zu transfizierenden HEK293-Zellen, (ii) Menge der maxi-EBV-DNA, (iii) Menge der Expressionsplasmid-DNA und (iv) Konzentration des Transfektionsreagenzes Polyethylenimin (PEI) in Kombination mit dem Transfektionsmedium Optimem.

Die Menge an zu transfizierenden Zellen wurde so gewählt, dass die HEK293-Zellen nach dreitägiger Transfektion nicht vollständig konfluent ausgewachsen waren, sondern sich weiterhin in ihrem proliferierenden Zustand befanden. Die optimale Menge an einzusetzender p2089-maxi-EBV-DNA wurde durch Auszählen GFP-positiver HEK293-Zellen drei Tage nach Transfektion bestimmt. Das Optimum stellte sich bei einer Transfektion mit 5µg maxi-EBV-DNA ein. In Versuchen mit *de novo* methylierter p2089-maxi-EBV-DNA konnte die Transfektionseffizienz durch Auszählen GFP-positiver HEK293-Zellen nur unzureichend bestimmt werden: regelmäßig wurden nach Transfektion von identischen DNA-Mengen bei CpG-methylierter EBV-DNA im Vergleich zu unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA 80% weniger GFP-positive Zellen gezählt. Dies resultiert wohl aus einer epigenetischen Repression des GFP-Promotors in CpG-methylierter DNA. Da aber die CpG-Methylierung sehr wahrscheinlich die Transfektionseffizienz der DNA nicht beeinflusst, wurde bei Transfektionen dieselbe Menge an unmodifizierter bzw. modifizierter DNA verwendet. Die beiden Expressionsplasmide p509 und p2130 tragen keine Markergene, sodass ich deren Transfektionseffizienz indirekt mit Hilfe von Fluoreszenzanalysen der jeweils exprimierten Gene bestimmt habe. Vergleicht man in Abbildung 4.4 (Kapitel 4.2.1.2) die Expression von Zta in Reihe 1 und 2, erkennt man nach Transfektion mit dem BZLF1-Expressionsplasmid klar die Zta-exprimierenden, fluoreszierenden HEK293-Zellen. Diese Situation trifft auch für Rta zu (Vergleich von Reihe 1 und 2 mit 3 und 4). Der Einsatz von jeweils 0,5µg Expressionsplasmid-DNA führt zu einer ausreichend starken ektopischen Expression der beiden lytischen Gene BZLF1 und BRLF1. Die optimale Menge des Transfektionsreagenz PEI wurde durch Transfizieren von konstanten DNA-Mengen (maxi-EBV und Expressionsplasmid) mit unterschiedlichen Mengen PEI ermittelt. Die beste Transfektionseffizienz wurde in folgendem Verhältnis erhalten: 5µg maxi-EBV-

DNA und 0,5µl jedes Expressionsplasmids in 12µl PEI und einem Endvolumen von 2ml Optimem. Das in diesen Vorarbeiten erarbeitete Protokoll (siehe Kapitel 3.2.2) wurde während meiner Arbeit bei allen transienten Transfektionen verwendet.

4.2 Analyse der Genexpression und Virusneusynthese

– Übersicht –

Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils werden die verwendeten Nachweismethoden beschrieben und resultierende Ergebnisse dargestellt. Die Nachweismethoden, die ich zur Detektion lytischer Genprodukte verwendet habe, sind in Abbildung 4.2 (Punkt 3-6) veranschaulicht.

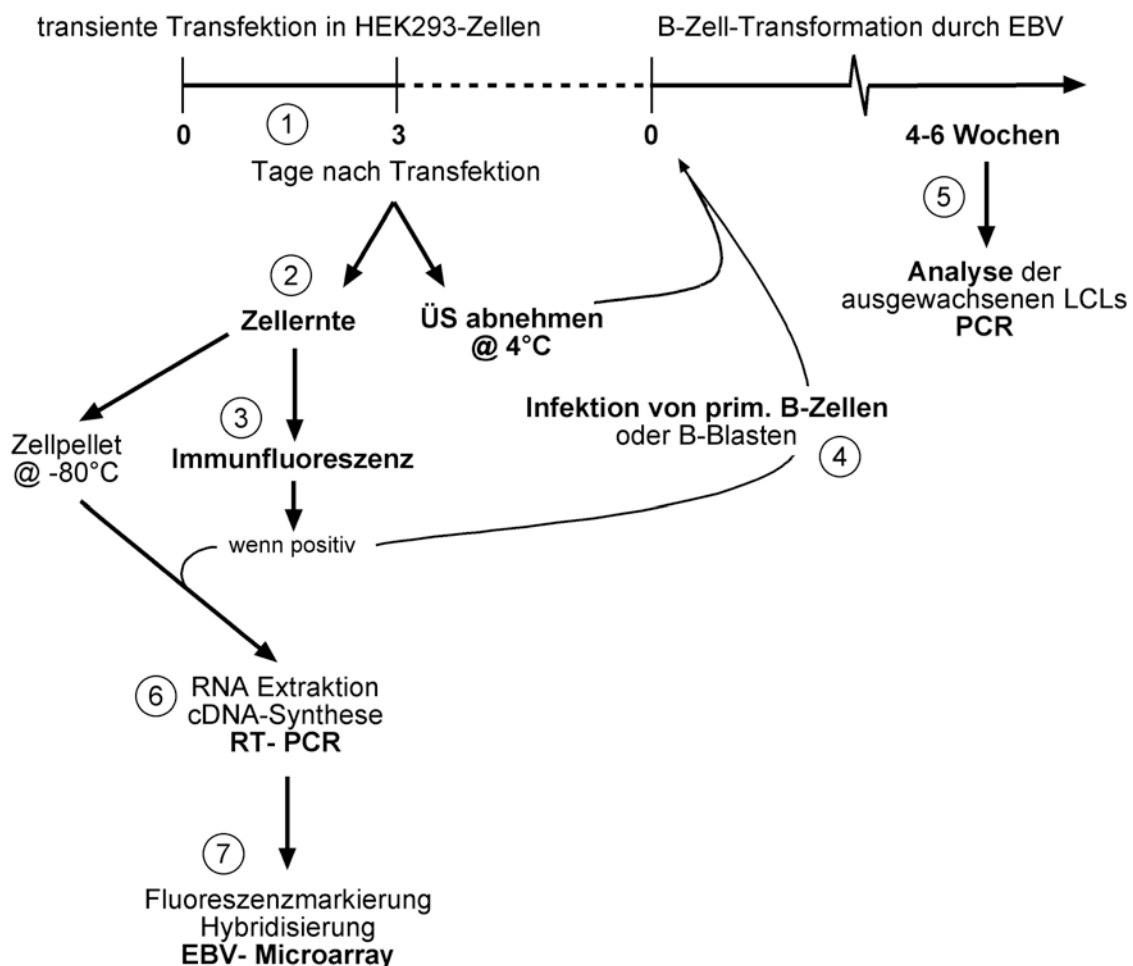


Abb. 4.2: Versuchsabläufe zur Detektion lytischer Genprodukte

Dargestellt ist eine schematische Übersicht und zeitliche Einteilung der durchgeführten Methoden, die zum Nachweis lytischer Genprodukte verwendet wurden. HEK293-Zellen wurden binnen drei Tagen mit maxi-EBV-DNA transient transfiziert (1). Diese HEK293-Zellen wurden durch Immunfluoreszenzanalysen auf die Expression lytischer Gene untersucht (3). B-Blasten wurden mit Viren aus den Zellkulturüberständen von HEK293-Zellen infiziert (4). Die EBV-transformierten B-Blasten (LCLs) wurden durch die Methodik der PCR analysiert (5). RNA-Extraktionen aus transient transfizierten HEK293-Zellen gaben Aufschluss über den transkriptionellen Status der lytischen Phase. Die Analyse ausgewählter lytischer Transkripte erfolgte durch RT-PCR (6); EBV-Microarray-Analysen bestimmten das genomweite Expressionsprofil von EBV-Transkripten (7).

Drei Tage nach transienter Transfektion wurden die transfizierten HEK293-Zellen und die Zellkulturüberstände auf virale Gene und Virusproduktion untersucht. Anfangs wurde die Induktion des lytischen Zyklus in den Zellen durch Immunfärbung lytischer Transkripte mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Im Mittelpunkt stehen fünf Transkripte, die zu den drei unterschiedlichen Genfamilien (IE, E, L) gehören: (i) Zta (BZLF1) und Rta (BRLF1) als 'immediate-early'-Genprodukte, (ii) EA-D (BMRF1) als 'early'-Genprodukt und (iii) VcAgp125 (BALF4) sowie gp350/220 (BLLF1) als 'late'-Genprodukte. Zusätzlich gaben RT-PCR-Analysen Aufschluss über den transkriptionellen Status der lytischen Phase. Die vollständige Induktion des lytischen Zyklus und Synthese von Nachkommenviren wurde durch Kokultivierung der HEK293-Kulturüberstände mit B-Blasten erbracht. Die B-Blasten wurden durch neusynthetisierte Viren transformiert, die daraus entstehenden LCLs auf maxi-EBV-DNA analysiert.

4.2.1 Expressionsnachweis lytischer Genprodukte durch Immunfluoreszenz

– Übersicht –

In jedes Feld eines Objektträgers (8-Loch) wurden 5×10^4 Zellen aufgetragen. Nach Trocknen, Fixieren für 20min und mehreren Waschschritten wurde mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper inkubiert. Erneutes Waschen und anschließendes Inkubieren mit einem Cy3-gekoppelten Sekundär-Antikörper machte die viralen Proteine lytisch induzierter Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

4.2.1.1 Kontrollexperimente – Induktion des lytischen Zyklus in stabil EBV-transfizierten HEK293-Zellen

Die stabil mit EBV transfizierte, lytisch induzierbare Epithelzelllinie HEK293/TR⁻ diente als Kontrolle für die Methodik der Immunfärbung. In einigen wenigen Zellen war eine spontane Expression des lytischen Schaltergens BZLF1 feststellbar, allerdings wurde der vollständige lytische Zyklus nicht induziert, da andere lytische Gene fehlen (Abbildung 4.3, Reihe 1). Durch die ektopische Expression des viralen Transaktivators BZLF1 konnte jedoch der vollständige lytische Zyklus in HEK293/TR⁻-Zellen effizient induziert werden, die Expression aller fünf ausgewählten lytischen Gene durch Immunfärbung war offensichtlich (Abbildung 4.3, Reihe 2).

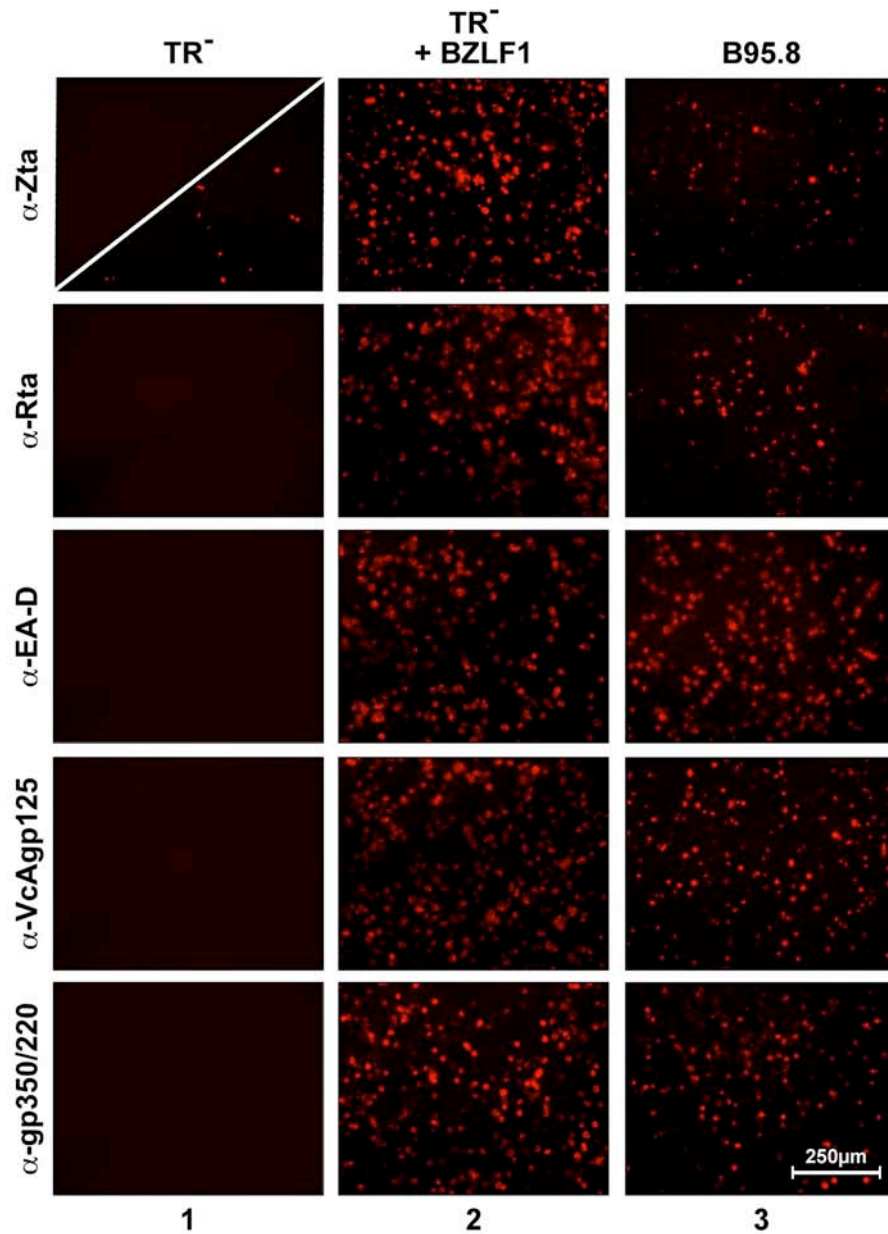


Abb. 4.3: Detektion lytischer Genprodukte in stabil EBV-transfizierten HEK293-Zellen und spontan lytischen B95.8-Zellen

Untersucht wurden die stabil EBV-transfizierte Zelllinie HEK293/TR⁻ und die EBV positive Zelllinie B95.8. HEK293/TR⁻-Zellen schienen z.T. spontan das für den lytischen Zyklus wichtige BZLF1-Transkript Zta zu exprimieren. Die geringe Expression an Zta war nicht ausreichend, um die nachgeschalteten Gene zur Expression zu bringen (1). Nach Induktion des lytischen Zyklus durch ektopische BZLF1-Expression fand ein vollständiger lytischer Zyklus in HEK293/TR⁻-Zellen statt (2). In der B95.8-Zelllinie unterstützen ca. 5-10% aller Zellen spontan den lytischen Zyklus (3). Gezeigt sind Färbungen mit Antikörpern gegen Proteine von fünf Genen, die zu den drei unterschiedlichen Genfamilien (IE, E, L) der lytischen Phase gehören: Zta (BZLF1) und Rta (BRLF1) als 'immediate-early'-Genprodukte, EA-D (BMRF1) als 'early'-Genprodukt und VcAgp125 (BALF4) sowie gp350/220 (BLLF1) als 'late'-Genprodukte.

Als weitere Kontrolle diente die spontan lytische B95.8-Zelllinie. Wie erwartet konnten alle fünf ausgewählten Proteine durch Immunfärbung detektiert werden (Abbildung 4.3, Reihe 3).

4.2.1.2 BZLF1-Expression in transient transfizierten HEK293-Zellen ist nicht ausreichend für die Induktion des lytischen Zyklus

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, wurden 1×10^6 HEK293-Zellen mit $5 \mu\text{g}$ p2089-maxi-EBV-DNA transient transfiziert und nach drei Tagen analysiert. Eine spontane Induktion des lytischen Zyklus konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 4.4, Reihe 1). Selbst die spontane Expression von Zta war für die Induktion des vollständigen lytischen Zyklus nicht ausreichend (Daten nicht gezeigt). Auch die ektopische Expression von BZLF1 durch Kotransfektion des Expressionsplasmids p509 war nicht in der Lage, den lytischen Zyklus zu induzieren (Abbildung 4.4, Reihe 2).

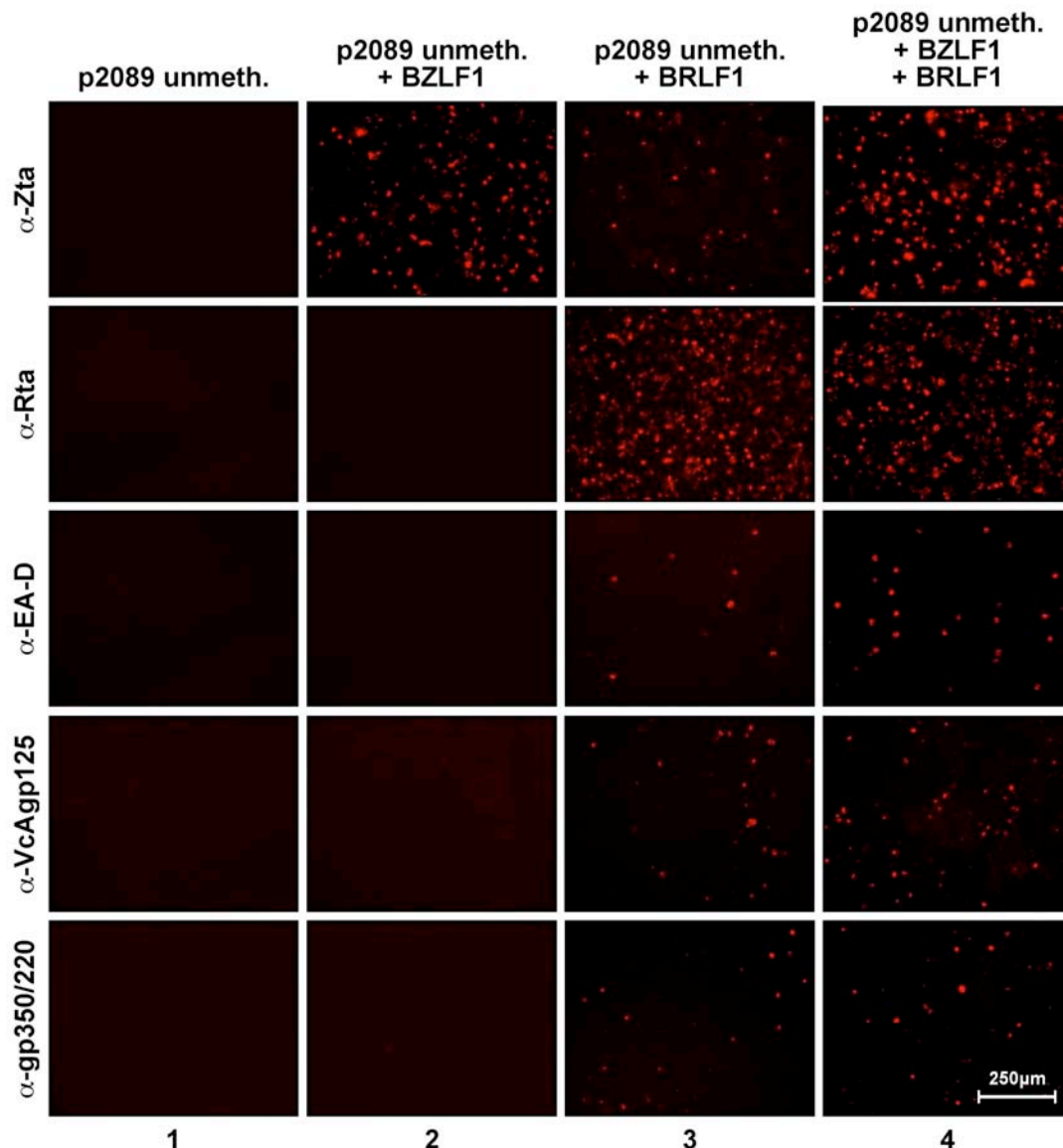


Abb. 4.4: Detektion lytischer Genprodukte in HEK293-Zellen, transient transfiziert mit dem maxi-EBV-Plasmid p2089

HEK293-Zellen wurden transient mit dem maxi-EBV-Plasmid p2089 transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen auf Objektträgern unter Wärme getrocknet und permeabilisiert. Der Nachweis von

lytischen Genprodukten erfolgte mittels monoklonaler Antikörper gegen Proteine der drei unterschiedlichen Genfamilien (IE, E, L): Zta (BZLF1) und Rta (BRLF1) als 'immediate-early'-Genprodukte, EA-D (BMRF1) als 'early'-Genprodukt und VcAgp125 (BALF4) sowie gp350/220 (BLLF1) als 'late'-Genprodukte. Durch einen Cy3-gekoppelten Sekundäantikörper wurden die Genprodukte in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit dem p2089-maxi-EBV-Plasmid führte nicht zur Expression lytischer Gene (1). Ektopische Expression von BZLF1 führte nur zur Expression von Zta (2). Ektopische Expression von BRLF1 aber induzierte die Transkription lytischer EBV-Gene (3 und 4).

4.2.1.3 Nachweis lytischer Genprodukte durch transiente Transfektion von CpG-methylierter EBV-DNA

Die DNA-Methylierung von Cytosinen spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der viralen und zellulären Genexpression. Dabei schreiben die meisten Modelle der Modifikation von CG-Dinukleotiden durch zelluläre Methyltransferasen eine inaktivierende Funktion der Gentranskription zu. Interessanterweise haben Bhende und Kollegen ein Bindemotiv im BRLF1-Promotor Rp (ZRE3) entdeckt, an das der virale Transaktivator Zta nur dann bindet, wenn es in methylierter Form vorliegt (Bhende et al., 2004; Bhende et al., 2005). Diesem Phänomen wurde hier nachgegangen.

Wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, kann das gesamte EBV-Genom *in vitro* mit der M.SssI-Methyltransferase effizient CpG-methyliert werden. HEK293-Zellen wurden mit dieser modifizierten maxi-EBV-DNA transient transfiziert, in der Erwartung, dass Zta an methylierungssensitive Sequenzmotive in Promotorregionen lytischer Gene bindet, diese aktiviert und so die lytische Phase induziert. Nach transienter Transfektion von CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA kam es jedoch nicht zur spontanen Induktion des lytischen Zyklus (Abbildung 4.5, Reihe 1). Erst die Kotransfektion des BZLF1-Expressionsplasmids (p509) führte zur Induktion des lytischen Zyklus. Die Expression aller fünf ausgewählten lytischen Gene wurde durch Immunfärbung nachgewiesen (Abbildung 4.5, Reihe 2). Demzufolge scheint der Block in der abortiv lytischen Phase von zweierlei Faktoren abzuhängen: (i) dem epigenetischen Zustand von permissiven Promotoren für Zta wie z.B. von Rp und (ii) der Expressionshöhe des BZLF1-Gens.

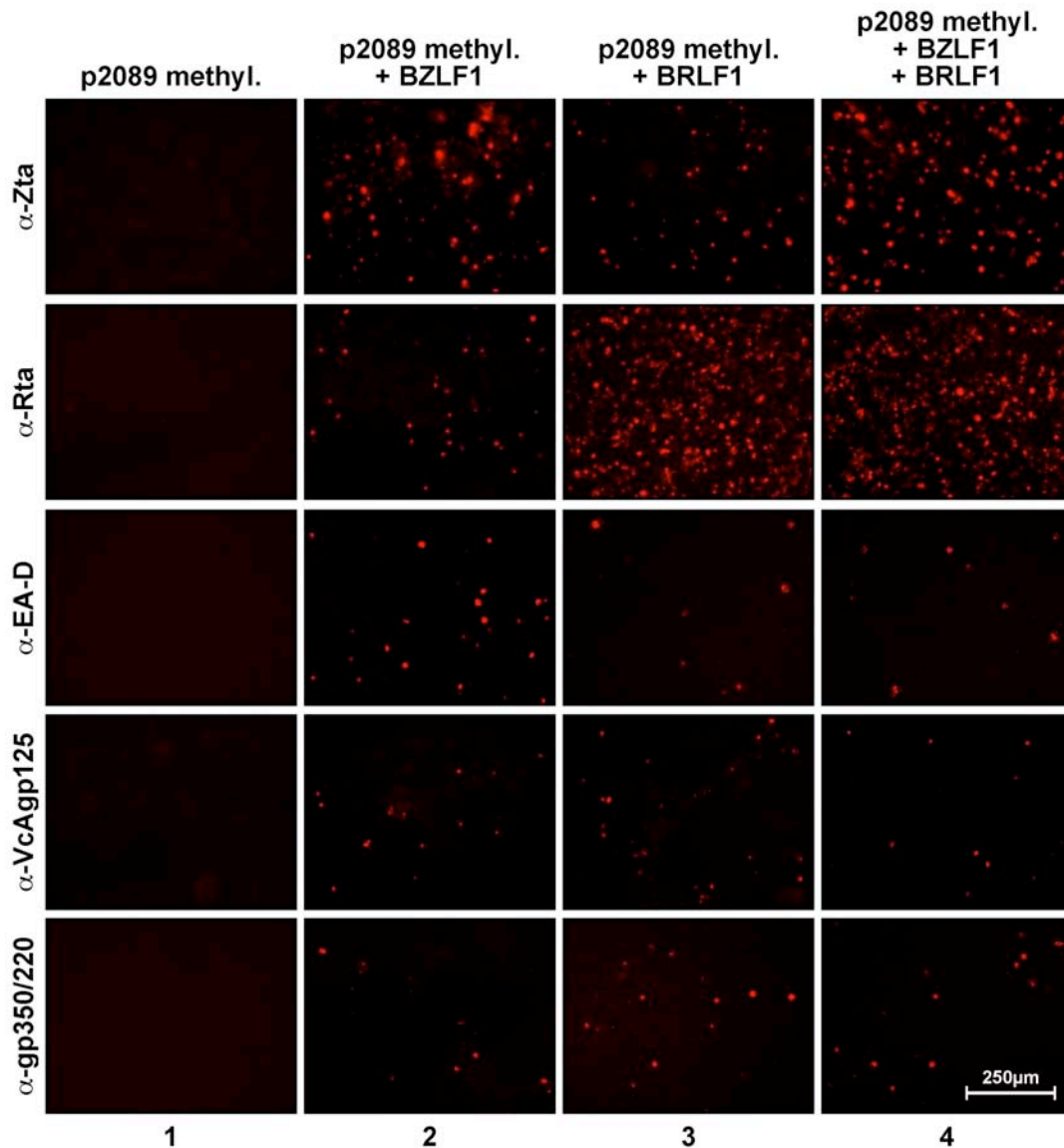


Abb. 4.5: Detektion lytischer Genprodukte in HEK293-Zellen, transient transfiziert mit CpG-methylierter EBV-DNA

Maxi-EBV-DNA wurde bei 37°C für vier Stunden mit der *de novo* Methyltransferase M.SssI CpG-methyliert. Die *in vitro* modifizierte DNA wurde in HEK293-Zellen transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen auf Objektträgern hitzefixiert und permeabilisiert. Der Nachweis von lytischen Genprodukten erfolgte mittels monoklonaler Antikörper gegen Proteine der drei unterschiedlichen Genfamilien (IE, E, L): Zta (BZLF1) und Rta (BRLF1) als 'immediate-early'-Genprodukte, EA-D (BMRF1) als 'early'-Genprodukt und VcAgp125 (BALF4) sowie gp350/220 (BLLF1) als 'late'-Genprodukte. Durch einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper wurden die Genprodukte in einem invertierten Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit dem methylierten p2089-maxi-EBV-Plasmid alleine führte nicht zur Expression lytischer Gene (1). Zta konnte die Expression nachgeschalteter lytischer Gene induzieren (2). Auch bei Kotretransfektionen mit methylierter EBV-DNA und ektopisch exprimiertem Rta wurden lytische EBV-Gene transkribiert (3 und 4). Der epigenetische Zustand des BRLF1-Promoter Rp scheint der wichtige Faktor für die erfolgreiche Induktion der lytischen Phase durch Zta in HEK293-Zellen zu sein.

4.2.1.4 Ektopische Expression von Rta induziert die Transkription lytischer EBV-Gene

Bhende und Kollegen konnten zeigen, dass eines der drei Bindemotive im Rp - ZRE3 - von Zta ausschließlich in methylierter Form gebunden wird (Bhende et al., 2004; Bhende et al., 2005). Zusätzlich konnte ich belegen, dass der lytische Zyklus unmittelbar nach transienter Transfektion von CpG-methylierter maxi-EBV-DNA in HEK293-Zellen abläuft (siehe Kapitel 4.2.1.3). Somit lag es nahe, dass der epigenetische Zustand des BRLF1-Promotors ein wichtiger Restriktionspunkt des lytischen Zyklus in HEK293-Zellen ist. Damit wurde die Frage aufgeworfen, ob dies der einzige Faktor ist, der die Induktion des lytischen Zyklus limitiert. Um dies zu beantworten, habe ich unmethylierte EBV-DNA gemeinsam mit dem Expressionsplasmid für BRLF1 (p2130) in HEK293-Zellen kotransfiziert. Wären weitere methylierte Promotoren lytischer Gene notwendig, um den Block der abortiv lytischen Phase zu überwinden, sollten keine weiteren lytischen Genprodukte durch Immunfärbung nachweisbar sein. Wie in Abbildung 4.4, Reihe 3 eindeutig gezeigt wird, war das ektopisch exprimierte Rta in der Lage, die lytische Phase in der Epithelzelllinie HEK293 vollständig zu initialisieren. Alle fünf ausgewählten Genprodukte waren detektierbar. Durch dieses Experiment konnte der Block in der abortiv lytischen Phase in Epithelzellen eindeutig benannt werden: Zta kann den unmethylierten BRLF1-Promotor nicht aktivieren. Wie erwartet initialisierte Rta auch bei Kotransfektion von methylierter maxi-EBV-DNA den vollständigen lytischen Zyklus in HEK293-Zellen (Abbildung 4.5, Reihe 3). Ebenso konnte durch Kotransfektion beider Expressionsplasmide (p509 und p2130) mit unmethylierter oder methylierter EBV-DNA die lytische Replikation eingeleitet werden (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5, jeweils Reihe 4). Ein Überblick aller Ergebnisse, die im Rahmen der Immunfluoreszenzanalysen erarbeitet wurden, ist in Tabelle 4.1 gezeigt.

	unmethyliert				methyliert				Kontrollen		
	p2089 +BZLF1	p2089 +BRLF1	p2089 +BZLF1 +BRLF1	p2089 +BZLF1 +BRLF1	p2089 +BZLF1	p2089 +BRLF1	p2089 +BZLF1 +BRLF1	p2089 +BZLF1 +BRLF1	TR ⁻ +BZLF1	TR ⁻ +BZLF1	B95.8
α -Zta	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
α -Rta	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
α -EA-D	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
α -VcAgp125	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
α -gp350/220	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+

Tab. 4.1: Überblick der Immunfluoreszenzerggebnisse nach transients Transfektion von maxi-EBV-DNA

Induktion der lytischen Phase in transient transfizierten HEK293-Zellen mit unmethylierter und methylierter maxi-EBV-DNA. Nachweis von lytischen Genprodukten erfolgte mittels monoklonaler Antikörper gegen Proteine der drei unterschiedlichen Genfamilien (IE, E, L): Zta (BZLF1) und Rta (BRLF1) als 'immediate-early'-Genprodukte, EA-D (BMRF1) als 'early'-Genprodukt und VcAgp125 (BALF4) sowie gp350/220 (BLLF1) als 'late'-Genprodukte. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen ausschließlich mit p2089-maxi-EBV-DNA führte nicht zur Expression lytischer Gene. Nur in Experimenten mit CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA führte die ektopische Expression von BZLF1 zum vollständigen lytischen Zyklus. Eine Kotransfektion des BRLF1-Expressionsplasmids induzierte in unmethylierter und methylierter p2089-maxi-EBV-DNA den lytischen Zyklus. Als Kontrolle dienten nicht induzierte bzw. lytisch induzierte HEK293/TR⁻-Zellen und B95.8-Zellen. (-) virale lytische Proteine konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz nicht detektiert werden; (+) positive Immunfluoreszenz

4.2.2 RT-PCR-Analyse ausgewählter Transkripte lytischer Gene

– Übersicht –

Aus transient transfizierten HEK293-Zellen, lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen und B95.8-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und mit DNaseI 90min lang bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt stellte sicher, dass in der anschließenden PCR-Reaktion ausschließlich virale cDNA amplifiziert wurde, da der Großteil lytischer Transkripte ungespleißt ist. Eine Kontrolle des Verdau genomischer DNA erfolgte an Hand der gespleißten Produkte von BZLF1 und BLLF1 sowie des zellulären β -Actin Transkripts. Nach dem DNase-Verdau wurde die mRNA mit dem „SuperScript™ III First-Strand“ cDNA Kit (Invitrogen) revers transkribiert. Die Amplifikation der fünf interessierenden viralen Transkripte (BZLF1, BRLF1, BMRF1, BALF4, BLLF1) sowie der zellulären Kontrolle (β -Actin) erfolgte mit einer PCR-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern. Als Kontrollen dienten die stabil mit EBV transfizierte Epithelzelllinie HEK293/TR⁻ (\pm lytisch induziert) sowie die spontan lytische B95.8-Zelllinie (Abbildung 4.6 und 4.7, Reihe 9-11). Eine mögliche Kontamination des PCR-

Ansatzes mit EBV-DNA wurde mit einer Wasserkontrolle ausgeschlossen (Abbildung 4.6 und 4.7, Reihe 12).

4.2.2.1 Kontrolle der Kontamination mit genomischer DNA

Eine anfängliche PCR-Analyse deckte die Kontamination der RNA-Proben mit genomischer DNA auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Die kontaminierende genomische DNA konnte aber durch eine 90-minütige Inkubation mit DNaseI abgebaut werden; es waren keine PCR-Produkte mehr detektierbar (Abbildung 4.6, Reihe 1-11). Zur Kontrolle wurde die PCR-Reaktion mit einer lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Probe durchgeführt, die nicht mit DNaseI behandelt war. Die erwarteten PCR-Produkte sind gezeigt (Abbildung 4.6, Reihe 13). Die Amplifikation des BLLF1-Gens mit genomischer viraler DNA ist unmöglich, da der verwendete 'forward' Primer für BLLF1 komplementär zur Spleißstelle des gp350/220-kodierenden Gens ist (Abbildung 4.6, Reihe 13).

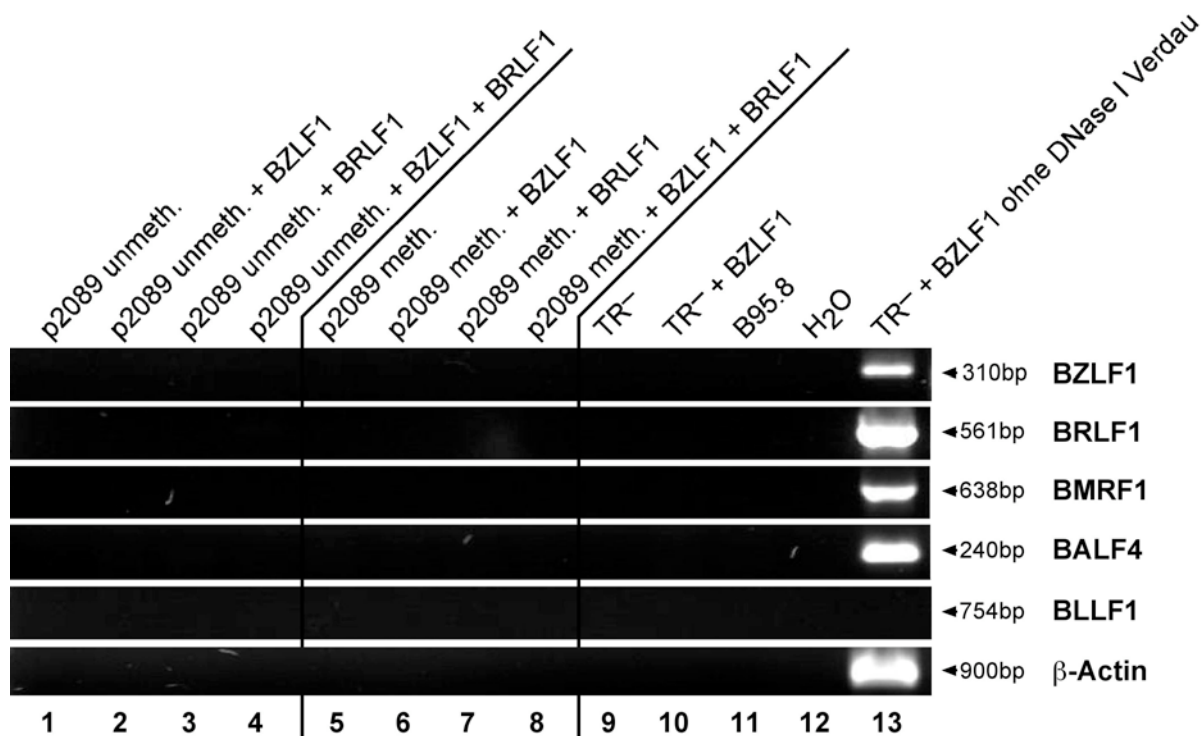


Abb. 4.6: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der PCR-Amplifikate zur Kontrolle der Kontamination von RNA-Proben mit genomischer DNA

Aus transient transfizierten HEK293-Zellen, lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen und B95.8-Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) Gesamt-RNA isoliert. 1µg RNA wurde 90min lang mit „DNaseI – Amplification Grade“ (Invitrogen) bei 37°C inkubiert. Der DNaseI-Verdau wurde durch eine PCR-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern für BZLF1, BRLF1, BMRF1, BALF4, BLLF1 und β-Actin überprüft (Reihe 1-11). Genomische DNA konnte nach DNaseI-Verdau nicht amplifiziert werden. Als Kontrolle dienten RNA-Proben von lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen ohne DNaseI-Verdau (Reihe 13). BLLF1 zeigte kein PCR-Produkt, da der verwendete FP für BLLF1 komplementär zur Spleißstelle des gp350/gp220-Gens ist und deshalb nicht an virale genomische DNA bindet.

4.2.2.2 Spontane Expression von BZLF1

Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass bei transienter Transfektion von unmethylierter und methylierter maxi-EBV-DNA eine spontane Expression von BZLF1 erfolgte, es wurden allerdings nur geringe Transkriptmengen von BZLF1 in diesen Zellen detektiert (Abbildung 4.7, Reihe 1 und 5 bei 36 PCR-Zyklen). Eine spontane Aktivität von BZLF1 war auch in geringem Maße in der stabil mit EBV transfizierten Epithelzelllinie HEK293/TR⁻ sichtbar (Abbildung 4.7, Reihe 9 bei 36 PCR-Zyklen).

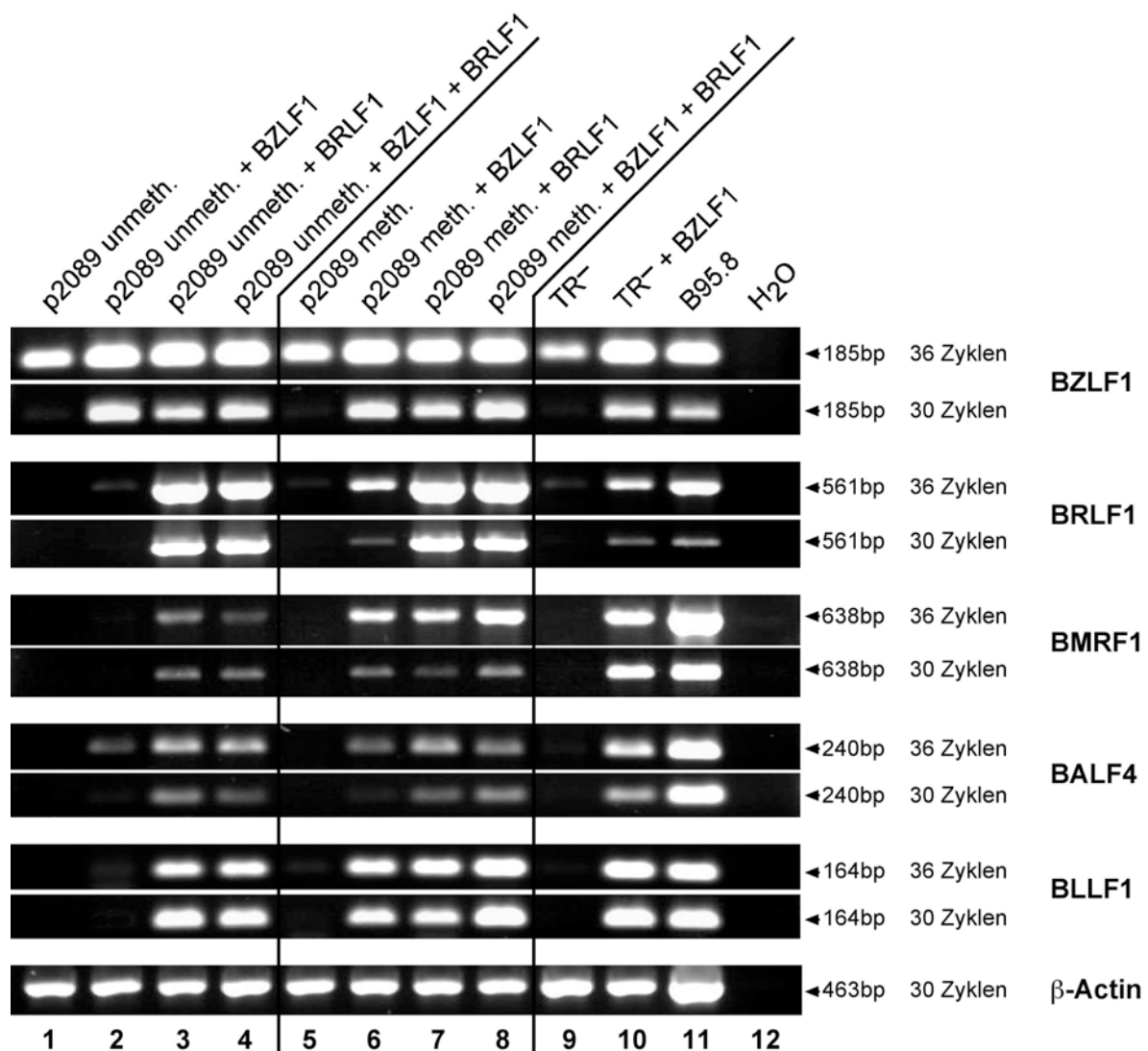


Abb. 4.7: RT-PCR-Analysen – Expression ausgewählter Gene

Aus transient transfizierten HEK293-Zellen, lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen und B95.8-Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) Gesamt-RNA isoliert. Aus jedem Versuch wurde 1 µg RNA nach 90min DNaseI-Verdau mit dem „SuperScriptTM III First-Strand“ cDNA Kit (Invitrogen) revers transkribiert. Die Amplifikation der fünf interessierenden viralen Transkripte (BZLF1, BRLF1, BMRF1, BALF4, BLLF1) sowie der zellulären Kontrolle (β-Actin) erfolgte durch eine PCR-Reaktion mit sequenzspezifischen Primern. Als Vergleich sind PCR-Reaktionen mit 30 und 36 Zyklen gezeigt. Nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit p2089-maxi-EBV-DNA wurde BZLF1 spontan exprimiert (Spalte 1 und 5). Auch HEK293/TR⁻-Zellen zeigten eine spontane BZLF1 Expression (Spalte 9). Jedoch schien das Expressionsniveau von BZLF1 nicht ausreichend für die Induktion weiterer lytischer Gene (Spalte 1, 5 und 9). Die ektopische Expression von BZLF1 induzierte in geringem Maß die Expression von BRLF1 und BALF4, jedoch keiner weiteren lytischen Gene (Spalte

2). Kotransfektion von methylierter EBV-DNA mit dem Expressionsplasmid für BZLF1 resultierte in der Expression aller fünf lytischen Gene (Spalte 6). Kotransfektion mit dem BRLF1 Expressionsplasmid induzierte wie erwartet in unmethylierter als auch methylierter EBV-DNA den lytischen Zyklus (vgl. Spalte 3, 4, 7 und 8). In den Positivkontrollen – lytisch induzierte HEK293/TR⁻-Zellen und B95.8-Zellen – waren alle fünf interessierenden Transkripte detektierbar (Spalte 10 und 11). Die β -Actin Kontrolle war in allen Proben nachweisbar.

4.2.2.3 Ektopische Expression von BZLF1 kann BRLF1 und BALF4 induzieren

Ein Teilziel dieser Arbeit war es, Gene zu identifizieren, die in unterschiedlichen Zuständen der lytischen Phase exprimiert werden. Wie in Abbildung 4.7 Reihe 2 deutlich gezeigt wird, führte die ektopische Expression von BZLF1 bei Kotransfektion mit unmethylierter p2089-maxi-ENV-DNA zu einem abortiv lytischen Zustand. Es kam zu einer schwachen Expression weniger lytischer Gene; bei 36 PCR-Zyklen waren PCR-Produkte von BRLF1 und BALF4 gerade noch detektierbar.

4.2.2.4 Nachweis lytischer Genprodukte nach transienter Transfektion von CpG-methylierter EBV-DNA

Wie schon mit Immunfluoreszenzanalysen gezeigt (Kapitel 4.2.1.3), konnte der Block in der abortiv lytischen Phase durch die Transfektion von methylierter maxi-EBV-DNA gemeinsam mit dem BZLF1 Expressionsplasmid p509 durchbrochen werden. Transkripte aller fünf ausgewählten lytischen Gene wurden in RT-PCR-Reaktionen amplifiziert (Abbildung 4.7, Reihe 6).

4.2.2.5 Ektopische Expression von Rta induziert die Transkription lytischer EBV-Gene

Der Block in der abortiv lytischen Phase konnte auch durch Kotransfektion mit dem BRLF1 Expressionsplasmid (p2130) überwunden werden. So bewirkte die ektopische Expression von Rta die sofortige Aktivierung der viralen Transkription in unmethylierter EBV-DNA (Abbildung 4.7, Reihe 3) sowie in methylierter EBV-DNA (Abbildung 4.7, Reihe 7). Diese Ergebnisse wurden durch Kotransfektion beider Expressionsplasmide (p509 und p2130) mit unmethylierter oder methylierter EBV-DNA bestätigt, es wurden PCR-Produkte aller fünf ausgewählten Gene generiert (Abbildung 4.7, Reihe 4 und 8).

In diesen Experimenten konnte ich einen weiteren Faktor, der für den Block in der abortiv lytischen Phase verantwortlich ist, identifizieren: die Menge an

transkribiertem Zta ist für die Überwindung des Blocks in der abortiv lytischen Phase von entscheidender Bedeutung (Vgl. in Abbildung 4.7, Reihe 1,5,9 mit 2,6,10). Darüber hinaus benötigt Zta methylierte Bindemotive, wahrscheinlich im BRLF1-Promotor Rp, um dessen Expression effizient zu aktivieren.

4.2.3 Nachweis und Quantifizierung der Virusneusynthese

– Übersicht –

Die Expression von lytischen späten ('late')-Genen bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch infektiöse Viren freigesetzt wurden. Durch Kokultivierung und Transformation von B-Blasten mit infektiösen Partikeln aus Kulturüberständen von transient transfizierten HEK293-Zellen konnte ich zeigen, dass infektiöse Nachkommenviren synthetisiert werden. Die Effizienz der Virusneusynthese wurde in diesen Experimenten ebenfalls analysiert. Die Beweisführung entspricht in der Abbildung 4.2 den Punkten 4 und 5 des Fließschemas. Das genaue methodische Vorgehen ist in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

4.2.3.1 Kontrollexperimente - Infektion von BBLs mit 2089-Wildtyp-EBV

Wie in Kapitel 4.1.1.2 beschrieben, kann die stabil mit EBV transfizierte HEK293/2089-Zelllinie durch ektopische Expression von BZLF1 lytisch aktiviert werden. Es entstehen neusynthetisierte Viren, die B-Blasten effizient infizieren und transformieren. Die optimalen Bedingungen für den Nachweis von Nachkommenviren wurden in Vorversuchen ermittelt. In sämtlichen Versuche wurden $2,5 \times 10^6$ B-Blasten in 48 Einzelgefäßen einer 96-Loch-Platte mit 100µl der generierten Virussuspension infiziert. Die Rate an ausgewachsenen B-Zell-Kulturen in 48 Einzelgefäßen erlaubte eine Aussage über die relative Menge von Nachkommenviren.

4.2.3.2 Virusneusynthese nach CpG-Methylierung des EBV-Genoms und Kotransfektion von BZLF1 bzw. BRLF1

Eine definierte Anzahl B-Blasten wurde mit Kulturüberständen von sämtlichen Versuchen, die in Tabelle 4.1 (Kapitel 4.2.1.4) aufgeführt sind, kokultiviert. Nach sechs Wochen wurde die Transformationseffizienz durch Auswerten der 96-Loch-Platten bestimmt. Nur B-Blasten, die durch EBV infiziert wurden, zeigten das

typische Erscheinungsbild wachstumstransformierter Zellen und exprimierten GFP. Ein Beispiel ist in Abbildung 4.8 gezeigt.

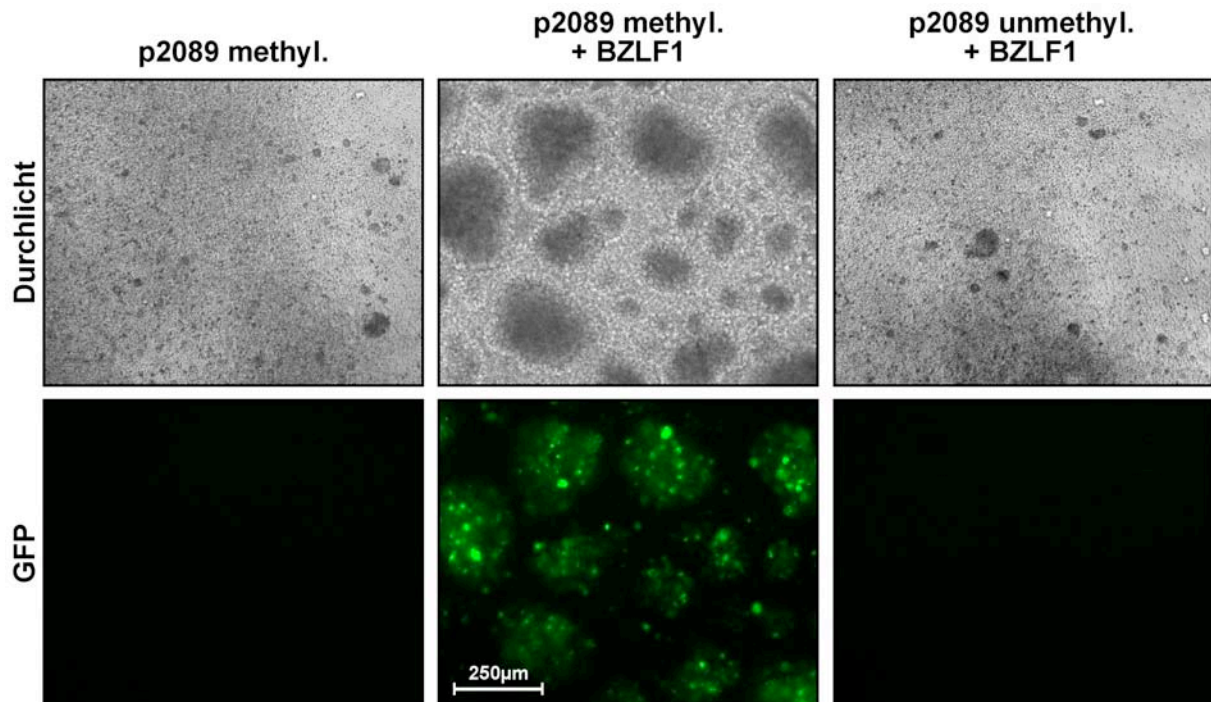


Abb. 4.8: Nachweis der Virusneusynthese durch Infektion von B-Blasten.

B-Blasten wurden mit Zellkulturüberständen von transient transfizierten HEK293-Zellen kokultiviert. Sechs Wochen nach Infektion wurde auf Transformation überprüft. Nur B-Blasten, die durch EBV infiziert wurden, zeigten das typische Erscheinungsbild wachstumstransformierter Zellen und exprimierten GFP.

In Versuchen, in denen HEK293-Zellen nur mit maxi-EBV-DNA (unmethyliert oder methyliert) transient transfiziert wurden, kam es zu keiner Synthese von Nachkommenviren. B-Blasten wurden nicht transformiert. Auch führte die Kotransfektion von unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA mit dem BZLF1-Expressionsplasmid (p509) in keinem Fall zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln. Die Kotransfektion von unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA mit dem BRLF1-Expressionsplasmid (p2130) setzte allerdings neusynthetisierte Viren frei. Im Median aller Versuche wuchsen in 23 von 48 Einzelgefäßen LCLs aus. Die Kotransfektion von beiden Expressionsplasmiden steigerte die Transformationseffizienz auf 43 auswachsende LCLs je 48 Einzelgefäße. Auch in Versuchen, in denen HEK293-Zellen transient mit CpG-methylierter EBV-DNA transfiziert wurden, bewirkte die ektopische Expression von BZLF1 und/oder BRLF1 die Synthese von Nachkommenviren. So konnte im Median aller Versuche mit methylierter p2089-maxi-EBV-DNA und Kotransfektion von BZLF1 in 18 von 48 ausplattierten Einzelgefäßen LCLs gezählt werden. Die ektopische Expression von BRLF1 steigerte die Transformationseffizienz auf 42 auswachsende LCLs je 48

Einzelgefäße. Der höchste Virustiter wurde durch Kotransfektion methylierter p2089-maxi-EBV-DNA mit beiden Expressionsplasmiden erreicht; B-Blasten wuchsen in 48 von 48 Einzelgefäßen in allen durchgeführten Versuchen aus. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Angegeben ist der Median aus allen Versuchen zusammen mit den jeweils niedrigsten und höchsten beobachteten Transformationsereignissen in eckigen Klammern.

	unmethyliert [x aus 48]	Anzahl der Versuche	methyliert [x aus 48]	Anzahl der Versuche
p2089	0 [0/0]	12	0 [0/2]	10
p2089 +BZLF1	0 [0/0]	12	18 [2/48]	10
p2089 +BRLF1	23 [10/47]	4	42 [35/48]	2
p2089 +BZLF1 +BRLF1	43 [16/48]	4	48 [48/48]	2

Tab. 4.2: Überblick über die B-Zelltransformation mit Überständen aus transient mit p2089-maxi-EBV-DNA transfizierten HEK293-Zellen

B-Blasten wurden mit Zellkulturüberständen von transient transfizierten HEK293-Zellen kokultiviert. Nach sechs Wochen wurde auf Transformation überprüft. Transiente Transformation von p2089-maxi-EBV-DNA produzierte keine Nachkommenviren, B-Blasten wurden nicht transformiert. Kotransfektion des BZLF1 Expressionsplasmids mit methylierter p2089-maxi-EBV-DNA resultierte in der Freisetzung von infektiöse Nachkommenviren; im Median wuchsen in 18 von 48 Einzelgefäßen LCLs aus. Die Kotransfektion von BRLF1 ermöglichte den lytischen Zyklus in transienten Transfektionen mit unmethylierter und methylierter p2089-maxi-EBV-DNA; in 23 (unmethylierte DNA) bzw. 42 (methylierte DNA) Einzelgefäßen wuchsen LCLs aus. Die ektopische Expression beider IE-Genen erhöhte den Virustiter; bei Kotransfektion mit unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA wuchsen in 43 Einzelgefäßen LCLs aus, bei Kotransfektion mit methylierter DNA in allen 48 Einzelgefäßen. Gezeigt ist der Median aus allen Versuchen, mit der jeweils niedrigsten und höchsten beobachteten Transformationseffizienz in eckigen Klammern. Zusätzlich ist die Anzahl der durchgeführten Versuche angegeben, die in die Berechnung mit eingeflossen ist.

4.2.3.3 Analyse der transformierten B-Blasten

Zur Bestätigung des rekombinanten EBV-Genoms wurden die LCL-Kulturen expandiert und deren genomische DNA isoliert. Die DNA diente als Template für PCR-Reaktionen mit sequenzspezifischen Primern für den GFP- und Chloramphenicol-Gen-Lokus im p2089-maxi-EBV-Konstrukt. Im Gegensatz zu Wildtyp-B95.8-DNA besaßen alle entstandenen LCLs diese beiden Loci (Abbildung 4.9). Wie erwartet war in allen DNA-Proben das BNLF1-Gen nachweisbar. In Abbildung 4.9 ist ein vergleichender, exemplarischer PCR-Nachweis dargestellt.

