

Aus der Abteilung Genvektoren des
Helmholtz-Zentrums München

Wissenschaftlicher Geschäftsführer: Prof. Dr. Günther Wess

**Molekulare und immunologische Charakterisierung
von *Virus-like Particles*
im Hinblick auf eine Verwendung als EBV-Impfstoff**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Corinna Ramona Hüls

aus
Tübingen

2018

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Reinhard Zeidler

Zweitgutachterin: Priv. Doz. Dr. Barbara Adler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 29. August 2018

Eidesstattliche Versicherung

Hüls, Corinna

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Molekulare und immunologische Charakterisierung von *Virus-like Particles* im
Hinblick auf eine Verwendung als EBV-Impfstoff“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 28. Februar 2018

Corinna Hüls

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	Abstract	2
2	EINLEITUNG	3
2.1	Das Epstein-Barr-Virus	3
2.1.1	Infektion und Latenz	3
2.1.2	Virale RNAs	4
2.1.3	EBV-spezifische Immunantworten	6
2.1.4	Immunevasionstrategien des EBV	12
2.1.5	EBV-assoziierte Erkrankungen	14
2.1.6	EBV-Impfstoffe	15
2.2	<i>Virus-like particles</i>	16
2.2.1	Aufbau und Funktion	16
2.2.2	Anwendungsgebiete	17
2.2.3	Extrazelluläre Vesikel	18
2.3	Genetisch modifizierte rekombinante EBVs und VLPs	19
2.4	Ziel der Arbeit	20
3	MATERIAL	21
3.1	Geräte	21
3.2	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	22
3.3	Medien und Zusätze	24
3.3.1	Zellkulturmedien	24
3.3.2	Zusätze	24
3.4	Puffer und Lösungen	25
3.5	Chemikalien und Reagenzien	26
3.6	Enzyme	28
3.7	Antikörper	28
3.7.1	Primärantikörper	28
3.7.2	Sekundärantikörper	29
3.8	Oligonukleotide	29
3.8.1	Primer für quantitative real-time PCR	29
3.8.2	Primer für TaqMan miRNA PCR	30
3.8.3	Primer für Standard-PCR	30
3.8.4	<i>Spike-in</i> Kontroll-RNA	30
		III

3.9	Plasmide	30
3.10	Maxi-EBV BACs	31
3.11	Bakterienstämme	31
3.12	Viren und <i>Virus-like particles</i> (VLPs)	32
3.12.1	Viren	32
3.12.2	VLPs	32
3.13	Eukaryotische Zellen	33
3.13.1	Primäre Zellen	33
3.13.2	Etablierte Zelllinien	33
3.13.3	T-Zellklone	34
3.14	Kits	34
3.15	Software	35
4	METHODEN	36
4.1	Zellbiologische Methoden	36
4.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	36
4.1.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA	37
4.1.3	Generierung von VLP-Produzentenzelllinien	38
4.1.4	Induktion der Virus-/VLP-Produktion in Produzentenzelllinien	38
4.1.5	Virustitration mit Raji-Zellen	39
4.1.6	Isolation von PBMCs aus Vollblut	39
4.1.7	Aufreinigung von primären B-Zellen aus PBMCs mittels MACS	39
4.1.8	Isolation von primären B-Lymphozyten aus humanen Adenoiden	40
4.1.9	Durchflusszytometrie	40
4.1.10	Stimulationsexperimente mit B-Zellen	40
4.1.11	T-Zellassays	41
4.2	Aufreinigung und Charakterisierung von EV und VLPs	41
4.2.1	Herstellung von EV-depletiertem Medium	41
4.2.2	Isolation von EV und VLPs aus Zellkulturüberständen	41
4.2.3	VLP-Qualitätsbestimmung	42
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Vesikeln mittels ‚Nanopartikel-Tracking Analyse‘	42
4.2.5	Präparation von EV und VLPs zur RNA-Isolation	43
4.3	Molekularbiologische Methoden	43
4.3.1	Kultivierung von Bakterien	43
4.3.2	Herstellung und Elektroporation von rekombinationskompetenten Bakterien	44
4.3.3	Konstruktion von rekombinanten VLPs	45

4.3.4	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	45
4.3.5	Präparation von Maxi-EBV BAC-DNA	46
4.3.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	48
4.3.7	Restriktionsverdau von DNA	48
4.3.8	RNA-Extraktion	48
4.3.9	Reverse Transkription und absolute Quantifizierung von miRNA	49
4.3.10	Reverse Transkription von mRNA	50
4.3.11	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	50
4.3.12	Nachweis von EBV in primären B-Zellen mittels PCR	51
4.3.13	RNA-Sequenzierung	51
4.4	Proteinbiochemie	52
4.4.1	Immunoblotting	52
4.4.2	ELISA (<i>Enzyme-linked-immunosorbent assay</i>)	54
5	ERGEBNISSE	55

Teil I: <i>Virus-like-Particles</i> (VLPs) und die darin verpackten viralen RNAs beeinflussen die zelluläre Genexpression		55
5.1	Bedingungen an VLPs als Basis für einen EBV-Impfstoff	55
5.1.1	Durch VLPs übertragene virale RNAs sind über mehrere Stunden stabil	55
5.1.2	Herstellung von gp350-positiven EV	56
5.2	Transkriptomanalyse von B-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln	59
5.2.1	Probenvorbereitung und Experimentaufbau	59
5.2.2	Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten	60
5.3	Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch VLPs	67
5.3.1	IFN β wird in den ersten 24 Stunden nach VLP-Inkubation exprimiert	67
5.3.2	Einfluss von VLPs auf antivirale Gene	68
5.3.3	VLPs induzieren die Expression von Akute-Phase-Proteinen (APP)	69
5.4	Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch VLPs	70
5.4.1	VLPs aktivieren EBV-spezifische CD4 ⁺ -T-Zellen	70
Teil II:		72
Einfluss viraler miRNAs auf die immuninduzierende Aktivität von VLPs		72
5.5	Herstellung von neuen VLP-Produzenten	72
5.5.1	Klonierung neuer Maxi-EBVs mit und ohne miRNAs und Etablierung von stabilen VLP-Produzentenzelllinien	73
5.5.2	Qualitätskontrolle der VLP-Präparationen mit Elijah-Zellen	75
5.5.3	Nachweis von viralen miRNAs in VLP-Präparationen	76

5.5.4	Phänotypische Untersuchung der VLP-Mutanten mit und ohne miRNAs	77
5.5.5	Einfluss der VLP-Mutanten auf die Expression immunmodulatorischer Gene und Akute-Phase-Proteine (APP)	78
5.5.6	Einfluss viraler miRNAs auf die Stimulation EBV-spezifischer CD4 ⁺ -T-Zellen	79
6	<u>DISKUSSION</u>	81
6.1	Molekulare und immunologische Eigenschaften EBV-basierter VLPs	82
6.2	VLPs induzieren antivirale angeborene Immunantworten	83
6.3	VLPs aktivieren spezifische T-Zellantworten	84
6.4	Anforderungen an VLPs als Basis für einen EBV-Impfstoff	86
6.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	88
7	<u>LITERATUR</u>	89
8	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	101
9	<u>ANHANG</u>	102
10	<u>PRÄSENTATIONEN</u>	127
11	<u>DANKSAGUNG</u>	128

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein humanes Herpesvirus, welches einen Großteil der weltweiten Bevölkerung infiziert und anschließend lebenslang im B-Zellkompartiment persistiert. Während die Primärinfektion bei Kindern meist asymptomatisch verläuft, manifestiert sich in Jugendlichen und Erwachsenen häufig eine infektiöse Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber). Außerdem ist EBV an der Entstehung verschiedener Tumore wie dem Nasopharynxkarzinom, dem Magenkarzinom und dem Burkitt-Lymphom beteiligt. Immundefiziente oder iatrogen immunsupprimierte Personen, wie Transplantationspatienten, haben ein besonders hohes Risiko, eine potenziell tödliche EBV-assoziierte Erkrankung (PTLD) zu entwickeln. Eine Immunisierung könnte dieses Risiko reduzieren. Trotz einiger vielversprechender Ansätze gibt es bis heute keinen zugelassenen EBV-Impfstoff. Aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung eines solchen Vakzins sind rekombinante *Virus-like Particles* (VLPs), die in Aufbau und Zusammensetzung dem Virus zu großen Teilen entsprechen, aber kein virales Genom besitzen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der molekularen und immunologischen Eigenschaften von VLPs, im Hinblick auf einen EBV-Impfstoff.

Mittels RNA-Sequenzierung ließen sich erstmalig die über VLPs auf B-Zellen übertragenen viralen RNAs in ihrer Gesamtheit analysieren und ihr Einfluss auf die zelluläre Genexpression untersuchen. Dabei konnten zahlreiche virale Transkripte identifiziert werden, die für immundominante Proteine kodieren und in den Zielzellen vor allem virusspezifische, zellregulatorische und immunologische Signalwege induzieren. Außerdem sind die viralen mRNAs wahrscheinlich für die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen verantwortlich, da sie sich als in den Zielzellen sehr stabil erwiesen haben und nach der Transduktion sofort translatiert werden können. Wichtig ist die Erkenntnis, dass VLPs dieselben Gene und Signalwege induzieren, welche auch durch infektiöse Viren aktiviert werden. Während virale mRNAs die Viruserkennung fördern, vermindern virale miRNAs sowohl die Expression antiviraler Gene, als auch die Aktivierung EBV-spezifischer CD4⁺-T-Zellantworten, was beim Design des potenziellen EBV-Vakzins berücksichtigt werden muss.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass sich VLPs unter vielen molekularen und immunologischen Gesichtspunkten wie das echte Virus verhalten. Da zudem durch genetische Manipulationen die Sicherheit von genomfreien VLPs garantiert werden kann,

sind sie ein vielversprechender Kandidat für einen künftigen EBV-Impfstoff, um als Schutz vor IM und PTLDs eingesetzt zu werden.

1.1 Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus that infects the majority of the population worldwide and persists lifelong in the B-cell compartment of its host. While the primary infection is usually asymptomatic in children, it can cause infectious mononucleosis (IM) during adolescence or early adulthood. Furthermore, EBV is associated with various types of tumors such as nasopharyngeal carcinoma, gastric cancer or Burkitt's lymphoma. Immunocompromised or iatrogenically immunosuppressed persons, like transplant patients, are at particular risk to develop potentially lethal EBV-associated diseases (PTLDs). An immunization may reduce these risks, but despite several promising approaches, a safe and efficient vaccine against EBV is still not available. The most promising candidate for such a vaccine are recombinant virus-like particles (VLPs), which mimic the structure and content of the virus but lack the viral DNA genome. The aim of this work was to analyze both molecular and immunological characteristics of VLPs and to examine their potential as an EBV vaccine.

By using RNA sequencing, the entirety of viral RNAs that were transduced into human B cells via VLPs was analyzed, as were their effects on the cellular gene expression. Numerous viral transcripts encoding for immunodominant proteins and inducing virus-specific, cell regulatory and immunological signaling pathways were identified. Moreover, it was shown that transduced viral mRNAs were shown to be remarkably stable after transduction. They can be translated immediately and thus presumably account for the activation of EBV-specific CD8⁺ T cells. The experiments described here demonstrate the induction of many cellular genes and signaling pathways associated with viral infections through VLPs. As for the design of a potential EBV vaccine, it has to be considered that VLPs lacking the viral miRNAs led to a stronger expression of antiviral genes and activation of specific CD4⁺ T cells than VLPs carrying viral miRNAs.

Taken together, VLPs behave like infectious virus particles in many molecular and immunological aspects. In addition, the possibility to manipulate VLPs genetically at will, e.g. by deleting potential viral oncogenes, makes VLPs an attractive candidate for an EBV vaccine to protect against IM and PTLDs.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Epstein-Barr-Virus

2.1.1 Infektion und Latenz

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder humanes Herpesvirus 4 (HHV4), gehört zur Familie der Herpesviren und ist ein umhülltes DNA-Virus mit einem linearen, 172 kb großen Genom (Arvin et al. 2007). Es wird über Tröpfcheninfektion übertragen und infiziert vor allem B-Lymphozyten (B-Zell-Tropismus), aber auch naso- und oropharyngeale Epithelzellen (Niedobitek, Meru, and Delecluse 2001). Der Kontakt zu den Zielzellen wird hauptsächlich über die Interaktion des viralen Glykoproteins 350 (gp350) mit dem zellulären Rezeptor CD21 (CR2) vermittelt, was zu einer Aktivierung der Zellen und zur Aufnahme des Virus führt (Busse et al. 2010; Neuhierl et al. 2002). In den Zielzellen liegt das EBV-Genom als zirkuläre extrachromosomale virale DNA (Episom) vor und initiiert den Zellzyklus und eine gesteigerte Zellproliferation, um sich möglichst schnell zu replizieren (Arvin et al. 2007). Induziert wird diese frühe lytische Phase durch die beiden unmittelbaren frühen viralen Gene BZLF1 und BRLF1. Sie veranlassen im weiteren Verlauf auch die Expression verschiedener früherer Gene (zum Beispiel BMRF1, BNLF2a), die zur Expansion und Aufrechterhaltung des viralen Genoms beitragen (Kalla, Gobel, and Hammerschmidt 2012). Um sich allerdings langfristig im Wirt zu etablieren und möglichst vor dem Immunsystem verborgen zu bleiben, muss das Virus anschließend eine Latenz etablieren. Der erste Schritt dahin ist der Übergang in die prälatente Phase, die sich durch die Expression der latenten Gene und einiger weniger lytischer Gene auszeichnet und die Etablierung der Latenz unterstützt. Danach tritt EBV in die latente Phase seines Zyklus ein, die in die Phasen III-0 unterteilt wird und währenddessen wenige bis keine latenten Proteine exprimiert werden (siehe Abbildung 1). Vor allem ruhende B-Gedächtniszellen sind das Reservoir für latent persistierendes EBV (Bornkamm and Hammerschmidt 2001). Dort exprimiert das Virus nur einen kleinen Anteil an latenten viralen Genen (EBNAs und LMPs), sowie virale nicht-kodierende RNAs (EBERs) und bleibt so vom Immunsystem weitestgehend unentdeckt (Kang and Kieff 2015). Diese Latenz ist der Grund für die erfolgreiche lebenslange Persistenz in einmal infizierten Wirten, die für einen Großteil der Individuen keine weiteren Auswirkungen hat. Wird eine latent mit EBV infizierte Person allerdings durch Krankheit oder Transplantation immungeschwächt, kann das Virus in die lytische Phase seines Zyklus, die so genannte

Reaktivierung, übergehen und sich neu replizieren (Odumade, Hogquist, and Balfour 2011). Dies führt zur Expression später Gene (unter anderem BLLF1, BALF4, BFRF3), zur Bildung neuer Viruspartikel und einer damit verbundenen Infektion neuer Zellen und der Expansion des Virus.

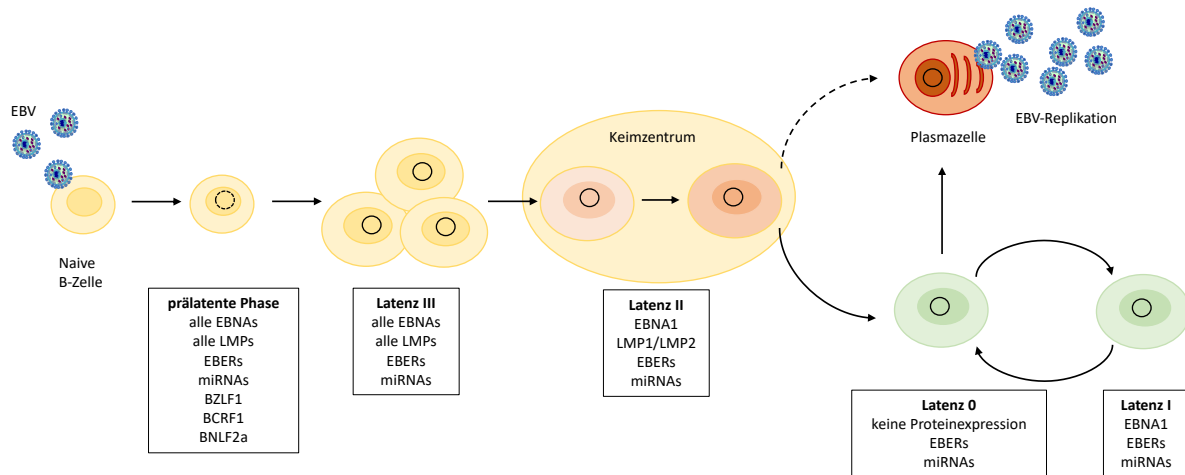


Abbildung 1: Übersicht der viralen Genexpression von EBV während der unterschiedlichen Latenzphasen
 EBV persistiert in B-Gedächtniszellen von infizierten Individuen. Nach der Infektion von naiven B-Zellen tritt das Virus in eine transiente prälatente Phase ein. Diese zeichnet sich durch die Expression latenter Gene aus, zu der alle EBNA, alle LMPs, sowie EBERS und miRNAs gehören. Zusätzlich werden in dieser Phase auch einige wenige lytische Gene wie BZLF1, BCRF1 und BNLF2a exprimiert, welche die Immunantwort des Wirtes gegen EBV unterdrücken und so eine erfolgreiche Etablierung der persistenten Infektion unterstützen. Danach tritt das Virus in die latente Phase III ein, in der alle EBNA, LMPs, EBERS und miRNAs exprimiert werden. Während dieser Phase wandern die infizierten B-Zellen in das Keimzentrum und das Virus geht in die Latenzphase II über, welche sich durch die Expression von EBNA1, LMP1 und LMP2, inklusive EBERS und miRNAs auszeichnet. Im Keimzentrum differenzieren einige EBV-infizierte B-Zellen zu B-Gedächtniszellen. In diesem Stadium befindet sich EBV in der Latenzphase 0, in der keine viralen Proteine, sondern nur EBERS und miRNAs exprimiert werden. Wenn sich diese Zellen erneuern, muss EBV in die Latenzphase I übergehen und EBNA1 exprimieren, damit eine Aufteilung des viralen Episoms in die neuen Zellen gewährleistet werden kann. B-Gedächtniszellen können schließlich auch in Plasmazellen differenzieren, was gleichzeitig zu einer Expression der lytischen Gene und damit zur Replikation des Virus führt. Bearbeitet nach Wen et al. 2007; Kalla, Gobel, and Hammerschmidt 2012; Young, Yap, and Murray 2016.

2.1.2 Virale RNAs

In den letzten Jahren wurde für verschiedene humane Herpesviren wie das Herpes-Simplex-Virus (HSV), das Cytomegalovirus (CMV) oder das Kaposi-Sarkom-Virus (KSHV), sowie für EBV nachgewiesen, dass die Viruspartikel nicht nur das virale Genom, sondern auch virale RNA-Moleküle (*ribonucleic acids*, RNAs) enthalten, welche während einer Infektion ebenfalls auf die Zielzellen übertragen werden. Diese RNAs sind dort nicht nur nachweisbar, sondern auch funktional und nehmen Einfluss auf die virale und zelluläre Genexpression (Bresnahan and Shenk 2000; Cliffe, Nash, and Dutia 2009; Jochum et al. 2012; Sciortino et al. 2001). Im Fall von EBV lassen sich drei Arten von RNAs unterscheiden: mRNAs, microRNAs und nicht-kodierende RNAs.

2.1.2.1 mRNAs

Die Verpackung und der Übertrag von viralen Boten-RNAs (*messenger RNAs*, mRNAs) erscheinen bei einem DNA-Virus im ersten Moment überflüssig, da es in der Lage ist, über den zellulären Transkriptions- und Syntheseapparat alle benötigten Proteine herstellen zu lassen. Wie Jochum *et al.* jedoch nachweisen konnten, nehmen übertragene virale mRNAs sowohl Einfluss auf die Regulation zellulärer als auch viraler Gene und zwar unmittelbar nach dem Übertrag auf die Zielzelle. So transaktivieren zum Beispiel übertragene Transkripte von BZLF1 den frühen lytischen Promotor BMRF1 und tragen dadurch zur Einleitung der prälatenten Phase der EBV-Infektion bei. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass übertragene BNFL2a-Transkripte Einfluss auf die Erkennung frisch infizierter B-Zellen von EBV-spezifischen CD8⁺-T-Zellen haben und so an der Immunevasion des Virus beteiligt sind. Vergleichbare Ergebnisse wurden für BMLF1-Transkripte gezeigt (Jochum et al. 2012). So scheinen das Verpacken und der Übertrag viraler mRNAs dem Virus einen Vorteil während der frühen Phase der Infektion zu verschaffen, was langfristig die erfolgreiche Etablierung einer persistierenden latenten Infektion unterstützt.

2.1.2.2 EBERs

Weitere RNAs des EBV sind die beiden kurzen, nicht-polyadenylierten, nicht-kodierenden RNAs (*EBV-encoded small RNAs*, EBERs) EBER1 und EBER2 (Skalsky and Cullen 2015). Sie werden in allen Latenzphasen des Virus exprimiert, ebenfalls in Viruspartikel verpackt und auf Zielzellen übertragen (Jochum et al. 2012; Swaminathan, Tomkinson, and Kieff 1991). EBERs spielen eine wichtige Rolle in EBV-infizierten Krebszellen (Nanbo and Takada 2002). Sie inhibieren beispielsweise die *RNA-activated protein kinase* (PKR), sodass eine durch Interferon- α (IFN α) vermittelte Apoptose nicht mehr ausgelöst werden kann, oder stimulieren die Produktion von Wachstumsfaktoren wie Interleukin-10 (IL-10), *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und Interleukin-9 (IL-9) und begünstigen so das maligne Zellwachstum in verschiedenen Tumoren (Iwakiri and Takada 2010; Swaminathan, Tomkinson, and Kieff 1991). Andere Studien konnten zeigen, dass EBERs zur Aktivierung des Immunsystems führen, entweder durch die Bindung an *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) oder den *Toll-like* Rezeptor 3 (TLR 3), was zur Expression von Typ-I-Interferonen und Zytokinen führt (Iwakiri 2014).

2.1.2.3 MicroRNAs

EBV war das erste Virus, in dem die Expression von microRNAs (miRNAs) nachgewiesen werden konnte. Inzwischen wurden über 40 virale miRNAs identifiziert, die in EBV-infizierten und -transformierten Zellen exprimiert werden. Dort nehmen sie Einfluss auf virale und zelluläre Gene, sowie die zelluläre Immunantwort und tragen so zur erfolgreichen Etablierung der latenten Infektion bei (Barth, Meister, and Grässer 2011; Hooykaas et al. 2016). Genauer gesagt unterdrücken EBV-kodierte miRNAs die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und verhindern die Differenzierung naiver CD4⁺-T-Zellen, sodass weniger zytotoxische CD4⁺-T-Zellen ausgebildet werden, die ihrerseits wiederum weniger infizierte B-Zellen erkennen und beseitigen (Tagawa et al. 2016). Des Weiteren konnte durch die schnelle Expression viraler miRNAs, welche alleine keine immunogenen Eigenschaften besitzen, die Aktivierung spezifischer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen verhindert werden. Dies trug ebenfalls zur Immunevasion des Virus bei und ermöglichte es ihm, unentdeckt die für eine lebenslang persistierende Latenz nötigen Proteine zu exprimieren (Albanese et al. 2016).

2.1.3 **EBV-spezifische Immunantworten**

Der menschliche Körper hat verschiedene Strategien entwickelt, um Pathogene zu bekämpfen und deren systematische Ausbreitung zu verhindern. Die Grundlage dafür sind die angeborene Immunantwort, die schnell aber unspezifisch reagiert und die erworbene (adaptive) Immunantwort, die durch Differenzierung von spezialisierten T-Zellen zielgerichtet Pathogene beseitigen kann und über die Ausbildung von Gedächtniszellen einen effektiven und langanhaltenden Schutz gewährt.

2.1.3.1 Angeborene Immunantwort

Zelluläre Bestandteile sind ein wesentlicher Teil der angeborenen Immunantwort und an der Erkennung einer EBV-Infektion beteiligt. Dazu gehören dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs), Monozyten und Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK). DCs werden in zwei funktionelle Gruppen, die konventionellen DCs (*conventional DCs*, cDCs) und die plasmazytoiden DCs (*plasmacytoid DCs*, pDCs) unterteilt (Merad et al. 2013). Während pDCs TLR9 exprimieren und dadurch doppelsträngige DNA (dsDNA) erkennen, besitzen cDCs keinen TLR 9, dafür aber den endosomal lokalisierten TLR3, welcher doppelsträngige RNA (dsRNA) erkennt, die teilweise von EBERs

ausgebildet wird (Iwasaki and Medzhitov 2004; Iwakiri et al. 2009). In beiden Fällen führt die Aktivierung der TLRs zu einer Ausschüttung großer Mengen an Typ-I-Interferonen (vor allem IFN α), wodurch unter anderem die EBV-induzierte Transformation von B-Zellen während der ersten 24 Stunden nach Infektion eingeschränkt wird (Lotz et al. 1985). Außerdem aktivieren und rekrutieren DCs weitere Immunzellen wie Granulozyten und NK-Zellen, die ebenfalls die Transformation von B-Zellen inhibieren und spezifisch lytisch replizierende Zellen erkennen (Chijioke, Müller, et al. 2013; Lunemann et al. 2013; Pappworth, Wang, and Rowe 2007).

NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer EBV-Primärinfektion und während der Pathogenese der infektiösen Mononukleose (IM) (Williams et al. 2005; Balfour et al. 2013). Außerdem wird angenommen, dass eine nicht funktionierende NK-Antwort im Verlauf einer persistierenden EBV-Infektion ein Grund für die Bildung EBV-assoziiertes Tumore ist, da sie normalerweise das EBV-vermittelte Wachstum transformierter B-Zellen reduzieren (Lunemann et al. 2013; Strowig et al. 2008; Azzi et al. 2014; Chijioke, Landtwing, and Münz 2016).

Ein weiteres wichtiges Element der angeborenen Immunantwort sind die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs), die in unterschiedlichen Kombinationen auf Immunzellen exprimiert werden und pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) diverser Erreger erkennen (Iwasaki and Medzhitov 2004). Wichtige Vertreter der PRR sind *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), *NOD-like* Rezeptoren (*nucleotide-binding oligomerization-like receptors*, NLRs), das Retinsäure-induzierte Gen I (*retinoic acid-inducible gene 1*, RIG-I) und C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptoren (*C-type lectin-like receptors*). Durch die Bindung ihrer jeweiligen Erkennungsmoleküle, beispielsweise Peptide oder Nukleinsäuren, lösen sie Signalkaskaden aus, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B oder Interferon-regulatorischen Faktoren (*interferon-regulatory factors*, IRF) 3 und 7 führen. Diese wiederum induzieren die Produktion von Typ-I-Interferonen (vor allem IFN α und IFN β) oder aktivieren antiapoptotische und inflammatorische Prozesse (Reich 2008).

Obwohl B-Zellen dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden, exprimieren sie unter anderem die TLRs 3 und 9 und sind dadurch auch an der angeborenen Immunantwort beteiligt (Dorner et al. 2009). Dabei ist TLR 9, der in B-Zellen vermehrt zu

finden ist, der wichtigste Vertreter bei der Erkennung einer EBV-Infektion. Er ist intrazellulär in Endosomen lokalisiert und erkennt unmethylierte CpG-Motive doppelsträngiger DNA (Ishii et al. 2008). Da die dsDNA von EBV in Viruspartikeln und kurz nach der Infektion in B-Zellen unmethyliert vorliegt, findet eine Erkennung durch TLR 9 während der primären Infektion und der Reaktivierung statt (Kalla et al. 2010). Eine Bindung viraler dsDNA an TLR 9 löst die Aktivierung von NF- κ B aus, welche die Transkription proinflammatorischer Zytokine und die Proliferation von B-Zellen induziert (Iskra et al. 2010). Dadurch werden im infizierten Wirt einerseits die darauffolgende Virusreplikation und ein damit verbundener Zelltod verhindert, sodass wichtige Immunfunktionen aufrechterhalten werden können. Andererseits inhibiert dieser Mechanismus auch die Elimination infizierter Zellen, wodurch dem Virus eine latente Persistenz ermöglicht wird (Münz 2015).

Schließlich reagiert das humorale Immunsystem auch mit der Ausschüttung verschiedener inflammatorischer Zytokine auf eine Infektion mit EBV. Dazu zählen zum Beispiel der Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), IL-6 und IL-1 β , welche auch in den Tonsillen von Patienten mit IM erhöht sind. Ein wichtiger Vertreter dieser Zytokine ist Interferon- γ (IFN γ), welches vor allem von aktivierten T- und NK-Zellen produziert wird. IFN γ spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer EBV-Infektion und -Reaktivierung, ist aber auch Auslöser zahlreicher Symptome während einer IM. IFN α dagegen ist in IM-Patienten nicht nachweisbar, was für eine Produktion in der frühen Phase der Infektion spricht, in der noch keine Symptome erkennbar sind.

Die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und *transforming growth factor*- β (TGF- β) sind ebenfalls im Serum von IM-Patienten nachweisbar. Gleichzeitig kann auch das latente Gen BCRF1 des EBV, welches als virales IL-10-Homolog fungiert, detektiert werden. IL-10 wird von Monozyten und Lymphozyten produziert und unterdrückt die T-Zellproliferation, indem es HLA Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche von B-Zellen reduziert (Zeidler et al. 1997). Außerdem hemmt es die Zytokin-, sowie die IFN γ -Produktion, wirkt so pathogenen Effekten entgegen und hat einen wichtigen Anteil an der Balance zwischen dem Schutz durch das Immunsystem und dem Auftreten von Symptomen während einer IM (Chijioke, Azzi, et al. 2013).

2.1.3.2 Zentrale Rolle von IFN β bei der virusinduzierten angeborenen Immunantwort

Eine zentrale Rolle bei der virusinduzierten angeborenen Immunantwort nimmt IFN β ein. Seine Produktion wird zu einem großen Teil durch den Kontakt von PAMPs mit zellulären PRRs ausgelöst (Nan, Nan, and Zhang 2014). Nahezu alle Zellen des Immunsystems können IFN β produzieren, darunter auch darauf spezialisierte Zelltypen wie die pDCs. Nach seiner Freisetzung induziert IFN β verschiedene Mechanismen, die eine Ausbreitung des Virus verhindern sollen. Es stimuliert die Produktion von Chemokinen, die eine Erkennung von virusinfizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen erleichtern, aktiviert natürliche Killerzellen, antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) und CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen und induziert die Transkription verschiedener Interferon-stimulierter Gene (ISG) (Reich 2008). Ein ausführlicher Ablauf der Prozesse ist in Abbildung 2 dargestellt (Münz 2015).

Speziell bei viralen Infektionen ist die frühe Immunantwort über Interferone wichtig, da sie die folgende adaptive Immunantwort mitgestaltet. So konnten beispielsweise Koerner *et al.* zeigen, dass Mäuse mit einer funktionierenden IFN β -Signalweiterleitung resistenter gegen eine Infektion mit Influenza A waren als jene, bei denen dieser Signalweg gestört war. Auch war es nicht möglich, den Ausfall der IFN β -Antwort durch IFN α komplett zu kompensieren (Koerner et al. 2007). Untersuchungen mit EBV-transformierten B-Zellen (*lymphoblastoid cell lines*, LCLs) zeigten, dass IFN β selbst im Stadium einer erfolgreich etablierten Infektion antivirale Signalwege und die Transkription von Genen der angeborenen Immunantwort aktivieren kann (Khsheibun et al. 2014). Im Gegensatz dazu beobachteten Ng *et al.*, dass eine Blockade von IFN β die Ausbildung einer persistierenden viralen Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) erschwert, indem die Lymphozytenmigration und die Virusbeseitigung durch antivirale T-Zellantworten gefördert wird (Ng et al. 2015). In die gleiche Richtung deuten Untersuchungen von Gram *et al.*, wonach B-Zellen nicht in der Lage sind, Typ-I-Interferone als Antwort auf zytoplasmatische DNA-Exposition zu induzieren und somit eine potenzielle Nische für die virale Persistenz eröffnen (Gram et al. 2017).

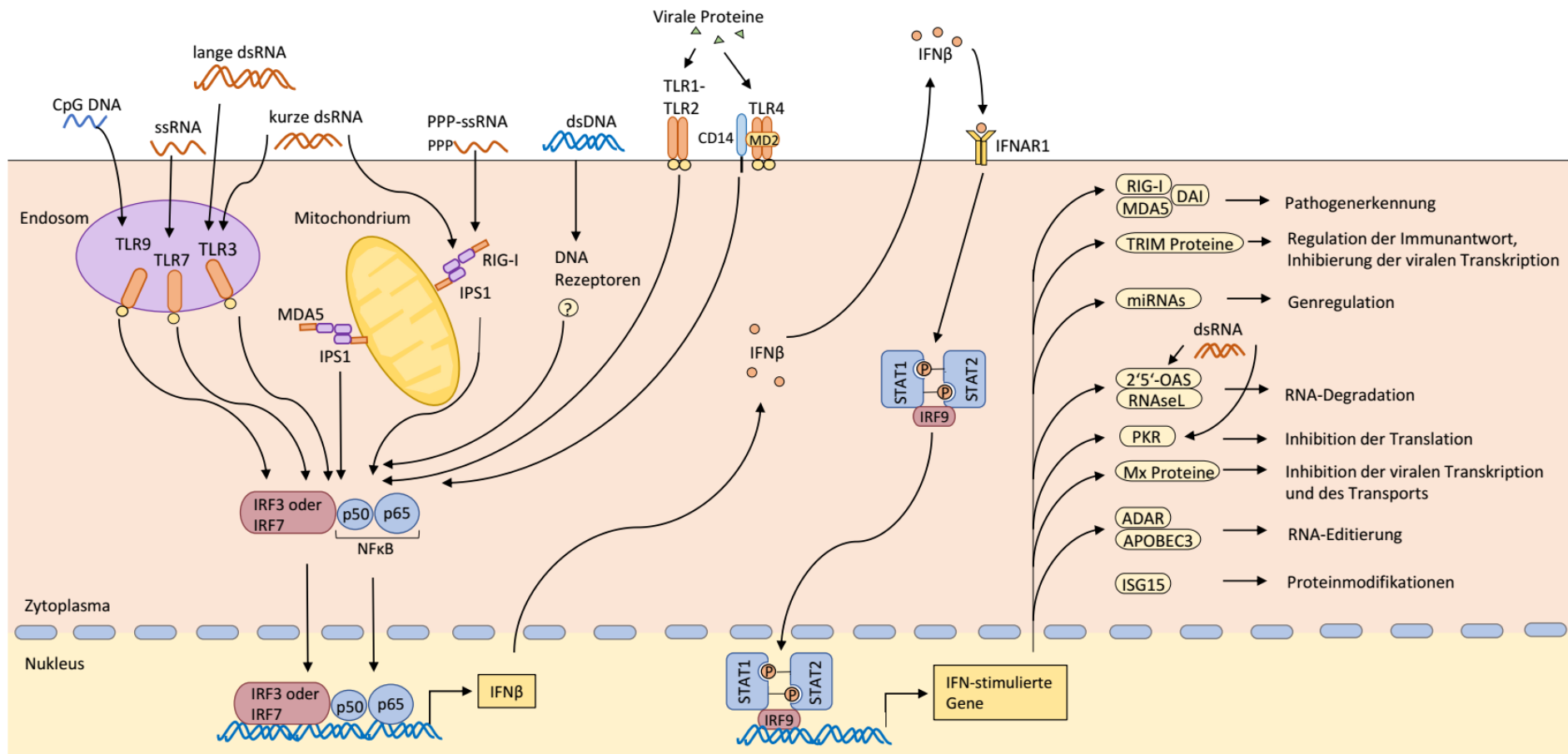


Abbildung 2: Zentrale Rolle von IFNβ bei der antiviralen angeborenen Immunantwort

Bei Kontakt von viralen Proteinen oder Nucleinsäuren mit ihren jeweiligen PRRs (*pattern recognition receptors*) werden Signalwege initiiert, die die Transkriptionsfaktoren IRF3 und 7 und/oder NF-κB aktivieren. Dies führt zur Expression von IFNβ, welches seinerseits antivirale Effektorprogramme in den infizierten Zellen und ihren Nachbarn auslöst. Einige der Interferon-stimulierten Gene (ISG) wie RIG-I (*retinoic-acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), DAI (*DNA-dependent activator of IRFs*), miRNAs und TRIM-Familie (*tripartite motif-containing*) sind in die Amplifikation und Regulation der Interferonantwort involviert. Andere ISG wie die OAS (*2'5'-oligoadenylate synthetase*), RNaseL (*ribonucleas L*), die IFN-induzierbare PKR (*dsRNA-dependent protein kinase*), das Mx-Protein (*myxovirus resistance*), ADAR (*adenosine deaminase RNA-specific*) und APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide 3*) sind an antiviralen Mechanismen beteiligt, die mit dem Zyklus des Virus interferieren. OAS und PKR werden außerdem von doppelsträngiger RNA (dsRNA) aktiviert. IFNAR1 (*interferon-α-receptor*), IPS1 (*IFNβ-promotor stimulator 1*), ISG15 (*IFN-stimulated protein of 15 kDa*), MD2 (*myeloid differentiation protein 2*), PPP (*5'-triphosphate*), ssRNA (*single-stranded RNA*), STAT (*signal transducer and activator of transcription*), TLR (*Toll-like receptor*), IRF3/7 (*interferon-regulatory factor 3/7*) NF-κB (*nuclear factor-κB*). Angepasst nach Bowie and Unterholzner 2008.

2.1.3.3 Adaptive Immunantwort

Infizierte B-Lymphozyten und weitere antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie DCs, Monozyten und Makrophagen präsentieren virale Antigene in Form von Peptiden mittels Proteinkomplexen, dem so genannten humanen Leukozytenantigen-System (*human leucocyte antigen*, HLA) oder Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), auf ihrer Oberfläche. Diese HLA-Peptidkomplexe werden von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen erkannt, die wiederum die Beseitigung der infizierten Zellen initiieren (Reich 2008).

Intrazelluläre Antigene werden von HLA Klasse-I-Rezeptoren gebunden. Diese werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und von CD8⁺-T-Zellen erkannt, die daraufhin zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren und die virusbefallenen Zellen beseitigen (Reich 2008; Münz 2015). Die Mehrzahl dieser aktivierten CD8⁺-T-Zellen sind gegen Epitope früher lytischer Gene des EBV (beispielsweise BZLF1, BRLF1, BMRF1) gerichtet und nur wenige erkennen Antigene von latenten Proteinen (EBNAs, LMPs), was als Immundominanz bezeichnet wird (Callan et al. 2000; Taylor et al. 2015).

HLA Klasse-II-Rezeptoren werden nur von bestimmten Zellen, zum Beispiel dendritischen Zellen, exprimiert. Sie präsentieren CD4⁺-T-Zellen extrazelluläre Peptidfragmente, was diese dazu veranlasst, B-Zellen zur Antikörperproduktion anzuregen oder Makrophagen zu aktivieren, die die infizierten Zellen aufnehmen und im Phagolysosom vernichten (Landais, Saulquin, and Houssaint 2005).

Eine zentrale Rolle bei der langfristigen Kontrolle einer EBV-Infektion nehmen die B-Gedächtniszellen ein. Sie ermöglichen eine schnellere, stärkere und effizientere Antwort auf erneute Infektionen oder Reaktivierungen als naive Zellen. Allerdings bieten sie gleichzeitig auch einen bevorzugten Ort für die persistierende Latenz des Virus, wobei sich in gesunden Individuen nur eine geringe Zahl an EBV-infizierten Zellen im Gedächtniszellkompartiment nachweisen lässt (Babcock et al. 1998). Für eine langfristig erfolgreiche Kontrolle der akuten und persistierenden Phase der Virusinfektion ist ein Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunantwort ausschlaggebend (Martorelli et al. 2012).

2.1.4 Immunevasionstrategien des EBV

Während seiner Koevolution mit dem menschlichen Wirt hat EBV Strategien entwickelt, um sich dem Immunsystem anzupassen und es zu seinem Vorteil zu nutzen. So ist letztendlich eine Balance zwischen der Erkennung und Bekämpfung von EBV durch das Immunsystem und einer Toleranz von infizierten Zellen mit einer latenten Form des persistierenden Virus entstanden.

2.1.4.1 Immunregulation während der lytischen Phase

Besonders wichtig sind virale Immunevasine während der Primärinfektion oder einer Reaktivierung von EBV. Eine Möglichkeit, die Viruserkennung in diesen Stadien zu verhindern, ist die Degradation von TLR-mRNA (speziell auch TLR9) durch das frühe lytische Protein BGLF5 (Chijioke, Azzi, et al. 2013). Dies führt zu einer verminderten Expression dieser Rezeptoren und erschwert dadurch die Erkennung des Virus durch das angeborene Immunsystem (van Gent et al. 2011; van Gent et al. 2015). Auch die beiden unmittelbaren frühen Gene BZLF1 und BRLF1 sind an der Modulation des Immunsystems beteiligt. Ihre Proteine interagieren mit IRF3 und IRF7 und inhibieren dadurch die Produktion von Typ-I-Interferonen (Hahn et al. 2005; Bentz et al. 2010). Zusätzlich inhibiert BZLF1 NF- κ B und auch die lytischen Proteine BGLF4 und BPLF1 greifen in diesen Signalweg ein, was am Ende die Induktion antiviraler Immuneffektormechanismen verhindert und die virale Replikation erleichtert (Morrison and Kenney 2004; Chang et al. 2012; van Gent et al. 2014).

2.1.4.2 Immunevasion während der Latenz

Um während der latenten Infektionsphase eine Erkennung durch das Immunsystem zu vermeiden, exprimiert EBV in diesem Stadium nur sehr wenige virale Proteine. Dazu gehören während der Latenz III EBNA1-6, LMP1 und 2. In Latenz II werden dann nur noch EBNA1, LMP1 und LMP2 exprimiert. Die Latenz I zeichnet sich durch die Expression eines einzigen Proteins, EBNA1, aus und während der Latenzphase 0 kommt EBV komplett ohne Proteinexpression zurecht (vergleiche Abbildung 1)(Münz 2015). EBNA1 inhibiert seine eigene Translation und proteasomale Degradation, sodass die Antigenpräsentation und dadurch die T-Zellantwort verhindert wird (Hochberg et al. 2004). Außerdem hemmt EBNA1 den kanonischen NF- κ B-Signalweg und moduliert die STAT1- und TGF β -Signalwege (Valentine et al. 2010; Wood et al. 2007).

EBNA2 sorgt einerseits dafür, dass in den infizierten Zellen geringe Mengen an IFN β produziert werden, die zu einer Produktion von ISG führen, andererseits aber die antiproliferativen Effekte durch eine Inhibition ausgewählter ISG neutralisieren (Kanda et al. 1999; Aman and Gabain 1990; Kanda et al. 1992). Zusätzlich verstärkt EBNA2 die Aktivität von STAT1, sodass die Produktion von inflammatorischen Mediatoren unterdrückt wird (Ho and Ivashkiv 2006).

LMP1 nimmt Einfluss auf viele immunologische Prozesse und begünstigt dadurch das B-Zellwachstum und das Zellüberleben (Middeldorp and Pegtel 2008). Es imitiert beispielsweise das CD40-Signal und induziert die Expression von IRF7, wodurch das B-Zellwachstum gefördert wird (Kieser 2007; Zhang and Pagano 2000). Gleichzeitig führt LMP1 zu einer reduzierten Expression von TLR 9 und induziert ISG über den JAK/STAT-Signalweg. Dadurch wird EBV selbst schlechter vom Immunsystem erkannt und gleichzeitig eine Superinfektion verhindert, was die Ausbildung der Latenz fördert (Gires et al. 1999; Zhang et al. 2004; Fathallah et al. 2010). LMP2 führt in infizierten B-Zellen zu einem Schutz vor Apoptose und beschleunigt den Abbau von IFN-Rezeptoren, was die Zellen weniger sensibel für IFN α und IFN γ macht (Swanson-Mungerson, Bultema, and Longnecker 2010; Shah et al. 2009).

2.1.4.3 Beitrag der nicht-kodierenden RNAs zur Immunevasion von EBV

Auch EBERs spielen bei der Immunevasion eine wichtige Rolle. Zum einen können sie die PKR binden und so die Interferon-stimulierte Genaktivität inhibieren. Zum anderen interagieren sie mit RIG-I, was einerseits zwar zu einer Induktion der Immunantwort führt, andererseits aber auch IL-10 induziert (Clarke et al. 1991). Dieser autokrine Wachstumsfaktor hat antiinflammatorische Eigenschaften, welche der Immunantwort entgegenwirken (Iwakiri 2014).

Einen weiteren Beitrag zum Schutz vor dem Immunsystem liefern die viralen miRNAs. Sie inhibieren zum Beispiel die Bildung eines Inflammasoms, verschiedene Bereiche des TGF β -Signalweges oder vermindern die Erkennung infizierter Zellen durch spezifische CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (Haneklaus et al. 2012; Callegari et al. 2014; Albanese et al. 2016; Tagawa et al. 2016).

2.1.5 EBV-assoziierte Erkrankungen

Ein Großteil der weltweiten Bevölkerung ist mit EBV infiziert und trägt das Virus als persistierenden Erreger lebenslang ohne weitere Konsequenzen in sich. Da die Primärinfektion häufig während der frühen Kindheit stattfindet und dabei meistens asymptomatisch verläuft, bleibt sie üblicherweise unbemerkt. Bei Jugendlichen und Erwachsenen kann sie dagegen eine IM, auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt, hervorrufen. Diese ist in der akuten Phase durch die Produktion und Freisetzung hoher Virustiter charakterisiert und beeinträchtigt den Patienten über mehrere Wochen mit grippeähnlichen Symptomen, wie Fieber, Gliederschmerzen und Müdigkeit (Balfour, Dunmire, and Hogquist 2015; Niedobitek et al. 1997).

Aufgrund seiner transformierenden und lymphoproliferativen Eigenschaften, die zur Ausbildung diverser Tumore wie dem Burkitt-Lymphom, dem Hodgkin-Lymphom, dem Nasopharynxkarzinom oder einem Magenkarzinom führen können, wurde EBV von der Internationalen Agentur für Krebsforschung als Gruppe-I-Kanzerogen klassifiziert (Jha, Banerjee, and Robertson 2016; Ressing et al. 2015; Middeldorp et al. 2003; Niedobitek, Meru, and Delecluse 2001). Besonders bei immunsupprimierten Patienten besteht zudem die Gefahr, dass sie lymphoproliferative Krankheiten wie PTLD (*Posttransplant lymphoproliferative disorders*) oder ARLs (*AIDS-related lymphomas*) entwickeln (Middeldorp et al. 2003). Das größte Risiko haben EBV-seronegative Patienten, die durch oder während der Transplantation mit EBV infiziert werden und das Virus aufgrund der Immunsuppression nicht kontrollieren können. Diese Patienten könnte eine vorher durchgeführte Immunisierung schützen.

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen mehreren Autoimmunkrankheiten und einer EBV-Infektion nachgewiesen werden (Chen 2011). Im Fall von systemischem Lupus erythematoses (SLE) und rheumatoider Arthritis (RA) zeigten Patienten erhöhte Titer an anti-EBV-Antikörpern, eine gestörte T-Zellantwort auf EBV-Antigene und eine höhere Viruslast in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (James et al. 2001; Poole et al. 2006).

Auch für Multiple Sklerose (MS), einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung mit Schäden an den Myelinscheiden im zentralen Nervensystem, wird ein Zusammenhang mit einer EBV-Infektion vermutet. So hatten beispielsweise Patienten, die stark an IM erkrankten, ein 20-fach höheres Risiko für MS als seronegative Patienten (Ascherio and Munger 2007).

2.1.6 EBV-Impfstoffe

Während der Entwicklung zahlreicher Impfstoffe gegen verschiedene Viren, wurden auch immer wieder Ansätze für einen EBV-Impfstoff getestet. Das Ziel dabei war es, einerseits die Manifestation einer IM während der Primärinfektion, andererseits aber vor allem die Ausbildung von PTLDs in immuninkompetenten Patienten zu verhindern. Abbildung 3 stellt in einer Zeitachse den Weg der EBV-Forschung, beginnend bei der Definition der IM, über die Entdeckung des EBV, bis zu den aktuellen Ergebnissen der EBV-Impfstoffentwicklung dar.

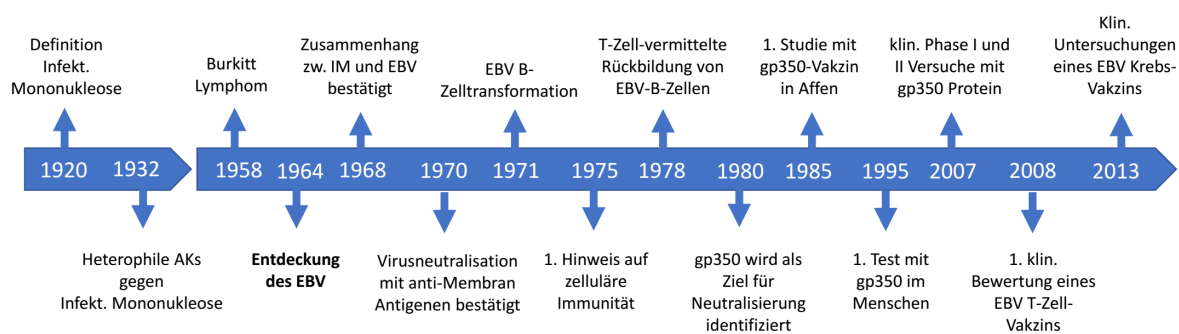


Abbildung 3: Zeitachse mit wichtigen Schritten auf dem Weg zur Entwicklung eines EBV-Impfstoffs

Die Zeitachse stellt die Meilensteine der EBV-Forschung von der Definition der infektiösen Mononukleose über die Entdeckung des Epstein-Barr-Virus bis zu den aktuellen Ergebnissen der EBV-Impfstoffentwicklung dar. Bis heute gibt es keinen zugelassenen Impfstoff gegen EBV. Bearbeitet nach Münz 2015.

Der erste potenzielle EBV-Impfstoff basierte auf gp350 und wurde 1985 von Epstein und Kollegen an Lisztaffen getestet. Die damit behandelten Affen entwickelten nach intraperitonealer EBV-Infektion keine Lymphome und produzierten sowohl neutralisierende Antikörper, als auch EBV-spezifische CD8⁺-T-Zellen (Epstein et al. 1985; Wilson et al. 1996). Limitiert wurden diese vielversprechenden Erkenntnisse durch die Tatsachen, dass die Affen eine geschützte Spezies sind, sich natürlicherweise nicht mit EBV infizieren, keine latenten Infektionen entwickeln und auch nur nach parenteraler Verabreichung hoher Virusdosen Lymphome ausbilden (Cohen 2015).

Eine der ersten Studien mit einem möglichen EBV-Impfstoff an Menschen wurde von Gu *et al.* 1995 durchgeführt. Dabei wurden Kinder mit einem Vaccinia-Virus, das gp350 auf der Oberfläche trägt, geimpft. Danach konnten erhöhte Titer an EBV-neutralisierenden Antikörpern in allen Probanden detektiert werden. Außerdem infizierten sich deutlich weniger geimpfte Kinder im Verlauf des Beobachtungszeitraums mit EBV, als in der nicht geimpften Vergleichsgruppe. Aufgrund der möglichen Nebenwirkungen des Vaccinia-

Vektors war eine Zulassung dieses Impfstoffes allerdings sehr unwahrscheinlich und wurde bis heute nicht erteilt (Gu et al. 1995; Cohen 2015).

Eine weitere Studie mit rekombinantem gp350, das an Aluminiumhydroxid/Monophosphoryl-Lipid gebunden wurde, führte bei 99 % der Probanden zu hohen Titern an EBV-neutralisierenden Antikörpern, die in den meisten Fällen eine Etablierung von IM verhinderten, allerdings nicht die EBV-Infektion per se (Moutschen et al. 2007; Sokal et al. 2007). Verschiedene Ansätze mit demselben Impfstoff oder EBV-Peptiden, welche die T-Zellantwort induzieren sollten, führten ebenfalls zu reduziertem Auftreten von EBV-assoziierten Erkrankungen, konnten aber in keinem Fall eine Infektion mit dem Virus verhindern (Rees et al. 2009; Elliott et al. 2008).

Die aktuellste Studie mit einem gp350-basierten Vakzin erfolgte 2013. Dabei wurde ein Tetramer aus gp350 in Aluminiumhydroxid oder Aluminiumhydroxid mit CpG verpackt. Beide Varianten führten zu höheren Antikörpertitern als monomeres gp350, verstärkten die spezifische T-Zellantwort und zeigten verbesserte Virusneutralisationstiter (Cui et al. 2013; Münz 2015).