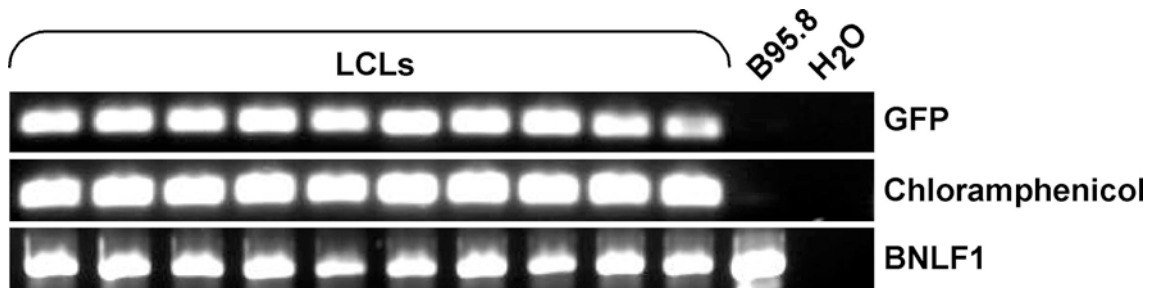


Abb. 4.9: PCR-Nachweis von rekombinanten maxi-EBV-DNAs in wachstumstransformierten B-Blasten (LCLs)

Aus B95.8 und verschiedenen LCL-Klonen wurde gesamtzelluläre DNA isoliert und als Template für die PCR-Amplifikation verwendet. In LCLs, nicht jedoch in der Kontrollzelllinie B95.8, war GFP und Chloramphenicol nachweisbar. Das LMP1 kodierende Gen BNLF1 konnte wie erwartet in allen Proben detektiert werden.

4.2.3.4 Kotransfektion einer *de novo* Methyltransferase führt zur Virusneusynthese

Wie in den bisherigen Ergebnissen gezeigt, ist die CpG-Methylierung des EBV-Genoms neben dem Expressionsniveau des lytischen Transaktivators BZLF1 essentiell für die Induktion des lytischen Zyklus und die Virusneusynthese. Im Gegensatz zur zellulären DNA, welche ein bestimmtes Methylierungsmuster aufweist, ist die in Virionen enthaltene EBV-DNA bzw. die in Transfektionen verwendete p2089-maxi-EBV-DNA nicht CpG-methyliert (Dyson and Farrell, 1985; Robertson et al., 1996; Shaw et al., 1979). Aus unveröffentlichten Arbeiten der Arbeitsgruppe wissen wir aber, dass die virale DNA in latent infizierten B-Zellen sehr langsam innerhalb mehrerer Wochen nach Infektion durch zelluläre *de novo* Methyltransferasen (z.B. Dnmt3) an CG-Dinukleotiden methyliert wird. Die fehlende Methylierung der viralen DNA könnte ein Grund dafür sein, warum es nach Primärinfektion oder transients Transfektion von viraler DNA zur abortiv lytischen Phase kommt, da der unmethylierte Zustand der ZREs im Promotor des BRLF1-Gens Rp die Aktivierung dieses Gens verhindert, obwohl alle infizierten primären B-Zellen BZLF1 exprimieren (eigene unveröffentlichte Beobachtungen und Wen et al., 2007).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die *de novo* Methyltransferase M.Sssl *in vitro* in EBV-DNA entsprechende epigenetische CpG-Methylmodifikationen einführt, die nach transients Transfektion die Induktion des lytischen Zyklus unmittelbar erlauben. Durch die ektopische Expression der M.Sssl-Methyltransferase in HEK293-Zellen sollte es deshalb auch möglich sein, die CpG-Methylierung von kotransfizierter p2089-maxi-EBV-DNA zu bewirken. Der für die

Methylierungsreaktion wichtige Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM) wird *in vivo* ständig neu generiert (siehe Abbildung 4.10), er steht somit wahrscheinlich auch für die M.Sssl-Methyltransferase unlimited zur Verfügung. Die ektopische Expression der M.Sssl-Methyltransferase sollte deshalb zu einer raschen Modifikation der EBV-DNA führen.

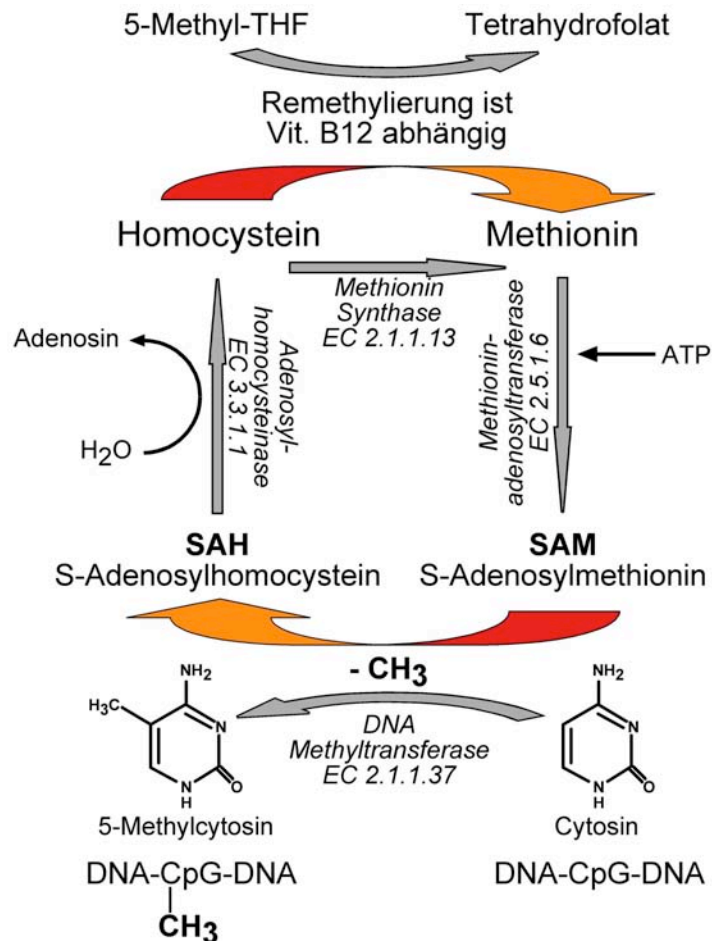


Abb. 4.10: Synthese von 5-Methylcytosin *in vivo*

Im Organismus dient S-Adenosylmethionin (SAM, AdoMet) als Kofaktor für zahlreiche Methyltransferasen. Durch die DNA-Methyltransferase wird eine Methylgruppe (CH₃) von SAM auf die DNA übertragen. Hierbei entstehen 5-Methylcytosin und SAH. An der Remethylierung von Homocystein zu Methionin (Methylierungszyklus) ist die Methionin-Synthase beteiligt, die das Vitamin B12 als Kofaktor und 5-Methyltetrahydrofolsäure (5-Methyl-THF) als Methylgruppendonor benötigt. Aus Methionin entsteht nach Transfer der ATP-Adenosylgruppe erneut SAM.

Das Expressionsplasmid p3663.1 besteht aus dem pRK5-Vektor, in den die Sequenz der *de novo* Methyltransferase M.Sssl unter Kontrolle des CMV-Promotors kloniert wurde (persönliche Angaben von W. Hammerschmidt). HEK293-Zellen wurden mit 5µg unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA, 0,5µg p509-DNA (BZLF1-Expressionsplasmid) und 4µg p3663.1-DNA (M.Sssl-Expressionsplasmid) unter den im Standardprotokoll angegebenen Bedingungen (Kapitel 3.2.2) transient transfiziert. Zusätzlich wurde 0,5µg des BALF4-Expressionsplasmids (p2670) kotransfiziert, da mit diesem die Menge an produzierten infektiösen Partikeln deutlich gesteigert wird

(Neuhierl et al., 2002). Die Kulturüberstände wurden drei Tagen nach Transfektion abgenommen und mit B-Blasten in einer 96-Loch-Platte ausplattiert. Die Virusneusynthese wurde, wie im Standardprotokoll beschrieben (Kapitel 3.2.3), bestimmt. Im Median aller durchgeführten Versuche wuchsen in 45 von 48 Einzelgefäßen LCLs aus (18/48 mind.; 48/48 max.; sieben unabhängig durchgeführte Experimente). Dieser Versuch lässt vermuten, dass durch ektopische Expression der *de novo* Methyltransferase M.Sssl die p2089-maxi-EBV-DNA sehr rasch *in vivo* methyliert wird. Zta konnte deshalb an das modifizierte ZRE2- bzw. ZRE3-Motiv im BRLF1-Promotor binden und den lytischen Zyklus initialisieren. Somit konnte der Block in der abortiv lytischen Phase durch Kotransfektion des M.Sssl-Expressionsplasmids (p3663.1) sofort überwunden werden.

4.2.3.5 Proteintransduktion der M.Sssl-Methyltransferase resultiert in der Neusynthese von Viren

Nachdem die beiden Ursachen für die Restriktion in der abortiv lytischen Phase aufgedeckt waren – (i) Zta's Unvermögen, den unmethylierten Rp zu aktivieren und (ii) die Dosis an transkribiertem Zta – stand der für die lytische Induktion notwendige Methylierungsgrad der EBV-DNA im Mittelpunkt der Interesse. Wie umfangreich muss die EBV-DNA *in vitro* methyliert sein, damit nach transienter Transfektion der lytische Zyklus unverzüglich eingeleitet werden kann?

Zu diesem Zweck wurde p2089-maxi-EBV-DNA, wie im Standardprotokoll beschrieben (Kapitel 3.4.4), methyliert. Jedoch wurden abnehmende SAM-Konzentrationen verwendet, um einen unterschiedlichen Grad an DNA-Methylierung zu erhalten. 100% SAM entsprach der aus den Angaben des Herstellers berechneten, einzusetzenden SAM-Konzentration; 0% SAM bedeutete eine Inkubation der DNA mit der M.Sssl-Methyltransferase ohne den für die Methylierung notwendigen Methylgruppendonator SAM. Der Methylierungsgrad wurde, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, durch einen Restriktionsverdau mit dem CpG-methylierungssensitiven Enzym AgeI festgestellt. Abbildung 4.11 stellt ein exemplarisches Agarosegel vor, auf dem in unterschiedlichem Grad CpG-methylierte p2089-maxi-EBV-DNA analysiert wurde.

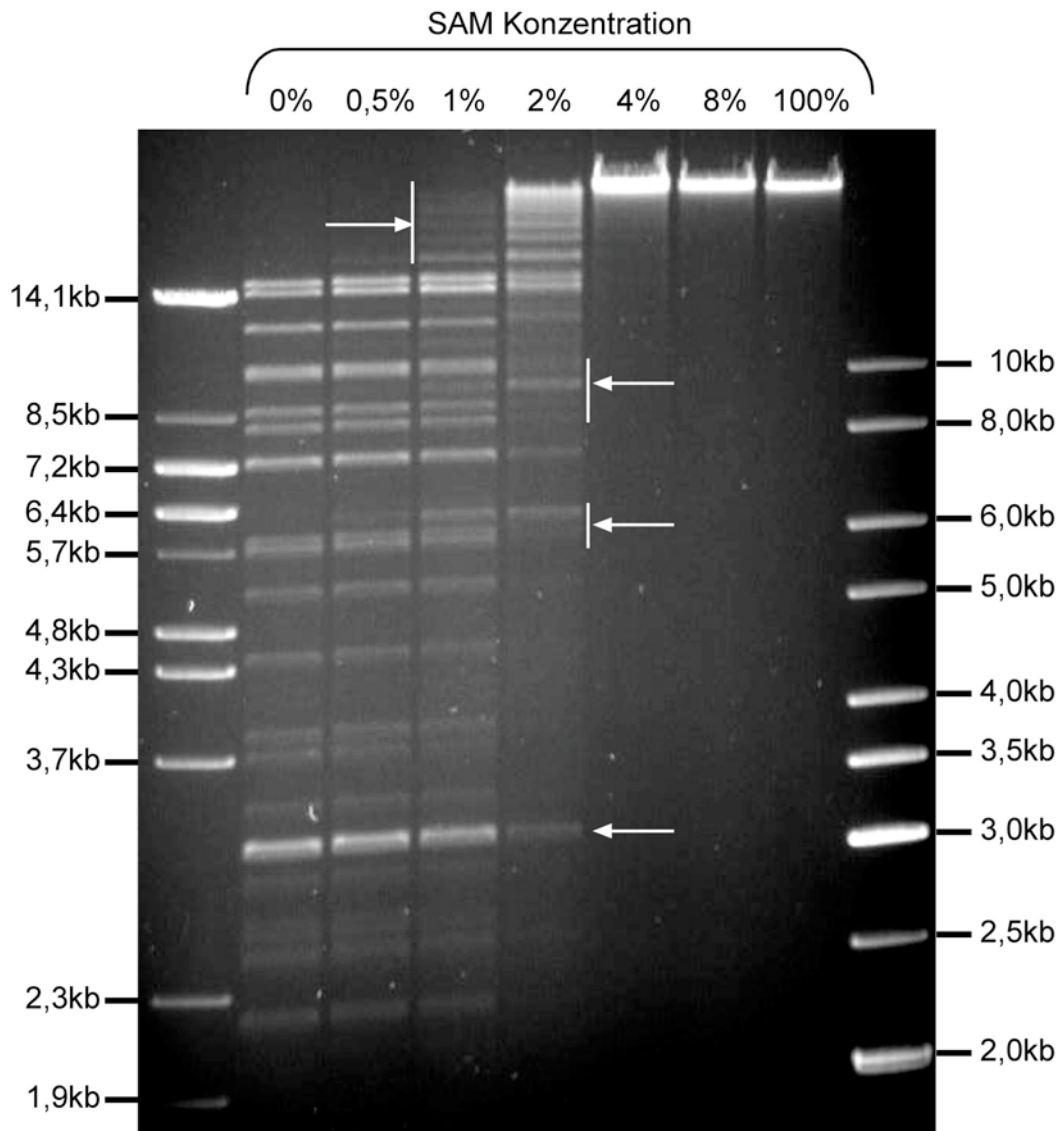


Abb. 4.11: Unterschiedlicher Methylierungsgrad von p2089-maxi-EBV-DNA

Durch verschiedene SAM Konzentrationen (0%-100%) wurde p2089-maxi-EBV-DNA in unterschiedlichem Grad CpG-methyliert. 100% SAM entsprach der nach Angaben des Herstellers berechneten optimalen SAM-Konzentration; 0% SAM bedeutete eine Inkubation der p2089-DNA ohne Zugabe von SAM. Gezeigt ist der Restriktionsverdau der DNAs mit dem methylierungssensitiven Enzym AgeI. Verdeutlicht sind Bereiche, in denen niedermolekulare Produkte nicht mehr entstehen, bedingt durch den Anstieg der Methylierung, die die Restriktion der DNA durch AgeI blockiert.

Nach transienter Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNAs mit unterschiedlichem Methylierungsgrad in Kombination mit dem BZLF1-Expressionsplasmid wurde das Kulturmedium nach drei Tagen abgenommen und mit B-Blasten sechs Wochen lang kokultiviert. Es wurde erwartet, dass die verschiedenen SAM-Konzentrationen in unterschiedlichen Virustitern resultieren. Das Maximum an Transformationseffizienz sollte bestimmt werden und daraus der optimale Methylierungsgrad abgeleitet werden.

Überraschenderweise resultierten alle transienten Transfektionen mit p2089-maxi-EBV-DNAs, ungeachtet ihres Methylierungsgrads, in der Freisetzung von

Nachkommenviren. Es scheint so, als ob die Methyltransferase M.Sss1 mittransfiziert wurde oder eventuell sogar an die EBV-DNA gebunden hatte und dadurch zu einer CpG-Methylierung der EBV-DNA in der Zelle führte. Überlegungen zur Inaktivierung des Enzyms wurden nicht weiter verfolgt, da die laut Angaben des Herstellers dafür benötigten Bedingungen die physiologische Integrität der DNA gefährdet hätten. Durch Transfektion des Enzyms konnte das in ausreichendem Maße *in vivo* generierte SAM der M.Sss1 als Methylgruppendonor dienen und bewirkte wahrscheinlich so eine sehr rasche Methylierung der EBV-DNA *in vivo*. Zta war dadurch in der Lage, an die beiden methylierten ZREs im Rp zu binden und initiierte postwendend die lytische Phase.

4.3 Herstellung eines genomweiten EBV-Microarrays

– Übersicht –

Bisher wurde die Induktion des lytischen Zyklus durch die Analyse einzelner ausgewählter Transkripte oder Proteine bestätigt. Um jedoch in verschiedenen lytischen Zuständen jene Faktoren zu identifizieren, die für den Block in der abortiv lytischen Phase verantwortlich sind, muss man die Veränderungen des Transkriptom in seiner Gesamtheit analysieren. Hierfür benötigt man eine Methode, welche die parallele Quantifizierung möglichst aller mRNAs einer biologischen Probe, hier aller viraler Transkripte, ermöglicht.

Mit einem Microarray kann die Expression tausender Gene simultan analysiert werden. Die Grundidee der Microarray-Technologie besteht darin, dass auf einer festen Unterlage an definierten Orten bekannte Sondenmoleküle abgelegt werden (**‘spotting’**), die wiederum komplementäre Moleküle, die nachgewiesen werden sollen, spezifisch binden. Die auf der Oberfläche an einem bestimmten Ort immobilisierte DNA bezeichnet man als **Probe**; die zu untersuchenden Transkripte als **Zielstruktur (‘target’)**. Da die Sequenz der gespotteten Probe auf dem Array bekannt ist, kann die dazu komplementäre Zielstruktur identifiziert werden. Man unterscheidet durch die Art der verwendeten Probe generell zwischen DNA- und Protein-Arrays. Bei den DNA-Microarrays unterteilt man weiter in die beiden Untergruppen (i) komplementäre DNA (cDNA)-Arrays und (ii) Oligonukleotid-Arrays. Da in dieser Arbeit ein cDNA-Array hergestellt wurde, wird im weiteren Verlauf

ausschließlich auf die Techniken eingegangen, die für die Herstellung und Verwendung des cDNA-Arrays von Interesse sind.

Bei einem **cDNA-Array** werden die Proben üblicherweise mit Hilfe der PCR-Technik generiert. Die Produkte sind in der Regel zwischen 0,5 und 2,5kb groß (Bilban et al., 2002; Duggan et al., 1999) und können im 'contact'- oder 'non-contact'-Verfahren auf der Oberfläche abgelegt werden. Faktoren die dabei die 'Spot'-Morphologie beeinflussen, sind u.a. der verwendete 'spotting buffer', die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit (siehe auch Dufva, 2005). Die Oberfläche besteht meist aus einem Glasobjektträger, der durch unterschiedliche Chemikalien modifiziert wurde. Aldehyd-, Amino- oder Epoxid-Gruppen sind die hauptsächlich verwendeten Modifikationen.

Ist der Array hergestellt, werden aus biologischen Proben Gesamt-RNA Extrakte gewonnen. Maximal zwei biologische Proben können auf einem Array miteinander verglichen werden. Zunächst wird die Gesamt-RNA mit DNase behandelt, um genomische DNA zu entfernen, welche in der Markierungsreaktion stören und bei der Hybridisierung zu einem erhöhten Hintergrund führen kann. In der Markierungsreaktion können Fluorochrome (z.B. Cy3/grün oder Cy5/rot) auf unterschiedliche Art in die Zielstruktur eingebaut werden (direkt oder indirekt). Die Fluoreszenz-markierten Zielstrukturen werden im gleichen Verhältnis zueinander gemischt und mit dem die cDNA-Proben enthaltendem Array inkubiert (**Hybridisierung**). Dabei muss unter solchen Bedingungen gearbeitet werden, die eine spezifische Bindung zwischen Zielstruktur und Probe erlauben, eine unspezifische aber möglichst ausschließen. Die Messung der Fluoreszenz der komplementären, gebundenen Zielstruktur wird mit einem speziellen Fluoreszenz-Scanner vorgenommen. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz hängt von der Menge an exprimierten Transkripten in der biologischen Probe ab. Die Fluoreszenzintensitäten werden für jeden Farbstoff und jeden einzelnen Spot auf dem Array bestimmt. Die resultierenden Verhältnisse (**'ratios'**) geben die relative Häufigkeit der Sequenzen in den beiden biologischen Proben wieder.

Das Fließschema in Abbildung 4.12 zeigt einen schematischen Versuchsablauf der Schritte, die während eines Experiments mit einem Microarray durchgeführt werden.

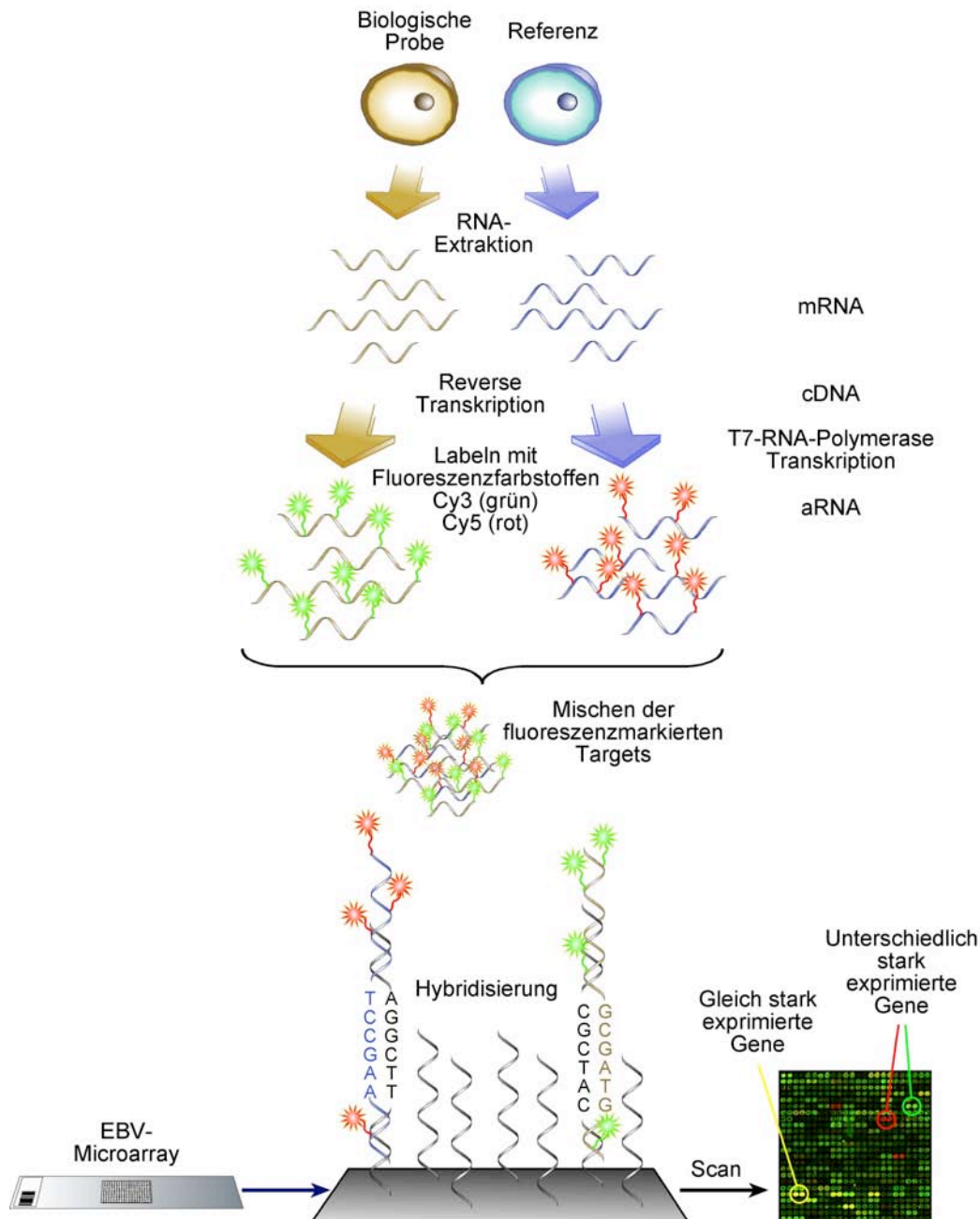


Abb. 4.12: Schematischer Versuchsablauf eines Microarrayexperiments

Die Analyse der Transkripte einer Zelle mit Hilfe eines Microarrays beinhaltet folgende Schritte. RNA-Isolierung aus den zu untersuchenden Zellen (biologische Probe) und der Referenzzelllinie (Referenz), Umschreiben der mRNA in cDNA (Reverse Transkription). In die cDNA können mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Nucleotide eingebaut werden (im Detail siehe Abbildung 4.20). Der Einbau von zwei Farbstoffen (Cy3 – grün; Cy5 – rot) ermöglicht eine Detektion von mRNA-Zielstrukturen aus zwei unabhängigen Experimenten auf einem Microarray. Fluoreszenzmarkierte antisense RNAs (aRNAs) werden im gleichen Verhältnis gemischt und auf den Microarray hybridisiert. Ist die Proben-DNA auf dem Microarray komplementär zur Zielstruktur-aRNA, binden die Basen aneinander. Die Fluoreszenzintensität hängt von der Transkriptmenge eines Gens in der Ausgangszellpopulation ab. Gibt es nur in einer Zelllinie ein bestimmtes Transkript, so erscheint der Spot auf dem Microarray in grün oder rot. Ist das Transkript in beiden Zelllinien gleich stark exprimiert, entsteht ein Spot in gelber Mischfarbe aus grün und rot.

Durch die Herstellung eines genomweiten EBV-Microarrays ist es deshalb möglich, ein Expressionsprofil aller viralen Gene in unterschiedlichen Vermehrungszuständen zu erhalten.

4.3.1 Erstellen einer genomischen Bibliothek

– Übersicht –

In dieser Arbeit wurde ein cDNA-Microarray hergestellt. Die Proben bestehen aus PCR-Produkten des EBV-Genoms und zellulären Haushaltsgenen (HKG) als Kontrollen. Als weitere Kontrolle wurden sog. ‘Spike-in’ Kontrollen (Stratagene) auf den Array gespottet.

4.3.1.1 Planung und PCR-Amplifikation der HKG-Kontrollen

HKGs wurden bei Microarrayexperimenten für die Normalisierung der Daten, die man nach der Hybridisierung erhält, benötigt. Jedoch mehren sich die Berichte, die besagen, dass selbst die Expression von HKGs Variationen unterliegt (Bilban et al., 2002; Thellin et al., 1999; Welsh et al., 2001). Auch in der eigenen Arbeitsgruppe konnten wir bei qRT-PCR Experimenten die Regulation von HKGs nach Infektion von primären B-Zellen mit EBV beobachten. Aus diesem Grund wurden mehrere HKGs als Kontrolle verwendet. Eine Liste der 28 HKGs mit ihrem im Array verwendeten Kürzel, ihrem Gen-Namen und der spezifischen ‘Accession-Number’ befindet sich im Anhang (Tabelle C). Sämtliche Produkte wurden mit sequenzspezifischen Primerpaaren aus cDNA humaner Epithelzellen generiert. Ihre Amplifikate waren entsprechend der EBV-Produkte 500-700nt groß.

Bei der Planung des Arrays wurde zusätzlich darauf Wert gelegt, dass jede Ecke eines Rasters (‘grids’) – ein Abschnitt von 9x9 Spots (siehe Abbildung 4.19) – ein PCR-Produkt enthält, das von einem konstant exprimierten Transkript gebunden wird. Die HKGs wurden hierfür als Markierungspunkte (‘guidance spots’) verwendet.

4.3.1.2 Generierung zweier unabhängiger Sets an dachziegelartig überlappenden PCR-Produkten aus dem EBV-Genom

Es wurden 285 sequenzspezifische Primerpaare *in silico* entworfen und mit Hilfe der PCR-Technologie Produkte mit einer Fragmentgröße von 500-700nt generiert. Dadurch wurde das gesamte B95.8-Wildtyp-EBV-Genom dachziegelartig überlappend abgebildet. Sämtliche PCR-Fragmente, die Größe der entstehenden Produkte, das entsprechende Gen, die Nukleotidkoordinaten, die Sequenzen der Primer und primerspezifische Eigenschaften sind im Anhang (Tabelle A) aufgelistet. Durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel

konnte eine Aussage über die Qualität der PCR-Produkte und die Spezifität der Amplifikation der EBV-DNA gemacht werden (Abbildung 4.13).

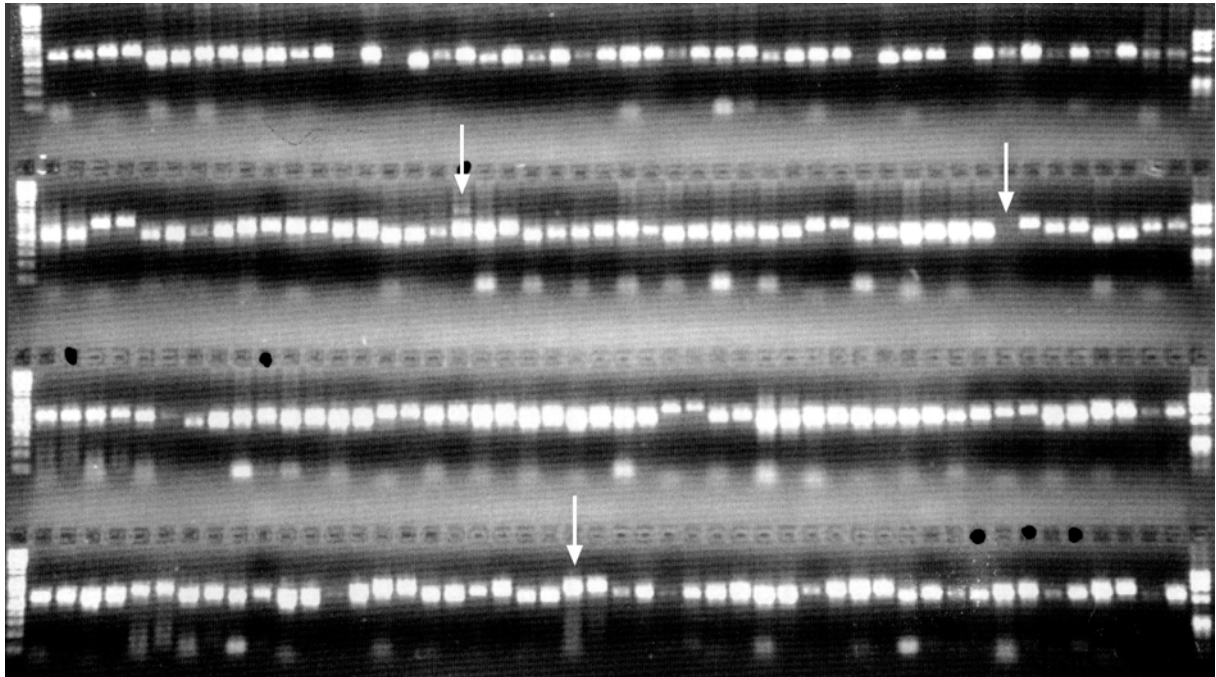


Abb. 4.13: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit 192 PCR-Produkten

Nach Amplifikation von 192 PCR-Produkten wurden jeweils 5 μ l PCR-Produkt und 5 μ l Auftragspuffer miteinander gemischt und in einem Ethidiumbromid-gefärbten Gel aufgetrennt. Qualitative Unterschiede einzelner PCR-Produkte waren gut zu erkennen. So traten z.T. zusätzliche kleinere Fragmente, größere Fragmente oder kein PCR-Produkt auf (Beispiele sind durch Pfeile gekennzeichnet).

Da EBV Transkripte von beiden Strängen des doppelsträngigen Genoms kodiert werden, wurden durch Einbringen einer Amino-Modifikation am FP bzw. BP zwei Sets an PCR-Produkten generiert, um strangspezifische Proben zu erhalten: (i) sämtliche PCR-Produkte mit einem Amino-gekoppelten FP; (ii) sämtliche PCR-Produkte mit einem Amino-gekoppelten BP. Der Amino-Linker kann in einer chemischen Reaktion kovalent mit Aldehyd-Gruppen auf einer Glasoberfläche verbunden werden (Schena et al., 1995). Dies geschieht über ein instabiles Zwischenprodukt, das nach Dehydrierung ($-H_2O$) durch die Schiff'sche-Base-Reaktion in eine stabile Bindung umgewandelt wird (siehe Abbildung 4.14).

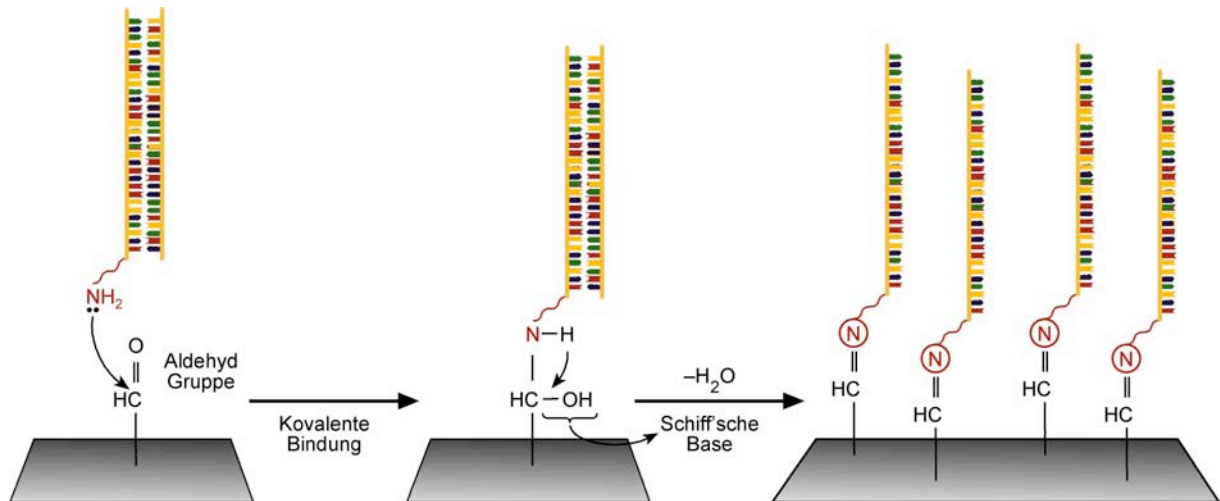


Abb. 4.14: Bindungschemie auf Aldehyd-beschichteten Objektträgern

Die Aminogruppe kann während der PCR-Reaktion in die DNA eingebaut werden, indem ein Aminomodifizierter FP oder BP für die Reaktion verwendet wird. Die aliphatische Aminogruppe reagiert mit der Kohlenstoffgruppe innerhalb des Aldehyds. Das instabile Zwischenprodukt wird während der Schiff'schen-Base-Reaktion unter Dehydrierung stabil gebunden. Um den Fluoreszenzhintergrund zu verringern, werden die nicht interagierten Aldehyd-Gruppen durch Natrium-Borohydrid (NaBH_4) zu primären Alkoholen reduziert (Bowtell and Sambrook, 2003).

Dadurch wäre es möglich, auf Aldehyd-beschichteten Objektträgern zwischen Zielstrukturen beider DNA-Stränge zu unterscheiden. Abbildung 4.15 zeigt ein Fließschema über den Ablauf der Herstellung des EBV-Microarrays.

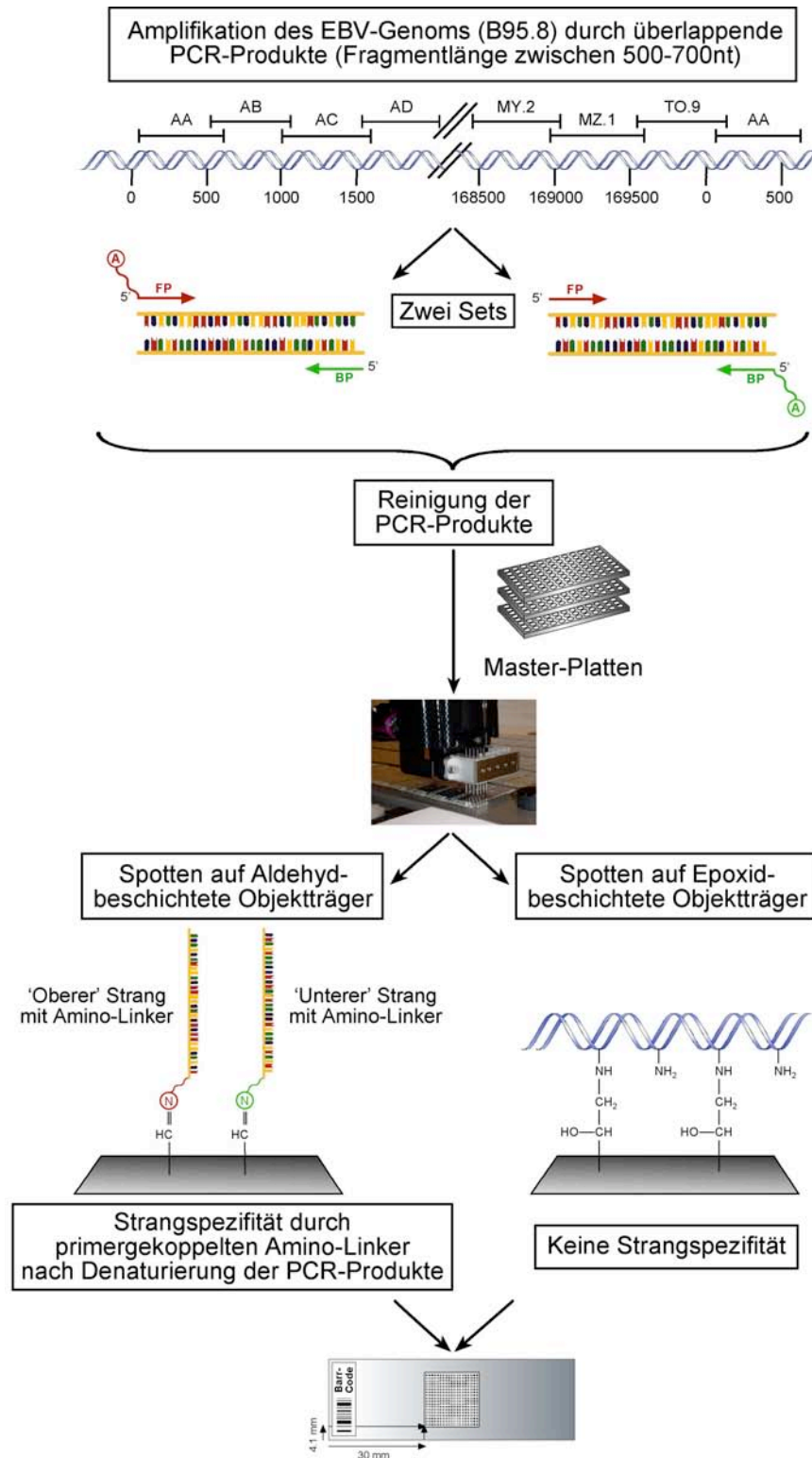


Abb. 4.15: Herstellung des EBV-Microarrays

Amplifikation des EBV-Genoms (B95.8) durch 285 sequenzspezifische, dachziegelartig überlappende PCR-Produkte mit einer Fragmentlänge von 500-700nt. Durch Einbau von Amino-gekoppelten Primern (FP oder BP) wurden zwei Sets an PCR-Produkten generiert. Die PCR-Produkte wurden mit „MultiScreen PCR_μ96 Platten“ (Millipore) von Salzen, dNTPs und verbliebenen Primern gereinigt. Zwei mögliche Vorgehensweisen können unterschieden werden: PCR-Produkte mit oberem bzw. unterem Amino-gekoppeltem Strang. Beim Spotten auf Epoxid-beschichtete Objektträger erfolgt die kovalente Bindung zwischen Aminogruppen der DNA und Carboxygruppen der Epoxidoberfläche auf dem Objektträger. So kann beim Verzicht auf Strangspezifität der Probe ein mehrfacher Probenatz auf dem EBV-Microarray erreicht werden.

4.3.1.3 Klonierung problematischer PCR-Produkte in den pCR2.1-Vektor

Nicht alle 2x285 Primerpaare generierten qualitativ einwandfreie, hochwertige PCR-Produkte. Abbildung 4.16 zeigt Beispiele möglicher unspezifischer Produkte, die bei der PCR-Amplifikation auftraten.

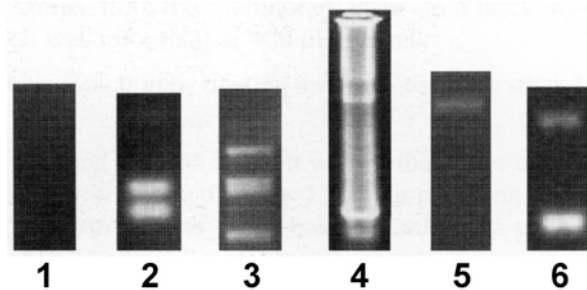


Abb. 4.16: Beurteilung von PCR-Produkten

(1) Es war kein PCR-Produkt sichtbar. (2) Zwei Banden mit gleicher oder ähnlicher Intensität wurden generiert. (3) Mehr als drei Banden derselben Intensität waren sichtbar. (4) In der PCR konnte keine spezifische Bande generiert werden, ein Schmier ist sichtbar. (5) Im Verhältnis zum DNA-Marker war die Bande von sehr geringer Intensität. (6) Das PCR-Produkt besaß mehrere Banden, von denen eine dominant war (Auszug aus Bowtell and Sambrook, 2003).

Zunächst habe ich versucht, durch die Auswahl neuer Primerpaare für die jeweilige Region im EBV-Genom das Problem zu beheben. Falls das keinen Erfolg zeigte, wurde durch Verändern der Annealing-Temperatur und/oder DMSO-Konzentration versucht, die PCR-Reaktion dahingehend zu verändern, dass ein einziges, spezifisches PCR-Produkt entstand. War auch dies nicht möglich, wurde, wie in Kapitel 3.5.3 und 3.1.2 beschrieben, die als korrekt vermutete Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in den pCR2.1-Vektor kloniert. Durch Sequenzieren der Insert-DNA wurden die Sequenzen auf ihre Richtigkeit bestätigt. Insgesamt mussten 78 PCR-Produkte in den pCR2.1-Vektor kloniert werden, da sie durch die herkömmliche PCR-Amplifikation nicht effizient hergestellt werden konnten. Ein Überblick mit den Plasmidnamen und den Nukleotidkoordinaten der PCR-Fragmente im B95.8-Genom ist im Anhang (Tabelle B) aufgeführt.

4.3.1.4 PCR-Amplifikation klonierter subgenomischer EBV-Produkte

Die klonierten PCR-Fragmente wurden erneut mit Hilfe der PCR-Technologie und universalen Primern amplifiziert. Diese Primer binden sequenzspezifisch im pCR2.1-Vektor, sodass nur ein Primerpaar für alle 78 klonierten Produkte benötigt wurde. Für eine optimale Amplifikation wurden mehrere Primerpaare getestet. Die Lage des optimalen Primerpärchens führte leider zu einer Verlängerung des PCR-Amplifikats um 90nt im Vergleich zum eingesetzten EBV-Fragment. Auch hier wurde durch

Einführen eines Amino-Linkers im FP bzw. BP die Strangspezifität beibehalten. Die Sequenzen der beiden universalen, pCR2.1-Vektor spezifischen Primer sind im Anhang (S.158) angegeben.

4.3.2 Reinigung der PCR-Produkte

Die überschüssigen Amino-gekoppelten Primer stören im weiteren Verlauf der Arrayherstellung, da diese ebenfalls auf der Glasoberfläche kovalent gebunden würden. Deshalb wurden sämtliche verbliebenen Primer und dNTPs, sowie die bei der PCR-Reaktion eingesetzten Salze mit Hilfe der „MultiScreen PCR_{μ96} Filter Platten“ (Millipore) aus den PCR-Produkten entfernt. Abbildung 4.17 zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes Gel mit PCR-Produkten jeweils vor und nach ihrer Reinigung.

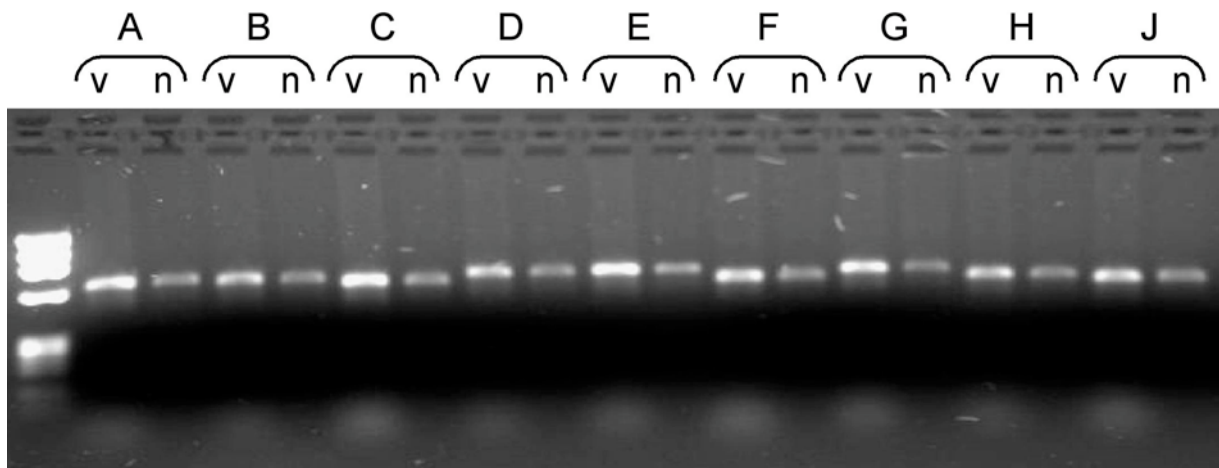


Abb. 4.17: Reinigung von PCR-Produkten

Verbliebene Primer, dNTPs und Salze wurden mit der „MultiScreen PCR_{μ96} Filter Platte“ (Millipore) entfernt. Gezeigt sind Beispiele (A-J) verschiedener PCR-Produkte vor (v) und nach (n) der Reinigung.

4.3.3 Quantifizierung der PCR-Produkte

Mit Hilfe des „PicoGreen dsDNA Quantitation Kits“ (Molecular Probes) wurde die Menge an generiertem PCR-Produkt im 96-Loch-Maßstab bestimmt. PicoGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, mit dem die dsDNA-Konzentration im Picogrammbereich (25 pg/ml bis 1000 ng/ml) gemessen werden kann (Excitation ~480nm, Emission ~520nm). Nach Erstellen einer Standardgeraden mit festgelegten DNA-Mengen (Fluoreszenz versus DNA-Konzentration) wurde die Konzentration jedes einzelnen PCR-Produkts berechnet. Es wurde zwischen 2,5µg und 9µg an PCR-Produkt generiert; im Mittel aller PCR-Produkte waren es 4,9µg.

4.3.4 Spotten des EBV-Microarrays

Die Qualität beim Spotten aller PCR-Produkte ist sehr schwer zu kontrollieren. Der verwendete 'spotting buffer', die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit während des Spotvorgangs spielen eine wichtige Rolle. Gleichzeitig muss innerhalb des Spots die gleiche Probendichte sichergestellt werden (Deegan et al., 1997; Diehl et al., 2001; Rickman et al., 2003; Wrobel et al., 2003). Um diese technischen Parameter einzuhalten, hatten wir das Spotten einer Firma übergeben. Ein weiterer wichtiger Parameter stellte das chemische Verfahren dar, mit dem die PCR-Produkte kovalent an die Glasoberfläche gebunden werden. Zwei Verfahren standen zur Verfügung: das Spotten der PCR-Proben auf (i) Aldehyd-beschichtete Objektträger oder (ii) Epoxid-beschichtete Objektträger. Das Spotten auf Aldehyd-beschichtete Objektträger hat zwei Nachteile. (i) Aromatische Amine der G, C und A Basen innerhalb der DNA können ebenfalls an die Aldehyd-Gruppen auf dem Objektträger binden. Die Effizienz dieser Nebenreaktion beträgt ~0,01% bei kurzen Oligonukleotiden und ~10% bei dsPCR-Produkten (Zammatteo et al., 2000), ein relativ hoher Prozentsatz. (ii) Die Firma, bei der das Spotten auf Aldehyd-Oberflächen erfolgen könnte, praktiziert dies im 'non-contact' piezoelektrischen Verfahren. Dafür müsste mehr PCR-Produkt generiert werden, da je Probe mindestens 6µg PCR-Produkt vorliegen muss. Deshalb hatten wir beschlossen, das Spotten der PCR-Produkte von „Ocimum Biosolutions“ durchführen zu lassen. Dort werden Epoxid-beschichtete Objektträger verwendet. Diese besitzen (i) eine sehr hohe Haltbarkeit (über 1 Jahr bei Raumtemperatur, UV-geschützt), (ii) eine hohe Spezifität und (iii) ein sehr gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis. (iv) Gleichzeitig sind Probleme mit der Epoxyid-Oberfläche beim Denaturieren der Proben nicht bekannt. Zusätzlich wird dort im Kontakt-Verfahren mit gespaltene Nadeln ('split-pins') gespottet. Dafür wird eine geringere Probenmenge benötigt. 5µMol je Probe in 10µl Gesamtvolumen war ausreichend für mehrere 100 Arrays. Dies entsprach 1,65µg bei einem 500bp PCR-Produkt, mit bis zu 2,3µg für ein 700bp PCR-Produkt; eine Menge die relativ gut zu generieren war. Bedingt durch die gute Probenqualität und durch Optimieren der Spotting-Bedingungen während verschiedener Vorversuche mit einzelnen Proben konnte bei „Ocimum Biosolutions“ die benötigte Konzentration um die Hälfte auf 5µMol in 20µl Endvolumen verringert werden. Somit hätten nahezu 1000 Arrays mit den von mir hergestellten Proben gespottet werden können.

Für den Vorgang des Spottens mussten die PCR-Produkte auf zwei 384-Loch-Masterplatten übertragen werden. Das System der Probenanordnung ist im Anhang (Tabelle D und S.172) gezeigt. Die Proben wurden so angeordnet, dass mit 2x4 Nadeln in einem 9x9 Raster gespottet werden konnte. Beim Spotten wurde die DNA über ihre Aminogruppen mit den Carboxygruppen der Epoxidoberfläche kovalent gebunden (Abbildung 4.18). Da diese kovalente Bindung durch Aminoseitengruppen der Basen stattfindet, geht diese Kopplung mit einem Verlust der Strangspezifität einher im Gegensatz zu einer Aldehyd-vermittelten Kopplung über die Aminoendgruppen der verwendeten Primer (siehe Abbildung 4.14). Dafür konnte die Qualität und Spezifität innerhalb des Arrays als solches erhöht werden, da das EBV-Genom nun vierfach auf dem Array abgebildet wurde. Abbildung 4.19 zeigt das Auftragsschema und die Koordinaten ('spot localization' und 'array finder') der PCR-Produkte auf dem EBV-Microarray.

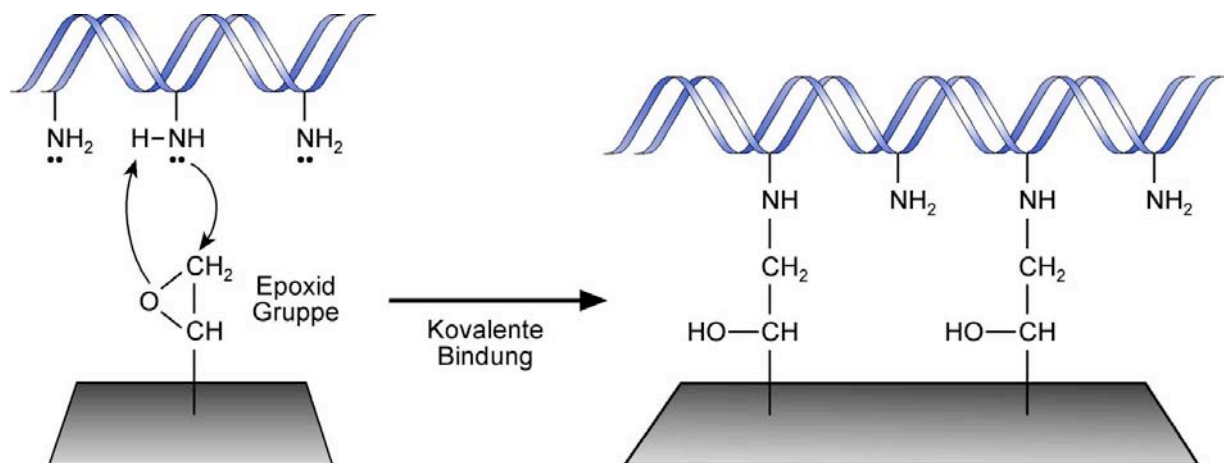


Abb. 4.18: Bindungschemie auf Epoxid-beschichteten Objektträger

Durch die kovalente Bindung zwischen den Aminogruppen der DNA-Basen und der Epoxid-Gruppe auf der Oberfläche des beschichteten Objektträgers wurde die DNA immobilisiert.

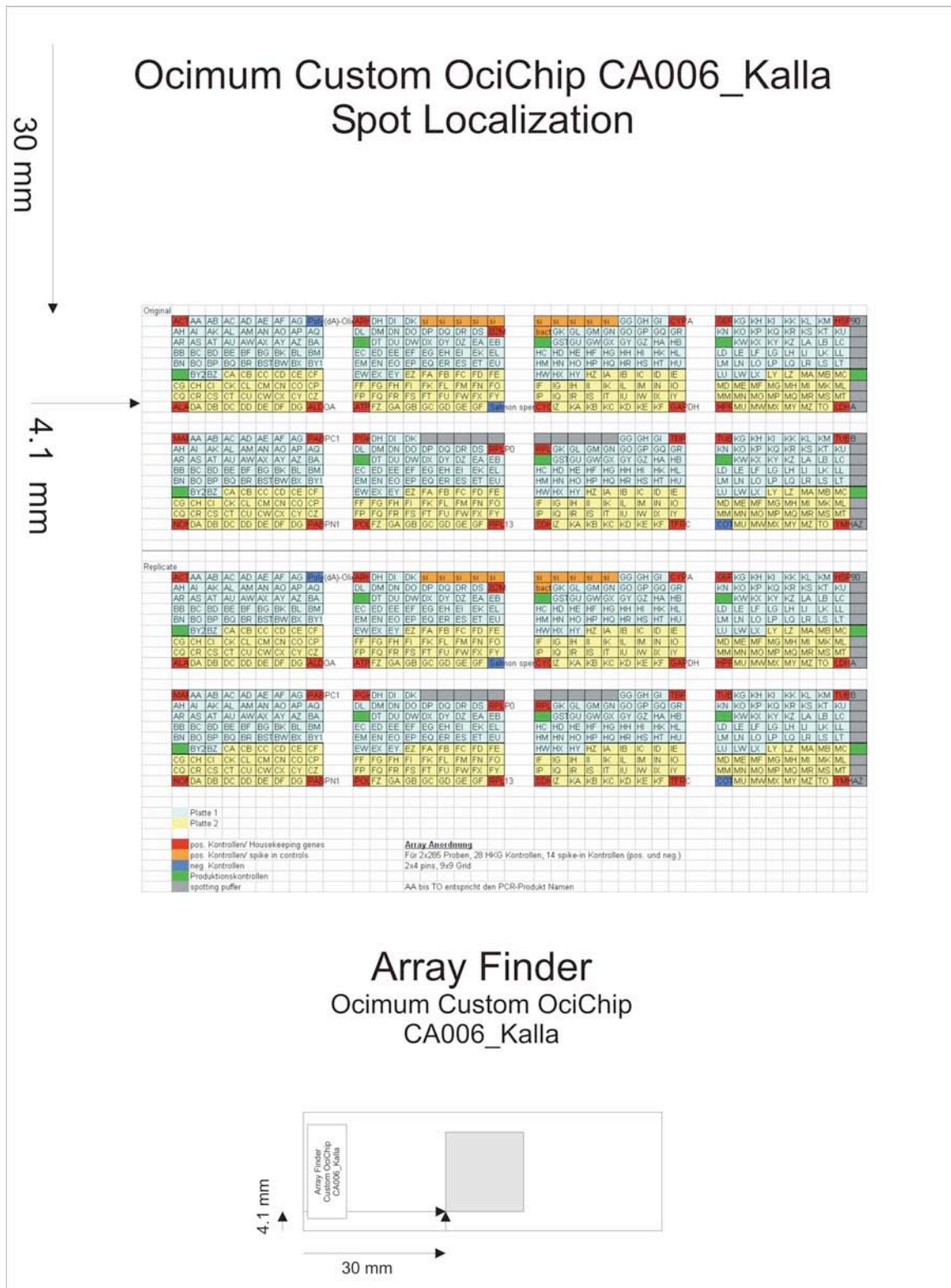


Abb. 4.19 'Spot Localization' des EBV-Microarrays

Gezeigt sind alle Proben, die auf den EBV-Microarray gespottet wurden. Proben, die sich in der ersten 384-Loch-Masterplatte befinden, sind hellblau, Proben aus der zweiten Platte gelb unterlegt. Von mir generierte HKG-Kontrollen (rot unterlegt) mit einer Produktgröße von 500-700nt sind vorwiegend in den Ecken eines 9x9 Rasters positioniert. 'Spike-in' Kontrollen sind orange (positiv) und dunkelblau (negativ). Spotten des Puffers alleine diente der Hintergrundbestimmung. 10% der gespotteten Arrays wurde einer Qualitätskontrolle durch die Firma „Ocimum Biosolutions“ unterzogen. Dabei dienen Produktionskontrollen (grün; bekannte Proben und Zielstruktur) der Firma „Ocimum Biosolutions“ als Referenz für den Erfolg und die Qualität des Spottens. An Hand des 'Array Finders' kann der gespottete Bereich auf dem Array eindeutig zugeordnet werden.

4.3.5 Fluoreszenz Markierung der RNA

Aus den zu untersuchenden Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) Gesamt-RNA isoliert. Sämtliche RNA-Zielstrukturen wurden auf ihre Qualität, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, untersucht. Dabei gibt die sog. RIN (RNA integrity number) Aufschluss über die Integrität und Qualität der RNA. Nur RNAs, die mindestens eine RIN von 7 besaßen, wurden für das Markieren und Hybridisieren verwendet. Die RNA wurde 15min lang bei 37°C mit „DNaseI – Amplification Grade“ (Invitrogen) behandelt, um genomische DNA zu beseitigen. Das Umschreiben von mRNA in aminoallylmarkierte antisense RNA (aRNA) wurde mit dem „ExpressArt[®] mRNA Amplification Kit“ (AmpTec) durchgeführt. Mittels eines speziellen oligo-(dT) Primers wurden 2µg mRNA zunächst revers transkribiert. Doppelsträngige cDNA wurde während einer 16stündigen *in vitro* Transkription umgeschrieben und amplifiziert, sodass bis zu 20±8µg aRNA generiert werden konnte. Dabei wurden AA-UTPs eingebaut, die anschließend mit Fluorochromen markiert wurden. Fragmentieren der aRNA erzeugte RNA-Fragmente mit einer Länge von 100-200nt. Das Fließschema in Abbildung 4.20 zeigt das Umschreiben der mRNA in aminoallylmarkierte aRNA.

4.3.6 Hybridisierung und Lesen des EBV-Microarrays

Um die Hybridisierung der Zielstrukturen auf dem Microarray zu gewährleisten, wurden die Proben auf dem Objektträger durch zweiminütiges kochen in Wasser denaturiert. Auch die Zielstruktur-RNA wurden für 5min bei 90°C denaturiert. Die Hybridisierung der Fluoreszenz-markierten aRNA-Zielstrukturen selbst erfolgte in einer „Tecan HS4800Pro“-Maschine bei der Firma „Ocimum Biosolutions“ bei 60°C. Dabei werden aRNA-Zielstrukturen an die auf dem Array immobilisierten komplementären Proben gebunden (siehe auch Abbildung 4.12). Durch anschließendes Waschen des Arrays wurden ungebundene bzw. schwach gebundene Zielstrukturen entfernt. Der Array wurde mit gasförmigem Stickstoff getrocknet und bis zur Entnahme in diesem aufbewahrt. Das verwendete Protokoll befindet sich in Kapitel 3.5.7.

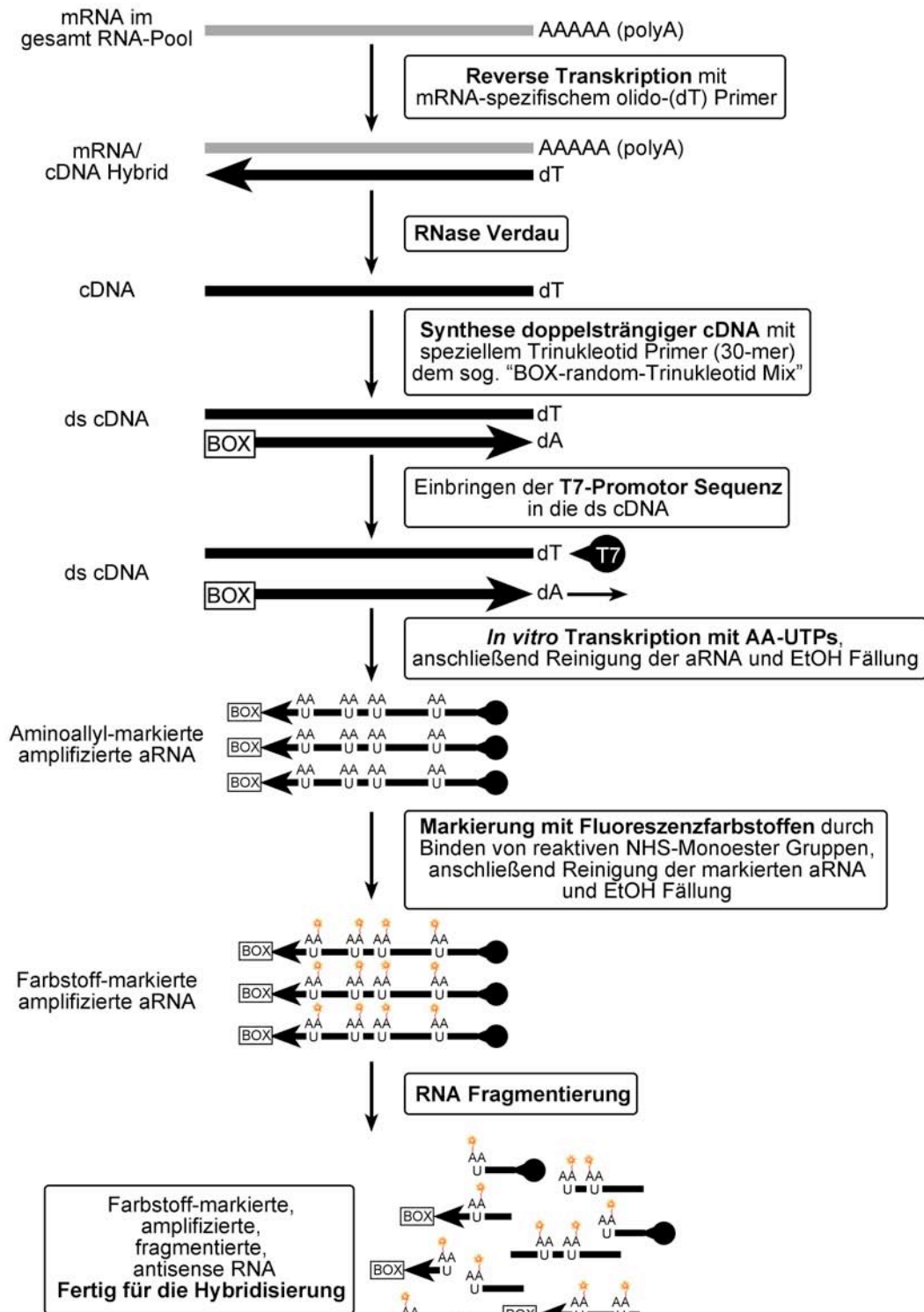


Abb. 4.20: Schematische Darstellung des Umschreibens von mRNA in aminoallylmarkierte aRNA mit dem „ExpressArt® mRNA Amplification Kit“ (AmpTec)

Die mRNA wurde mittels eines speziellen oligo-(dT) Primer in cDNA umgeschrieben. Bedingt durch den oligo-(dT) Primer war keine T7-Promotor Sequenz in der cDNA vorhanden. Die RNAs wurden durch hitzesensitive RNasen abgebaut. Aus der einzelsträngigen cDNA wurde durch einen speziellen Trinukleotid-Primer (30-mer), dem „BOX-random-Trinukleotid Mix“, doppelsträngige cDNA (ds cDNA) generiert. Die T7-Promotor Sequenz wurde in einem weiteren Syntheseschritt in die cDNA eingeführt. Es folgte der Einbau des modifizierten Nucleotids 5-(3-aminoallyl)-Uracil (AA-U) während der *in vitro* Transkription. In der Aminoallylgruppe an der C5-Position des Uracils befand sich eine reaktive primäre Aminogruppe, durch die eine Interaktion von AA-markierter RNA mit Fluorochromen stattfinden konnte. Nach einem Waschschrift wurde die antisense RNA (aRNA) fragmentiert, sodass für die Hybridisierungsreaktion gleichlange RNA-Fragmente (100-200nt) zur Verfügung standen.

Der nächste Schritt in einem Microarray-Experiment beinhaltet die Analyse des Arrays und die Auswertung der Daten. Hierfür müssten zuerst sämtliche im GAL-Format vorliegende Daten in das für die Bildanalyse verwendete Programm aufgenommen werden. Abbildung 4.21 zeigt den sog. 'Header', der mit der „GenePix“-Software generiert wurde. Im 'Header' befinden sich alle Informationen, die das Programm für die Analyse benötigt: Anzahl der Blöcke bzw. Raster sowie die Koordinaten der Blöcke auf dem Array. Darunter sind alle Proben mit ihren Koordinaten innerhalb der Raster aufgeführt, sodass das Programm die Fluoreszenz eines Spots der entsprechenden Probe direkt zuweisen kann.

	A	B	C	D	E	F
1	ATF	1				
2	19	5				
3	Type=GenePix arrayList V1.0					
4	BlockCount=16					
5	BlockType = 0					
6	Block1= 650, 16000, 100, 9, 400, 9, 400					
7	Block2= 5150, 16000, 100, 9, 400, 9, 400					
8	Block3= 9650, 16000, 100, 9, 400, 9, 400					
9	Block4= 14150, 16000, 100, 9, 400, 9, 400					
10	Block5= 650, 20500, 100, 9, 400, 9, 400					
11	Block6= 5150, 20500, 100, 9, 400, 9, 400					
12	Block7= 9650, 20500, 100, 9, 400, 9, 400					
13	Block8= 14150, 20500, 100, 9, 400, 9, 400					
14	Block9= 650, 24700, 100, 9, 400, 9, 400					
15	Block10= 5150, 24700, 100, 9, 400, 9, 400					
16	Block11= 9650, 24700, 100, 9, 400, 9, 400					
17	Block12= 14150, 24700, 100, 9, 400, 9, 400					
18	Block13= 650, 29200, 100, 9, 400, 9, 400					
19	Block14= 5150, 29200, 100, 9, 400, 9, 400					
20	Block15= 9650, 29200, 100, 9, 400, 9, 400					
21	Block16= 14150, 29200, 100, 9, 400, 9, 400					
22	Block	Row	Column	ID	Name	
23	1	1		1 HKG_ACTB	HKG_ACTB	
24	1	1		2 FP_AA	FP_AA	
25	1	1		3 FP_AB	FP_AB	
26	1	1		4 FP_AC	FP_AC	
27	1	1		5 FP_AD	FP_AD	
28	1	1		6 FP_AE	FP_AE	
29	1	1		7 FP_AF	FP_AF	
30	1	1		8 FP_AG	FP_AG	

Abb. 4.21: 'Array-Header' des EBV-Microarrays

Die Daten des EBV-Microarrays liegen in Form einer GAL-Datei vor. Diese kann auch mit der Excel-Software geöffnet und betrachtet werden. Gezeigt ist der sog. 'Header'. In ihm befinden sich alle Informationen, die das zum Lesen verwendete Programm benötigt: Anzahl der Blöcke bzw. Raster; Koordinaten der Blöcke auf dem Array. Unterhalb des 'Headers' sind alle Proben mit ihren Koordinaten innerhalb der Raster aufgelistet, sodass das Programm die Fluoreszenz eines Spots der Probe direkt zuweisen kann.

Das Auslesen des Arrays erfolgte bei „Ocimum Biosolutions“ mit einem „Affymetrix 428 Array Scanner“. Dabei wurde eine 16-bit Datei im TIFF-Format produziert, die den gesamten Array abbildet (Abbildung 4.22). Die TIFF-Dateien stellten somit die „Rohdaten“ des Experiments dar. Die Dateien wurden nach dem Lesen des EBV-

Microarrays mit der „ImaGene-Software“ (Biodiscovery) bei „Ocimum Biosolutions“ erstellt. Mit Hilfe des Scanners und der generierten TIFF-Datei wurde die Fluoreszenzintensität jedes Farbstoffs (Cy3 oder Cy5) in jedem Spot auf dem Array gemessen und die Fluoreszenz eines jeden Spots in Zahlen umgewandelt. Anschließend folgte die Hintergrundkorrektur und Grundnormalisierung der Daten mit der „MAVI-Software“ (MWG Biotech), ebenfalls durch „Ocimum Biosolutions“.

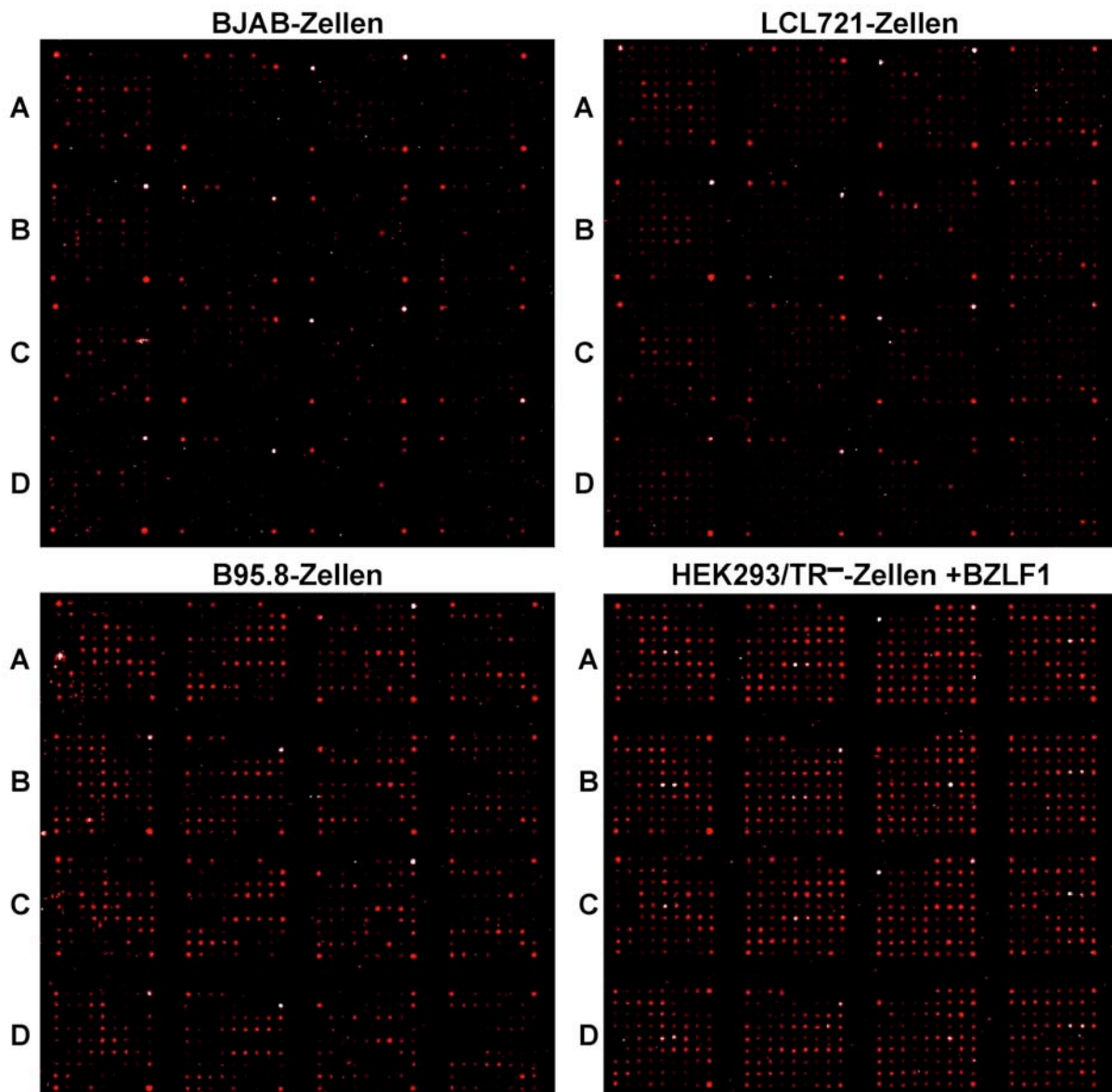


Abb. 4.22.: Expressionsprofil von EBV-Genen verschiedener Zelllinien nach Hybridisierung der Cy3-markierten aRNA-Zielstrukturen auf den EBV-Microarray

Das EBV-Expressionsprofil wurde in drei unterschiedlichen Zelllinien betrachtet: LCL721-, B95.8- und lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen. Als Vergleich ist das Expressionsprofil der EBV-negativen Zelllinie BJAB gezeigt. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten nach Hybridisierung von Cy3-markierten aRNA-Zielstrukturen. Die Arrays wurden gescannt und jeweils eine Datei mit einer Auflösung von 16-bit im TIFF-Format generiert. Durch Verwenden von HKGs als Markierungspunkte ist die Struktur der 16 Rasterfelder in jeder Analyse gut zu erkennen. Wie erwartet ist eine Ähnlichkeit zwischen Reihe A und C sowie B und D vorhanden, da die Spots identische Proben beinhalten.

4.3.7 Qualitätskontrolle – Expressionsprofil von EBV in ausgewählten Zelllinien

– Übersicht –

Viele Faktoren sind für die erfolgreiche Durchführung eines Microarray-Experiments von Bedeutung: (i) die Probenqualität, (ii) die Oberflächenqualität des Arrays, (iii) das Spotten der Proben auf dem Array, (iv) die Spotmorphologie, (v) die mRNA-Extraktion und Markierung, (vi) die Hybridisierung der Zielstrukturen mit den Proben und (vii) die Datenanalyse und –auswertung. Die Probenqualität wurde durch Auftragen der PCR-Produkte auf ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel ermittelt. Punkt (ii) bis (iv) wurde von ‘Ocimum Biosolutions’ mit Hilfe der Produktionskontrollen bei 10% der gespotteten Arrays durchgeführt. Die Bestimmung der RNA-Qualität (v) nach Extraktion und DNase-Verdau erfolgte wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Nur hochwertige RNA (RIN zwischen 7-10) wurde in Microarray-Experimenten verwendet. Ebenso konnte die Qualität der *in vitro* Transkription (amplifizierte cDNA-Menge) und Inkorporation der Fluorochrome direkt (Nanodrop) bestimmt werden. Die Spezifität der Hybridisierung wurde an Hand von Negativkontrollen (‘spotting buffer’ Spots) und Positivkontrollen (HKGs) bestimmt. Unklar blieb aber zunächst, wie hoch die Sensitivität und Spezifität des EBV-Microarray ist und ob mit diesem EBV-Microarray tatsächlich sämtliche EBV-Transkripte erkannt werden. Zusätzlich könnten auch bei der Herstellung der PCR-Produkte und Masterplatten systematische Fehler aufgetreten sein. Um dies zu ermitteln, wurde der EBV-Microarray mit RNA-Zielstrukturen verschiedener Zellen hybridisiert.

4.3.7.1 Bestimmung der Spezifität durch Hybridisierung mit aRNA EBV-negativer Zelllinien: BJAB und DG75

Die Spezifität des EBV-Arrays konnte durch Hybridisieren von RNA-Zielstrukturen aus zwei EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie, BJAB und DG75, festgestellt werden. Sämtliche Spots sollten ungefähr die gleiche Fluoreszenzintensität aufweisen, und EBV-spezifische Proben sollten nicht gebunden werden. Meine Ergebnisse bestätigen diese Erwartungen.

In beiden Zelllinien war die Expression der HKG-Kontrollen nahezu identisch. Ein Fluoreszenzunterschied mit einem Faktor >2 konnte bei keinem HKG festgestellt werden. Wie erwartet konnte auch bei der Mehrheit der EBV-Proben keine

unspezifische Bindung von Transkripten der beiden EBV-negativen Zelllinien beobachtet werden, die beiden Zelllinien besaßen die gleichen Expressionsmuster (Tabelle E, Anhang). Ausschließlich bei zwei Produkten konnte eine höhere Fluoreszenz von DG75-Zielstrukturen im Vergleich zu BJAB-Zielstrukturen beobachtet werden. Der Fluoreszenzunterschied wies bei PCR-Probe FI Faktor 2,3 und bei MD Faktor 2,2 auf. Dies sind jedoch relativ geringe Werte. Berücksichtigt man zudem, dass diese Werte aus Einzelexperimenten stammen, ist es gut möglich, dass sich bei mehreren Wiederholungen auch diese beiden niedrigen Werte normalisieren. In den weiteren Versuchen wurde jeweils die BJAB-Zelllinie als Referenz verwendet.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der Vorversuche darauf hin, dass der Array sehr spezifisch und der Hintergrund äußerst gering ist.

4.3.7.2 Genomweites Expressionsprofil der latent EBV-infizierten Zelllinie LCL721

Aufschluss über die Expression viraler Gene in der Latenz gaben RNA-Proben von latent infizierten B-Zellen, sog. LCLs. Zellen der LCL721-Zelllinie exprimieren laut Literatur neun virale Gene, die für den Zustand der Latenz III typisch sind: sechs nukleäre-Proteine (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, und EBNA-LP), drei Membranproteinen (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) und nicht-kodierende RNAs (EBER1, EBER2, BARTs) (Thorley-Lawson, 2001). Die von diesen Transkripten kodierten Genprodukte treiben die infizierte B-Zelle in den Zellzyklus, halten die Proliferation aufrecht und verhindern die Apoptose. Ein Beispiel für die bei der Auswertung von LCL721-Zellen generierte TIFF-Bilddatei ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

Das virale Expressionsprofil dieser Zelllinie wurde mit der humanen, EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie BJAB verglichen (Tabelle F, Anhang). Innerhalb der Gruppe der HKG-Kontrollen konnten keine Unterschiede in den Expressionsniveaus beider Zelllinien festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Transkripte der nicht-kodierenden und nicht-polyadenylierten RNAs (EBERs und BARTs) konnten, wie erwartet, nicht detektiert werden. Alle latenten viralen Transkripte waren detektierbar, allerdings lag die Signalstärke bei einigen unter dem angenommenen Schwellenwert von 2. Bei BKRF1 (EBNA-1) konnte eine hohe Expression mit einem maximalen Faktor von 11,1 bei Probe GW detektiert werden.

Die Expression von BYRF1 (EBNA-2) lag knapp unter dem Schwellenwert (mit einem Maximum von Faktor 1,9 bei Probe BR), ebenso wie bei BERF1 (EBNA-3A) mit einem Maximum von Faktor 1,7 bei Probe FO. Bei BERF2a/b (EBNA-3B) zeigte nur eine von sieben Proben ein Signal über dem Schwellenwert (mit einem Maximum von Faktor 2,4 bei Probe FP). Auch bei BERF3/4 (EBNA-3C) ist nur eine von fünf Proben signifikant detektierbar (mit einem Maximum von Faktor 2,17 bei Probe GA). Auch wenn das Expressionsniveau der EBNA-Familie niedrig war, konnten dennoch in den Proben, die diese Gene repräsentieren, deutlich stärkere Signale im Vergleich zur Kontrollzelllinie detektiert werden. Im Vergleich dazu war jedoch die Expression der beiden Membranproteine eindeutig: BNLF1 (LMP-1) mit einem Maximum von 4,9 in Probe MT und BNLF2 (LMP-2) mit einem Maximum von 3,6 in Probe MU.

Interessanterweise konnten in LCL721-Zellen auch Transkripte von nicht latenten Genen detektiert werden: BNRF1 ('major tegument protein') wies ein Maximum von Faktor 2,5 in Probe AM auf; BHRF1 (virales bcl-2 Homolog) war bis zu 11,8fach (Probe CC) über dem Hintergrund exprimiert; BBRF1 ('capsid protein') zeigte ein Maximum von 2,3 in Probe HH und BBLF3 ('primase associated factor') wies in Probe HM ein Maximum von 2,8 auf. Die Region um BARF0 und BALF3, deren Funktion weiterhin ungeklärt ist, besaß ein hoch exprimiertes RNA Niveau (Maximum von 5,8 in Probe MD). Meines Wissens wurden diese Gene in strikt latenten Zelllinien wie in LCL721 noch nie beschrieben, sie spielen möglicherweise aber in der Latenz eine bisher unbekannte Rolle.

4.3.7.3 Genomweites Expressionsprofil viraler Transkripte der Zelllinie B95.8

In der B95.8-Zelllinie unterstützen 5-10% der Zellen spontan den lytischen Zyklus, sodass im Vergleich mit der EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Zelllinie BJAB alle EBV-Transkripte detektierbar sein müssten (Tabelle G, Anhang). Die im Folgenden kurz besprochenen Ergebnisse bestätigen diese Erwartung. Ein Beispiel für die bei der Auswertung von B95.8-Zellen generierte TIFF-Bilddatei ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

Ähnlich wie beim Vergleich von BJAB mit viralen Transkripten der LCL721 war die Expression der HKG-Kontrollen in B95.8- und BJAB-Zellen gleich (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte mit wenigen Ausnahmen bei den meisten EBV-Genen ein eindeutig erhöhtes Expressionsniveau (>2) im Vergleich zu BJAB-Zellen

nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellten Bereiche dar, die in Tabelle 4.3 (Spalte 1) aufgelistet sind. Deren transkriptionelle Aktivität war sehr niedrig und lag zum Teil nahe oder unter dem Schwellenwert von 2,0.

B95.8-Zellen versus BJAB-Zellen	HEK293/TR ⁻ -Zellen versus HEK293-Zellen	PCR- Fragmente
EBERs	EBERs	AN-AP
	BCRF2	BA-BE
BWRF1	BWRF1	BK-BL
BFLF1	BFLF1	CG-CK
	BFRF1	CL-CN
BPLF1	BPLF1	CU-DM
BOLF1	BOLF1	DM-DS
BORF1	BORF1	DT-DX
BSLF1		EP-ET
BBLF4		HB-HF
BGLF3		IA-IC
BGLF1	BGLF1	IG-IK
BDLF4	BDLF4	II-IK
BXRF1	BXRF1	KW-KY
BVRF1	BVRF1	KY-LC
BVRF2		LE-LH
BdRF1		LF-LG
BILF1		LO-LP
BALF5	BALF5	LQ-LY
BALF2	BALF2	ML-MN
BALF1		MO-MP
BARF1		MP-MR

Tab. 4.3: Auflistung von unterrepräsentierten EBV-Genen in zwei unterschiedlichen Zelllinien
Vergleichendes Expressionsprofil von EBV in B95.8- und HEK293/TR⁻-Zellen. Aufgelistet sind jene EBV-Gene, bei deren korrelierenden PCR-Fragmenten eine transkriptionelle Aktivität unter dem Schwellenwert von 2,0 gemessen wurde.

4.3.7.4 Genomweites Expressionsprofil von EBV in stabil transfizierten Epithelzellen

In der stabil transfizierten HEK293/TR⁻-Zelllinie konnte durch die transiente Expression des viralen Transaktivators BZLF1 der lytische EBV Zyklus effizient induziert werden (siehe Kapitel 4.1.1.2). Ein direkter Vergleich mit HEK293-Zellen sollte also die Expression aller lytischen Gene aufdecken. Ein Beispiel für die bei der Auswertung von HEK293/TR⁻-Zellen generierte TIFF-Bilddatei ist in Abbildung 4.22 gezeigt.

Wie erwartet zeigten die HKGs in den beiden Epithelzelllinien keinen signifikanten Unterschied (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu B95.8-Zellen, in denen nur ca. 5-10% den lytischen Zyklus unterstützen, konnten nach lytischer Induktion in HEK293/TR⁻-Zellen z.T. sehr viel höhere Fluoreszenzintensitäten gemessen werden (Tabelle H, Anhang). Transkripte von Genen, die in Tabelle 4.3 (Spalte 2) aufgelistet sind, waren allerdings ähnlich wie in B95.8-Zellen schwach exprimiert.

4.3.8 Expressionsprofil von EBV nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen

Mittels Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen konnte ich zeigen, dass nur nach transienter Transfektion von methylierter EBV-DNA die Expression ausgewählter lytischer Gene detektierbar war. Der EBV-Microarray sollte die genomweite Analyse von EBV-Genen erlauben und die Sets an viralen Genen definieren, die in unterschiedlichen Versuchsansätzen exprimiert werden. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurden drei unterschiedliche Versuchsansätze im Detail analysiert: (i) HEK293-Zellen transient transfiziert mit p2089-maxi-EBV-DNA; (ii) HEK293-Zellen transient transfiziert mit p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem Expressionsplasmid für BZLF1 (p509); (iii) HEK293-Zellen transient transfiziert mit *de novo* CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem Expressionsplasmid für BZLF1 (p509). RNA-Zielstrukturen dieser Versuche wurden in Triplikaten mit dem EBV-Microarray untersucht und die Mittelwerte der einzelnen Ereignisse für die Expressionsanalyse verwendet. Dadurch konnte der Schwellenwert von 2 auf 1,5 erniedrigt werden.

p2089-maxi-EBV-DNA unmethyliert		p2089-maxi-EBV-DNA unmethyliert + BZLF1		p2089-maxi-EBV-DNA methyliert + BZLF1	
Gen, Lokus	min/max ratio	Gen, Lokus	min/max ratio	Gen, Lokus	min/max ratio
oriP	3,07	oriP	1,58		
		BYRF1	0,79/2,08	BYRF1	0,95/8,21
		BHLF1	0,95/1,61	BHLF1	0,91/6,45
BORF1	0,81/1,69				
				BORF2	1,02/2,22
				BMRF1	1,10/2,45
				BMRF2	2,45/7,94
				BMLF1	1,10/2,79
				BLRF2/BLLF1/BLLF2	1,54/2,38
				BERF1/BERF2a	1,55
Fragment GC	1,51				
		BZLF2	1,15/2,07	BZLF2	1,08/2,57
		BZLF1	2,39/7,43	BZLF1	2,83/8,14
BRLF1	0,99/1,51			BRLF1	1,08/2,83
				BKRF3	0,98/2,36
				BKRF3/BKRF4	2,36
		BKRF4/BBLF4	1,55	BKRF4/BBLF4	1,74
				BBRF2/BBLF3	3,09
				BBLF3	2,92
				BBLF2	1,10/1,94
				BBRF3	1,94/2,05
				BBLF1/BGLF5	6,17
				BGLF5	2,28/8,45
				BGLF4	0,89/4,58
				BDRF1/BGRF1	1,55
		BGLF2	1,00/1,86		
				BDLF3	1,35/1,6
BcLF1	0,94/1,78				
				BTRF1	1,08/1,86
				BXLF2	1,42/1,86
BVRF2/BdRF1	1,18/1,55				
				BARF0/BALF3	1,11/1,74
BALF3/BALF2	1,21/1,52				
BALF2/BALF1	1,22/1,55				

Tab. 4.4: Expression von EBV-Genen nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen

Expressionsprofil von EBV in transient transfizierten HEK293-Zellen: (i) Transfektion von p2089-DNA (unmethyliert); (ii) Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA (unmethyliert) gemeinsam mit dem Expressionsplasmid für BZLF1; (iii) Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA (CpG-methyliert) gemeinsam mit dem Expressionsplasmid für BZLF1. Aufgelistet sind EBV-Gene, deren transkriptionelle Aktivität über dem Schwellenwert von 1,5 lagen. Zusätzlich sind das Minimum und Maximum angegeben, die durch Bilden der Expressionsverhältnisse („ratio“) für die aufgelisteten EBV-Gene bestimmt werden konnten.

Eine Expression viraler Gene nach transienter Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA wurde nicht erwartet. Ausschließlich BZLF1-Transkripte sollten auf niedrigem Niveau detektierbar sein, da z.T. eine spontane Expression von BZLF1 in Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen festgestellt worden war (Abbildung 4.7, 36 Zyklen). Es zeigte sich jedoch, dass auch andere, bisher unbekannte Gene in diesem Versuchsansatz detektierbar waren. Virale Gene, die in Tabelle 4.4 (Spalte 1) aufgelistet sind, zeigten im Vergleich zu HEK293-Zellen eine erhöhte Expression (im Detail Tabelle I, Anhang).

Eine Detektion viraler Transkripte nach transienter Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 wurde nur für wenige Gene erwartet. BZLF1 sollte auf hohem Niveau detektierbar sein. Zusätzlich zeigten aber auch weitere Gene, die in Tabelle 4.4 (Spalte 2) aufgelistet sind, im Vergleich zu HEK293-Zellen eine erhöhte Expression (im Detail Tabelle K, Anhang).

Die Expression aller lytischen Gene wurde nach transienter Transfektion von *de novo* CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 erwartet. Jedoch waren nicht alle EBV-Gene detektierbar, ähnlich wie in B95.8-Zellen und lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen. Gene, die in Tabelle 4.4 (Spalte 3) aufgelistet sind, zeigten im Vergleich zu HEK293-Zellen eine erhöhte Expression (im Detail Tabelle L, Anhang).

In HEK293-Zellen, die ausschließlich mit p2089-maxi-EBV-DNA transfiziert wurden, konnte keine hohen Expressionswerte detektiert werden. Gene, für die ein Wert über 1,5 berechnet wurde, zeigten dies jedoch nur in vereinzelt Proben. Meist lagen deren Werte nahe dem Schwellenwert von 1,5, sodass sie wohl als Ausreißer gewertet werden müssen. Auch in HEK293-Zellen, die mit p2089-maxi-EBV-DNA und dem Expressionsplasmid für BZLF1 transient transfiziert wurden, konnten nur wenige Gene exprimiert vorgefunden werden. Wie erwartet konnte in den Proben, die das BZLF1-Gen repräsentieren, eine hohe Expression detektiert werden. In HEK293-Zellen, die mit CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA und dem BZLF1-Expressionsplasmid transient transfiziert wurden, konnte ein Satz an Genen

definiert werden, die hoch exprimiert vorlagen (Tabelle 4.4, Spalte 3). Diese stellen womöglich jene Gene dar, deren Aktivität durch Zta und Rta bei der Induktion des lytischen Zyklus im Vordergrund stehen.

5. DISKUSSION

EBV ist ein ungewöhnliches Virus. Im Gegensatz zu vielen anderen Viren kommt es unmittelbar nach Infektion permissiver Zellen nicht zu einer Neusynthese von Nachkommenviren, stattdessen etabliert EBV eine latente Infektion. In dieser Phase entsteht eine stabile Situation zwischen Virus und Wirtszelle, in der EBV als extrachromosomales Episom innerhalb des Zellkerns der infizierten Zelle gemeinsam mit dem zellulären Genom repliziert und auf die entstehenden Tochterzellen verteilt wird (Adams, 1987; Kirchmaier and Sugden, 1995). Die lytische Phase kann erst durch entsprechende Stimuli in latent infizierten Zellen reaktiviert werden. Dies resultiert schließlich in der Synthese von Nachkommenviren (Bauer et al., 1982a; Bauer et al., 1982b; Fahmi et al., 2000; Takada, 1984; Takada and Ono, 1989). EBV besitzt folglich einen biphasischen Infektionszyklus, der aus einer latenten und einer lytischen Phase besteht.

Es ist sehr wenig über die frühe Phase der EBV-Infektion in B-Zellen und die initiale Expression viraler Gene in den ersten Stunden und Tagen der Infektion bekannt. Es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass das IE-Gen BZLF1, das zusammen mit BRLF1 die lytische Phase induziert, in der frühen Phase der Infektion nicht exprimiert wird, im Gegenzug aber Promotoren latenter Gene (Wp, Cp, Qp) sehr früh aktiviert werden. Alle bisherigen Arbeiten gehen davon aus, dass das BZLF1-Gen initial reprimiert ist, die lytische Phase des EBV deshalb nicht eingeleitet wird, und EBV ausschließlich die latente Infektion etabliert. Die Repression des BZLF1-Gens soll auf mehreren Ebenen stattfinden: (i) Repression durch virale latente Genprodukte (Adler et al., 2002; Miller et al., 1994a; Miller et al., 1994b; Miller et al., 1993); (ii) Repression durch zelluläre Genprodukte (Binne et al., 2002; Kraus et al., 2001; Kraus et al., 2003; Liu et al., 1998; Montalvo et al., 1995; Montalvo et al., 1991; Schwarzmann et al., 1994) und (iii) Repression durch antisense Transkripte. Jedoch existieren hierzu widersprüchliche Arbeiten (Jenkins et al., 2000; Prang et al., 1995).

Es mehren sich aber Berichte, die ein anderes Bild zeigen. Es wurde in einzelnen Fällen gezeigt, dass in der frühen Phase der EBV-Infektion sehr wohl lytische Gene exprimiert werden. So wurde von Zeidler *et al.* unmittelbar nach Infektion von B-Zellen die Expression des lytischen EBV-Proteins vIL-10 nachgewiesen (Zeidler et al., 1997). Auch die beiden viralen Bcl-2-homologen Gene, BALF1 und BHRF1, sind initial exprimiert und essentiell für die erfolgreiche Infektion

primärer B-Zellen (Altmann and Hammerschmidt, 2005). Viel wichtiger ist jedoch der Befund, dass das für die lytische Genexpression unentbehrliche IE-Gen BZLF1 sehr schnell nach Infektion exprimiert wird. So konnten Wen *et al.* binnen sechs Stunden p.i. das BZLF1-Protein Zta in B-Zellen detektieren. Dies resultierte aber nicht in der Induktion des vollständigen lytischen Zyklus, da Wen und Kollegen weder das BMRF1- noch das BLLF1-Protein nachweisen konnten (Wen et al., 2007). Diese Ergebnisse werden auch durch eigene unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Genvektoren bestätigt, in der unmittelbar nach Infektion von primären B-Zellen beide IE-Gene BZLF1 und BRLF1 nachgewiesen wurden. Sowohl die IE-Gene BZLF1 und BRLF1, die E-Gene BHRF1 und BALF1 als auch das zur Gruppe der 'late'-Gene gehörende BCRF1 (vIL-10) werden anfänglich hoch exprimiert, sind aber nach Etablierung der Latenz nicht mehr detektierbar (Altmann and Hammerschmidt, 2005; Wen et al., 2007; Zeidler et al., 1997). Somit resultiert die anfängliche Expression lytischer Gene in einem abortiv lytischen Zyklus. Das bisherige Bild der Abläufe während der frühen Phase der EBV-Infektion scheint folglich nicht der Realität zu entsprechen. Wie EBV eine latente Infektion in primären B-Zellen etabliert, obwohl lytische Gene in diesen Zellen exprimiert werden, ist völlig offen.

Die Veröffentlichungen, die sich mit der lytischen Phase beschäftigen, betrachten fast ausschließlich die Abläufe, die während der lytischen Reaktivierung in latent infizierten Zellen stattfinden. In EBV-positiven BL-Zelllinien wurden diejenigen Signalwege beschrieben, die nach Quervernetzung des BCR mit α -Ig Antikörper zu einer Reaktivierung des lytischen Zyklus führen (siehe Kapitel 1.3). Durch physiologisch relevante Stimuli kann die Reaktivierung der lytischen Phase *in vivo* relativ gut erklärt werden. Es existieren jedoch keine mir bekannten Arbeiten, die Vorgänge während der frühen Infektion von B-Zellen mit EBV näher untersuchen. So sind diejenigen Faktoren unbekannt, die für den abortiv lytischen Zyklus verantwortlich sind. Mit Sicherheit kann gesagt werden, dass es nicht, wie lange vermutet, auf Grund der fehlenden BZLF1 Expression zur Etablierung der Latenz kommt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Ursachen für die Restriktion in der abortiv lytischen Phase aufzudecken und den Block gezielt zu überwinden. Dies wurde in HEK293-Zellen, einem epithelialen *in vitro* Zellsystem, erreicht.

5.1 Etablierung des Transfektionssystems in HEK293-Zellen

Entscheidend für die Durchführung dieser Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems, in dem nach transienter Transfektion von maxi-EBV-DNA der lytische Zyklus unmittelbar initialisiert werden konnte. Dies ermöglichte die gut transfizierbare Epithelzelllinie HEK293. In Vorarbeiten wurde ein Protokoll erstellt, das eine effiziente und reproduzierbare Transfektion von Gesamt-EBV-DNA gewährleistet, die Induktion der lytischen Phase ermöglicht und sogar die Virusneusynthese unterstützt.

5.2 Eine epigenetische Modifikation ist für die Kontrolle der latenten und lytischen Phasen von EBV verantwortlich

Aufgabe dieser Arbeit war es, im HEK293-Zellsystem diejenigen Faktoren zu identifizieren, die für das Phänomen der abortiv lytischen Phase verantwortlich sind. Mit verschiedenen Analysemethoden konnte die Expression lytischer Gene und die Synthese von Nachkommenviren analysiert werden: (i) Nachweis vialer Transkripte durch RT-PCR; (ii) Nachweis viraler lytischer Proteine durch Immunfluoreszenzanalysen; (iii) Nachweis infektiöser Nachkommenviren durch Transformation von B-Blasten. Darüber hinaus konnten die Faktoren, die für den abortiv lytischen Zyklus in HEK293-Zellen verantwortlich sind, identifiziert werden: (i) für die Induktion der lytischen Phase benötigt das IE-Protein Zta methylierte DNA-Bindemotive (ZREs) in dem BRLF1-Promotor Rp; (ii) für die Induktion des lytischen Zyklus ist eine stochastische Expression des viralen Schaltergens BZLF1 erforderlich.

5.2.1 Spontane Expression von BZLF1 resultiert nicht in der Induktion des lytischen Zyklus

Mittels RT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass nach transienter Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA (unmethyliert oder methyliert) eine geringe Menge an BZLF1-Transkripten in den Zellen vorhanden ist (Abbildung 4.7 vgl. 30 und 36 PCR-

Zyklen). Selbst in Immunfluoreszenzanalysen konnte in beiden Versuchen z.T. das IE-Protein Zta nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch war die Menge an Zta für eine Induktion des lytischen Zyklus nicht ausreichend. Dies konnte mit allen drei Analysemethoden eindeutig bewiesen werden.

5.2.2 Die ektopische Expression von BZLF1 bewirkt die Induktion von wenigen lytischen Genen

Nach ektopischer Expression des BZLF1-Gens konnte die Aktivierung von einigen wenigen zusätzlichen lytischen Genen in RT-PCR-Analysen gezeigt werden. Jedoch scheint Zta nach Kotransfektion von unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA und dem Expressionsplasmid für BZLF1, p509, trotz des hohen BZLF1-Expressionsniveaus nur ineffizient an Promotoren lytischer Gene binden zu können. Ausschließlich nach 36 PCR-Zyklen konnten schwache Banden für BRLF1 und BALF4 im Agarosegel detektiert werden (Abbildung 4.7, Reihe 2). Diese schwache Aktivierung des zweiten IE-Gens BRLF1 scheint aber nicht ausreichend zu sein, um die gesamte lytische Kaskade zu aktivieren. Dieser Versuchsansatz resultierte auch in keiner detektierbaren Virusneusynthese (Tabelle 4.2). Auch in Immunfluoreszenzanalysen konnten in diesem Versuch die beiden Genprodukte, BZLF1 und BRLF1, vermutlich deshalb nicht detektiert werden, da diese Nachweismethode für die geringe Expressionshöhe nicht sensitiv genug ist.

5.2.3 Das Fehlen von Methylierungsmustern bewirkt den Block in der abortiv lytischen Phase

BZLF1 ist das essentielle virale Schaltergen, das gemeinsam mit BRLF1 weitere lytische Gene aktiviert. Nur die gemeinsame Expression beider Gene führt zum vollständigen lytischen Zyklus (Countryman et al., 1987; Countryman and Miller, 1985; Feederle et al., 2000; Shimizu et al., 1989). Dafür muss Zta aber an bestimmte Bindemotive in Promotoren lytischer Gene binden. Die Sequenz dieser Bindemotive ist sehr divergent und es sind nur wenige Promotoren lytischer Gene beschrieben, in denen diese Bindemotive tatsächlich existieren (Feederle et al., 2000; Giot et al., 1991; Holley-Guthrie et al., 1990). Im BRLF1-Promotor Rp wurde durch Bhende und Kollegen ein bisher unbekanntes drittes ZRE entdeckt, das von Zta ausschließlich im CpG-methylierten Zustand gebunden wird (Bhende et al., 2004; Bhende et al., 2005).

Diese Arbeit analysiert die funktionellen Konsequenzen dieser Einzelbeobachtungen. Zta ist ein außergewöhnliches Protein. Es scheint sowohl an unmethylierte und methylierte Bindemotive zu binden, initialisiert aber die BRLF1 Expression und somit den lytischen Zyklus in HEK293-Zellen ausschließlich durch Binden an methylierte DNA, wahrscheinlich methyliert vorliegende ZRE-Sequenzmotive im Rp. Durch transiente Transfektion von *de novo* methylierter p2089-maxi-EBV-DNA in HEK293-Zellen war das ektopisch exprimierte Zta in der Lage, initial den lytischen Zyklus zu aktivieren. Dies konnte mit Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen bewiesen werden (Abbildung 4.5 und Abbildung 4.7, Reihe 6). Es wurden Transkripte der beiden IE-Gene BZLF1 und BRLF1, des E-Gens BMRF1 und der beiden L-Gene BALF4 und BLLF1 detektiert. Der Beweis, dass es auch zur vollständigen Virussynthese und Produktion infektiöser Viruspartikel kommt, konnte durch Infektion und Wachstumstransformation von B-Blasten zu LCLs erbracht werden (Tabelle 4.2).

Dieser Befund ist unerwartet, da in der Literatur im Allgemeinen postuliert wird, dass die Methylierung von Cytosinen der DNA in der transkriptionellen Reprimierung der Genexpression resultiert (Boyes and Bird, 1991; Kass et al., 1997; Siegfried et al., 1999). Zwei Modelle beschreiben die epigenetischen Veränderungen, die zur Genreprimierung führen: DNA-Methylierung führt zur Reprimierung der Transkription, (i) indem es direkt verhindert, dass transkriptionelle Aktivatoren an DNA-Sequenzen binden (Watt and Molloy, 1988). (ii) Alternativ erkennen Methyl-CpG-Bindeproteine (MBPs) methylierte DNA und rekrutieren Korepressoren, die ihrerseits die Genexpression reprimieren (Kudo, 1998; Nan et al., 1997; Nan et al., 1998).

Im Gegensatz zur allgemeinen Lehrmeinung konnte jedoch in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Zta ein Protein ist, das die Genexpression gezielt in CpG-methylierter DNA aktivieren kann.

5.2.4 Eine rasche CpG-Methylierung ist entscheidend für einen initialen lytischen Zyklus

Im Gegensatz zur chromosomalen DNA der virusproduzierenden Wirtszelle ist die in den Virionen enthaltene EBV-DNA nicht methyliert (Dyson and Farrell, 1985; Robertson et al., 1996; Shaw et al., 1979). Das Muster der zellulären DNA-Methylierung wird in allen somatischen, proliferierenden Zellen durch

Methyltransferasen aufrechterhalten (Okano et al., 1999; Pradhan et al., 1999). Diese Methyltransferasen sind wahrscheinlich auch dafür verantwortlich, dass in latent infizierten Zellen das EBV-Genom eine *de novo* Methylierung der CG-Dinukleotide erfährt. Wir wissen aus unveröffentlichten Arbeiten der Arbeitsgruppe, dass dieser Prozess sehr langsam stattfindet. Da die Virion-DNA keine CpG-Methylierung trägt, wird sie durch die zellulären Methyltransferasen wahrscheinlich nur sehr ineffizient modifiziert. Dabei ist wohl genau diese langsame Methylierung der Grund dafür, dass in der frühen Phase der Infektion in infizierten Zellen die Virusneusynthese unterbleibt, obwohl das Schlüsselgen BZLF1 exprimiert wird. Sehr wahrscheinlich ist die Blockade essentieller lytischer Gene eine unabdingbare Voraussetzung für die latente Infektion, da eine Virusneusynthese mit dem Überleben der infizierten Zellen nicht vereinbar ist.

Der Prozess der Methylierung kann jedoch dramatisch beschleunigt werden. So wurde in meiner Arbeit ein Expressionsplasmid (p3663.1) verwendet, das die *de novo* Methyltransferase M.Sssl aus *Schistosoma* kodiert. Deren konstitutive Expression wird durch den verwendeten CMV-Promotor gewährleistet. Unveröffentlichte Arbeiten meiner Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die EBV-DNA nach ektopischer Expression der M.Sssl-Methyltransferase sehr rasch *in vivo* methyliert wird. In dieser Arbeit konnte ich erstmals aufdecken, dass Zta die vollständige lytische Phase mit CpG-methylierter genomischer EBV-DNA initialisieren kann. Die Synthese von infektiösen Nachkommenviren wurde durch Infektion und Waschstumstransformation von B-Blasten nachgewiesen, die bei unmethylierter EBV-DNA in meinem HEK293-Modell nie zu beobachten war.

5.2.5 In HEK293-Zellen ist die Methylierung von Rp essentiell für die Induktion der lytischen Phase

Über Zta ist bekannt, dass es in allen latent EBV-infizierten Zellen den vollständigen lytischen Zyklus initiiert. Von Rta weiß man jedoch, dass es einen gewissen Zelltropismus besitzt. Im Gegensatz zur BL-Zelllinie HH514-16, wo Rta beide Promotoren, Zp und Rp, aktiviert, kann Rta in RAJI-Zellen keinen der beiden Promotoren aktivieren. Auch die Aktivierung von späteren lytischen Genen durch Rta scheint zelltypspezifisch zu sein, da die BMRF1-Expression in Epithelzellen ausschließlich durch Zta reguliert zu sein scheint. In B-Zellen jedoch findet eine Steuerung der BMRF1-Expression durch beide IE-Gene statt (Chang et al., 2004b;

Countryman and Miller, 1985; Ragoczy et al., 1998; Rooney et al., 1988; Takada et al., 1986; Zalani et al., 1996). In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass in der Epithelzelllinie HEK293 der Block in der abortiv lytischen Phase ausschließlich im BRLF1-Promotor Rp liegt. Kein weiterer Promotor lytischer Gene muss eine methylierte Zielsequenz aufweisen. Dieser Nachweis konnte durch Kotransfektion von unmethylierter maxi-EBV-DNA und dem Expressionsplasmid für BRLF1 (p2130) erbracht werden. Dieser Versuch resultierte in der Induktion der lytischen Phase, folglich war die Expression der fünf stellvertretend analysierten lytischen Gene in Immunfluoreszenz- und RT-PCR-Analysen detektierbar (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.7, Reihe 3). Die Synthese von infektiösen Viruspartikeln wurde auch hier durch Infektion und Wachstumstransformation von B-Blasten erbracht (Tabelle 4.2). Die Virusproduktion konnte darüber hinaus noch gesteigert werden, wenn methylierte p2089-maxi-EBV-DNA mit dem BRLF1-Expressionsplasmid kotransfiziert wurde. Dies resultierte in einer fast doppelt so hohen Transformationseffizienz (Tabelle 4.2). Die effizienteste Induktion des lytischen Zyklus wurde in transienten Transfektionen erreicht, in denen methylierte p2089-maxi-EBV-DNA mit Expressionsplasmiden beider IE-Gene kotransfiziert wurde. Zusätzlich konnte in diesem Versuchansatz auch der höchste Virustiter festgestellt werden (Tabelle 4.2). Somit konnte der indirekte Nachweis erbracht werden, dass in HEK293-Zellen ZREs ausschließlich im Rp methyliert sein müssen, um Zta die Induktion der lytischen Phase zu ermöglichen.

Aus eigenen unveröffentlichten Arbeiten ist aber auch bekannt, dass in B-Zellen unmittelbar nach Infektion mit EBV die beiden IE-Gene BZLF1 und BRLF1 sowie weitere lytische Gene exprimiert werden. Warum also sind die beiden IE-Gene nicht in der Lage, auch in B-Zellen den lytischen Zyklus initial zu induzieren? Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Induktion der lytischen Phase von der infizierten Zelle abhängt. Im Gegensatz zu Epithelzellen muss es in B-Zellen Sequenzmotive in Promotoren weiterer lytischer Gene geben, an die der virale Transkriptionsfaktor Zta nur dann bindet, wenn die Zielsequenz eine CpG-Methylierung aufweist. Nur so kann wahrscheinlich der vollständige lytische Zyklus in B-Zellen initialisiert werden. Diese weiteren CpG-methylierungssensitiven ZRE-Zielsequenzen gilt es nun zu identifizieren.

5.3 Der biphasische Vermehrungszyklus von EBV wird durch epigenetische Mechanismen gesteuert

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, wie wichtig die Modifikation des EBV-Genoms durch zelluläre Methyltransferasen für die beiden Phasen des Vermehrungszyklus von EBV ist. Die Blockade essentieller lytischer Gene scheint eine unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche latente Infektion zu sein. Denn selbst wenn nach Infektion einer B-Zelle beide IE-Gene BZLF1 und BRLF1 exprimiert werden, sind sie nicht in der Lage, den vollständigen lytischen Zyklus im unmodifizierten EBV-Genom zu ermöglichen, da in der frühen Phase der Infektion nur wenige lytische Gene exprimiert werden. Nachdem deren Expression nach kurzer Zeit gänzlich eingestellt wird, sprechen wir von einer abortiv lytischen Phase. Diese wiederum ermöglicht die Etablierung einer latenten Infektion, sodass aus der infizierten B-Zelle eine latent infizierte LCL entsteht. Die Modifikation des viralen Genoms durch Methylierung von CG-Dinukleotiden spielt nicht nur in der Regulation der lytischen Phase eine entscheidende Rolle, sondern auch in der Regulation latenter Gene. Denn ausschließlich durch fortschreitende Methylierung des Wp und einer damit verbundenen Repression latenter Gene ist es EBV möglich, der Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen zu entgehen und sich so stabil im Wirt zu etablieren (Ambinder et al., 1999; Day et al., 2007; Minarovits et al., 1991; Park et al., 2007; Robertson et al., 1996). Durch fortschreitende epigenetische Modifikationen des EBV-Genoms während der B-Zell-Transformation ähnelt das virale Genom mehr und mehr dem chromosomalen Wirtsgenom. Das EBV-Genom wird hypermethyliert, mit dem zellulären Chromatin assoziiert und in Nukleosomen verpackt (Dyson and Farrell, 1985; Robertson et al., 1996; Shaw et al., 1979). Aus eigenen unveröffentlichten Arbeiten meiner Arbeitsgruppe wissen wir, dass der Methylierungsstatus des EBV-Genoms stetig zunimmt und dass es frühestens vier Wochen nach Infektion auf niedrigem Niveau zu einer Virusneusynthese kommt. Die Induktion des lytischen Zyklus scheint dabei spontan zu erfolgen oder durch äußere Einflüsse initialisiert zu sein und führt sehr wahrscheinlich durch Quervernetzung des BCR zur Expression von BZLF1. Zta wäre aber nun in der Lage, an methylierte Zielsequenzen in Promotoren lytischer Gene zu binden und so den vollständigen lytischen Zyklus zu ermöglichen. Dies könnte erklären, warum die Infektion einer

permissiven Zelle mit EBV ein zweigeteilter Prozess ist. In Abbildung 5.1 ist ein Model der biphasischen Regulation des lytischen Zyklus dargestellt.

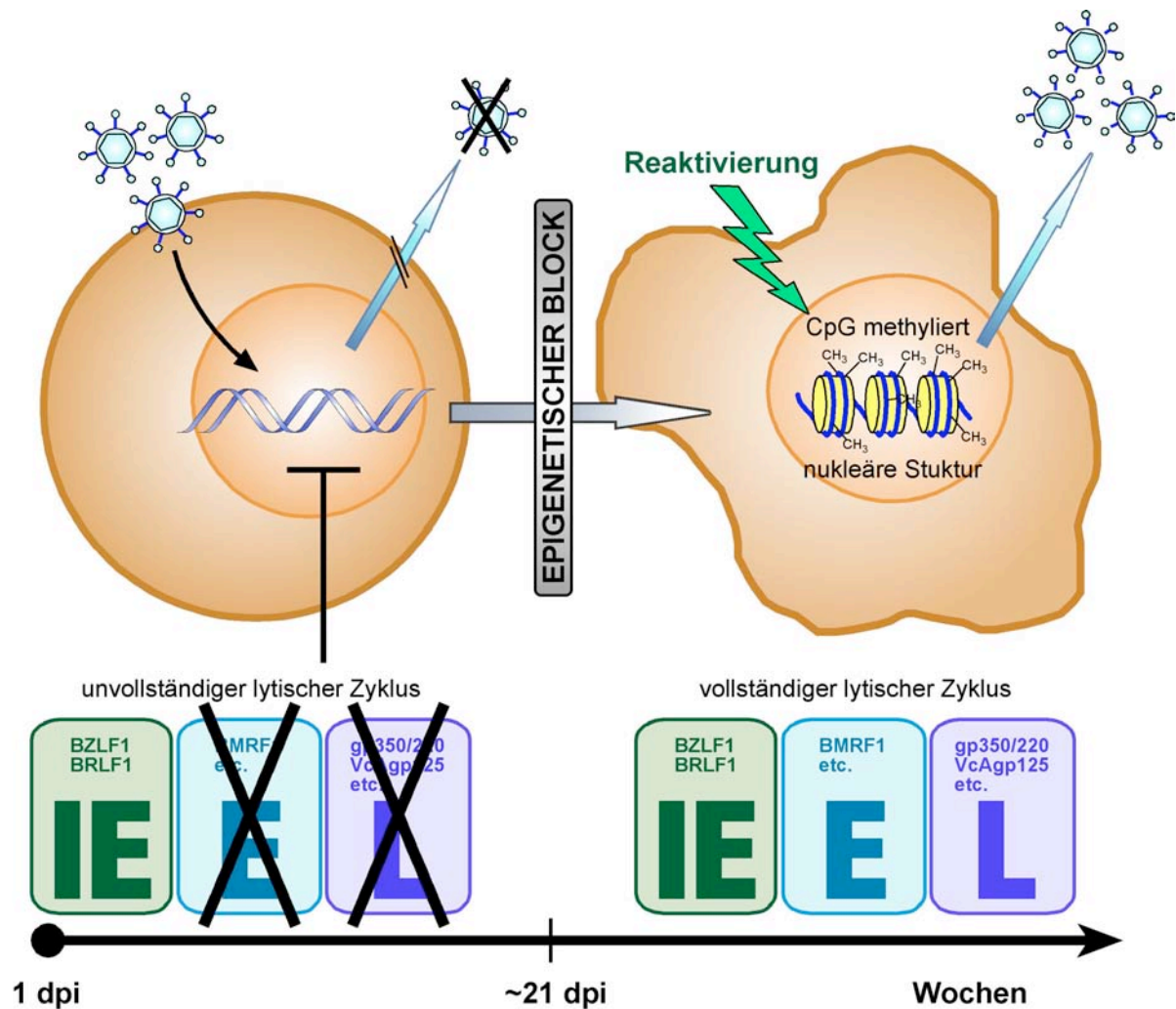


Abb. 5.1: Model der biphasischen Regulation des lytischen Zyklus

Nach Infektion einer B-Zelle (links) liegt das EBV-Genom als unmodifiziertes Episom im Zellkern vor. Trotz der Expression der beiden lytischen Schaltergene BZLF1 und BRLF1, die zur Klasse der 'immediate-early'-Gene (IE) gehören, findet keine Virusneusynthese statt. Gene der 'early' (E) und 'late' (L)-Gene werden nicht exprimiert. In diesen Zellen etabliert sich eine latente Infektion, eine LCL entsteht (rechts). Während der Transformation kommt es zu epigenetischen Veränderungen des EBV-Genoms, nach ca. 4 Wochen kann auf niedrigem Niveau Virusneusynthese detektiert werden. Die Induktion des lytischen Zyklus kann spontan erfolgen oder durch äußere Einflüsse initialisiert werden (z.B. durch Quervernetzung des BCR). In der Folge werden alle viralen Genklassen (IE, E und L) exprimiert.