Bis heute gibt es allerdings immer noch keinen zugelassenen Impfstoff gegen EBV. Vor allem im Hinblick auf die Bekämpfung der Etablierung lymphoproliferativer Erkrankungen in immuninkompetenten Patienten und die Ausbildung EBV-assoziiierter Autoimmunerkrankungen sollten daher weiter Anstrengungen in Richtung einer EBV-Impfstoffentwicklung betrieben werden.

2.2 Virus-like particles

2.2.1 Aufbau und Funktion

Virus-like particles (VLPs) sind multimere biologische Strukturen, die bei der Neusynthese von Viren als Nebenprodukt entstehen (Bailer et al. 2017). Sie tragen nicht nur virale Proteine auf der Oberfläche, sodass sie dieselbe Konformation wie das dazugehörige Virus aufweisen, sondern enthalten auch ein Kapsid. Außerdem verpacken VLPs funktionelle virale Proteine, die für die Bindung an und Aufnahme in die Zielzellen verantwortlich sind (Chroboczek, Szurgot, and Szolajska 2014; Roldão et al. 2010). Im Unterschied zu echten Viren besitzen VLPs kein virales Genom und sind daher nicht infektiös (Pavlova et al. 2013). Für VLPs des EBV konnte gezeigt werden, dass die Partikel virale RNAs enthalten, welche bei der Synthese mit verpackt werden (Jochum et al. 2012).

Eine Unterscheidung zwischen Viren und VLPs ist mittels Elektronenmikroskop möglich, während eine Trennung aufgrund ihrer biophysikalischen Ähnlichkeit bisher nicht durchführbar ist (Nolte-'t Hoen et al. 2016; Shevchuk et al. 2008). Gentechnische Verfahren ermöglichen jedoch auch die Herstellung von VLPs ohne die gleichzeitige Bildung von Viruspartikeln. Zugleich ist es möglich, die Zusammensetzung der VLPs zu manipulieren und beispielsweise Proteine oder RNAs von Interesse gezielt zu verpacken (Frietze, Peabody, and Chackerian 2016). Durch die besondere Herstellungsweise der EBV-basierten VLPs, die nur auf einer Deletion der Verpackungssignale für das virale Genom basiert, haben sie zusätzlich auch eine virale Hülle und kommen dem echten Virus im gesamten Aufbau am nächsten (Pavlova et al. 2013). Der Umstand, dass VLPs das infektiöse Virus in Aussehen und Eigenschaften imitieren, ohne dabei selbst infektiös zu sein, machen sie zu optimalen Kandidaten für verschiedene Anwendungen im biologischen und pharmakologischen Bereich (Ong, Tan, and Ho 2017).

2.2.2 Anwendungsgebiete

Ein Anwendungsgebiet für VLPs ist die Verpackung und Verabreichung von Wirkstoffen (*drug delivery*), da sie diese in hoher Konzentration zielgerichtet und ohne große Nebenwirkungen intravenös transportieren können (Bailer et al. 2017). Wie Viren werden auch VLPs in Zielzellen aufgenommen, prozessiert und Epitope viraler Proteine von APCs präsentiert, um spezifische angeborene und zellvermittelte Immunantworten auszulösen (Zeltins 2013).

Heutzutage sind bereits einige VLP-basierte Vakzine im Einsatz. Bereits erfolgreiche prophylaktische VLP-Impfstoffe sind jene gegen Hepatitis B (HBV) und humane Papillomviren (HPV) (Sominskaya et al. 2010; Frazer 2004). Der proteinbasierte Impfstoff gegen Hepatitis B war der erste seiner Art und besteht aus einem rekombinanten Oberflächenantigen (HBsAg), das sich spontan kugelförmig zu VLPs anordnet und an Aluminiumhydroxidgel adsorbiert wird (Greiner et al. 2010). Durch drei Injektionen dieser VLPs wird die Bildung spezifischer anti-HBV-Antikörper induziert und dadurch eine Immunität gegenüber Hepatitis B-Infektionen für mindestens 25 Jahre gewonnen. Der Impfstoff gegen HPV basiert auf VLPs, die sich aus dem rekombinant hergestellten Hauptkapsidprotein L1 des jeweiligen Virusstammes zusammensetzen. Nach drei aufeinanderfolgenden Impfdosen kann so ein Schutz für mindestens acht Jahre erreicht werden (Chroboczek, Szurgot, and Szolajska 2014; Roy and Noad 2008).

Ein vielversprechender Ansatz für einen EBV-Impfstoff basierend auf VLPs wurde 2011 von Ruiss *et al.* publiziert. In diesen VLPs fehlten sieben EBV-Proteine, sowie die DNA-Verpackungssignale, sodass einerseits keine virale DNA verpackt werden konnte und andererseits, selbst im Falle einer seltenen illegitimen Verpackung, diese keinesfalls transformierende Eigenschaften besaßen. In Mäusen induzierten diese VLPs die Bildung von neutralisierenden Antikörpern und zelluläre Immunantworten, welche mittels IFN γ -Elispot nachgewiesen werden konnten (Ruiss et al. 2011). Fraglich war zu diesem Zeitpunkt allerdings, ob die VLPs als Impfstoff in geeigneter Menge und in den verwendeten Produzentenzellen herzustellen wären und schließlich zur Anwendung im Menschen akzeptiert werden würden (Cohen 2015).

2.2.3 Extrazelluläre Vesikel

Eine weitere Vesikelart, die häufig im Zusammenhang mit Viren und VLPs genannt wird, sind extrazelluläre Vesikel (EV). EV sind von einer Phospholipidmembran umschlossene Einheiten, die von nahezu jeder Zelle sezerniert werden (Raposo and Stoorvogel 2013). Sie enthalten Proteine, Nukleinsäuren und Lipide ihrer Parentalzelle und können diese auf andere Zellen übertragen, wo sie dann funktional aktiv sind. Auch virusinfizierte Zellen produzieren EV, die auch virale Proteine oder virale RNAs enthalten und ohne Elektronenmikroskop nicht von Partikeln umhüllter Viren zu unterscheiden sind (Nolte-'t Hoen et al. 2016). Während EV bei ihrer Entdeckung zuerst als Entsorgungsvehikel der Zelle betrachtet wurden, ist inzwischen bekannt, dass sie vielmehr zur interzellulären Kommunikation genutzt werden und wichtige Rollen bei der Kontrolle verschiedener Entwicklungsprozesse, der Proliferation, der Migration und bei pathologischen Prozessen spielen können (Maas, Breakefield, and Weaver 2017).

Diese Tatsache kann auch ein nützliches Hilfsmittel bei der Untersuchung der biologischen und molekularen Bedeutung viraler Proteine und Nukleinsäuren sein. Durch genetische Manipulation lassen sich einzelne Virusbestandteile in EV-produzierenden Zellen exprimieren und in Vesikel verpacken, sodass deren Funktion auf und in Zielzellen isoliert untersucht werden kann (Gärtner 2016). In Abbildung 4 sind schematisch die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Viruspartikeln, VLPs und EV dargestellt.

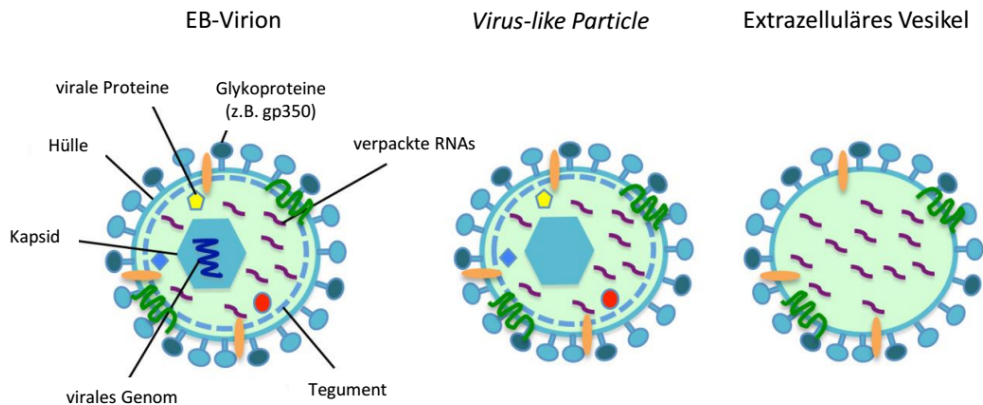


Abbildung 4: Aufbau eines EB-Virions, eines *Virus-like Particle* (VLP) und eines extrazellulären Vesikels (EV)
 Das EB-Virion enthält im Zentrum das virale Genom, welches in einem Kapsid verpackt ist. Umschlossen wird dieses zusammen mit viralen Proteinen und RNAs vom Tegument, an das sich die Virushülle anschließt. Diese enthält verschiedenen Glykoproteine wie beispielsweise gp350. VLPs unterscheiden sich im Aufbau bis auf das Fehlen des viralen Genoms nicht von echten Viruspartikeln. Das extrazelluläre Vesikel wurde in dieser Abbildung genetisch so manipuliert, dass es auf seiner Membran das virale gp350 trägt und mRNA-Transkripte verpackt.

2.3 Genetisch modifizierte rekombinante EBVs und VLPs

Die genetische Modifizierung des EBV Genoms und die damit verbundene Möglichkeit einer gezielten Untersuchung der Funktion einzelner Virusbestandteile erlaubte auch die Herstellung EBV-basierter VLPs. Das System wurde von Hammerschmidt und Kollegen entwickelt, indem sie mit einem rekombinanten EBV-Genom eine induzierbare Produzentenzelllinie etablierten (Delecluse et al. 1998). Dabei wurde das gesamte Genom des EBV-Laborstamms B95.8 in ein F-Plasmid des Bakteriums *Escherichia coli*, genannt *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC), eingebracht. Das zusätzliche Einfügen einer durch einen CMV-Promotor gesteuerten Expressionskassette für eGFP und Hygromycin B als phänotypische Marker, ermöglichte die Selektion und Visualisierung stabil transfizierter HEK293-Produzentenzelllinien. Außerdem wurde dadurch die Bestimmung eines Virustiters mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Die Virusproduktion kann durch Transfektion eines für BZLF1 codierenden Plasmids induziert und die Ausbeute an infektiösem Virus durch eine Co-Transfektion mit BALF4 erhöht werden. Die genetische Manipulation mittels homologer Rekombination ist im Methodenteil unter 4.3.3 ausführlicher beschrieben und ermöglichte durch die Deletion der terminalen repetitiven Sequenzen (*terminal repeats*, TRs), welche für die Verpackung des viralen Genoms in das Kapsid zuständig sind, auch die Produktion von EBV-basierten VLPs. Diese entsprechen vom Aufbau und der Zusammensetzung her echten Viruspartikeln, haben also auch ein Kapsid und eine Hülle, enthalten aber aufgrund der fehlenden Verpackungssequenzen

kein virales Genom (TR-VLPs) (Delecluse et al. 1999). Dadurch eignen sie sich hervorragend als Vehikel für sämtliche EBV-Bestandteile und sind ein vielversprechender Kandidat für EBV-basierte Vakzine (Hettich 2006; Ruiss et al. 2011).

2.4 Ziel der Arbeit

Das Epstein-Barr Virus ist ein humanpathogener Erreger, der eine Vielzahl an Erkrankungen im infizierten Individuum auslösen kann. Vor allem aufgrund seiner tumorigenen Eigenschaften und der Assoziation mit Autoimmunerkrankungen sind eine Bekämpfung des Virus im Wirt und die Entwicklung eines Impfstoffs von großer Bedeutung. Da es bis heute keine spezifische Therapie der Primärinfektion oder der durch EBV hervorgerufenen Erkrankungen gibt, wird die Entwicklung eines effizienten und gleichzeitig sicheren Impfstoffes als wichtig angesehen. Ein vielversprechender Ansatz für die Entwicklung eines solchen Impfstoffs sind *Virus-like particles*. Diese wurden bereits als Impfstoffe gegen HBV und HPV zugelassen und haben den Vorteil, dass sie das „echte“ Virus größtenteils imitieren, ohne dabei selbst infektiös zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen und immunologischen Eigenschaften von VLPs im Hinblick auf die Entwicklung eines EBV-Impfstoffs analysiert werden. Dafür war es zuerst wichtig, die Stabilität der VLPs und ihre Fähigkeit, virale Bestandteile auf Zielzellen zu übertragen, genauer zu untersuchen. Dies geschah über RNA-Sequenzierung und qRT-PCR von B-Zellen, welche zuvor mit EBV-basierten VLPs inkubiert worden waren. Dadurch sollten wichtige Informationen über die Zusammensetzung der übertragenen viralen RNAs gewonnen werden. Die Analyse der Genexpressionsdaten sollte einen Einblick in die frühen zellulären immunologischen Ereignisse von B-Zellen nach der Infektion geben. Schließlich erlaubten diese Daten eine Aussage über die Voraussetzungen von VLPs zu treffen, um als Basis für einen EBV-Impfstoff herangezogen werden zu können.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Generierung und Testung von VLPs mit und ohne miRNAs. Da virale miRNAs nachweislich immunevasive Eigenschaften haben, sollte deren Einfluss auf die durch VLPs induzierte zelluläre Immunantwort getestet werden. Zusammengefasst können die gewonnenen Erkenntnisse ein weiterer Schritt in Richtung der Konstruktion von EBV-basierten VLPs sein, die als Impfstoff eingesetzt werden können, um die Etablierung von IM und PTLDs zu verhindern.

3 MATERIAL

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose Gelkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Bakterieninkubator	Thermo Fisher, Waltham, USA
Brutschrank CO ₂ -Unitherm 170	UniEquip, Planegg, Deutschland
Durchflusszytometer (FACS Canto, FACS Calibur)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Falcon-Roller TRM 50	IDL, Nidderau, Deutschland
Flourometer (DanaQuant 200)	Hofer, Holliston, USA
Filmentwickler (CP100)	AGFA, Mortsel, Belgien
Geldokumentationsstation (Quantum ST5)	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Gel-Gießstand (Dual Gel Caster, Mighty Small)	Hofer, Amersham, Freiburg, Deutschland
Heizblock (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Illumina HiSeq 1500	Illumina, San Diego, USA
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Light Cycler 480 II	Roche, Basel, Schweiz
MACS Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mehrkanalpipette (Pipet-Lite XLS, 8-Kanal)	Rainin/Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Mikroplatten Photometer (Tecan Infinite F200 Pro)	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Multipette® stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanopartikel Tracking Analysator (ZetaView®)	Particle Metrix, Meerbusch, Deutschland
Nanophotometer (Nanodrop)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul-Marienfeld, Königshofen, Deutschland

PCR-Cycler (T Gradient)	Biometra, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten (Pipet-Lite XLS: 1000µl; 200µl; 20µl; 2µl)	Rainin/Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Spannungsquelle (BIO-RAD Power Pac 200)	BioRad, München, Deutschland
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Tischultrazentrifuge (TL100)	Beckman Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge (PICO 21 centrifuge)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Transferkammer (Trans-Blot SD Semi Dry Transfer)	BioRad, München, Deutschland
Ultrazentrifuge (Optima L-60, Optima L-70)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Ultrazentrifuge Rotoren (SW23, SW32, SW60Ti, 70Ti)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
UV-Transilluminator	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge (Avanti J-26 XP)	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 3 L-R)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Rotana 46RSC)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge (Eppendorf 5415R)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Dialysemembran (Spectra/Por)	Spectrumlabs, Breda, Niederlande
Einfrierröhrchen, CryoTube™	NUNC, Thermo Scientific, USA
Einmalküvetten (10x10x48 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalskalpell	B Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen, div. Größen	B Braun, Melsungen, Deutschland
ELISA Platten (MaxiSorp®)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland

FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Filme (CEA Medical X-Ray Screen Film blue sensitive)	Agfa Healthcare NV, Mortsel, Belgien
Filtereinheit: 0,45 µm; 1,2 µm (CA-S)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Filtereinheit: 0,8 µm (Ca-S)	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Gel-Blotting Papier (GB 004)	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
MACS Säulen (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nitrozellulose Amersham™ Proctan™ Premium (0,45 µm)	GE Healthcare, München, Deutschland
PCR Reaktionsgefäße (ThermoStrips)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen div. Größen	Gilson, Limburg-Offenheim, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
qPCR 96-Loch Platten mit Klebefolie (LC480)	Roche, Basel, Schweiz
Reaktionsgefäße, Safe Lock (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen (1,2 ml)	Beckman Coulter, USA
Ultrazentrifugenröhrchen (4 ml, Ultra-Clear)	Beckman Coulter, USA
Ultrazentrifugenröhrchen (35 ml)	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Zellkulturschalen/-flaschen div. Größen	Corning Inc, Corning, USA
Zellsieb (100 µm)	Corning Inc, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen FALCON® (15 ml; 50 ml)	Corning Inc, Corning, USA
96-Loch Rundbodenplatte (Nunc™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Loch V-Bodenplatte (Nunc™)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellkulturplatten (6-Loch, 12-Loch, 48-Loch, 96-Loch)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

3.3 Medien und Zusätze

3.3.1 Zellkulturmedien

Medium	Bestandteile
Einfriermedium	FCS + 10% DMSO (v/v)
LCL-Medium	500 ml RPMI; 7,5% FCS; 1% Pen/Strep; 1% Natriumpyruvat; 1% NEAA; 1% L-Glutamin
RPMI/G418	500 ml RPMI; 8% FCS; 1% Pen/Strep; 1 mg/ml Geneticin (G418)
RPMI/Hygro	500 ml RPMI; 8% FCS; 1% Pen/Strep; 100 µg/ml Hygromycin
RPMI/Puro	500 ml RPMI; 10% FCS; 1% Pen/Strep; 1 µg/ml Puromycin
RPMI-Standardmedium	500 ml RPMI; 8% FCS; 1% Pen/Strep

3.3.2 Zusätze

Name	Hersteller
Defibriniertes Schafsblut	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ficoll	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Fötales Rinderserum (FBS)	Bio & SELL, Feucht, Deutschland
Geneticin (G418)	Milipore, Burlington, USA
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin Gibco®	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/0,05% EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Alkalischer Lysepuffer I	50 mM Glukose; 25 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA in H ₂ O; 100 µg/ml RNase A frisch dazu
Alkalischer Lysepuffer II	Frisch angesetzt: 0,2 mM NaOH; 1% SDS (w/v) in H ₂ O
Alkalischer Lysepuffer III	3 M KAc; 11,5% Essigsäure (v/v) in H ₂ O; gelagert bei 4°C
Bis-Tris/Acrylamid Sammelgel (4%)	2,86 ml 1,25 M BisTris pH 6,8; 1,5 ml 30% Acrylamid; 5,6 ml H ₂ O; 100 µl 10% APS; 10 µl TEMED
Bis-Tris/Acrylamid Trenngel (8%)	4,29 ml 1,25 M BisTris pH 6,8; 4 ml 30% Acrylamid; 3,14 ml H ₂ O; 100 µl 10% APS; 4 µl TEMED
Blockpuffer (WB)	5% (w/v) Milchpulver; 0,1% Tween-20 (v/v) in 1x TBS
DNA Färbepuffer	100 mM Tris HCl pH 7,4; 10 mM EDTA; 1 M NaCl
ECL Lösung	ECL 1: 0,1 M Tris HCl pH 8,8; 200 mM p-Courmainsäure; 1,25 mM Luminol ECL 2: 3% H ₂ O ₂ (v/v) Arbeitslösung: 1 ml ECL 1 + 3 µl ECL 2
ELISA AP Substrat	5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (p-NPP); 0,5 mM MgCl ₂ 50% Diethanol-amin pH9,5; gelagert bei -20°C
ELISA Waschpuffer	0,05% Tween-20 (v/v) in PBS
FACS-Puffer (Elijah Assay)	0,5% BSA oder FCS (v/v), 2mM EDTA, in PBS
FACS-Puffer	2% FCS in PBS
Fixierlösung (FACS)	1% Paraformaldehyd; 2% FCS in PBS
LB-Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; H ₂ O ad 1 l; pH 7,5 eingestellt mit NaOH; autoklaviert

Lysepuffer I (Maxi-EBV)	50 mM Glucose; 25 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA
Lysepuffer II (Maxi-EBV)	0,2 M NaOH; 0,4% SDS (w/v)
Lysepuffer "RIPA"	50mM TrisHCl pH 7,4; 1% NP-40/Igepal (v/v); 0,5% DOC (v/v); 0,1% SDS (w/v); 137mM NaCl; 1 Tablette Proteaseinhibitor Cocktail (Complete Mini, Roche)
Protein Ladepuffer (Laemmli), nicht-reduzierend (5x)	62,5 mM Tris HCl pH 7,4; 20% Glycerol (v/v); 2% SDS (w/v); 0,0625% Bromphenolblau (w/v)
Protein Ladepuffer (Laemmli) reduzierend (5x)	62,5 mM Tris HCl (pH 7,4); 20% Glycerol (v/v); 2% SDS (w/v); 5% β -Mercaptoethanol (v/v); 0,0625% Bromphenolblau (w/v)
SDS Laufpuffer (WB)	NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer (1x); 5 mM NaHSO ₃
Spezial TE Puffer	50 mM Tris HCl pH 8,0; 20 mM EDTA
Standard TE Puffer	10 mM Tris HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA
TAE (50x)	242 g Tris; 100 ml 0,5 M Na ₂ EDTA pH 8,0; 57,1 ml Essigsäure; H ₂ O ad 1 l
TBE Puffer (5x)	54 g Tris; 27,5 g H ₃ BO ₃ ; 3,72 g Na ₂ EDTA; H ₂ O ad 1 l
TBS (10x)	24,2 g Tris; 80 g NaCl; H ₂ O ad 1 l
Transferpuffer, semi-dry Blotting (10x)	30,3 g/l Tris; 144 g/l Glycin; 0,4% SDS (v/v); Arbeitslösung: 1x Transferpuffer + 20% MeOH
Waschpuffer (WB)	0,05% Tween-20 (v/v) in 1x TBS

3.5 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Agarose Gibco®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

MATERIAL

DNA Marker 100bp; 1kb	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ELISA Substrat (OptiEIA substrate solution)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem, Illinois, USA
FACS Flow/Clean/Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Glycogen (RNA-grade)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Go Taq Green Mastermix (2x)	Promega, Mannheim, Deutschland
HoechstDye 33258	Hoechst, Frankfurt, Deutschland
Lambda DNA BstEII Digest Marker	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
OptiPrep™ Density Gradient Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS Gibco®	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinmarker (Page Ruler Plus prestained)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteaseinhibitor ULTRA Tabletten, EDTA-frei	Roche, Basel, Schweiz
Proteaseinhibitor Complete Mini, EDTA-frei	Roche, Basel, Schweiz
Referenz DNA Lambda HindIII	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Standardbeads 102 nm	Particle Metrix, Inning am Ammersee, Deutschland
Standard Taq Puffer (10x)	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol (TRIZOL™ Reagent)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypanblau	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Transfektionsreagenzien: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
 Polyethylenimin (PEI und PEI Max),
 1:1000 (w/v) in sterilem H₂O

3.6 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden mit den empfohlenen Puffern entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt.

Name	Hersteller
DNase I (RNase-frei)	Qiagen, Hilden, Deutschland
GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
Lysozyme	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
qPCR Reaktionsmix (SYBR Green Master I)	Roche, Basel, Schweiz
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, USA
RNase A	Promega, Mannheim, Deutschland
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim, Deutschland
Taq Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper

Zielantigen	Klon	Spezies/Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Calnexin		Maus	1:1000	BD Biosciences, USA
CD63	24F9	Ratte/IgG2b	1:5000	AG Zeidler, HGMU
CD81	5A6	Maus/IgG1	1:1000	BioLegend, USA
gp350	OT-6	Maus	1:2500	J.M. Middeldorp, NL
BZLF1/Zta	BZ1	Maus	1:50	E. Kremmer, HGMU (Hybridomüberstand)
BRLF1/Rta	8C12	Maus	1:100	E. Kremmer, HGMU (Hybridomüberstand)
gp350-Alexa647	6G4	Ratte	1:250 (direkt markiert)	AG Zeidler, HGMU

3.7.2 Sekundärantikörper

Zielantigen	Konjugat	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Ratte IgG	HRP	Maus/IgG2b	1:1000	E. Kremmer, HGMU
Maus	HRP	Pferd	1:3000	Cell Signalling, USA

3.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Metabion GmbH synthetisiert (Martinsried, Deutschland).

3.8.1 Primer für quantitative real-time PCR

Target	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')	Produkt- größe (nt)
BZLF1	CTGGTGTCCGGGGGATAAT	TCCGCAGGTGGCTGCT	107
BRLF1	CCTGTCTTGACGAGACCAT	AAGGCCTCCTAAGCTCCAAG	100
BMRF1	CGTGCCAATCTTGAGGTTTT	CGGAGGCGTGGTTAAATAAA	116
BNLF2a	TGCTGACGTCTGGGTCT	TGCTTTGCTAGAGCAGCAGT	98
BCRF1	ACCTTAGGTATGGAGCGAAG	GGGAAAATTGTCACATTGGT	110
LMP1	AGGCTAGGAAGAAGGCCAAA	CTGTTCATCTTCGGGTGCTT	109
EBNA2	ACATGAACCGGAGTCCATA	TGCGGGGTCTATAGATGGAG	82
EBER1	GACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGC	CCAGCTGGTACTTGACCGAAGACG	150
EBER2	GGACAGCCGTTGCCCTAGTGG	AGCGGACAAGCCGAATACCCTTC	166
gp350	TTGTGAAATTTGCCCATCCT	CAAAACCCCGTGTACCTG	222
GUSB	CGCCCTGCCTATCTGTATTC	TCCCCACAGGGAGTGTGTAG	91
IFNB1	CGACACTGTTCGTGTTGTA	GAACACAACAGGAGAGCAA	67
CCR1	CCACATGCAAAGCTACTGCT	CGGCCCTGACACCACTAC	60
CD73	TCCCGGATGAGAGAGGA	CCCTGGACCTAGGCTTC	70
TRIM21	AATGCATCTCTCAGGTTGGG	TGTTGGCTAGCTGTCGATTG	102
TTP	GAGACCCACCCAGTCT	CCCAGACGCTGAGGAGTG	60
TNF α	CAGCCTCTTCTCCTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA	123
IL-1 β	TACCTGTCCTGCGTGTTGAA	TCTTTGGGTAATTTTGGGATCT	76

3.8.2 Primer für TaqMan miRNA PCR

Alle Primer wurden von Thermo Fisher Scientific (USA) bezogen.

Target	Bezeichnung	Nummer
miR-BART1	ebv-miR-BART1-5p	197199_mat
miR-BART3	ebv-miR-BART3	004578_mat
miR-BHRF1-2	ebv-miR-BHRF1-2-3p	197239_mat
human miR-16	hsa-miR-16	000391
<i>C. elegans</i> mir-39	cel-mir-39	000200

3.8.3 Primer für Standard-PCR

Target	Vorwärtsprimer (5'-3')	Rückwärtsprimer (5'-3')	Produktgröße (bp)
BamHI W Region	TCGCGTTGCTAGGCCACCTT	CTTGGATGGCGGAGTCAGCG	296

3.8.4 Spike-in Kontroll-RNA

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße (bp)
<i>C. elegans</i> mirNA cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	22

3.9 Plasmide

Plasmidnr. (AGV Datenbank)	Beschreibung
p509	BZLF1-Expressionsplasmid; induziert die lytische Phase von EBV in rekombinanten Produzentenzellen
p2670	BALF4-Expressionsplasmid; steigert die Virus-/Vesikelsynthese
p2385	gp350-Expressionsplasmid; zur Herstellung gp350-positiver EV
p1933	Verpackungsplasmid, enthält TRs; wird zur Herstellung von Viruspartikeln aus VLP-Produktionszellen verwendet
p1925	eGFP Expressionsplasmid; wird zur Herstellung von eGFP-positiven EV verwendet

3.10 Maxi-EBV BACs

Plasmidnr. (AGV Datenbank)	Name	Beschreibung
p2089	rekombinanter Laborstamm	kodiert das EBV B95.8 Genom, erweitert mit CMV-Promotor-gesteuertem Hygromycin-Resistenzgen und eGFP (Delecluse et al. 1998)
p2114	TR-VLPs	entspricht p2089, aber mit einer Deletion der TRs, was zur Produktion von VLPs führt (Delecluse et al. 1999)
p6008.5	rekombinanter WT, inklusive fehlender miRNAs	kodiert für das EBV B95.8 Genom, basierend auf p2089, Puromycin-Resistenzgen, enthält zusätzlich die im WT deletierten miRNAs
p6338.10	rekombinanter WT, Deletion der miRNAs	kodiert für das EBV B95.8 Genom, basierend auf p6008.5, Puromycin-Resistenzgen, enthält keine miRNAs
p6354	VLPs +miRNAs	entspricht p6008.5, aber mit einer Deletion der TRs, was zur Produktion von VLPs führt, die alle miRNAs enthalten
p6355	VLPs Δ miRNAs	entspricht p6338.10, aber mit einer Deletion der TRs, was zur Produktion von VLPs führt, die keine miRNAs enthalten

3.11 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung
Escherichia coli DH5 α	<i>F</i> -, <i>F80dlacZDM15</i> , <i>D(lacZYA-argF)</i> , <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17(rk-, mk)</i> , <i>supE44</i> , λ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Singh et al. 2010)
Escherichia coli SW105	<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara</i> , <i>leu</i>) 7649 <i>galU</i> Δ <i>galK</i> <i>rspL</i> <i>nupG</i> [λ <i>cl857</i> (<i>cro-bioA</i>) \leftrightarrow <i>tet</i>], (Warming et al. 2005)

3.12 Viren und *Virus-like particles* (VLPs)

3.12.1 Viren

Name (Plasmidnr.)	Beschreibung
EBV 2089 (p2089)	rekombinantes EBV; enthält ein BAC, basierend auf B95.8 mit zusätzlichem CMV-Promotor gesteuertem Hygromycin-Resistenzgen und eGFP; Virusproduktion wird durch transiente Transfektion mit p509 und p2670 induziert
wtEBV (p6008.5)	EBV-WT; enthält ein BAC, basierend auf dem EBV B95.8-Genom mit allen miRNAs; Virusproduktion wird durch transiente Transfektion mit p509 und p2670 induziert
EBV Δ miRNAs (p6338)	EBV miRNA-Deletionsmutante; enthält ein BAC, basierend auf p6008.5 und trägt eine Deletion für alle miRNAs; Virusproduktion wird durch transiente Transfektion mit p509 und p2670 induziert

3.12.2 VLPs

Name	Beschreibung
TR-VLPs (p2114)	EBV-Verpackungslinie; enthält ein BAC, basierend auf p2089, dem die TRs fehlen, sodass das virale Genom nicht verpackt werden kann; Partikelproduktion wird durch transiente Transfektion mit p509 und p2670 induziert
VLPs+miRNAs (p6354)	wtVLP; enthält ein BAC, basierend auf p6008.5, dem die TRs fehlen; besitzt alle viralen miRNAs; Partikelproduktion wird durch transiente Transfektion mit p509 und p2670 induziert
VLPs Δ miRNAs (p6355)	miRNA-Deletionsmutante; enthält ein BAC, basierend auf p6338.10, dem die TRs fehlen; negativ für alle viralen miRNAs; Partikelproduktion wird durch transiente Transfektion mit p509 und p2670 induziert

3.13 Eukaryotische Zellen

3.13.1 Primäre Zellen

Zellen	Beschreibung
B-Lymphozyten	B-Zellen, isoliert aus humanen Adenoiden oder PBMCs
PBMCs	isoliert aus humanem Vollblut (Spender oder <i>buffy coats</i>)

3.13.2 Etablierte Zelllinien

Zellen	Beschreibung
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen 293, generiert durch Transformation von humaner embryonaler Nierenzellkultur mit AV5 DNA (Graham et al. 1977)
HEK293/2089	HEK293-Zellen, die stabil mit p2089 transfiziert wurden; eGFP-positiv (Delecluse et al. 1998)
HEK293/TR-2	HEK293-Zellen, die stabil mit p2114 transfiziert wurden, rekombinante TR-VLP-Produzentenzelllinie (Delecluse et al. 1998)
Raji	EBV-positive Burkitt-Lymphomzelllinie (Karpova et al. 2005)
Elijah	EBV-negative Burkitt-Lymphomzelllinie
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie, etabliert durch <i>in vitro</i> Transformation von primären humanen B-Zellen mit EBV (B95.8 Stamm)
mini-LCL (mLCLs)	Lymphoblastoide Zelllinie, etabliert durch <i>in vitro</i> Transformation von primären B Zellen mit einem Mini-EBV, einer Virusmutanten, die den lytischen Zyklus nicht induzieren kann (Kempkes et al. 1995)
B95.8	Lymphoblastoide Krallenaffenzelllinie, latent und lytisch mit EBV infiziert; geben ständig infektiöse B95.8 Viren in den Überstand ab (Miller and Lipman 1973; Miller et al. 1972)

3.13.3 T-Zellklone

Alle T-Zellklone wurden von Dr. Julia Damaschke und Dr. Dinesh Adhikary (AG Mautner) zur Verfügung gestellt.

Name	Klon	Epitop	HLA Restriktion
BcLF1	JD BcLF1	nicht bekannt	HLA-DRB1*0101
BFRF3	DA BFRF3	nicht bekannt	HLA-DRB1*1502
BNRF1	JM N 1H7	AA ₅₄₈₋₅₆₁ -LGGLNLFVNDLASPV-	HLA-DRB3*0101
BSRF1	DA BSRF1	nicht bekannt	HLA- DQB1*0601
gp350	gp 1D6	AA ₆₅₋₇₉ -FGQLTPHTKAVYQPR-	HLA-DRB1*1301

3.14 Kits

Kit	Hersteller
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent, Santa Clara, USA
Bradford Protein Assay	BioRad, München, Deutschland
DNaseI Digestion Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
ELISA für humanes IFN- β (HRP)	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA für humanes IFN- γ (ALP)	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Illumina HiSeq SBS kit v4 (50cycle)	Illumina, San Diego, USA
Isolation v. genom. DNA (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Isolation v. Plasmid-DNA (EndoFree Plasmid Maxi-Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Isolation v. Plasmid-DNA (JetStar Maxiprep DNA Kit)	Genomed, Leesburg, USA
Isolation v. vesikulärer RNA (Zymo RNA Isolationskit)	ZYMO Research, Irvine, USA
Isolation v. zellulärer RNA (RNeasy Mini Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
	Qiagen, Hilden, Deutschland

Isolation von miRNA

(miRNeasy Kit)

Magnetische Zellaufreinigung (humanes B Zell Isolationskit II, CD3 MicroBeads)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MycoAlert mycoplasma detection Kit	Lonza, Basel, Schweiz
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.15 Software

Name	Anwendung/Anbieter
Bedtools 2.25.0	NGS Datenanalyse, (Quinlan and Hall 2010) https://github.com/ark5x/bedtools2/releases
FlowJo 9.8.5	FACS Auswertung, Tree star
Galaxy 15.10	NGS Datenanalyse, (Afgan et al. 2016) Center for Comparative Genomics and Bioinformatics, State College, USA, https://galaxyproject.org/
GraphPad Prism 6	Statistische Auswertungen, GraphPad Software Inc.
IGV 2.3.72	Broad Institute, Cambridge, USA http://software.broadinstitute.org/software/igv/
LightCycler 480 Software SP3	qPCR Analysen, Roche, Basel, Schweiz
MacVector	Analyse von Nukleotiden und Proteinsequenzen, MacVector Inc.
Mendeley	Literaturverwaltung, Mendeley Inc., New York, USA
Microsoft®Word, Excel, PowerPoint, 2017	Datenanalyse und Darstellung, Microsoft Corporation
Photoshop® CS	Bildbearbeitung, Adobe, San José, USA

4 METHODEN

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Sämtliche zellbiologische Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank und unter Einhaltung der geltenden S1- und S2-Vorschriften der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) durchgeführt. Alle verwendeten Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium bei 5%igem Kohlenstoffdioxidgehalt und atmosphärischem Sauerstoffgehalt von 21% bei 37 °C kultiviert. Alle Zentrifugationsschritte wurden standardmäßig bei 300 x g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Regelmäßig erfolgte ein Test auf Kontamination mit Mykoplasmen unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Lonza). Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

4.1.1.1 Passagieren von adhärenenten Zellen

Das Passagieren adhärenenten Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 70-90%. Dazu wurde zuerst das alte Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Durch die anschließende Behandlung mit Trypsin-EDTA bei 37 °C, wurden die Zellen abgelöst, mit frischem Kulturmedium abgespült und resuspendiert, um in der gewünschten Zelldichte (standardmäßig 1:10) wieder ausgesät und weiter kultiviert zu werden.

4.1.1.2 Passagieren von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden zum Passagieren in ein Zentrifugenröhrchen überführt, pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde danach in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Kulturflasche gegeben.

4.1.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurde die gewünschte Zellzahl geerntet und abzentrifugiert. Danach wurden sie in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in ein vorgekühltes Einfriereröhrchen überführt und zunächst bei -80 °C zwischengelagert. Die

Langzeitlagerung erfolgte einige Tage später durch die Überführung in die Gasphase eines Stickstofflagersystems.

Zum Auftauen wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank auf RT gebracht und die Zellen zügig in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen. Nach einmaligem Abzentrifugieren und Resuspendieren in frischem Kulturmedium wurden die Zellen je nach Bedarf kultiviert. Bei Zellen, die unter Selektion gehalten werden, wurde ein Tag nach dem Auftauen das Standardmedium durch das entsprechende Selektionsmedium ersetzt.

4.1.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA

Um Zellen erfolgreich zu transfizieren, sollten sie eine Konfluenz von 70-80% haben. Sie wurden dafür in 14 cm Zellkulturschalen entsprechend kultiviert. Die Transfektion erfolgte mittels PEI (Polyethylenimin) und Opti-MEM bzw. mit PEI-Max und RPMI ohne Zusätze.

Für die Transfektion mit PEI und Opti-MEM wurden in zwei separaten Reaktionsgefäßen jeweils 2 ml Opti-MEM vorgelegt und mit insgesamt 20 µg Plasmid-DNA bzw. 6 µl PEI/1 µg DNA versetzt und vorsichtig vermischt. Nach einer Inkubation von 2 min bei RT wurden beide Ansätze gemischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und durch 10 ml Opti-MEM ersetzt. Die PEI/DNA-Mischung wurde schließlich tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4-6 Stunden Inkubation wurde das Opti-MEM durch 25 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

Zur Transfektion mit PEI-Max wurden zuerst 4 ml RPMI ohne Zusätze vorgelegt und dann mit einer Gesamtmenge von 12 µg Plasmid-DNA versetzt. Dazu wurden anschließend 6 µl PEI-Max/1 µg DNA gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 20 ml Kulturmedium ersetzt. Darauf folgte das tröpfchenweise Aufbringen der PEI-Max/DNA-Mischung.

Um zu testen, ob die Transfektion der Zellen erfolgreich war, wurden diese nach 24-72 Stunden lysiert, um mittels Western Blot die Expression des entsprechenden Proteins nachzuweisen. Alternativ wurde in einem separaten Ansatz eine Transfektion mit einem eGFP-Expressionsplasmid durchgeführt. Dadurch war es möglich, die Expression im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten und gleichzeitig die

Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen (Prozent an GFP-positiven Zellen).

4.1.3 Generierung von VLP-Produzentenzelllinien

Zur Generierung von VLP-Produzentenzelllinien wurden HEK293-Zellen in einer 6-Loch-Platte mit 1 µg Maxi-EBV DNA transfiziert (vergleiche 4.1.2 Transfektion mit PEI). Abweichend wurden in diesem Fall nur jeweils 500 µl Opti-MEM pro Ansatz, sowie 4,5 µl PEI und 1 ml Opti-MEM zum Mediumswechsel eingesetzt. Nach 4 h Inkubation wurden 2 ml RPMI-Standardmedium auf die Zellen gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion mittels Analyse der GFP-Fluoreszenz. Danach wurden die Zellen trypsiniert und in unterschiedlichen Verdünnungen auf 14 cm-Schalen in 25 ml Medium mit Puromycin (500 ng/ml) ausgesät und das Medium einmal pro Woche gewechselt. Dadurch wurden die abgestorbenen Zellen entfernt, wohingegen die stabil transfizierten langsam zu kleinen Kolonien auswuchsen. Diese wurden, sobald sie mit bloßem Auge sichtbar waren, mit Trypsin-getränkten Whatmanpapier-Stückchen gepickt, einzeln auf 6-Loch-Platten verteilt und weiter expandiert. Jeder Klon wurde mittels Transfektion (siehe PEI-Max unter 4.1.4) auf seine VLP-Produktivität getestet und der Beste für alle weiteren Experimente herangezogen.

Zusätzlich wurden die Produzentenzellklone hinsichtlich ihrer Fähigkeit, infektiöses Virus zu verpacken, untersucht. Dafür wurde eine Transfektion mit jeweils 500 ng DNA der Expressionsplasmide BZLF1 (p509) und BALF4 (p2670), sowie zusätzlich 1 µg DNA des Helferplasmids (p1933) durchgeführt, welches für die *terminal repeats* (TRs) kodiert. Dadurch sollte die Fähigkeit, das virale Genom zu verpacken wiederhergestellt und infektiöse Viren produziert werden. Dieser Überstand wurde anschließend mittels Raji-Zellen auf seine Infektiosität getestet (siehe 4.1.5).

4.1.4 Induktion der Virus-/VLP-Produktion in Produzentenzelllinien

Um die Virusproduktion zu initiieren, wurde eine Transfektion mit PEI-Max wie in 4.1.2 beschrieben durchgeführt. Eingesetzt wurden hierbei die Expressionsplasmide BZLF1 (p509) und BALF4 (p2670) mit je 10 µg DNA/14 cm Zellkulturschale (je 1 µg DNA/6-Loch-Platte). BZLF1 wird benötigt, um den lytischen Zyklus in den Produzentenzellen zu initiieren und die Kombination mit BALF4 erhöht die Effizienz der Virusverpackung, sowie die Infektiosität (Delecluse et al. 1998)(Neuhierl et al. 2002). Drei

Tage nach Transfektion wurde der virushaltige Zellkulturüberstand durch Zentrifugieren bei 300 x g für 10 min, 2.000 x g für 20 min und anschließender Filtration durch einen 0,8 µm Filter geerntet. Die Virusüberstände konnten schließlich bei 4 °C gelagert werden und waren mehrere Monate bis zu einem Jahr stabil.

4.1.5 Virustitration mit Raji-Zellen

Alle verwendeten rekombinanten Viren exprimieren eGFP als phänotypischen Marker, das nach erfolgreicher Infektion auch in den Zielzellen exprimiert wird und daher zur Bestimmung der Konzentration an infektiösem Virus verwendet werden kann. Hierzu wurden 5×10^4 Raji-Zellen mit 20 µl, 50 µl, 100 µl und 200 µl Virusüberstand infiziert. Drei Tage nach Infektion wurde die Prozentzahl an GFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Über die Menge an GFP-positiven Raji-Zellen pro Milliliter Virusstock ließ sich der Virustiter (*multiplicity of infection*, MOI) berechnen, welcher in „*green Raji units*“ (GRUs) angegeben wurde.

4.1.6 Isolation von PBMCs aus Vollblut

Periphere mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) wurden aus frischem venösen Blut von Spendern oder Leukozytenkonzentraten (*buffy coats*) mittels Dichtezentrifugation isoliert. Dafür wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt und 30 ml dieser Mischung vorsichtig auf 15 ml Ficoll geschichtet. Durch die Zentrifugation für 35 min mit 2.000 x g bei RT und ohne Zentrifugenbremse sammeln sich die PBMCs in der Interphase oberhalb der Ficoll-Lösung. Diese wurde im Anschluss vorsichtig abgenommen und mit PBS vier bis fünf Mal gewaschen.

4.1.7 Aufreinigung von primären B-Zellen aus PBMCs mittels MACS

Zur Isolierung der B-Zellpopulation aus gereinigten PBMCs wurde eine magnetische Zellseparation (*magnetic-activated cell sorting*, MACS) mit Produkten der Firma Miltenyi nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Gewinnung der B-Zellen erfolgte über negative Selektion, bei der alle übrigen Zellen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern an die magnetische Säule gebunden werden, sodass die reine B-Zellfraktion unmarkiert gesammelt werden kann.

4.1.8 Isolation von primären B-Lymphozyten aus humanen Adenoiden

Primäre humane B-Lymphozyten können aus Adenoiden isoliert werden. Diese stammten von Kindern, die sich im Klinikum Großhadern in München einer Adenoidektomie unterziehen mussten. Die Verwendung des Gewebes wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) bewilligt. Als erstes wurden die Adenoide mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, in PBS aufgenommen und durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) gegeben. Die Zellsuspension wurde mit 500 µl Schafsblut gemischt, bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert, um die T-Zellen durch Rosettenbildung zu depletieren, und dann mit PBS auf 30 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf 7 ml Ficoll geschichtet, um die mononukleären Zellen mittels Gradient von den übrigen Zellen zu trennen. Die Zentrifugation erfolgte für 35 min mit 2.000 x g ohne Bremse bei RT. Anschließend wurde die Zellschicht oberhalb der Ficoll-Lösung vorsichtig abgenommen und vier bis fünf Mal gewaschen. Die so aufgereinigten Zellen bestehen größtenteils aus CD19-positiven B-Zellen (> 85%, mittels Durchflusszytometrie) und wurden daher direkt in die meisten Experimente eingesetzt. Um eine vollkommen reine B-Zellpopulation zu bekommen, kann als weiterer Aufreinigungsschritt eine magnetische Zellseparation (MACS) durchgeführt werden (siehe 4.1.7).

4.1.9 Durchflusszytometrie

Für den Nachweis von bestimmten Oberflächenantigenen auf Zellen wurden diese zuerst mit FACS-Puffer gewaschen und danach pro Färbung $1-5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt. Die Färbung mit entsprechend verdünntem Primärantikörper erfolgte in 50 µl FACS-Puffer für 20 min auf Eis. Nach einem Waschschriff mit PBS wurde die Färbung mit Fluorochrom-markiertem Zweitantikörper nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und für die Analyse in 400-500 µl FACS-Puffer aufgenommen.

4.1.10 Stimulationsexperimente mit B-Zellen

Primäre B-Zellen wurden entweder aus Blut oder Adenoiden isoliert (s. 4.1.6 - 4.1.8) und jeweils 1×10^6 Zellen mit Virus (MOI = 0,1 GRUs/Zelle), VLPs oder EV (5.000 Vesikel/Zelle) für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und das Zellpellet danach entweder für die

RNA-Isolation direkt in Lysepuffer resuspendiert oder bei -80 °C zur späteren Bearbeitung eingefroren.

4.1.11 T-Zellassays

Zur Ermittlung der Immunogenität von EV oder VLPs wurden antigenpräsentierende Zellen (zum Beispiel mLCLs, B-Blasten, primäre B-Zellen) über Nacht in einer 96-Loch-Rundbodenplatte (1-5 x 10⁴ Zellen/Loch) mit den aufgereinigten Vesikelpräparationen inkubiert (in Triplikaten). Nach einem Waschschrift am nächsten Tag wurden sie im Verhältnis 1:1 mit den korrespondierenden T-Zellen gemischt, in eine 96-Loch-Spitzbodenplatte überführt und erneut über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag (nach 16-20 Stunden) gesammelt und in ELISA-Assays eingesetzt oder für spätere Analysen bei -20 °C gelagert.

4.2 Aufreinigung und Charakterisierung von EV und VLPs

4.2.1 Herstellung von EV-depletiertem Medium

Bei der Herstellung von EV soll die Kontamination mit FCS-Vesikeln vermieden werden. Um diese aus dem Zellkulturmedium zu entfernen, wurde RPMI1640 mit 20% FCS gemischt und über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand durch einen 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und danach 1:1 mit FCS-freiem RPMI1640 auf eine finale Konzentration von 10% FCS verdünnt. Das EV-depletierte Medium konnte bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

4.2.2 Isolation von EV und VLPs aus Zellkulturüberständen

Zur Produktion von EV wurden HEK293-Zellen mit den gewünschten Expressionsplasmiden wie in 4.1.2 beschrieben transfiziert. Um die Produktion von VLPs zu induzieren, wurden die Expressionsplasmide für BZLF1 und BALF4 eingesetzt (vergleiche 4.1.4). Für den Mediumswechsel wurde in beiden Fällen EV-depletiertes Medium, bzw. RPMI ohne FCS verwendet. Nach drei Tagen wurden die Zellkulturüberstände geerntet, indem sie für 10 min bei 300 x g und anschließend für 20 min bei 2.000 x g zentrifugiert wurden. Als weiterer Aufreinigungsschritt folgte eine Filtration durch einen 0,45 µm-Filter.

Die Aufkonzentrierung der EV beziehungsweise VLPs erfolgte durch Ultrazentrifugation mit 100.000 x g für 2 Stunden bei 4 °C. Danach wurde der Überstand bis auf 1-2 ml abgenommen, Proteaseinhibitor hinzugegeben und das Pellet durch Schütteln auf Eis für 30 min oder vorsichtiges Resuspendieren gelöst. Die so konzentrierten EV/VLPs können über mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden.

4.2.3 VLP-Qualitätsbestimmung

Um VLPs zu quantifizieren, wurde deren Bindung an EBV-negative Elijah-Zellen durch Färbung mit einem anti-gp350-Antikörper durchflusszytometrisch gemessen. Dafür wurden 2×10^5 Zellen mit verschiedenen Volumina (50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 500 µl, Negativkontrolle) an konzentrierten VLPs in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml für 3 Stunden bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. In dieser Zeit binden die Vesikel beziehungsweise die Viruspartikel an die Zellen, werden aber nicht aufgenommen. Um die Zellen anschließend zu waschen, wurden sie bei 700 x g für 10 min und 4 °C zentrifugiert und danach in 1 ml eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert. In der Zwischenzeit wurde der anti-gp350-Antikörper (Ratte, Klon 6G4-11, direkt gekoppelt mit Alexa 647) 1:250 in FACS-Puffer verdünnt und die Zellen schließlich in 50 µl Antikörperlösung aufgenommen. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in 300 µl Puffer aufgenommen. Die Detektion mittels Durchflusszytometer erfolgte im APC-Kanal und eine Quantifizierung anschließend mithilfe des EBV 2089-Standards bekannten Titters.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Vesikeln mittels ‚Nanopartikel-Tracking Analyse‘

Die ‚Nanopartikel-Tracking Analyse‘ (NTA) ist eine relativ neue Methode, um extrazelluläre Vesikel in Lösung zu charakterisieren und ihre Konzentration zu bestimmen. Die Messungen für diese Arbeit wurden mit dem ZetaView PMX110 Instrument (Particle Metrix) durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Kombination eines Laserstreulichtmikroskops mit einer Videokamera. Diese verfolgt über einen bestimmten Zeitraum die Bewegung einzelner Partikel, die sich durch die Brownsche Molekularbewegung größenabhängig schneller oder langsamer bewegen. In der darauffolgenden Analyse wird aus den aufgenommenen Videosequenzen die

Partikelkonzentration, bezogen auf das Streulichtvolumen des Partikels, berechnet. Je nach Einstellung und vorheriger Kalibrierung können Partikel einer Größe von 50-1.000 nm detektiert werden. Für die Konzentrationsbestimmung von EV und VLPs wurde das Gerät mit 102 nm Polystyrol-Standardbeads kalibriert. Jede Probe wurde so verdünnt, dass sich pro Bildausschnitt zwischen 50-200 Partikel detektieren ließen. Für alle Messungen wurden die Einstellungen aus Tabelle 1 angewendet.

Tabelle 1: Einstellungen zur Messung von EV und VLPs

Parameter	Einstellung
Blende	70
Sensitivität	50
Min./max. Partikelgröße	5/1.000
Min. Helligkeit	20
Zyklus	3
Positionen	11

4.2.5 Präparation von EV und VLPs zur RNA-Isolation

Für eine RNA-Isolation aus EV und VLPs müssen als erstes freie RNA und DNA in der Präparation verdaut werden. Dazu wurde RNase A in einer finalen Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt, für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch die Zugabe von RNasin (finale Konzentration von 1 u/µl) und einer weiteren Inkubation von 30 min bei 37 °C gestoppt. Zum DNase-Verdau wurde ein Kit (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde der Überstand in 1,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt und für 1,5 Stunden bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die so pelletierten Vesikel wurden in 300 µl Trizol aufgenommen und mittels Isolationskit (ZYMO) gemäß Protokoll isoliert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von Bakterien

Prokaryotische Zellen wurden als Suspensionskultur in LB-Medium bei 32 °C bzw. 37 °C unter aeroben Bedingungen (Schütteln mit 200 rpm) kultiviert. Die jeweiligen Wachstumsbedingungen und Antibiotika-Resistenzen sind in der AGV-Datenbank

(ClonesManager) hinterlegt. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Zur Selektion diente ein Antibiotikum, welches dem LB-Medium beziehungsweise dem Agar abhängig vom vektorkodierten Resistenzgen des Bakterienklons zugesetzt wurde (100 µg/ml Ampicillin, 15 µg/ml Chloramphenicol, 30 µg/ml Kanamycin). Zur Langzeitlagerung wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 50% Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

4.3.2 Herstellung und Elektroporation von rekombinationskompetenten Bakterien

Für die Herstellung rekombinationskompetenter Bakterien wurde eine 5 ml Starterkultur in salzfreiem LB-Medium mit Chloramphenicol mit einem Einzelklon angeimpft und über Nacht bei 32 °C kultiviert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag auf 40 ml desselben Mediums expandiert und bei 32 °C kultiviert, bis die Suspension eine OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0,6 erreichte. Anschließend wurde der Kolben sofort in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt, 15 min bei 200 rpm geschüttelt, um die Expression der rekombinanten Proteine zu induzieren, und dann für 20 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt sollten alle weiteren Schritte auf Eis und mit vorgekühlten Gefäßen und Reagenzien durchgeführt werden. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension dreimal gewaschen, indem sie jeweils bei 1.600 x g und 4 °C für 10 min pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in 20 ml (10 ml im 2. Schritt und 1,5 ml im 3. Schritt) kaltem Wasser gelöst wurde. Nach einer letzten Zentrifugation bei Höchstgeschwindigkeit für 15 Sekunden und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 100-150 µl sterilem 10%igem Glycerin/H₂O resuspendiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt (40 µl/Aliquot) und sofort zur Elektroporation eingesetzt. Dafür wurden auf Eis zuerst 2,5 µl DNA vorgelegt, die Bakterien dazugegeben und alles luftblasenfrei in eine vorgekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1.700 kV und 25 µF für 4,8-5,1 ms. Anschließend wurde die Küvette zwei Mal mit je 500 µl LB-Medium ausgespült, alles in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 60 min bei 32 °C und 250 rpm inkubiert. Schließlich wurden unterschiedliche Volumina an Bakterien auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol und Kanamycin ausgestrichen und bei 32 °C über Nacht inkubiert (Russell and Sambrook 2001).

4.3.3 Konstruktion von rekombinanten VLPs

Das rekombinante EBV-System wurde von Hammerschmidt und Kollegen entwickelt und ist ein künstliches Chromosom, genannt ‚*Bacterial Artificial Chromosome*‘ (BAC), das aus dem F-Plasmid des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) entwickelt wurde (Delecluse et al. 1998). In dieses Plasmid wurde das gesamte EBV Genom des B95.8 Stammes, sowie zusätzlich eine CMV-Promotor-gesteuerte Expressionskassette für eGFP und Hygromycin B kloniert, die als phänotypische Marker dienen. Alle BACs, welche das EBV-Genom kodieren und zur Produktion von Virus oder VLPs dienen, werden als ‚Maxi-EBVs‘ bezeichnet.

Ziel der Konstruktion von neuen VLP-Produzenten sollte es sein, Vesikel zu bekommen, die entweder das komplette Set an miRNAs (+miRNAs) oder eine Deletion für alle miRNAs (Δ miRNAs) von EBV enthalten. Genetische Manipulationen wurden mithilfe von homologer Rekombination im *E. coli* Stamm SW105 durchgeführt (Warming et al. 2005). Dieser Stamm ist nach Hitzeinduktion zur homologen Rekombination fähig und enthält außerdem eine Deletion für das *galk* Gen, was zu einem defekten Galaktosemetabolismus führt und somit eine positive und negative Selektion ermöglicht.

Das neue VLP-Produzentenpaar basiert auf den beiden EBV-Parentalstämmen 6008.5 (+miRNAs) und 6338.10 (Δ miRNAs). Dort sollten jeweils die TRs mittels homologer Rekombination durch eine mit 50 bp-langen Armen flankierte Kanamycin-Kassette ersetzt werden, welche zuvor aus dem Klonierungsvektor p2068 ausgeschnitten und durch Elektroporation in die Bakterien mit dem entsprechenden Maxi-EBV eingebracht wurden. Eine erfolgreiche Rekombination wurde durch das Wachsen von resistenten Kolonien auf Kanamycin/Chloramphenicol-Agarplatten kontrolliert. Durch ebenfalls neu eingebrachte Restriktionsschnittstellen ließ sich ein charakteristisches Bandenmuster generieren, das zusätzlich eine erfolgreiche Konstruktion von neuen Maxi-EBVs bestätigte. Die Intaktheit des gesamten BAC ließ sich durch ein einheitliches Bandenmuster nach Restriktionsverdau der Konstrukte vor und nach genetischer Manipulation überprüfen.

4.3.4 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit Aufreinigungskits nach Herstellerangaben durchgeführt (Promega, JetStar). DNA zur Produktion von Virus oder VLPs wurde mit einem Endotoxin-freien Präparationskit isoliert (Qiagen).

Zur Selektion von BAC-Bakterienklonen wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse aufgereinigt (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 2001). Dafür wurden die Bakterien in 200 µl alkalischer Lyselösung I (TE Puffer) mit RNase A (50 µg/ml) resuspendiert, danach mit 200 µl alkalischer Lyselösung II gemischt und auf Eis für 5 min inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl alkalischer Lyselösung III wurde die Reaktion neutralisiert, für 20 min auf Eis inkubiert und danach bei Höchstgeschwindigkeit für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 350 µl Isopropanol präzipitiert und durch erneutes Zentrifugieren pelletiert. Nach einem Waschschriff mit 500 µl EtOH wurde der restliche Alkohol vorsichtig abgenommen, die DNA in 20 µl TE Puffer gelöst und in Restriktionsverdau-Analysen eingesetzt.

4.3.5 Präparation von Maxi-EBV BAC-DNA

Um stabile VLP-Produzentenzelllinien mit Maxi-EBVs etablieren zu können, muss die DNA besonders rein und unbeschädigt sein. Folgendes Protokoll basiert auf dem Standardprotokoll von Russell und Sambrook mit Modifikationen von This und Feederle *et al.* (Russell and Sambrook 2001; This 2005; Feederle, Bartlett, and Delecluse 2010). Dafür wurde eine 6 ml Vorkultur (LB-Medium mit Chloramphenicol) mit dem gewünschten Maxi-EBV tragende Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 32 °C kultiviert. Diese wurde am nächsten Tag auf sechs 2-Liter Erlenmeyerkolben mit je 400 ml LB-Medium, 300 mM NaCl und Chloramphenicol aufgeteilt und erneut über Nacht bei 32 °C kultiviert ($OD_{600} = 2,5-4,8$). Daraufhin wurden die Bakterien bei 6.300 x g und 4 °C für 15 min pelletiert, der Überstand abgegossen und die Zentrifugenbecher für einige Minuten bei -80 °C eingefroren. Die Bakterien wurden auf Raumtemperatur aufgetaut, alle weiteren Schritte allerdings auf Eis durchgeführt. Jedes Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer I resuspendiert und danach auf 45 ml aufgefüllt. Pro Becher wurden anschließend 10 mg Lysozym zugegeben, vorsichtig gemischt und 5-10 min inkubiert. Die Lyse der Bakterien wurde durch die Zugabe von 58 ml Lysepuffer II, vorsichtigem Mischen und Inkubieren für 5 min induziert. Das Abstoppen der Lyse erfolgte mit 70 ml eiskaltem Lysepuffer II, vorsichtigem Schwenken und einem Inkubationsschritt von mindestens 30 min auf Eis (oder über Nacht bei 4 °C). Zellschrott wurde durch Zentrifugieren mit 14.000 x g für 10 min bei 4 °C abgetrennt, der Überstand über mit Wasser befeuchtete Filterpapiere gegeben und auf vier neue Zentrifugenbecher verteilt.

Für die Präzipitation der DNA wurde das 0,4-fache Volumen Isopropanol hinzugemischt, für 20 min bei RT inkubiert und anschließend mit 14.000 x g und 20 °C für 30-40 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, das Pellet mit 200 ml 80%igem EtOH gewaschen, für 5 min bei RT inkubiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das restliche EtOH vorsichtig entfernt, das DNA-Pellet einige Minuten kopfüber getrocknet, und schließlich in 10 ml spezial-TE durch vorsichtiges Rollen gelöst. Der Inhalt aller vier Becher wurde danach in einem Reaktionsgefäß vereint, mit 400 µg RNase A versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Um kontaminierende Proteine zu entfernen, folgte eine Behandlung der DNA-Lösung mit 6 mg Proteinase K für mindestens 45 min bei 50 °C.

Die Separation der intakten, ringförmigen DNA von DNA-Bruchstücken erfolgte über einen CsCl-Gradienten. Dafür musste als erstes das Gewicht der DNA-Lösung bestimmt und anschließend 1 g CsCl pro Gramm Lösung zugegeben werden. Dies wurde zur Vermeidung von Präzipitaten in drei Schritten in einem 50°C warmen Wasserbad durchgeführt, bis sich das CsCl vollständig gelöst hatte. Danach wurde 1 ml einer 1%igen Ethidiumbromidlösung (EtBr) vorsichtig hinzu gemischt, die Lösung gleichmäßig auf zwei Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und diese mit einer CsCl-Lösung (1,55 g/ml in H₂O) austariert. Die Ultrazentrifugation erfolgte mit 100.000 x g (70Ti Rotor) bei 20 °C für drei Tage. Unter UV-Licht waren danach zwei Banden zu erkennen, von denen die obere die DNA-Bruchstücke und die untere die intakte, ringförmige DNA enthielt. Diese wurde mithilfe einer Spritze vorsichtig seitlich aus dem Röhrchen gesaugt und in ein frisches 11,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Dazu wurden erneut 0,5 ml EtBr gegeben, das restliche Volumen mit CsCl-Lösung aufgefüllt und eine weitere Zentrifugation mit 100.000 x g bei 20 °C für drei Tage durchgeführt. Danach wurde erneut die untere Bande wie zuvor beschrieben abgenommen und die DNA durch die Zugabe von 5 ml CsCl-gesättigtem Isopropanol und Zentrifugation mit 4.000 x g für 30 min bei RT präzipitiert. Dieser Schritt wurde mindestens drei Mal wiederholt, um alle Reste des EtBr auszuwaschen. Abschließend wurde das Isopropanol bis auf ungefähr 1 ml Restvolumen abgenommen, dieses in eine Dialysekammer überführt und mit einem Dialyseschlauch verschlossen. Die Dialyse erfolgte in 2 Litern TE Puffer bei 4 °C über Nacht mit einmaligem Pufferwechsel. Am nächsten Tag konnte die DNA vorsichtig aus der Kammer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration gemessen werden.

4.3.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Üblicherweise wurde die Konzentration der Plasmid-DNA über das Verhältnis der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm im Nanodrop (Peqlab) bestimmt. Für die genaue Messung der Menge an doppelsträngiger DNA des Maxi-EBV, wurde HoechstDye 33258 in DNA-Färbepuffer verdünnt (1:10.000) und pro Probe 2 ml dieser Lösung in Küvetten vorgelegt (inklusive Nullwert und 1.000 ng Lambda HindIII Referenz). Dazu wurden dann jeweils 5 µl DNA gemischt und die Fluoreszenz bei 450 nm in einem Fluorimeter (Hoefer) bestimmt. Anhand des Referenzwertes ließ sich daraus die exakte Konzentration der DNA berechnen.

4.3.7 Restriktionsverdau von DNA

Der enzymatische Verdau von DNA zu Klonierungszwecken oder zur Kontrolle der DNA-Qualität wurde nach Herstellerangaben mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und Puffern durchgeführt.

Für den Kontrollverdau von Maxi-EBVs wurden pro Ansatz 1 µg DNA eingesetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente anhand ihrer Größe erfolgte in einem 25 cm langen 0,7%igen Agarosegel (TBE-Puffer) über Nacht mit zirkulierendem Laufpuffer bei 65 V.

4.3.8 RNA-Extraktion

4.3.8.1 RNA-Extraktion aus Zellen

Zelluläre RNA wurde mittels Isolations-Kit gemäß den Herstellerangaben (Qiagen) extrahiert. In Zeitexperimenten wurden die Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt mit PBS gewaschen und anschließend als Pellet (möglichst trocken) bei -80 °C eingefroren. Alle Proben wurden schließlich gemeinsam, inklusive DNase-Verdau auf der Säule, aufgereinigt. Die Elution der RNA erfolgte in 30-40 µl RNase-freiem H₂O.

4.3.8.2 RNA-Extraktion aus EV und VLPs

Für die Extraktion vesikulärer RNA mussten in einem ersten Schritt freie DNA und RNA im Überstand verdaut werden. Hierzu wurde das Vesikelpellet nach der Ultrazentrifugation in 100 µl PBS aufgenommen und mit DNase I (1 u/1 µl) und RNase A (10 µg/ml) für 30 min bei 37 °C verdaut. Danach folgten ein Stoppen der Reaktion mit DNase-Stopplösung und eine Behandlung mit RNase-Inhibitor (RNAsin, 1 u/µl) nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Vesikel im dreifachen Volumen Trizol

aufgenommen und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C eingefroren. Die RNA-Extraktion erfolgte schließlich nach Herstellerangaben (ZYMO) inklusive DNA-Verdau auf der Säule und Elution in 40-50 µl RNase-freiem H₂O.

4.3.8.3 Qualitätsbestimmung von mRNA

Üblicherweise wurde die Qualität und Konzentration von zellulärer RNA mithilfe des Nanodrop bestimmt. Bei einer sehr geringen Zellzahl (> 1x10⁵ Zellen), Zellen mit einem insgesamt sehr geringen RNA-Gehalt (B-Zellen) oder vesikulärer RNA wurde die Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyzer (Agilent) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 1 µl RNA gemäß den Herstellerangaben (Agilent RNA 6000 Pico Kit) eingesetzt.

4.3.8.4 miRNA Extraktion aus VLPs

Die Extraktion von miRNAs aus VLPs wurde von Manuel Albanese aus der AG Hammerschmidt durchgeführt. Dazu wurde der Zellkulturüberstand (180 ml Ausgangsvolumen) nach der Ultrazentrifugation direkt in 700 µl Quiazol resuspendiert, für 10 Sekunden gevortext, 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei -80 °C eingefroren. Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem miRNeasy Kit (Qiagen). Dafür wurden die Proben als erstes auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Glycogen versetzt, um die Extraktionseffizienz zu erhöhen. Zusätzlich wurden 10 µl (10⁷ Kopien) der synthetischen *C. elegans* miRNA cel-miR-39 als *spike-in* Kontrolle hinzugegeben. Danach wurden die Proben mit dem 0,2-fachen Volumen Chloroform gemischt (10 Sekunden vortexen) und bis auf weiteres das Protokoll gemäß den Herstellerangaben, inklusive Waschschrift mit RWT Puffer, befolgt. Die miRNA wurde schließlich in 30 µl RNase-freiem H₂O eluiert.

4.3.9 Reverse Transkription und absolute Quantifizierung von miRNA

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeiten wurden ebenfalls von Manuel Albanese aus der AG Hammerschmidt durchgeführt. Für die cDNA-Synthese aus isolierter miRNA wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific) gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Proben mit einer geringen Ausbeute an miRNA wurden mit RNase-freiem Wasser 1:3 verdünnt und anschließend 9 µl in die Reaktion eingesetzt. Die cDNA wurde danach 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und davon jeweils 4 µl in die qRT-PCR eingesetzt, die mit dem TaqMan Fast Advanced Master Kit (Thermo Scientific) durchgeführt wurde. Zur absoluten Quantifizierung, dienten spezifische, synthetisch

hergestellte Oligonukleotide. Daraus wurde eine Verdünnung von 10^8 - 10 Kopien mit RNase-freiem Wasser hergestellt, gleichzeitig mit den isolierten miRNAs revers transkribiert und über qRT-PCR analysiert. Die CT-Werte der miRNA-Proben wurden danach mithilfe der Standardkurven aus den synthetisch hergestellten miRNAs ermittelt (4-parameter logistic curve, Graphpad). Die absolute Kopienzahl der *C. elegans spike-in* Kontrolle (cel-miR-39) wurde dabei zur Normalisierung herangezogen.

4.3.10 Reverse Transkription von mRNA

Die cDNA Synthese aus zellulärer und vesikulärer RNA wurde üblicherweise mit 1 µg RNA gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (Qiagen). Da die Menge an RNA aus Vesikeln dafür in der Regel zu gering war, ebenso wie in einigen Experimenten mit zellulärer RNA (gleiche Zellzahl/Bedingung), wurde in diesem Fall das Maximalvolumen von 12 µl pro Ansatz eingesetzt. Für jede Probe wurde zusätzlich ein Reaktionsmix ohne Reverse Transkriptase angesetzt, um eventuelle Kontamination mit DNA auszuschließen. Der Reaktionsmix in diesem Kit besteht aus einer Primermischung an Oligo-dT-Nukleotiden und *random* Hexamer-Oligonukleotiden, sodass sowohl die reverse Transkription von mRNA-Transkripten mit Poly-A-Schwanz, als auch solchen ohne (beispielsweise EBERs) gewährleistet war.

4.3.11 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die Existenz und Frequenz von RNA-Transkripten wurde mittels quantitativer *real-time* PCR in 96-Loch-Platten in einem LightCycler 480 (Roche) ermittelt. Als interkalierendes Reagenz in die doppelsträngige DNA diente SYBR Green gemäß den Herstellerangaben (Roche). Allerdings wurde das Gesamtreaktionsvolumen auf 10 µl reduziert, sodass jeder Ansatz (Triplikate für jede Bedingung) aus 2 µl verdünnter cDNA (mindestens 1:5 in H₂O verdünnt), 10 pmol Primermix (Vorwärts und Rückwärts) und 5 µl 2x SYBR Green Reaktionsmix bestand. Die Effizienz jedes Primerpaares war zuvor über eine Verdünnungsreihe mit LCL-DNA bestimmt worden. Unter Berücksichtigung dieser PCR-Effizienz konnte schließlich mithilfe der LC480-Software die relative Expression jedes Zielgenes kalkuliert werden. Als Referenztranskript diente β-Glucuronidase (GUSB), die in B-Zellen stabil exprimiert wird (Brouwer, Bokhoven, and Kremer 2006).

qRT-PCR Programm:

95 °C	10 min	45 Zyklen
95 °C	10 s	
60 °C	10 s	
72 °C	10 s	
95 °C	5 s	
65 °C	1 s	

Kontinuierliches Heizen auf 95 °C (Schmelzkurve)

4.3.12 Nachweis von EBV in primären B-Zellen mittels PCR

Um zu bestimmen, ob die Spender von B-Zellen EBV-positiv sind, wurde DNA aus 200 µl Zellsuspension isoliert. Dafür wurde das QIAmp DNA Blood Mini Kit nach Herstellerangaben (Qiagen) verwendet. Von der isolierten DNA wurden 200 ng in ein PCR Standardprotokoll eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten einerseits ein Ansatz ohne DNA, sowie ein Ansatz ohne Polymerase. Als Positivkontrolle wurde eine bereits getestete DNA eines EBV-positiven Spenders eingesetzt. Die fertige PCR konnte anschließend direkt auf ein 1-2%iges Agarosegel (TAE-Puffer) aufgetragen werden, da im Reaktionsmix bereits DNA-Ladepuffer enthalten war. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei 100 V für ungefähr eine Stunde, wobei das amplifizierte PCR-Produkt auf einer Höhe von 300 bp laufen sollte.

PCR Protokoll:

4 µl	GoTaq Green Puffer (5x)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	BamHI w-Region fw (5 pmol)
0,5 µl	BamHI w-Region rev (5 pmol)
200 ng	DNA
<u>Ad 25 µl</u>	H ₂ O
0,2 µl	GoTaq DNA Polymerase

PCR Programm:

94 °C	2 min	35 Zyklen
94 °C	30 s	
63 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
10 °C	hold	

4.3.13 RNA-Sequenzierung

Um Effekte von EV und VLPs auf die Genexpression der Zielzellen zu untersuchen, wurde die Methode der RNA-Sequenzierung in Kombination mit NGS (*next generation sequencing*) angewendet. Dafür wurden B-Zellen aus Adenoiden von vier verschiedenen Spendern isoliert und jeweils 2 x 10⁶ Zellen pro Bedingung in das Experiment eingesetzt. Die B-Zellen wurden mit EV bzw. VLPs (5.000 Partikel/Zelle) für 24 Stunden inkubiert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen. Danach wurde das Zellpellet in 300 µl

Trizol aufgenommen und gut resuspendiert, bis die Lösung nicht mehr trüb war. Anschließend wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und alle gesammelt zur RNA-Isolation und darauffolgender Präparation der cDNA-Bibliothek ins Genzentrum der LMU in die Gruppe von Dr. Helmut Blum gebracht. Dort wurden alle weiteren Arbeitsschritte von Dr. Stefan Krebs und Marlis Fischaleck durchgeführt. Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte mittels Bioanalyzer über die Ermittlung des RIN-Wertes (*RNA Integrity Number*). Dieser gibt den Grad der Degradierung der RNA von 1 (komplett degradiert) bis 10 (vollständig intakt) an. RNA-Proben, die zur RNA-Sequenzierung eingesetzt werden, sollten einen RIN-Wert von > 7 haben, was in diesem Fall von allen Proben erfüllt wurde. Die RNA-Sequenzierung erfolgte mittels Kit nach Herstellerangaben (Illumina) auf einem NGS-Chip mit acht Spuren. Anschließend mussten die Daten anhand ihrer spezifischen Indices sortiert werden (Demultiplexing), bevor sie auf dem Galaxy Server weiter analysiert werden konnten. Die Proben (RefSeq) wurden auf das Hg19 (Human Genome Version 19) und EBV 2089 (eigene Herstellung) gemappt und von Dr. Alexander Buschle visualisiert.

4.4 Proteinbiochemie

4.4.1 Immunoblotting

4.4.1.1 Herstellung von Zell- und EV-Lysaten

Zur Herstellung von Zell- oder EV-Lysaten wurde als erstes die entsprechende Menge pelletiert, mit PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor (50 μl Puffer auf 1×10^6 Zellen) resuspendiert. Danach erfolgte eine Inkubation auf Eis für 15 min mit anschließender Zentrifugation mit $16.000 \times g$ für 10 min und RT. Das im Überstand enthaltene Protein wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen eingesetzt oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Die Quantifizierung der Zell-/EV-Lysate erfolgte mittels Bradford-Assay. Von der mit H_2O -verdünnten Bradford-Stocklösung (1:5) wurden 1 ml pro Probe in eine 1,5 ml Küvette überführt, dazu 1 μl des Lysates gegeben, vorsichtig gemischt und die Konzentration im Photometer gemessen, wobei 1 ml Bradford-Lösung ohne Lysat als Leerwert diente.

Für die anschließende Western Blot-Analyse wurden 10-20 µg der Lysate mit denaturierendem oder nicht-denaturierendem (für den Nachweis von CD63) 6x Lämmli-Puffer gemischt und bei 95°C für 10 min aufgeköcht.

4.4.1.3 Bis-Tris Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Proteintransfer

Die Auftrennung von Proteinen aus Zell- oder EV-Lysaten erfolgte über Bis-Tris/Polyacrylamid-Gele. Diese wurden wie unter 4.4.1.1 beschrieben hergestellt und pro Tasche 20-30 µl Probe, bzw. 8 µl Größenstandard aufgetragen. Um die Proben durch das Sammelgel laufen zu lassen, wurde zuerst eine konstante Stromstärke von 40 mA angelegt, welche für die Auftrennung im Trenngel auf 80 mA erhöht wurde.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels eines „*Semi-dry* Blot“-Systems. Dafür wurden das Gel, die Blotting-Papiere, sowie die Membran in Blotpuffer eingeweicht und anschließend als Sandwich in die Transferkammer überführt. Der Transfer erfolgte bei konstanten 18 V für 45 min. Ein erfolgreicher Proteintransfer wurde durch eine Färbung mit Ponceau Rot (Inkubation für ungefähr 5 min, danach Waschen mit 1x TBS-T) überprüft.

Danach wurde die Membran mit 5% Milch in 1x TBS-T bei RT für eine Stunde blockiert und anschließend mit dem Primärantikörper (verdünnt in 5% Milch/1x TBS-T) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x TBS-T (mindestens drei Mal) wurde die Membran für mindestens eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in 5% Milch/1x TBS-T) inkubiert und danach erneut gut gewaschen. Für die Detektion der gebundenen Antikörper mittels Chemilumineszenz wurde die Membran mit ECL-Arbeitslösung für etwa 2 min inkubiert und in eine Entwicklerkassette überführt. Schließlich erfolgte der Übertrag des Chemilumineszenzsignals auf einen Röntgenfilm mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (üblicherweise 2 min) und die Entwicklung des Films in einer Dunkelkammer.

4.4.1.4 Dot Blot

Um native Proteine in Zelllysaten, VLPs oder EV zu detektieren, wurden 2 µl direkt auf eine Nitrozellulosemembran getropft. Nach dem vollständigen Trocknen der Probe, wurde die Membran mit 5% Milch/1x TBS-T geblockt und anschließend wie in 4.4.1.3 beschrieben mit Antikörpern inkubiert und entwickelt.

4.4.2 ELISA (*Enzyme-linked-immunosorbent assay*)

Mittels ELISA lassen sich Zytokine in Zellkulturüberständen quantifizieren. Für den Nachweis von IFN γ wurde ein Detektionskit der Firma Mabtech verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Abweichung vom Protokoll ist anzumerken, dass statt 100 μ l nur jeweils 50 μ l Zellkulturüberstand, verdünnter Standard (rekombinantes IFN γ) oder Antikörperlösung in Triplikaten eingesetzt wurden. Als Substrat für die Alkaline Phosphatase (ALP) diente fünffach konzentriertes p-Nitrophenylphosphat, welches mit H $_2$ O verdünnt (1:5) und mit MgSO $_4$ (1:500) versetzt wurde. Die Bestimmung der OD erfolgte an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm. Mithilfe der Standardkurve konnte anschließend die Menge an freigesetztem IFN γ in den Proben berechnet werden.

Um IFN β zu detektieren, wurde ein ELISA-Kit von R&D Systems nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 100 μ l Zellkulturüberstand in Triplikaten eingesetzt. Die Substratlösung für die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) wurde aus H $_2$ O $_2$ und Tetramethylbenzidin (1:1) angesetzt und nach einer Inkubation von 20 min (abgedeckt) mit 2 N H $_2$ SO $_4$ abgestoppt. Die OD wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt und die Menge an freigesetztem IFN β mittels Standardkurve berechnet.

5 ERGEBNISSE

Teil I:

***Virus-like-Particles (VLPs)* und die darin verpackten viralen RNAs beeinflussen die zelluläre Genexpression**

5.1 Bedingungen an VLPs als Basis für einen EBV-Impfstoff

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen und immunologischen Charakteristika von VLPs im Hinblick auf einen möglichen EBV-Impfstoff zu untersuchen. Dafür müssen VLPs einige Grundvoraussetzungen erfüllen, die über den ähnlichen Aufbau, die Zusammensetzung der Partikel und den B-Zelltropismus hinausgehen. Vielmehr sollten sie ebenfalls in der Lage sein, von den Zielzellen aufgenommen zu werden, um dadurch sämtliche virale Bestandteile zu übertragen, was im weiteren Verlauf zu einer Aktivierung des Immunsystems führen kann. In diesem Teil der Arbeit wurden in allen Experimenten TR-VLPs eingesetzt (siehe 3.12.2).

5.1.1 Durch VLPs übertragene virale RNAs sind über mehrere Stunden stabil

EBV-Partikel enthalten virale mRNAs und miRNAs aus allen Phasen des EBV-Zyklus. Diese werden bei einer Infektion auf die Zielzellen übertragen und sind dort bereits nach zwei Stunden nachweisbar (Jochum et al. 2012). In der Zielzelle bleibt die Menge an viralen Transkripten zuerst konstant und steigt dann nach 6-12 Stunden an. Auch für rekombinante TR-VLPs des EBV konnte gezeigt werden, dass sie mRNAs und miRNAs verschiedener Stadien des EBV-Zyklus enthalten (Jochum et al. 2012). Aus diesem Grund sollte in einem ersten Experiment untersucht werden, ob auch VLPs ihre verpackten RNAs auf B-Zellen übertragen.

Dafür wurden B-Zellen aus Adenoiden mit konzentrierten TR-VLPs, beziehungsweise EBV 2089, inkubiert und über einen Zeitraum von 24 Stunden regelmäßig 10^6 Zellen zur RNA-Extraktion abgenommen. Diese ließ sich dann nach anschließender cDNA-Synthese mittels qRT-PCR auf das Vorhandensein von viralen Transkripten hin testen. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, waren in mit VLPs inkubierten Zellen bereits nach zwei Stunden virale Transkripte aus allen Stadien des EBV-Zyklus detektierbar

(unmittelbare Gene: BZLF1, BRLF1, BMRF1; frühe Gene: BNLF2a; latente Gene: EBNA2 und nicht-kodierende RNAs: EBER1, EBER2). Über den Verlauf des Beobachtungszeitraums nahm die Menge an Transkripten nicht ab, was auf eine große Stabilität der übertragenen mRNAs hindeutet und es ihnen ermöglicht, auch mehrere Stunden nach dem Übertrag funktional aktiv zu sein. Das entspricht den Ergebnissen der B-Zellen, die mit EBV 2089 infiziert wurden und wo ebenfalls bereits nach 2 Stunden Transkripte detektierbar waren. Der Anstieg der Transkriptmenge ist hier auf eine *de novo*-Transkription zurückzuführen.

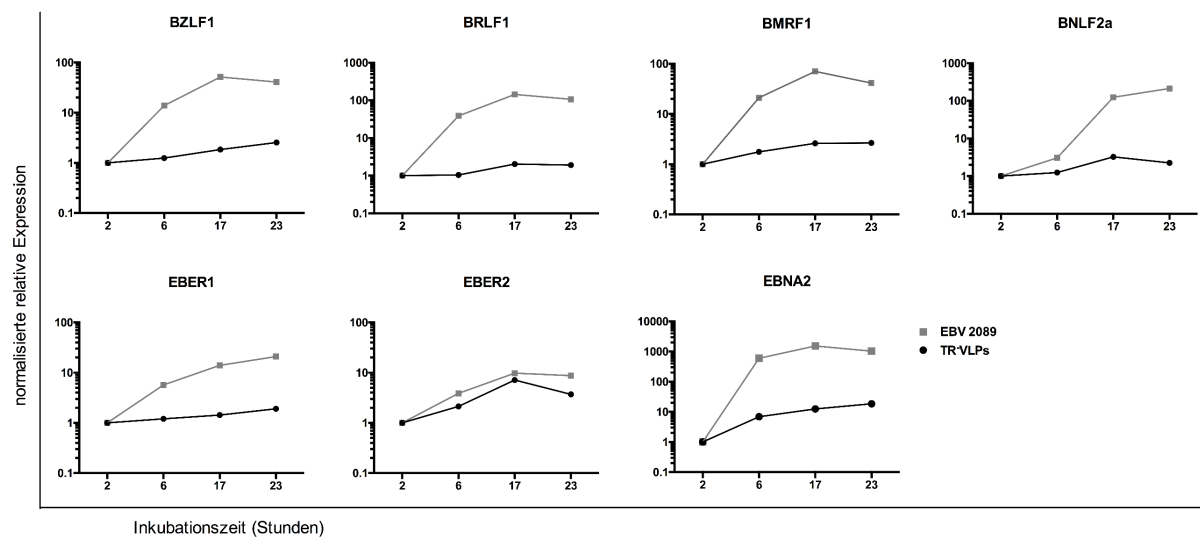


Abbildung 5: TR-VLPs übertragen virale mRNAs auf B-Zellen

Aus Adenoiden isolierte B-Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h mit rekombinanten, aufkonzentrierten TR-VLPs oder EBV 2089 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 10^6 Zellen abgenommen und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Jeweils $1 \mu\text{g}$ RNA wurde zur cDNA-Synthese eingesetzt und anschließend mittels qRT-PCR auf EBV-Transkripte hin analysiert: BZLF1, BRLF1 und BMRF1 gehören zu den unmittelbaren Genen von EBV, BNLF2a ist ein frühes und EBNA2 ein latentes Gen. EBER1 und EBER2 sind die beiden nicht-kodierenden RNAs des EBV. Die relativen Transkriptionslevel beziehen sich auf das Haushaltsgen GUSB. Normalisiert wurde auf den 2-Stunden Wert. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten.

5.1.2 Herstellung von gp350-positiven EV

Für die Untersuchung des Effekts von VLPs auf das Immunsystem, ist ein direkter Vergleich mit EBV ungeeignet. Da in mit Virus infizierten Zellen eine Neusynthese von Virusproteinen stattfindet, kann ab diesem Zeitpunkt nicht mehr differenziert werden, ob Effekte auf die Zelle auf eine Neusynthese oder die bereits vorhandenen Transkripte und Proteine zurückzuführen sind. Andererseits löst bereits die Bindung des viralen gp350 auf der Oberfläche von VLPs und EBV an den zellulären Rezeptor CD21 eine Aktivierung von B-Zellen durch die Induktion verschiedener Signalwege aus (Roberts, Luxembourg,

and Cooper 1996; Busse et al. 2010). Um den Einfluss von VLPs auf B-Zellen untersuchen zu können, wurden daher Kontrollvesikel verwendet. Hierbei handelte es sich um extrazelluläre Vesikel (EV) von HEK293-Zellen, die sowohl gp350 als Protein, als auch die für gp350-codierende mRNA enthielten. So erhielten die Vesikel den für EBV-typischen B-Zelltropismus. Außerdem aktivierten sie – wie EBV und VLPs – durch ihre Bindung an CD21 die damit behandelten Zellen, hatten darüber hinaus aber keinen Einfluss auf die Zielzellen (Ruiss et al. 2011).

Für die Herstellung dieser EV wurden HEK293-Zellen mit einem gp350-Expressionsplasmid transfiziert und die Vesikel aus dem Überstand drei Tage später mit den üblichen Methoden aufgereinigt. Eine erfolgreiche Expression von gp350 wurde mittels Western Blot (WB) bestätigt und für alle weiteren Präparationen durch Dot Blots (DB) kontrolliert. Dafür wurden entweder 25 µg Zellysate oder konzentrierte Vesikelpräparation lysiert, auf ein Gel aufgetragen (WB) oder je 2 µl direkt auf eine Nitrozellulosemembran getropft (DB) und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. Abbildung 6A zeigt den Nachweis verschiedener Proteine in VLP- und EV-Präparationen und den dazugehörigen Produzentenzellen im WB. Als Positivkontrolle dienten die Tetraspanine CD63 und CD81, die häufig als „Pan-Vesikelmarker“ verwendet werden. Als Negativkontrolle diente Calnexin, ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums, das nicht in EV verpackt wird (Witwer et al. 2013).

In allen untersuchten Proben ließen sich CD63 und CD81 nachweisen, während Calnexin nur in den Zellysaten detektiert wurde. In den EV transfizierter HEK293-Zellen und der VLP-Produzentenzelllinie ließ sich gp350 detektieren, während die EV nicht-transfizierter HEK293-Zellen, wie erwartet gp350-negativ waren.

Als weitere Kontrolle für die Zusammensetzung der Vesikel wurde vesikuläre RNA aus gp350-EV und TR-VLPs isoliert und ihre Qualität mittels Bioanalyser untersucht. Diese Untersuchung gibt Aufschluss über die Reinheit der Probe, die Größe der RNA-Transkripte, sowie den Gehalt an rRNA (Abbildung 6B). In den Elektropherogrammen ist auf der X-Achse die aufgetrennte RNA entsprechend ihrer Länge dargestellt. Auf der Y-Achse geben die fluoreszierenden Einheiten (*fluorescence units*; FU) Aufschluss über die Menge an RNA der jeweiligen Länge. Auffällig ist der deutliche Unterschied zwischen vesikulärer und zellulärer RNA. Während in zellulärer RNA die rRNA (18S und 28S) dominiert, fehlt diese in vesikulärer RNA, die dafür überwiegend aus kürzeren Transkripten mit einer Länge von 50-500 Nukleotiden (nt) besteht (Rider, Hurwitz, and

Meckes 2016; Twu et al. 2013).

Die Konzentrationsbestimmung der gp350-EV und TR-VLPs erfolgte über NTA im ZetaView durch die Messung von drei separat verdünnten Ansätzen. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurden stets 5.000 Vesikel pro Zelle eingesetzt. Dieses Verhältnis war zuvor durch Titration ermittelt worden. Dabei wurde getestet, ab welcher Menge an applizierten VLPs virale Transkripte in den Zielzellen nachweisbar waren, gleichzeitig die Zellviabilität durch eine zu große Menge aber nicht beeinträchtigt wurde.

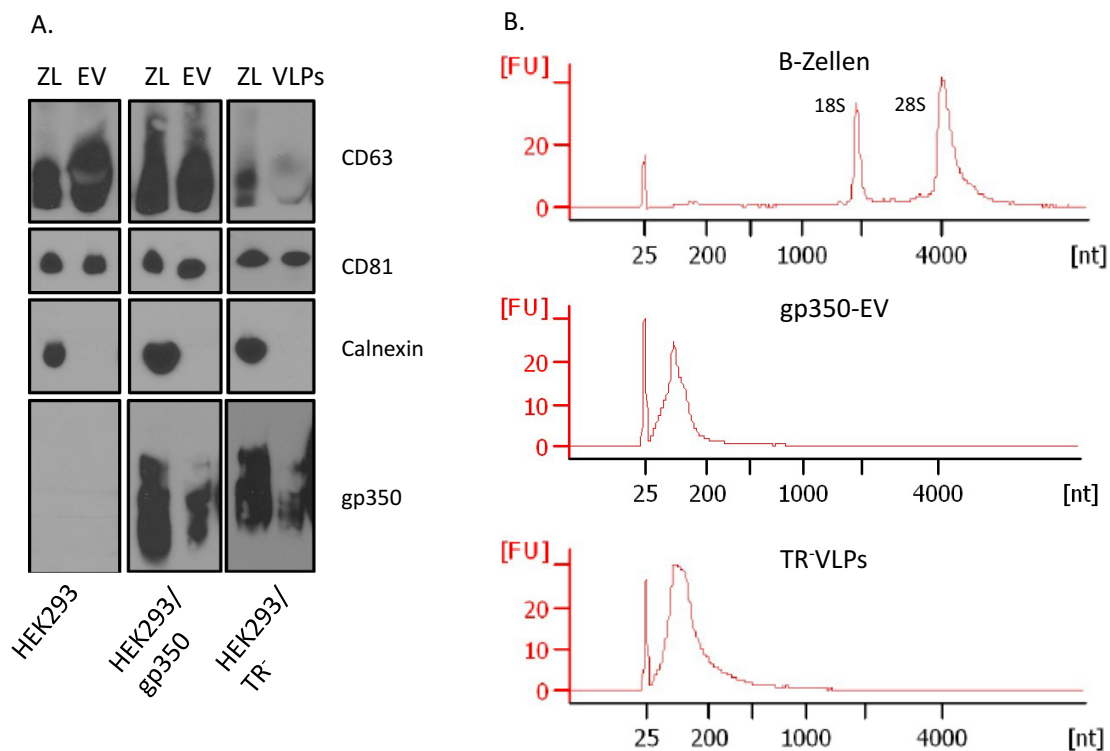


Abbildung 6: Kontrolle der EV- und VLP-Präparationen auf Protein- und RNA-Gehalt

A. Die Expression von gp350 auf den Kontroll-EV wurde mittels Western Blot überprüft. Aufgetragen wurden jeweils 25 µg Zellysate (ZL) oder konzentrierte Vesikelpräparation. Die beiden Tetraspanine CD63 und CD81 dienen als „Pan-Vesikelmarker“, Calnexin als Negativkontrolle, da es ein Protein des endoplasmatischen Retikulums ist und nicht in Vesikel verpackt wird. B. Aus beiden Vesikelpräparationen wurde RNA isoliert und deren Qualität mittels Bioanalyzer (Agilent) kontrolliert.

5.2 Transkriptomanalyse von B-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln

Um die Eignung von VLPs als Kandidat für einen EBV-Impfstoff bewerten zu können, musste unter anderem ihr Einfluss auf die Zielzellen genauer untersucht werden. Dies erfolgte unter Einsatz von RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) basierend auf *Next-Generation Sequencing* (NGS) der cDNA, einem Hochdurchsatzverfahren nach der Sanger-Methode. Dabei sollten einerseits die übertragenen viralen mRNAs aus VLPs in den Zielzellen detektiert werden, um einen Übertrag zu bestätigen und Aufschluss über deren Zusammensetzung zu geben. Andererseits sollte der Einfluss der VLPs auf die zelluläre Genexpression der Zielzellen untersucht werden. Wichtig für den Aufbau des Experimentes war es dabei, Informationen über die Expressionsprofile unterschiedlich behandelter B-Zellen zu erhalten, um diese später vergleichen zu können. Um biologische Variationen zu minimieren, wurden B-Zellen aus Adenoiden von vier Spendern in das Experiment eingesetzt (biologische Replikate).

5.2.1 Probenvorbereitung und Experimentaufbau

Da nicht alle vier Adenoide gleichzeitig aufgearbeitet werden konnten, wurden die Proben welche in die RNA-Sequenzierung eingesetzt werden sollten, an unterschiedlichen Tagen generiert und schließlich gemeinsam weiter prozessiert.

Als erstes wurden B-Zellen nach Standardprotokoll aus Adenoiden isoliert (vergleiche 4.1.8). Jeweils zwei Millionen Zellen wurden anschließend entweder unbehandelt, oder mit gp350-EV, beziehungsweise mit TR-VLPs für 24 Stunden inkubiert (Abbildung 7). Aus den unbehandelten Zellen sollte das Expressionsprofil von B-Zellen in Ruhe ermittelt werden. Eine allein durch die Bindung von gp350 an die Zielzellen vermittelte Änderung der zellulären Genexpression wurde durch die Inkubation mit gp350-EV induziert. Dadurch war es möglich, den Einfluss der TR-VLPs auf die Genexpression von B-Zellen vom Hintergrundsignal, welches durch die Aktivierung über CD21 entsteht, zu unterscheiden. Nach der Inkubation wurden die Zellen sorgfältig gewaschen, zur RNA-Extraktion in Trizol aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Die weitere Probenverarbeitung von der RNA-Isolation bis zur RNA-Sequenzierung erfolgte in der AG Blum im Genzentrum der Ludwig-Maximilians Universität (LMU) München und ist unter 4.3.13 genauer beschrieben.

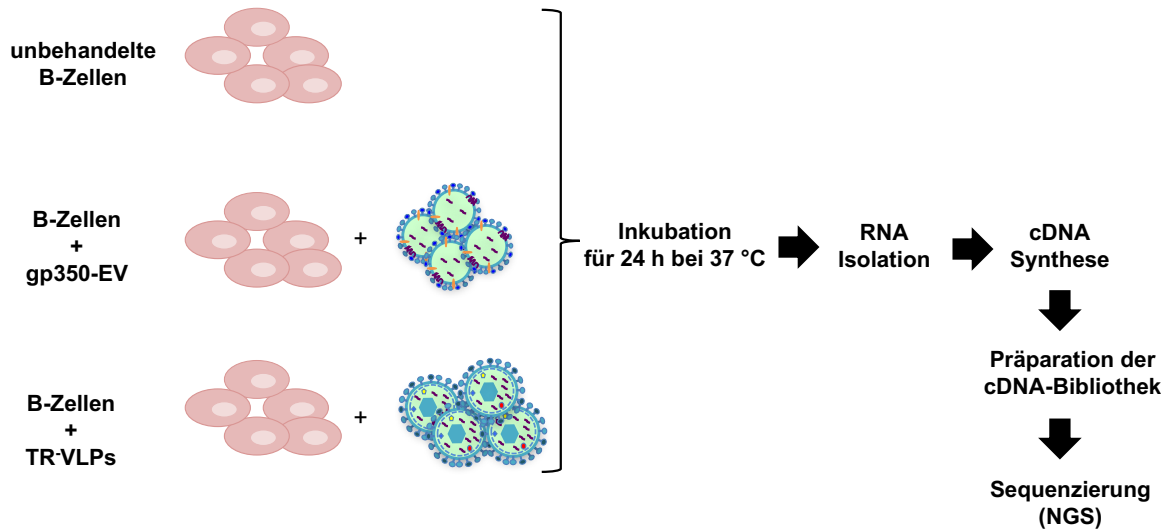


Abbildung 7: Schematischer Versuchsaufbau der Probengenerierung zur RNA-Sequenzierung

Aus Adenoiden von vier Spendern wurden B-Zellen isoliert und jeweils 2×10^6 Zellen unbehandelt, oder mit gp350-EV beziehungsweise TR-VLPs gemischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Dabei stellten unbehandelte Zellen das Expressionsprofil von B-Zellen in Ruhe dar. Eine Inkubation mit gp350-EV induzierte die durch eine Bindung an den zellulären Rezeptor CD21 vermittelten Änderungen der zellulären Genexpression. Im Anschluss an die Inkubation erfolgten zwei Waschschritte mit PBS, die Aufnahme und Lyse der Zellpellets in Trizol, sowie die Sammlung und Lagerung der Proben bei -80 °C. Alle weiteren Schritte, das heißt, die RNA-Extraktion, die cDNA-Synthese, die Präparation der cDNA-Bibliothek, sowie die RNA-Sequenzierung, wurden in der AG Blum des Genzentrums der LMU München durchgeführt.

5.2.2 Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten

Die Daten der RNA-Sequenzierung, welche in der AG Blum generiert wurden, mussten anschließend anhand ihrer spezifischen Indices decodiert und sortiert werden (Demultiplexing), bevor sie auf dem Galaxy Server (Genzentrum LMU) weiter analysiert werden konnten. Dies geschah unter Anleitung von Dr. Alexander Buschle aus der AG Hammerschmidt. Um Erkenntnisse über die viralen Transkripte beziehungsweise die zellulären Genexpressionsprofile der Proben zu gewinnen, mussten die gewonnenen Rohdaten anschließend mit Referenzgenomen abgeglichen werden. Als humanes Referenzgenom diente das online zugängliche Hg19 (humanes Genom Version 19).

Die Grundlage für das EBV-Genom war in dieser Arbeit EBV 2089 (Datenbank der AGV, MacVector, p2089), aus welchem alle kodierenden Sequenzen kopiert und unter Einhaltung des Leserahmens zu einem neuen Datensatz zusammengestellt wurden. Mit dieser Datei erfolgte anschließend die Analyse der EBV-Transkripte. Abbildung 8 zeigt einen Auszug der Annotation der Sequenzierungsdaten auf das EBV-Genom in einem IGV-Browser Fenster. Bunte *Peaks*, die mit ihrer Höhe die Anzahl an Transkripten (*Reads*) pro Gen darstellen, zeigen Übereinstimmungen der Sequenzierungsproben mit dem

Referenzgenom an. Die blaue Bande in der unteren Reihe markiert die Position von gp350 im EBV-Genom. An dieser Stelle sind sowohl in mit TR-VLPs, als auch in mit gp350-EV inkubierten B-Zellen *Peaks* zu erkennen. Während jedoch in B-Zellen, die mit gp350-EV inkubiert wurden, keine weiteren *Peaks* detektiert werden konnten, sind in mit VLPs inkubierten B-Zellen genomweit *Peaks* und somit identifizierte EBV-Transkripte zu finden. In unbehandelten B-Zellen ließ sich kein EBV-Transkript nachweisen.

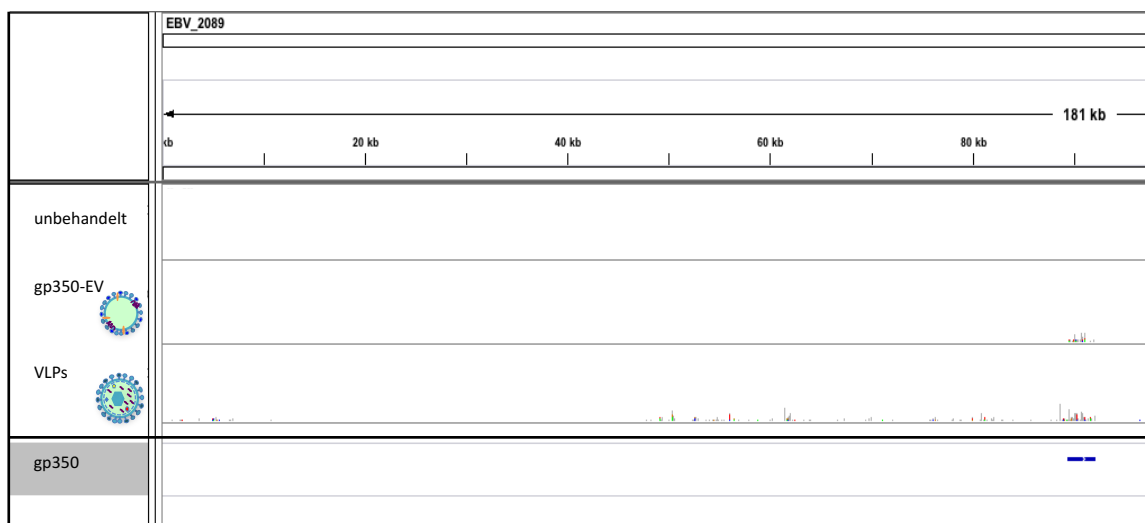


Abbildung 8: Annotation der viralen Transkripte aus den RNA-Sequenzierungsdaten auf das EBV 2089-Genom
 Ausschnitt des EBV-Genoms in einem IGV-Browser Fenster und die darauf annotierten Ergebnisse der mittels RNA-Sequenzierung detektierten EBV-Transkripte. Die mittleren Reihen zeigen alle *Reads* für EBV-Transkripte, die in den jeweiligen Proben identifiziert werden konnten und die Höhe der *Peaks* gibt dabei Aufschluss über deren Anzahl. Die unterste Reihe zeigt die Position von gp350 im EBV-Genom und die darüberliegenden *Peaks* die dazugehörigen *Reads* in der jeweiligen Probe an. Hier ist als Beispiel der Bereich markiert, auf dem gp350 im EBV-Genom lokalisiert ist (blaue Bande, unterste Reihe).

5.2.2.1 VLPs übertragen ein breites Spektrum an EBV-Transkripten auf B-Zellen

Der Übertrag viraler Transkripte durch EBV-Virionen und VLPs war bereits gezeigt worden (Jochum et al. 2012). Während in den bisherigen Experimenten mittels qRT-PCR nur die Präsenzen bestimmter einzelner viraler Transkripte nachgewiesen werden konnten, sollte durch die hier vorgenommene RNA-Sequenzierung das gesamte Spektrum der viralen mRNAs analysiert werden. Dadurch sollte ein genauerer Überblick über die Abundanz der viralen Transkripte gewonnen werden. Dafür wurden die RNA-Sequenzierungsdaten auf das EBV 2089-Genom annotiert, damit für jedes Gen die Anzahl der Transkripte (*Reads*) in jeder Probe bestimmt werden konnte. Daraus wurde dann für jede Bedingung der Mittelwert aller vier Replikate gebildet (siehe Tabelle in Abbildung 9). Ein Großteil der EBV-Transkripte ließ sich in mit TR-VLPs behandelten B-

Zellen wiederfinden (siehe Tabelle 2), dazu gehörten auch die bereits mittels qRT-PCR nachgewiesenen Transkripte aus 5.1.1. Die 20 häufigsten EBV-Transkripte sind in Abbildung 9 dargestellt, wobei es sich bei den meisten um Strukturproteine der Virushülle (unter anderem BALF4 und gp350), des Teguments (zum Beispiel BNRF1) oder des Kapsids (BFRF3) handelt. Auch BZLF1-Transkripte waren häufig. BALF4 und BZLF1 werden beide zur Induktion der Produktion von VLPs transfiziert und sind vermutlich deshalb überrepräsentiert. In mit gp350-EV behandelten B-Zellen konnte bis auf gp350 selbst kein weiteres virales Transkript detektiert werden.