5.4 Microarray, eine Methodik um das Expressionsprofil viraler Gene aufzudecken

Meine bisherigen Arbeiten zeigen an einzelnen ausgewählten Transkripten, dass der lytische Zyklus durch Binden von Zta an methylierte Zielsequenzen im Rp induziert werden kann. Jedoch zeigen die RT-PCR-Analysen der verschiedenen Experimente

auch, dass die Induktion lytischer Gene kein Schwarzweiß-Zustand ist, sondern dass Zwischenzustände existieren. So können bei transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit unmethylierter p2089-maxi-EBV-DNA und dem Expressionsplasmid für BZLF1 nach 36 PCR-Zyklen geringe Transkriptmengen von BRLF1 und BALF4 detektiert werden. Die Detektion weiterer lytischen Gene, von denen es ca. 70 gibt, wäre durch die Erhebung des gesamten Expressionsprofils des EBV-Genoms möglich.

Im Verlauf meiner Arbeiten habe ich einen cDNA-Microarray des gesamten EBV-Genoms hergestellt. Mit diesem kann u.a. eine genomweite Bestandsaufnahme aller EBV-Gene durchgeführt werden, um sämtliche vorhandene Transkripte z.B. in der abortiv lytischen Phase zu identifizieren. Es kann selbstverständlich auch ein Expressionsprofil viraler Gene in verschiedenen Latenzzuständen oder während der lytischen Replikation aufgestellt werden.

5.4.1 Genomweite EBV-Microarrays

Wir wussten durch eine enge Korrespondenz mit Dr. B. Sugden (University of Wisconsin, Madison, USA), dass dessen Arbeitsgruppe schon mit EBV-Microarrays gearbeitet hatte, in denen 25mer und 70mer Oligomere getestet worden waren. Mit beiden Ansätzen traten Probleme im Bereich der Sensitivität auf. Deshalb entschlossen wir uns, einen cDNA-Array auf Basis von 500-700bp langen, überlappenden PCR-Fragmenten zu generieren, da die Länge der Proben entscheidend zur Sensitivität des Microarrays beiträgt. Dabei wurde das gesamte EBV-Genom durch zwei Sets an PCR-Produkten abgedeckt, indem entweder der FP oder der BP mit einer Aminomodifikation versehen wurde. Mit diesen PCR-Proben ist es möglich, einen EBV-strangspezifischen Microarray herzustellen. Jedoch haben wir uns aus Gründen der Haltbarkeit der Microarrays und der zu generierenden Probenmenge gegen diese Variante entschieden. Stattdessen haben wir der kovalenten Epoxidkopplung den Vorzug gegeben und das EBV-Genom auf dem Array vier Mal abgebildet. Durch das Vorhandensein von vier Replikaten jeder Probe können Ausreißer identifiziert werden, die jedoch nicht in die Auswertung mit einfließen.

Bei qRT-PCR-Experimenten im Vorfeld der Arbeit hatten wir feststellen können, dass die dabei verwendeten HKG-Kontrollen nicht die erwartete Konstanz bzw. Reproduzierbarkeit zeigten. Auch verweisen immer mehr Publikationen darauf,

dass die Wahl der als Kontrolle verwendeten HKGs sorgfältig getroffen werden muss, da auch die Expression dieser Gene sehr wohl variiert (Bilban et al., 2002; Thellin et al., 1999; Welsh et al., 2001). Deshalb wurden für den EBV-Microarray 28 HKGs verwendet, die in verschiedensten Prozessen der Zelle beteiligt sind. Dadurch wurde versucht, ein Set an konstant exprimierten Genen für die Normalisierung der erhaltenen Daten zu gewährleisten. Zusätzlich wurden die HKG-Kontrollen als Markierungspunkte in den Ecken eines Rasters eingesetzt, sodass ein optisch klar erkennbares Muster auf dem Array erkennbar ist (Abbildung 4.19 und 4.22). Nach ausführlicher Diskussion mit anderen Arbeitsgruppen hatten wir uns außerdem entschieden, zusätzlich sog. 'Spike-in'-Kontrollen zu verwenden. Es wurden zusätzlich 10 'SR Alien Amine Oligo' Proben („SpotReport™ Alien™ Amine Oligo Array Validation System“, Stratagene) und vier im System enthaltene Kontrollen auf den Array gespottet. Diese Proben besitzen laut Angabe von Stratagene keine Sequenzähnlichkeit mit humanen-, Maus-, Ratte-, Hefe- oder Pflanzengenen und können zusammen mit den komplementären mRNA-Spikes als Positivkontrolle oder ohne diese als Negativkontrolle verwendet werden. Jedoch ergaben sich bei diesen Kontrollen zwei Probleme: (i) Da es sich um 70mer Oligos handelt (im Vergleich zu 500-700bp der EBV-Produkte), sind nach der Hybridisierung der Zielstrukturen und Verwenden von stringenten Waschschrritten die mRNA-Spikes nicht stabil, da die verwendeten Lösungen auf 500-700bp Proben optimiert waren; (ii) Es traten bei mehreren 'SR Alien Amine Oligos' unspezifische Bindungen von Zielstrukturen auf, vermutlich EBV-Produkte. Aus diesen Gründen wurden bei sämtlichen Auswertungen die 'SR Alien Amine Oligo'-Spots als Kontrolle nicht mit einbezogen.

Es existieren bereits einige Publikationen, in denen EBV-Microarrays verwendet wurden. Jedoch benutzten die meisten Gruppen einen Oligonukleotid-Array mit 70-75meren (Bernasconi et al., 2006; Yuan et al., 2006; Zhang et al., 2006). Ausschließlich in zwei mir bekannten Fällen wurden cDNA-Microarrays verwendet. Jedoch wurden ausschließlich bekannte ORFs bei diesen Arrays gespottet, sodass ein beträchtlicher Anteil des EBV-Genoms nicht mit abgebildet wird (Fang et al., 2005; Lu et al., 2006). Im Gegensatz dazu ist in unserem cDNA-Microarray das gesamte EBV-Genom dachziegelartig überlappend abgebildet, sodass auch nicht kodierende Regionen, deren transkriptionelle Aktivität unbekannt ist, in die Analyse mit einbezogen werden. Ein weiterer Nachteil der beiden cDNA-Arrays von Fang *et. al.* und Lu *et. al.* ist in meinen Augen, dass dort keine

einheitlichen Probenlängen verwendet wurden. So wurden bei Fang *et al.* (Fang et al., 2005) Proben zwischen 300-600bp gespottet, wobei in der Arbeitsgruppe von Lu C.C. sogar noch drastischere Unterschiede in der Probenlänge vorhanden war (200-2388bp) (Lu et al., 2006). Dies resultiert in einem bereits visuell inhomogenen Bild auf dem Array und kann bei der Hybridisierung und v.a. bei den Waschschritten zu teilweise erheblichen Problemen führen. In dem cDNA-Microarray, der in meiner Arbeit hergestellt wurde, habe ich deshalb explizit darauf geachtet, dass die Probenlänge im Bereich zwischen 500-700bp liegt.

Allen veröffentlichten Arbeiten gemeinsam ist, dass Zustände von bereits mit EBV-infizierten Zellen analysiert werden. So vergleicht z.B. Zhang *et al.* das Transkriptionsprofil verschiedener EBV-assoziiertes NK/T-Zelllymphome miteinander (Zhang et al., 2006). Vor allem aber wird die lytische Induktion in BL-Zelllinien und die verschiedenen Expressionsprofile von EBV in diesen Zellen nach Reaktivierung der lytischen Phase analysiert (Bernasconi et al., 2006; Lu et al., 2006; Yuan et al., 2006). Keine Arbeitsgruppe jedoch betrachtet das Expressionsprofil von EBV nach initialer Infektion von permissiven Zellen oder nach unmittelbarer Induktion des lytischen Zyklus in ursprünglich EBV-negativen Zellen.

5.4.2 Expressionsprofil von EBV in ausgewählten Zelllinien

Zur Kontrolle der Sensitivität und Spezifität des in dieser Arbeit hergestellten cDNA-Microarrays wurden anfangs Zielstrukturen von EBV-negativen Zellen (BJAB und DG75) auf dem Array hybridisiert. Es fanden beim Großteil der Proben keine unspezifischen Bindungen mit Zielstrukturen von den EBV-negativen Zelllinien statt. Ausschließlich die beiden Proben FI und MD zeigten eine erhöhte Signalstärke, wenn die beiden Zelllinien miteinander verglichen wurden (Tabelle E, Anhang). Jedoch war der Unterschied nahe am Schwellenwert von 2. Zusätzlich handelt es sich bei den Versuchen mit den EBV-negativen Zelllinien um Einzelexperimente, sodass es möglicherweise bei mehrmaliger Wiederholung zu einer Normalisierung dieser beiden Werte kommt.

Aus der Korrespondenz mit Dr. B. Sugden wussten wir, dass die Sensitivität der von ihm verwendeten Oligoarrays nicht hoch genug war, um latente Transkripte in LCLs zu detektieren. Mit dem in dieser Arbeit hergestellten cDNA-Array konnte jedoch die Expression einiger latenter Gene eindeutig detektiert werden. So waren EBNA1, EBNA-3B, EBNA-3C, LMP-1 und LMP-2 signifikant exprimiert. Auch bei den

beiden latenten Genen EBNA-2 und EBNA-3A ist ein deutlicher Unterschied im Vergleich zur Kontrollzelllinie erkennbar, auch wenn der Schwellenwert von 2 nicht erreicht wurde (Tabelle F, Anhang). Somit konnte zum ersten Mal das genomweite Expressionsprofil von EBV in der latent infizierten Zelllinie LCL721 dargestellt werden. Interessanterweise wurden auch zusätzliche Transkripte viraler Gene exprimiert gefunden: BNRF1, BHRF1, BBRF1, BBLF3, BALF5, BALF4 und BALF3/BARF0. Besonders BHRF1, BALF4 und das Gencluster BALF3/ BARF0 sind hoch exprimiert. Warum diese Transkripte in der LCL721 exprimiert werden, ist nicht erklärbar, da sie zu den lytischen Gene zählen.

Im Vergleich der latenten und spontan lytischen B95.8-Zelllinie mit der EBV-negativen Zelllinie BJAB wurde erwartet, dass sämtliche viralen Transkripte detektiert werden. Im Großteil des EBV-Genoms wurde dies beobachtet (Tabelle G, Anhang). Jedoch existieren einige Bereiche, in denen die Expression als nicht signifikant hoch eingestuft werden muss. Vor allem viele Gene, die für Tegumentproteine kodieren, waren relativ schwach exprimiert. Warum bei einigen EBV-Transkripten keine signifikanten Expressionsniveaus erreicht wurden ist nicht klar. Möglicherweise liegen diese Transkripte zu diesem Zeitpunkt der Infektion oder im Allgemeinen nur in sehr geringem Maße in der Zelle vor.

Ein nahezu identisches Bild wie in B95.8-Zellen konnte beim Vergleich von lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen mit HEK293-Zellen festgestellt werden. Auch hier sind nahezu alle EBV-Gene exprimiert (Tabelle H, Anhang). Wie bei B95.8 war u.a. die Expression von einigen Tegumentproteinen gering.

Entgegen meinen ursprünglichen Annahmen konnte bei keinem Versuch ein Unterschied in der Expression der HKG-Kontrollen festgestellt werden, sodass diese in den verschiedenen Zellsystemen trotz lytischer Induktion als konstant angesehen werden können.

5.4.3 Expressionsprofil von EBV nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen

Durch eine genomweite Bestandsaufnahme aller exprimierten EBV-Gene mittels des EBV-Microarrays konnten unterschiedliche Sets an exprimierten Genen definiert werden. Dabei wurden drei verschiedene Versuchsansätze im Detail analysiert: (i) HEK293-Zellen transient transfiziert mit p2089-maxi-EBV-DNA; (ii) HEK293-Zellen transient transfiziert mit p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem

Expressionsplasmid für BZLF1 (p509); (iii) HEK293-Zellen transient transfiziert mit *de novo* CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem Expressionsplasmid für BZLF1 (p509). Wie erwartet konnte in HEK293-Zellen, die ausschließlich mit p2089-maxi-EBV-DNA transfiziert wurden (Versuchsansatz (i)), keine Expression lytischer Gene festgestellt werden. In Einzelfällen lagen einige Werte nahe dem Schwellenwert von 1,5 (z.B. PCR-Probe GC und GM mit einem 'ratio' von 1,51) (Tabelle I, Anhang), sodass diese Werte grenzwertig waren. In Versuchen mit HEK293-Zellen, die mit p2089-maxi-EBV-DNA und dem Expressionsplasmid für BZLF1, p509, kotransfiziert wurden (Versuchsansatz (ii)), war das BZLF1-Gen auffällig hoch exprimiert. Dies war erwartet, da das kotransfizierte Expressionsplasmid für BZLF1 natürlich dieses Transkript hoch exprimiert. Für das zweite IE-Gen BRLF1 konnten keine Werte oberhalb des Schwellenwertes von 1,5 gemessen werden. Es zeigte sich jedoch ein etwas höheres Niveau in den PCR-Proben für BRLF1 im Vergleich zum Versuchsansatz (i). Zusätzlich konnten auch in dieser Konstellation nur vereinzelte Proben gefunden werden, die oberhalb des Schwellenwertes von 1,5 lagen (Tabelle K, Anhang). Ausschließlich nach transienter Transfektion von methylierter p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem BZLF1-Expressionsplasmid konnten mehrere lytische Gene exprimiert vorgefunden werden (Versuchsansatz (iii)). Auffällig war die Clusterbildung von einigen viralen lytischen Genen: BYRF1-BHLF1, BHRF1, BMRF1-BMRF2-BMLF1, BLRF2-BLLF1b-BLLF2, BZLF2-BZLF1-BRLF1, BKRF3-BKRF4, BBRF2-BBLF3-BBLF2-BBRF3-BBLF1-BGLF5-BGLF4 und BXLF2 (Tabelle L, Anhang). Von Interesse ist dabei, dass mehrere dieser Gene von Lu und Kollegen in Versuchen mit RAJI-Zellen als Rta-abhängig exprimiert charakterisiert wurden (Lu et al., 2006). Dazu zählen u.a. folgende Gene: BHRF1, BMRF1, BMRF2, BMLF1, BLRF2, BKRF3, BKRF4, BBLF3, BBLF2, BBRF3, BBLF1, BGLF5. Diese weisen auch in Versuchen mit methylierter p2089-maxi-EBV-DNA nach lytischer Induktion eine erhöhte Expression auf. Somit kann geschlussfolgert werden, dass diese Gruppe von Genen indirekt methylierungsabhängig exprimiert wird, da die Expression des sie aktivierenden Gens BRLF1 ausschließlich methylierungsabhängig von Zta induziert wird. Es konnte in diesem Versuchsansatz jedoch kein vollständiges Profil von allen EBV-Genen festgestellt werden, da offensichtlich bei vielen lytischen Genen die Expression nicht ausreichend hoch, bzw. die Methodik des Microarrays nicht sensitiv genug war.

Diese Ergebnisse decken sich mit den in anderen experimentellen Ansätzen (Immunfluoreszenzanalysen, RT-PCR-Analysen, Transformation von B-Blasten) gewonnenen Daten und erweitern sie um den genomweiten Überblick der wesentlichen Gene, die methylierungsabhängig hoch exprimiert werden.

5.5 Ausblick

In meinen experimentellen Arbeiten habe ich in verschiedenen Ansätzen die Frage nach den Grundlagen der abortiv lytischen Phase verfolgt. Obwohl das IE-Protein Zta in allen infizierten und einigen mit maxi-EBV-DNA transfizierten Zellen exprimiert wird, werden nur wenige weitere lytische Gene exprimiert, bevor letztlich in der latenten Infektion diese Gene völlig reprimiert sind. Ich konnte indirekt zeigen, dass Zta in epithelialen HEK293-Zellen ausschließlich den methylierten BRLF1-Promotor Rp aktiviert, um so gemeinsam mit Rta sämtliche lytischen Proteine zu induzieren. Im Vergleich dazu scheint es, als ob in B-Zellen weitere Promotoren lytischer Gene CpG-methylierte Zielsequenzen für Zta aufweisen müssen, damit es in diesen Zellen zur Induktion des lytischen Zyklus und Synthese von Nachkommenviren kommt. Die Induktion des lytischen Zyklus weist also zelltypspezifische Unterschiede auf.

Aus unveröffentlichten Arbeiten meiner Arbeitsgruppe wissen wir, dass Zta methylierungsunabhängig und hoch affin an den BMRF1-Promotor und an ZRE-Motive innerhalb des lytischen Replikationsursprung, oriLyt, bindet. Die Option, methylierungsunsensitive Bindemotive von Zta in den BRLF1-Promotor zu klonieren, bietet sich an. Diese modifizierte maxi-EBV-DNA sollte in HEK293-Zellen nach transienter Transfektion zu einer unmittelbaren und methylierungsunabhängigen Induktion des lytischen Zyklus führen. Sehr wahrscheinlich werden Nachkommenviren mit dieser genetischen Alteration aber nicht in der Lage sein, in infizierten B-Zellen den lytischen Zyklus zu induzieren, da in diesen B-Zellen weitere methylierungssensitive ZRE-Motive in Promotoren essentieller lytischer Gene vermutet werden. Alternativ ist es denkbar, ein maxi-EBV-Plasmid zu konstruieren, das die M.SssI-Methyltransferase konstitutiv exprimiert. Auch diese Modifikation dürfte zur sofortigen Induktion des lytischen Zyklus in HEK293-Zellen führen. Es ist jedoch nicht klar, inwiefern die konstitutiv exprimierte Methyltransferase nach Infektion von B-Zellen negative Auswirkungen hat und mit dem Überleben dieser Zellen kompatibel ist.

Gelänge es mit diesen Situationen tatsächlich, ein exklusiv lytisches maxi-EBV in HEK293-Zellen zu generieren, könnte auf zeitraubende Arbeitsschritte verzichtet werden. Es wäre möglich, nach transienter Transfektion von maxi-EBV-DNA sofort Nachkommenviren in HEK293-Zellen zu generieren und den viralen Phänotyp in infizierten B-Zellen zu analysieren.

Die frühe Phase der EBV-Infektion in B-Zellen ist kaum untersucht und deshalb nicht verstanden. Mit Hilfe meines EBV-Microarrays kann jedoch jetzt ein genomweites Expressionsprofil von EBV in der frühen Phase der Infektion aufgestellt werden. So können jene Sets an viralen Genen identifiziert werden, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Stunden bzw. Tage) nach Infektion exprimiert werden. Möglicherweise kann dieses Vorgehen Hinweise geben, warum in der frühen Phase der Infektion Gene exprimiert werden, die eigentlich der lytischen Phase zugeordnet sind.

Von außerordentlichem Interesse ist die Identifizierung weiterer methylierungssensitiver Bindestellen für Zta in infizierten B-Zellen. So müssen zusätzlich zu den ZREs im Rp weitere virale Transaktivatoren existieren, deren Promotoren ausschließlich dann gebunden werden, wenn diese methylierte Zielsequenzen für Zta besitzen. Ein experimenteller Zugang zu dieser Fragestellung ist ein ChIP-on-chip Ansatz mit immunpräzipitiertem Zta, das an verschiedene ZRE-Motive gebunden vorliegt. Dadurch sollte es möglich sein, methylierungsabhängige und –unabhängige Bindestellen für Zta zu identifizieren. Möglicherweise könnte man in diesem Ansatz virale Gene definieren, die in der frühen Phase der Infektion bzw. bei einer Reaktivierung der lytischen Phase reguliert sind. Dadurch könnte auch in B-Zellen die Regulation der lytischen Phase besser verstanden werden und ein rekombinantes EBV-Genom generiert werden, das in allen permissiven Zellen ausschließlich den lytischen Zyklus unterstützt und damit die latente Infektion dieses Herpesvirus unterbindet. Diese Viren könnten die Entwicklung einer EBV-Vakzinie vorantreiben.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Epstein-Barr Virus, EBV, infiziert humane primäre B-Zellen sehr effizient; diese Zellen werden jedoch initial ausschließlich latent infiziert. Eine Virusproduktion findet nicht statt, obwohl in diesen Zellen die beiden frühen Schaltergene des viralen lytischen Zyklus exprimiert werden. Neben BZLF1 und BRLF1 werden nur sehr wenige lytische Gene des EBV exprimiert, wir sprechen von einer initialen abortiv lytischen Phase. Es war Aufgabe dieser Arbeit, die Ursache für die Restriktion der lytischen Genexpression auf der molekularen Ebene zu definieren.

Als Modell diente eine humane Epithelzelllinie (HEK293), die transient mit rekombinanter gesamtgenomischer EBV-DNA (p2089-maxi-EBV) zusammen mit Expressionsplasmiden für verschiedene virale und zelluläre Gene transfiziert wurde. Die virale Genexpression wurde mit verschiedenen Analysemethoden untersucht: (i) Nachweis viraler Transkripte durch RT-PCR; (ii) Nachweis viraler lytischer Proteine durch Immunfluoreszenzanalysen; (iii) Nachweis funktioneller Nachkommenviren durch Infektion und Transformation von B-Blasten; (iv) Erstellen viraler Genexpressionsprofile mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten EBV-Microarray. Dieser EBV-Microarray umfasst dachziegelartig überlappend das gesamte EBV-Genom in 285 500-700bp großen PCR-Produkten und erlaubt die genomweite Bestandsaufnahme aller EBV-Transkripte.

Die transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit rekombinanter p2089-maxi-EBV-DNA, aus *E. coli* isoliert, resultierte nie in der Induktion des lytischen Zyklus. Auch die ektopische Expression des lytischen Schaltergens BZLF1 konnte diesen Block nicht überwinden, ebenso entstanden keine Nachkommenviren. Dieser Block konnte jedoch durch die Modifikation der rekombinanten EBV-DNA durch CpG-Methylierung oder durch ektopische Expression des BRLF1-Gens überkommen werden. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das BZLF1-Genprodukt Zta ein Protein ist, das in dem verwendeten Modell bevorzugt an methylierte Zielsequenzen bindet und die Transkription gezielt in CpG-methylierter DNA aktivieren kann. Eine dieser Zielsequenzen umfasst den Promotor des BRLF1-Gens, der nur durch Zta transaktiviert wird, wenn er CpG-Methylierungen aufweist. Da EBV-DNA in Virionen nicht CpG-methyliert vorliegt, kann BZLF1 die Expression entscheidender viraler Schlüsselgene in den ersten Tagen nach Infektion humaner B-Zellen nicht induzieren; die Virusneusynthese bleibt aus. Die fehlende Methylierung entscheidender Zielsequenzen des BZLF1-Genprodukts Zta ist die

Voraussetzung für die erfolgreiche latente Infektion und den biphasischen, zwischen Latenz und Virusneusynthese alternierenden Infektionszyklus dieses Herpesvirus.

7. ABKÜRZUNGEN

α -	anti
aa	Aminosäure
AA-UTP	Aminoallyl-UTP
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
aRNA	antisense RNA
BBLs	B-Blasten
BCR	B-Zell Rezeptor
BL	Burkitt-Lymphom
β -ME	β -Mercaptoethanol
BP	‚backward primer‘
bp	Basenpaar(e)
bZIP	‚basic leucine zipper‘
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CsCl	Cäsiumchlorid
Cp	C-Promotor
Cy3	Indocarbocyanin
DL	Durchlauf
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion (‚ <u>d</u> ays <u>p</u> ost <u>i</u> nfection‘)
ds cDNA	doppelsträngige/ Doppelstrang cDNA
E	früh (‚early‘)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA-D	‚early antigen D‘
EBV	Epstein-Barr Virus
EtOH	Ethanol
EV	Endvolumen
etc.	et cetera
FP	‚forward primer‘
GFP	grün fluoreszierendes Protein

gp	Glykoprotein
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	humane embryonale Nierenzelle (,h <u>u</u> man <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells')
HKG	Haushaltsgen (,h <u>u</u> se <u>k</u> eeping <u>g</u> ene')
H ₂ O	Wasser
Hyg	Hygromycin
IE	sehr früh (,immediate early')
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
L	spät (,late')
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (,l <u>y</u> mphoblastoid <u>c</u> ell <u>l</u> ine')
max.	maximal
min	Minute
mind.	mindestens
mRNA	Boten-RNA (,messenger RNA')
neg./ -	negativ
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
o/n	über Nacht
oriLyt	lytischer Replikationsursprung
oriP	plasmidaler Replikationsursprung
PBMCs	' <u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ells'
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
p.i.	nach Infektion (' <u>p</u> ost <u>i</u> nfection')
pos./ +	positiv
Qp	Q-Promotor
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
RIN	' <u>R</u> NA- <u>i</u> ntegrity- <u>n</u> umber'
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen (,rounds') pro Minute
RRE	Rta-responsives Element

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sog.	so genannt
spez.	spezial
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
T _m	Schmelztemperatur
TRE	TPA-responsives Element
Tris	Tris-Hydromethyl-Aminomehtan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W _p	W-Promotor
z.B.	zum Beispiel
ZRE	Zta-responsives Element

8. LITERATUR

- Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. and Matsumoto, K. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase can be involved in transforming growth factor beta superfamily signal transduction in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mol Cell Biol*, **19**, 2322-2329.
- Adams, A. (1987) Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. *J Virol*, **61**, 1743-1746.
- Adamson, A.L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R.A., Mauser, A., Swenson, J. and Kenney, S. (2000) Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol*, **74**, 1224-1233.
- Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Baier, B. and Bornkamm, G.W. (2002) Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 437-442.
- Altmann, M. and Hammerschmidt, W. (2005) Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol*, **3**, e404.
- Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B. and Hammerschmidt, W. (2006) Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14188-14193.
- Ambinder, R.F., Robertson, K.D. and Tao, Q. (1999) DNA methylation and the Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol*, **9**, 369-375.
- Amon, W., Binne, U.K., Bryant, H., Jenkins, P.J., Karstegl, C.E. and Farrell, P.J. (2004) Lytic cycle gene regulation of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **78**, 13460-13469.
- Amon, W. and Farrell, P.J. (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol*, **15**, 149-156.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C. and Stein, H. (1995) Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*, **85**, 744-750.
- Atfi, A., Buisine, M., Mazars, A. and Guespach, C. (1999) Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase(SAPK/JNK) signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **272**, 24731-24734.
- Axmann, A., Seidel, D., Reimann, T., Hempel, U. and Wenzel, K.W. (1998) Transforming growth factor-beta1-induced activation of the Raf-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, **249**, 456-460.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M. and Thorley-Lawson, D.A. (1998) EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, **9**, 395-404.
- Babcock, G.J. and Thorley-Lawson, D.A. (2000) Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12250-12255.
- Bauer, G., Hofler, P. and Simon, M. (1982a) Epstein-Barr virus induction by a serum factor. Characterization of the purified factor and the mechanism of its activation. *J Biol Chem*, **257**, 11411-11415.

- Bauer, G., Hofler, P. and Simon, M. (1982b) Epstein-Barr virus induction by a serum factor. Purification of a high molecular weight protein that is responsible for induction. *J Biol Chem*, **257**, 11405-11410.
- Baumann, M., Feederle, R., Kremmer, E. and Hammerschmidt, W. (1999) Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt. *Embo J*, **18**, 6095-6105.
- Ben-Bassat, H., Goldblum, N., Mitrani, S., Goldblum, T., Yoffey, J.M., Cohen, M.M., Bentwich, Z., Ramot, B., Klein, E. and Klein, G. (1977) Establishment in continuous culture of a new type of lymphocyte from a "Burkitt like" malignant lymphoma (line D.G.-75). *Int J Cancer*, **19**, 27-33.
- Ben-Sasson, S.A. and Klein, G. (1981) Activation of the Epstein-Barr virus genome by 5-aza-cytidine in latently infected human lymphoid lines. *Int J Cancer*, **28**, 131-135.
- Bernasconi, M., Berger, C., Sigrist, J.A., Bonanomi, A., Sobek, J., Niggli, F.K. and Nadal, D. (2006) Quantitative profiling of housekeeping and Epstein-Barr virus gene transcription in Burkitt lymphoma cell lines using an oligonucleotide microarray. *Virology*, **3**, 43.
- Bhende, P.M., Seaman, W.T., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C. (2004) The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet*, **36**, 1099-1104.
- Bhende, P.M., Seaman, W.T., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C. (2005) BZLF1 activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186. *J Virol*, **79**, 7338-7348.
- Bilban, M., Buehler, L.K., Head, S., Desoye, G. and Quaranta, V. (2002) Normalizing DNA microarray data. *Curr Issues Mol Biol*, **4**, 57-64.
- Binne, U.K., Amon, W. and Farrell, P.J. (2002) Promoter sequences required for reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol*, **76**, 10282-10289.
- Borza, C.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, **8**, 594-599.
- Bowtell, D.D. and Sambrook, J. (2003) *DNA Microarrays: a molecular cloning manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Boyes, J. and Bird, A. (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, **64**, 1123-1134.
- Bryant, H. and Farrell, P.J. (2002) Signal Transduction and Transcription Factor Modification during Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency. *J Virol*, **76**, 10290-10298.
- Busch, S.J. and Sassone-Corsi, P. (1990) Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet*, **6**, 36-40.
- Campbell, K.S. (1999) Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Curr Opin Immunol*, **11**, 256-264.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C. and Rajewsky, K. (2004) B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol*, **5**, 317-327.
- Cayrol, C. and Flemington, E. (1996a) G0/G1 growth arrest mediated by a region encompassing the basic leucine zipper (bZIP) domain of the Epstein-Barr virus transactivator Zta. *J Biol Chem*, **271**, 31799-31802.
- Cayrol, C. and Flemington, E.K. (1996b) The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Embo J*, **15**, 2748-2759.
- Chan, A.T., Tao, Q., Robertson, K.D., Flinn, I.W., Mann, R.B., Klencke, B., Kwan, W.H., Leung, T.W., Johnson, P.J. and Ambinder, R.F. (2004) Azacitidine

- induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors. *J Clin Oncol*, **22**, 1373-1381.
- Chang, L.K., Chung, J.Y., Hong, Y.R., Ichimura, T., Nakao, M. and Liu, S.T. (2005) Activation of Sp1-mediated transcription by Rta of Epstein-Barr virus via an interaction with MCAF1. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6528-6539.
- Chang, L.K., Lee, Y.H., Cheng, T.S., Hong, Y.R., Lu, P.J., Wang, J.J., Wang, W.H., Kuo, C.W., Li, S.S. and Liu, S.T. (2004a) Post-translational modification of Rta of Epstein-Barr virus by SUMO-1. *J Biol Chem*, **279**, 38803-38812.
- Chang, L.K. and Liu, S.T. (2000) Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Res*, **28**, 3918-3925.
- Chang, Y., Chang, S.S., Lee, H.H., Doong, S.L., Takada, K. and Tsai, C.H. (2004b) Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *J Gen Virol*, **85**, 1371-1379.
- Chang, Y., Lee, H.H., Chang, S.S., Hsu, T.Y., Wang, P.W., Chang, Y.S., Takada, K. and Tsai, C.H. (2004c) Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *J Virol*, **78**, 13028-13036.
- Chang, Y.N., Dong, D.L., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1990) The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol*, **64**, 3358-3369.
- Chen, L.W., Chang, P.J., Delecluse, H.J. and Miller, G. (2005) Marked variation in response of consensus binding elements for the Rta protein of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **79**, 9635-9650.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daille, J. and Sergeant, A. (1986) Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J*, **5**, 3243-3249.
- Chi, T. and Carey, M. (1993) The ZEBRA activation domain: modular organization and mechanism of action. *Mol Cell Biol*, **13**, 7045-7055.
- Countryman, J., Jenson, H., Seibl, R., Wolf, H. and Miller, G. (1987) Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J Virol*, **61**, 3672-3679.
- Countryman, J. and Miller, G. (1985) Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4085-4089.
- Cox, M.A., Leahy, J. and Hardwick, J.M. (1990) An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J Virol*, **64**, 313-321.
- Daibata, M., Humphreys, R.E. and Sairenji, T. (1992) Phosphorylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA. *Virology*, **188**, 916-920.
- Daibata, M., Humphreys, R.E., Takada, K. and Sairenji, T. (1990) Activation of latent EBV via anti-IgG-triggered, second messenger pathways in the Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Immunol*, **144**, 4788-4793.
- Daibata, M., Speck, S.H., Mulder, C. and Sairenji, T. (1994) Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B cells. *Virology*, **198**, 446-454.
- Darr, C.D., Mauser, A. and Kenney, S. (2001) Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 induces the lytic form of viral replication through a mechanism involving phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, **75**, 6135-6142.

- Davie, J.R. (2003) Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, **133**, 2485S-2493S.
- Day, L., Chau, C.M., Nebozhyn, M., Rennekamp, A.J., Showe, M. and Lieberman, P.M. (2007) Chromatin profiling of Epstein-Barr virus latency control region. *J Virol*, **81**, 6389-6401.
- Deegan, R.D., Bakajin, O., Dupont, T.F., Huber, G., Nagel, S.R. and Witten, T.A. (1997) Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, **389**, 827-829.
- Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W. (1998) Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8245-8250.
- Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. and Hammerschmidt, W. (1999) A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5188-5193.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J*, **17**, 3091-3100.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- di Renzo, L., Altioik, A., Klein, G. and Klein, E. (1994) Endogenous TGF-beta contributes to the induction of the EBV lytic cycle in two Burkitt lymphoma cell lines. *Int J Cancer*, **57**, 914-919.
- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M. and Hoheisel, J.D. (2001) Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res*, **29**, E38.
- Dufva, M. (2005) Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng*, **22**, 173-184.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, **21**, 10-14.
- Dunn, S.E., Chin, E.R. and Michel, R.N. (2000) Matching of calcineurin activity to upstream effectors is critical for skeletal muscle fiber growth. *J Cell Biol*, **151**, 663-672.
- Dunn, S.E., Simard, A.R., Bassel-Duby, R., Williams, R.S. and Michel, R.N. (2001) Nerve activity-dependent modulation of calcineurin signaling in adult fast and slow skeletal muscle fibers. *J Biol Chem*, **276**, 45243-45254.
- Dyson, P.J. and Farrell, P.J. (1985) Chromatin structure of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol*, **66 (Pt 9)**, 1931-1940.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M. (1964) Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703.
- Faggioni, A., Zompetta, C., Grimaldi, S., Barile, G., Frati, L. and Lazdins, J. (1986) Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *Science*, **232**, 1554-1556.
- Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P. and Joab, I. (2000) Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol*, **74**, 5810-5818.
- Fang, W.Y., Zheng, W.L., Ma, W.L., Liu, T.F., Wang, S., Xie, W.B., Li, H., Ren, C.P. and Yao, K.T. (2005) Design and preparation of Epstein-Barr virus genome-wide cDNA probes. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, **25**, 246-250.

- Farrell, P.J., Rowe, D.T., Rooney, C.M. and Kouzarides, T. (1989) Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J*, **8**, 127-132.
- Faulkner, G.C., Krajewski, A.S. and Crawford, D.H. (2000) The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol*, **8**, 185-189.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J. (2000) The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo J*, **19**, 3080-3089.
- Feederle, R., Neuhierl, B., Bannert, H., Geletneky, K., Shannon-Lowe, C. and Delecluse, H.J. (2007) Epstein-Barr virus B95.8 produced in 293 cells shows marked tropism for differentiated primary epithelial cells and reveals interindividual variation in susceptibility to viral infection. *Int J Cancer*, **121**, 588-594.
- Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1992) trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol*, **66**, 5030-5039.
- Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1995) Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol*, **69**, 2998-3006.
- Flemington, E. and Speck, S.H. (1990a) Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol*, **64**, 1227-1232.
- Flemington, E. and Speck, S.H. (1990b) Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. *J Virol*, **64**, 4549-4552.
- Flemington, E. and Speck, S.H. (1990c) Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9459-9463.
- Flemington, E. and Speck, S.H. (1990d) Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol*, **64**, 1217-1226.
- Flemington, E.K. (2001) Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments. *J Virol*, **75**, 4475-4481.
- Flemington, E.K., Borrás, A.M., Lytle, J.P. and Speck, S.H. (1992) Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. *J Virol*, **66**, 922-929.
- Flemington, E.K., Goldfeld, A.E. and Speck, S.H. (1991) Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis. *J Virol*, **65**, 7073-7077.
- Francis, A., Ragoczy, T., Gradoville, L., Heston, L., El-Guindy, A., Endo, Y. and Miller, G. (1999) Amino acid substitutions reveal distinct functions of serine 186 of the ZEBRA protein in activation of early lytic cycle genes and synergy with the Epstein-Barr virus R transactivator. *J Virol*, **73**, 4543-4551.
- Furnari, F.B., Adams, M.D. and Pagano, J.S. (1992) Regulation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase gene. *J Virol*, **66**, 2837-2845.
- Furnari, F.B., Zacny, V., Quinlivan, E.B., Kenney, S. and Pagano, J.S. (1994) RAZ, an Epstein-Barr virus transdominant repressor that modulates the viral reactivation mechanism. *J Virol*, **68**, 1827-1836.
- Giot, J.F., Mikaelian, I., Buisson, M., Manet, E., Joab, I., Nicolas, J.C. and Sergeant, A. (1991) Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1251-1258.

- Glaser, G., Vogel, M., Wolf, H. and Niller, H.H. (1998) Regulation of the Epstein-Barr viral immediate early BRLF1 promoter through a distal NF1 site. *Arch Virol*, **143**, 1967-1983.
- Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, **59**, 675-680.
- Gradoville, L., Kwa, D., El-Guindy, A. and Miller, G. (2002) Protein kinase C-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol*, **76**, 5612-5626.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Gruffat, H., Duran, N., Buisson, M., Wild, F., Buckland, R. and Sergeant, A. (1992) Characterization of an R-binding site mediating the R-induced activation of the Epstein-Barr virus BMLF1 promoter. *J Virol*, **66**, 46-52.
- Gruffat, H., Manet, E., Rigolet, A. and Sergeant, A. (1990) The enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6835-6843.
- Gruffat, H., Manet, E. and Sergeant, A. (2002) MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep*, **3**, 141-146.
- Gruffat, H. and Sergeant, A. (1994) Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1172-1178.
- Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B. and Davis, R.J. (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, **267**, 389-393.
- Gutsch, D.E., Holley-Guthrie, E.A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M.A., Baldwin, A.S. and Kenney, S.C. (1994a) The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, **14**, 1939-1948.
- Gutsch, D.E., Marcu, K.B. and Kenney, S.C. (1994b) The Epstein-Barr virus BRLF1 gene product transactivates the murine and human c-myc promoters. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **40**, 747-760.
- Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3720-3724.
- Halstead, J., Kemp, K. and Iqnotz, R.A. (1995) Evidence for involvement of phosphatidylcholine-phospholipase C and protein kinase C in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **270**, 13600-13603.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1988) Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, **55**, 427-433.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of E. coli. In Glover, D. (ed.), *DNA cloning. A practical approach*. IRL Press, Oxford, Vol. 1, pp. 109-135.
- Hannigan, M., Zhan, L., Ai, Y. and Huang, C.K. (1998) The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*, **246**, 55-58.
- Heldin, C.H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**, 465-471.

- Hicks, M.R., Al-Mehairi, S.S. and Sinclair, A.J. (2003) The zipper region of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta is necessary but not sufficient to direct DNA binding. *J Virol*, **77**, 8173-8177.
- Hicks, M.R., Balesaria, S., Medina-Palazon, C., Pandya, M.J., Woolfson, D.N. and Sinclair, A.J. (2001) Biophysical analysis of natural variants of the multimerization region of Epstein-Barr virus lytic-switch protein BZLF1. *J Virol*, **75**, 5381-5384.
- Hocevar, B.A., Brown, T.L. and Howe, P.H. (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J*, **18**, 1345-1356.
- Holley-Guthrie, E.A., Quinlivan, E.B., Mar, E.C. and Kenney, S. (1990) The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol*, **64**, 3753-3759.
- Hsu, T.Y., Chang, Y., Wang, P.W., Liu, M.Y., Chen, M.R., Chen, J.Y. and Tsai, C.H. (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus can be triggered by an Rta protein mutated at the nuclear localization signal. *J Gen Virol*, **86**, 317-322.
- Inman, G.J. and Allday, M.J. (2000) Apoptosis induced by TGF-beta 1 in Burkitt's lymphoma cells is caspase 8 dependent but is death receptor independent. *J Immunol*, **165**, 2500-2510.
- Jenkins, P.J., Binne, U.K. and Farrell, P.J. (2000) Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol*, **74**, 710-720.
- Kallin, B., Luka, J. and Klein, G. (1979) Immunochemical characterization of Epstein-Barr virus-associated early and late antigens in n-butyrate-treated P3HR-1 cells. *J Virol*, **32**, 710-716.
- Karajannis, M.A., Hummel, M., Anagnostopoulos, I. and Stein, H. (1997) Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood*, **89**, 2856-2862.
- Kass, S.U., Landsberger, N. and Wolffe, A.P. (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol*, **7**, 157-165.
- Kato, Y., Zhao, M., Morikawa, A., Sugiyama, T., Chakravorty, D., Koide, N., Yoshida, T., Tapping, R.I., Yang, Y., Yokochi, T. and Lee, J.D. (2000) Big mitogen-activated kinase regulates multiple members of the MEF2 protein family. *J Biol Chem*, **275**, 18534-18540.
- Katz, D.A., Baumann, R.P., Sun, R., Kolman, J.L., Taylor, N. and Miller, G. (1992) Viral proteins associated with the Epstein-Barr virus transactivator, ZEBRA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 378-382.
- Kenney, S.C., Holley-Guthrie, E., Quinlivan, E.B., Gutsch, D., Zhang, Q., Bender, T., Giot, J.F. and Sergeant, A. (1992) The cellular oncogene c-myc can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells. *Mol Cell Biol*, **12**, 136-146.
- Kieff, E. and Rickinson, A. (2001) Epstein-Barr virus and its replication. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2511-2573.
- Kintner, C. and Sugden, B. (1981) Conservation and progressive methylation of Epstein-Barr viral DNA sequences in transformed cells. *J Virol*, **38**, 305-316.
- Kirchmaier, A.L. and Sugden, B. (1995) Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **69**, 1280-1283.

- Kouzarides, T., Packham, G., Cook, A. and Farrell, P.J. (1991) The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene*, **6**, 195-204.
- Kouzarides, T. and Ziff, E. (1989) Behind the Fos and Jun leucine zipper. *Cancer Cells*, **1**, 71-76.
- Kraus, R.J., Mirocha, S.J., Stephany, H.M., Puchalski, J.R. and Mertz, J.E. (2001) Identification of a novel element involved in regulation of the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **75**, 867-877.
- Kraus, R.J., Perrigoue, J.G. and Mertz, J.E. (2003) ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **77**, 199-207.
- Kudo, S. (1998) Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol*, **18**, 5492-5499.
- Kurosaki, T. (1999) Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, **17**, 555-592.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J. and Woodgett, J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, **369**, 156-160.
- Laichalk, L.L., Hochberg, D., Babcock, G.J., Freeman, R.B. and Thorley-Lawson, D.A. (2002) The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity*, **16**, 745-754.
- Laichalk, L.L. and Thorley-Lawson, D.A. (2005) Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*, **79**, 1296-1307.
- Lau, R., Packham, G. and Farrell, P.J. (1992) Differential splicing of Epstein-Barr virus immediate-early RNA. *J Virol*, **66**, 6233-6236.
- Lee, D.K., Suh, D., Edenberg, H.J. and Hur, M.W. (2002) POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J Biol Chem*, **277**, 26761-26768.
- Li, M., Linseman, D.A., Allen, M.P., Meintzer, M.K., Wang, X., Laessig, T., Wierman, M.E. and Heidenreich, K.A. (2001) Myocyte enhancer factor 2A and 2D undergo phosphorylation and caspase-mediated degradation during apoptosis of rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci*, **21**, 6544-6552.
- Liang, C.L., Chen, J.L., Hsu, Y.P., Ou, J.T. and Chang, Y.S. (2002) Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J Biol Chem*, **277**, 23345-23357.
- Lieberman, P.M., Hardwick, J.M., Sample, J., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1990) The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J Virol*, **64**, 1143-1155.
- Liu, C., Sista, N.D. and Pagano, J.S. (1996) Activation of the Epstein-Barr virus DNA polymerase promoter by the BRLF1 immediate-early protein is mediated through USF and E2F. *J Virol*, **70**, 2545-2555.
- Liu, P., Liu, S. and Speck, S.H. (1998) Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *J Virol*, **72**, 8230-8239.
- Liu, P. and Speck, S.H. (2003) Synergistic autoactivation of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter by Rta and Zta. *Virology*, **310**, 199-206.

- Liu, S., Borrás, A.M., Liu, P., Suske, G. and Speck, S.H. (1997a) Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the Z1 domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *Virology*, **228**, 11-18.
- Liu, S., Liu, P., Borrás, A., Chatila, T. and Speck, S.H. (1997b) Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member. *Embo J*, **16**, 143-153.
- Lu, C.C., Jeng, Y.Y., Tsai, C.H., Liu, M.Y., Yeh, S.W., Hsu, T.Y. and Chen, M.R. (2006) Genome-wide transcription program and expression of the Rta responsive gene of Epstein-Barr virus. *Virology*, **345**, 358-372.
- Lu, J., McKinsey, T.A., Nicol, R.L. and Olson, E.N. (2000a) Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4070-4075.
- Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L. and Olson, E.N. (2000b) Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell*, **6**, 233-244.
- Luka, J., Kallin, B. and Klein, G. (1979) Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology*, **94**, 228-231.
- MacCallum, P., Karimi, L. and Nicholson, L.J. (1999) Definition of the transcription factors which bind the differentiation responsive element of the Epstein-Barr virus BZLF1 Z promoter in human epithelial cells. *J Gen Virol*, **80 (Pt 6)**, 1501-1512.
- Manet, E., Allera, C., Gruffat, H., Mikaelian, I., Rigolet, A. and Sergeant, A. (1993) The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region. *Gene Expr*, **3**, 49-59.
- Manet, E., Gruffat, H., Trescol-Biemont, M.C., Moreno, N., Chambard, P., Giot, J.F. and Sergeant, A. (1989) Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *Embo J*, **8**, 1819-1826.
- Manet, E., Rigolet, A., Gruffat, H., Giot, J.F. and Sergeant, A. (1991) Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Res*, **19**, 2661-2667.
- Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Philipsen, S. (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*, **89**, 619-628.
- Massague, J. and Weis-Garcia, F. (1996) Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals. *Cancer Surv*, **27**, 41-64.
- Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., Burkhardt, A.L., Bolen, J.B. and Longnecker, R. (1994a) Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in sIg-mediated signal transduction. *Infect Agents Dis*, **3**, 128-136.
- Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E. and Longnecker, R. (1994b) An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 772-776.
- Miller, C.L., Longnecker, R. and Kieff, E. (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *J Virol*, **67**, 3087-3094.
- Miller, G., El-Guindy, A., Countryman, J., Ye, J. and Gradoville, L. (2007) Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses(1). *Adv Cancer Res*, **97**, 81-109.

- Miller, G. and Lipman, M. (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70**, 190-194.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D. and Lipman, M. (1972) Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 383-387.
- Minarovits, J., Minarovits-Kormuta, S., Ehlin-Henriksson, B., Falk, K., Klein, G. and Ernberg, I. (1991) Host cell phenotype-dependent methylation patterns of Epstein-Barr virus DNA. *J Gen Virol*, **72 (Pt 7)**, 1591-1599.
- Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J. and Kouzarides, T. (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *Embo J*, **18**, 5099-5107.
- Miyashita, E.M., Yang, B., Lam, K.M., Crawford, D.H. and Thorley-Lawson, D.A. (1995) A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell*, **80**, 593-601.
- Montalvo, E.A., Cottam, M., Hill, S. and Wang, Y.J. (1995) YY1 binds to and regulates cis-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol*, **69**, 4158-4165.
- Montalvo, E.A., Shi, Y., Shenk, T.E. and Levine, A.J. (1991) Negative regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **65**, 3647-3655.
- Morrison, T.E. and Kenney, S.C. (2004) BZLF1, an Epstein-Barr virus immediate-early protein, induces p65 nuclear translocation while inhibiting p65 transcriptional function. *Virology*, **328**, 219-232.
- Morrison, T.E., Mauser, A., Klingelhutz, A. and Kenney, S.C. (2004) Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J Virol*, **78**, 544-549.
- Morrison, T.E., Mauser, A., Wong, A., Ting, J.P. and Kenney, S.C. (2001) Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity*, **15**, 787-799.
- Nan, X., Campoy, F.J. and Bird, A. (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, **88**, 471-481.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, **393**, 386-389.
- Nemerow, G.R., Mold, C., Schwend, V.K., Tollefson, V. and Cooper, N.R. (1987) Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*, **61**, 1416-1420.
- Neuhierl, B., Feederle, R., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J. (2002) Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15036-15041.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H. and Young, L.S. (1997) Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol*, **182**, 151-159.
- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**, 693-698.
- Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A. and Sample, J. (1996) Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J Virol*, **70**, 623-627.

- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247-257.
- Ornatsky, O.I. and McDermott, J.C. (1996) MEF2 protein expression, DNA binding specificity and complex composition, and transcriptional activity in muscle and non-muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 24927-24933.
- Packham, G., Economou, A., Rooney, C.M., Rowe, D.T. and Farrell, P.J. (1990) Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J Virol*, **64**, 2110-2116.
- Park, J.H., Jeon, J.P., Shim, S.M., Nam, H.Y., Kim, J.W., Han, B.G. and Lee, S. (2007) Wp specific methylation of highly proliferated LCLs. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 513-520.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J.B. and Muller, C.W. (2006) Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell*, **21**, 565-572.
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R.D. and Roberts, R.J. (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*, **274**, 33002-33010.
- Prang, N., Wolf, H. and Schwarzmann, F. (1995) Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *J Virol*, **69**, 2644-2648.
- Quinlivan, E.B., Holley-Guthrie, E.A., Norris, M., Gutsch, D., Bachenheimer, S.L. and Kenney, S.C. (1993) Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1999-2007.
- Ragoczy, T., Heston, L. and Miller, G. (1998) The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J Virol*, **72**, 7978-7984.
- Ragoczy, T. and Miller, G. (1999) Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes. *J Virol*, **73**, 9858-9866.
- Ragoczy, T. and Miller, G. (2001) Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites. *J Virol*, **75**, 5240-5251.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J. and Davis, R.J. (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, **270**, 7420-7426.
- Reh fuss, R.P., Walton, K.M., Loriaux, M.M. and Goodman, R.H. (1991) The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem*, **266**, 18431-18434.
- Rickinson, A. and Kieff, E. (2001) Epstein-Barr virus. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2575-2627.
- Rickman, D.S., Herbert, C.J. and Aggerbeck, L.P. (2003) Optimizing spotting solutions for increased reproducibility of cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, **31**, e109.
- Robertson, K.D., Manns, A., Swinnen, L.J., Zong, J.C., Gulley, M.L. and Ambinder, R.F. (1996) CpG methylation of the major Epstein-Barr virus latency promoter in Burkitt's lymphoma and Hodgkin's disease. *Blood*, **88**, 3129-3136.

- Rodriguez, A., Armstrong, M., Dwyer, D. and Flemington, E. (1999) Genetic dissection of cell growth arrest functions mediated by the Epstein-Barr virus lytic gene product, Zta. *J Virol*, **73**, 9029-9038.
- Rooney, C., Taylor, N., Countryman, J., Jenson, H., Kolman, J. and Miller, G. (1988) Genome rearrangements activate the Epstein-Barr virus gene whose product disrupts latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9801-9805.
- Ruf, I.K. and Rawlins, D.R. (1995) Identification and characterization of ZIIBC, a complex formed by cellular factors and the ZII site of the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol*, **69**, 7648-7657.
- Saemundsen, A.K., Kallin, B. and Klein, G. (1980) Effect of n-butyrate on cellular and viral DNA synthesis in cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Virology*, **107**, 557-561.
- Saltis, J. and Bobik, A. (1996) Regulation by protein kinase C of transforming growth factor-beta 1 action on the proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **23**, 573-575.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schaefer, B.C., Strominger, J.L. and Speck, S.H. (1995) Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10565-10569.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schepers, A., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1993) A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *Embo J*, **12**, 3921-3929.
- Schepers, A., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (1996) Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology*, **220**, 367-376.
- Schwarzmann, F., Prang, N., Reichelt, B., Rinkes, B., Haist, S., Marschall, M. and Wolf, H. (1994) Negatively cis-acting elements in the distal part of the promoter of Epstein-Barr virus trans-activator gene BZLF1. *J Gen Virol*, **75 (Pt 8)**, 1999-2006.
- Shaw, J.E., Levinger, L.F. and Carter, C.W., Jr. (1979) Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *J Virol*, **29**, 657-665.
- Shimizu, N., Sakuma, S., Ono, Y. and Takada, K. (1989) Identification of an enhancer-type sequence that is responsive to Z and R trans-activators of Epstein-Barr virus. *Virology*, **172**, 655-658.
- Shimizu, N. and Takada, K. (1993) Analysis of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus: identification of an anti-immunoglobulin response sequence. *J Virol*, **67**, 3240-3245.
- Siegfried, Z., Eden, S., Mendelsohn, M., Feng, X., Tsuberi, B.Z. and Cedar, H. (1999) DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet*, **22**, 203-206.
- Sinclair, A.J. (2003) bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J Gen Virol*, **84**, 1941-1949.
- Sinclair, A.J., Brimmell, M., Shanahan, F. and Farrell, P.J. (1991) Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol*, **65**, 2237-2244.
- Sinclair, A.J. and Farrell, P.J. (1995) Host cell requirements for efficient infection of quiescent primary B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol*, **69**, 5461-5468.