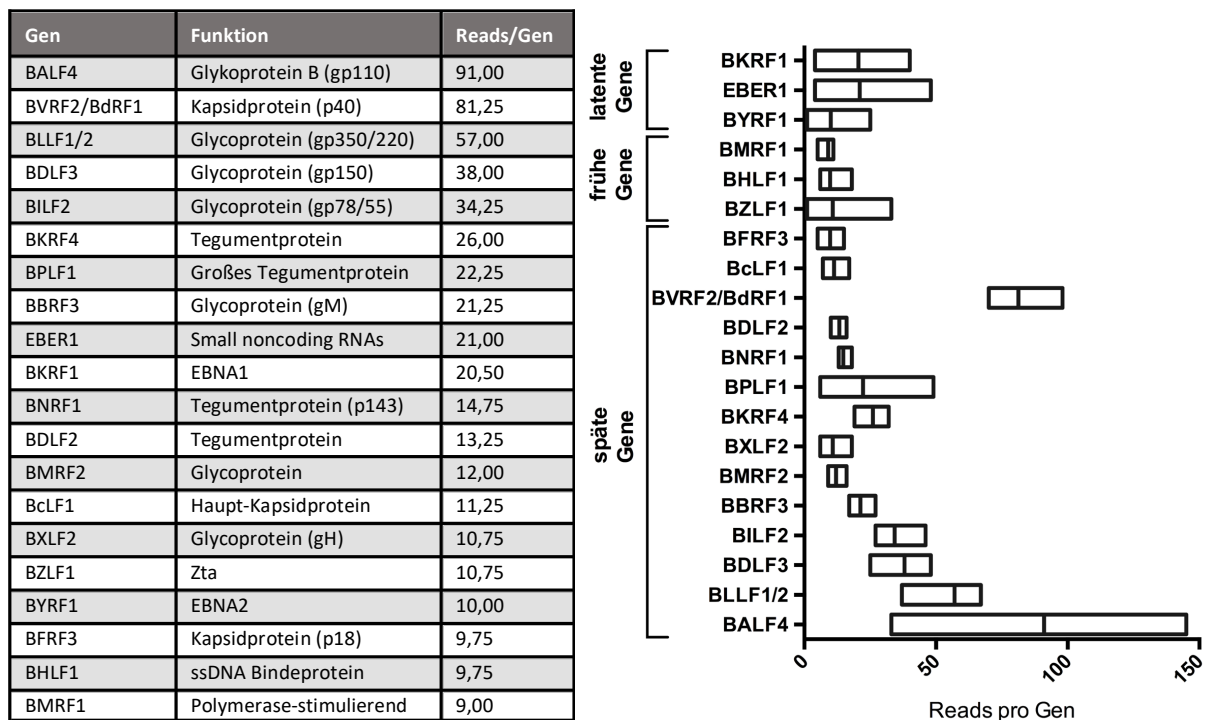


Abbildung 9: Übersicht der mittels VLPs übertragenen häufigsten EBV-Transkripte in B-Zellen

Die aus der RNA-Sequenzierung gewonnenen Daten wurden mit dem EBV-Genom (basierend auf 2089) abgeglichen. A. Die Tabelle zeigt die Top 20 Transkripte mit den meisten Reads pro Gen (Mittelwert aus 4 Replikaten). B. In der Grafik sind die betreffenden Gene den Stadien des EBV-Zyklus zugeordnet. Die meisten von ihnen kodieren für Glykoproteine (unter anderem BALF4 und gp350), Tegumentproteine (zum Beispiel BNRF1) oder Kapsidproteine (BFRF3). BZLF1 ist ebenfalls vermehrt zu finden, was sich unter anderem darauf zurückführen lässt, dass es gemeinsam mit BALF4 zur Induktion der Produktion von TR-VLPs benötigt, und dabei überexprimiert wird. In mit gp350-EV behandelten B-Zellen konnten außer dem Glykoprotein gp350 selbst keine weiteren EBV-Transkripte nachgewiesen werden.

5.2.2.2 VLPs nehmen Einfluss auf die zelluläre Genexpression

Um den Einfluss von VLPs und damit der übertragenen viralen Transkripte auf die zelluläre Genexpression zu untersuchen, wurden Referenzdaten von unbehandelten und mit gp350-EV behandelten B-Zellen benötigt. Die unbehandelte Kontrolle spiegelt das natürliche Genexpressionsprofil humaner B-Zellen in Ruhe wieder. Dem gegenüber

stehen B-Zellen, welche mit gp350-positiven EV inkubiert wurden. In diesem Fall hat alleine die Bindung von gp350 an den zellulären Rezeptor CD21 einen Effekt auf die Genexpression (Busse et al. 2010; Roberts, Luxembourg, and Cooper 1996). Die Inkubation mit TR-VLPs gibt Aufschluss darüber, inwieweit deren Bindung und Aufnahme darüber hinaus die zelluläre Genexpression beeinflussen. Abbildung 10 stellt die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung in MA-Plots (*mean average*) dar. Damit werden Unterschiede in Messungen aus zwei Proben visualisiert (Robinson, McCarthy, and Smyth 2010). Im vorliegenden Experiment ist dies einerseits der Vergleich von unbehandelten mit gp350-EV behandelten B-Zellen (Abbildung 10A) und andererseits der Vergleich von gp350-EV-behandelten mit TR-VLP-behandelten B-Zellen (Abbildung 10B). Der jeweilige Plot zeigt auf der Y-Achse die log₂-fache Änderung der Genexpression jedes einzelnen Gens zwischen den beiden Bedingungen. Die X-Achse stellt den Mittelwert der normalisierten, detektierten *Reads* pro Gen aus den vier Replikaten dar. Graue Punkte stehen für nicht signifikant regulierte Gene, während rote Punkte alle signifikant regulierten Gene mit einem festgelegten p-Wert von $< 0,05$ anzeigen. Gene, die linkerhand der gestichelten vertikalen Linie liegen, wiesen weniger als 20 *Reads* pro Zählung auf und wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Ebenso wurden diejenigen Gene in der Auswertung nicht berücksichtigt, welche zwischen den beiden horizontalen Linien liegen, und somit weniger als 2-fach hoch- oder herabreguliert waren. Innerhalb dieser Grenzen konnten in den mit gp350-EV behandelten Proben 1431 signifikant hochregulierte und 1111 signifikant runterregulierte Gene im Vergleich mit nicht-behandelten B-Zellen detektiert werden. Dies wurde auf die Interaktion des viralen gp350 mit dem zellulären Rezeptor und die dadurch vermittelte Aktivierung der B-Zellen zurückgeführt und nicht weiter untersucht (Daten siehe Tabelle 5 und Tabelle 6). Im Vergleich von gp350-EV- mit TR-VLP-behandelten B-Zellen wurden 818 Gene signifikant hoch- und 817 Gene signifikant runterreguliert und im Folgenden genauer analysiert.

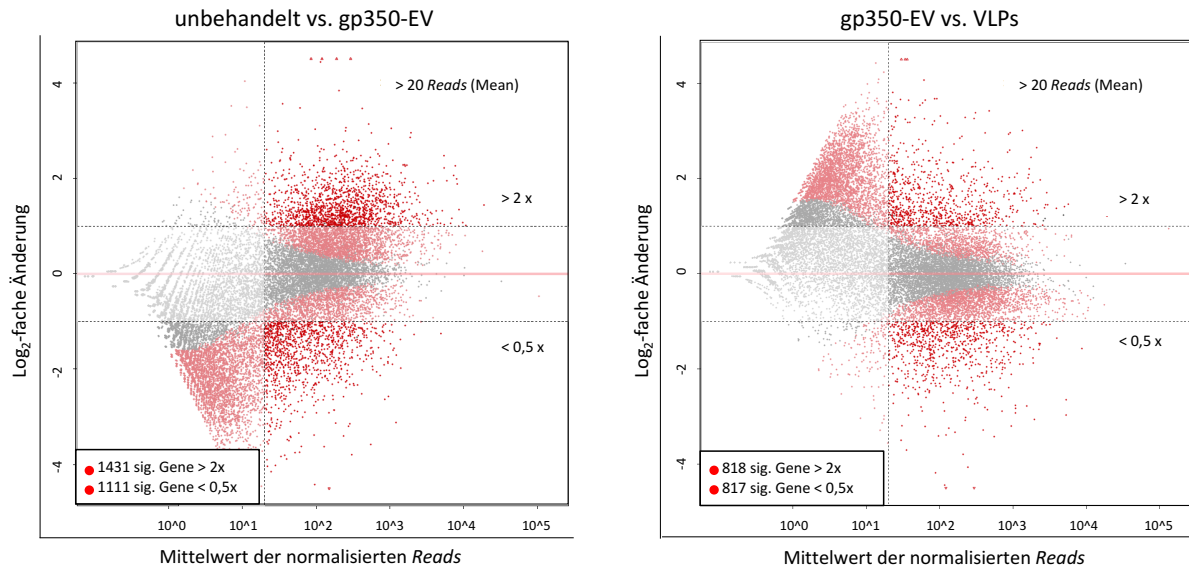


Abbildung 10: Differenziell regulierte Gene in B-Zellen nach Inkubation mit gp350-EV oder TR-VLPs

Die MA-Plots zeigen die \log_2 -fache Änderung der Genexpression (Y-Achse) zwischen zwei unterschiedlich behandelten Proben für jedes Gen. Die X-Achse bildet den Mittelwert der normalisierten Reads pro Gen aus vier Replikaten ab. Graue Punkte stehen für Gene, die nicht signifikant reguliert wurden. Rote Punkte zeigen Gene mit einem festgelegten p-Wert unter 0,05 an und sind damit signifikant reguliert. Linkerhand der grauen vertikalen Linie liegen Gene mit weniger als 20 Reads pro Zählung, welche aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Die beiden horizontalen grauen Linien trennen diejenigen Gene ab, welche < 2 -fach reguliert, und ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Die Legende gibt die Zahl der Gene an, die innerhalb der gesetzten Bedingungen liegen und nach der entsprechenden Behandlung hoch- oder runterreguliert wurden. Links: Differenziell regulierte Gene in mit gp350-EV behandelten, verglichen mit unbehandelten B-Zellen. Rechts: Änderung im Expressionsprofil von B-Zellen nach Inkubation mit TR-VLPs im Vergleich zu mit gp350-EV inkubierten B-Zellen.

5.2.2.3 Nach VLP-Inkubation differenziell regulierte Gene in B-Zellen sind an der Viruserkennung und Immunantwort beteiligt

Um Informationen über die Funktion der durch Inkubation mit VLPs signifikant deregulierten Gene zu bekommen, wurde eine KEGG-Signalweganalyse (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) durchgeführt. Dabei ordnet ein Onlineprogramm („webgestalt“) Gene zellulären Signalwegen zu. In die Analyse wurden alle 1635 signifikant deregulierten Gene eingesetzt (Tabelle 3 und Tabelle 4), von denen 1534 Gene Signalwegen zugeordnet werden konnten. Die 20 Signalwege mit den meisten eingruppierten Genen sind in Abbildung 11 dargestellt. Zu sehen ist jeweils der Name des Signalwegs mit dazugehörigem p-Wert, sowie die Zahl der zugeordneten identifizierten Gene. Die beeinflussten Signalwege stehen entweder im Zusammenhang mit Virusinfektionen oder sind an Formen der Immunerkennung beteiligt.

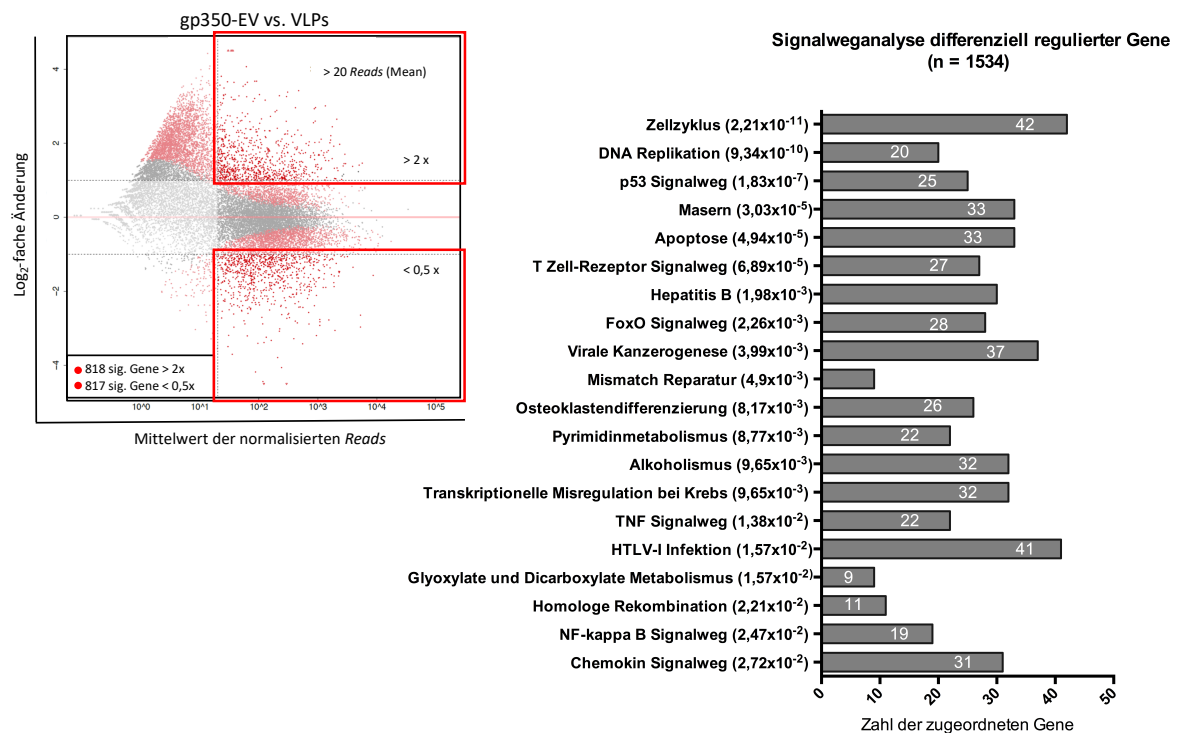


Abbildung 11: KEGG Signalweganalyse der deregulierten Gene in B-Zellen nach Inkubation mit VLPs
 Links: Die über RNA-Sequenzierung identifizierte, signifikant deregulierten Gene (rote Kästen) in B-Zellen nach Inkubation mit TR-VLPs wurden einer KEGG Signalweganalyse (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) mit dem Onlineprogramm „webgestalt“ unterzogen. Rechts: Top 20 Signalwege mit den meisten eingruppierten Genen. Auf der Y-Achse ist die Zahl der zugeordneten Gene für jeden Signalweg aufgetragen, während die Namen der Signalwege, inklusive p-Wert, auf der X-Achse dargestellt sind.

5.2.2.4 VLPs induzieren die Expression von Interferon β in B-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Inkubation von B-Zellen mit VLPs Änderungen im Expressionsmuster von Genen induziert, die zur Viruserkennung und Immunantwort gehören, sollten diese genauer betrachtet werden. Der Fokus lag dabei auf den hochregulierten Genen (vergleiche oberer roter Kasten in Abbildung 11). Eine vollständige Liste dieser Gene ist im Anhang zu finden (Tabelle 3). Das am stärksten hochregulierte Gen nach Inkubation mit VLPs war Interferon β -1 (IFNB1) mit einer $46,61(\pm 2,27)$ -fach gesteigerten Expression, verglichen mit B-Zellen, die mit gp350-EV inkubiert wurden. IFNB1 (auch IFN β) ist ein Typ-I-Interferon, das hauptsächlich von Zellen des angeborenen Immunsystems als Reaktion auf Pathogene ausgeschüttet wird (Haji Abdolvahab, Mofrad, and Schellekens 2016).

Um die Daten der RNA-Sequenzierung zu bestätigen, wurde nicht verwendete mRNA der mit TR-VLPs behandelten B-Zellen in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels qRT-PCR auf die Expression von IFN β hin untersucht. Mithilfe des Haushaltsgens GUSB, welches in B-Zellen stabil exprimiert wird, wurde die relative Expression von IFN β

berechnet (Brouwer, Bokhoven, and Kremer 2006).

Abbildung 12A zeigt die relative Expression von IFN β (Mittelwert aus vier Spendern) in unbehandelten B-Zellen und solchen, die mit gp350-EV oder TR-VLPs inkubiert wurden. In unbehandelten und mit gp350-EV stimulierten B-Zellen war keine, beziehungsweise nur eine sehr geringe Expression von IFN β detektierbar, wobei die relative Expression nach Inkubation mit TR-VLPs um das 56,9-Fache anstieg. Somit ließen sich die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung, wonach B-Zellen auf die Behandlung mit TR-VLPs mit einer gesteigerten Expression von IFN β reagieren, mittels qRT-PCR bestätigen.

Da diese qRT-PCR allerdings mit den Sequenzierungsproben durchgeführt wurde, war es in einem nächsten Schritt wichtig, die IFN β -Produktion auch in weiteren Experimenten und mit anderen Methoden zu reproduzieren. Dafür wurden aus frischen Adenoiden erneut B-Zellen nach Standardprotokoll isoliert und diese anschließend noch auf MACS-Säulen gegeben, um eine komplett reine B-Zellpopulation zu erhalten. Diese B-Zellen wurden danach mit gp350-EV oder TR-VLPs für 21 Stunden inkubiert und schließlich die Menge an freigesetztem IFN β im Überstand mittels ELISA gemessen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit gp350-EV zu einer kaum nennenswerten Freisetzung von IFN β führte, wohingegen die Produktion nach Inkubation mit TR-VLPs um das 16-Fache anstieg (Abbildung 12B).

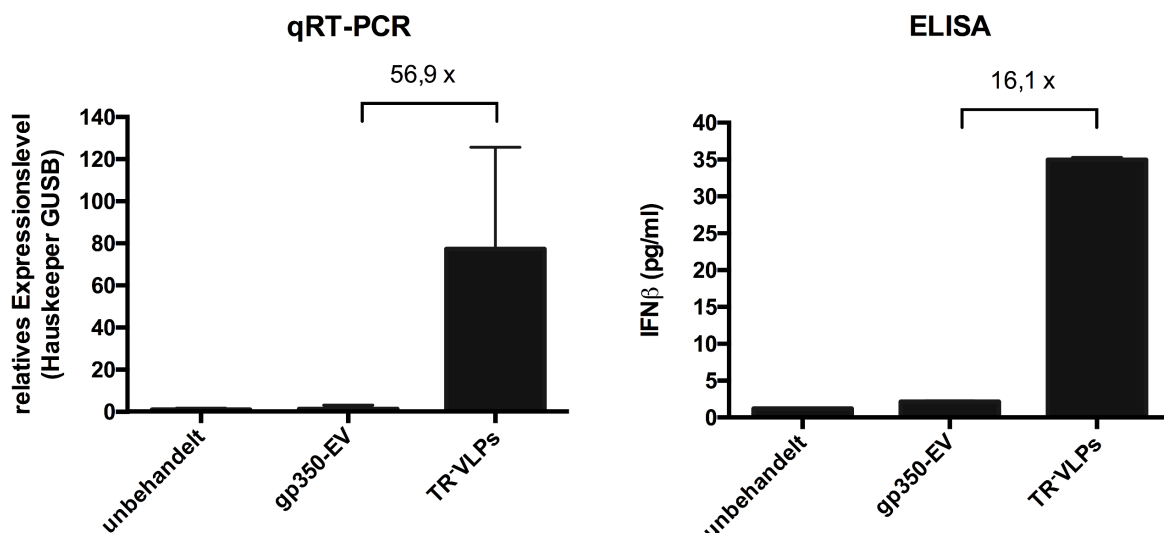


Abbildung 12: Die Inkubation mit VLPs induziert die Expression und Freisetzung von IFN β in B-Zellen

A. Bestätigung der IFNB1-Expression mittels qRT-PCR. Nicht zur Sequenzierung eingesetzte mRNA der mit TR-VLPs inkubierten B-Zellen aller vier Adenoide wurde revers transkribiert und die cDNA in eine qRT-PCR eingesetzt. Mit spezifischen Primern wurden IFN β und das Haushaltsgen GUSB amplifiziert und anschließend die relative Expression berechnet. B. Test auf die Freisetzung von IFN β aus B-Zellen nach Inkubation mit TR-VLPs mittels ELISA. Über MACS-Säulen zusätzlich aufgereinigte B-Zellen wurden mit gp350-EV oder TR-VLPs für 21 h bei 37 °C inkubiert und danach die Menge an freigesetztem IFN β im Überstand gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve mit rekombinantem IFN β . n = 3.

5.3 Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch VLPs

Kommt der Körper in Kontakt mit Pathogenen wie Bakterien oder Viren, setzen das angeborene und adaptive Immunsystem verschiedene Reaktionen in Gang, die zu deren Beseitigung führen sollen. Dies beinhaltet auch die Bildung von Gedächtniszellen, sodass der Erreger bei erneutem Kontakt schneller erkannt und unschädlich gemacht werden kann. Die Fähigkeit zur schnellen Erkennung und erfolgreichen Beseitigung von Pathogenen soll durch eine Impfung erreicht werden, um so die Manifestation einer Erkrankung zu verhindern. Darum ist es wichtig, die Effekte eines potenziellen Vakzins auf das Immunsystem näher zu untersuchen.

5.3.1 IFN β wird in den ersten 24 Stunden nach VLP-Inkubation exprimiert

Die Ausschüttung von Interferonen ist eine der ersten Reaktionen des angeborenen Immunsystems auf virale Infektionen. Unter anderem wird dadurch die Erkennung von viralen Nukleinsäuren gemeldet und deren Abbau initiiert. Wie oben gezeigt, induziert der Kontakt und die Aufnahme von VLPs die Produktion von IFN β in humanen B-Zellen. Im weiteren Verlauf sollte nun geklärt werden, wie schnell eine B-Zelle nach Kontakt mit VLPs mit der Produktion von IFN β reagiert. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden frische B-Zellen aus Adenoiden isoliert und mit gp350-EV oder TR-VLPs über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 10^6 Zellen entnommen, gewaschen, zur späteren RNA-Extraktion in Trizol aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und Untersuchung des Expressionsstatus von IFN β zu verschiedenen Zeitpunkten mittels qRT-PCR erfolgte anschließend für alle Proben gemeinsam. Auch hier diente GUSB als Haushaltsgen zur Berechnung der relativen Expression. Abbildung 13 zeigt ein repräsentatives Beispiel aus vier Spendern. Wie zu erkennen ist, konnte in mit gp350-EV inkubierten B-Zellen zu keinem Zeitpunkt eine Expression von IFN β detektiert werden. Im Gegenteil dazu ließ sich nach Inkubation mit TR-VLPs schon nach sechs Stunden IFN β in den Zellen nachweisen. Das Expressionslevel stieg danach im Verlauf der Zeit bis zu einem Höchstwert nach 21 Stunden an, und nahm danach bis zum Endpunkt der Messung nach 24 Stunden wieder leicht ab.

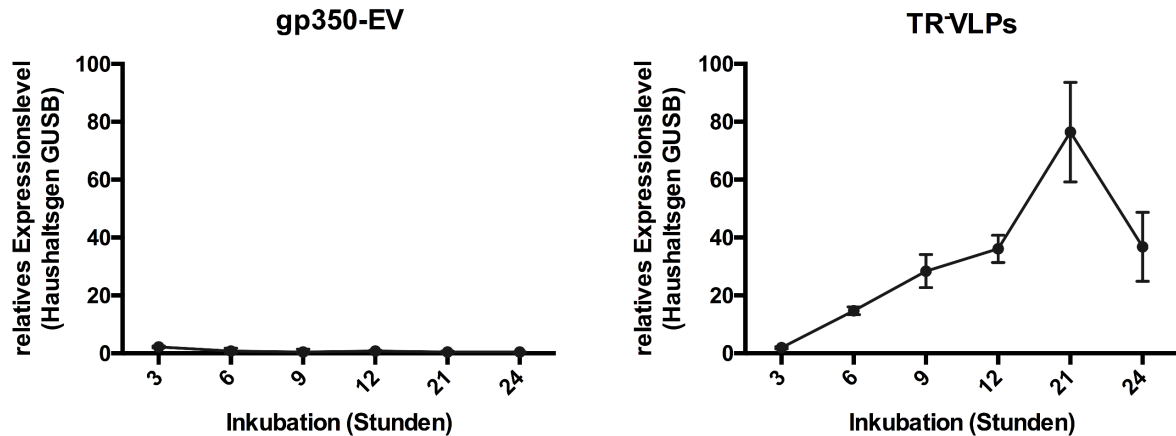


Abbildung 13: Verlauf der IFN β -Expression nach Inkubation mit gp350-EV und VLPs über 24 h

B-Zellen aus Adenoiden wurden über einen Zeitraum von 24 h mit gp350-EV oder TR-VLPs inkubiert und jeweils 10^6 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen, um RNA zu isolieren. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von IFN β untersucht. Als Haushaltsgen diente GUSB. Die Grafik zeigt ein repräsentatives Beispiel aus vier unabhängigen Experimenten.

5.3.2 Einfluss von VLPs auf antivirale Gene

Da B-Zellen auf eine Inkubation mit VLPs mit einer starken IFN β -Freisetzung reagieren, sollte der Fokus als nächstes auf den nachgeschalteten Signalwegen liegen. Ein durch IFN β reguliertes Gen, dessen Expression nach Inkubation mit VLPs ebenfalls deutlich hochreguliert wurde, ist APOBEC3A (siehe Tabelle 3). Dieses Enzym modifiziert virale mRNA durch RNA-Editierung und trägt damit zur Abwehr von DNA- und RNA-Viren bei. Außerdem induziert IFN β die Expression zahlreicher ISG und IFIT, deren Proteine ebenfalls an der Abwehr viraler Infektionen beteiligt sind. Vertreter beider Gruppen konnten im Transkriptom von B-Zellen nach Inkubation mit VLPs detektiert werden (vergleiche Tabelle 3).

Ein wichtiger Vertreter der ISG ist TRIM21. Dieser IgG-Rezeptor erkennt Antikörper, die Viren (oder VLPs) gebunden haben, sowie an RIG-I gebundene einzelsträngige RNA (ssRNA) und markiert diese Komplexe durch seine E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität für die Degradation im Proteasom. Zusätzlich ist TRIM21 ein negativer Regulator von IFN β , indem es durch den Abbau von IRF3 ein Überschießen der angeborenen Immunantwort verhindert.

Aus diesem Grund sollte der Effekt von VLPs auf die Expression von TRIM21 genauer untersucht werden. Dazu wurde erneut RNA aus B-Zellen isoliert, die zuvor für 24 Stunden mit gp350-EV oder TR-VLPs inkubiert worden waren, anschließend cDNA synthetisiert und mittels qRT-PCR auf die Expression von TRIM21 hin untersucht. Wie in

Abbildung 14 zu erkennen ist, hatte die Inkubation mit gp350-EV keinen Effekt auf die Expression von TRIM21. Bei einer Stimulation mit TR-VLPs dagegen, war eine Expression von TRIM21 bereits sechs Stunden nach Beginn der Inkubation nachweisbar und stieg innerhalb der nächsten 15 Stunden weiter an, um danach wieder abzunehmen. Dieser Verlauf ist mit dem der IFN β -Expression vergleichbar.

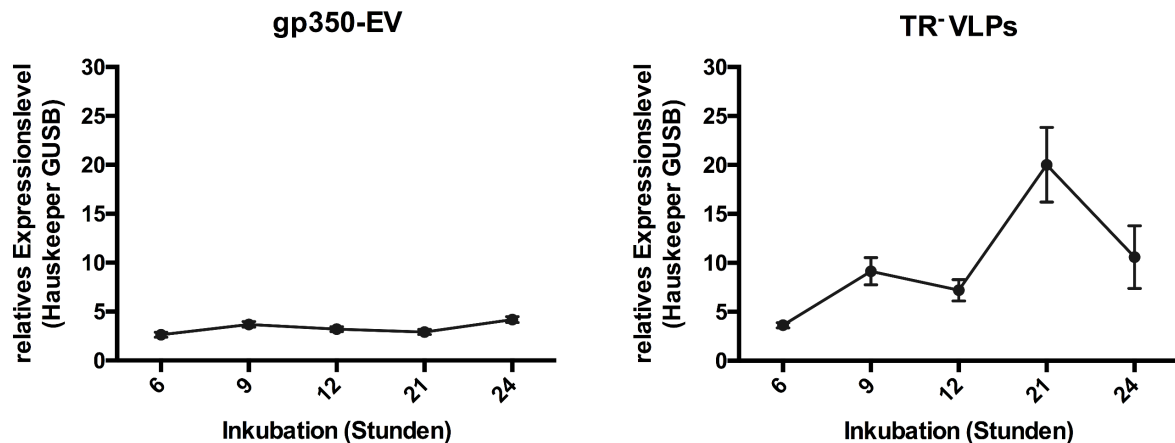


Abbildung 14: VLPs induzieren die Expression von TRIM21 in B-Zellen

Aus Adenoiden isolierte B-Zellen wurden mit gp350-EV oder TR-VLPs über 24 h inkubiert und regelmäßig jeweils 10^6 Zellen zur RNA-Isolation abgenommen. Über qRT-PCR wurde die Expression von TRIM21 analysiert. Die relative Expression wurde mithilfe des Haushaltsgens GUSB berechnet. n = 3.

5.3.3 VLPs induzieren die Expression von Akute-Phase-Proteinen (APP)

Eine weitere unspezifische Reaktion des Immunsystems auf Infektionen ist die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen (APP). Zusammen mit Interferonen sind Interleukin-1 β (IL-1 β) und der Tumornekrosefaktor α (TNF α) wichtige Vertreter dieser Gruppe. Im Folgenden lag daher der Fokus auf dem Einfluss der VLPs auf die Expression dieser Zytokine, wobei dieselben Proben wie im vorangegangenen Experiment eingesetzt wurden. In Abbildung 15 ist der Verlauf der Expression von IL-1 β und TNF α nach Inkubation mit TR-VLPs über 24 Stunden dargestellt. Die Inkubation mit gp350-EV führte in beiden Fällen zu keiner Expression (nicht dargestellt). Für IL-1 β konnte ein ähnlicher Expressionsverlauf detektiert werden wie für IFN β und TRIM21. Dabei stieg die Expression bereits kurz nach Beginn der Inkubation an und erreichte nach 21 Stunden ein Maximum, woraufhin sie anschließend wieder abnahm. Eine Zunahme der Expression von TNF α durch Inkubation mit TR-VLPs konnte dagegen zu keinem Zeitpunkt gemessen werden.

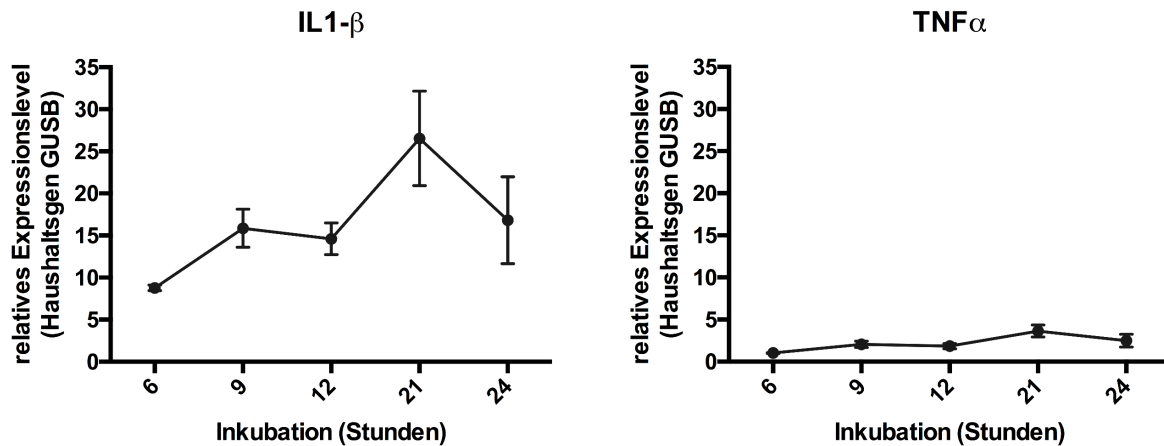


Abbildung 15: VLPs induzieren die Expression von Akute-Phase-Proteinen (APP)

B-Zellen aus Adenoiden wurden mit gp350-EV oder TR-VLPs über einen Zeitraum von 24 h inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 10^6 Zellen zur RNA-Isolation abgenommen. Über qRT-PCR wurde die Expression von IL-1 β und TNF α untersucht. Die relative Expression wurde über das Haushaltsgen GUSB ermittelt. n = 3.

5.4 Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch VLPs

Damit VLPs als EBV-Impfstoff fungieren können, genügt es nicht, nur eine unspezifische Immunreaktion auszulösen. Sie sollten vielmehr wie ein infektiöses Virus auch das adaptive Immunsystem aktivieren. Nur so kann ein langfristiger Schutz des Geimpften erreicht werden.

5.4.1 VLPs aktivieren EBV-spezifische CD4⁺-T-Zellen

Über Endozytose aufgenommene Peptide von Pathogenen werden auf HLA Klasse-II-Molekülen präsentiert. Diese werden von spezifischen CD4⁺-T-Zellen erkannt, was unter anderem die Freisetzung von Interferon γ (IFN γ) auslöst. Im nächsten Experiment sollte die Fähigkeit von VLPs, spezifische CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren, getestet werden. Dafür wurde ein etablierter CD4⁺-T-Zellklon, der eine HLA-Restriktion für das virale Protein BFRF3 besitzt, verwendet. Als APC dienten autologe Mini-LCLs (mLCLs). Das sind lymphoblastoide B-Zelllinien, die mit einem rekombinanten Mini-EBV transformiert und dadurch zu einer immortalisierten Zelllinie wurden (Kempkes et al. 1995). Dem Mini-EBV Genom fehlen alle lytischen Proteine, sodass die infizierten Zellen keine Viruspartikel freisetzen können. Da sie auch kein BFRF3 enthalten, wird außerdem eine Stimulation der T-Zellen durch die APCs alleine ebenfalls ausgeschlossen (Moosmann et al. 2002). Über Nacht wurden 5×10^4 mLCLs, mit einem zum T-Zellklon

autologen HLA-Typ, mit gp350-EV oder TR-VLPs inkubiert (in Triplikaten). Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen, um ungebundene Vesikel zu entfernen, und mit ebenfalls 5×10^4 BFRF3-spezifischen $CD4^+$ -T-Zellen gemischt. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht wurde am nächsten Tag der Überstand abgenommen und mittels ELISA auf die Bildung von $IFN\gamma$ hin untersucht. Als Positivkontrolle dienten mLCLs, die mit $1,5 \mu M$ rekombinantem BFRF3-Protein inkubiert wurden, als Negativkontrolle unbehandelte mLCLs. Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, waren die $CD4^+$ -T-Zellen in der Lage, sowohl das rekombinante Protein, als auch die mit TR-VLPs behandelten mLCLs zu erkennen und infolgedessen $IFN\gamma$ auszuschütten. Eine Inkubation von APCs mit T-Zellen alleine induzierte, ebenso wie die Inkubation mit gp350-EV, keine $IFN\gamma$ -Produktion.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass TR-VLPs nicht nur eine unspezifische Immunantwort induzieren, sondern auch in der Lage sind, spezifische $CD4^+$ -T-Zellantworten auszulösen.

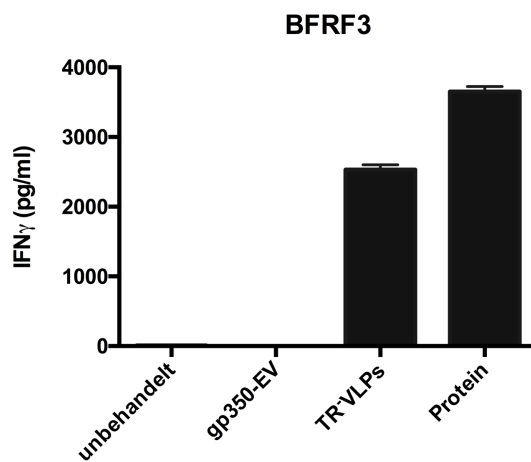


Abbildung 16: TR-VLPs aktivieren spezifische $CD4^+$ -T-Zellen

Als APCs wurden 5×10^4 mLCLs mit gp350-EV, TR-VLPs oder rekombinantem BFRF3 ($1,5 \mu M$) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschschrift und das Mischen mit 5×10^4 $CD4^+$ -T-Zellen, die spezifisch das virale Protein BFRF3 erkennen und den passenden HLA-Typ haben. Nach einer erneuten Inkubation wurde am nächsten Tag der Überstand abgenommen und mittels $IFN\gamma$ -ELISA quantifiziert. $n = 3$.

Teil II:

Einfluss viraler miRNAs auf die immuninduzierende Aktivität von VLPs

5.5 Herstellung von neuen VLP-Produzenten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TR-VLPs Abwehrreaktionen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems induzieren können, sollte nun in diesem Teil der Arbeit der Fokus auf dem Beitrag der viralen miRNAs in VLPs an dieser Induktion liegen.

In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass virale miRNAs des EBV die antivirale CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellantwort hemmen (Tagawa et al. 2016; Albanese et al. 2016). Dieses Erkenntnis ist auch für VLPs als potenzielles Vakzin wichtig, da es die adaptive Immunantwort in den geimpften Personen induzieren muss. Aus diesem Grund sollte in diesem Projekt eine VLP-Variante generiert werden, welcher die 44 viralen miRNAs vollständig fehlen (Barth, Meister, and Grässer 2011).

Grundlegende Arbeiten zur Generierung neuer EBV-Varianten, so genannter ‚Maxi-EBVs‘, wurden von Hammerschmidt und Kollegen durchgeführt. Maxi-EBVs basieren auf einem *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) von *E. coli*, in das ein rekombinantes EBV-Genom (p2089) hinein kloniert wurde. Durch stabile Transfektion in HEK293-Zellen können diese nach Induktion des lytischen Zyklus infektiöse Viruspartikel bilden (vergleiche 4.3.3). Durch die Möglichkeit, Maxi-EBVs gezielt genetisch zu manipulieren, können leicht weitere EBV-Varianten hergestellt werden. Um den Effekt der miRNAs in VLPs auf die Immunantwort direkt untersuchen zu können, wurde ein neues Maxi-EBV-Paar konstruiert, das sich nur durch das Vorhandensein, beziehungsweise die Abwesenheit aller 44 viralen miRNAs unterscheidet (siehe Abbildung 17). Eine Deletion der *terminal Repeats* (TRs) verhindert ein Verpacken des Virusgenoms in neu gebildete Vesikel, sodass nur genomfreie VLPs produziert werden.

5.5.1 Klonierung neuer Maxi-EBVs mit und ohne miRNAs und Etablierung von stabilen VLP-Produzentenzelllinien

Die bisher in dieser Arbeit verwendeten Viren und VLPs sind das rekombinante EBV 2089 (p2089) und die rekombinanten TR-VLPs (p2114). Deren Genom basiert auf dem EBV-Laborstamm B95.8, der aufgrund einer Deletion nur 13 miRNAs enthält (Kanda et al. 2015). Daher diente eine neue Generation an Maxi-EBVs als Ausgangsplasmide, denen die fehlenden miRNAs wieder inseriert (p6008.5, EBV+miRNAs), oder komplett deletiert wurden (p6338.10, EBV Δ miRNAs).

Um aus diesen Maxi-EBVs VLP-Produzenten zu generieren, wurden in einem ersten Schritt die TRs über homologe Rekombination entfernt und durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt, die aus dem Klonierungsvektor p2068, mit 50bp-langen Flanken auf jeder Seite, ausgeschnitten wurde (Abbildung 17A). Abbildung 17B zeigt die neu entstandenen Maxi-EBVs für beide VLP-Produzentenzelllinien. Das Konstrukt p6354 enthält das komplette Set an 44 viralen miRNAs, während p6355 alle miRNAs fehlen. Eine erfolgreiche homologe Rekombination und die Intaktheit des gesamten BAC-Rückgrates wurde durch eine Spaltung mit drei Restriktionsenzymen (BamHI, XhoI und PstI) und dem daraus resultierenden charakteristischen Bandenmuster kontrolliert (Abbildung 17C). Die beiden neu konstruierten VLP-Mutanten wurden danach stabil in HEK293-Zellen transfiziert und mit Puromycin (1 μ g/ml) Einzelklone selektiert.

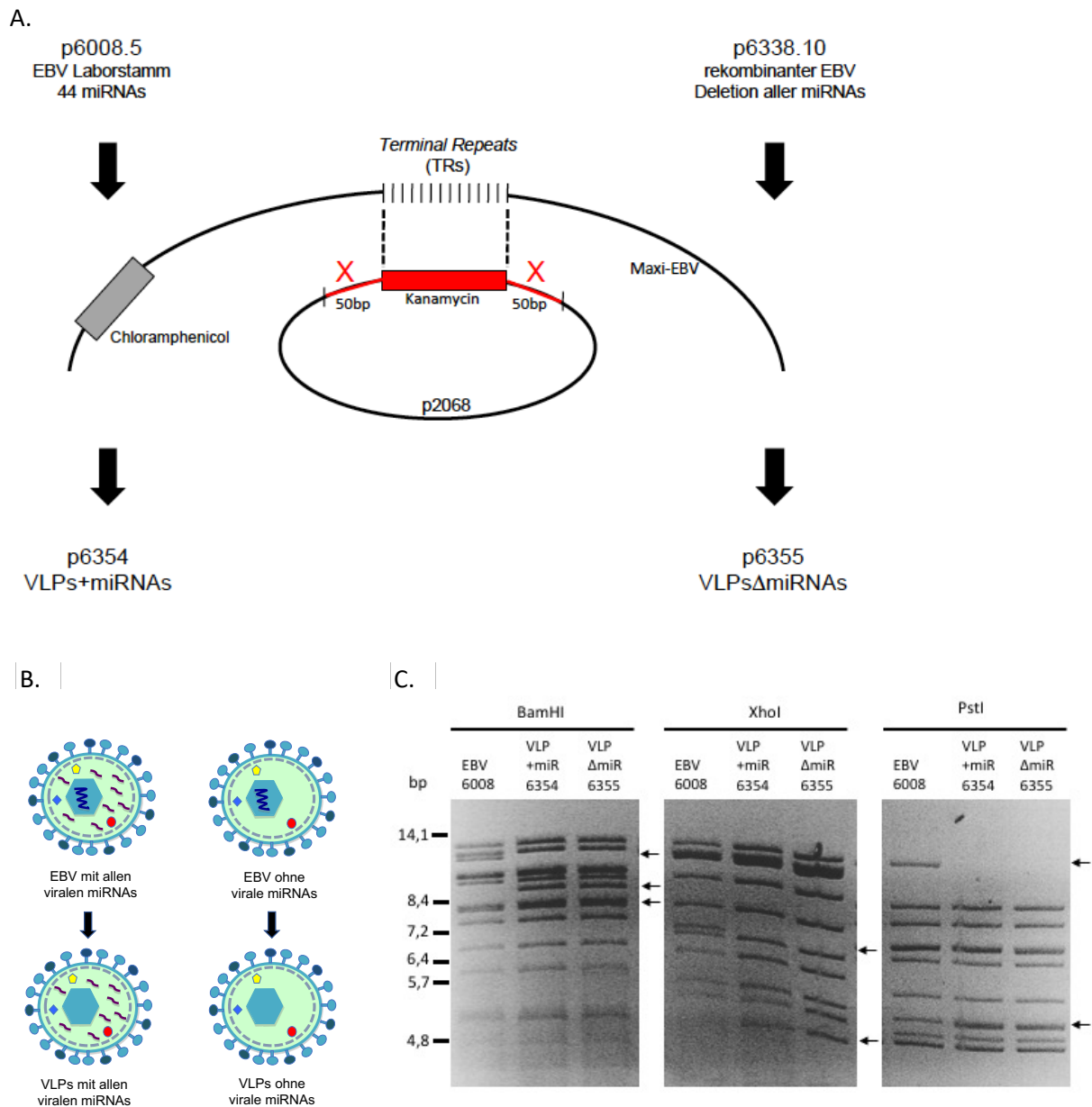


Abbildung 17: Konstruktion neuer VLP-Varianten mit und ohne miRNAs

A. Die neuen VLP-Produzenten wurden auf Basis der EBV-Konstrukte p6008.5 (enthält alle 44 viralen miRNAs) und p6338.10 (trägt eine Deletion für alle viralen miRNAs) hergestellt. p6008.5 ist eine rekombinante Variante des p2089, basierend auf dem B95.8 EBV-Genom, inklusive der fehlenden miRNAs. In beiden Konstrukten wurden über homologe Rekombination die *terminal Repeats* (TRs) deletiert und durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt. Dadurch entstanden zwei neue Konstrukte, die nicht mehr in der Lage sind, das virale Genom zu verpacken und stattdessen für VLPs mit (p6354, VLPs+miRNAs) und ohne miRNAs (p6355, VLPsΔmiRNAs) codieren (B). C. Eine erfolgreiche homologe Rekombination, sowie die Intaktheit des gesamten BAC wurde durch einen Verdau mit drei Restriktionsenzymen (BamHi, XhoI und PstI) im Vergleich mit dem Maxi-EBV p6008 kontrolliert. Spezifische neue oder deletierte Banden sind mit einem Pfeil markiert. Das Muster beider VLP-Varianten ist identisch, da eine Deletion der miRNAs aufgrund der geringen Basenzahl in diesem Gel nicht sichtbar ist. Marker: λ DNA-Marker, BstEII verdaut.

5.5.2 Qualitätskontrolle der VLP-Präparationen mit Elijah-Zellen

Für die Qualitätskontrolle der ausgewählten Produzentenklone wurden VLP-Zellkulturüberstände am dritten Tag nach Induktion des lytischen Zyklus abgenommen und mithilfe von Elijah-Zellen titriert (vergleiche 4.1.4 und 4.2.3). Die VLPs binden über das auf ihrer Oberfläche exprimierte Protein gp350 an die Elijah-Zellen. Diese Bindung lässt sich mithilfe eines fluoreszenzmarkierten anti-gp350-Antikörper im Durchflusszytometer detektieren. Der jeweils stabilste Klon beider VLP-Varianten wurde im Folgenden zur Produktion von VLPs eingesetzt. Abbildung 18A zeigt eine Titration mit TR-VLPs, die als Kontrolle für das neue VLP-Paar dienten. Je mehr VLPs zugegeben wurden, desto mehr Vesikel banden an die Elijah-Zellen. Sobald alle Bindestellen der Elijah-Zellen mit Vesikeln besetzt waren, beziehungsweise durch deren Bindung die übrigen CD21-Rezeptoren nicht mehr zugänglich waren, nahm die Fluoreszenz nicht mehr weiter zu. Wie in Abbildung 18B zu sehen ist, verhielt sich das neue VLP-Paar genauso wie die TR-VLPs. Dies bestätigte sich auch nach Bestimmung der VLP-Konzentration mittels ‚Nanopartikel-Tracking Analyse‘ (NTA), welche die Gesamtheit aller Partikel in Lösung erfasst, unabhängig von deren Zusammensetzung und Oberflächenmarkern. In Abbildung 18C wurde eine Titration der drei VLP-Präparationen mit Elijah-Zellen gegen die Zahl der Partikel in der jeweiligen Probe gegenübergestellt. Es ist klar zu erkennen, dass das gp350-Signal aller drei VLP-Varianten im Durchflusszytometer direkt mit der Zahl der Partikel in der jeweiligen Probe zusammenhängt.

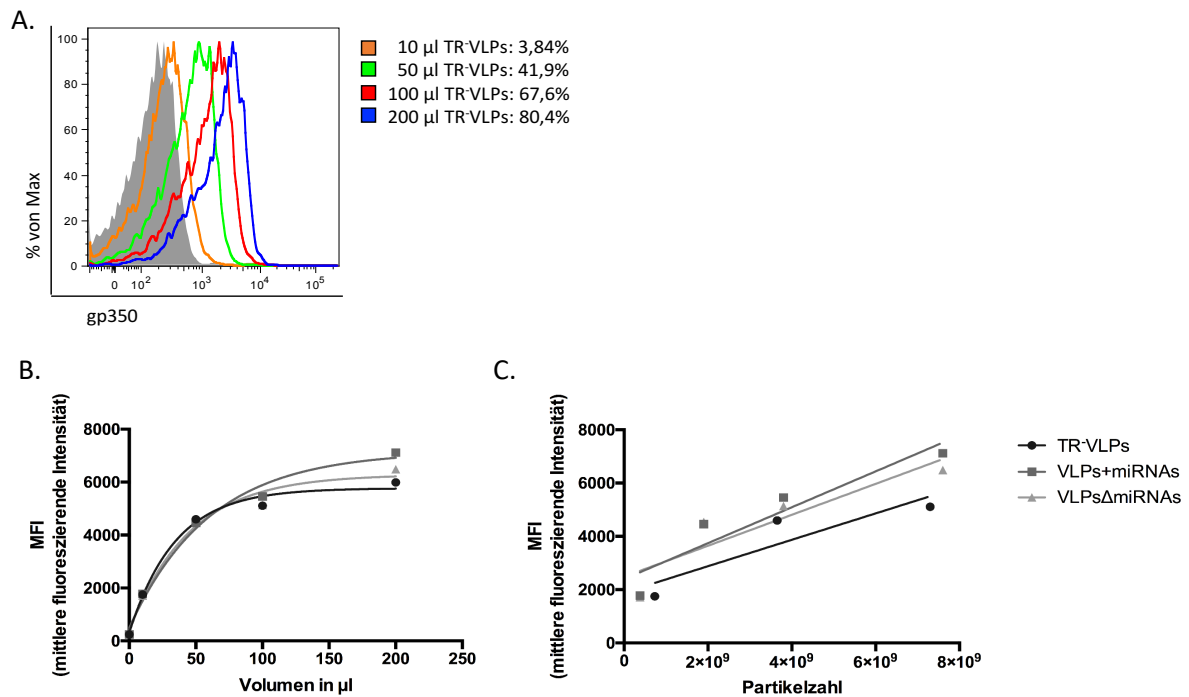


Abbildung 18: Qualitätskontrolle von VLP-Präparationen mittels Elijah-Zellen und NTA

Je 2×10^5 Elijah-Zellen wurden mit unterschiedlichen Volumina an konzentrierten VLP-Varianten für 3 h bei 4°C inkubiert, anschließend mit einem Alexa647-direktmarkiertem anti-gp350-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer detektiert. A. Titration von Elijah-Zellen mit TR-VLPs. B. Titration aller VLP-Präparationen mit Elijah-Zellen. C. Aus den mittels NTA bestimmten VLP-Konzentrationen wurde die Partikelzahl im jeweils eingesetzten Volumen berechnet und gegen die MFI aufgetragen.

5.5.3 Nachweis von viralen miRNAs in VLP-Präparationen

Der Nachweis viraler miRNAs in den neu konstruierten VLPs mit und ohne miRNAs erfolgte per qRT-PCR. Dazu wurde in beiden Produzentenzelllinien durch Transfektion eines BZLF1-Expressionsplasmids die VLP-Produktion induziert und die Überstände nach drei Tagen abgenommen. Die VLPs wurden über Ultrazentrifugation pelletiert und daraus die miRNAs isoliert. Als Kontrolle einer erfolgreichen miRNA-Aufreinigung, wurde den in Quiazol resuspendierten Proben eine synthetische miRNA des *C. elegans* (cel-miR-39) hinzugefügt, die später in allen Proben nachgewiesen werden konnte. Als Positivkontrollen für die Anwesenheit von miRNAs dienten EVs von 2089-LCLs und 2089-Virionen. Mit spezifischen Primern erfolgte die Detektion von drei viralen miRNAs (miR-BART-1, miR-BART-3 und miR-BHRF1-2), sowie der humanen miR-16 (hsa-miR-16) (Abbildung 19). Alle drei viralen miRNAs ließen sich in 2089 LCL-EV, den 2089-Virionen und den VLPs+miRNAs nachweisen, in miRNA-negativen VLPs dagegen nicht. Die Detektion von humaner miRNA zeigte allerdings, dass die VLPsΔmiRNAs zelluläre miRNAs sehr wohl verpacken. Damit konnte bestätigt werden, dass diese VLP-Variante tatsächlich frei von viralen miRNAs war.

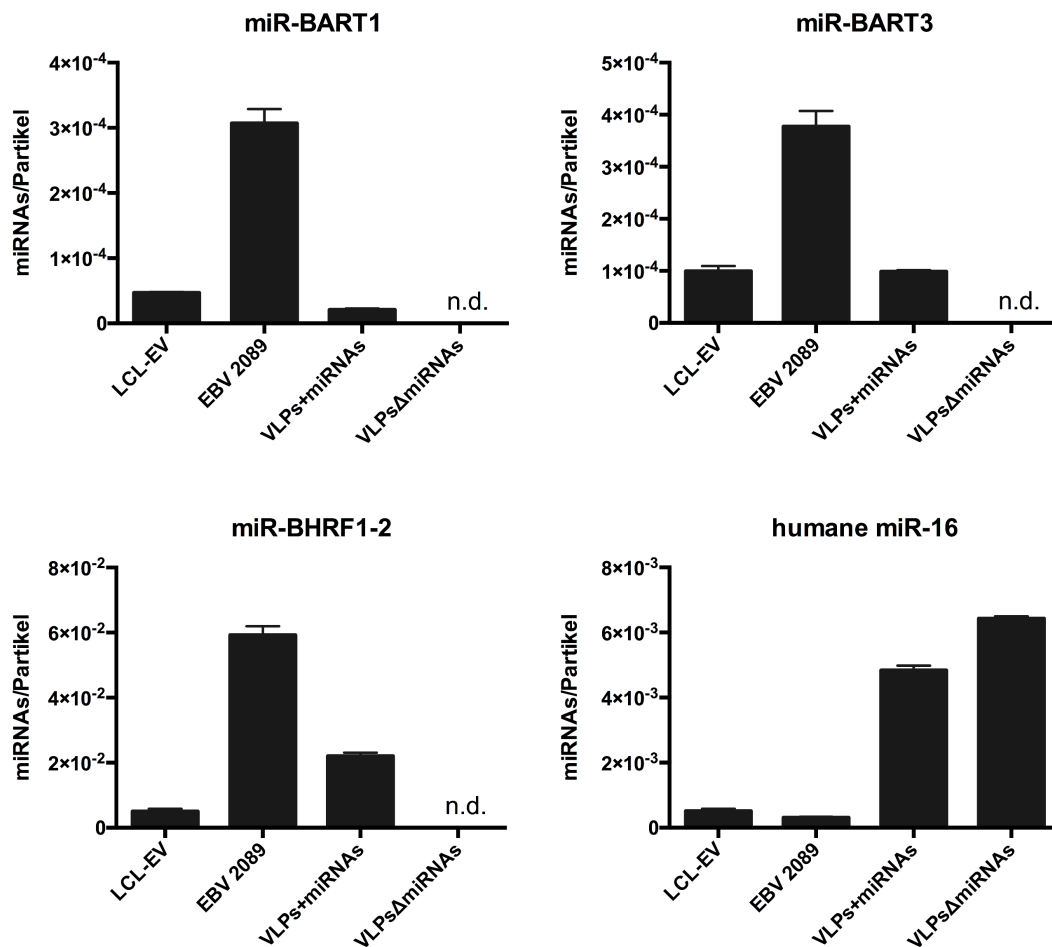


Abbildung 19: Nachweis viraler miRNAs in Vesikelpräparationen

Die Extraktion von miRNAs erfolgte direkt aus den konzentrierten VLP-Präparationen (VLPs+miRNAs und VLPsΔmiRNAs). LCL-EV und 2089-Virionen dienen als Positivkontrolle für die Anwesenheit von viralen miRNAs (miR-BART1, miR-BART3 und miR-BHRF1-2). Der Nachweis humaner miRNA (miR-16) zeigte, dass die Vesikel grundsätzlich zelluläre miRNAs enthalten. n = 3.

5.5.4 Phänotypische Untersuchung der VLP-Mutanten mit und ohne miRNAs

Um die Funktionalität der miRNAs in den VLPs zu testen, sollte als erstes ihr Einfluss auf die angeborene Immunantwort untersucht werden. Dazu wurden B-Zellen aus Adenoiden isoliert und mit VLPs mit und ohne miRNAs für 24 Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 10⁶ Zellen entnommen, um daraus RNA zu isolieren. Die Analyse der Expression von IFNβ erfolgte mittels qRT-PCR. Abbildung 20 zeigt, dass beide VLP-Mutanten die Expression von IFNβ induzierten, jedoch war die Induktion in mit VLPsΔmiRNAs inkubierten B-Zellen deutlich stärker.

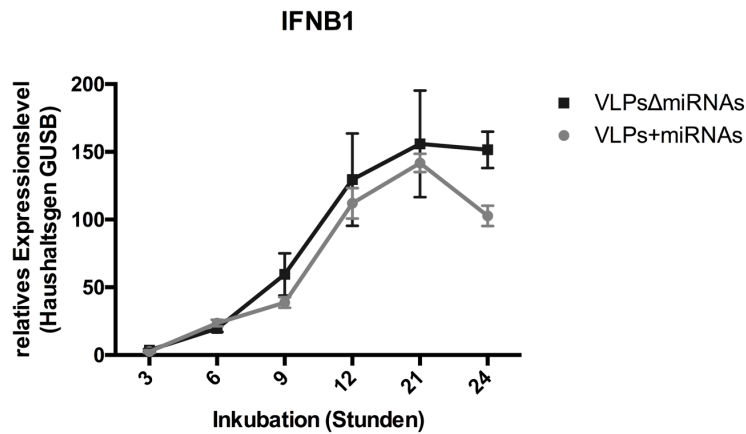


Abbildung 20: Induktion der IFN β -Expression durch VLPs mit und ohne miRNAs

B-Zellen aus Adenoiden wurden mit VLPs mit und ohne miRNAs (5.000 VLPs/Zelle) für 24 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 10^6 Zellen für eine RNA-Extraktion abgenommen. Über qRT-PCR wurde die Expression von IFN β analysiert. Repräsentatives Beispiel aus drei separat durchgeführten Experimenten.

5.5.5 Einfluss der VLP-Mutanten auf die Expression immunmodulatorischer Gene und Akute-Phase-Proteine (APP)

Als nächstes sollte der Einfluss viraler miRNAs auf die Expression antiviraler Gene und APPs betrachtet werden. Dazu wurde die aus dem vorherigen Experiment gewonnene mRNA auf die Expression der immunmodulatorischen Gene TRIM21 und Tristetraprolin (TTP), sowie der Akute-Phase-Proteine TNF α und IL1- β hin untersucht. Dabei fiel auf, dass nach Inkubation mit VLPs+miRNAs die Expression aller untersuchten Zielgene zu keinem Zeitpunkt anstieg (Abbildung 21). Dies stand im Gegensatz zur Inkubation mit TR-VLPs, welche eine Expression von TRIM21 und IL1- β in B-Zellen induzierten (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Wurden B-Zellen allerdings mit VLPs inkubiert, denen alle viralen miRNAs fehlen (VLPs Δ miRNAs), war eine Zunahme der Expression aller vier untersuchten Zielgene nach 12 Stunden festzustellen, die auch nach 21 Stunden noch weiter anstieg. Für TRIM21 war durch Inkubation mit VLPs Δ miRNAs nach 21 Stunden die relative Expression doppelt so hoch wie nach der Inkubation mit TR-VLPs, die noch 13 miRNAs enthalten. Die Expression von IL-1 β lag nach Inkubation mit VLPs Δ miRNAs auf demselben Level wie nach TR-VLP-Inkubation, stieg jedoch nach 21 Stunden immer noch weiter an. Im Gegensatz zu den beiden VLP-Varianten, welche miRNAs enthalten (TR-VLPs und VLPs+miRNAs), führte die Inkubation mit der miRNA-Deletionsmutanten (VLPs Δ miRNAs) zu einer Expression von TNF α . Aus diesem Grund wurden die in diesem Experiment eingesetzten B-Zellen zusätzlich auf die Expression von TTP hin getestet. TTP codiert für ein Zinkfinger- RNA-bindendes Protein (RBP), welches an AU-reiche Elemente

in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von mRNA-Transkripten bindet und dadurch zur Instabilität der RNAs führt. Des Weiteren spielt es eine Rolle bei der antiinflammatorischen Antwort, indem es $\text{TNF}\alpha$ supprimiert und somit als negativer Rückkopplungsmechanismus ein Überschießen der humoralen Immunreaktion verhindert (Newman, McHugh, and Turner 2016). Die Inkubation mit VLPs Δ miRNAs induzierte die Expression von TTP, während VLPs+miRNAs darauf keinen Effekt hatten.

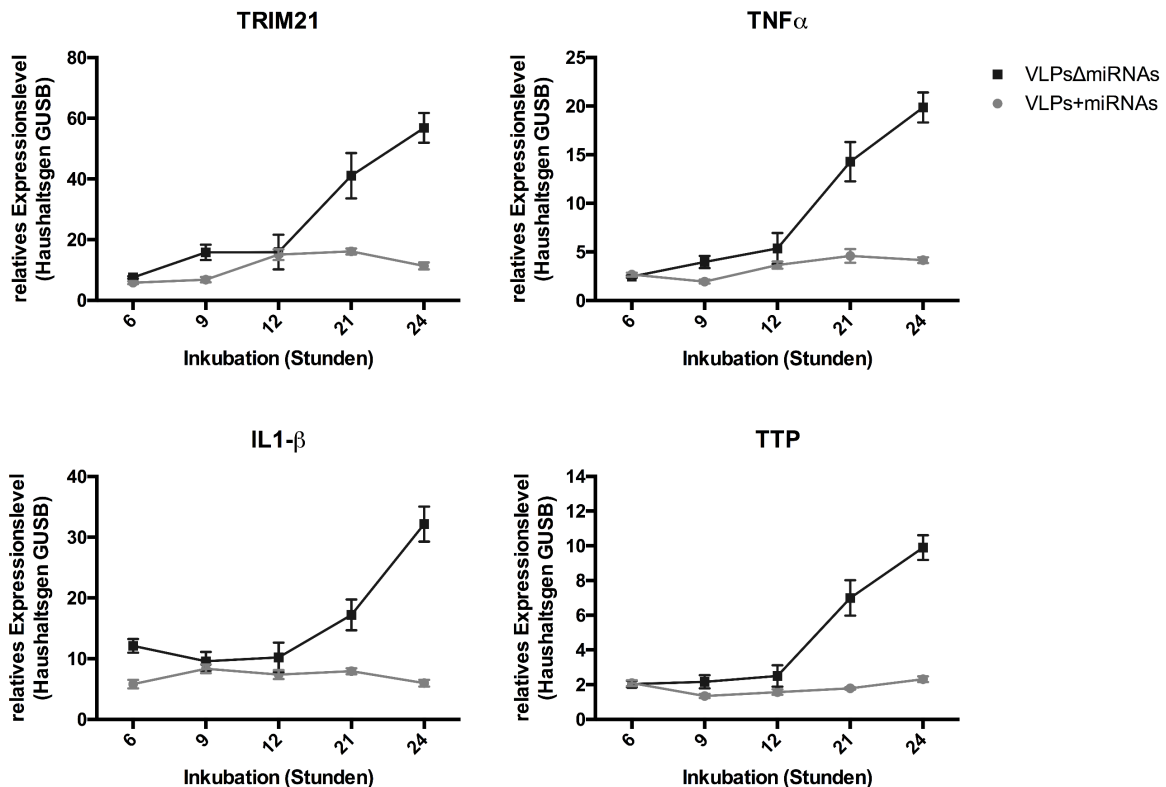


Abbildung 21: Einfluss der VLP-Mutanten (VLPs+miRNAs und VLPs Δ miRNAs) auf die Expression immunmodulatorischer Gene und Akute-Phase-Proteine (APPs)

B-Zellen aus Adenoiden wurden mit VLPs+miRNAs und VLPs Δ miRNAs für 24 h inkubiert und jeweils 10^6 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen, um die Expression der immunmodulatorischen Gene TRIM21 und TTP und der APP TNF α und IL1- β zu untersuchen. Repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Experimenten.

5.5.6 Einfluss viraler miRNAs auf die Stimulation EBV-spezifischer CD4⁺-T-Zellen

Mit dem folgenden Experiment sollte gezeigt werden, dass die neu konstruierten VLPs auch in der Lage sind, EBV-spezifische CD4⁺-T-Zellantworten auszulösen. Getestet wurden T-Zellklone, die spezifisch für das virale gp350, das Kapsidprotein BcLF1 oder die beiden Tegumentproteine BSRF1 und BNRF1 sind. Jeweils 5×10^4 mLCLs dienten als APC und wurden über Nacht mit den drei unterschiedlichen VLP-Mutanten (5.000 VLPs/Zelle) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Virusüberstand von EBV 2089 (MOI = 0,1)

verwendet. Am nächsten Tag wurden die mLCLs einmal gewaschen, um ungebundene Partikel zu entfernen und anschließend mit der gleichen Anzahl an spezifischen autologen T-Zellen gemischt. Nach einer erneuten Inkubation über Nacht wurde die IFN γ -Konzentration in den Überständen quantifiziert. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, induzierten alle VLP-Varianten eine Sekretion von IFN γ durch die T-Zellen. Die Menge an sekretiertem IFN γ war nach Kontakt mit TR-VLPs, VLPs+miRNAs und VLPs Δ miRNAs in gp350- und BSRF1-spezifischen T-Zellen vergleichbar. Dagegen führte die Inkubation mit VLPs+miRNAs in BcLF1-spezifischen T-Zellen zu einer verminderten Sekretion von IFN γ , während BSRF1-spezifische T-Zellen nach Inkubation mit der miRNA-Deletionsmutanten deutlich mehr freisetzen. Unbehandelte Zellen führten bei allen T-Zellen nur zu einer geringen, beziehungsweise keiner Sekretion von IFN γ .

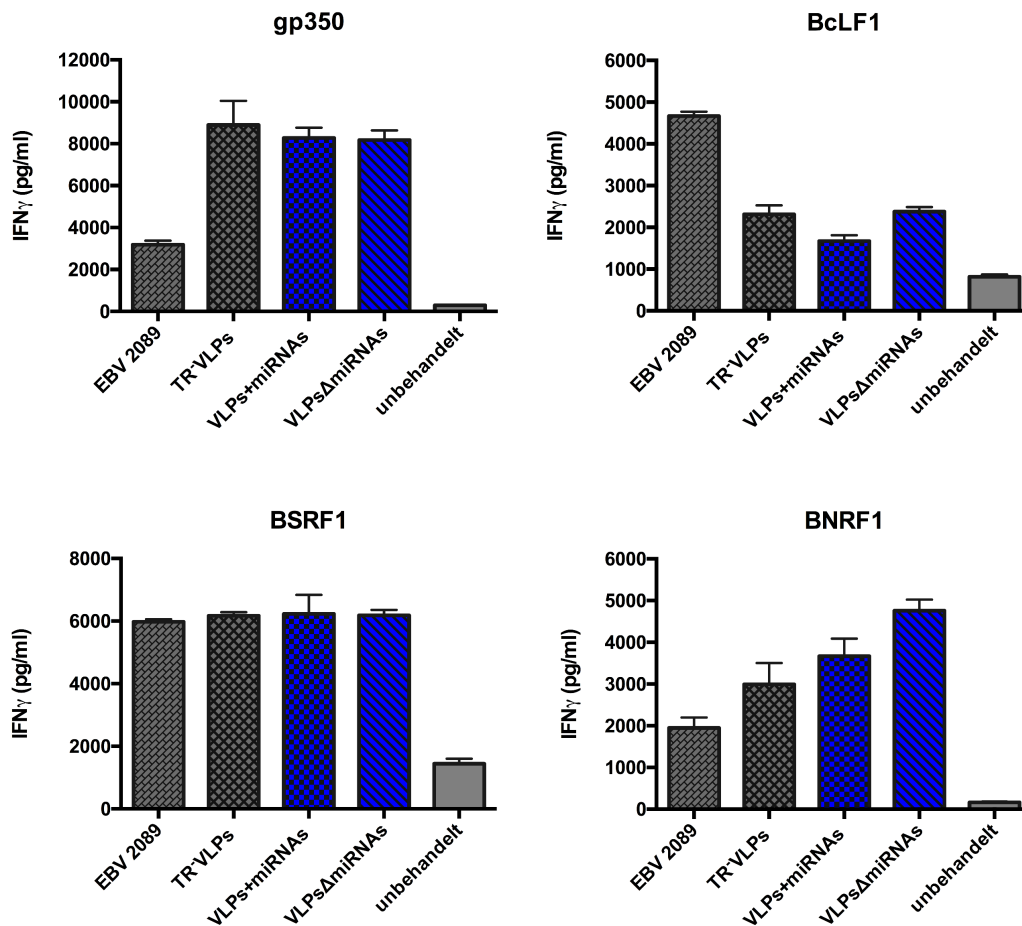


Abbildung 22: Induktion EBV-spezifischer CD4⁺-T-Zellantworten durch VLP-Mutanten

Über Nacht wurden 2×10^5 mLCLs mit VLP-Mutanten (TR-VLPs, VLPs+miRNAs und VLPs Δ miRNAs, 5.000 VLPs/Zelle) und dem als Positivkontrolle dienenden EBV 2089 (MOI = 0,1) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen, 1:1 mit spezifischen autologen CD4⁺-T-Zellkonen (gp350 = virales Glycoprotein, BcLF1 =virales Kapsidprotein, BSRF1 und BSRF1 = virale Tegumentproteine) gemischt und erneut über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Freisetzung von IFN γ in den Zellkulturüberstand mittels ELISA quantifiziert. Repräsentatives Beispiel aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

6 DISKUSSION

Die Tatsache, dass die Primärinfektion mit EBV bei den meisten Menschen während der frühen Kindheit überwiegend asymptomatisch und dadurch unbemerkt verläuft, lässt die Entwicklung eines Vakzins auf den ersten Blick nicht von hoher Priorität erscheinen. Eine nähere Auseinandersetzung mit der Pathologie des Virus führt aber schnell zu dem Schluss, dass ein Schutz gegen EBV in Form eines Impfstoffes dringend benötigt wird. Immer häufiger findet die Primärinfektion mit EBV heutzutage im Jugend- beziehungsweise frühen Erwachsenenalter statt, was oft zur Manifestation des Krankheitsbildes einer IM führt und die Patienten wochen- bis monatelang beeinträchtigt. Außerdem gibt es immer mehr Transplantationspatienten, die EBV-negativ sind. Diese können durch die Immunsuppression eine Infektion mit EBV, zum Beispiel durch das Spenderorgan, immunologisch nicht kontrollieren und haben ein hohes Risiko, PTLDs auszubilden.

Trotz verschiedener Ansätze, einen Impfstoff gegen EBV zu entwickeln, hat es bis zum heutigen Tag keiner bis zur Zulassung geschafft. Gründe dafür sind, dass die vielversprechenden Ergebnisse aus Tiermodellen nicht direkt auf den Menschen übertragbar waren und zum Beispiel die Ausbildung von EBV-assoziierten Erkrankungen in Patienten nur marginal reduziert werden konnte. Erfolgsversprechende Experimente mit dem Vaccinia-Virus als Impfvektor wurden nicht weiterverfolgt, da es aufgrund seiner möglichen Nebenwirkungen den Sicherheitsstandards nicht entsprach (Cohen 2015; Münz 2015). Ein erfolgreiches Vakzin muss angeborene und adaptive Immunantworten induzieren können, sodass zwar nicht eine sterile Immunität erreicht und damit die Infektion mit weiteren EBV-Stämmen verhindert, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ausbildung einer IM bei Gesunden, beziehungsweise PTLDs bei immunsupprimierten Patienten, vermieden werden kann. Ein vielversprechender Ansatz für ein EBV-Vakzin ist die Verwendung von VLPs, die in Aufbau und Zusammensetzung zu großen Teilen dem „echten“ Virus entsprechen und sich zudem leicht genetisch manipulieren lassen.

Sie waren der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit mit dem Ziel, VLPs im Hinblick auf eine Verwendung als EBV-Impfstoff molekular und immunologisch zu charakterisieren.

6.1 Molekulare und immunologische Eigenschaften EBV-basierter VLPs

Von EBV und anderen Herpesviren ist bekannt, dass sie zusammen mit ihrem DNA-Genom auch virale RNAs in Virionen verpacken und auf Zielzellen übertragen, welche dort direkt funktionell aktiv sind (Sciortino et al. 2001; Bresnahan and Shenk 2000; Jochum et al. 2012). Auch für rekombinante VLPs, die auf dem Genom von EBV basieren, wurde gezeigt, dass sie virale RNAs verpacken und übertragen (Jochum et al. 2012). Da zelluläre Abwehrmechanismen die Degradierung viraler RNA-Transkripte anstreben und für EBV, im Gegensatz zu RNA-Viren, keine speziellen Strategien bekannt sind, um diese Transkripte vor einem raschen Abbau zu schützen, war die Bedeutung dieser verpackten RNAs bislang unklar (Dickson and Wilusz 2011; Abernathy and Glaunsinger 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass transferierte virale RNAs in B-Zellen jedoch über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden stabil sind (5.1.1). Dieses Ergebnis erklärt, weshalb VLPs auch EBV-spezifische CD8⁺-T-Zellantworten induzieren, da die transferierten RNAs wohl translatiert und Epitope der daraus entstehenden Proteine über HLA Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Es bleibt aber unverstanden, weshalb die transferierten RNAs eine so hohe Stabilität aufweisen. Indem sie zytotoxische T-Zellen induzieren können, sind sie aber eine wichtige Komponente für VLPs als möglicher effizienter EBV-Impfstoff.

Die bisherigen Untersuchungen verpackter viraler RNAs aus Viruspartikeln und VLPs wurden mittels qRT-PCR unter Auswahl bestimmter Transkripte durchgeführt. Dadurch war es zwar möglich, einen Eindruck über die Variabilität der verpackten RNAs zu bekommen, ein Gesamtbild der RNAs und deren Anzahl lieferten sie allerdings nicht. Durch die tiefe RNA-Sequenzierung wurden hier erstmalig alle übertragenen viralen Transkripte in Zielzellen identifiziert und ihr Einfluss auf die zelluläre Genexpression analysiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die mittels VLPs transferierten RNA-Transkripte in ihrer Zusammensetzung denen in Virionen ähneln, da auch hier RNAs aus allen Phasen des EBV-Zyklus (frühe Gene, späte Gene, latente Gene) enthalten sind (5.2.2.1). Sie stützen die Theorie, dass verpackte virale RNAs speziell in der frühen Phase der Infektion von B-Zellen eine wichtige Rolle für die Biologie von EBV spielen. Indem schon kurz nach Eindringen in die Zielzelle funktionale mRNA-Transkripte vorliegen, können diese sofort

translatiert werden, ohne von einem Transport des viralen Genoms in den Zellkern und der erst anschließend möglichen *de novo*-Transkription abhängig zu sein. Das bringt dem Virus einen zeitlichen Vorteil bei der Etablierung der Infektion und könnte ein Grund für die erfolgreiche Verbreitung von EBV sein.

Von besonderem Interesse war jedoch die Tatsache, dass viele der am häufigsten gefundenen mRNAs für immundominante EBV-Proteine kodierten (Hinderer et al. 1999; Middeldorp and Meloen 1988). Als Immundominanz wird der Umstand bezeichnet, dass während einer adaptiven Immunantwort bestimmte Epitope eines Antigens bevorzugt von T-Zellen erkannt werden und dadurch stärkere Immunantworten auslösen als andere (Reich 2008). Zu den immundominanten Proteinen von EBV gehören virale Kapsidantigene (VCA), Bestandteile des Teguments, sowie Glykoproteine. Sie induzieren zuverlässig IgM-, IgG- und IgA-Antworten und sind dadurch auch wichtige diagnostische Marker. Ebenfalls immundominant sind sowohl IEA-Marker, Proteine des EA(D)-Komplexes, als auch EBNA1 (Münz 2015).

Die ähnliche Zusammensetzung der verpackten viralen RNAs in VLPs und Virionen, sowie der Übertrag einer großen Zahl für immundominante Proteine kodierender Transkripte auf Zielzellen sind gute Voraussetzungen für VLPs, als potenzielles EBV-Vakzin eingesetzt zu werden. Dadurch besitzen sie einerseits die Grundlage, eine mit dem Virus vergleichbare umfangreiche angeborene Immunantwort zu induzieren, andererseits sind polyepitope Konstrukte auch effizienter bei der Vermittlung von T-Zellantworten (Smith et al. 2006).

6.2 VLPs induzieren antivirale angeborene Immunantworten

Die Aktivierung von zellulären Immunantworten ist eine Bedingung, die VLPs erfüllen müssen, um als EBV-Vakzin eingesetzt werden zu können. Aufschluss darüber brachte die Analyse des Genexpressionsprofils von B-Zellen nach Inkubation mit gp350-EV oder VLPs. Dabei zeigten sich klare Unterschiede: gp350-positive EV wurden zwar von B-Zellen erkannt, was durch die differentiell regulierte Expression vieler Gene deutlich wurde, führten aber nicht zur Aktivierung von an der Immunerkennung beteiligten Signalwegen. Dagegen induzierten VLPs die differenzielle Regulation zahlreicher Gene in B-Zellen, welche sich Signalwegen zuordnen ließen, die einerseits an der Erkennung von

Viren und der Aktivierung von Immunantworten (Chemokin-Signalweg, NF- κ B-Signalweg, TNF-Signalweg, T-Zell-Rezeptor-Signalweg) beteiligt sind, andererseits aber auch wichtige Rollen bei der Regulation des Zellschicksals (Zellzyklus, DNA-Replikation, p53-Signalweg, FoxO-Signalweg, Apoptose) spielen.

VLPs induzieren auch die Sekretion von IFN β , dessen Expression unter anderem über spezifische zelluläre Rezeptoren (PRR) nach Kontakt mit viraler RNA induziert wird und das eine zentrale Position bei der Regulation von Immunantworten einnimmt. IFN β selbst induziert dann die Transkription von ISG und IFITs (*Interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats*), die verschiedene antivirale Immunantworten auslösen (Bowie and Unterholzner 2008). Diese haben zum einen das Ziel, die viralen RNAs durch Hemmung oder Abbau unschädlich zu machen, zum anderen unterstützen sie die Immunreaktion, indem sie zum Beispiel die Produktion virusneutralisierender Antikörper unterstützen (Cullen 2006; Stavrou and Ross 2015).

Wichtig ist dabei die Tatsache, dass in allen Experimenten VLPs ohne virale miRNAs eine sehr viel stärkere Expression der Zielgene induzierten, als VLPs mit miRNAs (5.5.5). Dies verdeutlicht die immunesvasiven Eigenschaften der miRNAs von EBV, welche die TLR-Signalweiterleitung, die Typ-I-Interferonantwort, sowie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unterdrücken (Albanese, Tagawa, and Buschle 2017; Hooykaas et al. 2017; Haneklaus et al. 2012).

Die Untersuchung der Einflüsse viraler miRNAs auf die Immunantwort ist daher ein weiterer wichtiger Punkt bei der Entwicklung eines möglichst wirksamen EBV-Impfstoffs. Dass VLPs mit IFN β ein natürliches Adjuvanz aktivieren und das Immunsystem durch die Induktion verschiedener immunregulatorischer Signalwege wie auf eine Virusinfektion reagiert, ist eine weitere wichtige Erkenntnis (Toporovski, Morrow, and Weiner 2010).

6.3 VLPs aktivieren spezifische T-Zellantworten

Damit ein antiviraler Impfstoff einen effektiven und langanhaltenden Schutz vermitteln kann, reicht die Induktion einer angeborenen Immunantwort allein nicht aus. Vielmehr muss er auch die Bildung von spezifischen T-Zellen und B-Gedächtniszellen anregen. Nur so kann ein dauerhafter Schutz garantiert werden, der besonders für immunsupprimierte Patienten wichtig ist. Sie können auf eine Primärinfektion nicht mit der Bildung neuer

EBV-spezifischer adaptiver Immunzellen reagieren („priming“), aber Gedächtniszellen reaktivieren.

EBV-spezifische CD8⁺-T-Zellen richten sich vor allem gegen Produkte früher lytischer Gene, die als erste in infizierten Zellen gebildet werden. Daten über spezifische CD8⁺-T-Zellen gegen latente Genprodukte gibt es vor allem über die EBNA3-Familie (Brooks et al. 2016). Eine Stimulation von EBV-spezifischen CD8⁺-T-Zellen durch VLPs wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da solche Reaktivierungen bereits mit einer anderen VLP-Variante gezeigt wurden (Ruiss et al. 2011). Diese Ergebnisse waren zunächst überraschend, da exogen aufgenommene virale Proteine über den HLA Klasse-II-Weg präsentiert werden und für B-Zellen eine Kreuzpräsentation über HLA Klasse-I-Moleküle bisher nicht gezeigt werden konnte (Keller et al. 2009). Allerdings können umhüllte Viren über verschiedene Wege in die Zielzelle gelangen. Zum einen über Phagozytose mit anschließender Fusion der Phagosomen- mit der Virusmembran, zum anderen durch die direkte Fusion der Zellmembran mit der des Virus. Wenn im ersten Fall das Phagosom mit einem Lysosom fusioniert, werden Peptide über HLA Klasse-II-Moleküle CD4⁺-T-Zellen präsentiert. Im zweiten Fall erfolgt die Freisetzung der viralen Bestandteile direkt ins Zytoplasma, wo sie prozessiert und schließlich auf HLA Klasse-I-Molekülen CD8⁺-T-Zellen präsentiert werden (Melero 2013).

Durch den Umstand, dass sowohl EB-Virionen als auch VLPs virale RNAs enthalten, die auf B-Zellen übertragen und dort translatiert werden können, sind auch virale Proteine innerhalb kurzer Zeit nach der Interaktion im Zytoplasma präsent und werden dann ebenfalls über HLA Klasse-I-Moleküle präsentiert. Eine spezifische CD8⁺-T-Zellantwort kann dadurch nicht nur in virusinfizierten Zellen, sondern auch nach Kontakt mit VLPs induziert werden. Es ist anzunehmen, dass auch im Falle einer Inkubation mit VLPs die viralen miRNAs die Erkennung und die Beseitigung der APC durch CD8⁺-T-Zellen verhindern, wie es für die Infektion mit EBV gezeigt werden konnte (Albanese et al. 2016).

Die Experimente mit CD4⁺-T-Zellen zeigten, dass auch die neuen VLP-Varianten von allen getesteten T-Zellklonen erkannt wurden (5.5.6), die Stärke der Erkennung allerdings durch die miRNAs beeinflusst wird. Auch bestätigte sich, dass VLPs im Hinblick auf die CD4⁺-T-Zellerkennung die gleichen Eigenschaften haben wie EB-Virionen, wo nach einer Infektion virale miRNAs die Aktivierung von zytotoxischen EBV-spezifischen CD4⁺-Effektor-T-Zellen reduzieren (Tagawa et al. 2016).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass alle bisher getesteten VLP-Varianten, sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellantworten induzierten. Diese Erkenntnis stimmt optimistisch, dass dies auch für diejenigen VLPs gelten wird, welche unter Berücksichtigung aller bisherigen Erkenntnisse über die Biologie und Immunologie der viralen Bestandteile von EBV entwickelt werden sollen.

6.4 Anforderungen an VLPs als Basis für einen EBV-Impfstoff

Ein Impfstoff muss verschiedene Kriterien erfüllen: Zuerst muss er sicher sein, das heißt er darf selbst keine Krankheiten auslösen und auch in kleinen Mengen nicht toxisch sein. Zweitens sollte der Impfstoff natürlich einen Schutz gegenüber dem jeweiligen Pathogen und den dadurch verursachten Erkrankungen vermitteln. Dazu gehört zum einen die Stimulation des angeborenen Immunsystems und die Produktion neutralisierender Antikörper, damit bereits das Eindringen in den Wirt erkannt und eine Ausbreitung bekämpft werden kann. Zum anderen muss auch die adaptive Immunantwort aktiviert werden, sodass spezifische T-Zellen und Gedächtniszellen gegen Antigene von Pathogenen gebildet werden können, die einen langanhaltenden Schutz garantieren. Dies ist besonders in Ländern wichtig, wo aufgrund von Armut oder fehlender Zugänglichkeit zu medizinischer Versorgung nicht regelmäßig geimpft werden kann. Schließlich muss ein Impfstoff auch praktische Voraussetzungen erfüllen, das heißt er muss einen akzeptablen Preis pro Dosis haben, biologisch stabil und in großen Mengen herstellbar sein (Reich 2008).

Nach heutigem Verständnis wird ein EBV-Impfstoff keine sterile Immunität vermitteln können, da vermutlich ein einzelnes Viruspartikel ausreicht, um in einer Zielzelle eine persistierende Infektion zu etablieren. Daher sind alle Menschen mit mehreren EBV-Stämmen infiziert, was bedeutet, dass eine Infektion nicht vor weiteren Infektionen schützt. Aus diesem Grund soll ein EBV-Vakzin insbesondere die Entstehung von Krankheiten vermeiden oder abmildern (Moss 2005; Neves et al. 2017). Offen bleibt die Frage, ob eine Impfung Auswirkungen auf die Entstehung oder Progression von EBV-assoziierten Tumoren haben kann, da diese verschiedene Latenzphasen des Virus widerspiegeln. EBV-basierte VLPs erfüllen die oben genannten Kriterien. Sie haben durch das fehlende virale Genom keine infektiösen und proliferativen Eigenschaften mehr, zudem können durch genetische Manipulation alle viralen Onkogene entfernt

werden. Die hier erhobenen Daten zeigen, dass es wichtig ist die Biologie von EBV genauer zu verstehen und die Funktion der einzelnen viralen Bestandteile zu kennen, um ein möglichst effektives Vakzin designen zu können. So stimuliert beispielsweise der immundominante VCA-Komplex, sowie die verpackten viralen mRNAs das Immunsystem, während die viralen miRNAs immunevasive Eigenschaften haben und in einem VLP-Vakzin nicht enthalten sein sollten. Fundierte Aussagen über den Beitrag der EBERs benötigen weitere Untersuchungen.

Durch den komplexen Aufbau und die große Ähnlichkeit zu infektiösen Viruspartikeln sind VLPs in der Lage, ein breites Spektrum an virusspezifischen Immunantworten zu induzieren. Dazu gehört einerseits eine ausführliche angeborene Immunantwort durch die Interaktion mit verschiedenen PRRs und der damit verbundenen Induktion weiterer immunmodulatorischer Signalwege, die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen und die Produktion neutralisierender Antikörper (Ruiss et al. 2011).

Andererseits aktivieren VLPs auch das adaptive Immunsystem, da spezifische CD4⁺-T-Zellen ihre jeweiligen Epitope auf mit VLPs inkubierten APCs erkennen. Die Reaktivierung EBV-spezifischer CD8⁺-T-Zellen nach VLP-Stimulation bedarf noch weiterer Untersuchungen. Aufgrund des Fehlens geeigneter Tiermodelle für EBV ist es leider schwierig *in vivo* Daten zu generieren, da sich nur Menschen und einige geschützte Affenarten mit dem Virus infizieren lassen. In Zusammenarbeit mit Prof. Renata Stripecke aus dem Exzellenzcluster der Medizinischen Hochschule Hannover arbeitet unser Labor daher an einem Effizienzmodell, das auf humanisierten Mäusen beruht und in dem untersucht werden soll, inwieweit eine Infektion mit EBV durch VLPs und monoklonale Antikörper kontrolliert werden kann (Stripecke 2016).

6.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass VLPs vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung neuer Vakzine sind. Sie verhielten sich in allen untersuchten Bereichen wie richtige Viren und induzierten umfangreiche angeborene und adaptive Immunantworten. Allerdings muss die Zusammensetzung eines EBV-spezifischen VLP-Vakzins unter Berücksichtigung seiner Biologie sorgfältig geplant werden, um alle Bestandteile zu eliminieren, die der Induktion einer effektiven Immunantwort entgegenwirken, oder die Sicherheit der Patienten gefährden könnten. Durch die Tatsache, dass VLPs das natürliche System bestmöglich widerspiegeln, ist eine Verabreichung zusammen mit Adjuvantien nicht nötig, was zusätzlich die Sicherheit durch die Vermeidung von Nebenwirkungen erhöht.

Weitere Anstrengungen müssen hinsichtlich der Herstellung EBV-basierter VLPs unternommen werden, um deren Produktion transfektionsunabhängig und damit leichter durchführbar zu machen. Außerdem kann sich durch Testen weiterer Produzentenzelllinien eventuell die VLP-Ausbeute steigern lassen.

Aktuell gibt es Bestrebungen unseres Labors und der AGV, VLPs ohne miRNAs und potenzielle Onkogene unter GMP-Bedingungen herzustellen, um diese in naher Zukunft tatsächlich als EBV-Vakzin im Menschen einzusetzen.

7 LITERATUR

- Abernathy, Emma, and Britt Glaunsinger. 2015. "Emerging Roles for RNA Degradation in Viral Replication and Antiviral Defense." *Virology* 479–480: 600–608.
- Afgan, Enis et al. 2016. "The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2016 Update." *Nucleic acids research* 44(W1): W3–10.
- Albanese, Manuel et al. 2016. "Epstein-Barr Virus microRNAs Reduce Immune Surveillance by Virus-Specific CD8+ T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 201605884.
- Albanese, Manuel, Takanobu Tagawa, and Alexander Buschle. 2017. "MicroRNAs of Epstein-Barr Virus Control Innate and Adaptive Antiviral Immunity." 91(16): 1–6.
- Aman, Pierre, and Alexander Von Gabain. 1990. "An Epstein-Barr Virus Immortalization Associated Gene Segment Interferes Specifically with the IFN-Induced Anti-Proliferative Response in Human B-Lymphoid Cell Lines." *EMBO Journal* 9(1): 147–52.
- Arvin, Ann et al. 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*.
- Ascherio, Alberto, and Cassandra L. Munger. 2007. "Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. Part I: The Role of Infection." *Annals of Neurology* 61(4): 288–99.
- Babcock, Gregory J., Lisa L. Decker, Mark Volk, and David A. Thorley-Lawson. 1998. "EBV Persistence in Memory B Cells in Vivo." *Immunity* 9(3): 395–404.
- Bailer, Susanne M., Christina Funk, André Riedl, and Zsolt Ruzsics. 2017. "Herpesviral Vectors and Their Application in Oncolytic Therapy, Vaccination, and Gene Transfer." *Virus Genes* 53(5): 741–48.
- Balfour, Henry H Jr, Samantha K Dunmire, and Kristin A Hogquist. 2015. "Infectious Mononucleosis." *Clinical & translational immunology* 4(2): e33.
- Barth, Stephanie, Gunter Meister, and Friedrich A. Grässer. 2011. "EBV-Encoded miRNAs." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1809(11–12): 631–40.
- Bentz, Gretchen L. et al. 2010. "Epstein-Barr Virus BRLF1 Inhibits Transcription of IRF3 and IRF7 and Suppresses Induction of Interferon- β ." *Virology* 402(1): 121–28.
- Bornkamm, G W, and W Hammerschmidt. 2001. "Molecular Virology of Epstein-Barr Virus." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 356(1408): 437–59.
- Bowie, Andrew G., and Leonie Unterholzner. 2008. "Viral Evasion and Subversion of Pattern-Recognition Receptor Signalling." *Nature Reviews Immunology* 8(12): 911–22.
- Bresnahan, Wade A., and Thomas Shenk. 2000. "A Subset of Viral Transcripts Packaged within

- Human Cytomegalovirus Particles.” *Science* 288(5475): 2373–76.
- Brooks, Jill M. et al. 2016. “Early T Cell Recognition of B Cells Following Epstein-Barr Virus Infection: Identifying Potential Targets for Prophylactic Vaccination.” *PLoS Pathogens* 12(4).
- Brouwer, Arjan P. M., Hans Bokhoven, and Hannie Kremer. 2006. “Comparison of 12 Reference Genes for Normalization of Gene Expression Levels in Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphoblastoid Cell Lines and Fibroblasts.” *Molecular Diagnosis & Therapy* 10(3): 197–204.
- Busse, C. et al. 2010. “Epstein-Barr Viruses That Express a CD21 Antibody Provide Evidence That gp350’s Functions Extend beyond B-Cell Surface Binding.” *Journal of Virology* 84(2): 1139–47.
- Callan, Margaret F.C. et al. 2000. “CD8+ T-Cell Selection, Function, and Death in the Primary Immune Response in Vivo.” *Journal of Clinical Investigation* 106(10): 1251–61.
- Callegari, Simone, Stefano Gastaldello, Omid R. Faridani, and Maria G. Masucci. 2014. “Epstein-Barr Virus Encoded microRNAs Target SUMO-Regulated Cellular Functions.” *FEBS Journal* 281(21): 4935–50.
- Chang, L.-S. et al. 2012. “Epstein-Barr Virus BGLF4 Kinase Downregulates NF- κ B Transactivation through Phosphorylation of Coactivator UXT.” *Journal of Virology* 86(22): 12176–86.
- Chen, Mei Ru. 2011. “Epstein-Barr Virus, the Immune System, and Associated Diseases.” *Frontiers in Microbiology* 2(JAN).
- Chijioke, Obinna, Anne Müller, et al. 2013. “Human Natural Killer Cells Prevent Infectious Mononucleosis Features by Targeting Lytic Epstein-Barr Virus Infection.” *Cell Reports* 5(6): 1489–98.
- Chijioke, Obinna, Tarik Azzi, David Nadal, and Christian Münz. 2013. “Innate Immune Responses against Epstein Barr Virus Infection.” *Journal of Leukocyte Biology* 94(December): 1185–90.
- Chroboczek, Jadwiga, Inga Szurgot, and Ewa Szolajska. 2014. “Virus-like Particles as Vaccine.” *Acta Biochimica Polonica* 61(3): 531–39.
- Clarke, Paul A. et al. 1991. “Binding of Epstein-Barr Virus Small RNA EBER-1 to the Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase DAI.” *Nucleic Acids Research* 19(2): 243–48.
- Cliffe, A. R., A. A. Nash, and B. M. Dutia. 2009. “Selective Uptake of Small RNA Molecules in the Virion of Murine Gammaherpesvirus 68.” *Journal of Virology* 83(5): 2321–26.
- Cohen, Jeffrey I. 2015. “Epstein-barr Virus Vaccines.” *Clinical & Translational Immunology*

4(1): e32.

- Cui, Xinle et al. 2013. "A Novel Tetrameric gp350 1-470 as a Potential Epstein-Barr Virus Vaccine." *Vaccine* 31(30): 3039–45.
- Cullen, B. R. 2006. "Role and Mechanism of Action of the APOBEC3 Family of Antiretroviral Resistance Factors." *Journal of Virology* 80(3): 1067–76.
- Delecluse, H J et al. 1998. "Propagation and Recovery of Intact, Infectious Epstein-Barr Virus from Prokaryotic to Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14): 8245–50.
- Ruiss, R. et al. 1999. "A First-Generation Packaging Cell Line for Epstein-Barr Virus-Derived Vectors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(9): 5188–93.
- Dickson, Alexa M., and Jeffrey Wilusz. 2011. "Strategies for Viral RNA Stability: Live Long and Prosper." *Trends in Genetics* 27(7): 286–93.
- Dorner, Marcus et al. 2009. "Plasma Cell Toll-like Receptor (TLR) Expression Differs from that of B Cells, and Plasma Cell TLR Triggering Enhances Immunoglobulin Production." *Immunology* 128(4): 573–79.
- E. This, D. Not et al. 2005. *How to Isolate Maxi-EBV DNA from 6x 400 Ml E.coli Bugs*. Madison.
- Elliott, S. L. et al. 2008. "Phase I Trial of a CD8+ T-Cell Peptide Epitope-Based Vaccine for Infectious Mononucleosis." *Journal of Virology* 82(3): 1448–57.
- Epstein, M. A. et al. 1985. "Protection of Cottontop Tamarins against Epstein-Barr Virus-Induced Malignant Lymphoma by a Prototype Subunit Vaccine." *Nature* 318(6043): 287–89.
- Fathallah, Ikbal et al. 2010. "EBV Latent Membrane Protein 1 Is a Negative Regulator of TLR9." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185(11): 6439–47.
- Feederle, Regina, Emmalene J Bartlett, and Henri-Jacques Delecluse. 2010. "Epstein-Barr Virus Genetics: Talking about the BAC Generation." *Herpesviridae* 1(1): 6.
- Frazer, Ian H. 2004. "Prevention of Cervical Cancer through Papillomavirus Vaccination." *Nature Reviews Immunology* 4(1): 46–55.
- Frietze, Kathryn M., David S. Peabody, and Bryce Chackerian. 2016. "Engineering Virus-like Particles as Vaccine Platforms." *Current Opinion in Virology* 18: 44–49.
- Gärtner, Kathrin. 2016. "Engineered Extracellular Vesicles for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)."
- van Gent, M. et al. 2011. "EBV Lytic-Phase Protein BGLF5 Contributes to TLR9

- Downregulation during Productive Infection.” *The Journal of Immunology* 186(3): 1694–1702.
- van Gent, Michiel et al. 2014. “Epstein-Barr Virus Large Tegument Protein BPLF1 Contributes to Innate Immune Evasion through Interference with Toll-like Receptor Signaling.” *PLoS pathogens* 10(2).
- Van Gent, Michiel et al. 2015. “Silencing the Shutoff Protein of Epstein-Barr Virus in Productively Infected B Cells Points to (Innate) Targets for Immune Evasion.” *Journal of General Virology* 96(4): 858–65.
- Gires, Olivier et al. 1999. “Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus Interacts with JAK3 and Activates STAT Proteins.” *EMBO Journal* 18(11): 3064–73.
- Graham, F L, J Smiley, W C Russell, and R Nairn. 1977. “Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5.” *The Journal of general virology* 36(1): 59–74.
- Gram, Anna M. et al. 2017. “Human B Cells Fail to Secrete Type I Interferons upon Cytoplasmic DNA Exposure.” *Molecular Immunology* 91: 225–37.
- Greiner, Vanille J. et al. 2010. “Characterization of the Lipid and Protein Organization in HBsAg Viral Particles by Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy.” *Biochimie* 92(8): 994–1002.
- Gu, S Y et al. 1995. “First EBV Vaccine Trial in Humans Using Recombinant Vaccinia Virus Expressing the Major Membrane Antigen.” *Developments in biological standardization* 84: 171–77.
- Hahn, Angela M et al. 2005. “Interferon Regulatory Factor 7 Is Negatively Regulated by the Epstein-Barr Virus Immediate-Early Gene, BZLF-1.” *Journal of virology* 79(15): 10040–52.
- Haji Abdolvahab, M., M. R K Mofrad, and H. Schellekens. 2016. 326 International Review of Cell and Molecular Biology *Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects*.
- Haneklaus, M. et al. 2012. “Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 Production.” *The Journal of Immunology* 189(8): 3795–99.
- Hettich, Eva. 2006. “Etablierung Einer Optimierten Helferzelllinie Zum Genvektortransfer in Humane B-Zellen.”
- Hinderer, Walter et al. 1999. “Serodiagnosis of Epstein-Barr Virus Infection by Using Recombinant Viral Capsid Antigen Fragments and Autologous Gene Fusion.” *Journal of*

- Clinical Microbiology* 37(10): 3239–44.
- Ho, Hao H., and Lionel B. Ivashkiv. 2006. “Role of STAT3 in Type I Interferon Responses: Negative Regulation of STAT1-Dependent Inflammatory Gene Activation.” *Journal of Biological Chemistry* 281(20): 14111–18.
- Hochberg, Donna et al. 2004. “Demonstration of the Burkitt’s Lymphoma Epstein-Barr Virus Phenotype in Dividing Latently Infected Memory Cells in Vivo.” In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, , 239–44.
- Hooykaas, Marjolein J. G. et al. 2017. “EBV MicroRNA BART16 Suppresses Type I IFN Signaling.” *The Journal of Immunology* 198(10): 4062–73.
- Hooykaas, Marjolein J. G., Elisabeth Kruse, Emmanuel J. H. J. Wiertz, and Robert Jan Lebbink. 2016. “Comprehensive Profiling of Functional Epstein-Barr Virus miRNA Expression in Human Cell Lines.” *BMC Genomics* 17(1): 644.
- Ishii, Ken J. et al. 2008. “Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections.” *Cell Host and Microbe* 3(6): 352–63.
- Iskra, Stefanie et al. 2010. “Toll-like Receptor Agonists Synergistically Increase Proliferation and Activation of B Cells by Epstein-Barr Virus.” *Journal of virology* 84(7): 3612–23.
- Iwakiri, Dai et al. 2009. “Epstein-Barr Virus (EBV)–encoded Small RNA Is Released from EBV-Infected Cells and Activates Signaling from Toll-like Receptor 3.” *The Journal of Experimental Medicine* 206(10): 2091–99.
- Iwakiri, Dai et al. 2014. “Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis.” *Cancers* 6(3): 1615–30.
- Iwakiri, Dai, and Kenzo Takada. 2010. “Role of EBERs in the Pathogenesis of EBV Infection.” *Advances in cancer research* 107: 119–36.
- Iwasaki, Akiko, and Ruslan Medzhitov. 2004. “Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses.” *Nature Immunology* 5(10): 987–95.
- James, Judith A. et al. 2001. “Systemic Lupus Erythematosus in Adults Is Associated with Previous Epstein-Barr Virus Exposure.” *Arthritis and Rheumatism* 44(5): 1122–26.
- Jha, Hem, Shuvomoy Banerjee, and Erle Robertson. 2016. “The Role of Gammaherpesviruses in Cancer Pathogenesis.” *Pathogens* 5(1): 18.
- Jochum, S et al. 2012. “RNAs in Epstein-Barr Virions Control Early Steps of Infection.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(21): E1396-404.
- Kalla, M. et al. 2010. “AP-1 Homolog BZLF1 of Epstein-Barr Virus Has Two Essential Functions Dependent on the Epigenetic State of the Viral Genome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(2): 850–55..

- Kalla, M., C. Gobel, and W. Hammerschmidt. 2012. "The Lytic Phase of Epstein-Barr Virus Requires a Viral Genome with 5-Methylcytosine Residues in CpG Sites." *Journal of Virology* 86(1): 447–58.
- Kanda, K et al. 1992. "The EBNA2-Related Resistance towards Alpha Interferon (IFN-Alpha) in Burkitt's Lymphoma Cells Effects Induction of IFN-Induced Genes but Not the Activation of Transcription Factor ISGF-3." *Mol Cell Biol* 12(11): 4930–36.
- Kanda, K. et al. 1999. "The Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 (EBNA2), a Protein Required for B Lymphocyte Immortalization, Induces the Synthesis of Type I Interferon in Burkitts Lymphoma Cell Lines." *Biological Chemistry* 380(2).
- Kanda, Teru et al. 2015. "Clustered MicroRNAs of the Epstein-Barr Virus Cooperatively Downregulate an Epithelial Cell-Specific Metastasis Suppressor." *Journal of Virology* 89(5): 2684–97.
- Kang, Myung-Soo, and Elliott Kieff. 2015. "Epstein–Barr Virus Latent Genes." *Experimental & Molecular Medicine* 47(1): e131.
- Karpova, M. B. et al. 2005. "Raji Revisited: Cytogenetics of the Original Burkitt's Lymphoma Cell Line [12]." *Leukemia* 19(1): 159–61.
- Keller, Susanne a et al. 2009. "Follicular and Marginal Zone B Cells Fail to Cross-Present MHC Class I-Restricted Epitopes Derived from Viral Particles." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182(10): 6261–66.
- Kempkes, B et al. 1995. "Immortalization of Human B Lymphocytes by a Plasmid Containing 71 Kilobase Pairs of Epstein-Barr Virus DNA." *Journal of virology* 69(1): 231–38.
- Khsheibun, Rana et al. 2014. "Gene Expression Profiling of the Response to Interferon Beta in Epstein-Barr-Transformed and Primary B Cells of Patients with Multiple Sclerosis." *PLoS ONE* 9(7).
- Kieser, Arnd. 2007. "Signal Transduction by the Epstein-Barr Virus Oncogene Latent Membrane Protein 1 (LMP1)." *Signal Transduction* 7(1): 20–33.
- Koerner, Iris et al. 2007. "Protective Role of Beta Interferon in Host Defense against Influenza A Virus." *Journal of virology* 81(4): 2025–30.
- Landais, Elise, Xavier Saulquin, and Elisabeth Houssaint. 2005. "The Human T Cell Immune Response to Epstein-Barr Virus." *The International Journal of Developmental Biology* 49(2–3): 285–92.
- Lotz, Martin et al. 1985. "Regulation of Epstein-Barr Virus Infection by Recombinant Interferons. Selected Sensitivity to Interferon- γ ." *European Journal of Immunology* 15(5): 520–25.