- Sista, N.D., Pagano, J.S., Liao, W. and Kenney, S. (1993) Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3894-3898.
- Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. and Pagano, J.S. (1984) Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*, **310**, 1225-1230.
- Sixbey, J.W., Vesterinen, E.H., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Walton, L.A. and Pagano, J.S. (1983) Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature*, **306**, 480-483.
- Speck, S.H., Chatila, T. and Flemington, E. (1997) Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol*, **5**, 399-405.
- Sugden, B. (1984) Expression of virus-associated functions in cells transformed in vitro by Epstein-Barr virus: Epstein-Barr virus cell surface antigen and virus-release from transformed cells. In Purtilo, D.T. (ed.), *Immune Deficiency and Cancer*, pp. 165-177.
- Sugden, B., Phelps, M. and Domoradzki, J. (1979) Epstein-Barr virus DNA is amplified in transformed lymphocytes. *J Virol*, **31**, 590-595.
- Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene*, **238**, 291-300.
- Suzuki, M., Asplund, T., Yamashita, H., Heldin, C.H. and Heldin, P. (1995) Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta 1 involves activation of protein kinase C. *Biochem J*, **307 (Pt 3)**, 817-821.
- Swenson, J.J., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S.C. (2001) Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 interacts with CBP, promoting enhanced BRLF1 transactivation. *J Virol*, **75**, 6228-6234.
- Swenson, J.J., Mauser, A.E., Kaufmann, W.K. and Kenney, S.C. (1999) The Epstein-Barr virus protein BRLF1 activates S phase entry through E2F1 induction. *J Virol*, **73**, 6540-6550.
- Takada, K. (1984) Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*, **33**, 27-32.
- Takada, K. and Ono, Y. (1989) Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol*, **63**, 445-449.
- Takada, K., Shimizu, N., Sakuma, S. and Ono, Y. (1986) trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment. *J Virol*, **57**, 1016-1022.
- Tamir, I. and Cambier, J.C. (1998) Antigen receptor signaling: integration of protein tyrosine kinase functions. *Oncogene*, **17**, 1353-1364.
- Tao, Q., Srivastava, G., Chan, A.C., Chung, L.P., Loke, S.L. and Ho, F.C. (1995) Evidence for lytic infection by Epstein-Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J Med Virol*, **45**, 71-77.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. and Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, **75**, 291-295.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001) Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, **1**, 75-82.
- Thorley-Lawson, D.A. and Gross, A. (2004) Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med*, **350**, 1328-1337.
- Tierney, R.J., Kirby, H.E., Nagra, J.K., Desmond, J., Bell, A.I. and Rickinson, A.B. (2000) Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus

- latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation. *J Virol*, **74**, 10468-10479.
- Tierney, R.J., Steven, N., Young, L.S. and Rickinson, A.B. (1994) Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol*, **68**, 7374-7385.
- Tsubata, T. and Wienands, J. (2001) B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol*, **20**, 675-678.
- Tsurumi, T. (2001) EBV replication enzymes. *Curr Top Microbiol Immunol*, **258**, 65-87.
- Tsurumi, T., Fujita, M. and Kudoh, A. (2005) Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*, **15**, 3-15.
- Uriet, G., Buisson, M., Chambard, P. and Sergeant, A. (1989) The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. *Embo J*, **8**, 1447-1453.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. and Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J*, **14**, 1798-1811.
- Wang, W., Zhou, G., Hu, M.C., Yao, Z. and Tan, T.H. (1997a) Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J Biol Chem*, **272**, 22771-22775.
- Wang, Y.C., Huang, J.M. and Montalvo, E.A. (1997b) Characterization of proteins binding to the ZII element in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter: transactivation by ATF1. *Virology*, **227**, 323-330.
- Watt, F. and Molloy, P.L. (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*, **2**, 1136-1143.
- Welsh, J.B., Sapinoso, L.M., Su, A.I., Kern, S.G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C.A., Frierson, H.F., Jr. and Hampton, G.M. (2001) Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*, **61**, 5974-5978.
- Wen, W., Iwakiri, D., Yamamoto, K., Maruo, S., Kanda, T. and Takada, K. (2007) Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J Virol*, **81**, 1037-1042.
- Woisetschlaeger, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L. and Speck, S.H. (1990) Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1725-1729.
- Wrobel, G., Schlingemann, J., Hummerich, L., Kramer, H., Lichter, P. and Hahn, M. (2003) Optimization of high-density cDNA-microarray protocols by 'design of experiments'. *Nucleic Acids Res*, **31**, e67.
- Wu, F.Y., Chen, H., Wang, S.E., ApRhys, C.M., Liao, G., Fujimuro, M., Farrell, C.J., Huang, J., Hayward, S.D. and Hayward, G.S. (2003) CCAAT/enhancer binding protein alpha interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol*, **77**, 1481-1500.
- Wu, F.Y., Wang, S.E., Chen, H., Wang, L., Hayward, S.D. and Hayward, G.S. (2004) CCAAT/enhancer binding protein alpha binds to the Epstein-Barr virus (EBV) ZTA protein through oligomeric interactions and contributes to cooperative

- transcriptional activation of the ZTA promoter through direct binding to the ZII and ZIIIB motifs during induction of the EBV lytic cycle. *J Virol*, **78**, 4847-4865.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, **270**, 2008-2011.
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3806-3810.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, **313**, 812-815.
- Youn, H.D., Chatila, T.A. and Liu, J.O. (2000) Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *Embo J*, **19**, 4323-4331.
- Youn, H.D. and Liu, J.O. (2000) Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity*, **13**, 85-94.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, **4**, 757-768.
- Yuan, J., Cahir-McFarland, E., Zhao, B. and Kieff, E. (2006) Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol*, **80**, 2548-2565.
- Zalani, S., Coppage, A., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S. (1997) The cellular YY1 transcription factor binds a cis-acting, negatively regulating element in the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter. *J Virol*, **71**, 3268-3274.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S. (1995) The Zif268 cellular transcription factor activates expression of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter. *J Virol*, **69**, 3816-3823.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S. (1996) Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9194-9199.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E.A., Gutsch, D.E. and Kenney, S.C. (1992) The Epstein-Barr virus immediate-early promoter BRLF1 can be activated by the cellular Sp1 transcription factor. *J Virol*, **66**, 7282-7292.
- Zammatteo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L. and Remacle, J. (2000) Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem*, **280**, 143-150.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S. and Hammerschmidt, W. (1997) Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood*, **90**, 2390-2397.
- Zhang, Q., Gutsch, D. and Kenney, S. (1994) Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol*, **14**, 1929-1938.
- Zhang, Y., Ohyashiki, J.H., Takaku, T., Shimizu, N. and Ohyashiki, K. (2006) Transcriptional profiling of Epstein-Barr virus (EBV) genes and host cellular genes in nasal NK/T-cell lymphoma and chronic active EBV infection. *Br J Cancer*, **94**, 599-608.
- zur Hausen, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K. and Hecker, E. (1978) Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature*, **272**, 373-375.

**Epigenetik von Epstein-Barr Virus:
Regulation viraler Gene in der frühen Phase
der Infektion**

Anhang

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Markus Kalla

München, Oktober 2007

Anhang

Tab. A: Auflistung aller verwendeten Primer für den EBV-Microarray

Auf Basis des B95.8-Genoms wurden dachziegelartig überlappende PCR-Produkte generiert. Die bei der PCR verwendeten Primer sind im Folgenden aufgelistet. Angegeben ist die Benennung und die Größe des PCR-Produkts, die entsprechenden Nukleotidkoordinaten im B95.8-Genom mit dem zuzuordnenden EBV-Gen, die Primersequenz und die primerspezifischen Eigenschaften. PCR-Fragmente, die in den pCR2.1-Vektor kloniert worden sind, finden sich in Tabelle B.

Produktname	Gen bzw. Lokus	Nukleotidkoordinaten (B95.8 Sequenz)	Produktgröße (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
AA	BNLF2a/ b	18..608	591	ATTCACCCTACTTTTCTTCTTGC	24	52.2	37.5
				CGCCACAAACAGTCAAACG	19	52.3	52.6
AB	BNLF2a/ b	544..1075	532	GGTGATGCTTGTGCTCCTGATAC	23	55.2	52.2
				GATCTTGCTCAGTGGACATGAAG	23	53.0	47.8
AC	BNLF2a/ b	1009..1626	618	TGGCATCTCTTTTACAGTGGTTC	23	52.7	43.5
				GCAGTAGTAGCAGCAGTAGCGG	22	53.9	59.1
AD	BNRF1	1603..2195	593	TGCCGCTACTGCTGCTACTAC	21	52.7	57.1
				CAAACCTGCCTGCCCATCTC	19	52.9	57.9
AF	BNRF1	2536..3132	597	TCATAGTTTGGAGCACGGATTC	22	53.4	45.5
				AACAGCAGACCCCTTTG	19	53.8	57.9
AG	BNRF1	3109..3731	623	AGTTCCAAAGGGGGTCTG	19	52.7	57.9
				CCTGACTGTGGGCAACGAAG	20	55.4	60.0
AH	BNRF1	3604..4161	558	CGTGGGAAGCAAGGAGCAC	19	55.5	63.2
				CCTGGGGCGGAGACAGAGG	19	59.1	73.7
AI	BNRF1	4111..4698	588	CTCGTCCGCTCCAACCTC	19	54.5	63.2
				GCAAAGGATGACCAGGTTCC	20	53.3	55.0
AK	BNRF1	4592..5198	607	CGAGTGGGCGAGCAAGGTC	19	57.9	68.4
				CAGGGGCGGGTGGATTATC	19	56.3	63.2
AL	BNRF1	4947..5555	609	GCGAGGTTAGGGACAACACG	20	54.5	60.0
				GGTCACACAGGAGAGCCAGATG	22	55.9	59.1
AM	BNRF1	5528..6127	600	GGTCGTCATCTGGCTCTCCTG	21	56.0	61.9
				CCCTCACCTCATCTCTCCTCG	21	55.0	61.9
AO	EBER1/ 2	6509..7133	625	GGGAAATGAGGGTTAGCATAGG	22	53.6	50.0
				CACAAAAAATAGCGGACAAGC	22	53.5	40.9
AP	EBER1/ 2	6921..7421	501	CAGCATGTATAGATTACGGTTTCG	24	52.8	45.8
				CAGTAGTAGAGTGGGAGTGCTATCC	25	52.5	52.0
AR	OriP	8034..8615	582	GCAACATTAGCCCACCGTG	19	53.7	57.9
				GACAAGCCGTAAAGACTGGATG	22	53.1	50.0
AS	OriP	8498..9025	528	GTCTTGGTCCCTGCCTGG	18	52.4	66.7
				GGTTAGTAAAGGGTCTAAGGAAC	25	52.4	44.0

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
AT	OriP	8927..9449	523	GGTTCACTACCCTCGTGGAATC	22	54.0	54.5
				CACGGGGGGGGACCAAAC	18	59.3	72.2
AU	BCRF1	9415..10012	598	TCAGAGAACCCCTTTGTGTTTG	22	53.3	45.5
				CGTAGGGTCTTTAGATTTTCACCC	24	54.4	45.8
AW	BCRF1	9990..10636	647	GGTGAAAATCTAAAGACCCTACGG	24	54.4	45.8
				CCACACTTGTCCTTGTGTCAG	21	54.2	57.1
AX		10615..11264	650	GCTGACAAGGGGACAAGTGTG	21	54.4	57.1
				AAGGGCTACATTTTCAAGTCG	22	52.2	40.9
AY	Cp promoter	11048..11647	600	TTATCTGGGAGGAGCGACG	19	52.6	57.9
				GCAGGAGGCTGTTTCTTCAGTC	22	54.6	54.5
AZ	Cp promoter	11459..11958	500	AACCCACAAATCATCTAAACCG	22	52.5	40.9
				TTTGGGGCAAAGAATTACATAC	23	52.2	34.8
BC	BCRF2	12703..13211	509	TCAGGGGCAGCAGGCTCAC	19	58.4	68.4
				CCACTCGGGTCTCGGTGGG	19	59.7	73.7
BD	BCRF2	13080..13610	531	GCTTCAGAGCCCAGGATGTC	20	53.6	60.0
				GTGGGGAGGGGTGGACGAG	19	58.6	73.7
BE	BCRF2	13560..14157	598	TCCCACGCCCGTCCACGGC	19	67.7	78.9
				CCAACCATAGACCCGCTTCC	20	55.7	60.0
BF		14125..14698	574	CCTAAAACCCCGGAAGC	19	52.7	57.9
				GAGACGGGTGGGTGTGTGTAG	21	54.1	61.9
BK	BWRF1	46872..47401	530	GCTTCAGAGCCCAGGATGTC	20	53.6	60.0
				TGGGGAGGGGTGGACGAG	18	57.7	72.2
BLn	BWRF1	47172..47816	645	CCACCCGAGCCCCCTCAGC	19	63.4	78.9
				GCTAAAAATGAAAAAGCACTTACCC	25	54.2	36.0
BM		47631..48258	628	CCCAGCCCCCTCTCGCCC	19	66.6	84.2
				TTACATAGCACTAACACAAGCCAAC	25	52.5	40.0
BP	BYRF1	49024..49672	649	CGACAGCACCCACCATTTTG	20	56.1	55.0
				CCGAGGACTGGACTTAGTTCAG	22	52.3	54.5
BR	BYRF1	49932..50555	624	GGACCCAGTAAAAGACCTCGC	21	54.3	57.1
				ATGGAATGCTCAGACCCCG	19	54.6	57.9
BXn	OriLyt	52500..53095	596	GGCAGTGAGGGAGGGGCGTG	20	63.4	75.0
				GCTCCACCCACTAGGTATATCG	22	52.2	54.5
BZ		53523..54110	588	GCCTGTGCCTTGTCCCGTG	19	58.5	68.4
				AGAAATAACCCACCGCAAAC	21	52.6	42.9
CA	BHRF1	54078..54669	592	GGTCTGTGCTGTTTTGCG	20	52.9	55.0
				AAGGCTTGGGTCTCCACGG	19	56.2	63.2

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
CC	BHRF1	54737..55312	576	CTCCTTACTATGTTGTGGACCTGTC	25	52.9	48.0
				ACGAAGAGCGTGAAGCACC	19	52.7	57.9
CD	BHRF1	55293..55889	597	CGGTGCTTCACGCTCTTCG	19	56.7	63.2
				CTTGGGGGCAGGCTACAAC	19	54.4	63.2
CE	BFLF2	55794..56344	551	GCTTAGCAGCCTCCAAGTTTTAC	23	53.6	47.8
				CAACCCAGCCTTCTCTACGC	20	53.9	60.0
CF	BFLF2	56210..56798	589	CTCTGGGATGTGAAGGGAGG	20	53.3	60.0
				CAGGTGTGGAAAATCTCGCTC	21	53.8	52.4
CG	BFLF2/ BFLF1	56750..57395	646	GCCAACCCTTTCCATTCTTC	20	52.7	50.0
				GAGCCTGATTCTTGACTCGTTC	22	52.2	50.0
CH	BFLF1	57361..57990	630	TGATGTTGTGCCGAACGAG	20	54.4	50.0
				GCTTCCTCCCTGTGTCTCTTC	22	55.7	59.1
CI	BFLF1	57847..58456	610	AAGTGGGGGTGGTTCTGGG	19	55.7	63.2
				CTCACGAGGAGTGGCGTAAC	20	52.2	60.0
CK	BFLF1	58361..58971	611	GCTTTTCAGATTGTCCACGG	20	52.1	50.0
				TTCCAGAGACCCAGATCACAC	22	53.0	54.5
CL	BFRF1	58647..59269	623	GGGGCAGTCTTTTGAGTTTC	21	54.3	52.4
				CCAGCATAATGATGGAGTTCTTTG	24	54.6	41.7
CN	BFRF1/ BFRF2	59696..60266	571	TGAGGCACCCATCCGCAG	19	61.3	68.4
				CCGCACAACCAAAAAATAAGC	21	54.1	42.9
CQ	BFRF2/ BFRF3	61424..62046	623	GCCTCACCTGTTCTCCTCTG	21	55.1	61.9
				TCGTGCCCTCTACTGTTTCTTAC	23	52.2	47.8
CR	BFRF3	61951..62550	600	TCCGCCGCCGAGCCGTCG	19	72.7	84.2
				GTCCCCAACATACACCGTG	20	52.4	55.0
CS	BPLF1	62355..62874	520	CACAGTAATGTTGTCTGGTCGC	22	52.2	50.0
				CGCACACCCAGTTGGTG	18	55.2	66.7
CTn	BPLF1	62768..63330	563	GGCACCCACCGCTTTAATTG	20	56.7	55.0
				TGTCTCCACACTCTACACCATCG	23	54.0	52.2
CU	BPLF1	63259..63896	638	CCAACCCTGGAATCTGGATG	20	54.0	55.0
				CAACCCCTCTTCTACGAGC	20	52.9	60.0
CW	BPLF1	63774..64406	633	ACCAGTCCGTGCCCCACCC	19	61.3	73.7
				CCTGAGAAATCTTATGCCTTATGG	24	53.2	41.7
CX	BPLF1	64331..64904	574	GGAGACGGGGATGGTGTCAC	20	56.2	65.0
				AGCGAGAGATGGGGTTTG	19	53.9	57.9

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
CZ	BPLF1	65381..66010	630	GTTGTGGTAGACGGGGATGTAG	22	52.7	54.5
				CTAACACGGCTCCTGGAAGTC	21	53.0	57.1
DC	BPLF1	66458..67044	587	GTCCCGCTCTCGCCTTGTC	19	56.9	68.4
				TCCTTGCCGCTATGCTATTG	20	53.1	50.0
DD	BPLF1	67004..67612	609	CCTCCTCACCTCGTTATTCC	21	54.1	57.1
				GGTCTACTGGCGGTCTATGATG	22	52.9	54.5
DE	BPLF1	67477..68084	608	GGTAACTTAGGAAGCGTTTCTTGAG	25	54.2	44.0
				CTCTCCCTCTGCGACACCC	19	54.3	68.4
DF	BPLF1	67856..68453	598	GGTGTAGAAGGTGATGGATTTTCAG	24	53.5	45.8
				CCCAAGCCTCCCAACAGTG	19	55.1	63.2
DG	BPLF1	68422..69011	590	CGTCAAATCCATCACTGTTGG	22	54.4	45.5
				GGGAAGAGCGGGAGAGTTC	19	52.6	63.2
DH	BPLF1	68985..69561	577	TGCTTATGGAActCTCCCGC	20	54.3	55.0
				TCGTCCGCTACCTGTCTGAC	20	52.5	60.0
DI	BPLF1	69541..70146	606	GGTCAGACAGGTAGCGGACG	20	54.5	65.0
				GCCTTCCCCCTCCAGTAATC	20	54.0	60.0
DK	BPLF1	70125..70745	621	GGGATTACTGGAGGGGGAAG	20	53.8	60.0
				CAACGGCAGCGGCTTTGAC	19	58.9	63.2
DL	BPLF1	70717..71354	638	GCCCCACCAGGTCAAAGCC	19	58.8	68.4
				CATCCAGTGCCTCAGCAAC	19	52.1	57.9
DP	BOLF1	72972..73574	603	GAGGAGTGAAAAGAGGGAGGTG	22	53.5	54.5
				GAGCAGGGAAGAAGGCAGTG	20	53.9	60.0
DR	BOLF1	73922..74483	562	GCAGCAGTCGGAAAAAGTGC	20	54.9	55.0
				GGCGGGGAGAGGGTGAAG	19	60.2	73.7
DS	BOLF1	74452..75070	619	CCACCACCGCTTTCTTCAC	19	52.8	57.9
				TCTTTGGACTGGGGGATTTG	20	53.8	50.0
DU	BORF1	75382..75915	534	GCCTCCTCGCTGAGTGCG	18	56.7	72.2
				GGGCACCGTCACCTTGAC	18	53.2	66.7
DW	BORF1	75773..76363	591	GCCGCTTCCACAActTCATC	20	54.5	55.0
				CCCCTCCTCCTCTGTTTC	19	52.3	63.2
DX	BORF1/ BORF2	76305..76900	596	CGTCTCTGACTGGGAGGTGATTC	23	56.5	56.5
				TGGGAGGTTAGGTGCTCAAAG	21	53.4	52.4
DY	BORF2	76792..77426	635	CAACCACCTGCCTCTACGC	19	53.0	63.2
				ACAAAActTGCCCGCTGTC	19	52.6	52.6

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
DZ	BORF2	77369..77947	579	CTACGGGGAGGAGTTTGAGC	20	52.9	60.0
				GAGCGAGAGGGGAGGGTCAG	19	53.5	68.4
EA	BORF2	77693..78276	584	GGGGGATGAACTCCTGCTG	19	54.1	63.2
				CCTCCTTGTGGTGACCTTGG	21	55.7	57.1
EB	BORF2	78247..78881	635	ATGCGTCCACCAAGGTCAC	19	52.8	57.9
				GCAAGATTCACAGGCTCGTTC	21	53.9	52.4
EC	BORF2/ BaRF1	78839..79400	562	GTTGGAGACTGACGGTTTTACTG	23	52.3	47.8
				CAGGGCTATGCTGTAGAAGGAG	22	52.6	54.5
ED	BaRF1/ BMRF1	79337..79921	585	GATTCTTGTGTTCTGCTGATTG	23	53.1	43.5
				CGGAGAGTCTGAGTGGTTTCC	21	52.7	57.1
EF	BMRF1	80110..80640	531	GGCAGAATCACCAGAGCCC	19	54.2	63.2
				GCGAGTCCGCTGCTACCG	18	56.7	72.2
EG	BMRF1	80355..80992	638	AGCGACAGGCTGAGGAACG	19	55.2	63.2
				CTGGAGTGGCTGGGAATGG	19	55.1	63.2
EH	BMRF1/ BMRF2	80961..81542	582	ACACCCTCGCCTGCCATTC	19	57.1	63.2
				GCCAAGAGCAACCCAAGTTC	20	53.7	55.0
EI	BMRF2	81439..82056	618	GCCAACCTGCCTCTTATGC	21	55.4	57.1
				CGCTACCCCGCTAAAGTAATAG	22	52.3	50.0
EK	BMRF2	81870..82502	633	CTTTCTCTGTGGGGCGATG	19	52.9	57.9
				AATGAGGAACGGTGATTAGGC	21	52.4	47.6
EL	BMLF1	82443..82946	504	TCAGTTATCACCGTACCATGAGTG	24	53.3	45.8
				AGACGGAGACACGATGAAGTTG	22	53.3	50.0
EM	BMLF1	82923..83532	610	TTCAACTTCATCGTGTCTCCG	21	52.6	47.6
				GCCTGTCTCCAAGATTACATTTG	23	52.3	43.5
EN	BMLF1	83499..84057	559	GGGCAAGGTGACAAATGTAATC	22	52.7	45.5
				GGAGGGCAGCGAAGAACAC	19	54.5	63.2
EO	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1	83934..84499	566	CGAGGTAGGGTTATGACCAC	21	52.5	57.1
				TCCAAGAATGTGAGGGTGTTTC	22	53.1	45.5
EP	BSLF1	84387..85010	624	TGGGCGGTCGGTTGATTGG	19	61.0	63.2
				TTTTGACAGCGGCGTGTATC	20	53.7	50.0
ER	BSLF1	85314..85958	645	CGGCACAGGTCATAGATTTCC	21	53.6	52.4
				CAGGGGCTTTGCGGAGCAC	19	60.1	68.4
ES	BSLF1	85661..86303	643	TTCTTGGGATTCCACTGG	19	52.0	52.6
				GCTATTTACTTCCGAGTCTGGTCAG	25	54.7	48.0

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
ET	BSLF1	86280..86848	569	TGACCAGACTCGGAAGTAAATAGC	24	53.6	45.8
				GCCTCAAACACTGACATTGCG	21	55.6	52.4
EU	BSLF1/ BSRF1	86764..87380	617	GGCACAACAAAACAGGCG	19	54.0	52.6
				CCACCTTCTCCATCTCCATCAG	22	54.9	54.5
EW	BSRF1	87114..87637	524	GCTCACTGAGACAGGTTTATTTGC	24	54.0	45.8
				CACCTTCATATCCCTTGTTTTACC	24	52.9	41.7
EY	BLLF3	87957..88562	606	CCCGACCTGCCAAAGATTG	19	55.2	57.9
				TTAGGACCTCCCCATTTTCG	20	53.1	50.0
EZ	BLLF3/ BLRF1	88445..89091	647	GGCGTAGCGTATGTGTGGAC	20	52.9	60.0
				GGAGCAGAAGGAACAGAGGTAGAC	24	54.4	54.2
FA	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2	89027..89641	615	GCTCTGAAGCAACAGGTCCTC	21	53.0	57.1
				CGGTTACCACAGCCCAAGC	19	55.3	63.2
FB	BLLF1a-b/ BLLF2	89517..90150	634	GACCAGCAGCAGCAGAAGG	19	53.2	63.2
				ACCCAGTTCAAACCCAGAGAC	21	52.0	52.4
FD	BLLF1a-b	90456..91051	596	GGTTGGGGTAGTCACTGCTGAG	22	55.1	59.1
				TCACCTCGGGGACACCTTC	19	54.4	63.2
FF	BLLF1a-b	91544..92053	510	CGAGCATTCTGTTTTTACGCTG	23	55.8	43.5
				CATTTTACCCACATGCAATG	21	52.9	42.9
FG	BLLF1a-b/ BLRF3	91971..92536	566	AAGTTGATGCTTTTTGCCCC	20	53.4	45.0
				TGAAACCTGCGGAGAATG	19	53.3	52.6
FK	BERF1	93399..93994	596	ACGGAGAGCGATGGAGATG	19	52.3	57.9
				CGAACTGGCTTGGGGTAAAC	20	53.7	55.0
FL	BERF1	93705..94215	511	CCATTACATGAACAACACGGC	21	52.8	47.6
				GCTGAGGGGATACTTGGGTC	20	52.4	60.0
FN	BERF1	94269..94890	622	TTTAGCCAGGTTGCTGATGTG	21	52.9	47.6
				GCTCGGAGGTATCGGACCC	19	55.6	68.4
FO	BERF1	94629..95161	533	GCACCCGCAGCCCATTTTC	18	58.5	66.7
				GCCTCATCTGGAGGATCTTGATAG	23	53.7	52.2
FP	BERF1/ BERF2a	94982..95562	581	CGAGGTTCTTGATTTGTCAATCC	23	54.4	43.5
				TGCAGCGGCATCTAAATTCTC	21	54.6	47.6
FQ	BERF2a/ BERF2b	95371..96019	649	AGCAGAGCACAGCAAGCCG	19	56.5	63.2
				CATTGTCCCCCCTGACTC	19	53.7	63.2
FR	BERF2b	95997..96548	552	TTTTGAGTCAGGGGGGAC	19	53.5	57.9
				TCCTCCTCGTCGCTTTCAG	19	52.7	57.9

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
FS	BERF2b	96322..96907	586	GAATGGTCCGCCAGTGC	18	53.5	61.1
				CGTGAAGTAGAACTGCTGTCACTTG	25	55.0	48.0
FT	BERF2b	96834..97398	565	ACTGAGTGTCCAGGCTCGG	19	52.2	63.2
				TTGAGGTGTCTGATGGGGAG	20	52.0	55.0
FW	BERF2b	97704..98254	551	AAGGGCTCCTGCTGGTCAG	19	54.1	63.2
				GGCGAAATCACTCATCGTTC	20	52.0	50.0
FX	BERF2b/ BERF3	98186..98749	564	TGGGGCTGGGGGACATTGC	19	62.2	68.4
				CAGTTAGAGGCATACTCACCTTGAC	25	53.2	48.0
FY	BERF3/ 4	98719..99316	598	CGGGCTGTCAAGGTGAGTATG	21	54.5	57.1
				ATGAAACGCACGAAATCTAAAAG	23	52.4	34.8
GA	BERF3/ 4	99902..100529	628	GGTCCAGTCAAGCCTACGC	20	53.8	60.0
				ACCAGCATCCATCACCGAG	19	52.9	57.9
GB	BERF3/ 4	100410..100910	501	CGTGAAATTACACAAATGCAACAAG	25	55.5	36.0
				CTGGGTGTGCCCATGCAC	18	55.1	66.7
GG	BZLF1	102474..102996	523	GGAAGCCACCCGATTCTTG	19	54.3	57.9
				GAGCCTCTGCCACAAGGC	18	52.9	66.7
GH	BZLF1/ BRLF1	102938..103571	634	GACCCAGTCGGAGCGGTTG	19	57.6	68.4
				AGATGGACCTGAGCCACCC	19	53.5	63.2
GI	BRLF1	103474..104034	561	CAGGGGGGAGTCCAGATTC	19	53.0	63.2
				ATAGCAGCGGTCCACCAAG	19	52.5	57.9
GK	BRLF1	103851..104402	552	GCTGACACACCTCTCGCCC	19	55.3	68.4
				CAGTGGAACTCCTATCCTCGTG	23	54.4	52.2
GN	BRRF1	105511..106158	648	GACGAATCGGGACCTGGGG	19	58.6	68.4
				GGACACAACACCTCACTACACAAAC	25	54.2	48.0
GO	BRRF1/ BRRF2	106013..106604	592	GTCACGGATGCCATTACCC	19	52.3	57.9
				AATAACACCAGACATAAGTTGTGG	25	53.2	40.0
GP	BRRF2	106481..107041	561	TTCTTCCCTGTTTGCTTTATGG	22	52.9	40.9
				GCAGACATCCAATGACCACTGAG	23	55.9	52.2
GQ	BRRF2	106913..107488	576	CGATGCTGTTTTCGCACGC	19	57.5	57.9
				GTTTCTCAGGCTTGCTAAG	21	52.6	52.4
GU	BKRF1	108982..109449	468	CGGGGTCGAGGAGGTAGTG	19	54.2	68.4
				TTCGTCCGTAGTCCTTTCTACG	22	52.9	50.0
GW	BKRF1	109354..109952	599	CGTGGTCAAGGAGGTTCCAAC	21	55.7	57.1
				CTACTGGGGATTATTCTTTAGTGC	25	52.0	40.0
GX	BKRF2/ BKRF3	109927..110522	596	CGCACTAAAGAATAAATCCCCAG	23	54.0	43.5
				CGTCCGACACAGGCAATAAC	20	52.9	55.0

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
GY	BKRF3	110498..111109	612	CTGCCGTTATTGCCTGTGTC	20	53.1	55.0
				AATCTATCTCACCGAGCCCC	20	52.2	55.0
GZ	BKRF3/ BKRF4	111079..111704	626	TTGCGTGAGAAGGGGCTCG	19	58.4	63.2
				TTGAAGGTGGAGGGGGGCG	19	61.5	68.4
HB	BBLF4	112222..112830	609	CCTGAGGCTGCTGCTTTCC	19	54.8	63.2
				GCACCTTCGGGGACTTTATG	20	53.6	55.0
HE	BBLF4	113529..114117	589	GAGCCACGCAGACGATGC	19	58.8	68.4
				CGTTCTCCCCGAGTTTGAC	20	55.8	60.0
HF	BBLF4/ BBRF1	114065..114636	572	AAAGGGCAGGAAGGGGGGC	19	60.9	68.4
				TCCAGTCCACATAACGCTCATAG	23	53.5	47.8
HIn	BBRF1	115516..116093	578	GCAGCACCGCCTCCGCAATC	20	64.4	70.0
				TTGTAGAACTCAGGGACGTTGG	22	53.4	50.0
HK	BBRF1/ BBRF2	115819..116327	509	TGACAGATGTCTACGCCACCC	21	54.7	57.1
				GGGCTCTTGGCATTCTCAATC	21	55.1	52.4
HL	BBRF2/ BBLF3	116273..116848	576	TGAACCTTATGGAGATGTGCG	21	52.6	47.6
				GCTACACCATTCCTATGGAAATCAC	25	54.9	44.0
HN	BBLF2	117422..117958	537	GGTCCCCCACCATCATT	19	53.5	57.9
				GGCTCGCTGCTCCTACAAC	19	52.4	63.2
HO	BBLF2	117938..118567	630	TTGTTGTAGGAGCAGCGAGC	20	53.1	55.0
				TCCGAGATGGAGGGGGAAC	19	55.9	63.2
HP	BBLF2	118530..119047	518	TGAGCATGGGGGCATGTC	18	54.6	61.1
				TCTCAAACAATGATGGAAACACC	23	53.1	39.1
HR	BBRF3	119333..119943	611	TGACCCCCACGCTCTATCTG	20	54.8	60.0
				GTTGTGCCGCAGGAAGGAG	19	55.5	63.2
HS	BBRF3	119925..120491	567	CTCCTTCTGCGGCACAAC	19	55.5	63.2
				CTCCCCTCTCCATTCCAG	19	53.2	63.2
HT	BBLF1/ BGLF5	120468..121049	582	TGGGGCTGGGAATGGAGAG	19	57.0	63.2
				TGTCATCCGTAAGACCTTGAGC	22	53.4	50.0
HU	BGLF5	121003..121544	542	ACGCTTCCAGGAGCCAG	18	52.6	61.1
				TCGTCTACCGTGGAGTACG	20	52.5	60.0
HW	BGLF5	121471..122102	632	CCTCATCTGCGTCAACAGATAG	23	55.4	52.2
				CGGTCCCTCCCTGAAATCC	19	55.5	63.2
HY	BGLF4	122499..123071	573	ATCCACGCACGGACTCTCG	19	55.7	63.2
				GTTTACTTTCTGAATCGGCACTG	23	52.6	43.5
HZ	BGLF4	122960..123558	599	CAGTCAGGACCAGCCTACCC	20	53.4	65.0
				GTTGAGTGTCTCCCCAGAACC	21	52.4	57.1

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
IA	BGLF4/ BGLF3	123536..124161	626	GGGGTTCTGGGGAGACACTC	20	54.5	65.0
				TGTGCCTTTTGTGCTTGCTAC	21	53.1	47.6
IB	BGLF3	124127..124729	603	TAGGTTTTGTTTATGTAGCAAGCAC	25	52.0	36.0
				GCCGAGGATGACTATGACTTCTC	23	53.6	52.2
ID	BDRF1/ BGRF1	125226..125834	609	CAGGTCCAGATGTGCCTACTACC	23	54.3	56.5
				GATTTTCCCACTGTGCCTAAAC	22	52.2	45.5
IE	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2	125777..126387	611	GCGTGTAGAGGTCAACAAGGAG	22	53.1	54.5
				CGGGGTGGTGCCTGGTATG	19	58.1	68.4
IF	BGLF2	126251..126841	591	CCGTTATCACATCTGGTTAGCAG	23	53.2	47.8
				GCTTCGCAAGTTCCTCAACAAG	22	55.7	50.0
IG	BGLF2/ BGLF1	126795..127358	564	CATCGCTCAGCACCCAGAG	19	53.9	63.2
				TCGCTTCCTCATTTAGTGG	20	52.7	50.0
IH	BGLF1	127338..127961	624	GCCACTGAAATGAGGAAGCG	20	54.7	55.0
				GGTCCAGGAGTCTGCTGCG	19	55.4	68.4
II	BGLF1/ BDLF4	127937..128569	633	CATAGCCGCAGCAGACTCC	19	53.2	63.2
				GGTTTCCTTTGTGTTCCCTTG	21	52.7	47.6
IK	BDLF4	128533..129095	563	AAACAGCATCAGGCAGCAAG	20	53.0	50.0
				CTCTTTGAGCAGGAGGTCTCTG	22	52.5	54.5
IL	BDRF1	128909..129538	630	TCAGGTAACGGGAGATGGAAC	21	53.0	52.4
				GGTGGTTGCTCGGATGTTG	19	53.5	57.9
IM	BDRF1	129381..129956	576	TGAAGGATGCTCAGGAGCG	19	53.6	57.9
				GACTGCTGTTGCCCTCCAC	19	52.7	63.2
IN	BDRF1	129824..130377	554	TTCTTCTCAAGGACCTAACAGG	23	53.4	47.8
				CAAGGGACTGGTGTAGTCAATAAAG	25	53.2	44.0
IP	BDLF3/ BDLF2	130878..131429	552	CGTGGTCAAGGTCGTAGACTG	21	52.2	57.1
				CAGAGGGTCTGGCGAGTG	19	55.3	68.4
IS	BDLF2/ BDLF1	131910..132502	593	GCATACCTCGCTCTTCATCCAG	22	55.4	54.5
				GACCTACCTACAGTCTTTGGCATC	24	53.0	50.0
IT	BDLF1	132274..132897	624	ACTTCCACCCTCTCCCCGC	19	57.5	68.4
				GTGCTGCCTACGCCCATAG	19	53.2	63.2
IU	BDLF1	132752..133309	558	TGGTGCCCCAGGTATGAAAC	20	54.5	55.0
				AAAGATGGATTTGAAAGTGGTAGTG	25	52.7	36.0
IW	BcLF1	133267..133833	567	CAGACGAGAGGAGAGAGACTACC	25	54.5	56.0
				TGTGAAAACATAATCAGGAGGTTG	25	54.2	40.0

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
IX	BcLF1	133808..134451	644	GCAACCTCCTGATTGTAGTTTTAC	25	55.1	44.0
				GCCGAATGTCTTCCTTCCC	19	53.4	57.9
IY	BcLF1	134343..134893	551	CCCCTGGGTGGATCTTGAG	19	53.9	63.2
				CAATTTGGAGAATGGGACGC	20	54.3	50.0
IZ	BcLF1	134685..135186	502	GCCCGTTCACCAAAACAGTC	20	54.3	55.0
				CAGTTTATTGAGAGGGTTGGAAAC	24	53.0	41.7
KA	BcLF1	134904..135480	577	CCTCGTCCCTGGTAAAATGG	20	53.4	55.0
				ATCAAGTTCATCTGCCGCC	19	52.4	52.6
KB	BcLF1	135336..135886	551	CGCTCTCATCCCCACAAC	19	55.0	63.2
				AGACTTCCTCCACCCGTCC	19	52.6	63.2
KC	BcLF1	135611..136199	589	AAGAAGGCTGGATAGGCAGTG	21	52.7	52.4
				CCATCAAAATGCTGGACAACC	21	54.3	47.6
KD	BcLF1	136081..136641	561	GGGGTGACAGAGAACCCTTGAGAG	23	55.7	56.5
				GTGGGGGGGGTGTATTG	19	53.7	57.9
KE	BcLF1	136626..137222	597	TAAACACCCCCCACTGG	19	56.6	63.2
				TCAAAGACCTGAGTCGTATGACG	23	53.5	47.8
KF	BcLF1	137158..137799	642	AGCAATGGTGGGGACGGAG	19	56.9	63.2
				TCAGGGTGGGCAGAGGACC	19	56.9	68.4
KG	BcLF1/ BcRF1	137648..138212	565	CGTCGGCTTCTACTCGGCG	19	58.1	68.4
				AAATGGGTCTGCGGAGAG	19	53.9	57.9
KH	BcRF1	138025..138625	601	CCCCCTGTCCGCCCTCAG	19	61.1	73.7
				TCCTCGTCTCGCTCTTGG	19	52.7	57.9
KI	BcRF1	138433..138965	533	CCGTGGGGCACCAGGAGC	18	60.8	77.8
				CAGGAAGCACCGCAGTGAC	19	53.8	63.2
KK	BcRF1	138868..139433	566	TTACGGACGGGTGGGGGC	19	63.3	73.7
				TCGGTTTTGGAGTGGGCG	19	58.1	57.9
KL	BcRF1/ BTRF1	139281..139891	611	CGGAGTCAGATCAAGTGCTG	21	52.3	52.4
				TGGGTAGGCTCTCACGGAC	19	52.2	63.2
KO	BXL2	141050..141664	615	TGGTCAGCAGCAGATAGTGAAC	22	52.0	50.0
				AGATTGGGGAGGTTTTGCG	19	53.9	52.6
KP	BXL2	141599..142194	596	GGTAGCACGGTGAGAAGAGCC	21	55.3	61.9
				GGAAGTGGACACGGAAACG	19	52.6	57.9
KQ	BXL2	142104..142676	573	GCCATTGCCAGTCTCACCC	19	55.0	63.2
				ATGCTTAGTGCCCCCTTG	19	54.0	57.9

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
KS	BXL2/ BXL1	142962..143483	522	CAGCTTAACCTCGCTGAGGC	20	54.3	60.0
				GCTACCTGAAGAGTGTCAACGATG	24	54.7	50.0
KT	BXL1	143410..143979	570	GGGGGCAAAATACTGTGTTAGG	22	54.3	50.0
				GTGGGAAAGACTACTATGCTGAATC	25	52.4	44.0
KW	BXL1/ BXR1	144485..144987	503	GGGGCAGTAGGCTTTTGG	18	52.1	61.1
				AGAGAGAGCAGCTTGGAGTAACAC	24	53.0	50.0
KX	BXR1	144783..145408	626	TTTTCAGGGGACTCATCC	20	53.3	55.0
				GCGGGAGAGGAGGTTTAGC	19	52.9	63.2
KY	BXR1/ BVR1	145173..145679	507	CGCAAAGCGTTACTCGCAAG	20	56.2	55.0
				CAGGTCCTGGCGGATCTC	18	52.5	66.7
KZ	BVR1	145435..146053	619	TCTTGATAGACCCCGCCCG	19	57.1	63.2
				AGCACCGCCACCACTTCTG	19	55.8	63.2
LA	BVR1	145992..146572	581	GGCAACCTGAACTTTACCAACTC	23	53.7	47.8
				CAGAGCGTGTAGACGAGCATC	21	52.5	57.1
LB	BVR1	146389..146896	508	CGGGACTACTGCCACGAC	19	55.2	68.4
				AGGGTGTCAAACTTTTGTCCG	21	53.2	47.6
LC	BVR1	146625..147233	609	CTGCTCCCCAGGCAATGC	19	60.0	68.4
				CCTTACTCCCTACCCGAAAC	21	53.4	57.1
LG	BVR2/ BdRF1	148838..149402	565	GAGGCAGACCCCGCTACCC	19	58.1	73.7
				GCTTTGATGAGGCTGAAATCC	21	53.0	47.6
LI	BILF2 (a,b,c,d)	149949..150501	553	GGGTCACTGGCTTATGCGTG	20	55.3	60.0
				TGCTGCTGTGTGGGGTCTG	19	55.1	63.2
LK	BILF2 (a,b,c,d)	150385..150935	551	CGACTCATTGCTAGGAACGC	20	52.5	55.0
				GCCACCTGAGGAACAACCTTTG	21	53.7	52.4
LL		150857..151462	606	CTGACACGATTGAGTAGAAAGGG	23	52.4	47.8
				GTGGCACTGAGGCAAGTAGC	20	52.3	60.0
LO	BILF1	152351..152909	559	TCACCCAGGAAGAGCAGCG	19	56.0	63.2
				TGGTTCACCGAATGGATGTC	20	52.8	50.0
LR	BALF5	153621..154180	560	TGCTCTCGCCGCTCTCTTC	19	55.6	63.2
				CCAGCCTCCTCTCCACCG	19	59.1	73.7
LS	BALF5	153878..154485	608	TTCTCGCCCCCTTCACTCC	19	56.3	63.2
				GGACACGGACTCGCTGTTTATC	22	55.2	54.5
LU	ECRF4/ BALF5	154990..155571	582	GCAAAGTCCACCACCAGAACC	21	55.7	57.1
				CAGGCACATCTACAGCATCAAC	22	52.3	50.0
LW	ECRF4/ BALF5	155503..156130	628	CTGACCTCGCAGACGCCCC	19	60.1	73.7
				CCCTCTCCCATCCCAACAG	19	53.9	63.2

Produkt- name	Gen bzw. Lokus	Nukleotid- koordinaten (B95.8 Sequenz)	Produkt- größe (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
LX	ECRF4/ BALF5	156108..156696	589	CACACTGTTGGGATGGGAGAG	21	54.1	57.1
				TCTGAAAAAGCCTGACAAGGAG	22	53.0	45.5
MA	BALF4	157492..158108	617	AGTGGTGGTAGTCGTTGTAGACG	23	52.6	52.2
				ACCCCCAGCAGTCCATCG	19	59.2	68.4
MB	BALF4	158073..158645	573	GCGGATGGGGCTGGGGGCG	19	70.0	84.2
				CGGGCAGACTGTGGAAATGTC	21	56.7	57.1
MD	BALF4/ BALF3	159085..159714	630	CCTCCGTGTGATTCTCCCG	19	55.1	63.2
				CCTGGCTCGCTGCTGTGAC	19	56.6	68.4
MG	BARF0/ BALF3	160322..160893	572	AGACCCCGCCGCAGAAGAG	19	58.9	68.4
				AAGTCCCATCCAGACCCG	19	55.8	63.2
MI	BALF3/ BALF2	161209..161764	556	AAACGGGGAAGGAGGATGG	19	55.1	57.9
				TCACAAAAACAGGAGGAAGACTG	23	52.7	43.5
MK	BALF3/ BALF2	161575..162190	616	CCTCCGCCGTCCACTCTATC	20	55.9	65.0
				GTGCCCGCCCGTACTACC	19	59.8	73.7
MM	BALF2	162475..163057	583	GGGTCTTGTGGTAGGTGTTGAG	22	52.6	54.5
				GCCGAAGTGGTCCAGTTTATG	21	53.7	52.4
MN	BALF2	163035..163624	590	TTCATAAACTGGACCACTTCGG	22	53.3	45.5
				TGCTTCTCGGGCTGGGGTG	19	60.5	68.4
MO	BALF2/ BALF1	164480..165038	559	ATGGGCATTGTGGAACACG	19	53.8	52.6
				GGTGCGAAACTACCTGGATG	20	52.0	55.0
MP	BALF1/ BARF1	165015..165620	606	TGGTCATCCAGGTAGTTTCGC	21	54.0	52.4
				GCTCACCTCCTCCAGTAGG	20	52.6	65.0
MQ	BARF1	1655701..66137	568	GCTTTCTGGGTGAGCGAGTC	21	55.4	57.1
				CGTGGGCTTCCTCCTTGTC	19	54.3	63.2
MR	BARF1	166112..166676	565	GAAAAATGACAAGGAGGAAGCC	22	53.7	45.5
				CCAGAAGAGCCAGAAGCAGATG	22	55.6	54.5
MS	BNLF2b	166628..167231	604	ACGATGGCGGAAACAACCTC	19	52.3	52.6
				TCCAAAAGGTCAAAGAACAAGG	22	52.7	40.9
MT	BNLF2b/ BNLF2a	167113..167741	629	CGGACGCCTCCTCCCAACG	19	62.2	73.7
				GCTTCCATCTTGTGCCAATAC	22	53.1	45.5
MU	BNLF1	167695..168344	650	TGTGGCTTGGGCTGAATCC	19	55.6	57.9
				AGGTTGAAAACAAAGGAGGTGAC	23	53.2	43.5
MW	BNLF1	168318..168938	621	CCTGGTCACCTCCTTTGTTTTTC	22	54.2	50.0
				AGATGCTCTGGCGACTTGG	19	52.6	57.9
MX	BNLF1	168850..169477	628	AGCAATAATGAGCAGGATGAGG	22	52.7	45.5
				AGGATGGAACACGACCTTGAG	21	53.0	52.4

Tab. B: Auflistung der klonierten subgenomischen EBV Produkte

78 PCR-Produkte wurden in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen) molekular kloniert. Angegeben ist der Klon- und Plasmidname, die entsprechenden Nukleotidkoordinaten im B95.8-Genom, die Produktgröße des klonierten PCR-Fragments und das dem PCR-Produkt zuzuordnende EBV-Gen bzw. der Locus im EBV-Genom.

Klonname	Plasmid	Gen bzw. Locus	Nukleotidkoordinaten (B95.8 Sequenz)	Produktgröße (nt)
AE.3	p3487	BNRF1	2076..2666	591
AN.4	p3488	EBER1	6011..6640	630
AQ.6	p3475		7350..8096	747
BAn.4	p3476	BCRF2	1969..2554	586
BBn2.2	p3477	BCRF2	12330..12856 etc.	527*
BG.1	p3528		14667..15255	589
BN.5	p3489		48200..48838	639
BO.3	p3529	BYRF1	48557..49178	622
BQ.8	p3530	BYRF1	49395..49958	564
BSTUn2.9	p3478	BHLF1	50268..52199	576*
BW.5	p3892	BHLF1	52056..52622	567
BY1n.1	p3490		52905..53469	565
BY2n.7	p3479		53286..53800	515
CB.3	p3491	BHRF1	54220..54826	607
CM.7	p3893	BFRF1	59246..59808	563
CO/o.5	p3492	BFRF2	60251..60868	618
CP.4	p3493	BFRF2	60848..61482	635
CY.13	p3531	BPLF1	64885..65484	600
DA.11	p3547	BPLF1	65885..66444	560
DB.1	p3532	BPLF1	66208..66729	522
DM.1	p3548	BPLF1/ BOLF1	71320..71936	617
DN.3	p3494	BOLF1	71877..72516	640
DO.1	p3480	BOLF1	72416..73030	615
DQ.14	p3533	BOLF1	73551..74118	568
DTn.4	p3495	BORF1	74959..75525	567

Klonname	Plasmid	Gen bzw. Locus	Nukleotidkoordinaten (B95.8 Sequenz)	Produktgröße (nt)
EE.1	p3534	BaRF1/ BMRF1	79659..80217	559
EQ.1	p3496	BSLF1	84789..85351	563
EX.3	p3497	BSRF1/ BLLF3	87474..87976	503
FC.13	p3549	BLLF1a-b	90114..90666	553
FE.4	p3498	BLLF1a-b	90976..91625	650
FH.1	p3535	BLRF3/ BERF1	92335..92909	575
FI.3	p3547	BERF1	92846..93425	580
FM.3	p3536	BERF1	93960..94459	500
FU.3	p3537	BERF2b	97306..97932	627
FZ.4	p3538	BERF3	99287..99929	643
GCn.2	p3481	BERF3	100643..101220	578
GD.3	p3894	BZLF2	101158..101740	583
GE.5	p3895	BZLF2	101590..102197	608
GF.2	p3539	BZLF1	102115..102684	570
GL.1	p3540	BRLF1	104377..104999	623
GM.6	p3896	BRLF1/ BRRF1	104973..105538	566
GR.11	p3482	BRRF2/ BKRF1	107429..108138	710
GSTn3.6	p3483	BKRF1	107886..109100	521*
HA.7	p3501	BKRF4/ BBLF4	111684..112312	629
HC.3	p3502	BBLF4	112567..113197	631
HD.3	p3503	BBLF4	113104..113721	618
HG.1	p3504	BBRF1	114612..115237	626
HH.2	p3505	BBRF1	115025..115531	507
HM.6	p3897	BBLF3	116825..117442	618
HQ.7	p3898	BBLF2/ BBRF3	118932..119569	638
HX.4	p3506	BGLF5/ BGLF4	122065..122673	609
IC.5	p3507	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1	124664..125289	626
IO.5	p3899	BDLF3	130313..130903	591

Klonname	Plasmid	Gen bzw. Locus	Nukleotidkoordinaten (B95.8 Sequenz)	Produktgröße (nt)
IQ.1	p3900	BDLF2	131311..131928	618
IRn.7	p3508	BDLF2	131738..132252	515
KM.7	p3509	BTRF1	139816..140442	627
KN.7	p3901	BTRF1/ BXLF2	140421..141070	650
KR.9	p3510	BXLF2	142476..143095	620
KU.13	p3511	BXLF1	143944..144528	585
LD.15	p3512		147197..147755	559
LE.17	p3513	BVRF2	147712..148320	609
LF.19	p3514	BVRF2/ BdRF1	148281..148921	641
LH.3	p3542	BVRF2/ BdRF1/ BILF2	149382..149970	589
LM.2	p3543		151310..151928	619
LN.6	p3484		151788..152398	611
LP.3	p3902	BILF1	152887..153455	569
LQ.5	p3544	BALF5	153222..153777	556
LT.5	p3515	BALF5	154431..155010	580
LY.17	p3516	BALF5/ BALF4	156576..157190	615
LZ.26	p3517	BALF4	157148..157796	649
MC.7	p3545	BALF4	158624..159187	564
ME.27	p3518	BARF0/ BALF3	159516..160015	500
MF.6	p3519	BARF0/ BALF3	159818..160397	580
MH.23	p3520	BARF0/ BALF3	160706..161282	577
ML.27	p3521	BALF2	162134..162724	591
MY.2	p3522	BNLF1	169454..170101	648
MZ.1	p3485		169917..170495	579
TO.9	p3486		171981..221	542

Die mit einem Stern markierten Produktgrößen resultieren durch eine Amplifikation der PCR-Fragmente aus Plasmiden, die nur einen Teil des B95.8-Genoms enthalten:

-
- Das BBn2 Fragment ist Teil des BamHI -W- Wiederholungen, es wurde aus dem Plasmid p56.2 als Template amplifiziert.
 - Das BSTUn2 Fragment ist Teil der EBNA-1-Wiederholungen, es wurde aus dem Plasmid p523 als Template amplifiziert.
 - Das GSTn3 Fragment ist Teil der NotI-Wiederholungen, es wurde aus dem Plasmid p2657.19 als Template amplifiziert.

Für die Amplifikation aller subgenomischen EBV Produkte aus dem pCR2.1-Vektor wurden folgende Primer verwendet:

pCRFP2: 5'- CTCGGATCCACTAGTAACGGC -3'

pCRBP2: 5'- CGCCAGTGTGATGGATATCTG -3'

Diese Primer binden sequenzspezifisch im pCR2.1-Vektor und flankieren das klonierte PCR-Fragment. Das PCR-Produkt ist im Vergleich zum EBV-PCR-Fragment 90nt länger und umfasst Sequenzabschnitte aus dem pCR2.1-Plasmid.

Tab. C: Auflistung der im Microarray verwendeten Haushaltsgene (HKGs)

Liste der im EBV-Microarray als Kontrolle verwendeten zellulären HKGs (28 Stck.). Angegeben ist das im Microarray verwendete Kürzel, der Genname, die genspezifische 'Accession-Number', die Produktgröße des PCR-Fragments, die Primersequenzen und die primerspezifischen Eigenschaften.