- Lunemann, A. et al. 2013. "A Distinct Subpopulation of Human NK Cells Restricts B Cell Transformation by EBV." *The Journal of Immunology* 191(10): 4989–95.
- Maas, Sybren L.N., Xandra O. Breakefield, and Alissa M. Weaver. 2017. "Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles." *Trends in Cell Biology* 27(3): 172–88.
- Martorelli, Debora et al. 2012. "Exploiting the Interplay between Innate and Adaptive Immunity to Improve Immunotherapeutic Strategies for Epstein-Barr-Virus-Driven Disorders." *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
- Melero, Vicente MásJosé A. 2013. volume 68 Structure and Physics of Viruses *Entry of Enveloped Viruses into Host Cells: Membrane Fusion*.
- Merad, Miriam et al. 2013. "The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting." *Annual Review of Immunology* 31(1): 563–604.
- Middeldorp, J. M., and D. M. Pegtel. 2008. "Multiple Roles of LMP1 in Epstein-Barr Virus Induced Immune Escape." *Seminars in Cancer Biology* 18(6): 388–96.
- Middeldorp, Jaap M., Antoinette A.T.P. Brink, Adriaan J.C. Van den Brule, and Chris J.L.M. Meijer. 2003. "Pathogenic Roles for Epstein-Barr Virus (EBV) Gene Products in EBV-Associated Proliferative Disorders." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 45(1): 1–36.
- Middeldorp, Jaap M., and Rob H. Melen. 1988. "Epitope-Mapping on the Epstein-Barr Virus Major Capsid Protein Using Systematic Synthesis of Overlapping Oligopeptides." *Journal of Virological Methods* 21(1–4): 147–59.
- Miller, G et al. 1972. "Epstein-Barr Virus: Transformation, Cytopathic Changes, and Viral Antigens in Squirrel Monkey and Marmoset Leukocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(2): 383–87.
- Miller, G, and M Lipman. 1973. "Release of Infectious Epstein-Barr Virus by Transformed Marmoset Leukocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(1): 190–94.
- Moosmann, Andreas et al. 2002. "B Cells Immortalized by a Mini-Epstein-Barr Virus Encoding a Foreign Antigen Efficiently Reactivate Specific Cytotoxic T Cells." *Blood* 100(5): 1755–64.
- Morrison, Thomas E., and Shannon C. Kenney. 2004. "BZLF1, an Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein, Induces p65 Nuclear Translocation While Inhibiting p65 Transcriptional Function." *Virology* 328(2): 219–32.
- Moss, Denis J. 2005. *Epstein-Barr Virus; Developing Vaccines Against EBV-Associated*

- Diseases*. ed. E. Robertson. Philadelphia: Caister Academic Press.
- Moutschen, Michel et al. 2007. "Phase I/II Studies to Evaluate Safety and Immunogenicity of a Recombinant gp350 Epstein-Barr Virus Vaccine in Healthy Adults." *Vaccine* 25(24): 4697–4705.
- Münz, Christian (Herausgeber). 2015. 391 Current Topics in Microbiology and Immunology *Epstein Barr Virus Volume 2 One Herpes Virus: Many Diseases*.
- Nan, Yuchen, Guoxin Nan, and Yan Jin Zhang. 2014. "Interferon Induction by RNA Viruses and Antagonism by Viral Pathogens." *Viruses* 6(12): 4999–5027.
- Nanbo, Asuka, and Kenzo Takada. 2002. "The Role of Epstein-Barr Virus-Encoded Small RNAs (EBERs) in Oncogenesis." *Reviews in Medical Virology* 12(5): 321–26.
- Neuhierl, B, R Feederle, W Hammerschmidt, and H J Delecluse. 2002. "Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr Virus Determines Viral Tropism and Efficiency of Infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(23): 15036–41.
- Neves, Marco, Joana Marinho-Dias, Joana Ribeiro, and Hugo Sousa. 2017. "Epstein–Barr Virus Strains and Variations: Geographic or Disease-Specific Variants?" *Journal of Medical Virology* 89(3): 373–87.
- Newman, R., J. McHugh, and M. Turner. 2016. "RNA Binding Proteins as Regulators of Immune Cell Biology." *Clinical and Experimental Immunology* 183(1): 37–49.
- Ng, Cherie T. et al. 2015. "Blockade of Interferon Beta, but Not Interferon Alpha, Signaling Controls Persistent Viral Infection." *Cell Host & Microbe* 17(5): 653–61.
- Niedobitek, G, N Meru, and H J Delecluse. 2001. "Epstein-Barr Virus Infection and Human Malignancies." *International journal of experimental pathology* 82: 149–70.
- Niedobitek, Gerald et al. 1997. "Epstein-Barr Virus (EBV) Infection in Infectious Mononucleosis: Virus Latency, Replication and Phenotype of EBV-Infected Cells." *Journal of Pathology* 182(2): 151–59.
- Nolte-‘t Hoen, Esther, Tom Cremer, Robert C. Gallo, and Leonid B. Margolis. 2016. "Extracellular Vesicles and Viruses: Are They Close Relatives?" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(33): 9155–61.
- Odumade, Oludare A., Kristin A. Hogquist, and Henry H. Balfour. 2011. "Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections." *Clinical Microbiology Reviews* 24(1): 193–209.
- Ong, Hui Kian, Wen Siang Tan, and Kok Lian Ho. 2017. "Virus like Particles as a Platform for Cancer Vaccine Development." *PeerJ* 5: e4053.

- Pappworth, I. Y., E. C. Wang, and M. Rowe. 2007. "The Switch from Latent to Productive Infection in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells Is Associated with Sensitization to NK Cell Killing." *Journal of Virology* 81(2): 474–82.
- Pavlova, S. et al. 2013. "An Epstein-Barr Virus Mutant Produces Immunogenic Defective Particles Devoid of Viral DNA." *Journal of Virology* 87(4): 2011–22.
- Poole, Brian D., R. Hal Scofield, John B. Harley, and Judith A. James. 2006. "Epstein-Barr Virus and Molecular Mimicry in Systemic Lupus Erythematosus." *Autoimmunity* 39(1): 63–70.
- Quinlan, Aaron R., and Ira M. Hall. 2010. "BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features." *Bioinformatics* 26(6): 841–42.
- Raposo, Graça, and Willem Stoorvogel. 2013. "Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends." *Journal of Cell Biology* 200(4): 373–83.
- Rees, Lesley et al. 2009. "A Phase I Trial of Epstein-Barr Virus Gp350 Vaccine for Children with Chronic Kidney Disease Awaiting Transplantation." *Transplantation* 88(8): 1025–29.
- Reich, Nancy C. 2008. "*Janeway's Immunobiology . Seventh Edition. By Kenneth Murphy, Paul Travers, and Mark Walport; Contributions by Michael Ehrenstein, Claudia Mauri, Allan Mowat, and Andrey Shaw. Garland Science . New York: Taylor & Fra.*" *The Quarterly Review of Biology* 83(4): 403–403.
- Resing, Maaïke E. et al. 2015. "Immune Evasion by Epstein-Barr Virus." In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, , 355–81.
- Rider, Mark A., Stephanie N. Hurwitz, and David G. Meckes. 2016. "ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles." *Scientific Reports* 6.
- Roberts, M. Luisa, Alain T. Luxembourg, and Neil R. Cooper. 1996. "Epstein-Barr Virus Binding to CD21, the Virus Receptor, Activates Resting B Cells via an Intracellular Pathway That Is Linked to B Cell Infection." *Journal of General Virology* 77(12): 3077–85.
- Robinson, Mark D, Davis J McCarthy, and Gordon K Smyth. 2010. "edgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data." *Bioinformatics (Oxford, England)* 26(1): 139–40.
- Roldão, António et al. 2010. "Virus-like Particles in Vaccine Development." *Expert review of vaccines* 9(10): 1149–76.
- Roy, Polly, and Rob Noad. 2008. "Virus-like Particles as a Vaccine Delivery System: Myths

- and Facts.” *Human Vaccines* 4(1): 5–12.
- Ruiss, R. et al. 2011. “A Virus-Like Particle-Based Epstein-Barr Virus Vaccine.” *Journal of Virology* 85(24): 13105–13.
- Ruiss, Romana et al. 2011. “EBV-gp350 Confers B-Cell Tropism to Tailored Exosomes Is a Neo-Antigen in Normal and Malignant B Cells-a New Option for the Treatment of B-CLL.” *PLoS ONE* 6(10).
- Russell, David W., and J Sambrook. 2001. Cold Spring Harbour *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sambrook, J, E F Fritsch, and T Maniatis. 2001. 2 Journal of Biological Chemistry *Molecular Cloning*.
- Sciortino, Maria-Teresa, Mikiko Suzuki, Brunella Taddeo, and Bernard Roizman. 2001. “RNAs Extracted from Herpes Simplex Virus 1 Virions: Apparent Selectivity of Viral but Not Cellular RNAs Packaged in Virions.” *Journal of Virology* 75(17): 8105.
- Shah, K. M. et al. 2009. “The EBV-Encoded Latent Membrane Proteins, LMP2A and LMP2B, Limit the Actions of Interferon by Targeting Interferon Receptors for Degradation.” *Oncogene* 28(44): 3903–14.
- Shevchuk, Andrew I. et al. 2008. “Imaging Single Virus Particles on the Surface of Cell Membranes by High-Resolution Scanning Surface Confocal Microscopy.” *Biophysical Journal* 94(10): 4089–94.
- Singh, Mahipal, Arpita Yadav, Xiaoling Ma, and Eugene Amoah. 2010. “Plasmid DNA Transformation in Escherichia Coli : Effect of Heat Shock Temperature , Duration , and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells.” *Shock* 6(4): 561–68.
- Skalsky, Rebecca L., and Bryan R. Cullen. 2015. “EBV Noncoding RNAs.” In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, , 181–217.
- Smith, Corey et al. 2006. “Functional Reversion of Antigen-Specific CD8⁺ T Cells from Patients with Hodgkin Lymphoma Following in Vitro Stimulation with Recombinant Polyepitope.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177(7): 4897–4906.
- Sokal, Etienne M. et al. 2007. “Recombinant gp350 Vaccine for Infectious Mononucleosis: A Phase 2, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial to Evaluate the Safety, Immunogenicity, and Efficacy of an Epstein-Barr Virus Vaccine in Healthy Young Adults.” *The Journal of Infectious Diseases* 196(12): 1749–53.
- Sominskaya, Irina et al. 2010. “Construction and Immunological Evaluation of Multivalent Hepatitis B Virus (HBV) Core Virus-like Particles Carrying HBV and HCV Epitopes.” *Clinical and Vaccine Immunology* 17(6): 1027–33.

- Stavrou, Spyridon, and Susan R. Ross. 2015. "APOBEC3 Proteins in Viral Immunity." *The Journal of Immunology* 195(10): 4565–70.
- Stripecke, Renata. 2016. "Leukemias and Bones: Humanizing the Niche in Mice." *Blood* 128(25): 2874–75.
- Swaminathan, S, B Tomkinson, and E Kieff. 1991. "Recombinant Epstein-Barr Virus with Small RNA (EBER) Genes Deleted Transforms Lymphocytes and Replicates in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(4): 1546–50.
- Swanson-Mungerson, Michelle, Rebecca Bultema, and Richard Longnecker. 2010. "Epstein-Barr Virus LMP2A Imposes Sensitivity to Apoptosis." *Journal of General Virology* 91(9): 2197–2202.
- Tagawa, Takanobu et al. 2016. "Epstein-Barr Viral miRNAs Inhibit Antiviral CD4⁺ T Cell Responses Targeting IL-12 and Peptide Processing." *The Journal of Experimental Medicine* 213(10): 2065–80.
- Taylor, Graham S. et al. 2015. "The Immunology of Epstein-Barr Virus-Induced Disease." *Annual Review of Immunology* 33(1): 787–821.
- Toporovski, Roberta, Matthew P Morrow, and David B Weiner. 2010. "Interferons as Potential Adjuvants in Prophylactic Vaccines." *Expert opinion on biological therapy* 10(June): 1489–1500.
- Twu, O et al. 2013. "Trichomonas Vaginalis Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host-parasite Interactions." *PLoS Pathog* 9(7): e1003482.
- Valentine, Robert et al. 2010. "Epstein-Barr Virus-Encoded EBNA1 Inhibits the Canonical NF- κ B Pathway in Carcinoma Cells by Inhibiting IKK Phosphorylation." *Molecular Cancer* 9.
- Warming, Søren et al. 2005. "Simple and Highly Efficient BAC Recombineering Using galK Selection." *Nucleic Acids Research* 33(4): 1–12.
- Wen, Wangrong et al. 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." *Journal of virology* 81(2): 1037–42.
- Williams, Hilary et al. 2005. "The Immune Response to Primary EBV Infection: A Role for Natural Killer Cells." *British Journal of Haematology* 129(2): 266–74.
- Wilson, a D et al. 1996. "Virus-Specific Cytotoxic T Cell Responses Are Associated with Immunity of the Cottontop Tamarin to Epstein-Barr Virus (EBV)." *Clinical and experimental immunology* 103(2): 199–205.

- Witwer, Kenneth W. et al. 2013. "Standardization of Sample Collection, Isolation and Analysis Methods in Extracellular Vesicle Research." *Journal of Extracellular Vesicles* 2(1).
- Wood, V H J et al. 2007. "Epstein-Barr Virus-Encoded EBNA1 Regulates Cellular Gene Transcription and Modulates the STAT1 and TGFbeta Signaling Pathways." *Oncogene* 26(28): 4135–47.
- Zeidler, R et al. 1997. "Downregulation of TAP1 in B Lymphocytes by Cellular and Epstein-Barr Virus-Encoded Interleukin-10." *Blood* 90(6): 2390–97.
- Zeltins, Andris. 2013. "Construction and Characterization of Virus-like Particles: A Review." *Molecular Biotechnology* 53(1): 92–107.
- Zhang, Jun et al. 2004. "The Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus Establishes an Antiviral State via Induction of Interferon-Stimulated Genes." *Journal of Biological Chemistry* 279(44): 46335–42.
- Zhang, L, and J S Pagano. 2000. "Interferon Regulatory Factor 7 Is Induced by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1." *Journal of virology* 74(3): 1061–68.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alkaline Phosphatase	kb	Kilobasen
APS	Ammoniumperoxidsulfat	kDa	Kilodalton
bp	Basenpaare	LCL	<i>lymphoblastoid cell line</i> , lymphoblastoide Zelllinie
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin	MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsgruppen	MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA	mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure	NEAA	<i>non essential amino acids</i> , nicht- essentielle Aminosäuren
EBER	EBV- <i>encoded RNA</i>	NK-Zellen	natürliche Killerzellen
EBV	Epstein-Barr Virus	NTA	<i>nanoparticle tracking analysis</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NTP	Nukleosidtriphosphat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	OD	optische Dichte
EV	extrazelluläre Vesikel	PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
GFP	grün fluoreszierendes Protein	PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
GRU	<i>green raji units</i>	PEI	Polyethylenimin
GUSB	β -Glucuronidase	Pen/Strep	Penicillin/Streptavidin
H ₂ O	Wasser	qRT-PCR	<i>quantitative real time PCR</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen	RT	Raumtemperatur
HRP	<i>horsesradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
IFN	Interferon	ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , einzelsträngige DNA
Ig	Immunglobulin	TEMED	Tetramethylethyldiamin
IL	Interleukin	VLPs	<i>virus-like particles</i>
IM	infektiöse Mononukleose	WT	Wildtyp

9 ANHANG

Tabelle 2: identifizierte EBV-Gene in B-Zellen

Gen	AD1	AD2	AD3	AD4	Mittelwert (Reads/Gen)
BALF4	33	44	142	145	91,00
BVRF2/BdRF1	70	72	85	98	81,25
BLLF1/2 (gp350)	64	37	60	67	57,00
BDLF3	25	32	47	48	38,00
BILF2	46	34	27	30	34,25
BKRF4	19	26	32	27	26,00
BPLF1	8	6	26	49	22,25
BBRF3	17	18	23	27	21,25
EBER1	4	14	48	18	21,00
BKRF1	4	6	32	40	20,50
BNRF1	13	14	18	14	14,75
BDLF2	10	13	14	16	13,25
BMRF2	10	13	9	16	12,00
BcLF1	7	17	10	11	11,25
BXLF2	6	7	12	18	10,75
BZLF1	1	2	7	33	10,75
BYRF1 (EBNA1)	1	3	11	25	10,00
BFRF3	15	5	10	9	9,75
BHLF1	6	7	18	8	9,75
BMRF1	10	10	11	5	9,00
BKRF3	12	8	8	4	8,00
BORF2	5	5	12	8	7,50
BLRF1	12	3	7	7	7,25
BLRF2	6	6	5	10	6,75
BFLF2	8	3	7	6	6,00

Gen	AD1	AD2	AD3	AD4	Mittelwert (Reads/Gen)
BORF1	7	6	5	5	5,75
BNLF1	3	3	3	13	5,50
BMLF1/BSLF2	2	2	9	9	5,50
BBLF1	1	0	8	12	5,25
BHRF1	7	1	7	5	5,00
BOLF1	1	5	8	6	5,00
BFRF2	3	2	6	7	4,50
BTRF1	7	3	1	7	4,50
BNLF2a	1	2	5	8	4,00
BXLF1	2	1	4	9	4,00
BALF2	1	3	7	4	3,75
BBRF2	1	3	4	6	3,50
BRLF1	3	2	1	8	3,50
BERF2b	1	2	5	5	3,25
BFLF1	0	0	5	7	3,00
BZLF2	3	2	2	4	2,75
BDRF1	1	0	5	4	2,50
BRRF2	1	3	1	4	2,25
BBLF4	1	2	1	5	2,25
BDLF1	0	3	1	5	2,25
BNLF2b	2	0	3	3	2,00
BGLF4	0	1	3	4	2,00
BGLF5	2	1	2	2	1,75
BFRF1	0	2	2	3	1,75
BALF3	1	0	4	2	1,75

Gen	AD1	AD2	AD3	AD4	Mittelwert (Reads/Gen)
EBER2	2	1	4	0	1,75
BARF1	0	2	3	1	1,50
BaRF1	0	2	3	1	1,50
BILF1	0	2	1	3	1,50
BKRF2	1	1	0	4	1,50
BERF1	0	0	3	3	1,50
BALF5	0	0	1	5	1,50
BRRF1	0	1	2	2	1,25
BBLF2	1	0	1	3	1,25

Tabelle 3: Hochregulierte Gene in B-Zellen nach Inkubation mit VLPs

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
IFNB1	36,14	5,54
DBNDD1	30,09	4,63
WNT16	33,88	4,62
DUSP8	61,19	4,07
CTGF	22,99	3,81
CCR1	91,59	3,68
CREB5	85,41	3,68
ROR1	29,26	3,66
TGM2	63,68	3,65
GMPR	37,81	3,64
SLC37A2	58,60	3,59
GPR98	21,85	3,57
IGFN1	53,89	3,54
TUBB3	25,54	3,49
LOC100507412	472,94	3,42
NR4A3	307,91	3,38
FAM177B	26,87	3,32
FCGR2B	102,31	3,31
APOBEC3A	25,04	3,30
RIN2	25,35	3,29
CACNA1A	222,96	3,28
NT5E	45,88	3,28
PTPRO	294,89	3,26
MARCH1	62,05	3,25
FPR3	34,08	3,24
ABCB1	84,87	3,21
KCNJ2	25,00	3,20
MIR22HG	39,29	3,18
P2RX1	36,79	3,18
RASSF6	127,76	3,16
RHOC	79,78	3,13
ANKRD20A9P	22,22	3,10
BMP6	23,91	3,08
COL24A1	22,74	3,03
SAT1	1342,67	3,01
DNAH12	20,21	3,00
IFIT2	912,73	2,96
JUND	416,8	2,96
IKZF2	869,68	2,93
LRP1B	21,68	2,91
MACC1	201,17	2,89
IFITM3	188,42	2,85
NEB	52,21	2,82
MAFB	20,15	2,80
RDH10	64,37	2,79
HMCN1	29,26	2,75

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
GABARAPL1	32,40	2,74
TBC1D9	156,97	2,72
MAML3	58,61	2,72
SNORA49	42,78	2,69
FMN1	23,08	2,69
C3orf37	110,65	2,66
NEAT1	2100,38	2,65
ZNF704	27,48	2,62
NR4A2	51,26	2,62
H1FO	48,31	2,60
FAIM3	901,74	2,60
TMEM140	291,01	2,59
CCL8	70,18	2,58
LILRB4	35,08	2,58
TXNIP	842,78	2,55
WDFY3	26,38	2,55
C14orf182	26,20	2,54
TSIX	45,10	2,54
PLEKHA7	103,41	2,54
THSD4	22,46	2,49
LOC646214	24,11	2,48
IER5L	37,06	2,45
RSAD2	1756,48	2,44
ENC1	21,58	2,44
ATF3	80,18	2,44
ZBP1	205,59	2,40
SH2D2A	60,04	2,39
CCDC144B	99,61	2,39
CHGB	24,10	2,37
CALD1	21,00	2,37
FOSL2	73,22	2,37
DSP	70,96	2,37
FHL1	22,57	2,37
TGFB2	26,38	2,37
CTSL1	89,50	2,37
CEACAM1	25,39	2,36
EIF2AK3	457,13	2,35
BBLF1	49,02	2,35
CDKN2D	43,91	2,35
RUNX2	125,80	2,34
FCHSD1	150,23	2,34
OASL	308,25	2,33
IFI27	154,41	2,33
TRIM69	24,20	2,33
USP32P2	26,23	2,32
MNDA	92,71	2,31

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
GAB2	89,86	2,30
TYROBP	45,38	2,30
C3orf67	41,92	2,29
CCR5	51,86	2,28
FOS	56,95	2,26
DUSP5	307,57	2,25
ARHGAP9	284,22	2,25
PTPN22	273,45	2,24
LOC100506190	27,86	2,24
MTSS1	404,55	2,23
TNFSF10	522,44	2,21
NEXN	95,05	2,21
SNORD8	31,49	2,21
BTG2	1660,31	2,20
RNF122	26,64	2,19
DDIT4	359,33	2,19
SPRY1	45,61	2,18
PUS10	128,32	2,18
CLMN	26,97	2,16
SIGLEC6	27,41	2,16
NR4A1	131,55	2,15
IRAK2	56,95	2,14
ATP8B4	26,59	2,14
C8orf80	76,07	2,14
ST6GALNAC3	21,69	2,14
GDF11	62,81	2,14
OTUD1	60,63	2,13
GN7	23,44	2,13
SRGAP3	20,24	2,13
SNORA47	24,09	2,12
THBS1	246,62	2,11
IFI6	1135,51	2,11
ABCB4	104,94	2,10
PARD3	24,38	2,10
MYOF	23,34	2,10
ENAH	24,56	2,10
MX2	1644,82	2,09
ASTN2	31,14	2,08
FAM125B	24,51	2,08
MAP1A	43,93	2,08
FAM46A	91,61	2,08
CD151	70,25	2,08
CASP10	74,18	2,07
TTC21A	30,58	2,07
MCTP2	212,03	2,07
SMAD3	235,42	2,05

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
DUSP16	197,23	2,05
SNX29P1	24,59	2,05
FGD4	20,40	2,04
CXCR4	714,72	2,04
SNORA22	39,06	2,04
HSPA2	34,69	2,03
HERC5	1051,56	2,03
GPR18	84,73	2,03
KCNN3	50,99	2,03
ID3	376,28	2,03
HMOX1	68,70	2,02
NTSC3	889,54	2,02
KLF2	107,99	2,01
IFITM1	1604,48	2,01
NCF4	195,12	2,01
GIMAP1	73,30	2,00
PATL2	37,03	2,00
IFITM2	632,34	1,99
GLIPR1	292,22	1,99
CCDC168	24,91	1,98
PNOC	31,46	1,98
RHOB	54,96	1,98
CEBPB	46,29	1,98
IFIT3	2344,62	1,97
CD1C	111,85	1,96
TLR7	318,07	1,96
C20orf194	25,45	1,96
CCL4	213,33	1,96
PLK2	23,34	1,96
ODZ1	37,57	1,95
GBP2	698,61	1,94
MAP1B	34,31	1,94
H1FX	86,61	1,94
ITGAX	80,11	1,94
C5orf56	45,98	1,93
SPATS2L	271,50	1,93
IL28RA	220,15	1,93
ANPEP	26,32	1,93
GRIN2A	22,90	1,92
IFIT1	1865,76	1,92
NFIA	25,61	1,92
FLJ35776	36,27	1,91
VEGFA	66,46	1,91
RELL1	39,84	1,91
ASAP3	32,65	1,91
CLEC7A	32,61	1,91

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
MAP2	24,72	1,91
DUSP1	96,96	1,90
LATS2	32,52	1,90
C17orf57	37,14	1,90
FAM100B	447,61	1,90
GATS	38,66	1,90
FAM214B	37,64	1,89
ALOX5	297,19	1,89
ZNF385A	50,37	1,89
FLJ38109	20,88	1,88
CHL1	29,06	1,88
DNAJB4	33,69	1,88
ADARB1	98,19	1,87
LPP	407,68	1,87
TSC22D3	137,52	1,87
SBF2	43,71	1,87
LINC00152	51,47	1,87
ATHL1	108,34	1,87
JAZF1	264,79	1,86
VPS37B	143,75	1,85
TIMP2	20,34	1,85
FCRL3	443,84	1,85
DOK2	22,17	1,84
LOC728743	52,98	1,84
CCL3	147,56	1,83
RNU11	431,50	1,83
NDRG1	78,91	1,83
SNORD10	140,42	1,82
PPP2R5B	22,94	1,81
C1orf173	20,06	1,81
FBXO32	21,43	1,81
PADI2	51,32	1,81
CMPK2	533,75	1,81
PLA2G7	53,97	1,81
TCP11L2	44,02	1,80
NAB2	148,93	1,80
BTG1	1502,12	1,80
ITGB3	50,98	1,80
ISG20	1143,48	1,80
HHAT	31,16	1,79
PLAC8	251,18	1,79
SNORA64	53,51	1,79
PDE3B	152,50	1,78
SCML4	61,94	1,78
CALCOCO1	145,04	1,78
SNORA63	127,66	1,78

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
GZMB	23,27	1,78
CHPT1	45,28	1,77
ARHGGEF11	40,71	1,77
SIGLEC1	21,23	1,77
LPAR5	103,95	1,76
PLSCR1	1423,71	1,76
MBD1	305,81	1,76
MUC4	41,82	1,75
GIMAP4	480,22	1,75
ADAP2	29,56	1,75
PRIC285	616,91	1,74
DDX60L	1271,28	1,74
ITGA4	841,58	1,74
MT2A	244,56	1,74
CBLB	310,35	1,74
PLP2	142,53	1,74
ENDOD1	203,01	1,73
CDKL2	23,05	1,73
FCRLA	565,32	1,73
LOC100289230	23,56	1,72
SYNPO2	23,06	1,72
PIGR	26,29	1,72
HAVCR2	25,13	1,72
MOV10	505,57	1,72
TRIB1	270,76	1,72
SNORA54	24,52	1,72
SERPINF1	20,88	1,71
CKB	89,60	1,71
PGAP1	135,58	1,71
MAP4K3	73,28	1,71
ISG15	2879,44	1,70
IL1RAP	23,79	1,70
CMIP	399,67	1,70
C5orf39	30,84	1,70
ANK1	21,84	1,70
IFI44	1039,63	1,69
LOC728730	20,29	1,69
ATP10A	54,36	1,69
SERPINF2	67,83	1,68
FOXO4	47,63	1,68
SVIL	20,65	1,68
MS4A7	34,42	1,68
CYTIP	1058,11	1,68
BANK1	879,24	1,68
UTRN	1240,16	1,68
OAS1	1024,75	1,68

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TP53INP2	38,49	1,67
CPEB3	50,90	1,67
RASGRP2	81,70	1,67
GLIPR2	29,95	1,66
RGS2	60,51	1,66
SOBP	29,24	1,66
PRKX	241,62	1,66
PSAP	757,27	1,66
NEO1	24,11	1,65
MAST4	60,73	1,65
SRGAP2P2	137,39	1,65
C19orf66	277,52	1,65
FYN	354,55	1,64
JHDM1D	169,62	1,63
FGD3	142,31	1,63
TNFRSF21	27,81	1,63
MOXD1	26,20	1,62
SNORD15B	35,09	1,62
CREM	246,83	1,62
FOSL1	23,01	1,62
TRIM38	748,68	1,61
TLR1	94,16	1,61
TSHZ2	77,71	1,61
YPEL3	87,51	1,61
SLA2	35,60	1,61
STAT2	1310,47	1,61
IPCEF1	102,95	1,61
LRP12	21,58	1,60
CECR1	76,37	1,60
CCL2	115,02	1,60
SCARNA21	224,29	1,60
BHLHE41	51,89	1,60
LAG3	39,13	1,59
MYO6	35,26	1,59
FDCSP	27,02	1,59
C16orf54	71,52	1,58
CD109	22,31	1,58
NCKAP1	31,99	1,58
SAMD9	1749,77	1,58
CSRNP1	112,67	1,58
MYO15B	58,96	1,58
TMEM156	91,93	1,58
PELI2	38,45	1,57
MCF2L2	27,01	1,57
PHLDA1	26,98	1,56
GAS7	132,44	1,56

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
SCN3A	27,10	1,56
NFIL3	37,55	1,56
IL1RN	35,58	1,56
DHX58	221,26	1,56
DDX58	880,00	1,56
CXXC1	371,04	1,56
STAT4	88,14	1,56
ABCA1	40,40	1,55
GPR82	37,55	1,55
CD5	157,11	1,55
SESN2	109,17	1,55
CLU	61,16	1,54
KIAA1683	23,74	1,54
ARID5B	1358,55	1,54
DUSP6	20,67	1,54
XYLT1	153,97	1,53
ATP9A	22,03	1,53
LPAR6	75,54	1,53
FAM107B	1530,63	1,53
GIMAP7	401,31	1,53
SLC7A11	155,20	1,52
SATB1	275,73	1,52
PDE4D	205,13	1,52
ACVR1	22,84	1,51
C6orf192	44,02	1,51
CXCL5	38,42	1,51
SETBP1	369,07	1,51
GPR174	56,19	1,51
BCL2L11	524,31	1,51
GPR155	102,99	1,51
HHEX	98,95	1,51
LOC286367	23,60	1,51
SHISA5	340,52	1,51
EIF4E3	59,83	1,51
RELL2	49,67	1,50
CD68	248,38	1,50
PYHIN1	99,91	1,50
S100A11	491,76	1,49
CLEC2B	104,03	1,49
GSN	77,31	1,49
LOC100506334	29,00	1,49
GBP3	124,93	1,49
SWT1	68,93	1,49
PARP12	554,27	1,49
PECAM1	20,19	1,48
TNS3	106,05	1,48

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ODF3B	42,78	1,48
STK38L	433,17	1,48
LAX1	70,92	1,48
EPB41L4A	20,53	1,47
ZBTB42	20,87	1,47
BLZF1	131,09	1,47
VAV3	157,24	1,47
VAMP5	21,03	1,46
GIMAP6	257,12	1,46
B2M	5656,83	1,46
SYTL1	99,18	1,46
MYO1F	77,92	1,46
FAM46C	228,39	1,45
C12orf35	2780,30	1,45
SAMD9L	2964,59	1,45
GALNT3	29,34	1,45
HDAC5	97,42	1,44
EPB41L3	21,91	1,44
CCDC71L	167,64	1,44
NUAK2	31,34	1,44
GPR171	55,49	1,43
DNAJB2	120,08	1,43
DDX60	990,36	1,43
BCL6	384,78	1,43
FCRL5	361,15	1,42
CTH	26,19	1,42
FAM122C	45,45	1,42
TSPYL2	275,52	1,42
USP18	494,52	1,41
IRF7	926,72	1,41
SLC44A2	320,82	1,41
RTKN2	52,98	1,41
LRRC27	38,14	1,41
RNF213	5017,62	1,41
NLRP1	176,27	1,41
LOC648987	56,09	1,41
SAMD12	20,30	1,41
ETS2	39,20	1,40
FLT1	25,25	1,40
PPP1R9A	23,45	1,40
CBWD2	190,49	1,40
KLLN	26,12	1,40
PDLIM7	44,63	1,40
PCDHGC3	22,92	1,40
LY9	85,84	1,39
ZNF513	108,11	1,39

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
FGR	88,28	1,39
BTBD11	23,78	1,39
LPIN2	373,89	1,39
DTHD1	26,11	1,38
PLEKHM1P	102,88	1,38
RTP4	117,58	1,38
CARD6	65,31	1,38
FCRL2	101,84	1,38
ITM2B	352,45	1,38
HDAC9	512,67	1,38
CD4	140,86	1,37
IFI44L	3894,56	1,37
ULK1	37,75	1,37
N4BP1	611,94	1,37
BCL2L14	27,87	1,37
SLFN5	921,96	1,37
DRAP1	918,75	1,37
ZSWIM6	91,38	1,36
PLCL1	27,85	1,36
CAMSAP2	25,39	1,36
SCIMP	89,44	1,36
GNB4	312,74	1,36
HERC6	642,02	1,35
SLC24A1	26,99	1,35
PSD3	55,07	1,35
TTC39B	32,42	1,35
SCARB2	116,83	1,35
EPST1L	1007,82	1,35
LOC388692	43,93	1,34
PTPN13	156,88	1,34
C13orf15	25,08	1,34
CALCRL	21,72	1,34
SELL	420,39	1,34
C1orf162	76,37	1,34
SLC12A6	388,26	1,34
DDIT3	83,91	1,34
LOC146880	40,56	1,34
TRAT1	110,28	1,33
SMCHD1	2112,58	1,33
LGALS3BP	122,10	1,33
PLAUR	22,64	1,33
PARP9	1154,51	1,33
FAM84B	55,83	1,33
RNF11	64,08	1,33
CD3G	58,59	1,32
RGS3	52,02	1,32

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ARHGEF3	356,41	1,32
PDCD1	74,54	1,32
TRIM5	414,54	1,32
TRIM22	1904,69	1,32
FAM105A	30,13	1,32
DYNC2H1	39,73	1,32
ZDHHC14	35,60	1,32
PAPD7	262,71	1,32
KIF21B	377,11	1,32
KLHL29	23,82	1,31
TYMP	583,94	1,31
NMT2	67,60	1,31
L3MBTL3	139,60	1,31
ABHD4	31,78	1,30
SH2D1A	65,57	1,30
FOSB	40,45	1,30
SNORA70	75,17	1,30
PARP11	259,25	1,30
CCPG1	25,39	1,30
PNPLA2	144,35	1,30
LY6E	1123,82	1,30
RASAL1	34,38	1,30
SUSD1	43,13	1,30
FCER1G	36,46	1,30
RARRES3	31,66	1,30
GIMAP8	97,12	1,29
EFCAB5	22,97	1,29
DIP2B	475,90	1,29
ITGB7	223,66	1,29
FILIP1L	29,17	1,29
PRRG4	55,26	1,29
SCARNA9	981,71	1,29
PPM1K	631,92	1,29
ADTRP	26,08	1,29
KLHL24	122,40	1,29
LOC338799	45,53	1,28
ENPP2	47,03	1,28
AGRN	60,99	1,28
ANTXR2	64,52	1,28
CMTM3	33,38	1,28
SERPINE1	20,64	1,28
SPRED1	23,71	1,28
ANKRD42	29,21	1,28
MXI1	66,64	1,28
ZNF516	81,58	1,28
AHI1	164,40	1,28

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ETV7	37,80	1,27
SLA	78,82	1,27
S100A6	149,22	1,27
IFIT5	574,31	1,27
UBASH3B	40,97	1,26
POU6F1	35,54	1,26
SNORD17	126,74	1,26
TNFSF13B	97,42	1,26
RNF19A	318,95	1,26
TP53INP1	187,80	1,26
EREG	24,31	1,26
BTBD3	70,52	1,26
DTX3L	2192,86	1,26
ZEB2	388,66	1,26
HSF5	34,89	1,26
ITGA5	29,37	1,26
DBN1	37,01	1,26
PRKCQ	101,50	1,26
CD8A	22,64	1,25
MAF	189,66	1,25
TRIB2	177,35	1,25
CHI3L2	75,47	1,25
TBL1X	244,29	1,25
LGALS8	242,57	1,25
CXCR6	37,09	1,25
AIM2	243,14	1,25
LOC100506023	26,06	1,25
KIAA1671	45,22	1,25
RHOH	296,94	1,25
TANC2	37,01	1,25
EVI2A	289,04	1,24
LILRA4	20,35	1,24
TRIM14	407,88	1,24
SERPINB6	59,02	1,24
FAM3C	243,95	1,24
IL7R	221,67	1,24
PDE7B	28,49	1,24
TMEM63A	104,48	1,24
FYB	598,59	1,24
TSPAN14	120,28	1,23
CA11	36,01	1,23
ACVR2B	29,73	1,23
ORAI2	428,50	1,23
PILRB	340,47	1,23
ERMAPP	29,81	1,23
HTR3A	39,59	1,23

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ZMYM1	40,21	1,23
AMIGO2	83,43	1,23
FEZ1	25,55	1,23
SERTAD1	38,70	1,23
CADM1	21,77	1,23
TTYH3	106,60	1,22
RHOBTB3	33,55	1,22
FAM8A1	39,89	1,22
KMO	119,68	1,22
PML	399,26	1,22
LCP2	200,30	1,22
DCUN1D3	22,84	1,22
DNAH1	100,71	1,21
HBP1	141,11	1,21
MMP9	82,01	1,21
ARMCX4	31,26	1,21
LOC401093	26,13	1,21
IFI35	325,42	1,21
FTL	19057,02	1,21
CUBN	22,39	1,21
EPHA4	28,05	1,21
TMEM154	169,24	1,21
WDFY1	804,35	1,21
MUC16	59,95	1,21
PRKAG2	91,04	1,21
CRAT	29,82	1,21
LAT	85,11	1,21
C5orf41	328,53	1,20
TESK1	139,49	1,20
FAM82A1	31,23	1,20
TMEM106A	104,81	1,20
TMEM66	573,63	1,20
SERPINA1	57,17	1,20
KLF9	91,30	1,20
IGJ	891,45	1,19
TNK2	265,15	1,19
TCIRG1	331,79	1,19
GPRASP1	37,65	1,19
APOL1	134,05	1,19
CARD11	588,82	1,18
EGR3	58,05	1,18
AQP9	22,59	1,18
RNF157	20,29	1,18
CD247	92,95	1,18
SIDT2	184,25	1,18
YPEL2	66,43	1,18

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
SCARNA10	132,50	1,18
SDCBP	218,26	1,18
ANXA1	31,56	1,18
LOC100216545	184,80	1,17
CD28	130,84	1,17
LYZ	89,87	1,17
SNORA12	202,99	1,17
IL6ST	636,02	1,17
KCNA3	106,62	1,17
TIPARP	530,60	1,17
ZFP36	642,54	1,17
ZCCHC2	529,76	1,17
GIMAP2	120,91	1,17
PGPEP1	33,02	1,17
EPHB6	37,34	1,17
ADAM17	233,25	1,17
SNORD94	23,07	1,16
RRN3P3	48,24	1,16
P2RX5	98,35	1,16
RERE	478,16	1,16
YPEL5	188,43	1,16
ZBTB20	176,09	1,16
FXYS5	428,71	1,16
EGR1	104,62	1,16
CHRN81	40,42	1,16
SRGAP2	301,67	1,16
C15orf39	229,53	1,16
LOC100505812	52,93	1,15
AGPAT4	25,68	1,15
PCDH9	70,90	1,15
WDR45	82,28	1,15
ARL8A	71,85	1,15
UBE2L6	708,50	1,15
GSDMB	70,61	1,15
OBSCN	43,22	1,15
DENND5B	262,88	1,15
UBA7	368,18	1,15
CD9	23,71	1,14
ZCCHC14	27,75	1,14
CD200R1	31,63	1,14
LRP10	260,55	1,14
NFIX	28,82	1,14
AFF1	447,07	1,14
CD6	196,86	1,13
APOLD1	24,27	1,13
ACADVL	337,81	1,13

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
BCL11B	152,19	1,13
JUP	144,83	1,13
FOXO3	88,64	1,13
SNORA23	32,12	1,13
PAN3-AS1	21,95	1,13
TRIM21	220,04	1,13
RNF149	88,70	1,13
IQGAP2	173,89	1,13
STX3	36,32	1,12
CPEB4	275,51	1,12
HNRPLL	91,71	1,12
CLSTN3	44,16	1,12
ITK	353,04	1,12
RAB30	206,05	1,11
C6orf1	40,77	1,11
LOC439949	52,74	1,11
BST2	520,91	1,11
MYADM	84,64	1,11
CD55	295,17	1,11
APBB2	38,19	1,11
MIDN	132,89	1,11
GKAP1	20,33	1,11
RNF24	27,61	1,11
MBOAT7	60,46	1,11
DEF8	124,91	1,11
GTPBP2	152,97	1,11
EV12B	734,12	1,10
CCR6	98,30	1,10
HCST	39,91	1,10
ZNRF2	277,39	1,10
METTL7A	67,02	1,10
SLC16A3	29,78	1,10
RASGRF2	38,12	1,10
CARD16	124,83	1,10
KCTD21	26,79	1,10
MBOAT1	24,57	1,10
PRKD2	425,26	1,10
LINC00115	30,24	1,10
ATG16L2	52,08	1,10
C3orf62	39,15	1,10
APOBR	127,86	1,09
C4orf34	245,03	1,09
LOC727896	28,00	1,09
SP110	997,51	1,09
SECISBP2L	571,03	1,09
ASCC1	156,33	1,09

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CHST12	74,35	1,09
CASP1	133,38	1,09
SELPLG	127,35	1,09
ABCA7	123,75	1,05
GPT2	33,38	1,05
MIR650	275,81	1,05
ACSS1	44,97	1,05
MAP1LC3B	266,79	1,05
ST6GAL1	1917,57	1,05
RHOBTB2	91,53	1,05
HEXIM1	228,87	1,05
AMFR	248,66	1,05
PNRC1	361,67	1,05
MED12L	33,15	1,05
LOC100130231	100,62	1,05
KIAA1841	26,54	1,04
DNAJC4	61,04	1,04
MSN	1997,84	1,04
PMAIP1	148,77	1,04
IRF2BPL	65,02	1,04
SYTL2	39,82	1,04
CD52	2022,25	1,04
MAST3	248,89	1,04
OSTF1	168,44	1,04
NMI	255,81	1,04
CALHM2	22,09	1,04
SESN3	272,99	1,04
BCORL1	63,55	1,03
OPTN	223,16	1,03
ARRDC3	281,66	1,03
TLR2	24,17	1,03
SOX5	139,20	1,03
SHC1	166,08	1,03
KIAA0040	518,58	1,03
CAPN3	40,68	1,03
CRIM1	42,10	1,03
AAK1	139,40	1,03
HIVEP2	670,95	1,03
C4orf3	168,43	1,03
SEMA4B	36,22	1,03
BSDC1	174,82	1,03
DMD	246,57	1,02
AQP3	30,06	1,02
MPP7	30,47	1,02
TGIF1	87,56	1,02
ERF	54,34	1,02

ANHANG

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
STIM1	91,92	1,09
PALLD	25,13	1,09
MAFK	65,77	1,09
ADAM28	184,22	1,08
PLXNA3	90,77	1,08
ARSD	27,90	1,08
P2RY10	392,55	1,08
ST3GAL1	147,70	1,08
PARP8	276,23	1,08
CTSB	268,28	1,08
SLCO4A1	66,42	1,08
SRXN1	21,85	1,07
BTN3A1	139,84	1,07
ERN1	39,08	1,07
OBFC2A	248,53	1,07
TNFRSF13B	403,21	1,07
SPATA13	255,61	1,07
CD8B	22,19	1,07
KLF5	27,71	1,07
FCHO1	81,97	1,07
WIPF1	1410,12	1,07
RNU12	25,76	1,07
DNASE2	43,18	1,07
FGL2	48,18	1,07
HERPUD2	241,08	1,07
ITSN1	22,64	1,07
ODF2L	117,76	1,06
DOCK4	26,93	1,06
PNPT1	441,83	1,06
KIAA1467	23,65	1,06
GRAP2	38,54	1,06
LOC254128	33,36	1,06
TAPT1	81,62	1,06
TSGA10	38,00	1,06
PDXDC2P	84,47	1,06
LDLR	110,47	1,06
FMNL1	477,61	1,06
ZBTB4	186,39	1,06
LMO4	99,89	1,06
GALM	47,90	1,06
PIM2	402,54	1,06
C18orf1	143,67	1,06
RIN3	142,77	1,06
KDM5B	207,96	1,06
EIF2C4	105,12	1,06
GNLY	21,51	1,05

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
RNF144A	35,43	1,02
NAPSB	276,75	1,02
AZ12	156,30	1,02
ALDH1L2	33,38	1,02
CLEC2D	2533,50	1,02
ARHGAP18	75,81	1,02
TBX21	32,80	1,02
ENTPD1	822,73	1,02
TSPAN5	25,62	1,02
SNX16	42,14	1,02
RNF166	39,82	1,02
HECA	291,27	1,02
TMEM2	118,74	1,01
FCRL1	176,55	1,01
LGMN	135,67	1,01
S1PR4	52,60	1,01
PIK3IP1	134,96	1,01
GTPBP1	423,94	1,01
SUN2	331,97	1,01
EEPD1	38,54	1,01
RBM47	60,75	1,01
RAPGEF2	113,42	1,01
XRN1	1316,15	1,01
CASP7	170,87	1,00
MXD1	105,24	1,00
APBB1	49,75	1,00
PTAFR	27,79	1,00
FBXO6	110,48	1,00
DNHD1	84,77	1,00
FGD2	411,13	1,00

Tabelle 4: Herabregulierte Gene in B-Zellen nach Inkubation mit VLPs

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CCL17	295,03	-5,27
TNFRSF8	121,74	-5,07
PRRT3	117,15	-4,44
SSTR2	87,97	-4,18
HOPX	242,72	-4,06
CCDC28B	208,92	-3,79
HMSD	35,38	-3,70
CRIP2	29,82	-3,50
ARHGAP31	554,03	-3,42
PVRL1	96,44	-3,41
TCFL5	122,22	-3,39
TYMS	162,07	-3,33
SYNPO	391,58	-3,28
DTL	133,37	-3,25
GINS2	63,44	-3,21
FSCN1	946,13	-3,20
ESAM	30,66	-3,19
MYB	222,84	-3,08
TNFAIP3	1953,47	-3,06
MREG	226,12	-3,02
ALPL	37,69	-2,97
CCL22	5285,46	-2,97
EBI3	1078,97	-2,93
MCM4	707,89	-2,89
JPH4	57,89	-2,88
ESCO2	116,25	-2,88
LMNA	447,84	-2,86
ANKRD33B	1083,02	-2,83
RRM2	413,99	-2,81
PAQR4	55,78	-2,80
NFKBIA	1538,56	-2,78
PCNA	1077,77	-2,77
CDCA7	298,46	-2,73
GATSL3	23,34	-2,72
CLIP2	330,22	-2,71
MCM10	112,52	-2,71
VIM	5290,66	-2,65
MGLL	244,71	-2,63
WDR91	311,53	-2,63
TESC	37,34	-2,62
HMGB3	65,20	-2,60
ICAM1	321,27	-2,60
RHOF	698,42	-2,58
C16orf59	23,79	-2,54
A4GALT	51,28	-2,54
CCL17	295,03	-5,27

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
GALNT14	50,95	-2,52
CHEK1	152,01	-2,51
CHEK1	152,01	-2,51
CDCA3	31,22	-2,50
EXO1	72,15	-2,50
SPC25	63,80	-2,47
E2F8	72,05	-2,46
KIAA0101	72,71	-2,46
KCNN4	288,16	-2,45
FCER2	559,03	-2,44
EZH2	475,61	-2,43
ZNF788	46,61	-2,43
SKA3	68,40	-2,43
MCM2	503,26	-2,43
NCF2	235,07	-2,41
SCARF1	34,70	-2,40
CRIP1	873,54	-2,39
FAM81A	43,55	-2,39
AKR7A2	53,12	-2,39
HIST1H3B	238,79	-2,38
UNG	102,84	-2,37
ERCC6L	37,58	-2,36
CCNA2	89,05	-2,36
SPECC1	181,77	-2,35
SNX22	163,30	-2,35
CXCL9	20,38	-2,34
OXTR	32,78	-2,34
NBEAL2	409,87	-2,34
TTK	76,51	-2,31
CDK1	100,09	-2,31
MELK	87,11	-2,31
TOP2A	471,63	-2,28
ZWINT	140,22	-2,28
RABL5	49,80	-2,27
EME1	26,48	-2,27
C1orf135	26,27	-2,27
MND1	25,04	-2,26
TNFAIP2	188,41	-2,25
TRIP10	279,81	-2,25
CNTNAP1	59,94	-2,25
CCNB2	82,24	-2,24
ASF1B	63,17	-2,24
STK33	26,45	-2,22
EEF2K	141,94	-2,21
CDC25A	65,52	-2,21
RFC3	143,52	-2,21

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
DSCC1	43,15	-2,21
FUT10	34,36	-2,20
FLOT2	667,33	-2,20
MLF1IP	82,07	-2,19
CDCA2	91,32	-2,19
HELLS	270,20	-2,18
CEP55	79,22	-2,17
FAS	349,79	-2,17
TRIP13	36,98	-2,16
CYB5A	63,52	-2,16
CENPF	394,15	-2,16
IL13RA1	174,61	-2,15
FEN1	329,32	-2,15
C15orf42	57,58	-2,14
NCAPH	107,81	-2,14
CERS4	136,80	-2,13
GMNN	126,10	-2,13
AURKB	67,09	-2,12
MAD2L1	59,96	-2,12
KIF2C	83,15	-2,12
MARCKS	945,14	-2,11
ACOT7	47,65	-2,11
NTHL1	33,67	-2,11
GNG8	37,20	-2,10
MCM7	705,95	-2,10
PODXL2	23,17	-2,10
LMNB2	431,98	-2,09
CD82	383,80	-2,08
SEPT11	370,14	-2,08
ORC1	68,53	-2,07
MSH6	520,55	-2,06
MTHFD1	435,46	-2,05
TUBB2B	36,99	-2,05
GPR114	110,45	-2,04
BATF3	30,41	-2,04
TMOD1	47,61	-2,04
BRCA1	177,33	-2,04
ZNF367	69,69	-2,03
PTGIR	45,16	-2,01
GRHPR	715,08	-2,01
PKMYT1	27,51	-2,00
BCL2L1	253,97	-2,00
ALDH2	83,06	-1,99
CDC6	108,26	-1,99
CXCR7	27,31	-1,99
C4orf46	118,40	-1,98

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
HIST1H1B	776,19	-1,98
ARNTL2	132,93	-1,98
CCDC167	149,06	-1,97
MTMR4	597,72	-1,97
GSTP1	724,75	-1,97
HIST1H2BL	506,30	-1,97
HADH	94,11	-1,96
NT5DC2	64,85	-1,96
TRIP2	122,99	-1,96
MYO1C	437,07	-1,96
KIAA1274	22,51	-1,96
CDC45	71,55	-1,95
BUB1B	164,02	-1,95
BIRCS	80,04	-1,94
HMMR	81,53	-1,94
CHAF1B	72,16	-1,94
DLGAP5	82,77	-1,94
KIF15	83,88	-1,93
CLSPN	270,63	-1,93
MSH2	272,55	-1,93
CDCA5	49,37	-1,92
RAD54L	57,14	-1,92
FAM162A	156,02	-1,92
LOXL3	34,46	-1,92
PHF16	224,81	-1,91
CDT1	68,94	-1,91
HIST1H2BM	307,76	-1,91
BHLHE40	353,74	-1,91
PAK1	132,72	-1,91
AICDA	231,45	-1,90
MKNK2	1234,18	-1,90
MKI67	1367,07	-1,90
HIST1H3C	650,74	-1,89
IRF5	336,39	-1,89
CTSH	770,26	-1,89
KDM2B	506,90	-1,89
SOCS2	38,50	-1,89
CKAP2L	58,85	-1,88
BRIP1	88,64	-1,88
CENPW	45,18	-1,88
CCDC34	53,93	-1,88
LSP1	1886,47	-1,88
BCAT1	712,30	-1,87
RAD51	47,77	-1,87
DENND4A	913,29	-1,87
MCM6	675,08	-1,87

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
XRCC2	48,90	-1,87
MMD	154,92	-1,86
CCNE1	32,23	-1,86
DUT	280,51	-1,86
SLAMF1	577,20	-1,85
NEK6	261,48	-1,85
NCAPG	162,76	-1,85
ABCC4	164,01	-1,84
STIL	81,61	-1,84
FANCI	186,16	-1,83
POLQ	152,68	-1,83
NFKBIE	496,36	-1,83
DHFR	75,97	-1,82
UBE2T	50,08	-1,82
CDC20	66,03	-1,82
GGH	46,54	-1,82
NFKB2	714,65	-1,82
ADCY3	180,37	-1,81
CTNNA1	64,47	-1,81
SEMA7A	601,28	-1,81
IL21R	875,33	-1,81
SAMD10	20,70	-1,81
HIST1H3J	312,52	-1,80
PBK	30,59	-1,79
USP13	69,47	-1,79
SLAIN1	74,36	-1,79
TPX2	213,18	-1,79
RRM1	520,65	-1,78
TMEM120A	73,06	-1,78
AMZ1	23,02	-1,78
CBFA2T3	165,59	-1,77
ADAM8	84,29	-1,77
SKP2	125,08	-1,77
DSE	151,41	-1,77
CCND2	1867,51	-1,77
DNA2	81,37	-1,77
NT5DC1	155,04	-1,77
GPR132	212,94	-1,77
SLC9A7	195,09	-1,76
LOC100132111	24,24	-1,76
TMEM97	76,03	-1,76
KCNMA1	81,18	-1,76
CD58	261,20	-1,75
RNASEH2A	60,11	-1,75
PARBP	45,51	-1,75
CPNE2	24,17	-1,75