Kürzel	Gen-Name Accession-Nr.	Produktgröße (nt)	FP-Sequenz (5' - 3') BP-Sequenz (5' - 3')	nt	Tm (°C)	GC (%)
ACTB	Beta-actin	545	TCCATCGTCCACCGCAAATG	20	58.8	55.0
	NM_001101		GGGAGACCAAAGCCTTCATAC	22	53.5	50.0
ALAS1	Aminolevulinate, delta-, synthase 1	611	CCTGGCAGCACAGATGAATC	20	52.9	55.0
	NM_000688		CAAAGCACGAGGAAAACAAG	20	50.2	45.0
ALDOA	Aldolase A, fructose-bisphosphate	584	TCCTTCCCCCAAGTTATC	19	50.4	52.6
	NM_000034		TGGCATTGAGGTTGATGGAC	20	53.0	50.0
ARHGDI	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	536	AGGATGAGCACTCGGTCAAC	20	51.4	55.0
	NM_004309		GATGGTGAGATTCCACTCCC	20	50.4	55.0
ATPase	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G isoform 1 (ATP6V1G1)	684	GCCCGCAAAAGAAAGAACC	19	53.8	52.6
	NM_004888		CCCTGACCTCAAGAAAGTGTAG	24	53.2	45.8
B2M	Beta-2-microglobulin	529	CAAAGATTGAGTTTACTCACG	23	52.5	43.5
	NM_004048		CCTCTAAGTTGCCAGCCCTC	20	53.1	60.0
CYC1	Cytochrome c-1	545	ATACCCCAACAGTGAGGCTG	20	51.4	55.0
	NM_001916		CAGATGAAGAGAGGCTTAGC	21	50.2	52.4
CYPA	Cyclophilin A/ Alias: Paptidyl isomerase A (PPIA)	585	CTTCATCCTAAAGCATAACGGG	21	50.9	47.6
	NM_021130		AACATTGACACTTCTGGGAC	21	50.4	47.6
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	555	GTCCGTGATGAGAAGTCAAG	21	51.1	52.4
	NM_000402		CAGTGGGGTGAATAACGC	19	50.3	52.6
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	626	AACTTTGGTATCGTGAAGGAC	22	51.6	45.5
	NM_002046		AACTGTGAGGAGGGGAGATTC	21	51.2	52.4
HPFT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	525	CTGGAGTCCTATTGACATCGC	21	51.3	52.4
	NM_000194		GGGAAGTCTGACAAAGATTC	21	50.5	47.6
HSP90	Heat shock 90kDa protein 1, beta (HSPCB)	697	GAATCCACGAAGACTCCACTAAC	23	51.3	47.8
	NM_007355		TCCTCAAGGGAAAAGCCAG	19	51.7	52.6
LDHA	Lactate dehydrogenase A	583	AAAGGCTACACATCCTGGGC	20	53.2	55.0
	NM_005566		CACACGGTAAACATCCACCTG	21	52.7	52.4
MAP4	Microtubule-associated protein 4, transcript variant 1	620	CTTCCCTTATGCCCTGACTG	20	51.3	55.0
	NM_002375		CTTTTCTTCTGCTGACAAAAC	22	52.5	45.5
NONO	Non-POU domain containing, octamer-binding	580	GTCGCCGATACTAATAAGTTGC	22	50.5	45.5
	NM_007363		GGGGAGTGAAGATAAGAAGC	22	50.7	50.0
PABPC1	Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	590	GTTTTGTATGTTTCTCCTCCCC	22	51.2	45.5
	NM_002568		CATTGTAAGTGTGGCTGTGC	21	50.8	47.6
PABPN1	Poly(A) binding protein, nuclear 1	583	CGTTCATCTATGTTGGCAATG	22	54.5	45.5
	NM_004643		CCCTCCTCAGCAGTTAGTTATG	22	50.2	50.0
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	537	GGGATGTCTATGCAATGATGC	22	51.0	45.5
	NM_000291		TCCACACAATCTGCTTAGCC	20	50.2	50.0
POLR2A	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa/ Alias: RNA polymerase II	559	TTTGAGGAAACGGTGGACG	19	53.2	52.6
	NM_000937		TGGGGGAATAAGAGGGACTC	20	52.0	55.0
RPL13A	Ribosomal protein L13a	541	AAAAAGCGGATGTTGGTTC	19	51.5	47.4
	NM_012423		GCCCTCCAATCAGTCTTCTG	20	51.1	55.0
RPL32	Ribosomal protein L32	540	GTGAAGAAAATGAGTAGGCAGC	22	50.3	45.5
	NM_000994		TGGTGGATTACCTGGAAGAG	21	50.2	52.4
RPLP0	Ribosomal Protein, large, P0	560	TCTGGAGAAACTGCTGCCTC	20	51.9	55.0
	NM_001002		GTGGGAAGGTGTAATCCGTC	20	50.7	55.0
SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	566	CGAAAGTTTATGGAGCGATAC	22	52.5	45.5
	NM_004168		CGAAAGTTTATGGAGCGATAC	22	52.5	45.5
TBP	TATA box binding protein	654	GGATAAGAGAGCCACGAACC	20	50.4	55.0
	NM_003194		CCAGATAGCAGCACGGTATG	20	50.8	55.0
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71)	623	GCTACTTGGACTATTCAGGGAGC	23	53.2	52.2
	NM_003234		CCATTTCCAGACCTCATTGGC	20	51.9	50.0
TUBA	Alpha Tubulin, ubiquitous (K-ALPHA-1)	530	TTTGATGGAGCCCTGAATG	19	50.7	47.4
	NM_006082		TCTGAAAACCTCGCTTCTC	20	51.1	50.0
TUBB	Beta tubulin, polypeptide	640	TGAAACCTACTCCATTGATAACG	23	50.6	39.1
	NM_001069		CTCGGTGAACTCCATCTCG	19	50.1	57.9
YMHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide/ Alias: Phospholipase A2 (PLA)	585	CCAACTTTTGTCTGCCTCATT	22	53.1	45.5
	NM_003406		ATGTGAACCGTTTCTGCC	19	52.1	52.6

Tabelle D: 'Bar-Code Master' mit zugehörigem 'Spot-localization Finder'

Aufgelistet sind alle PCR-Produkte (B95.8 und HKG-Kontrollen), die 'Spike-in' Kontrollen, Produktionskontrollen und Negativspots ('spottingbuffer') mit ihrer Zuordnung in den 'Grids' des EBV-Microarrays. Für jedes EBV-Produkt sind die entsprechenden Nukleotidkoordinaten und Genzugehörigkeiten im B95.8-Genom angegeben. Das kodierende Protein, die virale Funktion und die Zuordnung im Vermehrungszyklus sind vermerkt. Für die HKG-Kontrollen sind das verwendete Kürzel im Microarray sowie die offiziellen Gennamen als Kürzel angegeben. Die Positionen der 'Spike-in' Kontrollen sind ebenfalls angegeben. Unterhalb der Tabelle befindet sich eine schematische Darstellung der Spotanordnung auf dem Array. HKG-Kontrollen sind rot hinterlegt; 'Spike-in' Kontrollen sind blau bzw. orange hinterlegt; Produktionskontrollen sind grün hinterlegt; Negativkontrollen ('spottingbuffer') sind grau hinterlegt. Zuordnung: IE = 'immediate early', E = 'early', L = 'late', LT = 'latent', U = 'unknown'

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
A1	1	A2	1	HKG	ACTB	mRNA, Homo sapiens	ACTB			
A1	2	A2	2	FP	AA	18..608	BNLF2b/ BNLF2a	LMP-2A (166561..1677)	Latenz	LT
A1	3	A2	3	FP	AB	544..1075	BNLF2b/ BNLF2a	LMP-2B (59..1677)	Latenz	LT
A1	4	A2	4	FP	AC	1009..1626	BNLF2b/ BNLF2a	LMP-2	Latenz	LT
A1	5	A2	5	FP	AD	1603..2195	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	6	A2	6	FP	AE.3	2076..2666	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	7	A2	7	FP	AF	2536..3132	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	8	A2	8	FP	AG	3109..3731	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	9	A2	9	Spike-in	Poly(dA)-Oligo					
B1	1	B2	1	FP	AH	3604..4161	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
B1	2	B2	2	FP	AI	4111..4698	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
B1	3	B2	3	FP	AK	4592..5198	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
B1	4	B2	4	FP	AL	4947..5555	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
B1	5	B2	5	FP	AM	5528..6127	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
B1	6	B2	6	FP	AN.4	6011..6640	EBER1	'PKR inhibitor'		LT
B1	7	B2	7	FP	AO	6509..7133	EBER1&2	'PKR inhibitor'		LT
B1	8	B2	8	FP	AP	6921..7421	EBER1&2	'PKR inhibitor'		LT
B1	9	B2	9	FP	AQ.6	7350..8096	OriP			
C1	1	C2	1	FP	AR	8034..8615	OriP			
C1	2	C2	2	FP	AS	8498..9025	OriP			
C1	3	C2	3	FP	AT	8927..9449	OriP			
C1	4	C2	4	FP	AU	9415..10012	BCRF1	'Viral IL-10'	zelluläres Homolog	L
C1	5	C2	5	FP	AW	9990..10636	BCRF1	'Viral IL-10'	zelluläres Homolog	L
C1	6	C2	6	FP	AX	10615..11264				
C1	7	C2	7	FP	AY	11048..11647				
C1	8	C2	8	FP	AZ	11500..12000				
C1	9	C2	9	FP	BAn.4	11969..12554	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
D1	1	D2	1	FP	BBn2.2	12330..12856	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
D1	2	D2	2	FP	BC	12703..13211	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
D1	3	D2	3	FP	BD	13080..13610	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
D1	4	D2	4	FP	BE	13560..14157	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
D1	5	D2	5	FP	BF	14125..14698				
D1	6	D2	6	FP	BG.1	14667..15225				
D1	7	D2	7	FP	BK	46872..47401	BWRF1	EBNA-LP = EBNA-5	Latenz	LT
D1	8	D2	8	FP	BLn	47385..47902	BWRF1	EBNA-LP = EBNA-5	Latenz	LT
D1	9	D2	9	FP	BM	47631..48258				
E1	1	E2	1	FP	BN.5	48200..48838				
E1	2	E2	2	FP	BO.3	48557..49178	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
E1	3	E2	3	FP	BP	49024..49672	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
E1	4	E2	4	FP	BQ.8	49395..49958	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
E1	5	E2	5	FP	BR	49932..50555	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
E1	6	E2	6	FP	BSTUn2.9	50268..52199	BHLF1	'repeat protein'	unbekannt	E
E1	7	E2	7	FP	BW.5	52056..52622	BHLF1	'repeat protein'	unbekannt	E
E1	8	E2	8	FP	BXn	52500..53095	OriLyt			
E1	9	E2	9	FP	BY1n.1	52905..53469	OriLyt			
F1	1	F2	1		Produktionskontrolle					
F1	2	F2	2	FP	BY2n.7	53286..53800				
F1	3	F2	3	FP	BZ	53523..54110				
F1	4	F2	4	FP	CA	54078..54669	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
F1	5	F2	5	FP	CB.3	54220..54826	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
F1	6	F2	6	FP	CC	54737..55312	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
F1	7	F2	7	FP	CD	55293..55889	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
F1	8	F2	8	FP	CE	55794..56344	BFLF2		unbekannt	
F1	9	F2	9	FP	CF	56210..56798	BFLF2/ BFLF1		unbekannt	
G1	1	G2	1	FP	CG	56750..57395			unbekannt	
G1	2	G2	2	FP	CH	57361..57990	BFLF1	'Glycoprotein'	Virion Komponente	E
G1	3	G2	3	FP	CI	57847..58456	BFLF1	'Glycoprotein'	Virion Komponente	E
G1	4	G2	4	FP	CK	58361..58971	BFLF1	'Glycoprotein'	Virion Komponente	E
G1	5	G2	5	FP	CL	58647..59269	BFRF1	'Transport protein'	Virion Komponente	E
G1	6	G2	6	FP	CM.7	59246..59808	BFRF1 BFRF1/ BFRF2	'Transport protein'	Virion Komponente	E
G1	7	G2	7	FP	CN	59696..60266			Komponente	
G1	8	G2	8	FP	CO/o.5	60251..60868	BFRF2		unbekannt	
G1	9	G2	9	FP	CP.4	60848..61482	BFRF2 BFRF2/ BFRF3		unbekannt	
H1	1	H2	1	FP	CQ	61424..62046			Virion Komponente	
H1	2	H2	2	FP	CR	61951..62550	BFRF3	'Small capsid protein'	Virion Komponente	L
H1	3	H2	3	FP	CS	62355..62874	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
H1	4	H2	4	FP	CTn	62768..63330	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
H1	5	H2	5	FP	CU	63259..63896	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
H1	6	H2	6	FP	CW	63774..64406	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
H1	7	H2	7	FP	CX	64331..64904	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
H1	8	H2	8	FP	CY.13	64885..65484	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
H1	9	H2	9	FP	CZ	65381..65010 mRNA,	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	1	J2	1	HKG	ALAS1	Homo sapiens	ALAS1			
J1	2	J2	2	FP	DA.11	65885..66444	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	3	J2	3	FP	DB.1	66280..66729	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	4	J2	4	FP	DC	66458..67044	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	5	J2	5	FP	DD	67004..67612	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	6	J2	6	FP	DE	67477..68084	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	7	J2	7	FP	DF	67856..68453	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	8	J2	8	FP	DG	68422..69011 mRNA,	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
J1	9	J2	9	HKG	ALDOA	Homo sapiens mRNA,	ALDOA			
A1	10	A2	10	HKG	ARHGDI	Homo sapiens mRNA,	ARHGDI			
A1	11	A2	11	FP	DH	68985..69562	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	12	A2	12	FP	DI	69541..70146	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	13	A2	13	FP	DK	70125..70745	BPLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
A1	14	A2	14	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 1					
A1	15	A2	15	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 2					
A1	16	A2	16	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 3					
A1	17	A2	17	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 4					
A1	18	A2	18	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 5					
B1	10	B2	10	FP	DL	70717..71354	BPLF1 BPLF1/ BOLF1	'Large tegument protein'	Virion Komponente	L
B1	11	B2	11	FP	DM.1	71320..71936			Virion Komponente	L
B1	12	B2	12	FP	DN.3	71877..72516	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Virion Komponente	L
B1	13	B2	13	FP	DO.1	72416..73030	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Virion Komponente	L
B1	14	B2	14	FP	DP	72972..73574	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Virion Komponente	L
B1	15	B2	15	FP	DQ.14	73551..74118	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Virion Komponente	L
B1	16	B2	16	FP	DR	73922..74483	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Virion Komponente	L
B1	17	B2	17	FP	DS	74452..75070 mRNA,	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Virion Komponente	L
B1	18	B2	18	HKG	B2M	Homo sapiens	B2M			
C1	10	C2	10		Produktionskontrolle					
C1	11	C2	11	FP	DTn.4	74959..75525	BORF1		unbekannt	L
C1	12	C2	12	FP	DU	75382..75915	BORF1		unbekannt	L

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
C1	13	C2	13	FP	DW	75773..76363	BORF1		unbekannt	L
C1	14	C2	14	FP	DX	76305..76900	BORF1/ BORF2			L/ E
C1	15	C2	15	FP	DY	76792..77426	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
C1	16	C2	16	FP	DZ	77369..77947	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
C1	17	C2	17	FP	EA	77693..78276	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
C1	18	C2	18	FP	EB	78247..78881	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
D1	10	D2	10	FP	EC	78839..79400	BORF2/ BaRF1		Nukleotid Metabolismus	E
D1	11	D2	11	FP	ED	79337..79921	BaRF1/ BMRF1	'RNR-small subunit'	/ DNA Replikation	E
D1	12	D2	12	FP	EE.1	79659..80217	BaRF1/ BMRF1	'RNR-small subunit'	/ DNA Replikation	E
D1	13	D2	13	FP	EF	80110..80648	BMRF1	'EA-D'	DNA Replikation	E
D1	14	D2	14	FP	EG	80355..80992	BMRF1	'EA-D'	DNA Replikation	E
D1	15	D2	15	FP	EH	80961..81542	BMRF1/ BMRF2			
D1	16	D2	16	FP	EI	81439..82056	BMRF2	'Epi ligand'	unbekannt	L
D1	17	D2	17	FP	EK	81870..82502	BMRF2	'Epi ligand'	unbekannt	L
D1	18	D2	18	FP	EL	82443..82946	BMLF1	'Mta'	Genregulation virale	IE
E1	10	E2	10	FP	EM	82923..83532	BMLF1	'Mta'	Genregulation virale	IE
E1	11	E2	11	FP	EN	83499..84057	BMLF1	'Mta'	Genregulation virale	IE
E1	12	E2	12	FP	EO	83934..84499	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1			
E1	13	E2	13	FP	EP	84387..85010	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
E1	14	E2	14	FP	EQ.1	84789..85351	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
E1	15	E2	15	FP	ER	85314..85958	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
E1	16	E2	16	FP	ES	85661..86303	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
E1	17	E2	17	FP	ET	86280..86848	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
E1	18	E2	18	FP	EU	86764..87380	BSLF1/ BSRF1			E/ L
F1	10	F2	10	FP	EW	87144..87637	BSRF1	'PalmP'	unbekannt	L
F1	11	F2	11	FP	EX.3	87474..87976	BSRF1/ BLLF3			L/ E
F1	12	F2	12	FP	EY	87957..88562	BLLF3	'dUTPase'	Nukleotid Metabolismus	E
F1	13	F2	13	FP	EZ	88445..89091	BLLF3/ BLRF1	'dUTPase'/ gp15	/ Virion Komponente	L
F1	14	F2	14	FP	FA	89027..89641	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2	'Capsid protein'/ ...	Virion Komponente/ unbekannt	L
F1	15	F2	15	FP	FB	89517..90150	BLLF1a-b/ BLLF2			L
F1	16	F2	16	FP	FC.13	90114..90666	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
F1	17	F2	17	FP	FD	90456..91051	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
F1	18	F2	18	FP	FE.4	90976..91625	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
G1	10	G2	10	FP	FF	91544..92053	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
G1	11	G2	11	FP	FG	91971..92536	BLLF1a-b/ BLRF3			
G1	12	G2	12	FP	FH.1	92335..92909	BLRF3/ BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
G1	13	G2	13	FP	FI.3	92846..93425	BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
G1	14	G2	14	FP	FK	93399..93994	BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
G1	15	G2	15	FP	FL	93705..94215	BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
G1	16	G2	16	FP	FM.3	93968..94459	BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
G1	17	G2	17	FP	FN	94269..94890	BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
G1	18	G2	18	FP	FO	94629..95161	BERF1	EBNA 3A	Latenz	LT
H1	10	H2	10	FP	FP	94982..95562	BERF1/ BERF2a			
H1	11	H2	11	FP	FQ	95371..96019	BERF2a/ BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
H1	12	H2	12	FP	FR	95997..96548	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
H1	13	H2	13	FP	FS	96322..96907	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
H1	14	H2	14	FP	FT	96834..97398	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
H1	15	H2	15	FP	FU.3	97306..97939	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
H1	16	H2	16	FP	FW	97704..98254	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
H1	17	H2	17	FP	FX	98186..98749	BERF2b/ BERF3			LT
H1	18	H2	18	FP	FY	98719..99316	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT
J1	10	J2	10	HKG	ATPase	mRNA, Homo sapiens	ATP6V1G1			
J1	11	J2	11	FP	FZ.4	99287..99929	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT
J1	12	J2	12	FP	GA	99902..100529	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT
J1	13	J2	13	FP	GB	100410..100910	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
J1	14	J2	14	FP	GCn.2	100643..101220	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz Virion	LT
J1	15	J2	15	FP	GD.3	101158..101740	BZLF2	gp42	Komponente Virion	L
J1	16	J2	16	FP	GE.5	101590..102179	BZLF2	gp42	Komponente virale	L
J1	17	J2	17	FP	GF.2	102115..102684	BZLF1	Zta	Genregulation	IE
J1	18	J2	18	Spike-in	Salmon sperm DNA					
A1	19	A2	19	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 6					
A1	20	A2	20	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 7					
A1	21	A2	21	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 8					
A1	22	A2	22	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 9					
A1	23	A2	23	Spike-in	SR Alien Amine Oligo 10					
A1	24	A2	24	FP	GG	102474..102996	BZLF1 BZLF1/ BRLF1	Zta	virale Genregulation	IE
A1	25	A2	25	FP	GH	102938..103571	BRLF1	Zta/ Rta	virale Genregulation	IE
A1	26	A2	26	FP	GI	103474..104034	BRLF1 PPIA alias CYPA	Rta	virale Genregulation	IE
A1	27	A2	27	HKG	CYPA	mRNA, Homo sapiens				
B1	19	B2	19	Spike-in	β-actin Oligo					
B1	20	B2	20	FP	GK	103851..104402	BRLF1	Rta	virale Genregulation	IE
B1	21	B2	21	FP	GL.1	104377..104999	BRLF1 BRLF1/ BRRF1	Rta	virale Genregulation	IE
B1	22	B2	22	FP	GM.6	104973..105538	BRRF1	Rta	virale Genregulation	IE
B1	23	B2	23	FP	GN	105511..106158	BRRF1 BRRF1/ BRRF2	Na	unbekannt	E
B1	24	B2	24	FP	GO	106013..106604	BRRF2		unbekannt	
B1	25	B2	25	FP	GP	106481..107041	BRRF2		unbekannt	
B1	26	B2	26	FP	GQ	106913..107488	BRRF2 BRRF2/ BKRFF1		unbekannt	
B1	27	B2	27	FP	GR.11	107429..108138				
C1	19	C2	19		Produktionskontrolle					
C1	20	C2	20	FP	GSTn3.6	107886..108406	BKRF1	EBNA1, 'OriP binding protein'	Latenz	LT
C1	21	C2	21	FP	GU	108982..109449	BKRF1	EBNA1, 'OriP binding protein'	Latenz	LT
C1	22	C2	22	FP	GW	109354..109952	BKRF1	EBNA1, 'OriP binding protein'	Latenz Virion	LT
C1	23	C2	23	FP	GX	109927..110522	BKRF2/ BKRF3	'Glycoprotein L/ 'Uracil DNA glycosidase'	Komponente/ Nukleotid Metabolismus	L/ E
C1	24	C2	24	FP	GY	110498..111109	BKRF3	'Uracil DNA glycosidase'	Nukleotid Metabolismus	E
C1	25	C2	25	FP	GZ	111079..111704	BKRF3/ BKRF4 BKRF4/ BBLF4	'Uracil DNA glycosidase'/ ... / DNA	Metabolismus/ unbekannt	E
C1	26	C2	26	FP	HA.7	111684..112312	BBLF4	'Virion protein'/ ...	Replikation DNA	L
C1	27	C2	27	FP	HB	112222..112830	BBLF4	'DNA helicase'	Replikation DNA	E
D1	19	D2	19	FP	HC.3	112567..113197	BBLF4	'DNA helicase'	Replikation DNA	E
D1	20	D2	20	FP	HD.3	113104..113721	BBLF4	'DNA helicase'	Replikation DNA	E
D1	21	D2	21	FP	HE	113529..114117	BBLF4 BBLF4/ BRRF1	'DNA helicase'	Replikation	E
D1	22	D2	22	FP	HF	114065..114636		'DNA helicase'	/ Virion	
D1	23	D2	23	FP	HG.1	114612..115237	BBRF1	'Capsid protein'	Komponente Virion	L
D1	24	D2	24	FP	HH.2	115025..115531	BBRF1	'Capsid protein'	Komponente Virion	L
D1	25	D2	25	FP	HIn	115516..116093	BBRF1 BBRF1/ BBRF2	'Capsid protein'	Komponente	L
D1	26	D2	26	FP	HK	115819..116327	BBRF2/ BBLF3	'Capsid protein'		
D1	27	D2	27	FP	HL	116273..116848				
E1	19	E2	19	FP	HM.6	116825..117442	BBLF3	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
E1	20	E2	20	FP	HN	117422..117958	BBLF2	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
E1	21	E2	21	FP	HO	117938..118567	BBLF2	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
E1	22	E2	22	FP	HP	118530..119047	BBLF2	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
E1	23	E2	23	FP	HQ.7	118932..119569	BBLF2/ BBRF3			
E1	24	E2	24	FP	HR	119333..119943	BBRF3	'Glycoprotein M'	Virion Komponente	L
E1	25	E2	25	FP	HS	119925..120491	BBRF3 BBLF1/ BGLF5	'Glycoprotein M'	Virion Komponente	L
E1	26	E2	26	FP	HT	120468..121049		'MyrP'	unbekannt	L
E1	27	E2	27	FP	HU	121003..121544	BGLF5	'Alkaline exonuclease'	Nukleotid Metabolismus	E
F1	19	F2	19	FP	HW	121471..122102	BGLF5	'Alkaline exonuclease'	Nukleotid Metabolismus	E

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
F1	20	F2	20	FP	HX.4	122065..122655	BGLF5/ BGLF4			
F1	21	F2	21	FP	HY	122499..123071	BGLF4	'Protein kinase'	Nukleotid Metabolismus	E
F1	22	F2	22	FP	HZ	122960..123668	BGLF4	'Protein kinase'	Nukleotid Metabolismus	E
F1	23	F2	23	FP	IA	123536..124161	BGLF4/ BGLF3		unbekannt	E/ U
F1	24	F2	24	FP	IB	124127..124729	BGLF3		unbekannt	U
F1	25	F2	25	FP	IC.5	124664..125289	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1		Virion Komponente	
F1	26	F2	26	FP	ID	125226..125834	BDRF1/ BGRF1	'Packaging protein'	Virion Komponente	L
F1	27	F2	27	FP	IE	125777..126387	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2		Virion Komponente	L
G1	19	G2	19	FP	IF	126251..126841	BGLF2	'Tegument protein'	Komponente	L
G1	20	G2	20	FP	IG	126795..127358	BGLF2/ BGLF1		unbekannt	L
G1	21	G2	21	FP	IH	127338..127961	BGLF1		unbekannt	L
G1	22	G2	22	FP	II	127937..128569	BGLF1/ BDLF4		unbekannt	
G1	23	G2	23	FP	IK	128533..129095	BDLF4		unbekannt	E
G1	24	G2	24	FP	IL	128909..129538	BDRF1	'Capsid protein'	Virion Komponente	L
G1	25	G2	25	FP	IM	129381..129956	BDRF1	'Capsid protein'	Virion Komponente	L
G1	26	G2	26	FP	IN	129824..130377	BDRF1	'Capsid protein'	Virion Komponente	L
G1	27	G2	27	FP	IO.5	130313..130903	BDLF3 BDLF3/ BDLF2	gp150	Virion Komponente	L
H1	19	H2	19	FP	IP	130878..131429	BDLF2			
H1	20	H2	20	FP	IQ.1	131311..131928	BDLF2	'Cyclin B homolog'	zelluläres Homolog	L
H1	21	H2	21	FP	IRn.7	131738..132252	BDLF2 BDLF2/ BDLF1	'Cyclin B homolog'	zelluläres Homolog	L
H1	22	H2	22	FP	IS	131910..132502				
H1	23	H2	23	FP	IT	132274..132897	BDLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
H1	24	H2	24	FP	IU	132752..133309	BDLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
H1	25	H2	25	FP	IW	133267..133833	BcLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
H1	26	H2	26	FP	IX	133808..134451	BcLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
H1	27	H2	27	FP	IY	134343..134893	BcLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	19	J2	19	HKG	CYC1	mRNA, Homo sapiens	CYC1			
J1	20	J2	20	FP	IZ	134685..135186	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	21	J2	21	FP	KA	134904..135480	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	22	J2	22	FP	KB	135336..135886	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	23	J2	23	FP	KC	135611..136199	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	24	J2	24	FP	KD	136081..136641	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	25	J2	25	FP	KE	136626..137222	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	26	J2	26	FP	KF	137158..137799	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
J1	27	J2	27	HKG	GAPDH	mRNA, Homo sapiens	GAPD			
A1	28	A2	28	HKG	G6P	mRNA, Homo sapiens	G6PD			
A1	29	A2	29	FP	KG	137648..138212	BcLF1/ BcRF1		unbekannt	L/ E
A1	30	A2	30	FP	KH	138025..138626	BcRF1		unbekannt	E
A1	31	A2	31	FP	KI	138433..138965	BcRF1		unbekannt	E
A1	32	A2	32	FP	KK	138868..139433	BcRF1		unbekannt	E
A1	33	A2	33	FP	KL	139281..139891	BcRF1/ BTRF1		unbekannt	
A1	34	A2	34	FP	KM.7	139816..140442	BTRF1		unbekannt	L
A1	35	A2	35	HKG	HSP90	mRNA, Homo sapiens	HSPCB			
A1	36	A2	36		spottingbuffer					
B1	28	B2	28	FP	KN.7	140421..141070	BTRF1/ BXLF2			L
B1	29	B2	29	FP	KO	141050..141664	BXLF2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
B1	30	B2	30	FP	KP	141599..142194	BXLF2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
B1	31	B2	31	FP	KQ	142104..142676	BXLF2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
B1	32	B2	32	FP	KR.9	142476..143095	BXLF2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
B1	33	B2	33	FP	KS	142962..143483	BXLF2/ BXLF1			
B1	34	B2	34	FP	KT	143410..143979	BXLF1	'Thymidine kinase'	Nukleotid Metabolismus	E

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
B1	35	B2	35	FP	KU.13	143944..144528	BXLF1	'Thymidine kinase'	Nukleotid Metabolismus	E
B1	36	B2	36		spottingbuffer					
C1	28	C2	28		Produktionskontrolle					
C1	29	C2	29	FP	KW	144485..144987	BXLF1/ BXRf1			
C1	30	C2	30	FP	KX	144783..145408	BXRf1		unbekannt	L
C1	31	C2	31	FP	KY	145173..145679	BXRf1/ BVRf1			L
C1	32	C2	32	FP	KZ	145435..146053	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
C1	33	C2	33	FP	LA	145992..146572	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
C1	34	C2	34	FP	LB	146389..146869	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
C1	35	C2	35	FP	LC	146625..147233	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
C1	36	C2	36		spottingbuffer					
D1	28	D2	28	FP	LD.15	147197..147755				L
D1	29	D2	29	FP	LE.17	147712..148320	BVRf2	'Capsid protein, protease'	Virion Komponente	L
D1	30	D2	30	FP	LF.19	148281..148921	BVRf2/ BdRF1	'Capsid protein, protease/ 'Capsid protein, scaffold'	Virion Komponente	L
D1	31	D2	31	FP	LG	148838..149402	BVRf2/ BdRF1	'Capsid protein, protease/ 'Capsid protein, scaffold'	Virion Komponente	L
D1	32	D2	32	FP	LH.3	149382..149970	BVRf2/ BdRF1/ BILF2			L
D1	33	D2	33	FP	LI	149949..150501	BILF2 (a,b,c,d)	gp78/ 55	Virion Komponente	L
D1	34	D2	34	FP	LK	150385..150935	BILF2 (a,b,c,d)	gp78/ 55	Virion Komponente	L
D1	35	D2	35	FP	LL	150857..151462				
D1	36	D2	36		spottingbuffer					
E1	28	E2	28	FP	LM.2	151310..151928				
E1	29	E2	29	FP	LN.6	151788..152398	BILF1	gp60	Virion Komponente	L
E1	30	E2	30	FP	LO	152351..152909	BILF1	gp60	Virion Komponente	L
E1	31	E2	31	FP	LP.3	152887..153455	BILF1	gp60	Virion Komponente	L
E1	32	E2	32	FP	LQ.5	153222..153777	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
E1	33	E2	33	FP	LR	153621..154180	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
E1	34	E2	34	FP	LS	153878..154485	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
E1	35	E2	35	FP	LT.5	154431..155010	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
E1	36	E2	36		spottingbuffer					
F1	28	F2	28	FP	LU	154990..155571	ECRF4/ BALF5	'DNA polymerase'	unbekannt/ DNA Replikation	U/ E
F1	29	F2	29	FP	LW	155503..156130	ECRF4/ BALF5	'DNA polymerase'	unbekannt/ DNA Replikation	U/ E
F1	30	F2	30	FP	LX	156108..156696	ECRF4/ BALF5	'DNA polymerase'	unbekannt/ DNA Replikation	U/ E
F1	31	F2	31	FP	LY.17	156576..157190	BALF5/ BALF4	'DNA polymerase/ 'Glycoprotein B'	DNA Replikation	E/ L
F1	32	F2	32	FP	LZ.26	157148..157796	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
F1	33	F2	33	FP	MA	157492..158108	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
F1	34	F2	34	FP	MB	158073..158645	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
F1	35	F2	35	FP	MC.7	158624..159187	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
F1	36	F2	36		Produktionskontrolle					
G1	28	G2	28	FP	MD	159085..159714	BALF4/ BALF3			
G1	29	G2	29	FP	ME.27	159516..160015	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
G1	30	G2	30	FP	MF.6	159818..160397	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
G1	31	G2	31	FP	MG	160322..160893	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
G1	32	G2	32	FP	MH.23	160706..161282	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
G1	33	G2	33	FP	MI	161209..161764	BALF3/ BALF2			E
G1	34	G2	34	FP	MK	161575..162190	BALF3/ BALF2			E
G1	35	G2	35	FP	ML.27	162134..162724	BALF2	'ssDNA binding protein'	DNA Replikation	E
G1	36	G2	36		spottingbuffer					
H1	28	H2	28	FP	MM	162475..163057	BALF2	'ssDNA binding protein'	DNA Replikation	E
H1	29	H2	29	FP	MN	163035..163624	BALF2	'ssDNA binding protein'	DNA Replikation	E

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
H1	30	H2	30	FP	MO	164480..165038	BALF2/ BALF1	'DNA binding protein'	DNA Replikation/	E
H1	31	H2	31	FP	MP	165015..165620	BALF1/ BARF1	'bcl-2 like antagonist'		E
H1	32	H2	32	FP	MQ	165570..166137	BARF1	'ICAM-1 homolog'	zelluläres Homolog	E
H1	33	H2	33	FP	MR	166112..166676	BARF1	'ICAM-1 homolog'	zelluläres Homolog	E
H1	34	H2	34	FP	MS	166628..167231	BNLF2b BNLF2a	LMP2A	Latenz	LT
H1	35	H2	35	FP	MT	167113..167741	BNLF2b/ BNLF2a	LMP2A/ LMP2B	Latenz	LT
H1	36	H2	36		spottingbuffer					
J1	28	J2	28	HKG	HPRT1	mRNA, Homo sapiens	HPRT1			
J1	29	J2	29	FP	MU	167695..168344	BNLF1	LMP1	Latenz	LT
J1	30	J2	30	FP	MW	168318..168938	BNLF1	LMP1	Latenz	LT
J1	31	J2	31	FP	MX	168850..169477	BNLF1	LMP1	Latenz	LT
J1	32	J2	32	FP	MY.2	169454..170101	BNLF1	LMP1	Latenz	LT
J1	33	J2	33	FP	MZ.1	169917..170495				
J1	34	J2	34	FP	TO.9	171981..221				
J1	35	J2	35	HKG	LDHA	mRNA, Homo sapiens	LDHA			
J1	36	J2	36		spottingbuffer					
K1	1	K2	1	HKG	MAP4	mRNA, Homo sapiens	MAP4			
K1	2	K2	2	BP	AA	18..608	BNLF2b/ BNLF2a	LMP-2A (166561..1677)	Latenz	LT
K1	3	K2	3	BP	AB	544..1075	BNLF2b/ BNLF2a	LMP-2B (59..1677)	Latenz	LT
K1	4	K2	4	BP	AC	1009..1626	BNLF2b/ BNLF2a	LMP-2	Latenz	LT
K1	5	K2	5	BP	AD	1603..2195	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
K1	6	K2	6	BP	AE.3	2076..2666	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
K1	7	K2	7	BP	AF	2536..3132	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
K1	8	K2	8	BP	AG	3109..3731	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
K1	9	K2	9	HKG	PABPC1	mRNA, Homo sapiens	PABPC1			
L1	1	L2	1	BP	AH	3604..4161	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
L1	2	L2	2	BP	AI	4111..4698	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
L1	3	L2	3	BP	AK	4592..5198	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
L1	4	L2	4	BP	AL	4947..5555	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
L1	5	L2	5	BP	AM	5528..6127	BNRF1	'Major tegument protein'	Virion Komponente	L
L1	6	L2	6	BP	AN.4	6011..6640	EBER1	'PKR inhibitor'		LT
L1	7	L2	7	BP	AO	6509..7133	EBER1&2	'PKR inhibitor'		LT
L1	8	L2	8	BP	AP	6921..7421	EBER1&2	'PKR inhibitor'		LT
L1	9	L2	9	BP	AQ.6	7350..8096	OriP			
M1	1	M2	1	BP	AR	8034..8615	OriP			
M1	2	M2	2	BP	AS	8498..9025	OriP			
M1	3	M2	3	BP	AT	8927..9449	OriP			
M1	4	M2	4	BP	AU	9415..10012	BCRF1	'Viral IL-10'	zelluläres Homolog	L
M1	5	M2	5	BP	AW	9990..10636	BCRF1	'Viral IL-10'	zelluläres Homolog	L
M1	6	M2	6	BP	AX	10615..11264				
M1	7	M2	7	BP	AY	11048..11647				
M1	8	M2	8	BP	AZ	11500..12000				
M1	9	M2	9	BP	BAN.4	11969..12554	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
N1	1	N2	1	BP	BBN2.2	12330..12856	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
N1	2	N2	2	BP	BC	12703..13211	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
N1	3	N2	3	BP	BD	13080..13610	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
N1	4	N2	4	BP	BE	13560..14157	BCRF2	'EBNA intron'	unbekannt	U
N1	5	N2	5	BP	BF	14125..14698				
N1	6	N2	6	BP	BG.1	14667..15225				
N1	7	N2	7	BP	BK	46872..47401	BWRF1	EBNA-LP = EBNA-5	Latenz	LT
N1	8	N2	8	BP	BLn	47385..47902	BWRF1	EBNA-LP = EBNA-5	Latenz	LT
N1	9	N2	9	BP	BM	47631..48258				
O1	1	O2	1	BP	BN.5	48200..48838				
O1	2	O2	2	BP	BO.3	48557..49178	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
O1	3	O2	3	BP	BP	49024..49672	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
O1	4	O2	4	BP	BQ.8	49395..49958	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
O1	5	O2	5	BP	BR	49932..50555	BYRF1	EBNA2	Latenz	LT
O1	6	O2	6	BP	BSTUn2.9	50268..52199	BHLF1	'repeat protein'	unbekannt	E
O1	7	O2	7	BP	BW.5	52056..52622	BHLF1	'repeat protein'	unbekannt	E
O1	8	O2	8	BP	BXn	52500..53095	OriLyt			
O1	9	O2	9	BP	BY1n.1	52905..53469	OriLyt			
P1	1	P2	1		Produktionskontrolle					
P1	2	P2	2	BP	BY2n.7	53286..53800				

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
P1	3	P2	3	BP	BZ	53523..54110				
P1	4	P2	4	BP	CA	54078..54669	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
P1	5	P2	5	BP	CB.3	54220..54826	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
P1	6	P2	6	BP	CC	54737..55312	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
P1	7	P2	7	BP	CD	55293..55889	BHRF1	'Viral bcl-2'	zelluläres Homolog	E
P1	8	P2	8	BP	CE	55794..56344	BFLF2		unbekannt	
P1	9	P2	9	BP	CF	56210..56798	BFLF2/ BFLF1		unbekannt	
Q1	1	Q2	1	BP	CG	56750..57395			unbekannt Virion	
Q1	2	Q2	2	BP	CH	57361..57990	BFLF1	'Glycoprotein'	Komponente Virion	E
Q1	3	Q2	3	BP	CI	57847..58456	BFLF1	'Glycoprotein'	Komponente Virion	E
Q1	4	Q2	4	BP	CK	58361..58971	BFLF1	'Glycoprotein'	Komponente Virion	E
Q1	5	Q2	5	BP	CL	58647..59269	BFRF1	'Transport protein'	Komponente Virion	E
Q1	6	Q2	6	BP	CM.7	59246..59808	BFRF1/ BFRF2	'Transport protein'	Komponente Virion	E
Q1	7	Q2	7	BP	CN	59696..60266	BFRF2		Komponente	
Q1	8	Q2	8	BP	CO/o.5	60251..60868	BFRF2		unbekannt	
Q1	9	Q2	9	BP	CP.4	60848..61482	BFRF2/ BFRF3		unbekannt Virion	
R1	1	R2	1	BP	CQ	61424..62046			Komponente Virion	
R1	2	R2	2	BP	CR	61951..62550	BFRF3	'Small capsid protein'	Komponente Virion	L
R1	3	R2	3	BP	CS	62355..62874	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
R1	4	R2	4	BP	CTn	62768..63330	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
R1	5	R2	5	BP	CU	63259..63896	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
R1	6	R2	6	BP	CW	63774..64406	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
R1	7	R2	7	BP	CX	64331..64904	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
R1	8	R2	8	BP	CY.13	64885..65484	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
R1	9	R2	9	BP	CZ	65381..65010 mRNA,	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	1	S2	1	HKG	NONO	Homo sapiens	NONO			
S1	2	S2	2	BP	DA.11	65885..66444	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	3	S2	3	BP	DB.1	66280..66729	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	4	S2	4	BP	DC	66458..67044	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	5	S2	5	BP	DD	67004..67612	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	6	S2	6	BP	DE	67477..68084	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	7	S2	7	BP	DF	67856..68453	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	8	S2	8	BP	DG	68422..69011 mRNA,	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
S1	9	S2	9	HKG	PABPN1	Homo sapiens mRNA,	PABPN1			
K1	10	K2	10	HKG	PGK1	Homo sapiens	PGK1			
K1	11	K2	11	BP	DH	68985..69562	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
K1	12	K2	12	BP	DI	69541..70146	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
K1	13	K2	13	BP	DK	70125..70745	BPLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
K1	14	K2	14		spottingbuffer					
K1	15	K2	15		spottingbuffer					
K1	16	K2	16		spottingbuffer					
K1	17	K2	17		spottingbuffer					
K1	18	K2	18		spottingbuffer					
L1	10	L2	10	BP	DL	70717..71354	BPLF1/ BOLF1	'Large tegument protein'	Komponente Virion	L
L1	11	L2	11	BP	DM.1	71320..71936	BOLF1		Komponente Virion	L
L1	12	L2	12	BP	DN.3	71877..72516	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Komponente Virion	L
L1	13	L2	13	BP	DO.1	72416..73030	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Komponente Virion	L
L1	14	L2	14	BP	DP	72972..73574	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Komponente Virion	L
L1	15	L2	15	BP	DQ.14	73551..74118	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Komponente Virion	L
L1	16	L2	16	BP	DR	73922..74483	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Komponente Virion	L
L1	17	L2	17	BP	DS	74452..75070 mRNA, Homo sapiens	BOLF1	'Tegument protein/ LTPBP'	Komponente Virion	L
L1	18	L2	18	HKG	RPLP0		RPLP0			
M1	10	M2	10		Produktionskontrolle					
M1	11	M2	11	BP	DTn.4	74959..75525	BORF1		unbekannt	L

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
M1	12	M2	12	BP	DU	75382..75915	BORF1		unbekannt	L
M1	13	M2	13	BP	DW	75773..76363	BORF1		unbekannt	L
M1	14	M2	14	BP	DX	76305..76900	BORF1/ BORF2			L/ E
M1	15	M2	15	BP	DY	76792..77426	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
M1	16	M2	16	BP	DZ	77369..77947	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
M1	17	M2	17	BP	EA	77693..78276	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
M1	18	M2	18	BP	EB	78247..78881	BORF2	'RNR-large subunit'	Nukleotid Metabolismus	E
N1	10	N2	10	BP	EC	78839..79400	BORF2/ BaRF1		Nukleotid Metabolismus	E
N1	11	N2	11	BP	ED	79337..79921	BaRF1/ BMRF1	'RNR-small subunit'	/ DNA Replikation	E
N1	12	N2	12	BP	EE.1	79659..80217	BaRF1/ BMRF1	'RNR-small subunit'	/ DNA Replikation	E
N1	13	N2	13	BP	EF	80110..80648	BMRF1	'EA-D'	DNA Replikation	E
N1	14	N2	14	BP	EG	80355..80992	BMRF1 BMRF1/ BMRF2	'EA-D'	DNA Replikation	E
N1	15	N2	15	BP	EH	80961..81542				
N1	16	N2	16	BP	EI	81439..82056	BMRF2	'Epi ligand'	unbekannt	L
N1	17	N2	17	BP	EK	81870..82502	BMRF2	'Epi ligand'	unbekannt	L
N1	18	N2	18	BP	EL	82443..82946	BMLF1	'Mta'	Genregulation virale	IE
O1	10	O2	10	BP	EM	82923..83532	BMLF1	'Mta'	Genregulation virale	IE
O1	11	O2	11	BP	EN	83499..84057	BMLF1 BMLF1/ BSLF2/ BSLF1			
O1	12	O2	12	BP	EO	83934..84499				
O1	13	O2	13	BP	EP	84387..85010	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
O1	14	O2	14	BP	EQ.1	84789..85351	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
O1	15	O2	15	BP	ER	85314..85958	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
O1	16	O2	16	BP	ES	85661..86303	BSLF1	'Primase'	DNA Replikation	E
O1	17	O2	17	BP	ET	86280..86848	BSLF1 BSLF1/ BSRF1			E/ L
P1	10	P2	10	BP	EW	87144..87637	BSRF1	'PalmP'	unbekannt	L
P1	11	P2	11	BP	EX.3	87474..87976	BSRF1/ BLLF3			L/ E
P1	12	P2	12	BP	EY	87957..88562	BLLF3	'dUTPase'	Nukleotid Metabolismus	E
P1	13	P2	13	BP	EZ	88445..89091	BLLF3/ BLRF1 BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2	'dUTPase'/ gp15	Virion Komponente/ unbekannt	L
P1	14	P2	14	BP	FA	89027..89641	BLLF1a-b/ BLLF2	'Capsid protein'/ ...		L
P1	15	P2	15	BP	FB	89517..90150				L
P1	16	P2	16	BP	FC.13	90114..90666	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
P1	17	P2	17	BP	FD	90456..91051	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
P1	18	P2	18	BP	FE.4	90976..91625	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
Q1	10	Q2	10	BP	FF	91544..92053	BLLF1a-b	gp350/220	Virion Komponente	L
Q1	11	Q2	11	BP	FG	91971..92536	BLLF1a-b/ BLRF3 BLRF3/ BERF1			
Q1	12	Q2	12	BP	FH.1	92335..92909		.../ EBNA 3A	Latenz	LT
Q1	13	Q2	13	BP	FI.3	92846..93425				
Q1	14	Q2	14	BP	FK	93399..93994				
Q1	15	Q2	15	BP	FL	93705..94215				
Q1	16	Q2	16	BP	FM.3	93968..94459				
Q1	17	Q2	17	BP	FN	94269..94890				
Q1	18	Q2	18	BP	FO	94629..95161				
R1	10	R2	10	BP	FP	94982..95562	BERF2a BERF2a/ BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	11	R2	11	BP	FQ	95371..96019	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	12	R2	12	BP	FR	95997..96548	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	13	R2	13	BP	FS	96322..96907	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	14	R2	14	BP	FT	96834..97398	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	15	R2	15	BP	FU.3	97306..97939	BERF2b	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	16	R2	16	BP	FW	97704..98254	BERF2b BERF2b/ BERF3	EBNA 3B	Latenz	LT
R1	17	R2	17	BP	FX	98186..98749				LT
R1	18	R2	18	BP	FY	98719..99316	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT
S1	10	S2	10	HKG	POLR2A	Homo sapiens mRNA	POLR2A			
S1	11	S2	11	BP	FZ.4	99287..99929	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT
S1	12	S2	12	BP	GA	99902..100529	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT
S1	13	S2	13	BP	GB	100410..100910	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz	LT

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
S1	14	S2	14	BP	GCn.2	100643..101220	BERF3/ 4	EBNA 3C	Latenz Virion	LT
S1	15	S2	15	BP	GD.3	101158..101740	BZLF2	gp42	Komponente Virion	L
S1	16	S2	16	BP	GE.5	101590..102179	BZLF2	gp42	Komponente virale	L
S1	17	S2	17	BP	GF.2	102115..102684	BZLF1	Zta	Genregulation	IE
S1	18	S2	18	HKG	RPL13A	mRNA, Homo sapiens	RPL13A			
K1	19	K2	19		spottingbuffer					
K1	20	K2	20		spottingbuffer					
K1	21	K2	21		spottingbuffer					
K1	22	K2	22		spottingbuffer					
K1	23	K2	23		spottingbuffer					
K1	24	K2	24	BP	GG	102474..102996	BZLF1 BZLF1/ BRLF1	Zta	virale Genregulation	IE
K1	25	K2	25	BP	GH	102938..103571	BRLF1	Zta/ Rta	virale Genregulation	IE
K1	26	K2	26	BP	GI	103474..104034	BRLF1	Rta	virale Genregulation	IE
K1	27	K2	27	HKG	TBP	mRNA, Homo sapiens	TBP			
L1	19	L2	19	HKG	RPL32	mRNA, Homo sapiens	RPL32			
L1	20	L2	20	BP	GK	103851..104402	BRLF1	Rta	virale Genregulation	IE
L1	21	L2	21	BP	GL.1	104377..104999	BRLF1 BRLF1/ BRRF1	Rta	virale Genregulation	IE
L1	22	L2	22	BP	GM.6	104973..105538	BRRF1	Rta	virale Genregulation	IE
L1	23	L2	23	BP	GN	105511..106158	BRRF1 BRRF1/ BRRF2	Na	unbekannt	E
L1	24	L2	24	BP	GO	106013..106604	BRRF2		unbekannt	
L1	25	L2	25	BP	GP	106481..107041	BRRF2		unbekannt	
L1	26	L2	26	BP	GQ	106913..107488	BRRF2 BRRF2/ BKRF1		unbekannt	
L1	27	L2	27	BP	GR.11	107429..108138	BKRF1			
M1	19	M2	19		Produktionskontrolle					
M1	20	M2	20	BP	GSTn3.6	107886..108406	BKRF1	EBNA1, 'OriP binding protein'	Latenz	LT
M1	21	M2	21	BP	GU	108982..109449	BKRF1	EBNA1, 'OriP binding protein'	Latenz	LT
M1	22	M2	22	BP	GW	109354..109952	BKRF1	EBNA1, 'OriP binding protein'	Latenz Virion	LT
M1	23	M2	23	BP	GX	109927..110522	BKRF2/ BKRF3	'Glycoprotein L/ 'Uracil DNA glycosidase'	Komponente/ Nukleotid Metabolismus	L/ E
M1	24	M2	24	BP	GY	110498..111109	BKRF3	'Uracil DNA glycosidase'	Nukleotid Metabolismus	E
M1	25	M2	25	BP	GZ	111079..111704	BKRF3/ BKRF4 BKRF4/ BBLF4	'Uracil DNA glycosidase'/ ... / DNA	Metabolismus/ unbekannt	E
M1	26	M2	26	BP	HA.7	111684..112312	BBLF4	'Virion protein'/ ...	Replikation DNA	L
M1	27	M2	27	BP	HB	112222..112830	BBLF4	'DNA helicase'	Replikation DNA	E
N1	19	N2	19	BP	HC.3	112567..113197	BBLF4	'DNA helicase'	Replikation DNA	E
N1	20	N2	20	BP	HD.3	113104..113721	BBLF4	'DNA helicase'	Replikation DNA	E
N1	21	N2	21	BP	HE	113529..114117	BBLF4 BBLF4/ BRRF1	'DNA helicase'	Replikation	E
N1	22	N2	22	BP	HF	114065..114636	BRRF1	'DNA helicase'	/ Virion	
N1	23	N2	23	BP	HG.1	114612..115237	BRRF1	'Capsid protein'	Komponente Virion	L
N1	24	N2	24	BP	HH.2	115025..115531	BRRF1	'Capsid protein'	Komponente Virion	L
N1	25	N2	25	BP	HIn	115516..116093	BRRF1 BRRF1/ BRRF2 BRRF2/ BBLF3	'Capsid protein'	Komponente	L
N1	26	N2	26	BP	HK	115819..116327	BRRF2/ BRRF2/ BBLF3	'Capsid protein'		
N1	27	N2	27	BP	HL	116273..116848	BBLF3			
O1	19	O2	19	BP	HM.6	116825..117442	BBLF3	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
O1	20	O2	20	BP	HN	117422..117958	BBLF2	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
O1	21	O2	21	BP	HO	117938..118567	BBLF2	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
O1	22	O2	22	BP	HP	118530..119047	BBLF2 BBLF2/ BRRF3	'Primase associated factor'	DNA Replikation	E
O1	23	O2	23	BP	HQ.7	118932..119569	BRRF3		Virion Komponente	L
O1	24	O2	24	BP	HR	119333..119943	BRRF3	'Glycoprotein M'	Komponente Virion	L
O1	25	O2	25	BP	HS	119925..120491	BRRF3 BBLF1/ BGLF5	'Glycoprotein M'	Komponente	L
O1	26	O2	26	BP	HT	120468..121049	BGLF5	'MyrP'	unbekannt Nukleotid	L
O1	27	O2	27	BP	HU	121003..121544	BGLF5	'Alkaline exonuclease'	Metabolismus Nukleotid	E
P1	19	P2	19	BP	HW	121471..122102	BGLF5	'Alkaline exonuclease'	Metabolismus Nukleotid	E

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
P1	20	P2	20	BP	HX.4	122065..122655	BGLF5/ BGLF4		Nukleotid	
P1	21	P2	21	BP	HY	122499..123071	BGLF4	'Protein kinase'	Metabolismus	E
P1	22	P2	22	BP	HZ	122960..123668	BGLF4	'Protein kinase'	Nukleotid Metabolismus	E
P1	23	P2	23	BP	IA	123536..124161	BGLF4/ BGLF3		unbekannt	E/ U
P1	24	P2	24	BP	IB	124127..124729	BGLF3		unbekannt	U
P1	25	P2	25	BP	IC.5	124664..125289	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1		Virion Komponente	
P1	26	P2	26	BP	ID	125226..125834	BDRF1/ BGRF1	/ 'Packaging protein'	Virion Komponente	L
P1	27	P2	27	BP	IE	125777..126387	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2		Virion Komponente	L
Q1	19	Q2	19	BP	IF	126251..126841	BGLF2	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
Q1	20	Q2	20	BP	IG	126795..127358	BGLF2/ BGLF1		unbekannt	L
Q1	21	Q2	21	BP	IH	127338..127961	BGLF1		unbekannt	L
Q1	22	Q2	22	BP	II	127937..128569	BGLF1/ BDLF4		unbekannt	
Q1	23	Q2	23	BP	IK	128533..129095	BDLF4		unbekannt	E
Q1	24	Q2	24	BP	IL	128909..129538	BDRF1	'Capsid protein'	Virion Komponente	L
Q1	25	Q2	25	BP	IM	129381..129956	BDRF1	'Capsid protein'	Virion Komponente	L
Q1	26	Q2	26	BP	IN	129824..130377	BDRF1	'Capsid protein'	Virion Komponente	L
Q1	27	Q2	27	BP	IO.5	130313..130903	BDLF3 BDLF3/ BDLF2	gp150	Virion Komponente	L
R1	19	R2	19	BP	IP	130878..131429				
R1	20	R2	20	BP	IQ.1	131311..131928	BDLF2	'Cyclin B homolog'	zelluläres Homolog	L
R1	21	R2	21	BP	IRn.7	131738..132252	BDLF2 BDLF2/ BDLF1	'Cyclin B homolog'	zelluläres Homolog	L
R1	22	R2	22	BP	IS	131910..132502				
R1	23	R2	23	BP	IT	132274..132897	BDLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
R1	24	R2	24	BP	IU	132752..133309	BDLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
R1	25	R2	25	BP	IW	133267..133833	BcLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
R1	26	R2	26	BP	IX	133808..134451	BcLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
R1	27	R2	27	BP	IY	134343..134893	BcLF1	'Minor capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	19	S2	19	HKG	SDHA	mRNA, Homo sapiens	SDHA			
S1	20	S2	20	BP	IZ	134685..135186	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	21	S2	21	BP	KA	134904..135480	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	22	S2	22	BP	KB	135336..135886	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	23	S2	23	BP	KC	135611..136199	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	24	S2	24	BP	KD	136081..136641	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	25	S2	25	BP	KE	136626..137222	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	26	S2	26	BP	KF	137158..137799	BcLF1	'Major capsid protein'	Virion Komponente	L
S1	27	S2	27	HKG	TFRC	mRNA, Homo sapiens	TFRC			
K1	28	K2	28	HKG	TUBA	mRNA, Homo sapiens				
K1	29	K2	29	BP	KG	137648..138212	K-ALPHA-1 BcLF1/ BcRF1		unbekannt	L/ E
K1	30	K2	30	BP	KH	138025..138626	BcRF1		unbekannt	E
K1	31	K2	31	BP	KI	138433..138965	BcRF1		unbekannt	E
K1	32	K2	32	BP	KK	138868..139433	BcRF1		unbekannt	E
K1	33	K2	33	BP	KL	139281..139891	BcRF1/ BTRF1		unbekannt	
K1	34	K2	34	BP	KM.7	139816..140442	BTRF1		unbekannt	L
K1	35	K2	35	HKG	TUBB	mRNA, Homo sapiens	TUBB			
K1	36	K2	36		spottingbuffer					
L1	28	L2	28	BP	KN.7	140421..141070	BTRF1/ BXL2			L
L1	29	L2	29	BP	KO	141050..141664	BXL2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
L1	30	L2	30	BP	KP	141599..142194	BXL2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
L1	31	L2	31	BP	KQ	142104..142676	BXL2	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
L1	32	L2	32	BP	KR.9	142476..143095	BXL2 BXL2/ BXL1	'Glycoprotein H'	Virion Komponente	L
L1	33	L2	33	BP	KS	142962..143483				

Original		Replikat		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotid- koordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte							
L1	34	L2	34	BP	KZ	143410..143979	BXLF1	'Thymidine kinase'	Nukleotid Metabolismus	E
L1	35	L2	35	BP	KU.13	143944..144528	BXLF1	'Thymidine kinase'	Nukleotid Metabolismus	E
L1	36	L2	36		spottingbuffer					
M1	28	M2	28		Produktionskontrolle					
M1	29	M2	29	BP	KW	144485..144987	BXLF1/ BXRf1			
M1	30	M2	30	BP	KX	144783..145408	BXRf1		unbekannt	L
M1	31	M2	31	BP	KY	145173..145679	BXRf1/ BVRf1			L
M1	32	M2	32	BP	KZ	145435..146053	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
M1	33	M2	33	BP	LA	145992..146572	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
M1	34	M2	34	BP	LB	146389..146869	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
M1	35	M2	35	BP	LC	146625..147233	BVRf1	'Tegument protein'	Virion Komponente	L
M1	36	M2	36		spottingbuffer					
N1	28	N2	28	BP	LD.15	147197..147755				L
N1	29	N2	29	BP	LE.17	147712..148320	BVRf2	'Capsid protein, protease'	Virion Komponente	L
N1	30	N2	30	BP	LF.19	148281..148921	BVRf2/ BdRf1	'Capsid protein, protease/ 'Capsid protein, scaffold'	Virion Komponente	L
N1	31	N2	31	BP	LG	148838..149402	BVRf2/ BdRf1	'Capsid protein, protease/ 'Capsid protein, scaffold'	Virion Komponente	L
N1	32	N2	32	BP	LH.3	149382..149970	BVRf2/ BdRf1/ BILF2			L
N1	33	N2	33	BP	LI	149949..150501	BILF2 (a,b,c,d)	gp78/ 55	Virion Komponente	L
N1	34	N2	34	BP	LK	150385..150935	BILF2 (a,b,c,d)	gp78/ 55	Virion Komponente	L
N1	35	N2	35	BP	LL	150857..151462				
N1	36	N2	36		spottingbuffer					
O1	28	O2	28	BP	LM.2	151310..151928				
O1	29	O2	29	BP	LN.6	151788..152398	BILF1	gp60	Virion Komponente	L
O1	30	O2	30	BP	LO	152351..152909	BILF1	gp60	Virion Komponente	L
O1	31	O2	31	BP	LP.3	152887..153455	BILF1	gp60	Virion Komponente	L
O1	32	O2	32	BP	LQ.5	153222..153777	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
O1	33	O2	33	BP	LR	153621..154180	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
O1	34	O2	34	BP	LS	153878..154485	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
O1	35	O2	35	BP	LT.5	154431..155010	BALF5	'DNA polymerase'	DNA Replikation	E
O1	36	O2	36		spottingbuffer					
P1	28	P2	28	BP	LU	154990..155571	ECRF4/ BALF5	'DNA polymerase'	unbekannt/ DNA Replikation	U/ E
P1	29	P2	29	BP	LW	155503..156130	ECRF4/ BALF5	'DNA polymerase'	unbekannt/ DNA Replikation	U/ E
P1	30	P2	30	BP	LX	156108..156696	ECRF4/ BALF5	'DNA polymerase'	unbekannt/ DNA Replikation	U/ E
P1	31	P2	31	BP	LY.17	156576..157190	BALF5/ BALF4	'DNA polymerase/ 'Glycoprotein B'	DNA Replikation	E/ L
P1	32	P2	32	BP	LZ.26	157148..157796	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
P1	33	P2	33	BP	MA	157492..158108	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
P1	34	P2	34	BP	MB	158073..158645	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
P1	35	P2	35	BP	MC.7	158624..159187	BALF4	VcAgp125	Virion Komponente	L
P1	36	P2	36		Produktionskontrolle					
Q1	28	Q2	28	BP	MD	159085..159714	BALF4/ BALF3			
Q1	29	Q2	29	BP	ME.27	159516..160015	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
Q1	30	Q2	30	BP	MF.6	159818..160397	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
Q1	31	Q2	31	BP	MG	160322..160893	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
Q1	32	Q2	32	BP	MH.23	160706..161282	BARF0/ BALF3		unbekannt	E
Q1	33	Q2	33	BP	MI	161209..161764	BALF3/ BALF2			E
Q1	34	Q2	34	BP	MK	161575..162190	BALF3/ BALF2			E
Q1	35	Q2	35	BP	ML.27	162134..162724	BALF2	'ssDNA binding protein'	DNA Replikation	E
Q1	36	Q2	36		spottingbuffer					
R1	28	R2	28	BP	MM	162475..163057	BALF2	'ssDNA binding protein'	DNA Replikation	E
R1	29	R2	29	BP	MN	163035..163624	BALF2	'ssDNA binding protein'	DNA Replikation	E

Original		Replik		Art	Produktname, Genkürzel	Nukleotidkoordinaten bzw. Probenart	Genname	Protein	Funktion	Zuordnung	
Reihe	Spalte	Reihe	Spalte								
R1	30	R2	30	BP	MO	164480..165038	BALF2/ BALF1	'DNA binding protein'	DNA Replikation/	E	
R1	31	R2	31	BP	MP	165015..165620	BALF1/ BARF1	'bcl-2 like antagonist'		E	
R1	32	R2	32	BP	MQ	165570..166137	BARF1	'ICAM-1 homolog'	zelluläres Homolog	E	
R1	33	R2	33	BP	MR	166112..166676	BARF1	'ICAM-1 homolog'	zelluläres Homolog	E	
R1	34	R2	34	BP	MS	166628..167231	BNLF2b BNLF2a	LMP2A	Latenz	LT	
R1	35	R2	35	BP	MT	167113..167741	BNLF2b/ BNLF2a	LMP2A/ LMP2B	Latenz	LT	
R1	36	R2	36	spottingbuffer							
S1	28	S2	28	Spike-in	COT1 DNA Human						
S1	29	S2	29	BP	MU	167695..168344	BNLF1	LMP1	Latenz	LT	
S1	30	S2	30	BP	MW	168318..168938	BNLF1	LMP1	Latenz	LT	
S1	31	S2	31	BP	MX	168850..169477	BNLF1	LMP1	Latenz	LT	
S1	32	S2	32	BP	MY.2	169454..170101	BNLF1	LMP1	Latenz	LT	
S1	33	S2	33	BP	MZ.1	169917..170495					
S1	34	S2	34	BP	TO.9	171981..221					
S1	35	S2	35	HKG			mRNA, Homo sapiens	YWHAZ			
S1	36	S2	36	spottingbuffer							

Original	Column									Array Anordnung	Zwei pins 3x3 Grid	Ad bis TO entspricht den PCR-Produkt Namen																																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9																																				
Row R1	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35	A36
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33	L34	L35	L36
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12	N13	N14	N15	N16	N17	N18	N19	N20	N21	N22	N23	N24	N25	N26	N27	N28	N29	N30	N31	N32	N33	N34	N35	N36
	O1	O2	O3	O4	O5	O6	O7	O8	O9	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	R21	R22	R23	R24	R25	R26	R27	R28	R29	R30	R31	R32	R33	R34	R35	R36
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36
	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20	V21	V22	V23	V24	V25	V26	V27	V28	V29	V30	V31	V32	V33	V34	V35	V36
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24	X25	X26	X27	X28	X29	X30	X31	X32	X33	X34	X35	X36
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6	Z7	Z8	Z9	Z10	Z11	Z12	Z13	Z14	Z15	Z16	Z17	Z18	Z19	Z20	Z21	Z22	Z23	Z24	Z25	Z26	Z27	Z28	Z29	Z30	Z31	Z32	Z33	Z34	Z35	Z36

pos. Kontrollen/ Housekeeping genes
 pos. Kontrollen/ spike in controls
 Produktionskontrollen
 spotting buffer

Array Anordnung
 Zwei pins 3x3 Grid
 Ad bis TO entspricht den PCR-Produkt Namen

BP-1tag

FP-1tag

BP-1tag

FP-1tag

Tab. E: Vergleich der beiden EBV-negativen Zelllinien BJAB und DG75

Aufgelistet sind sämtliche EBV-Fragmente, die äquivalenten EBV-Gene und die Expressionsverhältnisse ('ratios'). Expressionsverhältnisse die über dem Schwellenwert von 2 liegen sind rot unterlegt.

Fragment	ratio	Gen
AA	1,0	BNLF2a/b
AB	1,0	BNLF2a/b
AC	0,6	BNLF2a/b
AD	1,2	BNRF1
AE	1,3	BNRF1
AF	1,1	BNRF1
AG	1,2	BNRF1
AH	0,6	BNRF1
AI	0,9	BNRF1
AK	1,0	BNRF1
AL	1,0	BNRF1
AM	1,3	BNRF1
AN	1,1	EBER1
AO	1,1	EBER1/2
AP	1,0	EBER1/2
AQ	1,7	
AR	0,8	
AS	0,9	
AT	0,9	
AU	1,0	BCRF1
AW	1,0	BCRF1
AX	1,0	
AY	0,9	
AZ	0,8	
BA	1,1	BCRF2
BB	1,1	BCRF2
BC	0,9	BCRF2
BD	1,0	BCRF2
BE	1,1	BCRF2
BF	1,0	
BG	1,2	
BK	0,9	BWRF1
BL	1,0	BWRF1
BM	1,0	
BN	0,7	
BO	1,2	BYRF1
BP	1,1	BYRF1
BQ	1,2	BYRF1
BR	1,1	BYRF1
BSTUn2	1,4	BHLF1
BW	1,0	BHLF1
BX	1,1	
BY1n	0,8	
BY2n	1,5	
BZ	1,0	
CA	1,2	BHRF1
CB	1,1	BHRF1
CC	1,5	BHRF1
CD	1,1	BHRF1
CE	1,2	BFLF2
CF	1,0	BFLF2
CG	0,7	BFLF2/ BFLF1
CH	1,0	BFLF1
CI	1,1	BFLF1
CK	1,1	BFLF1
CL	1,1	BFRF1
CM	1,3	BFRF1
CN	1,1	BFRF1/ BFRF2
CO	1,0	BFRF2
CP	1,1	BFRF2
CQ	0,9	BFRF2/ BFRF3
CR	1,2	BFRF3
CS	0,9	BPLF1
CT	1,0	BPLF1
CU	0,9	BPLF1
CW	1,0	BPLF1
CX	1,0	BPLF1
CY	1,0	BPLF1
CZ	1,2	BPLF1
DA	1,2	BPLF1
DB	1,2	BPLF1
DC	1,0	BPLF1
DD	1,2	BPLF1
DE	1,1	BPLF1
DF	1,1	BPLF1
DG	1,0	BPLF1
DH	1,3	BPLF1
DI	1,2	BPLF1
DK	1,1	BPLF1
DL	1,1	BPLF1
DM	0,8	BPLF1/ BOLF1
DN	1,0	BOLF1
DO	1,0	BOLF1
DP	1,1	BOLF1
DQ	1,2	BOLF1
DR	1,1	BOLF1
DS	1,2	BOLF1
DT	1,1	BORF1
DU	1,3	BORF1
DW	1,3	BORF1
DX	1,2	BORF1/ BORF2
DY	1,2	BORF2
DZ	1,2	BORF2
EA	1,3	BORF2
EB	1,1	BORF2
EC	1,4	BORF2/ BaRF1

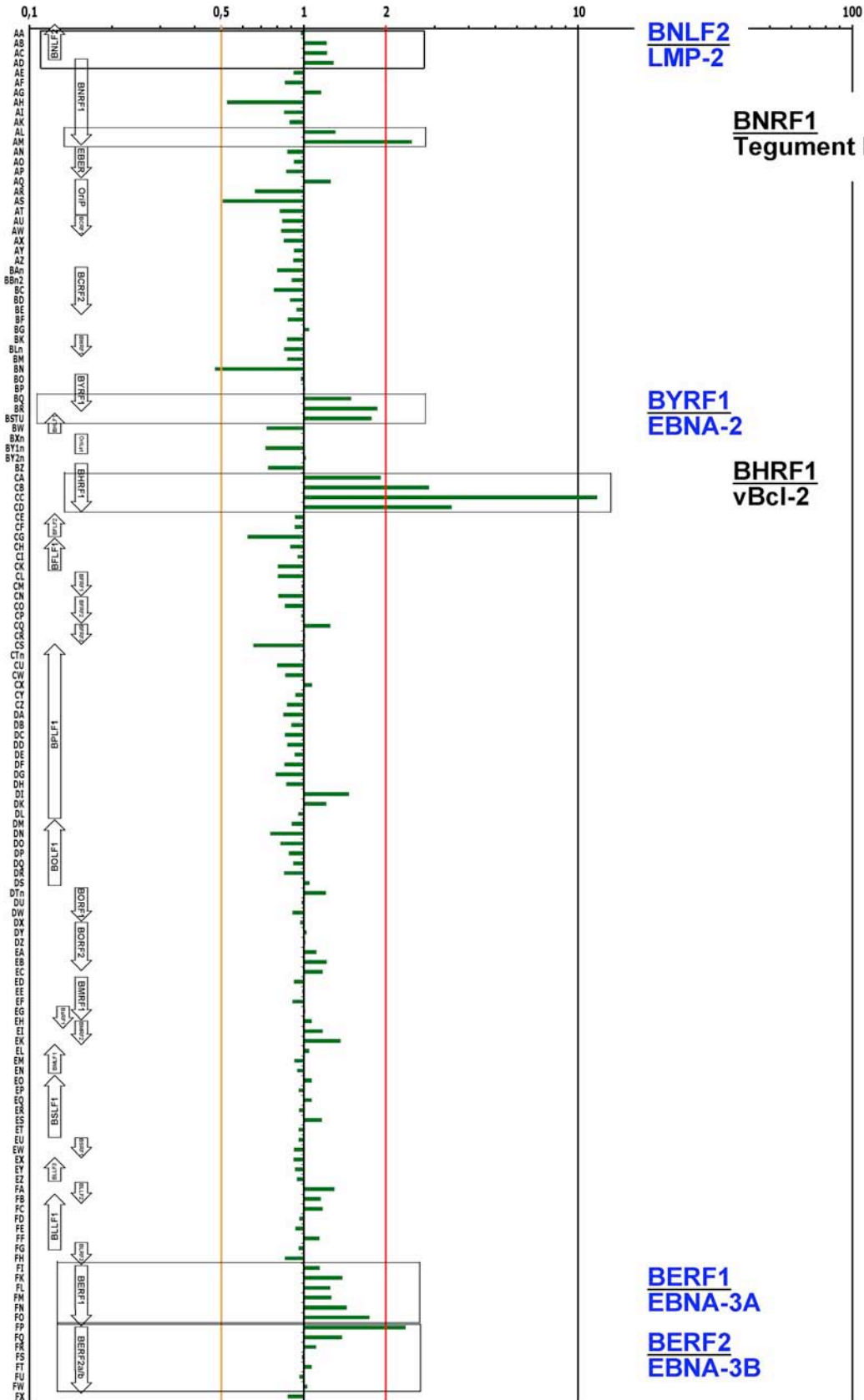
ED	1,3	BaRF1/ BMRF1
EE	1,2	BaRF1/ BMRF1
EF	1,2	BMRF1
EG	1,3	BMRF1
EH	1,1	BMRF1/ BMRF2
EI	1,4	BMRF2
EK	1,3	BMRF2
EL	1,4	BMLF1
EM	1,2	BMLF1
EN	1,4	BMLF1
EO	1,3	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1
EP	1,1	BSLF1
EQ	1,1	BSLF1
ER	1,2	BSLF1
ES	1,2	BSLF1
ET	1,3	BSLF1
EU	1,2	BSLF1/ BSRF1
EW	1,3	BSRF1
EX	1,1	BSRF1/ BLLF3
EY	1,1	BLLF3
EZ	1,0	BLLF3/ BLRF1
FA	1,2	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2
FB	1,3	BLLF1a-b/ BLLF2
FC	1,3	BLLF1a-b
FD	1,2	BLLF1a-b
FE	1,3	BLLF1a-b
FF	1,5	BLLF1a-b
FG	1,4	BLLF1a-b/ BLRF3
FH	1,0	BLRF3/ BERF1
FI	2,3	BERF1
FK	1,3	BERF1
FL	1,2	BERF1
FM	1,2	BERF1
FN	1,1	BERF1
FO	1,2	BERF1
FP	1,0	BERF1/ BERF2a
FQ	1,3	BERF2a/ BERF2b
FR	1,4	BERF2b
FS	1,3	BERF2b
FT	1,2	BERF2b
FU	1,3	BERF2b
FW	1,4	BERF2b
FX	1,1	BERF2b/ BERF3
FY	1,0	BERF3
FZ	1,2	
GA	1,3	
GB	1,3	
GC	1,1	
GD	1,3	BZLF2
GE	1,3	BZLF2
GF	1,4	BZLF1
GG	1,2	BZLF1
GH	1,0	BZLF1/ BRLF1
GI	1,1	BRLF1
GK	1,3	BRLF1
GL	1,2	BRLF1
GM	1,5	BRLF1/ BRRF1
GN	1,2	BRRF1
GO	1,4	BRRF1/ BRRF2
GP	1,3	BRRF2
GQ	1,2	BRRF2
GR	1,1	BRRF2/ BKRF1
GSTn3	1,0	BKRF1
GU	1,1	BKRF1
GW	1,2	BKRF1
GX	1,3	BKRF2/ BKRF3
GY	1,4	BKRF3
GZ	1,1	BKRF3/ BKRF4
HA	1,2	BKRF4/ BBLF4
HB	1,4	BBLF4
HC	1,0	BBLF4
HD	1,1	BBLF4
HE	1,1	BBLF4
HF	1,1	BBLF4/ BBRF1
HG	1,1	BBRF1
HH	1,3	BBRF1
HI	1,1	BBRF1
HK	1,0	BBRF1/ BBRF2
HL	1,3	BBRF2/ BBLF3
HM	1,2	BBLF3
HN	1,1	BBLF2
HO	1,0	BBLF2
HP	1,1	BBLF2
HQ	1,2	BBLF2/ BBRF3
HR	1,4	BBRF3
HS	1,0	BBRF3
HT	1,3	BBLF1/ BGLF5
HU	1,4	BGLF5
HW	1,1	BGLF5
HX	1,2	BGLF5/ BGLF4
HY	1,3	BGLF4
HZ	1,5	BGLF4
IA	1,3	BGLF4/ BGLF3
IB	1,1	BGLF3
IC	1,3	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1
ID	1,5	BDRF1/ BGRF1
IE	1,3	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2

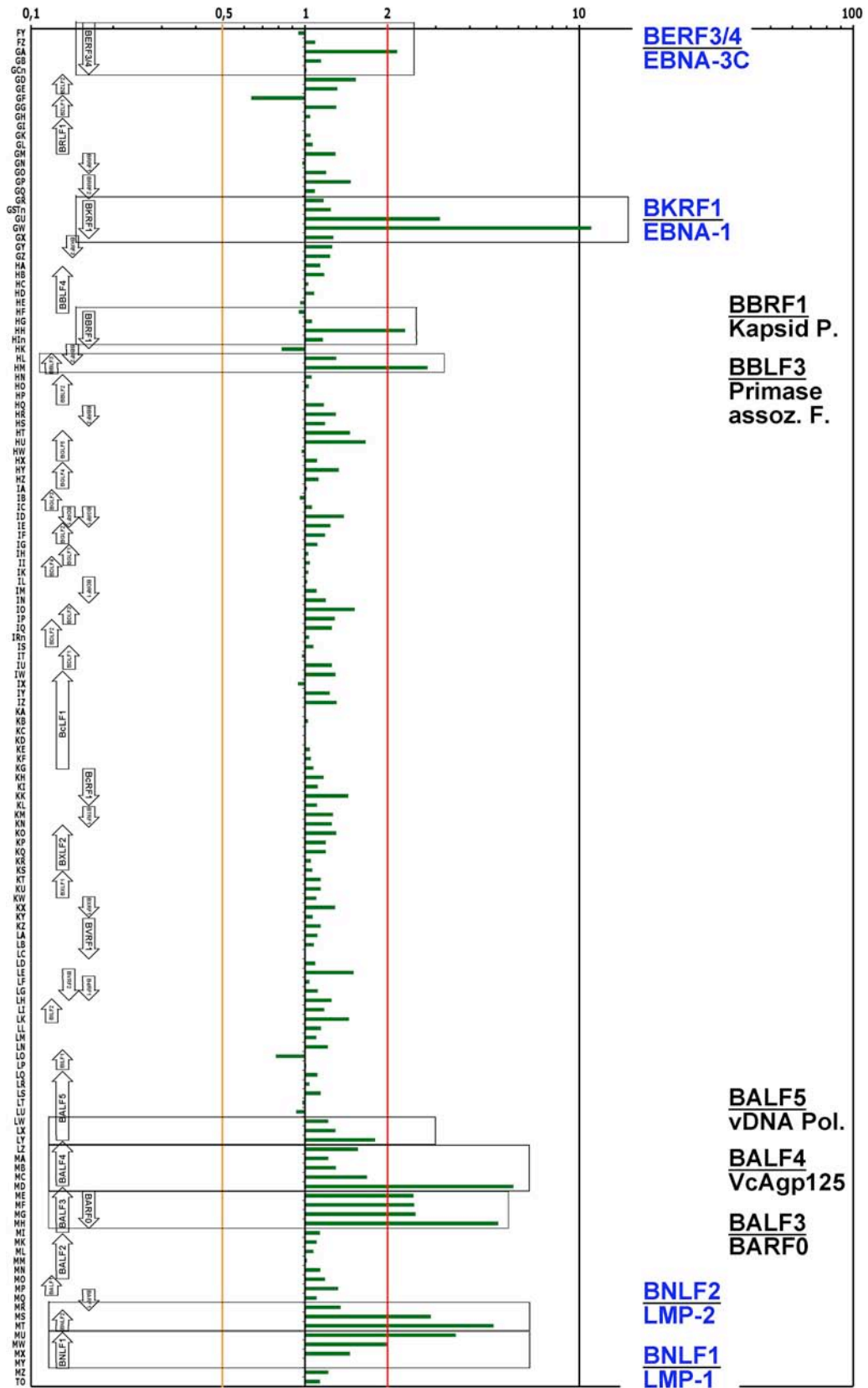
IF	1,4	BGLF2
IG	1,2	BGLF2/ BGLF1
IH	1,1	BGLF1
II	1,3	BGLF1/ BDLF4
IK	1,2	BDLF4
IL	1,4	BDRF1
IM	1,2	BDRF1
IN	1,4	BDRF1
IO	1,3	BDLF3
IP	1,4	BDLF3/ BDLF2
IQ	1,3	BDLF2
IR	1,4	BDLF2
IS	1,2	BDLF2/ BDLF1
IT	1,1	BDLF1
IU	1,3	BDLF1
IW	1,3	BcLF1
IX	1,0	BcLF1
IY	1,3	BcLF1
IZ	1,5	BcLF1
KA	1,7	BcLF1
KB	1,3	BcLF1
KC	1,2	BcLF1
KD	1,2	BcLF1
KE	1,1	BcLF1
KF	1,1	BcLF1
KG	1,3	BcLF1/ BcRF1
KH	1,1	BcRF1
KJ	1,2	BcRF1
KK	1,6	BcRF1
KL	1,2	BcRF1/ BTRF1
KM	1,2	BTRF1
KN	1,0	BTRF1/ BXLF2
KO	1,3	BXLF2
KP	1,3	BXLF2
KQ	1,4	BXLF2
KR	1,2	BXLF2
KS	1,4	BXLF2/ BXLF1
KT	1,2	BXLF1
KU	1,1	BXLF1
KV	1,3	BXLF1/ BXRf1
KX	1,3	BXRf1
KY	1,0	BXRf1/ BVRF1
KZ	1,2	BVRF1
LA	1,1	BVRF1
LB	1,1	BVRF1
LC	0,9	BVRF1
LD	1,2	
LE	1,2	BVRF2
LF	1,2	BVRF2/ BdRF1
LG	1,1	BVRF2/ BdRF1
LH	1,3	BVRF2/ BdRF1/ BILF2
LI	1,3	BILF2 (a,b,c,d)
LK	1,3	BILF2 (a,b,c,d)
LL	1,2	
LM	1,1	
LN	1,3	
LO	0,8	BILF1
LP	1,2	BILF1
LQ	1,2	BALF5
LR	1,1	BALF5
LS	1,2	BALF5
LT	1,1	BALF5
LU	0,9	ECRF4/ BALF5
LW	1,0	ECRF4/ BALF5
LX	1,2	ECRF4/ BALF5
LY	1,3	BALF5/ BALF4
LZ	1,4	BALF4
MA	1,2	BALF4
MB	1,2	BALF4
MC	1,2	BALF4
MD	2,2	BALF4/ BALF3
ME	1,1	BARF0/ BALF3
MF	1,3	BARF0/ BALF3
MG	1,1	BARF0/ BALF3
MH	1,0	BARF0/ BALF3
MI	1,2	BALF3/ BALF2
MK	1,1	BALF3/ BALF2
ML	1,1	BALF2
MM	1,1	BALF2
MN	1,0	BALF2
MO	1,2	BALF2/ BALF1
MP	1,4	BALF1/ BARF1
MQ	1,3	BARF1
MR	1,5	BARF1
MS	0,9	BNLF2b
MT	1,3	BNLF2b/ BNLF2a
MU	1,2	BNLF1
MW	1,1	BNLF1
MX	1,3	BNLF1
MY	1,3	BNLF1
MZ	1,3	
TO	1,2	

Vergleich der Expressionsprofile von LCL721 versus BJAB-Zellen

Latente Gene in blau

Lytische Gene in schwarz



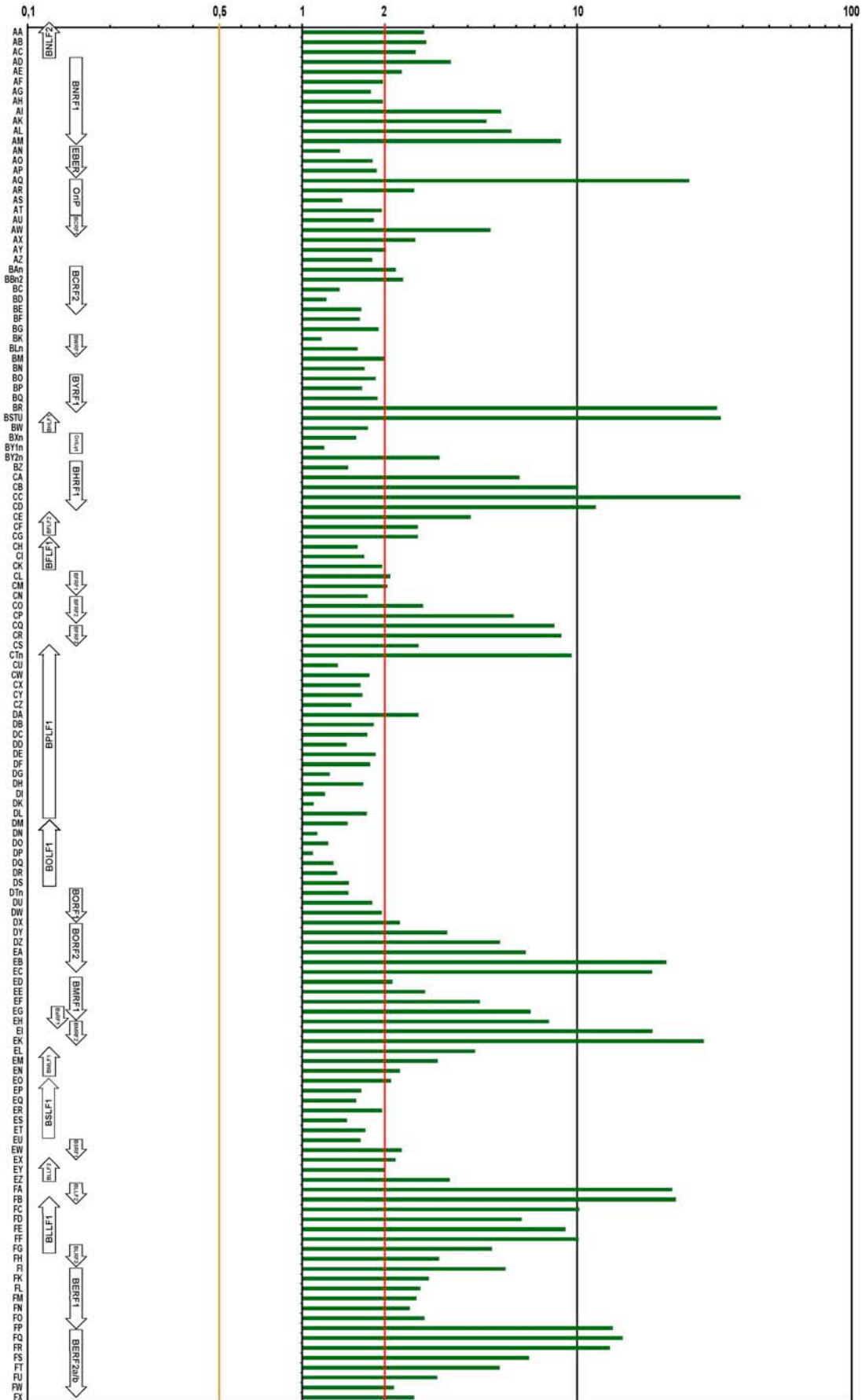


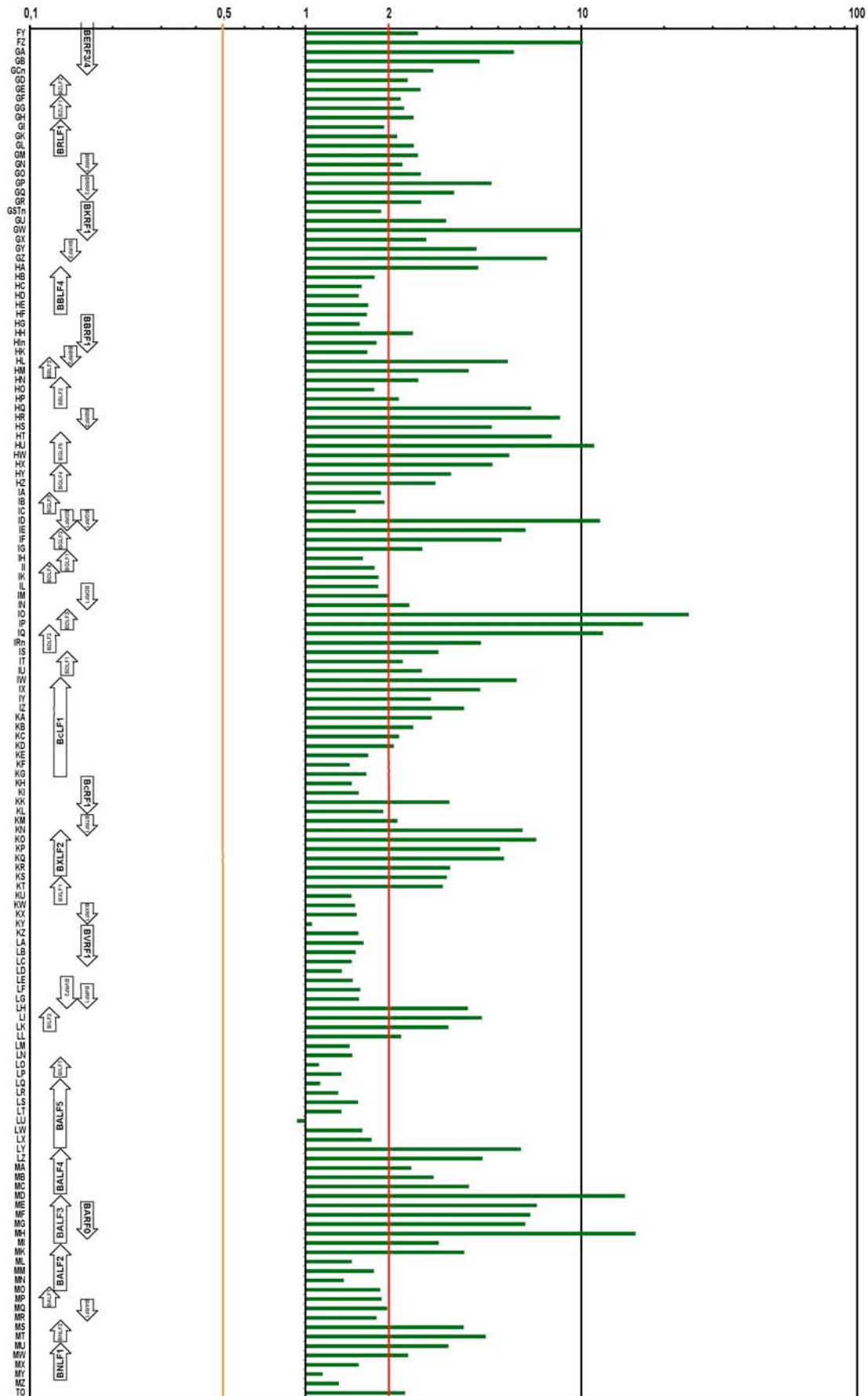
Tab. G: Expressionsprofil von EBV in der latenten und spontan lytischen Zelllinie B95.8 im Vergleich zur EBV-negativen BJAB-Zelllinie

Aufgelistet sind sämtliche EBV-Fragmente, die äquivalenten EBV-Gene und die Expressionsverhältnisse ('ratios'). Expressionsverhältnisse die über dem Schwellenwert von 2 liegen sind rot unterlegt. Im Anschluss befindet sich eine graphische Darstellung des genomweiten EBV-Expressionsprofils.

Fragment	ratio	Gen	EK	ratio	EMRF2	IS	ratio	BDLF2/BDLF1
AA	2.78	BNLF2a/b	EL	4.27	BMLF1	IT	2.25	BDLF1
AB	2.84	BNLF2a/b	EM	3.12	BMLF1	IU	2.65	BDLF1
AC	2.59	BNLF2a/b	EN	2.27	BMLF1	IW	5.83	BcLF1
AD	3.48	BNRF1	EO	2.11	BMLF1/BSLF2/BSLF1	IX	4.30	BcLF1
AE	2.30	BNRF1	EP	1.64	BSLF1	IY	2.65	BcLF1
AF	1.97	BNRF1	EQ	1.58	BSLF1	IZ	3.76	BcLF1
AG	1.78	BNRF1	ER	1.96	BSLF1	KA	2.87	BcLF1
AH	1.97	BNRF1	ES	1.46	BSLF1	KB	2.46	BcLF1
AI	5.31	BNRF1	ET	1.70	BSLF1	KC	2.19	BcLF1
AK	4.70	BNRF1	EU	1.64	BSLF1/BSRF1	KD	2.09	BcLF1
AL	5.78	BNRF1	EW	2.31	BSRF1	KE	1.69	BcLF1
AM	8.76	BNRF1	EX	2.19	BSRF1/BLLF3	KF	1.45	BcLF1
AN	1.37	EBER1	EY	1.99	BLLF3	KG	1.66	BcLF1/BcRF1
AO	1.81	EBER1&2	EZ	3.45	BLLF3/BLRF1	KH	1.47	BcRF1
AP	1.87	EBER1&2	FA	22.25	BLRF2/BLLF1b/BLLF2	KI	1.56	BcRF1
AQ	25.62		FB	22.95	BLLF1a-b/BLLF2	KK	3.33	BcRF1
AR	2.56		FC	10.21	BLLF1a-b	KL	1.91	BcRF1/BTRF1
AS	1.40		FD	6.31	BLLF1a-b	KM	2.16	BTRF1
AT	1.95		FE	9.09	BLLF1a-b	KN	6.13	BTRF1/BXLF2
AU	1.82	BCRF1	FF	10.17	BLLF1a-b	KO	6.86	BXLF2
AW	4.86	BCRF1	FG	4.91	BLLF1a-b/BLRF3	KP	5.08	BXLF2
AX	2.58		FH	3.15	BLRF3/BERF1	KQ	5.24	BXLF2
AY	2.02		FI	5.51	BERF1	KR	3.34	BXLF2
AZ	1.81		FK	2.90	BERF1	KS	3.26	BXLF2/BXLF1
BA	2.20	BCRF2	FL	2.70	BERF1	KT	3.14	BXLF1
BB	2.33	BCRF2	FM	2.61	BERF1	KU	1.47	BXLF1
BC	1.37	BCRF2	FN	2.47	BERF1	KW	1.51	BXLF1/BXRF1
BD	1.23	BCRF2	FO	2.79	BERF1	KX	1.54	BXRF1
BE	1.64	BCRF2	FP	13.53	BERF1/BERF2a	KY	1.06	BXRF1/BVRF1
BF	1.63		FQ	14.68	BERF2a/BERF2b	KZ	1.55	BVRF1
BG	1.90		FR	13.21	BERF2b	LA	1.62	BVRF1
BK	1.18	BWRF1	FS	6.71	BERF2b	LB	1.52	BVRF1
BL	1.59	BWRF1	FT	5.24	BERF2b	LC	1.47	BVRF1
BM	1.99		FU	3.10	BERF2b	LD	1.35	
BN	1.69		FW	2.17	BERF2b	LE	1.48	BVRF2
BO	1.86	BYRF1	FX	2.56	BERF2b/BERF3	LF	1.58	BVRF2/BdRF1
BP	1.65	BYRF1	FY	2.55	BERF3	LG	1.57	BVRF2/BdRF1
BQ	1.88	BYRF1	FZ	10.14		LH	3.88	BVRF2/BdRF1/BILF2
BR	32.39	BYRF1	GA	5.71		LI	4.37	BILF2 (a,b,c,d)
BSTUn2	33.44	BHLF1	GB	4.28		LK	3.30	BILF2 (a,b,c,d)
BW	1.74	BHLF1	GC	2.91		LL	2.22	
BX	1.58		GD	2.35	BZLF2	LM	1.45	
BY1n	1.21		GE	2.62	BZLF2	LN	1.48	
BY2n	3.16		GF	2.22	BZLF1	LO	1.12	BILF1
BZ	1.47		GG	2.28	BZLF1	LP	1.35	BILF1
CA	6.19	BHRF1	GH	2.47	BZLF1/BRLF1	LQ	1.13	BALF5
CB	10.13	BHRF1	GI	1.93	BRLF1	LR	1.31	BALF5
CC	39.50	BHRF1	GK	2.15	BRLF1	LS	1.55	BALF5
CD	11.75	BHRF1	GL	2.47	BRLF1	LT	1.35	BALF5
CE	4.11	BFLF2	GM	2.56	BRLF1/BRRF1	LU	0.93	ECRF4/BALF5
CF	2.64	BFLF2	GN	2.24	BRRF1	LW	1.61	ECRF4/BALF5
CG	2.64	BFLF2/BFLF1	GO	2.62	BRRF1/BRRF2	LX	1.74	ECRF4/BALF5
CH	1.59	BFLF1	GP	4.73	BRRF2	LY	6.05	BALF5/BALF4
CI	1.69	BFLF1	GQ	3.45	BRRF2	LZ	4.38	BALF4
CK	1.96	BFLF1	GR	2.63	BRRF2/BKRF1	MA	2.42	BALF4
CL	2.10	BFRF1	GSTn3	1.88	BKRF1	MB	2.91	BALF4
CM	2.04	BFRF1	GU	3.24	BKRF1	MC	3.91	BALF4
CN	1.73	BFRF1/BFRF2	GV	10.04	BKRF1	MD	14.42	BALF4/BALF3
CO	2.76	BFRF2	GW	2.74	BKRF2/BKRF3	ME	6.91	BARF0/BALF3
CP	5.90	BFRF2	GX	4.17	BKRF3	MF	6.53	BARF0/BALF3
CQ	8.30	BFRF2/BFRF3	GY	7.50	BKRF3/BKRF4	MG	6.27	BARF0/BALF3
CR	8.78	BFRF3	HA	4.23	BKRF4/BBLF4	MH	15.74	BARF0/BALF3
CS	2.66	BPLF1	HB	1.78	BBLF4	MI	3.04	BALF3/BALF2
CT	9.58	BPLF1	HC	1.60	BBLF4	MK	3.77	BALF3/BALF2
CU	1.35	BPLF1	HD	1.56	BBLF4	ML	1.47	BALF2
CW	1.76	BPLF1	HE	1.69	BBLF4	MM	1.77	BALF2
CX	1.63	BPLF1	HF	1.67	BBLF4/BBRF1	MN	1.38	BALF2
CY	1.66	BPLF1	HG	1.57	BBRF1	MO	1.87	BALF2/BALF1
CZ	1.51	BPLF1	HH	2.45	BBRF1	MP	1.89	BALF1/BARF1
DA	2.66	BPLF1	HI	1.81	BBRF1	MQ	1.98	BARF1
DB	1.83	BPLF1	HK	1.67	BBRF1/BBRF2	MR	1.81	BARF1
DC	1.73	BPLF1	HL	5.41	BBRF2/BBLF3	MS	3.75	BNLF2b
DD	1.46	BPLF1	HM	3.90	BBLF3	MT	4.52	BNLF2b/BNLF2a
DE	1.85	BPLF1	HN	2.57	BBLF2	MU	3.30	BNLF1
DF	1.77	BPLF1	HO	1.77	BBLF2	MW	2.36	BNLF1
DG	1.26	BPLF1	HP	2.18	BBLF2	MX	1.56	BNLF1
DH	1.67	BPLF1	HQ	6.59	BBLF2/BBRF3	MY	1.15	BNLF1
DI	1.21	BPLF1	HR	8.37	BBRF3	MZ	1.32	
DK	1.10	BPLF1	HS	4.74	BBRF3	TO	2.30	
DL	1.72	BPLF1	HT	7.82	BBLF1/BGLF5			
DM	1.47	BPLF1/BOLF1	HU	11.14	BGLF5			
DN	1.14	BOLF1	HW	5.49	BGLF5			
DO	1.25	BOLF1	HX	4.77	BGLF5/BGLF4			
DP	1.10	BOLF1	HY	3.37	BGLF4			
DQ	1.30	BOLF1	HZ	2.97	BGLF4			
DR	1.34	BOLF1	IA	1.88	BGLF4/BGLF3			
DS	1.48	BOLF1	IB	1.93	BGLF3			
DT	1.48	BORF1	IC	1.52	BGLF3/BDRF1/BGRF1			
DU	1.80	BORF1	ID	11.71	BDRF1/BGRF1			
DW	1.95	BORF1	IE	6.29	BDRF1/BGRF1/BGLF2			
DX	2.27	BORF1/BORF2	IF	5.14	BGLF2			
DY	3.38	BORF2	IG	2.65	BGLF2/BGLF1			
DZ	5.27	BORF2	IH	1.62	BGLF1			
EA	6.52	BORF2	II	1.78	BGLF1/BDLF4			
EB	21.17	BORF2	IK	1.84	BDLF4			
EC	18.83	BORF2/BaRF1	IL	1.83	BDRF1			
ED	2.14	BaRF1/BMRF1	IM	1.98	BDRF1			
EE	2.81	BaRF1/BMRF1	IN	2.38	BDRF1			
EF	4.44	BMRF1	IO	24.53	BDLF3			
EG	6.78	BMRF1	IP	16.72	BDLF3/BDLF2			
EH	7.91	BMRF1/BMRF2	IQ	12.00	BDLF2			
EI	18.84	BMRF2	IR	4.32	BDLF2			

Vergleich der Genexpressionsprofile von B95.8- versus BJAB-Zellen



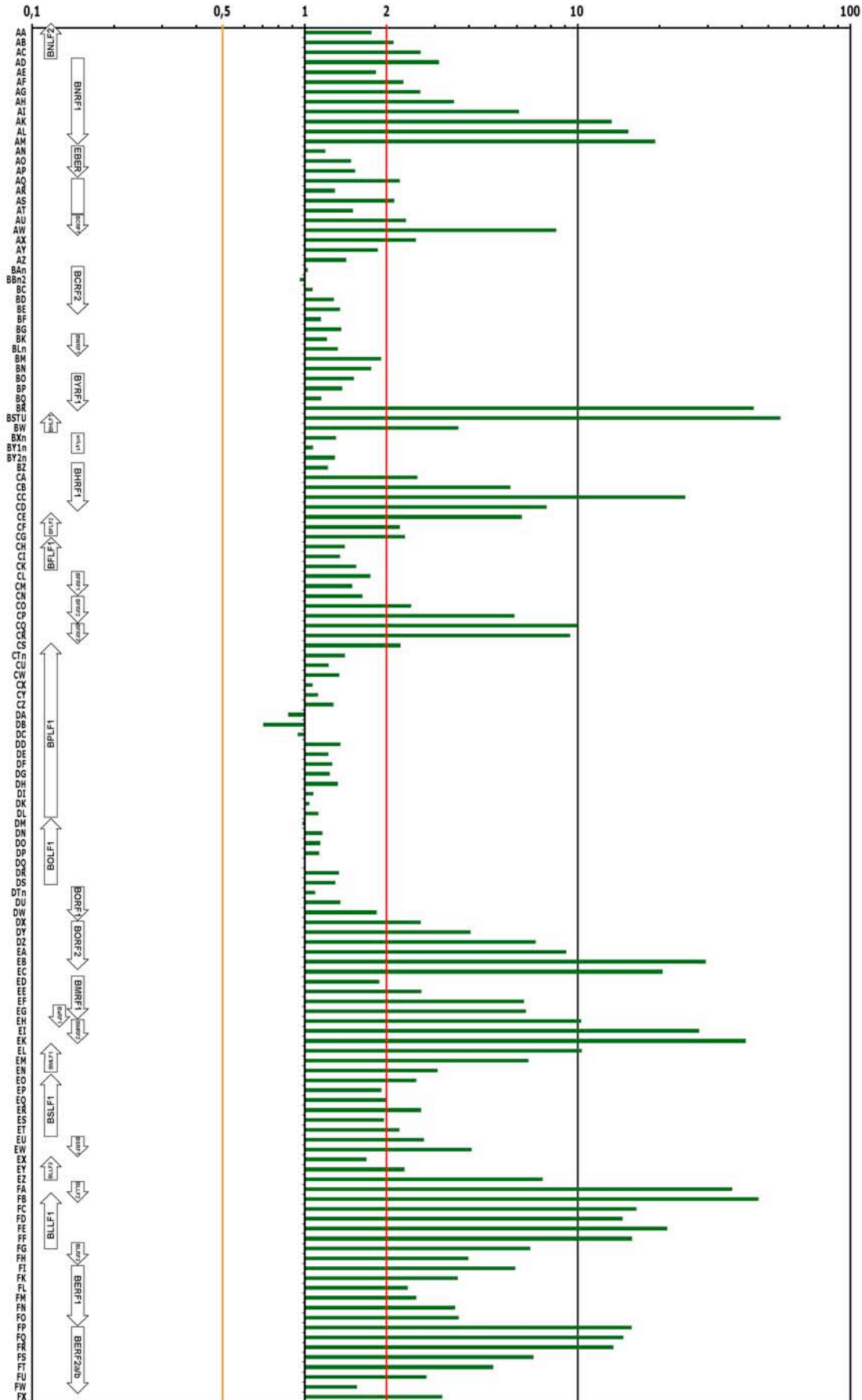


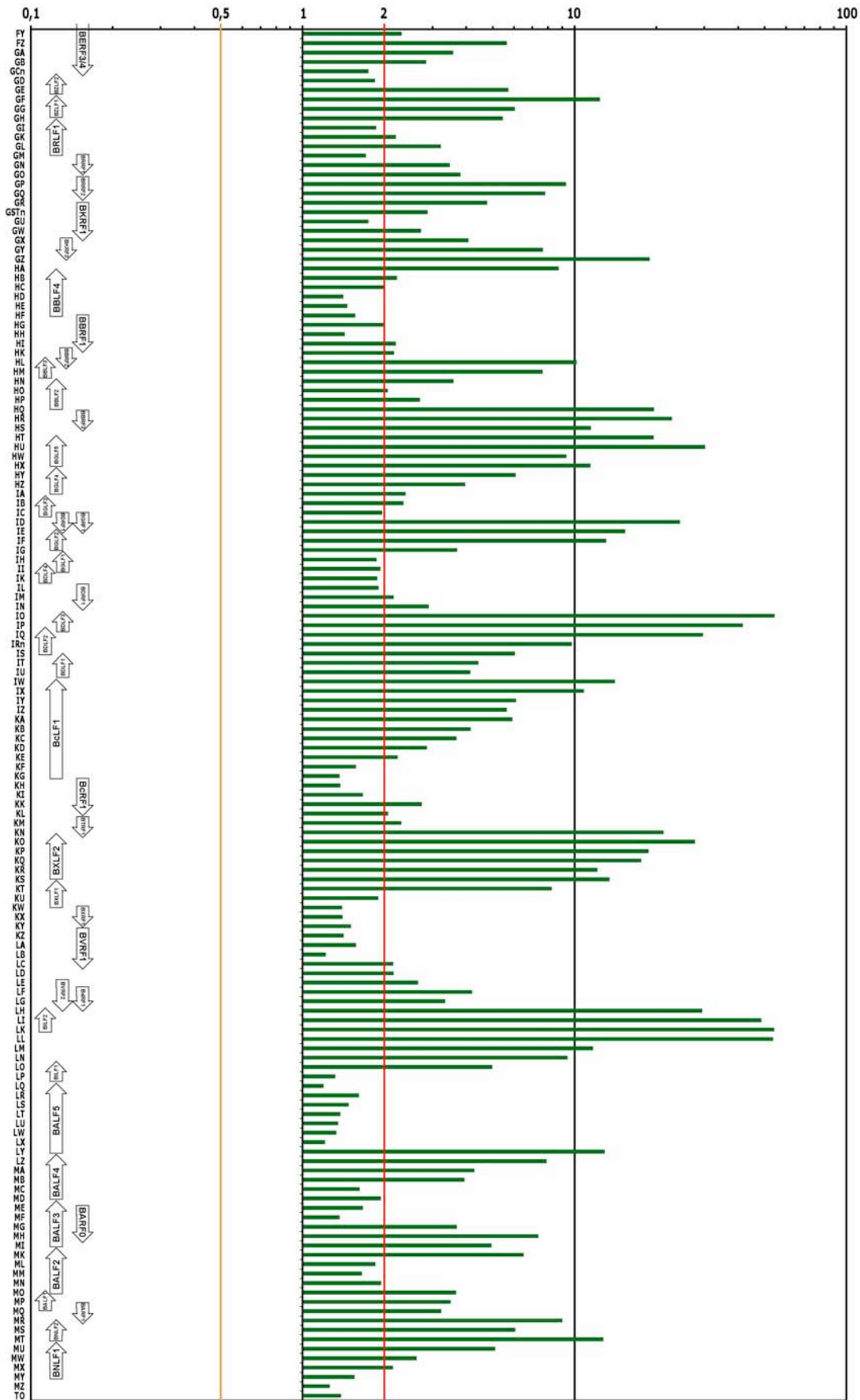
Tab. H: Expressionsprofil von EBV in lytisch induzierten HEK293/TR⁻-Zellen im Vergleich zu HEK293-Zellen

Aufgelistet sind sämtliche EBV-Fragmente, die äquivalenten EBV-Gene und die Expressionsverhältnisse ('ratios'). Expressionsverhältnisse die über dem Schwellenwert von 2 liegen sind rot unterlegt. Im Anschluss befindet sich eine graphische Darstellung des genomweiten EBV-Expressionsprofils.

Fragment	ratio	Gen						
AA	1,76	BNLF2a/b	EK	41,40	BMBF2	IS	6,04	BDLF2/ BDLF1
AB	2,12	BNLF2a/b	EL	10,40	BMLF1	IT	4,43	BDLF1
AC	2,67	BNLF2a/b	EM	6,61	BMLF1	IU	4,15	BDLF1
AD	3,11	BNRF1	EN	3,07	BMLF1	IW	14,11	BcLF1
AE	1,83	BNRF1	EO	2,58	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1	IX	10,94	BcLF1
AF	2,31	BNRF1	EP	1,82	BSLF1	IY	6,11	BcLF1
AG	2,66	BNRF1	EQ	1,99	BSLF1	IZ	5,64	BcLF1
AH	3,53	BNRF1	ER	2,67	BSLF1	KA	5,91	BcLF1
AI	6,11	BNRF1	ES	1,96	BSLF1	KB	4,16	BcLF1
AK	13,35	BNRF1	ET	2,23	BSLF1	KC	3,68	BcLF1
AL	15,41	BNRF1	EU	2,74	BSLF1/ BSRF1	KD	2,87	BcLF1
AM	19,27	BNRF1	EW	4,09	BSRF1	KE	2,24	BcLF1
AN	1,19	EBER1	EX	1,68	BSRF1/ BLLF3	KF	1,58	BcLF1
AO	1,48	EBER1&2	EY	2,32	BLLF3	KG	1,37	BcLF1/ BcRF1
AP	1,53	EBER1&2	EZ	7,46	BLLF3/ BLRF1	KH	1,38	BcRF1
AQ	2,23		FA	36,92	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2	KI	1,67	BcRF1
AR	1,29		FB	46,15	BLLF1a-b/ BLLF2	KK	2,75	BcRF1
AS	2,13		FC	16,46	BLLF1a-b	KL	2,07	BcRF1/ BTRF1
AT	1,51		FD	14,64	BLLF1a-b	KM	2,31	BTRF1
AU	2,36	BCRF1	FE	21,33	BLLF1a-b	KN	21,28	BTRF1/ BXLF2
AW	8,37	BCRF1	FF	15,88	BLLF1a-b	KO	27,79	BXLF2
AX	2,56		FG	6,73	BLLF1a-b/ BLRF3	KP	18,76	BXLF2
AY	1,86		FH	3,99	BLRF3/ BERF1	KQ	17,62	BXLF2
AZ	1,42		FI	5,92	BERF1	KR	12,18	BXLF2
BA	1,03	BCRF2	FK	3,64	BERF1	KS	19,47	BXLF2/ BXLF1
BB	0,96	BCRF2	FL	2,39	BERF1	KT	8,25	BXLF1
BC	1,07	BCRF2	FM	2,57	BERF1	KU	1,90	BXLF1
BD	1,28	BCRF2	FN	3,57	BERF1	KW	1,40	BXLF1/ BXRf1
BE	1,35	BCRF2	FO	3,68	BERF1	KX	1,41	BXRf1
BF	1,15		FP	15,83	BERF1/ BERF2a	KY	1,51	BXRf1/ BVRF1
BG	1,36		FQ	14,75	BERF2a/ BERF2b	KZ	1,42	BVRF1
BK	1,21	BWRF1	FR	13,57	BERF2b	LA	1,57	BVRF1
BL	1,33	BWRF1	FS	6,91	BERF2b	LB	1,22	BVRF1
BM	1,91		FT	4,92	BERF2b	LC	2,16	BVRF1
BN	1,76		FU	2,80	BERF2b	LD	2,16	
BO	1,52	BYRF1	FW	1,56	BERF2b	LE	2,66	BVRF2
BP	1,38	BYRF1	FX	3,20	BERF2b/ BERF3	LF	4,21	BVRF2/ Bdrf1
BQ	1,15	BYRF1	FY	2,32	BERF3	LG	3,35	BVRF2/ Bdrf1
BR	44,31	BYRF1	FZ	5,65		LH	29,55	BVRF2/ Bdrf1/ BILF2
BSTUn2	55,54	BHLF1	GA	3,58		LI	48,77	BILF2 (a,b,c,d)
BW	3,66	BHLF1	GB	2,85		LK	54,34	BILF2 (a,b,c,d)
BX	1,30		GC	1,75		LL	53,79	
BY1n	1,07		GD	1,85	BZLF2	LM	11,74	
BY2n	1,29		GE	5,72	BZLF2	LN	9,43	
BZ	1,22		GF	12,44	BZLF1	LO	4,99	BILF1
CA	2,59	BHRF1	GG	6,04	BZLF1	LP	1,32	BILF1
CB	5,68	BHRF1	GH	5,46	BZLF1/ BRLF1	LQ	1,20	BALF5
CC	24,85	BHRF1	GI	1,87	BRLF1	LR	1,61	BALF5
CD	7,71	BHRF1	GK	2,21	BRLF1	LS	1,48	BALF5
CE	6,25	BFLF2	GL	3,23	BRLF1	LT	1,38	BALF5
CF	2,24	BFLF2	GM	1,71	BRLF1/ BRRF1	LU	1,35	ECRF4/ BALF5
CG	2,33	BFLF2/ BFLF1	GN	3,48	BRRF1	LW	1,33	ECRF4/ BALF5
CH	1,40	BFLF1	GO	3,81	BRRF1/ BRRF2	LX	1,21	ECRF4/ BALF5
CI	1,35	BFLF1	GP	9,33	BRRF2	LY	12,93	BALF5/ BALF4
CK	1,54	BFLF1	GQ	7,81	BRRF2	LZ	7,92	BALF4
CL	1,75	BFRF1	GR	4,79	BRRF2/ BKRF1	MA	4,29	BALF4
CM	1,49	BFRF1	GStn3	2,88	BKRF1	MB	3,94	BALF4
CN	1,63	BFRF1/ BFRF2	GU	1,75	BKRF1	MC	1,62	BALF4
CO	2,46	BFRF2	GW	2,73	BKRF1	MD	1,94	BALF4/ BALF3
CP	5,99	BFRF2	GX	4,08	BKRF2/ BKRF3	ME	1,67	BARF0/ BALF3
CQ	10,03	BFRF2/ BFRF3	GY	7,67	BKRF3	MF	1,37	BARF0/ BALF3
CR	9,41	BFRF3	GZ	18,91	BKRF3/ BKRF4	MG	3,70	BARF0/ BALF3
CS	2,25	BPLF1	HA	8,76	BKRF4/ BBLF4	MH	7,37	BARF0/ BALF3
CT	1,40	BPLF1	HB	2,23	BBLF4	MI	4,96	BALF3/ BALF2
CU	1,23	BPLF1	HC	2,01	BBLF4	MK	6,52	BALF3/ BALF2
CW	1,34	BPLF1	HD	1,41	BBLF4	ML	1,86	BALF2
CX	1,07	BPLF1	HE	1,46	BBLF4	MM	1,65	BALF2
CY	1,12	BPLF1	HF	1,56	BBLF4/ BBRF1	MN	1,95	BALF2
CZ	1,28	BPLF1	HG	2,01	BBRF1	MO	3,67	BALF2/ BALF1
DA	0,87	BPLF1	HH	1,43	BBRF1	MP	3,51	BALF1/ BARF1
DB	0,70	BPLF1	HI	2,20	BBRF1	MQ	3,24	BARF1
DC	0,94	BPLF1	HK	2,17	BBRF1/ BBRF2	MR	9,03	BARF1
DD	1,35	BPLF1	HL	10,19	BBRF2/ BBLF3	MS	6,06	BNLF2b
DE	1,22	BPLF1	HM	7,65	BBLF3	MT	12,78	BNLF2b/ BNLF2a
DF	1,27	BPLF1	HN	3,60	BBLF2	MU	5,11	BNLF1
DG	1,24	BPLF1	HO	2,06	BBLF2	MW	2,64	BNLF1
DH	1,33	BPLF1	HP	2,71	BBLF2	MX	2,15	BNLF1
DI	1,08	BPLF1	HQ	19,64	BBLF2/ BBRF3	MY	1,55	BNLF1
DK	1,04	BPLF1	HR	22,86	BBRF3	MZ	1,26	
DL	1,13	BPLF1	HS	11,51	BBRF3	TO	1,39	
DM	0,98	BPLF1/ BOLF1	HT	19,60	BBLF1/ BGLF5			
DN	1,17	BOLF1	HU	30,30	BGLF5			
DO	1,14	BOLF1	HW	9,34	BGLF5			
DP	1,13	BOLF1	HX	11,46	BGLF5/ BGLF4			
DQ	1,00	BOLF1	HY	6,09	BGLF4			
DR	1,34	BOLF1	HZ	3,96	BGLF4			
DS	1,30	BOLF1	IA	2,40	BGLF4/ BGLF3			
DT	1,09	BORF1	IB	2,36	BGLF3			
DU	1,35	BORF1	IC	1,97	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1			
DW	1,84	BORF1	ID	24,44	BDRF1/ BGRF1			
DX	2,67	BORF1/ BORF2	IE	15,38	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2			
DY	4,06	BORF2	IF	13,09	BGLF2			
DZ	7,03	BORF2	IG	3,71	BGLF2/ BGLF1			
EA	9,09	BORF2	IH	1,87	BGLF1			
EB	29,58	BORF2	II	1,94	BGLF1/ BDLF4			
EC	20,50	BORF2/ BaRF1	IK	1,88	BDLF4			
ED	1,88	BaRF1/ BMBRF1	IL	1,91	BDRF1			
EE	2,68	BaRF1/ BMBRF1	IM	2,17	BDRF1			
EF	6,38	BMBRF1	IN	2,91	BDRF1			
EG	6,47	BMBRF1	IO	54,54	BDLF3			
EH	10,35	BMBRF1/ BMBRF2	IP	41,64	BDLF3/ BDLF2			
EI	28,01	BMBRF2	IQ	29,71	BDLF2			
			IR	9,81	BDLF2			