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
KIF20A	50,04	-1,75
RFC2	266,27	-1,75
AFF3	933,77	-1,74
GADD45B	260,35	-1,74
CCNB1	200,03	-1,74
SGPP2	31,76	-1,74
MIS18A	99,15	-1,74
ATF5	440,95	-1,74
GPR55	45,02	-1,74
FAM129A	749,48	-1,74
PDGFD	26,06	-1,73
MIR146A	25,90	-1,73
SLC05A1	54,56	-1,72
ASPM	276,57	-1,72
DPY19L2P2	25,86	-1,72
PLK4	75,06	-1,72
KDM1B	110,79	-1,72
SHMT1	74,29	-1,71
P4HA2	20,56	-1,71
CARM1	230,93	-1,71
E2F1	30,67	-1,70
TFRC	864,53	-1,70
DTYMK	79,82	-1,69
GPHN	113,32	-1,69
UNC119	75,93	-1,69
TP73	20,51	-1,69
HIST1H3G	76,91	-1,69
TK1	53,99	-1,69
THOP1	246,01	-1,68
DPYSL2	189,67	-1,68
STMN1	209,90	-1,67
TAGLN2	1266,59	-1,67
COCH	40,05	-1,67
CDKN3	84,95	-1,66
CENPK	73,33	-1,66
MCM3	837,93	-1,66
LOC100129034	240,78	-1,65
VAV2	253,14	-1,65
PDCD5	366,82	-1,65
KIF18B	27,35	-1,65
TSPAN33	468,98	-1,65
CAD	466,96	-1,64
PIK3CD	1028,62	-1,64
BLVRA	83,26	-1,64
EPB41L2	444,17	-1,64
BATF	146,40	-1,64

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
FAM105B	690,77	-1,63
LINC00265	42,03	-1,63
CBX5	1054,23	-1,63
NUSAP1	307,53	-1,63
NIT2	128,64	-1,63
TMEM201	56,02	-1,62
POLA2	230,91	-1,62
ZNF287	36,44	-1,62
C7orf49	124,70	-1,62
CSF2RB	581,01	-1,62
GINS3	54,93	-1,62
CCNE2	51,98	-1,62
GCSH	20,74	-1,62
RAD51AP1	82,85	-1,62
SHCBP1	75,30	-1,61
KIF11	222,64	-1,61
SPAG5	166,29	-1,61
IL7	25,21	-1,60
RAD54B	43,96	-1,60
SCCPDH	76,71	-1,60
AURKA	72,68	-1,59
PRDX2	95,86	-1,59
IL41	213,70	-1,59
IKBKE	172,73	-1,59
TRAF1	2247,54	-1,59
FNBP1	1894,17	-1,59
RFC5	215,89	-1,58
EIF2D	299,97	-1,58
CENPM	67,19	-1,58
ZC3H12C	75,67	-1,58
RASSF4	57,26	-1,58
CHAF1A	210,18	-1,58
MAP3K8	260,94	-1,58
PDCD2L	68,77	-1,58
LCP1	8676,25	-1,57
LOC100130744	110,64	-1,57
GOT2	342,05	-1,57
MYBL2	435,42	-1,57
SMC2	356,08	-1,56
LHFPL2	171,63	-1,56
GINS4	71,90	-1,56
WDHD1	147,53	-1,56
PNKD	106,16	-1,56
HERC1	1703,60	-1,55
RFC4	154,19	-1,55
HMG2	755,06	-1,55

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PIK3R5	144,97	-1,55
DBI	439,62	-1,55
ANLN	79,72	-1,54
CEP78	62,54	-1,54
SVIP	86,92	-1,54
HIST1H2AL	454,97	-1,54
PSMC3IP	58,22	-1,54
HYLS1	26,88	-1,54
NEK2	25,08	-1,53
MIPEP	58,17	-1,53
CCNF	53,45	-1,53
TUBB2A	42,99	-1,53
IRF4	1293,77	-1,53
KIAA1524	118,45	-1,52
FOXO1	71,47	-1,52
RXRA	28,33	-1,52
LPCAT1	594,72	-1,52
BUB1	185,46	-1,52
GTSE1	50,70	-1,52
C1orf115	57,03	-1,52
CDC7	72,42	-1,51
ESPL1	82,11	-1,51
CRELD2	99,36	-1,51
TARBP1	227,10	-1,51
SLC37A4	46,14	-1,51
IFT172	46,86	-1,50
NCAPD3	180,83	-1,50
ORC6	75,39	-1,50
KIF24	36,74	-1,50
MIIP	131,96	-1,50
HRSP12	26,81	-1,50
PRKDC	2296,05	-1,50
FAM173B	39,64	-1,50
VOPP1	372,37	-1,49
SFT2D1	205,65	-1,49
RECQL4	43,59	-1,49
GINS1	72,21	-1,48
DHCR24	272,98	-1,48
TMEM170B	61,05	-1,48
POLE2	45,59	-1,48
KIF23	88,40	-1,48
TEC	166,83	-1,48
POC1A	32,18	-1,48
TRAP1	434,30	-1,48
DENND3	245,41	-1,48
ZDHC23	32,76	-1,48

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
MGAT3	124,71	-1,48
FAM104B	41,50	-1,47
BIRC3	2337,41	-1,47
ITGA1	41,04	-1,47
LRP8	202,60	-1,47
C10orf58	33,68	-1,47
FLNA	2263,62	-1,47
SEMA4C	24,65	-1,46
CASC5	203,50	-1,46
TMEM106C	65,14	-1,46
FAHD2A	30,33	-1,46
STAT5A	483,32	-1,46
CFP	29,50	-1,45
HAUS4	55,58	-1,45
VCL	136,05	-1,45
HIST1H2AH	528,95	-1,45
KIF4A	49,45	-1,45
SLC25A15	43,74	-1,45
SLC29A1	130,58	-1,45
PAX5	1067,38	-1,45
BRI3BP	29,45	-1,44
TROAP	56,56	-1,44
NDFIP2	73,01	-1,43
PTGES2	162,28	-1,43
CCDC102A	35,92	-1,43
DONSON	54,12	-1,43
ZFHX2	27,93	-1,43
CAT	211,98	-1,43
ALDH5A1	81,14	-1,43
FLVCR2	27,51	-1,43
ARSB	192,38	-1,42
CPOX	100,18	-1,42
TMPO	1022,06	-1,42
CTPS2	63,95	-1,42
TFDP1	297,37	-1,42
TIFA	221,94	-1,42
PIF1	24,36	-1,42
PLXNA1	105,92	-1,42
CENPH	79,71	-1,42
C11orf82	49,39	-1,42
WDR76	260,44	-1,41
DEPDC1	52,84	-1,41
ALDOC	81,97	-1,41
NDE1	469,61	-1,41
RGS10	265,95	-1,41
GALNT6	32,13	-1,41

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
FAM136A	259,83	-1,41
ZNF280B	22,85	-1,40
ATAD2	309,89	-1,40
MBOAT2	28,39	-1,40
CYB561	32,14	-1,40
ARHGAP11A	105,21	-1,40
RBBP9	95,79	-1,40
SLC43A3	567,87	-1,39
ZNF318	832,66	-1,39
MFSD2A	59,37	-1,39
BMP2K	486,33	-1,39
AP1S3	101,21	-1,39
CR2	282,40	-1,39
TYSND1	48,33	-1,38
LOC100506844	23,98	-1,38
GPX4	304,13	-1,38
TRAF3	438,07	-1,38
SLC44A1	156,34	-1,38
HMG3	567,98	-1,38
SMS	315,62	-1,38
ECT2	95,79	-1,37
TONSL	73,60	-1,37
RAP2A	338,51	-1,37
PARP1	1610,74	-1,37
PRR11	86,99	-1,37
TLCD1	29,46	-1,37
DHODH	30,79	-1,36
CEP135	336,04	-1,36
CCDC141	239,93	-1,36
TRAIIP	22,98	-1,36
ARHGDIIB	3949,81	-1,35
HIST1H2AE	396,85	-1,35
MCM5	595,68	-1,35
FHOD1	156,46	-1,35
ATAD5	161,15	-1,35
B4GALT5	304,73	-1,35
GGCT	121,09	-1,34
IZUMO4	59,77	-1,34
PTRHD1	59,03	-1,34
C4orf27	50,55	-1,34
DOCK10	1288,65	-1,34
CSTF2	172,34	-1,34
WDR62	50,36	-1,33
PYCR1	143,33	-1,33
CCDC106	40,77	-1,33
NCAPG2	139,69	-1,33

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TTF2	251,57	-1,33
SLC35F2	149,30	-1,33
GPAM	88,24	-1,33
IL15	29,10	-1,33
GLRX5	86,85	-1,33
SIVA1	99,82	-1,33
AGPAT3	372,70	-1,32
TCTN1	80,26	-1,32
CENPO	53,06	-1,32
HTRA2	185,83	-1,32
DEPDC1B	34,02	-1,31
MCM8	290,26	-1,31
SLC15A4	265,54	-1,31
CENPE	237,73	-1,31
CPNE8	80,93	-1,31
LGALS3	110,41	-1,31
FH	233,57	-1,31
GATM	67,24	-1,31
CSE1L	855,99	-1,31
FAM213B	33,37	-1,31
FMNL3	741,64	-1,30
SNORD36A	21,18	-1,30
MCOLN2	357,83	-1,30
CAMKK2	130,93	-1,30
BRP44L	78,74	-1,30
SNX11	257,20	-1,30
BCKDHB	66,59	-1,30
TET3	325,71	-1,30
STARD10	37,53	-1,30
LOC400958	27,37	-1,30
PDGFA	22,30	-1,29
LACTB	143,61	-1,29
KIF14	61,29	-1,29
HIST2H2BF	1425,25	-1,29
C1orf186	39,67	-1,29
NUDT1	90,75	-1,29
ANP32A	1238,85	-1,29
TPGS2	175,49	-1,29
CABLES2	70,46	-1,29
SLC25A37	34,80	-1,29
ZNF90	43,24	-1,29
FIGL1	93,55	-1,29
CDCA8	60,18	-1,29
C6orf108	124,35	-1,29
MMS22L	149,51	-1,29
CHKA	43,44	-1,28

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
SEC61A2	43,56	-1,28
PAICS	848,42	-1,28
MRPS33	160,51	-1,28
DNAJC9	152,35	-1,28
LSMD1	216,35	-1,28
RFX2	26,17	-1,28
IMMP1L	31,24	-1,28
DHRS13	49,65	-1,28
ALDH4A1	33,61	-1,27
RNFT2	27,64	-1,27
HLTF	121,25	-1,27
ENO2	53,17	-1,27
HN1L	299,29	-1,27
NFE2L3	38,67	-1,26
TUBG1	321,76	-1,26
SUV39H2	63,59	-1,26
FOXRED2	43,77	-1,26
ZAK	174,59	-1,26
MAPK13	51,99	-1,26
FLNB	192,66	-1,26
ZMAT3	240,17	-1,26
PLOD1	71,89	-1,25
PDE9A	27,27	-1,25
ICMT	120,15	-1,25
EPM2AIP1	508,68	-1,25
LDHB	2047,87	-1,25
CXXC5	141,94	-1,25
C20orf27	36,40	-1,25
NCAPD2	367,69	-1,25
CDCA4	106,57	-1,24
HJURP	64,16	-1,24
CENPI	46,40	-1,24
COBL1	761,10	-1,24
MARCKSL1	404,36	-1,24
BEND5	27,03	-1,24
HIST1H4H	388,10	-1,24
PM20D2	158,34	-1,24
RMI1	74,99	-1,24
HIST1H3D	152,88	-1,24
SRI	355,91	-1,24
CPSF3	400,86	-1,24
FBXL18	83,38	-1,24
DHTKD1	297,87	-1,23
PTPLB	93,46	-1,23
IPO5	957,60	-1,23
GNG11	30,96	-1,23

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
C8orf37	37,64	-1,23
COMMD1	140,10	-1,23
FAM213A	35,89	-1,23
TFPI2	23,78	-1,23
TYK2	436,74	-1,23
DCPS	110,94	-1,22
PSMG1	112,43	-1,22
PPP1R7	447,76	-1,22
CNR2	69,60	-1,22
BTN2A2	170,73	-1,22
LRRC45	20,84	-1,22
PPP1R9B	1004,25	-1,22
BDH1	57,43	-1,22
DSN1	49,27	-1,22
IQSEC1	725,83	-1,21
SNORA76	61,99	-1,21
PRDX3	656,93	-1,21
RAD18	159,98	-1,21
HEATR2	125,97	-1,21
UBE2C	59,86	-1,21
TCL1A	604,07	-1,21
DDB2	128,38	-1,21
C15orf23	79,70	-1,21
PDSS1	44,06	-1,21
TKT	840,98	-1,21
FANCD2	204,02	-1,21
PHGDH	119,09	-1,21
KIF1C	186,84	-1,21
FSD1L	60,99	-1,20
ST3GAL5	115,94	-1,20
ZSCAN2	43,85	-1,20
CIITA	876,56	-1,20
DTX4	45,31	-1,20
POLD3	151,38	-1,20
SGOL1	68,84	-1,20
PTTG1	103,91	-1,20
FAH	38,23	-1,20
PLK1	59,63	-1,20
DIAPH3	66,19	-1,19
BID	434,90	-1,19
PKIA	30,95	-1,19
SNN	184,57	-1,19
EHD1	703,16	-1,19
VRK1	203,16	-1,19
HIST1H4A	45,55	-1,19
RUVBL1	245,17	-1,18

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TSPYL5	62,72	-1,18
NIPAL2	31,38	-1,18
SEPT8	31,73	-1,18
PRIM1	62,12	-1,18
ZFP64	68,98	-1,18
FADS2	129,36	-1,17
SMC4	718,86	-1,17
ANP32E	1041,64	-1,17
CD80	233,42	-1,17
ABHD6	42,27	-1,17
CD3EAP	82,12	-1,17
ZNF93	79,05	-1,17
XRCC3	34,69	-1,17
NAV2	30,04	-1,17
ADI1	56,90	-1,17
ACAT2	286,95	-1,17
UBAC1	55,55	-1,17
POLR1E	287,52	-1,17
ORC3	163,70	-1,17
NUP37	103,60	-1,16
AUTS2	58,25	-1,16
BASP1	1574,95	-1,16
SKA1	28,73	-1,16
ATP5G1	293,45	-1,16
SMARCA2	738,33	-1,16
RBFA	59,46	-1,16
AKR1A1	376,47	-1,16
ERI3	68,73	-1,16
HIST1H2BJ	242,33	-1,16
AFF2	165,07	-1,16
OBFC2B	137,03	-1,15
SLC16A1	220,94	-1,15
CD40	1281,55	-1,15
HIST1H4L	293,04	-1,15
PRKAR1B	62,58	-1,15
CCDC51	46,00	-1,15
RFK	76,77	-1,15
SLC1A1	37,72	-1,15
PASK	230,69	-1,15
PAFAH1B3	45,96	-1,15
NREP	37,42	-1,15
RTTN	163,15	-1,15
LOC283663	132,23	-1,15
GRN	959,05	-1,14
ACTB	20514,81	-1,14
LDHA	1799,51	-1,14

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
NLN	181,76	-1,14
ALCAM	412,08	-1,14
HYOU1	729,52	-1,14
C1orf112	69,57	-1,14
FUT7	57,63	-1,14
SCARB1	128,90	-1,14
GTF3C4	168,36	-1,14
SUPT16H	1337,01	-1,14
NIPSNAP1	105,30	-1,14
HMG2	1645,73	-1,14
LAT2	494,67	-1,14
DRAM1	38,29	-1,13
IMPDH2	776,40	-1,13
DSTN	144,55	-1,13
ASXL1	734,69	-1,13
TRAF4	292,13	-1,13
C16orf42	146,35	-1,13
VDAC3	195,78	-1,13
C9orf46	126,92	-1,13
SEMA4A	249,00	-1,13
TUBGCP5	75,32	-1,12
ZFH3	91,60	-1,12
WEE1	261,10	-1,12
HIST1H4F	148,07	-1,12
ZMYND19	30,34	-1,12
PARK7	656,68	-1,12
MAPK11	23,92	-1,12
SSRP1	883,18	-1,12
LOC283070	47,37	-1,12
POLA1	237,40	-1,12
TMEM14C	76,83	-1,12
KIF3B	330,59	-1,12
CCND1	50,45	-1,12
HMBS	46,43	-1,12
UTP20	542,89	-1,12
WBP5	39,38	-1,12
DGAT2	34,55	-1,12
FN3KRP	51,32	-1,12
BLM	153,92	-1,12
ZYG11A	21,42	-1,12
TTN	1745,03	-1,12
RACGAP1	171,06	-1,11
MSL3P1	27,05	-1,11
HILPDA	23,84	-1,11
PLIN3	148,19	-1,11
FANCB	45,02	-1,11

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
SLC20A1	271,45	-1,11
SEC11C	406,01	-1,11
ZWLCH	109,96	-1,10
RGS14	71,10	-1,10
SAAL1	161,51	-1,10
HSPA14	118,89	-1,10
IGSF3	38,15	-1,10
PGP	56,65	-1,10
AFMID	56,21	-1,10
DPP3	167,47	-1,10
ATP6VOE2	27,85	-1,10
PPA1	391,29	-1,10
WRAP53	49,46	-1,10
PMS1	176,78	-1,10
TMEM48	227,99	-1,10
FAM102B	56,68	-1,09
CCR4L	22,60	-1,09
BCL2L12	63,70	-1,09
FAM111B	400,40	-1,09
SLBP	213,85	-1,09
C5orf30	35,17	-1,09
COX16	193,30	-1,09
SGOL2	74,61	-1,09
NCOA1	565,09	-1,09
ISOC2	85,78	-1,09
VPS13A	762,62	-1,09
UCHL1	57,00	-1,09
TIPIN	153,56	-1,09
CCNG1	299,59	-1,08
HIST1H2BE	598,35	-1,08
NUP62	641,77	-1,08
EPS15	1429,66	-1,08
OLA1	498,04	-1,08
RFFL	32,10	-1,08
PRIM2	104,92	-1,08
MTERFD2	422,96	-1,08
SET	2822,90	-1,08
FKTN	124,81	-1,08
CYP2U1	25,37	-1,07
TOR3A	158,52	-1,07
YEATS4	123,40	-1,07
TIMM8A	108,76	-1,07
ARMC9	24,29	-1,07
MVK	41,93	-1,07
URB2	166,56	-1,07
SNHG4	56,50	-1,07

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CCDC99	125,56	-1,07
PFN1	3184,30	-1,07
C2CD2	43,58	-1,07
FAM54A	22,70	-1,07
SCFD2	248,54	-1,07
NUP155	483,90	-1,06
POFUT1	199,77	-1,06
H2AFZ	698,09	-1,06
FAIM	49,77	-1,06
ZNF286A	66,48	-1,06
RABEPK	75,48	-1,06
RDX	245,15	-1,06
RASSF2	1302,88	-1,06
TUBA1B	2473,73	-1,06
GMPS	366,87	-1,06
PSIP1	725,61	-1,05
ATIC	655,35	-1,05
C21orf59	130,82	-1,05
PCCB	95,41	-1,05
BOLA3	101,26	-1,05
FBX05	102,19	-1,05
DTX2	80,16	-1,05
NOP14	632,59	-1,05
PET117	44,54	-1,05
AGTPBP1	170,09	-1,05
NAT14	20,57	-1,05
C17orf79	50,42	-1,05
CBX1	384,50	-1,05
ENOSF1	32,77	-1,05
MFI2	83,10	-1,04
PARM1	104,93	-1,04
MDH1	356,44	-1,04
C2orf76	66,56	-1,04
NRP2	56,17	-1,04
ZIK1	32,40	-1,04
N6AMT2	34,54	-1,04
ALDH18A1	259,12	-1,04
GPI	566,11	-1,04
VDAC1	1896,61	-1,04
HMGB1	1077,55	-1,04
THYN1	75,00	-1,03
SNORD96A	30,03	-1,03
FYTTD1	1037,83	-1,03
USP1	385,12	-1,03
CDK4	300,06	-1,03
RBBP8	212,74	-1,03

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
UAP1L1	26,39	-1,03
BCL7C	48,81	-1,03
POP7	82,95	-1,03
CHCHD3	268,17	-1,03
FOXP4	174,46	-1,03
MLST8	153,53	-1,03
G3BP1	1439,67	-1,02
NAP1L1	2613,83	-1,02
HIST1H2AB	91,53	-1,02
PAK1IP1	146,28	-1,02
ACACA	241,43	-1,02
SFXN2	78,90	-1,02
PRPF40B	35,02	-1,02
IFFO2	91,67	-1,02
MCMBP	296,56	-1,02
AZI1	66,29	-1,02
C11orf51	111,14	-1,02
SOCS6	25,11	-1,01
NPAT	680,98	-1,01
AHCY	278,40	-1,01
SRPK1	472,35	-1,01
BCL2A1	495,59	-1,01
TRAPPC5	130,60	-1,01
BAD	47,04	-1,01
TMEM50B	125,90	-1,01
UCK2	162,68	-1,01
C1orf201	27,09	-1,00
RPGRIP1L	71,68	-1,00
PLD2	43,02	-1,00
PAQR8	113,78	-1,00
SGK196	48,71	-1,00
C4orf21	125,02	-1,00
GNPNAT1	88,68	-1,00
C12orf52	40,31	-1,00
SLC1A4	217,09	-1,00
UROS	113,31	-1,00

Tabelle 5: Hochregulierte Gene in B-Zellen nach Inkubation mit gp350-EV

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung	Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung	Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung	Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TNFRSF8	119,84	4,90	USP18	111,99	2,42	AICDA	219,06	2,16	FAM129A	704,62	2,02
CCL17	293,21	4,64	ICAM1	320,13	2,42	FKBP4	396,92	2,15	PNO1	274,42	2,02
SSTR2	85,23	4,59	LINC00158	44,09	2,41	SCFD2	201,69	2,15	LOC100130744	101,04	2,02
PRRT3	114,73	4,43	BID	352,64	2,41	RCN1	121,88	2,15	FAM162A	151,12	2,02
CCDC28B	204,31	3,84	DTL	141,10	2,39	BCL2L1	244,03	2,15	SEPT11	366,45	2,02
EBI3	1003,15	3,82	TMOD1	44,95	2,38	UCK2	130,37	2,14	NLN	152,80	2,01
MIR155HG	1149,90	3,67	ESAM	32,53	2,38	NFKBIE	465,41	2,14	C1orf135	26,61	2,01
HMSD	35,07	3,56	PCNA	1096,68	2,38	FEN1	323,34	2,13	BLVRA	77,24	2,01
CXCL10	60,22	3,47	WDR91	313,34	2,37	ESCO2	123,84	2,13	NHP2	382,68	2,01
LMNA	421,51	3,46	SLC29A1	111,51	2,37	GINS2	69,05	2,13	CLIP2	351,92	2,01
FCER2	516,28	3,14	IFIT1	295,86	2,37	OAS3	820,31	2,12	FAM86A	46,48	2,01
TRIP10	253,27	3,06	EZH2	470,98	2,36	GPHN	104,35	2,12	BATF3	30,07	2,00
ANKRD33B	1045,01	3,04	OXTR	31,97	2,36	KCNN4	292,91	2,12	RANBP1	506,73	2,00
PVRL1	96,86	3,03	MRPL12	209,30	2,36	DGAT2	28,48	2,11	ATIC	541,92	2,00
HOPX	250,41	2,99	MCM2	496,87	2,35	PSME2	1418,41	2,11	SLAMF1	553,08	2,00
CRIP2	30,14	2,99	FARSB	259,92	2,34	ABCC4	154,89	2,11	RAN	1610,52	2,00
TNFAIP3	1931,94	2,95	TLCD1	24,76	2,32	DSCC1	42,84	2,10	PRMT1	373,10	1,99
ARHGAP31	561,52	2,95	THOP1	220,95	2,30	DCTPP1	185,16	2,10	SLIRP	232,20	1,99
TRAF1	1886,32	2,86	PDCD2L	60,57	2,29	PTGER4	423,22	2,10	TYMS	181,95	1,99
JPH4	57,35	2,80	PAICS	711,89	2,29	CXCL9	20,68	2,10	HSPA8	8060,09	1,99
ATF5	377,04	2,79	NFKBIA	1584,82	2,28	IFIH1	515,88	2,10	TESC	39,63	1,99
MGLL	236,48	2,77	VDAC1	1508,65	2,28	CCDC86	164,52	2,09	SPECC1	186,81	1,98
LOXL3	30,51	2,76	CCND2	1699,25	2,27	MARCKS	932,52	2,09	SRM	309,28	1,98
FSCN1	956,28	2,72	NPM3	92,92	2,27	CRIP1	889,72	2,09	COMMD1	120,06	1,98
IL411	178,40	2,70	SELRC1	92,35	2,27	SNX11	221,54	2,08	PDSS1	37,74	1,98
NME1	104,86	2,68	LCP1	7722,79	2,26	PPA1	324,65	2,08	TRIP13	37,18	1,98
SOCS2	34,93	2,62	SNRPD1	896,03	2,26	ISOC2	70,30	2,08	RPL22L1	448,95	1,97
PYCR1	116,99	2,62	HSPD1	1612,26	2,25	GPATCH4	670,05	2,08	CPNE2	22,98	1,97
MREG	229,49	2,60	MTHFD1	416,87	2,25	B4GALT5	266,29	2,08	EBNA1BP2	241,94	1,97
TCFL5	127,14	2,60	SLC43A3	487,21	2,25	SYNPO	429,67	2,08	GMNN	127,23	1,96
LOC100132111	21,29	2,60	MRT04	231,19	2,25	PSMA6	633,73	2,07	TMCC3	99,10	1,96
BCAT1	640,81	2,60	METTL1	64,40	2,24	SCARF1	35,34	2,07	ARNTL2	131,15	1,96
MCM10	111,93	2,55	ISG15	577,60	2,23	CDC25A	65,58	2,06	C1QBP	524,35	1,95
TUBG1	260,23	2,55	SLC35F2	126,89	2,22	FAM105B	636,77	2,06	C16orf59	25,14	1,95
TUBB2B	34,14	2,55	MYB	237,80	2,21	HSP90AB1	7336,93	2,06	NPM1	3904,62	1,95
SNORA76	49,29	2,53	VIM	5448,21	2,21	SLCO5A1	50,67	2,05	STAG3	89,06	1,95
RHOF	689,48	2,51	TNFAIP2	185,64	2,21	CDK6	787,55	2,05	CHEK1	159,45	1,95
CD80	187,22	2,48	ATP5G1	241,60	2,20	LRRC32	34,01	2,05	HSP90AA1	5935,76	1,95
LMNB2	404,16	2,47	HSP90AB3P	265,72	2,20	BYSL	109,40	2,05	MF12	69,39	1,94
CCL22	5427,49	2,47	TIPIN	124,34	2,19	MTMR4	581,93	2,04	CHAF1B	70,42	1,94
ZNF788	45,51	2,47	PTGIR	43,24	2,19	CCT5	1017,62	2,04	TRAP1	394,25	1,94
MCM4	723,38	2,47	BOLA3	81,47	2,18	BCL2A1	403,94	2,04	CCDC124	272,08	1,94
HSPE1	179,42	2,46	IPO4	369,31	2,17	CDK4	245,36	2,04	PFAS	238,93	1,94
SEMA7A	543,21	2,44	GNG8	36,10	2,17	PHB	672,30	2,03	RRM2	447,04	1,93
PDCD5	322,77	2,43	CD58	242,50	2,17	RRP12	242,35	2,03	MCM6	654,57	1,93
SNHG4	44,20	2,43	DUSP4	343,85	2,16	AIMP2	77,64	2,03	SRI	309,61	1,93

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
BASP1	1346,79	1,93
POLD2	320,03	1,93
RUVBL1	210,76	1,93
RUVBL2	244,72	1,92
FASN	456,08	1,92
TUBA1B	2072,64	1,92
RRS1	206,51	1,91
EIF5A	1570,44	1,91
CARM1	219,34	1,91
GNL3	808,50	1,91
TOMM40	142,43	1,91
CTNNAL1	62,42	1,91
GRHPR	711,13	1,91
MX1	1454,09	1,90
PHGDH	103,54	1,90
CCT6A	991,81	1,90
PKM2	3278,65	1,90
NOP14	529,83	1,89
CSTF2	153,83	1,89
NCL	8209,21	1,88
CPSF3	351,56	1,87
SHFM1	650,80	1,87
RAB13	117,61	1,87
C3orf26	144,53	1,87
RPP40	65,63	1,86
PSMG1	98,44	1,86
CLN6	130,07	1,86
DDX21	1475,44	1,85
GALNT14	54,69	1,85
FAM136A	236,61	1,85
ALPL	42,02	1,85
IL21R	852,88	1,85
UBE2E1	582,34	1,85
MSH6	526,53	1,84
NEFM	51,16	1,84
UTP20	466,50	1,84
PPP1R14B	170,15	1,84
POLR1B	270,83	1,84
CAD	443,63	1,83
EME1	27,53	1,83
PSAT1	90,81	1,83
PTGES2	149,16	1,83
NOP16	127,29	1,82
PES1	373,20	1,82
FAM81A	46,15	1,82
ZWINT	146,04	1,81

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PHF16	224,22	1,81
ENO1	2232,44	1,81
FYTTD1	880,03	1,81
PAK1IP1	123,72	1,81
MTERFD1	138,31	1,81
CCT7	999,79	1,80
LAP3	415,12	1,80
BCS1L	108,01	1,80
MCOLN2	321,99	1,80
PRDX3	579,82	1,80
NOLC1	892,20	1,80
MMD	153,31	1,79
ORC1	70,57	1,79
WDR18	94,28	1,79
WDR12	170,53	1,79
C4orf46	119,83	1,79
DCAF13	300,64	1,78
MTHFD1L	262,76	1,78
RRM1	510,84	1,78
POLA2	220,03	1,78
RFC2	259,41	1,78
RPF2	134,63	1,78
DENND4A	910,10	1,78
EIF2AK2	665,18	1,78
GINS3	52,40	1,77
PPIL1	147,76	1,77
IRF5	335,92	1,77
ADCY3	178,22	1,77
CSE1L	774,21	1,77
BOP1	54,81	1,77
EXO1	78,03	1,77
ODC1	621,90	1,77
MYO1C	440,39	1,77
PSMD1	596,03	1,76
CCT3	1022,12	1,76
CCT4	1147,04	1,76
COX16	166,37	1,76
IMPDH2	675,95	1,76
MTHFD2	532,09	1,76
PA2G4	786,04	1,76
GGH	46,23	1,76
LSM6	378,32	1,76
RSAD2	210,35	1,76
HELLS	281,67	1,75
MRPL39	349,00	1,75
IPO5	855,50	1,75

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
EIF5AL1	189,09	1,75
RABL5	52,56	1,75
TSR1	383,08	1,75
RFC5	205,54	1,75
PSMC3IP	55,08	1,75
ARL2	31,53	1,75
MRPL17	141,03	1,75
MRPL24	136,40	1,75
CTPS	221,86	1,74
GOT2	326,12	1,74
SSRP1	771,08	1,74
SMS	290,68	1,74
TOMM5	273,38	1,74
CISD1	130,74	1,73
UTP15	168,52	1,73
PRMT5	287,68	1,73
SLC38A5	85,48	1,73
ERCC6L	40,45	1,73
SKA3	73,66	1,73
HNRNPAB	469,29	1,73
ASUN	269,59	1,73
SUV39H2	57,62	1,72
NDUFAB1	210,27	1,72
CSF2RB	559,99	1,72
CDCA7	332,58	1,72
FAM195A	38,88	1,72
SLC25A19	168,59	1,71
ACSL1	268,20	1,71
RAB8B	1847,69	1,71
COX17	311,84	1,71
POLR1E	254,01	1,71
MKI67IP	382,28	1,71
SNRPC	394,82	1,71
MCM7	731,81	1,71
CCT2	753,47	1,71
ACOT7	49,60	1,71
BRCA1	182,44	1,70
EHD4	244,03	1,70
MFSD2A	54,84	1,70
FAH	33,99	1,70
UQCRL	27,99	1,70
ATOX1	168,15	1,70
CENPW	45,69	1,70
CPNE8	73,78	1,70
AHCY	238,73	1,70
CNTNAP1	63,78	1,69

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PDCL3	232,73	1,69
ABTB2	117,17	1,69
COX5A	352,89	1,69
PLEK	653,06	1,69
FAM207A	38,29	1,69
PRKDC	2183,73	1,68
POLR1A	412,10	1,68
POLR3G	57,13	1,68
ARSB	180,44	1,68
CDCA2	96,47	1,68
USMG5	650,88	1,68
DTYMK	78,39	1,68
AP1S1	45,58	1,68
PLOD1	64,77	1,68
MND1	27,00	1,68
PRMT3	188,23	1,68
UNG	111,25	1,67
MCM3	819,65	1,67
POLR2I	165,50	1,67
CLSPN	276,39	1,67
YWHAE	1381,44	1,67
CHDH	23,81	1,67
NPTX1	23,11	1,66
DNAJA1	1311,81	1,66
NFKB2	717,19	1,66
FAS	368,22	1,66
SMC2	344,03	1,66
NDUFB3	281,85	1,66
HSPA9	1152,60	1,66
FH	215,52	1,66
UHRF1	122,46	1,65
NUDC	506,81	1,65
NCAPH	113,70	1,65
PAX5	1009,63	1,65
MYBBP1A	365,98	1,65
MRPL22	279,98	1,65
CDC6	111,72	1,65
OLA1	437,56	1,65
NT5DC2	66,83	1,65
GART	526,59	1,65
CDT1	70,79	1,64
CIRH1A	275,49	1,64
PARK7	583,06	1,63
IRF4	1246,36	1,63
URB2	146,81	1,63
RARS	369,40	1,63

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
AGPAT3	345,87	1,63
WDR43	607,19	1,63
HSPH1	846,34	1,63
YBX1	2422,74	1,63
NOP56	725,64	1,63
CDC45	73,73	1,63
NOC3L	360,43	1,63
HIST1H2BL	523,78	1,63
SAAL1	142,81	1,62
MRPS7	220,85	1,62
CMC1	111,16	1,62
GSTP1	750,19	1,62
SCD	256,49	1,62
FKTN	110,23	1,62
IGF2BP3	190,57	1,62
ALYREF	214,46	1,61
NOL6	199,60	1,61
TUFM	804,74	1,61
DKC1	396,90	1,61
CD40	1149,25	1,61
LDHB	1877,78	1,61
LSMD1	199,29	1,61
KIAA0020	413,92	1,61
SPC25	70,59	1,61
LRPPRC	933,37	1,61
HEATR2	114,45	1,61
PDCD11	507,48	1,60
ROMO1	277,21	1,60
KIAA0664	205,44	1,60
ATAD3A	91,19	1,60
VRK2	429,18	1,60
LDHA	1616,80	1,60
GEMIN5	317,36	1,60
GARS	662,86	1,60
OASL	42,31	1,60
ANP32A	1146,69	1,59
BUB1	179,95	1,59
IFI6	179,65	1,59
ETFA	418,22	1,59
SFT2D1	198,04	1,59
TIMM8A	96,06	1,58
ASF1B	68,24	1,58
KPNA2	638,89	1,58
C11orf82	47,13	1,58
CCDC167	155,27	1,58
AKR1A1	340,03	1,58

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ATP5J	697,50	1,58
EPB41L2	439,93	1,58
TIMM23	60,24	1,58
NUP155	429,47	1,58
PINX1	104,21	1,57
IL13RA1	186,85	1,57
MRPL3	298,36	1,57
SNORD96A	26,40	1,57
THG1L	77,78	1,57
C19orf48	163,23	1,57
WDHD1	144,84	1,57
TMEM97	76,86	1,57
RCC1	183,26	1,57
RFC4	150,73	1,57
LOC100507246	371,82	1,56
DHX33	176,98	1,56
BZW2	184,44	1,56
NUTF2	378,01	1,56
RFC3	155,74	1,56
SLC39A14	136,50	1,56
HMBS	41,44	1,56
POP7	72,96	1,56
GNL2	354,39	1,55
FHOD1	147,51	1,55
PSMA2	646,34	1,55
PRDX1	747,51	1,55
SERBP1	2318,69	1,55
DHCR24	264,42	1,55
POLR2F	141,73	1,55
ALDH18A1	229,90	1,55
PPAT	117,52	1,55
RRP9	97,93	1,55
EIF3B	665,19	1,54
NDUFS6	264,81	1,54
NAA20	172,88	1,54
PAK1	138,06	1,54
CCDC106	38,07	1,54
MYC	760,28	1,54
FLOT2	721,58	1,54
ZNF660	28,40	1,54
CMPK2	107,20	1,54
KIF3B	298,90	1,54
C22orf28	299,26	1,53
GTPBP4	340,90	1,53
C16orf88	113,85	1,53
EIF5B	1222,94	1,53

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ZFHX2	26,70	1,53
NAA15	877,64	1,53
STIP1	492,01	1,53
POC1A	31,07	1,53
EFTUD2	498,34	1,53
NUP62	575,72	1,53
PGAM1	103,31	1,53
TSPAN33	469,47	1,53
TTF2	238,75	1,53
POP1	97,93	1,52
UBE2L3	727,83	1,52
GMPS	327,21	1,52
IARS	856,91	1,52
NOP2	401,66	1,52
CHCHD2	802,53	1,52
SUPT16H	1216,67	1,52
POLR2L	355,96	1,52
NEK6	271,68	1,52
AHSA1	504,35	1,52
ZBTB8OS	246,49	1,52
TCP1	639,69	1,52
BRCA2	267,13	1,52
ABCE1	526,86	1,52
PKMYT1	29,30	1,51
EPRS	886,57	1,51
CD3EAP	75,28	1,51
SNRPG	410,54	1,51
LPCAT1	584,06	1,51
PARPBP	46,92	1,51
PRELID1	281,05	1,51
GPR55	46,03	1,51
CCDC58	89,13	1,50
STOML2	218,95	1,50
HEATR1	746,81	1,50
GALE	45,80	1,50
WDR4	122,15	1,50
C1orf115	56,19	1,50
NLE1	50,39	1,50
SLC25A39	295,98	1,50
ATP5I	797,43	1,50
ZC3HAV1L	21,93	1,50
WARS	893,14	1,50
NDUFA3	356,17	1,50
NAT10	461,34	1,50
SET	2541,50	1,50
ALDOA	1699,91	1,49

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CKS2	310,21	1,49
IFRD2	109,47	1,49
RAD51AP1	83,18	1,49
NTHL1	36,50	1,49
PCK2	183,22	1,49
PCBD1	60,90	1,49
HMG2	1508,30	1,49
TKT	779,99	1,49
NOB1	358,09	1,49
RAP2A	325,84	1,49
CHCHD3	239,69	1,48
NCAPG	169,69	1,48
TAGLN2	1283,53	1,48
XRCC2	51,16	1,48
PPP1R7	416,79	1,48
HYOU1	667,85	1,48
APEX1	665,33	1,48
MRPS33	151,66	1,48
TTLL12	213,64	1,48
PARVB	72,31	1,48
C7orf49	125,80	1,48
POLR2E	329,35	1,48
CCT8	950,33	1,47
GTF3C4	154,98	1,47
NFKB1	1029,48	1,47
DBI	436,22	1,47
PNPT1	186,79	1,47
EIF4EBP1	137,24	1,47
BRP44L	74,77	1,47
IFI44L	1149,47	1,47
LSP1	1986,19	1,47
LY6E	366,34	1,46
DDX1	553,23	1,46
HERC6	196,95	1,46
ACAT2	266,09	1,46
MRPS28	84,57	1,46
ZWILCH	100,41	1,46
GATSLS3	27,31	1,46
NCF2	264,64	1,46
TFRC	882,85	1,46
ETF1	483,30	1,46
MKMK2	1302,94	1,46
MLF1IP	90,61	1,45
PRKAR1B	57,47	1,45
SLC16A1	204,39	1,45
RBBP8	190,85	1,45

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TP53	598,50	1,45
POLQ	160,66	1,45
SCAMP3	376,51	1,45
DDX39A	488,86	1,45
NUDT1	86,00	1,45
IGF2BP1	23,75	1,45
U2AF1	836,10	1,45
MRPL20	477,74	1,45
B4GALT2	24,05	1,44
PSME3	487,64	1,44
DOCK10	1240,49	1,44
MRPL1	103,04	1,44
RAD54L	60,93	1,44
MRPS2	186,61	1,44
PHF5A	184,67	1,44
NDE1	457,50	1,44
ACTB	18931,63	1,44
EIF2D	302,02	1,44
GRN	885,98	1,43
OBFC2B	126,58	1,43
MAD2L1	65,55	1,43
CXCR7	29,47	1,43
PRPF40B	31,37	1,43
MAGOH	286,19	1,43
COX6C	573,77	1,43
RQCD1	227,27	1,43
CCNB1	207,65	1,43
NUP93	297,44	1,43
ATP1B3	231,94	1,43
G3BP1	1298,67	1,43
C14orf166	637,96	1,42
RRP1	141,26	1,42
ORC6	75,12	1,42
ZNF485	41,95	1,42
ZNF367	75,46	1,42
C9orf46	117,01	1,42
TEC	165,53	1,42
SRC	141,37	1,42
PAQR4	66,13	1,42
DUT	296,65	1,42
HMGA1	611,17	1,42
TBL3	121,88	1,42
FAM98A	201,61	1,42
LYAR	96,76	1,42
ANP32E	973,44	1,41
MIIP	131,20	1,41

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
POLR1C	165,70	1,41
TIMM10	86,75	1,41
DPH2	100,27	1,41
TOMM6	454,12	1,41
IFI44	270,83	1,41
CCNE1	34,19	1,41
WDR61	108,18	1,41
MDH1	325,13	1,41
PSMA4	612,61	1,41
KHSRP	507,61	1,41
EIF4G1	1310,14	1,41
SLC25A5	1102,21	1,41
HIST1H3C	691,69	1,40
ABCF2	335,61	1,40
NASP	1017,94	1,40
MIR146A	27,16	1,40
RARA	248,73	1,40
MELK	97,79	1,40
CAMKK2	125,74	1,40
CHAF1A	212,98	1,40
IPO7	888,88	1,40
ACAT1	112,43	1,40
TRIP6	29,51	1,40
GGCT	117,93	1,40
PUS7	117,80	1,39
TCEB1	223,10	1,39
MSH2	292,85	1,39
HTRA2	179,68	1,39
ATP5G3	429,70	1,39
BUB1B	177,27	1,39
ANAPC1	325,08	1,39
MIS18A	103,10	1,39
LOC100506930	38,44	1,39
GADD45GIP1	166,73	1,39
IFI30	1092,77	1,39
WDR75	385,85	1,39
HIST1H3J	328,70	1,38
NDUFS8	158,32	1,38
CHST10	50,11	1,38
TMEM201	57,29	1,38
C11orf95	48,21	1,38
PRPF31	376,10	1,38
ATAD5	157,27	1,38
UTP14A	191,77	1,38
GPN3	84,78	1,38
PRPF19	362,86	1,38

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PDAP1	568,67	1,38
BMP2K	478,28	1,38
SEH1L	333,32	1,38
TRUB2	126,15	1,38
NIT2	132,54	1,38
XPOT	438,44	1,38
HIST1H2AL	460,12	1,38
NOL10	216,04	1,37
KCNMA1	85,46	1,37
BLMH	179,74	1,37
DNA2	85,60	1,37
MRPS12	113,32	1,37
PSMC3	259,06	1,37
BCAR3	194,86	1,37
PI4K2B	229,16	1,37
ACOT13	154,44	1,37
SNRPF	321,09	1,37
VPS25	151,01	1,37
DOHH	64,86	1,37
ESD	396,93	1,37
HSPA4	836,00	1,37
EIF3M	683,01	1,36
RGS10	262,94	1,36
NDUFB7	228,43	1,36
FCHSD2	1124,79	1,36
PSMB5	107,41	1,36
TOMM22	235,29	1,36
NDUF2AF2	74,43	1,36
CEP55	88,82	1,36
CTSH	826,48	1,36
MRPS17	64,76	1,36
LYRM4	93,36	1,36
KARS	649,59	1,35
POLD3	143,76	1,35
MRPS15	160,88	1,35
MIF	538,20	1,35
CCNA2	102,49	1,35
PHPT1	102,15	1,35
ITPA	115,38	1,35
PSMD4	743,68	1,35
EIF2S1	444,49	1,35
SLC25A15	43,80	1,35
NSDHL	75,14	1,35
C17orf79	46,03	1,35
SEMA4A	232,83	1,35
MRPL21	100,19	1,35

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
DAD1	388,40	1,35
PSMB2	453,34	1,35
PSMD2	556,83	1,35
HNRNPM	1826,08	1,35
HIST1H2AH	530,77	1,35
KIAA1524	120,32	1,35
MTCH2	214,76	1,35
NOC4L	57,15	1,35
SNHG3	357,49	1,34
ALCAM	387,26	1,34
RPL4	8672,68	1,34
ILF2	543,74	1,34
TTK	87,37	1,34
ZNF593	62,55	1,34
PBK	32,63	1,33
UQCRH	545,74	1,33
CRELD2	101,26	1,33
BUD31	230,85	1,33
C15orf23	76,75	1,33
TMEM69	283,86	1,33
NBEAL2	468,37	1,33
LAS1L	267,26	1,33
ACACA	221,82	1,33
SLC39A1	184,28	1,33
RPSA	3236,27	1,33
A4GALT	60,89	1,33
SQLE	434,17	1,33
KIAA0101	84,95	1,33
SUV39H1	60,99	1,33
TMEM120A	77,83	1,33
AK2	559,09	1,33
RG9MTD1	202,20	1,33
CDK1	115,59	1,33
TSTA3	158,92	1,33
TUBB2A	43,71	1,32
NOP58	743,95	1,32
FOXRED1	67,12	1,32
COX7A2L	579,71	1,32
MRPL46	95,15	1,32
PSMD6	383,07	1,32
FUT10	39,13	1,32
TIMM17A	192,55	1,32
YARS	494,37	1,32
PARP1	1596,03	1,32
HERC5	214,39	1,32
ANXA7	483,39	1,32

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
HIST1H2BB	269,89	1,32
MRPL40	118,26	1,32
GAPDH	5139,59	1,32
NDUFAF4	101,14	1,32
TUBA1C	270,17	1,32
MCM8	285,62	1,32
XPO5	262,21	1,32
RPS5	4252,39	1,31
CENPH	79,82	1,31
CAPRIN1	1457,90	1,31
ZC3H12C	78,33	1,31
TFEB	209,58	1,31
SRFBP1	151,28	1,31
CCDC51	43,44	1,31
MIR4444-1	70,21	1,31
TIMM13	114,95	1,31
SNRPE	153,52	1,31
CCDC85B	124,07	1,31
DLEU1	34,60	1,31
SNORD45A	71,93	1,31
RAD51	52,00	1,31
PCCB	88,96	1,31
BEND3	56,23	1,31
ANKLE1	58,43	1,31
SRPK1	434,98	1,31
FDX1L	41,37	1,31
NDUFA9	270,53	1,31
FDXACB1	69,32	1,31
PPP5C	143,61	1,31
PSMC2	300,86	1,31
GCDH	75,31	1,31
TRAF4	275,38	1,30
DPY19L2P2	27,46	1,30
HIST1H1B	850,24	1,30
RFTN1	1548,72	1,30
NT5DC3	78,68	1,30
CLPB	87,51	1,30
RSL1D1	744,57	1,30
GIN51	73,17	1,30
CHCHD4	67,12	1,30
SSB	535,71	1,30
CD86	272,45	1,30
MRPS34	252,32	1,30
MALSU1	68,14	1,30
MRPS9	149,13	1,30
TRIAP1	143,58	1,30
FASTKD1	152,53	1,30

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TFAM	217,10	1,30
FTSJ2	146,89	1,30
BCL2L12	59,51	1,29
RAD54B	45,66	1,29
USP5	290,75	1,29
BRIX1	255,33	1,29
NAF1	114,64	1,29
ERAL1	111,76	1,29
RNASEH2A	64,12	1,29
CDCA5	54,37	1,29
PEA15	448,20	1,29
SSSCA1	94,40	1,29
DUSP10	213,66	1,29
CBX6	185,86	1,29
MKI67	1494,94	1,29
TFDP1	300,10	1,29
GPR132	227,62	1,29
RABEPK	70,86	1,29
PWP2	195,51	1,29
MRPL15	112,35	1,29
SLC5A6	112,21	1,28
TIMM50	93,12	1,28
HMGN3	567,45	1,28
DTD1	86,63	1,28
RPS7	3561,95	1,28
TSFM	86,46	1,28
PPRC1	387,43	1,28
NAA25	451,02	1,28
NIP7	134,36	1,28
ELAC2	359,92	1,28
HMGB3	77,91	1,28
RFX2	25,55	1,28
PSMC1	88,20	1,28
EIF6	227,31	1,28
POLE2	46,39	1,28
CYB561	32,18	1,28
BAG2	74,18	1,28
BRIP1	97,16	1,28
MRPL13	95,75	1,28
NAE1	210,09	1,28
PLK4	79,86	1,27
POLA1	225,66	1,27
SF3B3	958,03	1,27
PPP1R9B	972,95	1,27
ARMC6	108,74	1,27
THOC7	248,93	1,27
WDR3	236,96	1,27

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
FAM18A	30,07	1,27
FDPS	454,63	1,27
MECR	35,73	1,27
ENY2	339,48	1,27
PPM1G	679,94	1,27
CCRN4L	21,29	1,27
HPRT1	115,77	1,27
CCDC34	58,86	1,27
XRCC6	1018,20	1,26
HN1L	293,60	1,26
NDUFA13	478,96	1,26
DDX20	217,91	1,26
HSD17B10	117,52	1,26
FOX4	162,08	1,26
HIST2H2BF	1408,75	1,26
METAP1D	32,87	1,26
WDR36	594,45	1,26
SF3A3	546,33	1,26
WDR74	167,89	1,26
C12orf45	93,64	1,26
FKBP3	342,18	1,26
RPL35	3711,18	1,26
RRP7A	326,68	1,26
SEC11C	385,81	1,26
MRM1	42,18	1,25
FLNA	2311,58	1,25
DRG1	223,11	1,25
PABPC4	659,59	1,25
RPL7	2779,83	1,25
RAB8A	923,83	1,25
CUL1	526,58	1,25
DHRS13	48,83	1,25
XPO1	1133,91	1,25
SLC15A4	264,62	1,25
C10orf2	146,29	1,25
TWISTNB	164,39	1,25
MRPL4	130,53	1,24
GRPEL1	163,47	1,24
ATP5F1	437,13	1,24
MAT2A	978,97	1,24
SSBP1	308,70	1,24
PSMD12	208,69	1,24
ERH	426,15	1,24
TARS	638,00	1,24
URB1	243,30	1,24
GEMIN4	144,48	1,24
SCCPDH	80,27	1,24

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
MRPS23	119,47	1,24
DPM1	274,71	1,24
CHAC2	25,74	1,24
SFXN2	73,64	1,24
HIST1H2BE	563,92	1,24
FASTKD2	210,02	1,24
DONSON	55,28	1,24
TARS2	152,40	1,23
SKP2	135,77	1,23
TPX2	231,82	1,23
RFK	73,87	1,23
SEC61G	459,65	1,23
ADO	170,80	1,23
VOPP1	384,03	1,23
TOP2A	548,36	1,23
XRCC3	33,39	1,23
TET3	322,81	1,23
SNHG15	89,28	1,23
PSMD3	461,89	1,23
EXOSC8	253,83	1,23
TRMT61A	53,76	1,23
HSPA14	113,45	1,23
FANCI	203,75	1,23
C15orf42	65,69	1,23
MRPL51	277,46	1,23
C11orf83	44,67	1,23
FBXL18	81,99	1,23
GDI2	3016,29	1,23
MRPL37	180,25	1,23
NUP37	99,94	1,23
ZAK	172,04	1,23
SNRPA	276,12	1,23
LSM4	237,35	1,23
RINT1	249,35	1,23
CCND1	48,38	1,23
UQCRCQ	225,92	1,22
GNPNAT1	82,56	1,22
MIPEP	60,41	1,22
TTC4	39,14	1,22
HUWE1	2330,10	1,22
DPP3	160,13	1,22
BMS1	435,02	1,22
DDX10	227,46	1,22
PPID	213,27	1,22
GRINA	194,83	1,22
MTX1	42,31	1,22
POLDIP2	207,78	1,22