Vergleich von mit BZLF1 transfizierten und lytisch induzierten HEK293/TR-- versus HEK293-Zellen



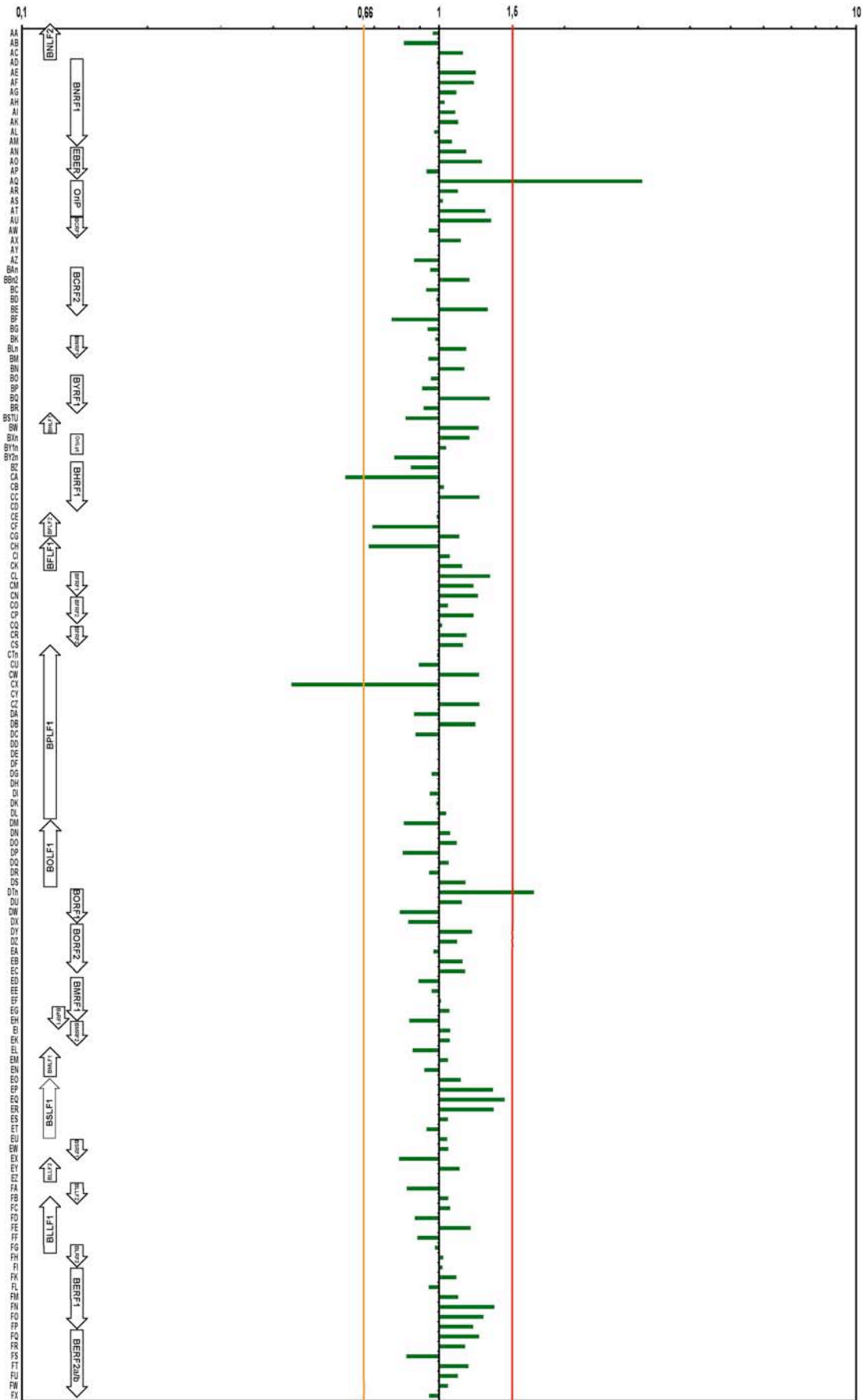


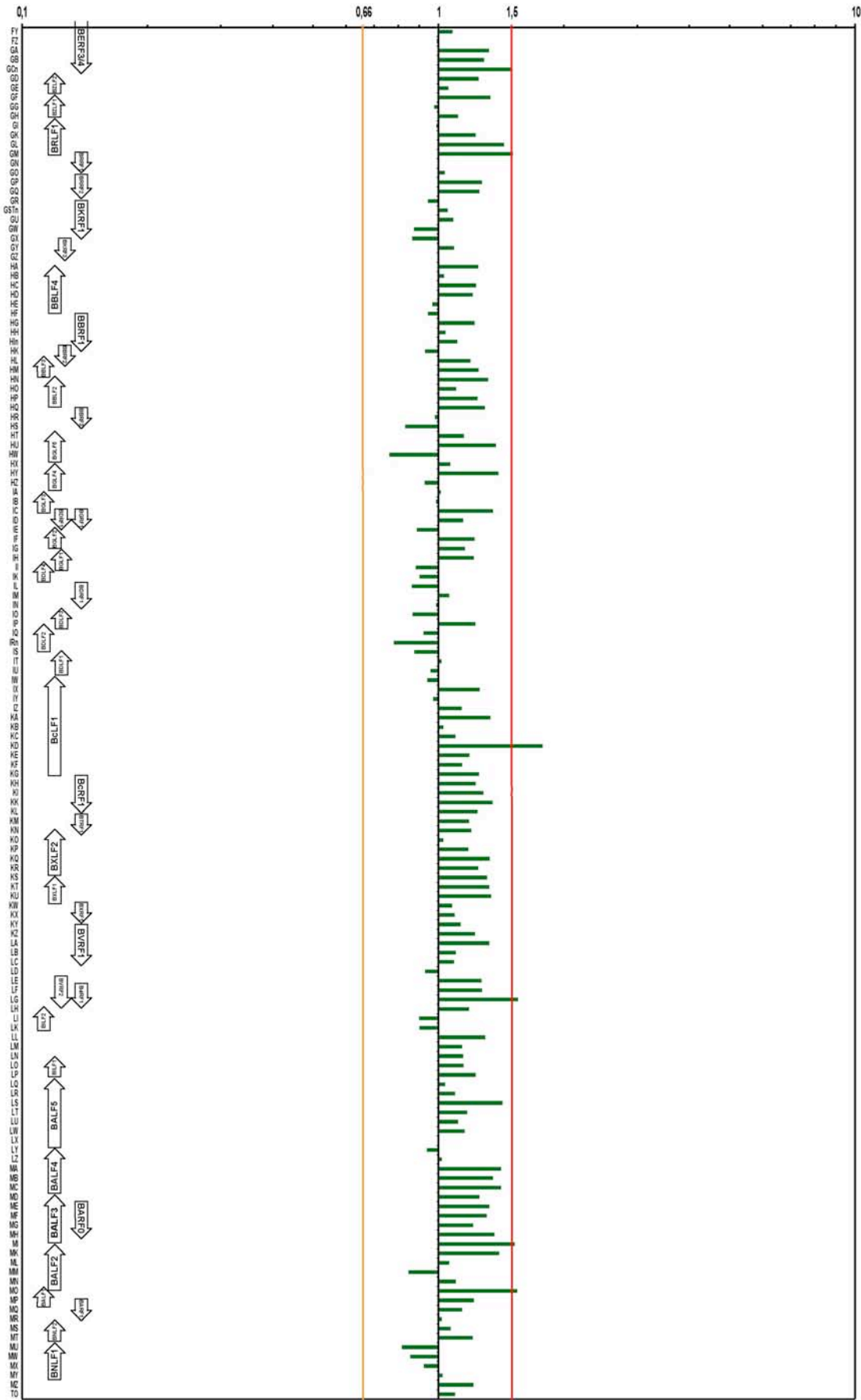
Tab. I: Expressionsprofil von EBV nach transienter Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA in HEK293-Zellen

Aufgelistet sind sämtliche EBV-Fragmente, die äquivalenten EBV-Gene und die Expressionsverhältnisse ('ratios'). Expressionsverhältnisse die unter dem Schwellenwert von 0,66 bzw. über 1,5 liegen sind gelb bzw. rot unterlegt. Im Anschluss befindet sich eine graphische Darstellung des genomweiten EBV-Expressionsprofils.

Fragment	ratio	Gen
AA	0,97	BNLF2a/b
AB	0,82	BNLF2a/b
AC	1,14	BNLF2a/b
AD	0,99	BNRF1
AE	1,23	BNRF1
AF	1,22	BNRF1
AG	1,10	BNRF1
AH	1,03	BNRF1
AI	1,09	BNRF1
AK	1,11	BNRF1
AL	0,97	BNRF1
AM	1,07	BNRF1
AN	1,16	EBER1
AO	1,27	EBER1&2
AP	0,93	EBER1&2
AQ	3,07	
AR	1,11	
AS	1,02	
AT	1,29	
AU	1,33	BCRF1
AW	0,94	BCRF1
AX	1,13	
AY	1,00	
AZ	0,87	
BA	0,95	BCRF2
BB	1,18	BCRF2
BC	0,93	BCRF2
BD	0,99	BCRF2
BE	1,31	BCRF2
BF	0,77	
BG	0,94	
BK	0,98	BWRF1
BL	1,16	BWRF1
BM	0,94	
BN	1,15	
BO	0,96	BYRF1
BP	0,91	BYRF1
BQ	1,32	BYRF1
BR	0,92	BYRF1
BSTUn2	0,83	BHLF1
BW	1,25	BHLF1
BX	1,19	
BY1n	1,04	
BY2n	0,78	
BZ	0,86	
CA	0,60	BHRF1
CB	1,03	BHRF1
CC	1,25	BHRF1
CD	1,00	BHRF1
CE	0,99	BFLF2
CF	0,69	BFLF2
CG	1,12	BFLF2/ BFLF1
CH	0,68	BFLF1
CI	1,06	BFLF1
CK	1,14	BFLF1
CL	1,33	BFRF1
CM	1,21	BFRF1
CN	1,24	BFRF1/ BFRF2
CO	1,05	BFRF2
CP	1,21	BFRF2
CQ	1,02	BFRF2/ BFRF3
CR	1,17	BFRF3
CS	1,14	BPLF1
CT	0,99	BPLF1
CU	0,90	BPLF1
CW	1,25	BPLF1
CX	0,44	BPLF1
CY	0,99	BPLF1
CZ	1,25	BPLF1
DA	0,87	BPLF1
DB	1,22	BPLF1
DC	0,88	BPLF1
DD	0,99	BPLF1
DE	1,00	BPLF1
DF	1,01	BPLF1
DG	0,96	BPLF1
DH	0,99	BPLF1
DI	0,95	BPLF1
DK	0,99	BPLF1
DL	1,04	BPLF1
DM	0,82	BPLF1/ BOLF1
DN	1,06	BOLF1
DO	1,10	BOLF1
DP	0,82	BOLF1
DQ	1,06	BOLF1
DR	0,95	BOLF1
DS	1,16	BOLF1
DT	1,69	BORF1
DU	1,13	BORF1
DW	0,81	BORF1
DX	0,84	BORF1/ BORF2
DY	1,20	BORF2
DZ	1,11	BORF2
EA	0,97	BORF2
EB	1,14	BORF2
EC	1,16	BORF2/ BaRF1
ED	0,89	BaRF1/ BMRF1
EE	0,96	BaRF1/ BMRF1
EF	1,01	BMRF1
EG	1,06	BMRF1
EH	0,85	BMRF1/ BMRF2
EI	1,06	BMRF2
EJ	1,13	BMLF1
EK	1,06	BMRF2
EL	0,86	BMLF1
EM	1,05	BMLF1
EN	0,92	BMLF1
EO	1,13	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1
EP	1,35	BSLF1
EQ	1,44	BSLF1
ER	1,35	BSLF1
ES	1,05	BSLF1
ET	0,93	BSLF1
EU	1,05	BSLF1/ BSRF1
EW	1,05	BSRF1
EX	0,80	BSRF1/ BLLF3
EY	1,12	BLLF3
EZ	1,00	BLLF3/ BLRF1
FA	0,84	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2
FB	1,05	BLLF1a-b/ BLLF2
FC	1,07	BLLF1a-b
FD	0,87	BLLF1a-b
FE	1,19	BLLF1a-b
FF	0,89	BLLF1a-b
FG	0,98	BLLF1a-b/ BLRF3
FH	1,02	BLRF3/ BERF1
FI	1,02	BERF1
FK	1,10	BERF1
FL	0,95	BERF1
FM	1,11	BERF1
FN	1,36	BERF1
FO	1,28	BERF1
FP	1,21	BERF1/ BERF2a
FQ	1,25	BERF2a/ BERF2b
FR	1,16	BERF2b
FS	0,83	BERF2b
FT	1,18	BERF2b
FU	1,11	BERF2b
FW	1,05	BERF2b
FX	0,95	BERF2b/ BERF3
FY	1,08	BERF3
FZ	0,99	
GA	1,32	
GB	1,29	
GC	1,51	
GD	1,25	BZLF2
GE	1,06	BZLF2
GF	1,33	BZLF1
GG	0,98	BZLF1
GH	1,11	BZLF1/ BRLF1
GI	0,99	BRLF1
GJ	1,23	BRLF1
GL	1,44	BRLF1
GM	1,51	BRLF1/ BRRF1
GN	1,00	BRRF1
GO	1,04	BRRF1/ BRRF2
GP	1,27	BRRF2
GQ	1,26	BRRF2
GR	0,94	BRRF2/ BKRF1
GSTn3	1,05	BKRF1
GU	1,09	BKRF1
GV	0,87	BKRF1
GX	0,87	BKRF2/ BKRF3
GY	1,09	BKRF3
GZ	1,00	BKRF3/ BKRF4
HA	1,25	BKRF4/ BBLF4
HB	1,03	BBLF4
HC	1,23	BBLF4
HD	1,21	BBLF4
HE	0,97	BBLF4
HF	0,94	BBLF4/ BBRF1
HG	1,22	BBRF1
HH	1,04	BBRF1
HI	1,11	BBRF1
HK	0,93	BBRF1/ BBRF2
HL	1,19	BBRF2/ BBLF3
HM	1,25	BBLF3
HN	1,32	BBLF2
HO	1,10	BBLF2
HP	1,24	BBLF2
HQ	1,29	BBLF2/ BBRF3
HR	0,98	BBRF3
HS	0,83	BBRF3
HT	1,15	BBLF1/ BGLF5
HU	1,38	BGLF5
HW	0,76	BGLF5
HX	1,07	BGLF5/ BGLF4
HY	1,40	BGLF4
HZ	0,93	BGLF4
IA	1,01	BGLF4/ BGLF3
IB	0,99	BGLF3
IC	1,35	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1
ID	1,15	BDRF1/ BGRF1
IE	0,89	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2
IF	1,22	BGLF2
IG	1,16	BGLF2/ BGLF1
IH	1,22	BGLF1
II	0,88	BGLF1/ BDLF4
IK	0,90	BDLF4
IL	0,86	BDRF1
IM	1,06	BDRF1
IN	0,99	BDRF1
IO	0,87	BDLF3
IP	1,23	BDLF3/ BDLF2
IQ	0,92	BDLF2
IR	0,78	BDLF2
IS	0,88	BDLF2/ BDLF1
IT	1,02	BDLF1
IU	0,96	BDLF1
IW	0,94	BcLF1
IX	1,26	BcLF1
IY	0,97	BcLF1
IZ	1,14	BcLF1
KA	1,33	BcLF1
KB	1,03	BcLF1
KC	1,10	BcLF1
KD	1,78	BcLF1
KE	1,19	BcLF1
KF	1,14	BcLF1
KG	1,25	BcLF1/ BcRF1
KH	1,23	BcRF1
KI	1,28	BcRF1
KK	1,35	BcRF1
KL	1,24	BcRF1/ BTRF1
KM	1,18	BTRF1
KN	1,20	BTRF1/ BXLF2
KO	1,03	BXLF2
KP	1,18	BXLF2
KQ	1,33	BXLF2
KR	1,25	BXLF2
KS	1,31	BXLF2/ BXLF1
KT	1,33	BXLF1
KU	1,34	BXLF1
KV	1,08	BXLF1/ BXRf1
KX	1,09	BXRf1
KY	1,13	BXRf1/ BVRF1
KZ	1,22	BVRF1
LA	1,33	BVRF1
LB	1,10	BVRF1
LC	1,09	BVRF1
LD	0,93	
LE	1,27	BVRF2
LF	1,27	BVRF2/ BDRF1
LG	1,55	BVRF2/ BDRF1
LH	1,18	BVRF2/ BDRF1/ BILF2
LI	0,90	BILF2 (a,b,c,d)
LK	0,90	BILF2 (a,b,c,d)
LL	1,30	
LM	1,14	
LN	1,15	
LO	1,15	BILF1
LP	1,23	BILF1
LQ	1,04	BALF5
LR	1,10	BALF5
LS	1,43	BALF5
LT	1,17	BALF5
LU	1,12	ECRF4/ BALF5
LW	1,16	ECRF4/ BALF5
LX	1,01	ECRF4/ BALF5
LY	0,94	BALF5/ BALF4
LZ	1,02	BALF4
MA	1,41	BALF4
MB	1,35	BALF4
MC	1,41	BALF4
MD	1,25	BALF4/ BALF3
ME	1,33	BARF0/ BALF3
MF	1,31	BARF0/ BALF3
MG	1,21	BARF0/ BALF3
MH	1,36	BARF0/ BALF3
MI	1,52	BALF3/ BALF2
MK	1,40	BALF3/ BALF2
ML	1,06	BALF2
MM	0,85	BALF2
MN	1,10	BALF2
MO	1,55	BALF2/ BALF1
MP	1,22	BALF1/ BARF1
MQ	1,14	BARF1
MR	1,02	BARF1
MS	1,07	BNLF2b
MT	1,21	BNLF2b/ BNLF2a
MU	0,82	BNLF1
MW	0,86	BNLF1
MX	0,92	BNLF1
MY	1,02	BNLF1
MZ	1,21	
TO	1,10	

Vergleich von transient mit p2089-maxi-EBV-DNA transfizierten HEK293-Zellen versus untransfizierte HEK293-Zellen



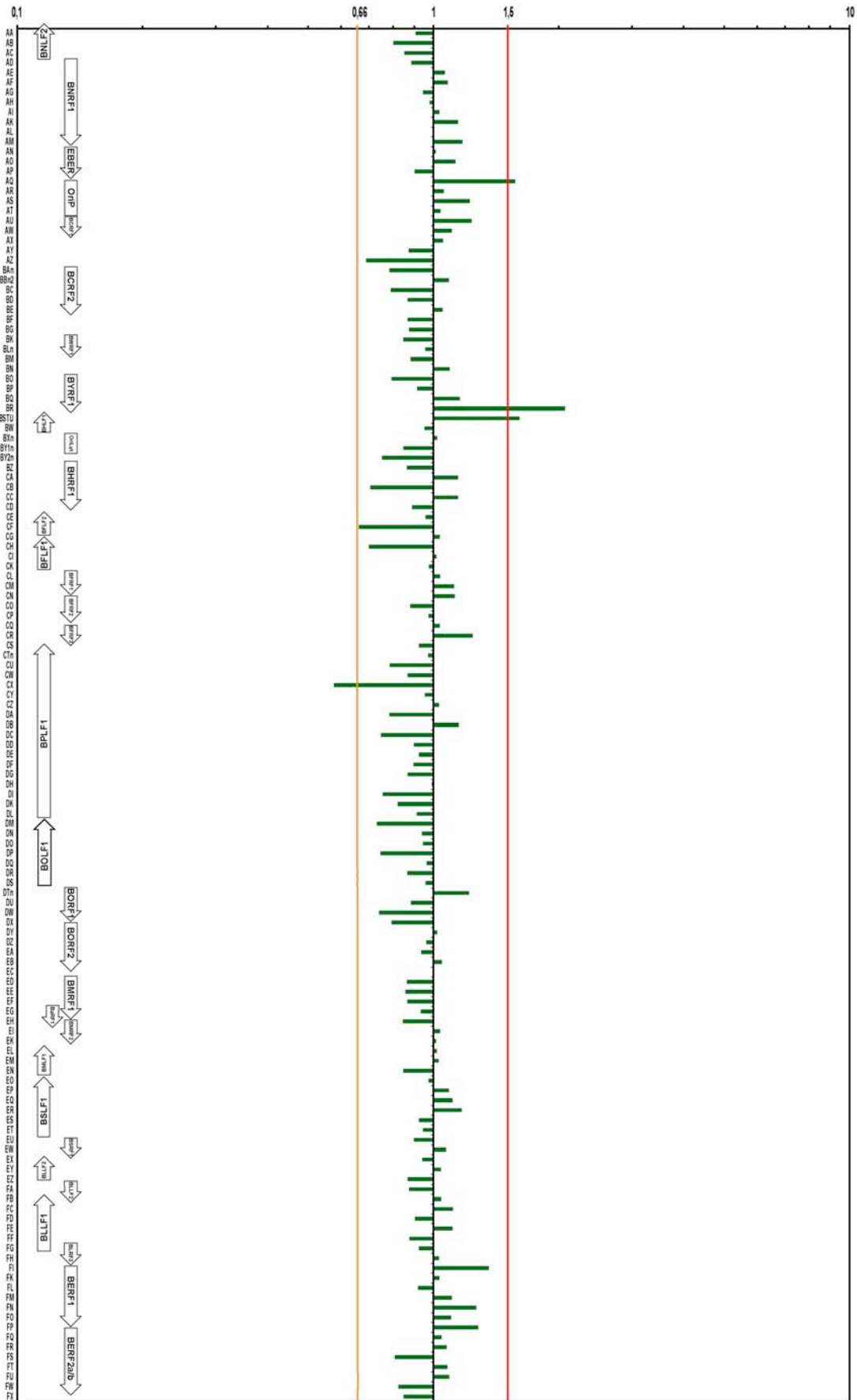


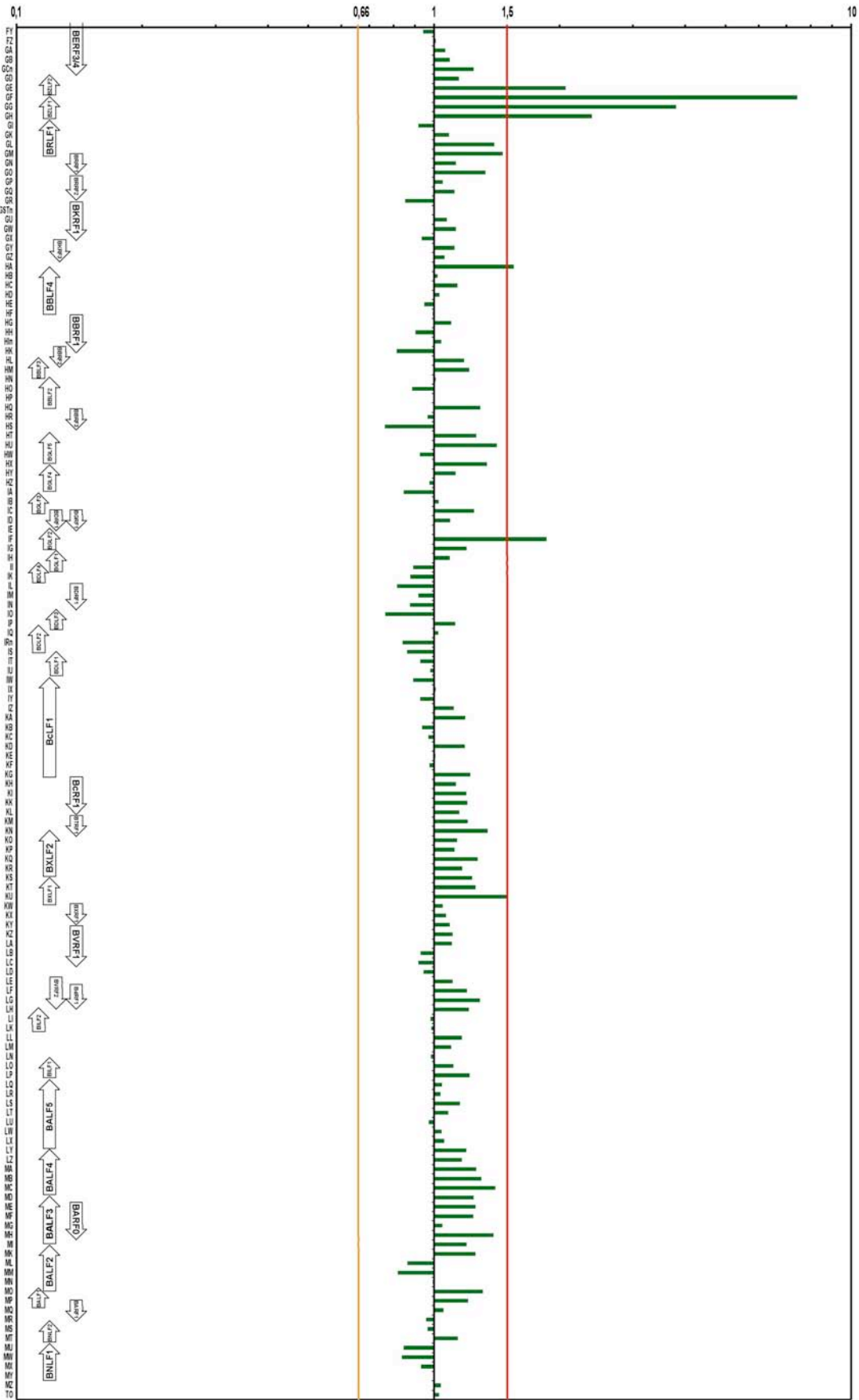
Tab. K: Expressionsprofil von EBV nach transients Transfektion von p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 in HEK293-Zellen

Aufgelistet sind sämtliche EBV-Fragmente, die äquivalenten EBV-Gene und die Expressionsverhältnisse ('ratios'). Expressionsverhältnisse die unter dem Schwellenwert von 0,66 bzw. über 1,5 liegen sind gelb bzw. rot unterlegt. Im Anschluss befindet sich eine graphische Darstellung des genomweiten EBV-Expressionsprofils.

Fragment	ratio	Gen	EK	1,02	BMRF2	IS	0,86	BDLF2/ BDLF1
AA	0,91	BNLF2a/b	EL	1,02	BMLF1	IT	0,93	BDLF1
AB	0,80	BNLF2a/b	EM	1,03	BMLF1	IU	0,98	BDLF1
AC	0,85	BNLF2a/b	EN	0,85	BMLF1	IW	0,89	BcLF1
AD	0,88	BNRF1	EO	0,97	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1	IX	1,01	BcLF1
AE	1,07	BNRF1	EP	1,09	BSLF1	IY	0,93	BcLF1
AF	1,09	BNRF1	EQ	1,11	BSLF1	IZ	1,12	BcLF1
AG	0,94	BNRF1	ER	1,17	BSLF1	KA	1,19	BcLF1
AH	0,98	BNRF1	ES	0,92	BSLF1	KB	0,94	BcLF1
AI	1,04	BNRF1	ET	0,95	BSLF1	KC	0,97	BcLF1
AK	1,15	BNRF1	EU	0,90	BSLF1/ BSRF1	KD	1,19	BcLF1
AL	1,00	BNRF1	EW	1,07	BSRF1	KE	1,01	BcLF1
AM	1,18	BNRF1	EX	0,94	BSRF1/ BLLF3	KF	0,98	BcLF1
AN	1,02	EBER1	EY	1,04	BLLF3	KG	1,22	BcLF1/ BcRF1
AO	1,13	EBER1&2	EZ	0,87	BLLF3/ BLRF1	KH	1,13	BcRF1
AP	0,90	EBER1&2	FA	0,88	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2	KI	1,20	BcRF1
AQ	1,58		FB	1,04	BLLF1a-b/ BLLF2	KK	1,21	BcRF1
AR	1,06		FC	1,12	BLLF1a-b	KL	1,15	BcRF1/ BTRF1
AS	1,23		FD	0,90	BLLF1a-b	KM	1,21	BTRF1
AT	1,04		FE	1,11	BLLF1a-b	KN	1,35	BTRF1/ BXLF2
AU	1,24	BCRF1	FF	0,88	BLLF1a-b	KO	1,14	BXLF2
AW	1,11	BCRF1	FG	0,92	BLLF1a-b/ BLRF3	KP	1,12	BXLF2
AX	1,06		FH	1,03	BLRF3/ BERF1	KQ	1,27	BXLF2
AY	0,87		FI	1,36	BERF1	KR	1,17	BXLF2
AZ	0,69		FK	1,03	BERF1	KS	1,24	BXLF2/ BXLF1
BA	0,78	BCRF2	FL	0,92	BERF1	KT	1,26	BXLF1
BB	1,09	BCRF2	FM	1,11	BERF1	KU	1,50	BXLF1
BC	0,79	BCRF2	FN	1,27	BERF1	KV	1,05	BXLF1/ BXRFF1
BD	0,87	BCRF2	FO	1,11	BERF1	KX	1,07	BXRFF1
BE	1,05	BCRF2	FP	1,28	BERF1/ BERF2a	KY	1,09	BXRFF1/ BVRF1
BF	0,87		FQ	1,05	BERF2a/ BERF2b	KZ	1,11	BVRF1
BG	0,87		FR	1,08	BERF2b	LA	1,11	BVRF1
BK	0,85	BWRF1	FS	0,81	BERF2b	LB	0,93	BVRF1
BL	0,96	BWRF1	FT	1,08	BERF2b	LC	0,92	BVRF1
BM	0,88		FU	1,09	BERF2b	LD	0,94	
BN	1,10		FW	0,83	BERF2b	LE	1,11	BVRF2
BO	0,79	BYRF1	FX	0,85	BERF2b/ BERF3	LF	1,20	BVRF2/ BdrF1
BP	0,91	BYRF1	FY	0,94	BERF3	LG	1,29	BVRF2/ BdrF1
BQ	1,16	BYRF1	FZ	1,01		LH	1,21	BVRF2/ BdrF1/ BILF2
BR	2,08	BYRF1	GA	1,07		LI	0,98	BILF2 (a,b,c,d)
BSTUn2	1,61	BHLF1	GB	1,09		LK	0,99	BILF2 (a,b,c,d)
BW	0,95	BHLF1	GC	1,25		LL	1,17	
BX	1,02		GD	1,15	BZLF2	LM	1,10	
BY1n	0,85		GE	2,07	BZLF2	LN	0,99	
BY2n	0,75		GF	7,43	BZLF1	LO	1,11	BILF1
BZ	0,87		GG	3,81	BZLF1	LP	1,22	BILF1
CA	1,15	BHRF1	GH	2,39	BZLF1/ BRLF1	LQ	1,05	BALF5
CB	0,71	BHRF1	GI	0,92	BRLF1	LR	1,04	BALF5
CC	1,15	BHRF1	GK	1,09	BRLF1	LS	1,16	BALF5
CD	0,89	BHRF1	GL	1,40	BRLF1	LT	1,08	BALF5
CE	0,96	BFLF2	GM	1,46	BRLF1/ BRRF1	LU	0,97	ECRF4/ BALF5
CF	0,66	BFLF2	GN	1,13	BRRF1	LW	1,04	ECRF4/ BALF5
CG	1,04	BFLF2/ BFLF1	GO	1,33	BRRF1/ BRRF2	LX	1,06	ECRF4/ BALF5
CH	0,70	BFLF1	GP	1,05	BRRF2	LY	1,20	BALF5/ BALF4
CI	1,02	BFLF1	GQ	1,12	BRRF2	LZ	1,17	BALF4
CK	0,98	BFLF1	GR	0,85	BRRF2/ BKRF1	MA	1,27	BALF4
CL	1,04	BFRF1	GSTn3	1,01	BKRF1	MB	1,30	BALF4
CM	1,12	BFRF1	GU	1,07	BKRF1	MC	1,40	BALF4
CN	1,13	BFRF1/ BFRF2	GW	1,13	BKRF1	MD	1,25	BALF4/ BALF3
CO	0,88	BFRF2	GX	0,94	BKRF2/ BKRF3	ME	1,26	BARF0/ BALF3
CP	0,97	BFRF2	GY	1,12	BKRF3	MF	1,25	BARF0/ BALF3
CQ	1,04	BFRF2/ BFRF3	GZ	1,06	BKRF3/ BKRF4	MG	1,05	BARF0/ BALF3
CR	1,24	BFRF3	HA	1,55	BKRF4/ BBLF4	MH	1,39	BARF0/ BALF3
CS	0,92	BPLF1	HB	1,02	BBLF4	MI	1,20	BALF3/ BALF2
CT	0,97	BPLF1	HC	1,14	BBLF4	MK	1,26	BALF3/ BALF2
CU	0,79	BPLF1	HD	1,03	BBLF4	ML	0,86	BALF2
CW	0,87	BPLF1	HE	0,95	BBLF4	MM	0,82	BALF2
CX	0,58	BPLF1	HF	1,00	BBLF4/ BBRF1	MN	0,99	BALF2
CY	0,95	BPLF1	HG	1,10	BBRF1	MO	1,31	BALF2/ BALF1
CZ	1,03	BPLF1	HH	0,90	BBRF1	MP	1,21	BALF1/ BARF1
DA	0,78	BPLF1	HI	1,04	BBRF1	MQ	1,06	BARF1
DB	1,15	BPLF1	HK	0,82	BBRF1/ BBRF2	MR	0,96	BARF1
DC	0,75	BPLF1	HL	1,18	BBRF2/ BBLF3	MS	0,97	BNLF2b
DD	0,90	BPLF1	HM	1,22	BBLF3	MT	1,14	BNLF2b/ BNLF2a
DE	0,92	BPLF1	HN	1,01	BBLF2	MU	0,85	BNLF1
DF	0,90	BPLF1	HO	0,89	BBLF2	MW	0,84	BNLF1
DG	0,87	BPLF1	HP	1,00	BBLF2	MX	0,93	BNLF1
DH	0,99	BPLF1	HQ	1,29	BBLF2/ BBRF3	MY	1,00	BNLF1
DI	0,76	BPLF1	HR	0,97	BBRF3	MZ	1,04	
DK	0,82	BPLF1	HS	0,76	BBRF3	TO	1,03	
DL	0,91	BPLF1	HT	1,27	BBLF1/ BGLF5			
DM	0,73	BPLF1/ BOLF1	HU	1,42	BGLF5			
DN	0,94	BOLF1	HW	0,93	BGLF5			
DO	0,95	BOLF1	HX	1,34	BGLF5/ BGLF4			
DP	0,75	BOLF1	HY	1,13	BGLF4			
DQ	0,97	BOLF1	HZ	0,98	BGLF4			
DR	0,87	BOLF1	IA	0,85	BGLF4/ BGLF3			
DS	0,96	BOLF1	IB	1,03	BGLF3			
DT	1,22	BORF1	IC	1,25	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1			
DU	0,88	BORF1	ID	1,09	BDRF1/ BGRF1			
DW	0,74	BORF1	IE	1,00	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2			
DX	0,79	BORF1/ BORF2	IF	1,86	BGLF2			
DY	1,02	BORF2	IG	1,20	BGLF2/ BGLF1			
DZ	0,96	BORF2	IH	1,09	BGLF1			
EA	0,93	BORF2	II	0,89	BGLF1/ BDLF4			
EB	1,05	BORF2	IK	0,88	BDLF4			
EC	1,00	BORF2/ BaRF1	IL	0,82	BDRF1			
ED	0,87	BaRF1/ BMRF1	IM	0,92	BDRF1			
EE	0,86	BaRF1/ BMRF1	IN	0,88	BDRF1			
EF	0,87	BMRF1	IO	0,77	BDLF3			
EG	0,93	BMRF1	IP	1,13	BDLF3/ BDLF2			
EH	0,84	BMRF1/ BMRF2	IQ	1,03	BDLF2			
EI	1,04	BMRF2	IR	0,84	BDLF2			

Vergleich von transient mit p2089-maxi-EBV-DNA und dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 kotransfizierten HEK293-Zellen versus untransfizierte HEK293-Zellen



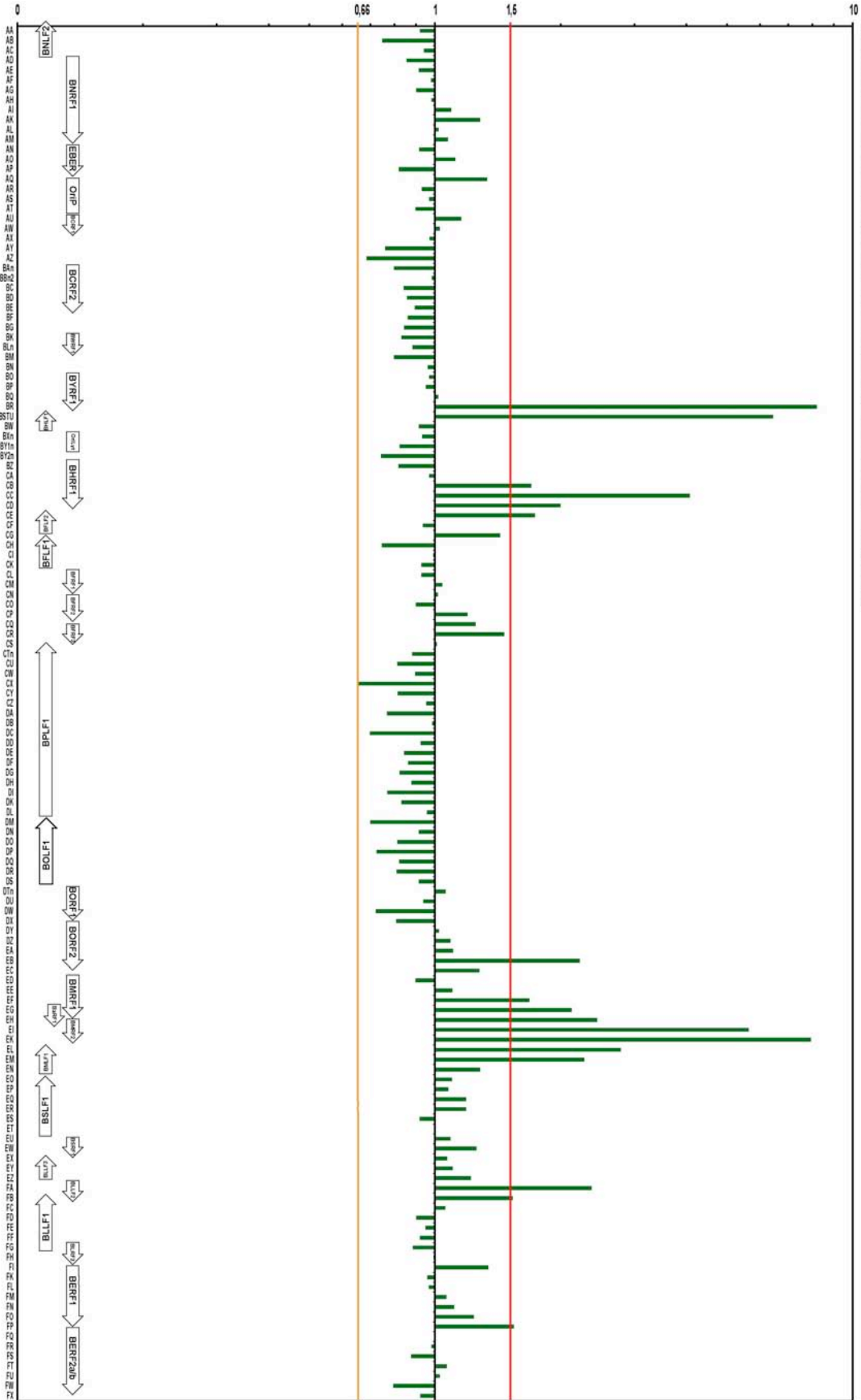


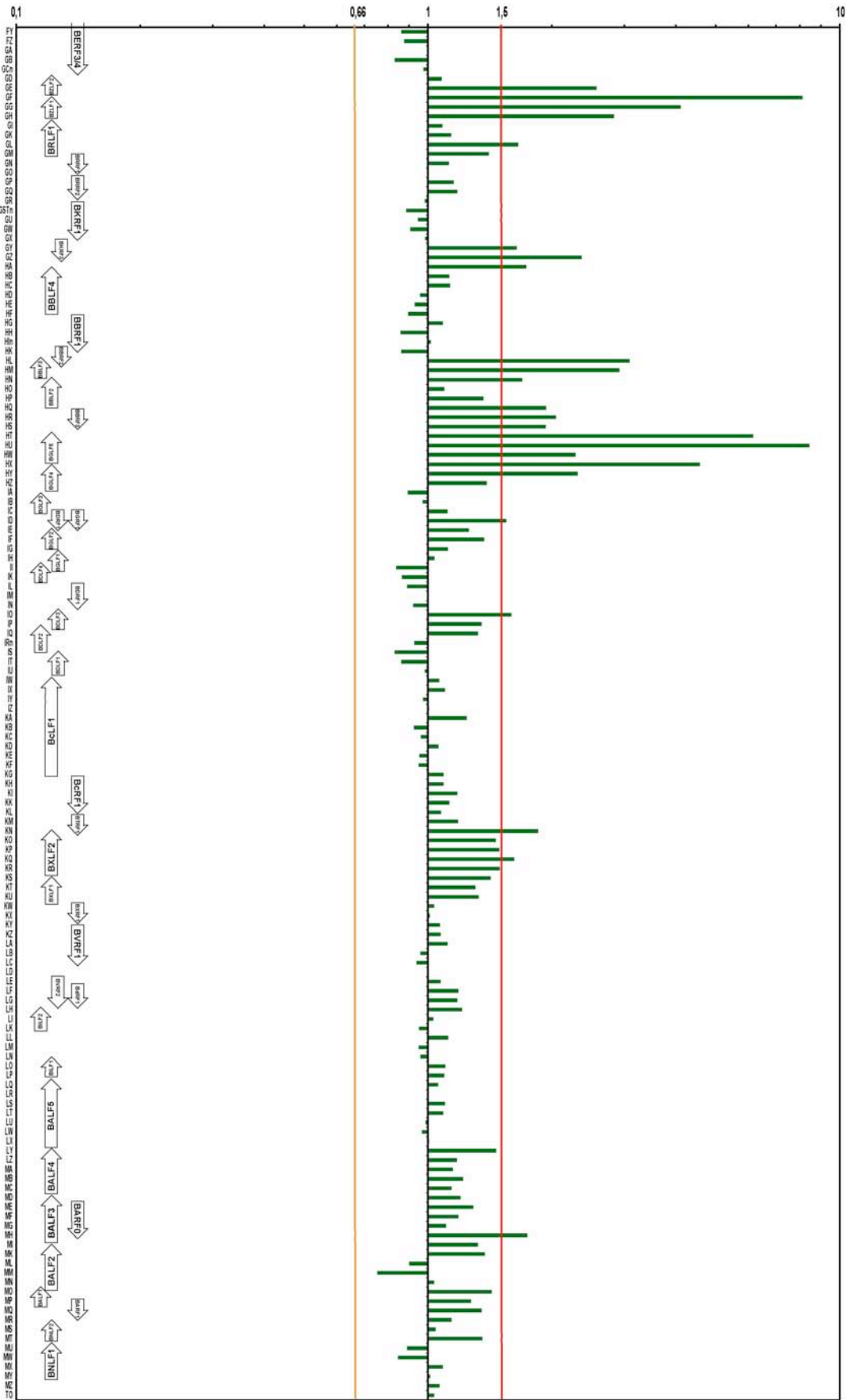
Tab. L: Expressionsprofil von EBV nach transienter Transfektion von CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA in Kombination mit dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 in HEK293-Zellen

Aufgelistet sind sämtliche EBV-Fragmente, die äquivalenten EBV-Gene und die Expressionsverhältnisse ('ratios'). Expressionsverhältnisse die unter dem Schwellenwert von 0,66 bzw. über 1,5 liegen sind gelb bzw. rot unterlegt. Im Anschluss befindet sich eine graphische Darstellung des genomweiten EBV-Expressionsprofils.

Fragment	ratio	Gen	Fragment	ratio	Gen	Fragment	ratio	Gen
AA	0,92	BNLF2a/b	EK	7,94	BMRF2	IS	0,83	BDLF2/ BDLF1
AB	0,75	BNLF2a/b	EL	2,79	BMLF1	IT	0,86	BDLF1
AC	0,94	BNLF2a/b	EM	2,28	BMLF1	IU	0,98	BDLF1
AD	0,85	BNRF1	EN	1,29	BMLF1	IW	1,07	BcLF1
AE	0,92	BNRF1	EO	1,10	BMLF1/ BSLF2/ BSLF1	IX	1,10	BcLF1
AF	0,98	BNRF1	EP	1,08	BSLF1	IY	0,97	BcLF1
AG	0,90	BNRF1	EQ	1,19	BSLF1	IZ	1,01	BcLF1
AH	0,98		ER	1,19	BSLF1	KA	1,24	BcLF1
AI	1,10	BNRF1	ES	0,92	BSLF1	KB	0,92	BcLF1
AK	1,29	BNRF1	ET	1,00	BSLF1	KC	0,96	BcLF1
AL	1,02	BNRF1	EU	1,09	BSLF1/ BSRF1	KD	1,06	BcLF1
AM	1,08	BNRF1	EW	1,26	BSRF1	KE	0,95	BcLF1
AN	0,92	EBER1	EX	1,07	BSRF1/ BLLF3	KF	0,95	BcLF1
AO	1,12	EBER1&2	EY	1,10	BLLF3	KG	1,09	BcLF1/ BcRF1
AP	0,82	EBER1&2	EZ	1,22	BLLF3/ BLRF1	KH	1,09	BcRF1
AQ	1,33		FA	2,38	BLRF2/ BLLF1b/ BLLF2	KI	1,18	BcRF1
AR	0,93		FB	1,54	BLLF1a-b/ BLLF2	KK	1,13	BcRF1
AS	0,97		FC	1,06	BLLF1a-b	KL	1,08	BcRF1/ BTRF1
AT	0,90		FD	0,90	BLLF1a-b	KM	1,19	BTRF1
AU	1,16	BCRF1	FE	0,95	BLLF1a-b	KN	1,86	BTRF1/ BXLF2
AW	1,03	BCRF1	FF	0,92	BLLF1a-b	KO	1,46	BXLF2
AX	0,97		FG	0,89	BLLF1a-b/ BLRF3	KP	1,49	BXLF2
AY	0,76		FH	0,99	BLRF3/ BERF1	KQ	1,62	BXLF2
AZ	0,69		FI	1,34	BERF1	KR	1,50	BXLF2
BA	0,80	BCRF2	FK	0,96	BERF1	KS	1,42	BXLF2/ BXLF1
BB	0,98	BCRF2	FL	0,97	BERF1	KT	1,31	BXLF1
BC	0,84	BCRF2	FM	1,07	BERF1	KU	1,33	BXLF1
BD	0,86	BCRF2	FN	1,11	BERF1	KW	1,04	BXLF1/ BXRf1
BE	0,90	BCRF2	FO	1,24	BERF1	KX	1,01	BXRf1
BF	0,86		FP	1,55	BERF1/ BERF2a	KY	1,07	BXRf1/ BVRF1
BG	0,84		FQ	1,00	BERF2a/ BERF2b	KZ	1,07	BVRF1
BK	0,83	BWRf1	FR	0,98	BERF2b	LA	1,12	BVRF1
BL	0,88	BWRf1	FS	0,88	BERF2b	LB	0,96	BVRF1
BM	0,80		FT	1,07	BERF2b	LC	0,94	BVRF1
BN	0,96		FU	1,03	BERF2b	LD	1,00	
BO	0,97	BYRF1	FW	0,80	BERF2b	LE	1,07	BVRF2
BP	0,95	BYRF1	FX	0,92	BERF2b/ BERF3	LF	1,19	BVRF2/ BdRF1
BQ	1,02	BYRF1	FY	0,86	BERF3	LG	1,18	BVRF2/ BdRF1
BR	8,21	BYRF1	FZ	0,88		LH	1,21	BVRF2/ BdRF1/ BILF2
BSTUn2	6,45	BHLF1	GA	1,00		LI	1,03	BILF2 (a,b,c,d)
BW	0,91	BHLF1	GB	0,83		LK	0,95	BILF2 (a,b,c,d)
BX	0,93		GC	0,97		LL	1,12	
BY1n	0,82		GD	1,08	BZLF2	LM	0,95	
BY2n	0,74		GE	2,57	BZLF2	LN	0,96	
BZ	0,82		GF	8,14	BZLF1	LO	1,10	BILF1
CA	0,97	BHRF1	GG	4,11	BZLF1	LP	1,10	BILF1
CB	1,70	BHRF1	GH	2,83	BZLF1/ BRLF1	LQ	1,06	BALF5
CC	4,08	BHRF1	GI	1,08	BRLF1	LR	0,99	BALF5
CD	2,00	BHRF1	GK	1,14	BRLF1	LS	1,10	BALF5
CE	1,74	BFLF2	GL	1,66	BRLF1	LT	1,09	BALF5
CF	0,94	BFLF2	GM	1,41	BRLF1/ BRRF1	LU	0,99	ECRF4/ BALF5
CG	1,44	BFLF2/ BFLF1	GN	1,13	BRRF1	LW	0,97	ECRF4/ BALF5
CH	0,75	BFLF1	GO	1,00	BRRF1/ BRRF2	LX	1,01	ECRF4/ BALF5
CI	0,99	BFLF1	GP	1,15	BRRF2	LY	1,46	BALF5/ BALF4
CK	0,93	BFLF1	GQ	1,18	BRRF2	LZ	1,18	BALF4
CL	0,93	BFRF1	GR	0,98	BRRF2/ BKRF1	MA	1,15	BALF4
CM	1,04	BFRF1	GSTn3	0,89	BKRF1	MB	1,22	BALF4
CN	1,02	BFRF1/ BFRF2	GU	0,95	BKRF1	MC	1,14	BALF4
CO	0,90	BFRF2	GW	0,91	BKRF1	MD	1,20	BALF4/ BALF3
CP	1,20	BFRF2	GX	0,98	BKRF2/ BKRF3	ME	1,29	BARF0/ BALF3
CQ	1,25	BFRF2/ BFRF3	GY	1,64	BKRF3	MF	1,19	BARF0/ BALF3
CR	1,47	BFRF3	GZ	2,36	BKRF3/ BKRF4	MG	1,11	BARF0/ BALF3
CS	1,01	BPLF1	HA	1,74	BKRF4/ BBLF4	MH	1,74	BARF0/ BALF3
CT	0,88	BPLF1	HB	1,13	BBLF4	MI	1,33	BALF3/ BALF2
CU	0,81	BPLF1	HC	1,13	BBLF4	MK	1,37	BALF3/ BALF2
CW	0,90	BPLF1	HD	0,96	BBLF4	ML	0,90	BALF2
CX	0,66	BPLF1	HE	0,93	BBLF4	MM	0,75	BALF2
CY	0,81	BPLF1	HF	0,89	BBLF4/ BBRF1	MN	1,04	BALF2
CZ	0,95	BPLF1	HG	1,09	BBRF1	MO	1,43	BALF2/ BALF1
DA	0,77	BPLF1	HH	0,86	BBRF1	MP	1,27	BALF1/ BARF1
DB	0,98	BPLF1	HI	1,02	BBRF1	MQ	1,35	BARF1
DC	0,70	BPLF1	HK	0,86	BBRF1/ BBRF2	MR	1,14	BARF1
DD	0,92	BPLF1	HL	3,09	BBRF2/ BBLF3	MS	1,04	BNLF2b
DE	0,84	BPLF1	HM	2,92	BBLF3	MT	1,36	BNLF2b/ BNLF2a
DF	0,86	BPLF1	HN	1,70	BBLF2	MU	0,89	BNLF1
DG	0,82	BPLF1	HO	1,10	BBLF2	MW	0,85	BNLF1
DH	0,88	BPLF1	HP	1,37	BBLF2	MX	1,09	BNLF1
DI	0,77	BPLF1	HQ	1,94	BBLF2/ BBRF3	MY	1,01	BNLF1
DK	0,83	BPLF1	HR	2,05	BBRF3	MZ	1,07	
DL	0,96	BPLF1	HS	1,94	BBRF3	TO	1,04	
DM	0,70	BPLF1/ BOLF1	HT	6,17	BBLF1/ BGLF5			
DN	0,91	BOLF1	HU	8,45	BGLF5			
DO	0,81	BOLF1	HW	2,28	BGLF5			
DP	0,73	BOLF1	HX	4,58	BGLF5/ BGLF4			
DQ	0,82	BOLF1	HY	2,31	BGLF4			
DR	0,81	BOLF1	HZ	1,39	BGLF4			
DS	0,91	BOLF1	IA	0,89	BGLF4/ BGLF3			
DT	1,06	BORF1	IB	0,97	BGLF3			
DU	0,94	BORF1	IC	1,12	BGLF3/ BDRF1/ BGRF1			
DW	0,72	BORF1	ID	1,55	BDRF1/ BGRF1			
DX	0,81	BORF1/ BORF2	IE	1,26	BDRF1/ BGRF1/ BGLF2			
DY	1,02	BORF2	IF	1,37	BGLF2			
DZ	1,09	BORF2	IG	1,12	BGLF2/ BGLF1			
EA	1,11	BORF2	IH	1,04	BGLF1			
EB	2,22	BORF2	II	0,84	BGLF1/ BDLF4			
EC	1,28	BORF2/ BaRF1	IK	0,86	BDLF4			
ED	0,90	BaRF1/ BMRF1	IL	0,89	BDRF1			
EE	1,10	BaRF1/ BMRF1	IM	1,01	BDRF1			
EF	1,69	BMRF1	IN	0,92	BDRF1			
EG	2,13	BMRF1	IO	1,60	BDLF3			
EH	2,45	BMRF1/ BMRF2	IP	1,35	BDLF3/ BDLF2			
EI	5,65	BMRF2	IQ	1,32	BDLF2			
			IR	0,93	BDLF2			

Vergleich von transient mit CpG-methylierter p2089-maxi-EBV-DNA und dem BZLF1-Expressionsplasmid p509 kotransfizierten HEK293-Zellen versus untransfizierte HEK293-Zellen





Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit durch ihre technische Hilfe, ihrem Rat oder ihrer moralischen Unterstützung beigetragen haben.

Insbesondere danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für die Vergabe dieses interessanten Projekts, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die unermüdliche Unterstützung bei der Lösung aller Probleme.

Ich bedanke mich herzlich bei

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick dafür, dass er die Pflichten des offiziellen Betreuers übernommen hat,

Herrn PD Dr. Reinhard Zeidler und Dr. Andreas Moosmann für ihre hilfreichen Tipps und guten Ratschläge, sowie für die Bereitstellung von B-Blasten,

Herrn Dr. Christian Betz, Frau Dr. Marion Horsch und Herrn Dr. Thomas Albert für die unzähligen Tipps und Ratschläge bei der Herstellung des EBV-Microarrays, allen Mitarbeitern der Abteilung Genvektoren der GSF und der Firma Vaecgene für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit.

Mein ganz spezieller Dank geht an Magda, Romana, Patsi, Steffi, Liudmilla, Daggi, Caro, den beiden Evas, Heidi, Martin, Christoph, Markus, Gilbert und nicht zu vergessen Rosi, ohne der das Schiff schon lange gesunken wäre. Danke für Eure Hilfsbereitschaft, Eure Unterstützung in den vielen motivierenden und demotivierenden Stunden und den gemeinsamen Spaß, der das Arbeiten jeden Tag aufs Neue zu unterbrechen wusste.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Markus Michael Kalla
Geburtsdatum	06.04.1977
Geburtsort	Nürnberg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulischer Werdegang

1983-1984	Grundschule Taufkirchen
1984-1985	Grundschule Tysværvåg, Norwegen
1985-1987	Grundschule Taufkirchen
1987-1988	Gymnasium Unterhaching
1988-1996	Gymnasium Penzberg, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife 1996

Zivildienst

1996-1997	Sozialstation Peißenberg, ambulante Alten- und Krankenpflege sowie Behindertenbetreuung
-----------	---

Studium

1997-2003	Diplomstudiengang Biologie an der TU-München
12.2002-09.2003	Diplomarbeit am Institut für Virologie der Studienfakultät Biowissenschaften an der TU- München in Kooperation mit der Firma Vaecgene Biotech GmbH: „Immunstimulierung von Chronisch Lymphatischen Leukämiezellen (B-CLL) mit Hilfe aktivierter Thrombozyten“
04.2004-10.2007	Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt, Abteilung Genvektoren an der GSF, München