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
KDM2B	559,63	1,22
STOML1	20,03	1,22
EXOSC2	251,51	1,22
DSE	165,42	1,22
C6orf108	123,94	1,21
KIF15	93,82	1,21
HEG1	220,41	1,21
LRRC41	211,01	1,21
CENPF	451,90	1,21
NUP35	91,83	1,21
MIR17HG	123,68	1,21
PSMD14	265,53	1,21
WRN	180,35	1,21
PIIF	134,22	1,21
KATNB1	55,56	1,21
SORD	53,70	1,21
WEE1	251,76	1,21
FNBP1	1996,53	1,21
RBBP9	97,82	1,21
POLD1	206,96	1,21
SURF2	48,83	1,21
EXOSC9	276,61	1,21
NOP10	401,70	1,21
PSMC4	226,31	1,21
MAK16	241,67	1,20
TCOF1	647,58	1,20
FUS	1324,94	1,20
POFUT1	190,02	1,20
VBP1	209,98	1,20
TCTN1	80,69	1,20
OGFOD1	237,34	1,20
EXOSC4	49,10	1,20
GPI	535,50	1,20
RPGRIP1L	66,85	1,20
LLPH	258,88	1,20
SEC13	218,18	1,20
CDC42	2192,57	1,20
EIF3I	568,77	1,20
POLR2H	72,24	1,20
METTL13	140,05	1,20
C14orf2	308,77	1,20
UBE2T	55,09	1,20
CHCHD8	143,95	1,20
DHX9	1491,79	1,20
LMNB1	534,46	1,20
COX6B1	871,88	1,19
DHX37	216,38	1,19

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CCNB2	96,01	1,19
AARSD1	78,30	1,19
FOXM1	74,75	1,19
NUP205	532,81	1,19
SH2B3	381,09	1,19
SLC35A4	255,21	1,19
MCCC2	348,61	1,19
CACYBP	392,87	1,19
HAT1	249,91	1,19
PSPH	52,19	1,19
PSMA3	418,21	1,19
DLD	282,68	1,19
MMS22L	150,16	1,19
DCLRE1A	74,46	1,19
MB21D1	75,26	1,19
CYC1	124,59	1,19
KCNK12	20,71	1,19
STK33	30,81	1,19
CERS4	157,65	1,19
TMEM205	100,99	1,19
ALKBH2	40,95	1,19
SNRPD3	397,71	1,19
TEX9	78,57	1,19
MASTL	150,40	1,19
PLSCR1	365,58	1,19
TUBB4B	438,23	1,18
DNTP2	446,38	1,18
TEX10	264,26	1,18
TIMM17B	77,49	1,18
HSPBP1	58,58	1,18
GCNT2	106,51	1,18
RABGGTB	400,19	1,18
LSM3	243,76	1,18
EIF2B3	73,23	1,18
CBX5	1127,60	1,18
SLC9A7	213,42	1,18
CDKN3	91,75	1,18
LOC400958	27,69	1,18
NONO	2095,23	1,18
SF3B14	288,48	1,18
CBX1	366,29	1,18
WDR76	267,61	1,18
DARS2	197,31	1,18
PSMC5	437,42	1,17
AURKAIP1	214,33	1,17
EXOSC5	53,60	1,17
KIF2C	96,11	1,17

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
E2F1	33,11	1,17
PRKCD	333,35	1,17
LARP4	514,87	1,17
HIST1H3B	283,08	1,17
TRMT5	94,16	1,17
RBX1	357,76	1,17
HAUS7	48,84	1,17
PDIA6	758,61	1,17
KPNB1	1641,67	1,17
YEATS4	118,38	1,17
RASGRP3	706,07	1,17
TARBP2	72,14	1,17
FARSA	219,21	1,17
HIST1H2BM	343,21	1,17
NDUFAF3	213,83	1,17
CDC7	76,42	1,17
UROS	106,76	1,17
RRP15	165,86	1,16
RECQL4	45,82	1,16
HIST1H4A	44,63	1,16
ERI3	67,54	1,16
HSPB11	196,42	1,16
TPI1	570,44	1,16
XPO4	453,12	1,16
SARNP	474,17	1,16
SPAG5	178,22	1,16
PSMB7	347,81	1,16
NUDCD1	183,10	1,16
MRPL23	127,76	1,16
BZW1	592,33	1,16
EEF1A1	6927,55	1,16
N6AMT2	33,08	1,16
NDUFV1	183,19	1,16
TARBP1	237,80	1,16
DAZAP1	338,11	1,16
POLR3B	82,77	1,16
CFL1	3267,17	1,16
SNORD2	22,44	1,15
PSMD7	481,49	1,15
ACTR3	2322,22	1,15
APOBEC3C	678,01	1,15
CENPI	46,25	1,15
MTAP	161,96	1,15
ATP5G2	1075,41	1,15
RCC2	516,82	1,15
PODXL2	26,86	1,15
CAND1	724,78	1,15

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
HRSP12	28,21	1,15
CDCA4	106,93	1,15
SIVA1	101,68	1,15
CXorf40B	50,61	1,15
CHCHD1	132,47	1,15
NDUFB6	93,86	1,15
GRWD1	168,42	1,15
DLGAP5	93,68	1,15
ECT2	98,98	1,15
C4orf43	141,49	1,15
PTTG1	103,25	1,15
STRAP	341,77	1,15
TIMM9	106,95	1,15
ERI2	38,78	1,15
EI24	174,76	1,15
RAB3GAP2	583,35	1,14
LTV1	279,26	1,14
IPO11	176,40	1,14
MLST8	146,27	1,14
ATAD2	320,43	1,14
MRPL14	70,34	1,14
SYNCRIP	1378,74	1,14
HIST1H2AE	405,88	1,14
ACLY	680,74	1,14
STAT5A	503,71	1,14
ACSL4	455,49	1,14
RBM3	844,00	1,14
QTRT1	72,70	1,14
EIF3A	2516,60	1,14
UTP11L	128,16	1,14
DARS	571,96	1,14
TRA2B	900,54	1,14
LOC100127983	21,27	1,14
GSTCD	70,90	1,14
ZNF318	862,50	1,14
DCPS	111,15	1,14
UBE2N	507,01	1,14
SFXN1	306,43	1,14
FBL	501,95	1,14
ELL2	233,96	1,14
RPL5	4414,50	1,14
UQCRC2	661,02	1,13
POLR3H	141,40	1,13
AMZ1	25,62	1,13
C11orf73	134,44	1,13
GPX4	313,48	1,13
IDH3A	326,89	1,13

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TSEN15	115,96	1,13
EIF4H	585,86	1,13
ALDH4A1	34,03	1,13
RPL26L1	52,11	1,13
C17orf89	65,93	1,13
BST2	223,76	1,13
ASNA1	138,15	1,13
METTL5	140,07	1,13
CYB5A	74,13	1,13
LONP1	188,56	1,13
TRAF7	240,02	1,13
MTIF2	235,32	1,13
BTF3	1593,32	1,13
SHMT2	535,56	1,13
PPIH	137,25	1,13
SNX8	206,44	1,13
NDUFS5	350,74	1,13
SNRNP40	211,11	1,13
ATAD3B	64,31	1,12
RCL1	106,78	1,12
PMVK	117,65	1,12
PFDN2	244,22	1,12
E2F8	87,68	1,12
BCCIP	314,12	1,12
STRA13	106,63	1,12
ZFP36L1	3292,39	1,12
NDUFA8	104,87	1,12
EIF3J	523,71	1,12
PRPS2	206,41	1,12
MRPL9	273,06	1,12
CALR	1737,10	1,12
PIF1	25,55	1,11
RAD51C	135,29	1,11
NUDT5	154,58	1,11
MMACHC	40,69	1,11
SHMT1	82,05	1,11
APOBEC3G	324,56	1,11
CENPN	80,19	1,11
MRPS11	96,20	1,11
PSMCT-1	42,80	1,11
PFKM	94,18	1,11
MRPS35	172,78	1,11
LSM1	164,39	1,11
CD97	394,78	1,11
CENPE	243,46	1,11
CHMP4A	434,55	1,11
PDGFA	22,95	1,11

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ICMT	121,70	1,11
HNRNPF	1380,39	1,11
ZNF267	704,21	1,11
C1orf31	83,19	1,11
PGK1	955,36	1,11
NOL7	381,70	1,11
NR2C2AP	58,07	1,11
NUSAP1	334,36	1,11
DHRS7B	25,86	1,11
ST3GAL5	116,00	1,10
DDX54	443,66	1,10
CANX	1930,35	1,10
NEK2	26,88	1,10
AARS	442,18	1,10
TMEM48	223,92	1,10
MGC70870	106,25	1,10
P4HA2	22,95	1,10
FAM35A	125,15	1,10
TP53BP2	348,07	1,10
SNHG8	347,47	1,10
AKAP1	133,98	1,10
BATF	159,38	1,12
LARS2	129,47	1,10
ZYG11A	21,32	1,10
SNRPA1	147,92	1,10
TAF9	280,97	1,12
GINS4	77,29	1,09
MVK	40,97	1,09
USP12	311,45	1,09
SWAP70	1447,59	1,09
PSMG4	41,76	1,09
CETN3	92,27	1,09
GTF2I	632,21	1,09
NUDT21	560,36	1,09
PLAGL1	99,65	1,09
PGAM5	100,74	1,09
MGAT3	132,33	1,09
POP4	166,11	1,09
MAPKAP1	456,34	1,09
TRAPPC5	125,22	1,09
BCAS1	33,50	1,09
LARP1	997,50	1,09
TMPO	1075,28	1,09
KIF23	93,58	1,09
COPS2	386,69	1,09
XRCC5	1023,69	1,09
CDCA3	38,89	1,09

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
NBN	305,68	1,09
CFP	31,32	1,09
ZNF749	54,11	1,09
PSMB1	503,20	1,09
HARS	241,62	1,09
STX11	177,99	1,09
SCO2	33,42	1,09
CKAP2L	66,95	1,08
C5orf30	34,74	1,08
HADH	108,78	1,08
AGK	116,50	1,08
ADAR	2440,54	1,08
MAPK11	24,08	1,08
GLRX3	214,81	1,08
ADSL	199,63	1,08
SURF6	156,81	1,08
HMG1	1180,85	1,08
MCAT	38,69	1,08
UCHL3	77,95	1,08
IMP4	209,65	1,08
NDUFB9	239,28	1,08
EPT1	206,86	1,08
NOL11	296,18	1,08
TBCE	101,33	1,08
FABP5	139,22	1,07
UBE2V2	174,35	1,07
RGS1	686,04	1,07
PNP	383,94	1,07
NAA10	180,36	1,07
PSME1	1298,51	1,07
HNRNPR	1078,75	1,07
EPS15	1405,24	1,07
HDDC2	225,00	1,07
PGM2	139,68	1,07
RPL7L1	148,83	1,07
AIFM1	118,25	1,07
PTMA	9763,21	1,07
AURKA	79,27	1,07
BHLHE40	405,98	1,07
NT5DC1	174,29	1,07
COPS4	176,59	1,07
HIST1H2AB	88,66	1,07
MPV17L2	58,80	1,07
HIST1H4L	292,05	1,07
LRP8	216,07	1,07
BRCC3	137,85	1,07
PWP1	438,37	1,07

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
DNAJC9	157,01	1,06
RAD23B	930,08	1,06
DNAJC11	283,42	1,06
INTS9	163,67	1,06
KCTD20	376,61	1,06
PTBP1	1193,15	1,06
PSMD11	272,69	1,06
LOC388796	76,18	1,06
ZRANB3	83,94	1,06
C4orf27	52,72	1,06
RASSF4	62,42	1,06
DHCR7	74,14	1,06
BIRC3	2501,29	1,06
TJP2	142,56	1,06
UCHL5	246,59	1,06
TXN2	184,49	1,06
SYNGR2	846,52	1,06
HDAC2	445,96	1,06
PIGW	51,85	1,06
PIK3CD	1130,99	1,06
EED	230,96	1,06
GTF2H3	63,62	1,06
KIF4A	52,91	1,06
RTKN	21,05	1,06
RPL8	4438,22	1,06
CD82	451,71	1,06
HNRNPA2B1	6663,14	1,06
RPL26	4860,41	1,06
MRPS27	380,17	1,05
FUBP1	1407,18	1,05
SDHB	274,78	1,05
SNORD80	29,27	1,05
EEF2K	170,04	1,05
DDB1	772,28	1,05
RBM42	182,99	1,05
ARID5A	339,42	1,05
AURKB	79,62	1,05
ASNS	213,73	1,05
AATF	424,23	1,05
CS	552,43	1,05
NUPL1	433,40	1,05
FTSJ3	319,02	1,05
EEF1B2	1004,46	1,05
ERCC8	45,86	1,05
HERC1	1847,50	1,05
ACO2	398,94	1,05
LACTB	148,03	1,05

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
MPHOSPH10	273,35	1,05
PELO	78,77	1,05
GTF3C6	184,80	1,05
MTFP1	31,32	1,05
NFE2L3	39,81	1,05
GSG2	59,26	1,05
RMND1	89,04	1,05
NCBP1	384,47	1,05
RWDD2B	53,91	1,05
EXOSC7	74,99	1,05
ATP5A1	963,32	1,05
CTU2	29,06	1,05
SNRPB2	268,46	1,05
AFG3L2	218,72	1,04
ZNF726	23,50	1,04
EMILIN2	113,32	1,04
FOXRED2	44,84	1,04
CCDC12	418,57	1,04
HIST1H2BC	1199,07	1,04
PRPF4	224,07	1,04
SUMO2	664,12	1,04
ZC3H15	468,44	1,04
UBA1	1032,08	1,04
SLC7A1	373,49	1,04
LINC00116	59,00	1,04
DDX49	102,79	1,04
YWHAQ	608,46	1,04
C19orf70	79,78	1,04
TAF1D	386,46	1,04
RFXANK	177,86	1,04
TNKS1BP1	36,18	1,04
CCDC99	124,22	1,04
PFN1	3141,77	1,04
NRAS	512,32	1,04
ATP5H	253,23	1,04
LANCL2	64,89	1,04
CABLES2	72,77	1,04
SRGN	999,10	1,04
ERCC2	79,55	1,04
BIRC5	92,70	1,04
MINA	153,25	1,04
GPR137B	85,09	1,04
HNRPDL	2026,04	1,03
CCDC138	58,12	1,03
AEN	143,38	1,03
TDRD7	195,84	1,03
AFMID	56,21	1,03

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
GUF1	159,46	1,03
LETM1	201,79	1,03
TIMM21	63,04	1,03
C16orf42	146,45	1,03
PIN1	186,11	1,03
GCFC2	115,66	1,03
ARMC9	24,06	1,03
NUDT15	33,78	1,03
NUCKS1	1313,54	1,03
KIF18A	71,16	1,03
DIABLO	177,32	1,03
CBFA2T3	187,27	1,03
NUP107	330,87	1,03
RPL27A	5477,36	1,03
DNAJC7	413,48	1,03
HNRNPU	3853,09	1,03
UMPS	122,38	1,03
SEMA4C	26,58	1,03
ACAD9	111,32	1,03
PAXIP1	119,20	1,03
TIMELESS	347,08	1,03
METTL2A	85,68	1,03
RAD18	164,06	1,03
FANCB	44,93	1,03
DEPDC1	55,97	1,03
GPS1	217,46	1,02
MTMR2	169,53	1,02
SUMO3	159,29	1,02
DNAJB11	260,20	1,02
ARPC5L	214,04	1,02
MCM5	625,05	1,02
HSPB1	102,19	1,02
HTT	1199,74	1,02
VRK1	206,76	1,02
FIBP	226,16	1,02
KPNA3	270,45	1,02
SAMM50	185,03	1,02
EARS2	87,71	1,02
PLIN3	148,60	1,02
AHRR	60,15	1,02
SLAMF7	321,89	1,02
PIM3	222,45	1,02
L2HGDH	48,05	1,02
MNF1	67,91	1,02
ME2	458,00	1,02
GFM1	152,72	1,02
RNMTL1	54,66	1,02

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
HIST1H4F	148,13	1,02
NAP1L1	2567,92	1,02
DNAJC2	266,71	1,02
DIMT1	109,06	1,01
NFKBIB	110,42	1,01
GAR1	124,66	1,01
EIF2A	461,38	1,01
UBAP2L	1139,66	1,01
MRPL32	144,80	1,01
RPL37	10741,09	1,01
MTA1	288,82	1,01
TONSL	78,53	1,01
XPO6	645,87	1,01
SGPP2	36,10	1,01
C11orf1	32,86	1,01
STIL	93,34	1,01
IMMT	300,61	1,01
SEC23B	322,64	1,01
CXorf56	148,36	1,01
SLAIN1	85,20	1,01
RPUSD3	81,45	1,01
APOO	25,28	1,01
SPRED2	82,20	1,00
ZNF581	121,26	1,00
C14orf126	63,04	1,00
LARS	716,16	1,00
H2AFY	463,94	1,00
GPR137	66,25	1,00
RIOK2	146,96	1,00
RWDD1	214,18	1,00
DHFR	87,16	1,00
LINC00265	46,83	1,00
LSM12	71,30	1,00
C4orf21	123,26	1,00
TMEM99	43,38	1,00
SRRT	637,08	1,00

Tabelle 6: Herabregulierte Gene in B-Zellen nach Inkubation mit gp350-EV

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
MARCH1	149,79	-4,65
GNG7	95,56	-4,42
WDR87	24,46	-4,15
C16orf74	21,79	-4,03
ADRB2	27,98	-4,02
GPR98	21,45	-3,90
PRICKLE1	39,72	-3,88
CNTNAP2	33,24	-3,83
FAM177B	37,42	-3,80
KLF2	304,21	-3,79
DPEP2	51,69	-3,75
NT5E	59,51	-3,74
TCP11L2	128,31	-3,62
CLMN	62,82	-3,62
LOC100507412	550,36	-3,58
COL12A1	22,31	-3,56
YPEL1	21,59	-3,52
P2RX1	42,66	-3,50
ROR1	22,95	-3,49
MEGF6	40,52	-3,48
RNASE6	45,31	-3,43
IGFN1	44,54	-3,41
TBC1D9	235,32	-3,40
NUAK2	93,79	-3,38
LRP1B	24,24	-3,37
SNORA49	58,08	-3,34
ANKRD20A9P	22,54	-3,31
RAP1GAP2	23,26	-3,30
LOC283194	27,67	-3,25
TMEM71	31,97	-3,23
SDK2	23,95	-3,20
S1PR1	274,51	-3,20
MGC39372	28,83	-3,19
TCL6	33,05	-3,18
COL24A1	23,46	-3,17
TGFBI	20,05	-3,15
TSC22D3	285,61	-3,15
SLC7A8	21,78	-3,14
PRG4	29,15	-3,14
RASGRP2	184,33	-3,13
FAIM3	1208,59	-3,12
MAFB	25,22	-3,12
HMCN1	33,55	-3,10
CHGB	44,48	-3,10
CSGALNACT1	24,58	-3,06
LOC646214	29,84	-3,06

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TMEM204	24,72	-3,03
FLJ35776	65,60	-3,00
PECAM1	45,85	-2,93
SEMA4B	100,69	-2,92
SFXN3	24,26	-2,91
C16orf54	149,08	-2,91
LOC100129550	22,77	-2,91
RAB37	70,31	-2,90
CDKN2D	55,81	-2,89
LAMA5	36,39	-2,89
NEB	50,82	-2,87
METTL7A	175,26	-2,86
YPEL3	174,76	-2,86
LRP2	21,10	-2,85
SNX29P1	38,40	-2,84
KANK2	31,04	-2,82
FLJ39639	20,74	-2,82
C11orf21	24,67	-2,80
TSIX	42,36	-2,77
RASSF6	92,94	-2,76
CXCL16	28,08	-2,75
TTC21A	44,91	-2,74
SIGLEC6	36,94	-2,73
AKAP6	21,44	-2,73
MAML3	57,02	-2,68
OBSCN	98,61	-2,68
FBXO32	34,16	-2,66
FCGR2B	63,85	-2,66
NDRG1	124,29	-2,64
ACSS1	106,08	-2,64
LY9	169,36	-2,63
SELL	853,35	-2,63
IRS2	28,41	-2,63
ANK1	36,66	-2,62
NFIA	38,37	-2,62
LOC100505622	32,49	-2,60
FRAT1	27,94	-2,60
THSD4	21,54	-2,59
CXCL5	88,75	-2,58
CROCCP3	25,10	-2,58
PDE3B	234,53	-2,58
KLRB1	33,57	-2,57
CXCR4	957,11	-2,57
PRDM8	39,08	-2,57
RASA3	129,09	-2,56
FOS	62,65	-2,56

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
GABARAPL1	27,92	-2,56
CD24	167,86	-2,55
COL4A4	36,43	-2,55
FLJ38109	30,22	-2,54
OTUD1	74,78	-2,54
ALOX5	414,49	-2,52
PNPLA7	31,41	-2,52
RBFOX2	21,60	-2,51
SNORD8	33,97	-2,50
MYO15B	94,08	-2,50
MCF2L2	43,88	-2,49
SNORA47	28,13	-2,49
SLC2A5	68,20	-2,48
LOC728392	21,21	-2,48
WDFY3	23,63	-2,46
TIMP2	28,42	-2,45
PLK2	31,37	-2,44
CSF1R	21,24	-2,44
C3orf37	94,61	-2,43
SCN3A	43,38	-2,43
ABCB1	51,43	-2,43
FGFRL1	26,87	-2,43
HMOX1	85,79	-2,43
KIAA1683	37,77	-2,42
HSPA2	42,90	-2,41
JHDM1D	254,43	-2,39
C8orf80	89,57	-2,39
C10orf54	68,34	-2,39
ACSL6	32,90	-2,39
IER5L	34,41	-2,38
ASTN2	35,87	-2,38
PDE7B	52,82	-2,38
FES	39,79	-2,36
SRGAP3	21,87	-2,35
PLEKHA5	20,36	-2,35
GELSR1	72,10	-2,35
GATS	48,62	-2,35
CYP27A1	29,76	-2,34
TGM2	27,90	-2,34
TP53INP1	326,13	-2,34
LAIR1	42,69	-2,34
PSD3	92,34	-2,34
NOG	21,46	-2,33
ENAH	25,73	-2,33
FAM46C	364,05	-2,33
FAM43A	94,39	-2,33

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
S1PR4	100,17	-2,33
HPCAL1	67,09	-2,32
NLRP1	284,97	-2,32
LYZ	165,46	-2,32
LOC100289230	31,92	-2,31
SCARNA21	321,11	-2,31
GPR18	96,77	-2,30
SERPINB2	98,83	-2,29
BHLHE41	76,18	-2,28
CECR1	109,09	-2,28
SNED1	65,33	-2,28
ANTXR2	108,38	-2,28
NR3C2	27,47	-2,28
FGD3	199,30	-2,28
EPHB6	67,86	-2,27
THBS1	251,60	-2,27
PATL2	42,58	-2,26
AMZ2P1	24,82	-2,26
EPHA4	48,58	-2,25
STMN3	21,89	-2,25
GCNT4	31,48	-2,25
PLCL1	44,73	-2,25
JUND	259,76	-2,24
LINC00426	40,04	-2,24
FAM13A-AS1	28,05	-2,24
LAT	144,73	-2,24
ITGAM	26,62	-2,24
TLE1	21,02	-2,24
PELI2	53,32	-2,23
C17orf57	44,13	-2,23
MUC4	58,85	-2,23
ZNF704	20,79	-2,23
CDC42BPA	21,34	-2,22
TMEM2	219,69	-2,22
SLC6A16	28,04	-2,21
CBX7	71,71	-2,21
ODZ1	43,37	-2,21
HHEX	140,62	-2,20
CALCOCO1	177,76	-2,20
SNORA22	40,03	-2,20
APBA2	43,35	-2,19
COL4A3	29,30	-2,19
TAGLN	26,40	-2,19
GYLTL1B	44,53	-2,19
ARRDC2	120,56	-2,18
ATP2B4	207,04	-2,18

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
SH2D1A	102,44	-2,17
TRIB2	283,69	-2,16
PNOC	33,63	-2,16
TREML2	131,25	-2,16
ABCA7	214,98	-2,16
CD9	41,71	-2,15
GZMB	29,19	-2,14
KLHL24	189,47	-2,14
NEIL1	132,67	-2,14
PYCARD	36,87	-2,14
PLCD1	23,05	-2,14
MMP9	132,20	-2,14
SERPINF1	26,68	-2,14
ZFP36L2	740,26	-2,13
CHPT1	53,94	-2,13
ANPEP	28,91	-2,13
FCHO2	22,74	-2,12
GSN	107,11	-2,12
LDLRAP1	56,48	-2,11
FCRL1	308,37	-2,11
NRP1	28,15	-2,11
P2RX5-	24,68	-2,11
ITGAX	87,27	-2,10
SAMD12	29,75	-2,10
MIAT	264,71	-2,10
SNORA64	59,20	-2,10
SNORD10	153,56	-2,09
RGS2	76,02	-2,09
PCDH9	115,01	-2,09
SNORD15B	41,39	-2,09
CD4	203,53	-2,09
GRAMD1C	46,42	-2,09
C5orf39	36,68	-2,08
ABCA2	52,74	-2,08
RNF144A	61,31	-2,08
RHOB	57,04	-2,08
VWA5A	27,52	-2,08
ASAP3	36,74	-2,07
ABCA1	51,82	-2,07
CD28	204,76	-2,07
GIMAP1	73,38	-2,06
FXYD5	662,04	-2,06
IL1RAP	27,94	-2,06
TMEM173	22,51	-2,04
MYOF	22,99	-2,04
DSP	57,69	-2,04

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
S100A8	36,14	-2,04
LRRC27	51,21	-2,04
SLA	114,97	-2,03
ULK1	51,70	-2,03
SCIMP	128,12	-2,03
PDE4D	263,67	-2,03
DNAH1	150,29	-2,03
CCR1	31,08	-2,03
RNU6ATAC	25,02	-2,03
PITPNM2	30,99	-2,02
YPEL2	101,72	-2,02
LOC728743	56,05	-2,02
SNORA63	137,38	-2,02
NMT2	95,33	-2,02
LBH	418,73	-2,02
NELL2	81,41	-2,02
ATP8B4	22,31	-2,01
ITGA6	67,97	-2,01
MAST4	72,24	-2,01
PNRC1	586,48	-2,01
SIGIRR	44,38	-2,01
SH3TC1	105,83	-2,01
FGD4	20,17	-2,01
PTPN13	219,75	-2,00
DUSP6	26,20	-2,00
LRP12	24,50	-2,00
GAB2	73,13	-2,00
TSPAN14	175,27	-1,99
PIK3IP1	219,45	-1,99
CST7	21,04	-1,99
NEAT1	1405,18	-1,98
PPP2R5B	24,16	-1,98
PLD4	50,71	-1,98
XYLT1	191,43	-1,98
TSHZ2	91,91	-1,97
ABCA10	23,63	-1,97
CD8A	32,35	-1,97
CCL24	36,15	-1,97
EPB41L3	28,90	-1,97
GPRASP1	56,66	-1,97
CASP10	67,53	-1,97
S100A9	57,72	-1,97
PTPN14	21,72	-1,96
FAM134B	51,48	-1,96
RARRES3	44,30	-1,96
MYO6	41,98	-1,96

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
IGF1R	74,10	-1,96
CRIM1	66,78	-1,95
ADTRP	35,98	-1,95
CCDC168	22,94	-1,95
PBXIP1	579,23	-1,94
CHST15	182,54	-1,94
ATG16L2	78,85	-1,94
CCDC144B	72,60	-1,93
CD3G	79,12	-1,93
SMAD3	215,11	-1,93
CHL1	29,55	-1,93
RASGRF2	57,49	-1,93
RNF125	54,69	-1,93
TMEM63A	146,93	-1,92
PALLD	37,99	-1,92
SNX29P2	41,54	-1,92
KIAA1377	20,33	-1,91
C20orf194	24,13	-1,91
PGM2L1	72,78	-1,91
RNF122	21,29	-1,91
GLIPIR1	272,19	-1,91
PINK1	26,62	-1,91
FYB	834,69	-1,91
TYROBP	34,93	-1,91
IRAK2	48,62	-1,91
MS4A7	38,50	-1,90
LOC730091	22,65	-1,90
TIGIT	246,03	-1,90
IL22	29,88	-1,90
CD5	185,48	-1,90
INPP5A	45,98	-1,90
EV12B	1080,44	-1,90
LRP5	34,14	-1,90
LOC10013023	153,25	-1,90
ATP9A	25,79	-1,89
CCPG1	33,87	-1,89
CDKL2	24,83	-1,89
C1orf162	98,05	-1,89
PLAC8	251,64	-1,88
EPB41L4A	25,26	-1,88
HTR3A	54,70	-1,88
PLA2G7	55,11	-1,88
KHDRBS2	50,67	-1,88
FAT1	21,03	-1,88
CEBPB	42,12	-1,87
PLEKHM1P	130,61	-1,87

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PRKCB	943,73	-1,87
SYTL1	119,87	-1,87
ATHL1	103,59	-1,87
CD247	128,71	-1,87
CALHM2	33,26	-1,86
SERPINE1	26,67	-1,86
ABHD4	41,41	-1,86
JAG1	22,35	-1,86
SVIL	21,98	-1,86
FLT1	31,17	-1,86
FAM117B	175,68	-1,86
UBASH3B	54,39	-1,86
ACVR1	26,98	-1,86
SNORA54	24,28	-1,85
FOXO4	50,93	-1,85
ST8SIA1	88,44	-1,85
PTAFR	42,31	-1,85
ARHGAP9	218,10	-1,85
NR4A2	31,30	-1,85
BANK1	938,71	-1,84
ITM2B	441,53	-1,84
MAP1B	31,42	-1,84
FAAH2	32,27	-1,83
DOPEY2	141,18	-1,83
PLXND1	105,09	-1,83
SNORD17	162,57	-1,83
PYHIN1	117,26	-1,83
AMICA1	45,32	-1,82
MAL	28,65	-1,82
FCRL2	125,22	-1,82
SCARNA10	182,87	-1,82
MYBL1	92,70	-1,82
CEP112	36,10	-1,82
LOC338799	58,90	-1,81
CD7	118,38	-1,81
BTN3A1	201,52	-1,81
KIAA1671	60,08	-1,81
MXD3	21,21	-1,80
DUSP1	88,48	-1,80
ITM2A	142,76	-1,80
TNFRSF25	63,03	-1,79
UACA	24,17	-1,79
ZNF540	20,13	-1,79
SUN2	480,32	-1,79
ITGA5	38,70	-1,79
IGFBP4	49,93	-1,79

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
KLF8	53,11	-1,79
SESN3	392,31	-1,79
ANXA1	42,52	-1,79
TMEM156	99,81	-1,78
GRAP2	54,47	-1,78
HSD17B11	77,97	-1,78
LOC100506334	32,94	-1,78
KRT19	23,35	-1,78
BCL11B	207,20	-1,78
RAB11FIP4	153,93	-1,78
ETS2	46,44	-1,78
PIM2	566,83	-1,77
TMEM66	754,64	-1,77
IL7R	286,65	-1,77
LOC202181	65,02	-1,77
SATB1	307,56	-1,77
SIGLEC10	66,45	-1,76
KCTD7	70,29	-1,76
SLC2A3	201,04	-1,76
LOC439949	71,60	-1,76
MAF	241,04	-1,76
AMY2B	32,83	-1,76
FAM26F	22,22	-1,76
RNASET2	173,56	-1,76
CCL1	47,06	-1,76
PLP2	139,47	-1,75
TP53INP2	39,36	-1,75
LPAR5	100,16	-1,75
FAM65B	950,26	-1,75
CBLB	302,82	-1,75
LHPP	41,57	-1,74
CD8B	30,23	-1,74
MXI1	82,82	-1,73
GATA3	46,40	-1,73
NCF4	163,82	-1,73
CAPN12	30,40	-1,73
ANK3	134,27	-1,73
MPP7	42,93	-1,73
LOC146880	49,01	-1,73
HDAC5	109,99	-1,73
STAT4	94,55	-1,72
STARD9	65,32	-1,72
SNORD94	29,15	-1,72
FLJ12334	21,45	-1,72
TXNIP	510,28	-1,72
LOC100506190	20,22	-1,72

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CCDC159	21,95	-1,72
ZCCHC14	36,76	-1,72
NCKAP1	33,66	-1,72
ITK	470,68	-1,71
GAPT	96,23	-1,71
SLC44A2	365,41	-1,71
EREG	31,76	-1,71
LARGE	41,50	-1,71
TJP1	24,69	-1,71
CUBN	27,83	-1,71
BTG2	1221,71	-1,71
CCR6	130,71	-1,70
ATP2A3	467,28	-1,70
APBB2	50,51	-1,70
FAM117A	154,81	-1,69
MME	103,55	-1,69
SYBU	21,10	-1,69
PGPEP1	41,73	-1,69
PHLDA1	28,14	-1,69
DEF8	164,04	-1,69
SERINC5	125,53	-1,69
C7orf41	40,95	-1,68
DYNC2H1	45,26	-1,68
RELL1	34,02	-1,68
MTUS1	22,62	-1,68
PFKFB3	553,49	-1,68
GPR171	61,42	-1,68
QSOX2	235,28	-1,68
SBF2	38,46	-1,68
DOCK4	36,09	-1,67
RAG1	23,44	-1,67
LOC286437	20,48	-1,67
ZNF831	97,73	-1,67
KLHL14	110,89	-1,67
PRKCQ	122,91	-1,67
NR4A1	98,00	-1,67
NEO1	23,06	-1,66
TBC1D10C	206,96	-1,66
SPOCK2	593,09	-1,66
MYO1F	84,02	-1,66
PON2	21,06	-1,66
GDPD5	50,00	-1,66
SLC7A11	163,42	-1,66
NCCRP1	27,88	-1,66
CLEC2B	112,04	-1,66
SMAD1	20,25	-1,66

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ZDHHC14	41,23	-1,65
DTHD1	29,18	-1,65
GRK5	50,95	-1,65
FAM159A	32,37	-1,65
FURIN	307,40	-1,65
ACP5	165,53	-1,65
ARHGEF11	36,18	-1,64
TNS3	112,86	-1,64
RNF166	53,16	-1,64
CITED2	156,97	-1,64
FAM105A	34,48	-1,64
ADAM28	238,55	-1,63
SELPLG	162,29	-1,63
CLU	62,62	-1,63
CD1C	86,88	-1,63
ZNF711	24,56	-1,63
MAP1A	32,85	-1,63
UCP2	590,73	-1,63
C3	26,68	-1,63
PLEKHB1	25,77	-1,62
PNPLA2	165,74	-1,62
PDXDC2P	108,39	-1,62
SCML4	54,63	-1,62
HIP1R	488,47	-1,62
IPW	31,40	-1,62
LOC10050602	30,07	-1,62
FCER1G	42,86	-1,61
CR1	96,14	-1,61
FAM212A	22,31	-1,61
ACAP3	23,73	-1,61
FLJ37453	20,42	-1,61
TRERF1	97,64	-1,61
MARCH3	82,13	-1,60
CCDC136	37,74	-1,60
ZNF345	32,90	-1,60
SCARNA9	1106,34	-1,60
CD3E	309,55	-1,60
SIPA1L2	22,01	-1,60
RAPH1	21,48	-1,60
HBP1	167,95	-1,60
ABCB4	76,00	-1,59
HCK	118,83	-1,59
VPREB3	84,85	-1,59
H1FX	69,64	-1,59
SYNPO2	20,46	-1,59
PPP1R3E	74,63	-1,58

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CRIPAK	22,03	-1,58
ARRB1	26,55	-1,58
KCNA3	129,29	-1,58
UBASH3A	32,15	-1,58
LCN10	21,13	-1,58
BAIAP2	20,97	-1,58
FCGRT	29,43	-1,58
TNRC6C	142,80	-1,58
POU6F1	40,64	-1,58
CCR5	34,54	-1,57
AQP3	39,08	-1,57
YPEL5	227,33	-1,57
MLL3	53,92	-1,56
UTRN	1137,50	-1,56
ABTB1	79,36	-1,56
C5orf56	36,78	-1,56
CLK1	548,41	-1,56
IQGAP2	211,37	-1,56
PRKCH	203,29	-1,55
ST3GAL1	182,06	-1,55
SMAGP	22,39	-1,55
GNLY	28,03	-1,55
NCF1B	24,17	-1,55
GBP2	569,31	-1,55
AKD1	69,60	-1,55
PSAP	700,06	-1,55
CMTM3	37,04	-1,55
RHOC	30,03	-1,55
LOC283663	358,91	-1,54
PLEKHA1	65,97	-1,54
PLA2G6	59,93	-1,54
VAMP5	21,80	-1,54
LOC286367	23,47	-1,54
PAN2	150,63	-1,53
SEPN1	48,52	-1,53
AK1	22,03	-1,53
GPRIN3	184,60	-1,53
GPR155	100,86	-1,53
PRKX	220,48	-1,53
EIF4E3	58,62	-1,53
CSF2	29,83	-1,53
BIN2	267,63	-1,52
CTSL1	51,96	-1,52
ERN1	47,63	-1,52
FBLN7	21,98	-1,52
LRRN3	66,95	-1,52

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
IL32	391,67	-1,52
ACTN1	119,07	-1,52
VAMP1	224,62	-1,52
FAM210B	41,80	-1,51
EGR1	119,32	-1,51
ADD2	36,29	-1,51
DFNB31	20,60	-1,51
CMTM7	106,17	-1,51
GIMAP4	411,28	-1,51
ZNF821	25,89	-1,51
S100A4	75,89	-1,51
IPCEF1	94,65	-1,50
MUC16	81,62	-1,50
SLC35D2	25,57	-1,50
CD109	20,53	-1,50
MAP3K12	28,27	-1,50
DNAH6	21,12	-1,50
MMP14	44,46	-1,50
GLCCI1	196,79	-1,50
LCP2	224,87	-1,50
SESTD1	140,50	-1,49
KIAA1324	39,99	-1,49
CD96	215,38	-1,49
CDH1	30,21	-1,49
LRRC37B	28,49	-1,49
NUMBL	26,05	-1,49
CTLA4	46,44	-1,49
DIRC2	33,91	-1,49
FBXL20	123,43	-1,49
TNFSF8	57,51	-1,49
NR1D2	145,53	-1,48
RIN3	170,57	-1,48
PLCB2	148,89	-1,48
RDH10	29,13	-1,48
TSPO	44,52	-1,48
CPEB3	44,74	-1,48
SPPL2B	119,79	-1,47
TMEM154	189,56	-1,47
SNORA70	77,53	-1,47
ACACB	32,76	-1,47
IGJ	1019,44	-1,47
RTKN2	52,47	-1,47
HOXB2	20,87	-1,47
RALGPS1	43,89	-1,46
GLIPR2	26,16	-1,46
C6orf192	41,50	-1,46

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PPP1R9A	23,45	-1,46
BCR	105,08	-1,46
MCTP1	22,50	-1,46
TXLNB	30,86	-1,46
ZNF238	264,89	-1,46
CD6	225,97	-1,46
DERL3	61,42	-1,45
TANC2	40,25	-1,45
HNRPLL	106,44	-1,45
MAPK8IP3	387,60	-1,45
GIMAP8	102,75	-1,45
ERMAP	32,16	-1,45
C13orf15	25,90	-1,45
STIM1	106,96	-1,44
TLR1	84,50	-1,44
BTBD11	23,63	-1,44
TMEM175	35,73	-1,44
BCAS3	81,20	-1,44
GNAZ	36,01	-1,44
AAK1	166,47	-1,44
C5orf41	361,39	-1,43
SNORD22	65,64	-1,43
MGAT4A	165,13	-1,43
AMN1	53,32	-1,43
ACSF2	31,97	-1,43
ZC3H6	181,49	-1,43
CXCR6	39,50	-1,43
ZNRF1	53,50	-1,43
FRS3	21,66	-1,43
LTBP3	50,62	-1,43
SEN7	199,02	-1,43
EMR2	20,16	-1,43
PTPRM	34,01	-1,42
ARL4C	233,72	-1,42
RGS3	53,26	-1,42
TOX2	74,25	-1,42
TNFRSF1A	29,29	-1,42
KCNN3	35,67	-1,42
KSR2	23,70	-1,42
MBOAT1	28,57	-1,41
TNIK	168,14	-1,41
PDE4DIP	404,47	-1,41
MAP3K1	555,05	-1,41
SESN1	72,37	-1,41
GGA2	839,08	-1,41
CAPN3	47,91	-1,41

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CA11	37,51	-1,41
TSPAN5	30,41	-1,41
CYTH4	256,07	-1,41
RHOBTB2	106,51	-1,40
XCL1	26,45	-1,40
ADD3	395,23	-1,40
PTPN22	168,44	-1,40
CYP1B1	162,23	-1,40
C18orf1	166,99	-1,40
CLSTN3	49,34	-1,40
SIDT2	200,87	-1,40
FYN	305,44	-1,40
UNKL	75,67	-1,40
HECA	341,65	-1,39
GIMAP6	241,35	-1,39
TPM1	26,57	-1,39
ARMCX4	32,70	-1,39
FGR	85,30	-1,39
FRAT2	49,74	-1,39
GKAP1	22,83	-1,39
PRCP	63,31	-1,39
HERC3	172,88	-1,39
P2RX5	107,27	-1,38
KIAA1841	30,37	-1,38
LIME1	33,41	-1,38
GIMAP7	358,72	-1,38
TMEM140	147,65	-1,38
CD37	1390,06	-1,38
LOC10050569	97,30	-1,38
SLC24A1	26,75	-1,38
KIT	44,90	-1,38
LOC388692	42,96	-1,37
PXN	51,70	-1,37
SYCP2	38,47	-1,37
RAPGEF2	133,11	-1,37
FAM8A1	41,88	-1,37
MIB2	27,53	-1,36
VAT1	78,08	-1,36
C7orf29	27,68	-1,36
CCDC64	141,75	-1,36
TGIF1	100,81	-1,36
CREB5	20,56	-1,36
FOSB	39,04	-1,35
GUSBP11	108,61	-1,35
CD27	213,64	-1,35
KIAA0930	80,91	-1,35

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
ITGB7	224,99	-1,35
CMTM8	25,68	-1,35
TNFRSF13C	226,44	-1,35
VMAC	22,46	-1,35
RORA	171,82	-1,35
SETBP1	331,33	-1,35
TNFAIP8L2	27,69	-1,34
F2R	20,65	-1,34
EHF	30,55	-1,34
DGKA	487,37	-1,34
TMBIM1	94,22	-1,34
CROCC	59,10	-1,34
KIAA0182	159,65	-1,34
AGPAT4	27,13	-1,34
LMF1	24,27	-1,34
LRRC16A	42,09	-1,34
LOC729683	56,44	-1,34
PTPRCAP	446,29	-1,33
FBXO44	49,94	-1,33
ARRB2	158,87	-1,33
LOC338758	25,12	-1,33
BLCAP	104,02	-1,33
CNNM4	44,69	-1,33
CTSD	144,85	-1,33
INPP4B	62,70	-1,32
SYTL3	20,63	-1,32
ZMYM1	41,37	-1,32
KCTD21	28,96	-1,32
EFCAB5	22,24	-1,32
FOSL2	38,94	-1,32
NLRC3	228,57	-1,32
IL8	754,21	-1,32
WDR52	82,13	-1,32
SNX18	110,18	-1,31
CERK	195,19	-1,31
PAR5	64,55	-1,31
CAMSAP2	25,02	-1,31
CD2	201,64	-1,31
CDC25B	224,45	-1,31
EIF2C4	115,92	-1,31
RNU11	292,45	-1,31
MCTP2	136,87	-1,31
DCBLD2	28,26	-1,31
FCHSD1	82,84	-1,31
FDCSP	23,41	-1,30
SLC4A8	21,46	-1,30

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
FAM214A	271,66	-1,30
RNF44	165,64	-1,30
LAX1	62,77	-1,30
CNNM3	148,87	-1,30
LEF1	276,58	-1,30
PEG10	89,24	-1,30
SLC12A6	372,28	-1,30
C1orf220	30,07	-1,30
IRF1	716,30	-1,29
ZCWPW1	48,16	-1,29
IL17RA	122,76	-1,29
B3GALTL	30,12	-1,29
SEMA4D	447,48	-1,29
EEP1	43,62	-1,29
TRAF3IP3	478,78	-1,29
TMEM159	32,06	-1,29
TIGD7	30,84	-1,29
SAYSD1	31,93	-1,29
ZNF385A	35,10	-1,28
ANKRD36BP2	70,53	-1,28
SIRPG	33,19	-1,28
CTSB	290,69	-1,28
LGMN	151,26	-1,28
SGSH	34,77	-1,28
ZNF862	63,82	-1,28
FLJ10038	68,01	-1,28
SLC24A6	45,03	-1,28
ZNF395	191,92	-1,27
CD52	2127,88	-1,27
CD55	312,79	-1,27
GALC	41,44	-1,27
RNF157	20,29	-1,27
GNG4	62,96	-1,27
TIAM1	108,33	-1,27
VPS26B	67,23	-1,27
DCUN1D3	22,76	-1,27
TRAT1	103,41	-1,27
GPER	29,83	-1,27
SNORA12	204,05	-1,27
CA5B	23,34	-1,27
TXK	52,55	-1,27
LOC678655	22,44	-1,27
SRXN1	23,24	-1,26
ZAP70	86,10	-1,26
CNN3	33,50	-1,26
CLIP4	79,98	-1,26
TP53I13	24,68	-1,26

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TECPR1	61,04	-1,26
GAB3	39,17	-1,26
STK38	427,75	-1,26
LPP	286,79	-1,26
CRAT	29,64	-1,26
STX7	664,31	-1,26
RPS6KA5	93,70	-1,26
MTSS1	230,02	-1,26
BTN3A3	170,22	-1,25
B2M	4931,52	-1,25
CRTC1	67,97	-1,25
SYTL2	43,17	-1,25
ACVR2B	29,59	-1,25
CADM1	21,37	-1,25
CTTN	25,11	-1,25
SHANK2	27,56	-1,25
PSTPIP1	62,03	-1,25
VAMP4	86,02	-1,25
TLR2	25,83	-1,25
ARHGAP42	20,61	-1,25
VAMP2	101,88	-1,25
DPYD	127,08	-1,25
ICOS	106,05	-1,24
ZBED2	51,53	-1,24
LMBR1L	68,68	-1,24
BTLA	193,40	-1,24
LINC00324	20,78	-1,24
C11orf80	45,21	-1,24
PLEKHA2	640,48	-1,24
FCHO1	86,89	-1,24
PLAUR	20,89	-1,24
ST14	107,65	-1,24
PHF7	32,79	-1,24
DIP2A	122,74	-1,24
CYTIP	822,39	-1,23
ZBTB4	198,77	-1,23
SNORA3	22,35	-1,23
BCL2L11	446,59	-1,23
FADS3	170,01	-1,23
SUSD3	72,98	-1,23
ID3	241,03	-1,23
SIPA1	330,94	-1,23
DYRK1B	28,66	-1,22
IL1A	29,68	-1,22
TNFRSF1B	308,49	-1,22
TNFRSF21	22,27	-1,22
PTPRJ	188,34	-1,22

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
LPAR6	61,35	-1,22
AQP9	21,91	-1,22
BTG1	1086,94	-1,22
PLXNA3	94,90	-1,22
DGKQ	30,48	-1,22
SHISA5	286,69	-1,22
DNAJC4	64,55	-1,22
DNHD1	92,68	-1,22
FBXL19-AS1	23,87	-1,22
TSPAN13	70,33	-1,22
MYLIP	54,72	-1,21
SLC25A42	24,74	-1,21
KIAA0040	555,53	-1,21
SGSM2	113,59	-1,21
PLD3	65,41	-1,21
ING4	68,15	-1,21
KIAA1324L	44,77	-1,21
AES	795,57	-1,21
TMEM80	40,93	-1,21
CDKN1B	198,37	-1,21
SERPINA1	55,11	-1,20
LAG3	29,50	-1,20
SAT1	433,03	-1,20
RALGPS2	792,55	-1,20
NUCB2	90,89	-1,20
TTC9	87,72	-1,20
DNASE2	44,68	-1,20
PDP1	160,92	-1,20
ANKH	68,59	-1,20
AFF1	451,22	-1,20
FAM214B	24,92	-1,20
AHNAK	995,78	-1,20
SLC15A2	99,06	-1,20
THBS3	22,97	-1,19
TMX4	136,79	-1,19
DGKD	213,11	-1,19
FAM102A	306,58	-1,19
THEMIS	90,06	-1,19
VPS37B	97,05	-1,19
LMBRD1	138,52	-1,19
TRIM52	135,20	-1,19
GSDMB	70,74	-1,19
APOLD1	23,90	-1,19
APPL2	101,69	-1,19
ZSWIM6	81,78	-1,19
KLF11	43,09	-1,18
TLE3	320,57	-1,18

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
PARVG	283,04	-1,18
ZNF860	100,67	-1,18
HDAC7	161,05	-1,18
SNORA23	30,43	-1,18
ABAT	48,91	-1,18
PTPRO	86,57	-1,18
LOC93622	33,15	-1,17
TBC1D4	427,17	-1,17
RUNX2	62,95	-1,17
GPR174	45,98	-1,17
KLC4	30,49	-1,17
DUSP16	121,27	-1,17
ZBTB20	173,02	-1,17
LCK	348,30	-1,17
AKAP7	22,51	-1,17
CORO2A	25,90	-1,16
DPY19L1	54,29	-1,16
MIDN	132,70	-1,16
DNAJB4	22,13	-1,16
ZNF528	40,58	-1,16
EVC	48,19	-1,16
BTN3A2	258,80	-1,16
ARSD	28,34	-1,16
LATS2	21,31	-1,16
OSBPL10	207,31	-1,16
PPAPDC1B	76,66	-1,16
BCL6	329,71	-1,16
STX3	35,89	-1,16
MGAT5	493,05	-1,16
FAM82A1	30,08	-1,16
C4orf3	175,19	-1,15
LOC100506776	29,65	-1,15
C5	20,31	-1,15
ALDH3A2	48,03	-1,15
ARHGAP26	67,07	-1,15
CTH	22,08	-1,15
MBP	416,37	-1,15
H1FO	21,07	-1,15
RRN3P3	47,04	-1,15
PNMA1	57,42	-1,15
SNORA18	31,94	-1,15
CG030	58,96	-1,15
KIAA0430	647,25	-1,15
HS1BP3	22,33	-1,15
ARHGFE3	318,87	-1,14
VAV3	130,78	-1,14
LRRC37A4	59,58	-1,14

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
IL10RA	405,32	-1,14
IL6ST	615,76	-1,14
SLCO3A1	36,15	-1,14
SORBS3	24,72	-1,14
ORAI2	400,63	-1,14
CROCCP2	60,16	-1,14
ITPR3	418,83	-1,14
PDE4B	397,67	-1,14
KLLN	22,22	-1,14
TRPS1	217,99	-1,14
MOB3B	35,16	-1,14
NPIPL3	20,59	-1,14
PRKACB	375,71	-1,13
FAM129C	383,65	-1,13
FLJ45340	127,59	-1,13
PAIP2B	50,79	-1,13
LOC100132247	58,21	-1,13
TC2N	292,44	-1,13
BANP	82,74	-1,13
TGFBR2	576,77	-1,13
LGALS8	223,87	-1,13
CRTAP	132,00	-1,13
PPP1R3B	34,90	-1,13
LOC283710	29,54	-1,12
MAN1A1	251,39	-1,12
KIAA1467	23,73	-1,12
SLC9A3R1	148,78	-1,12
ARL15	39,06	-1,12
HCST	38,85	-1,12
CD3D	272,55	-1,12
FCRL3	293,38	-1,12
ABLIM1	795,65	-1,12
TTC28-AS1	31,58	-1,12
CHMP1B	159,30	-1,12
F5	55,41	-1,12
ADARB1	64,17	-1,12
NR4A3	76,80	-1,12
FAM110A	26,11	-1,11
NQO1	31,60	-1,11
AMFR	251,00	-1,11
KIFC2	41,89	-1,11
SPSB3	86,92	-1,11
SNRK	172,21	-1,11
LOC100499466	144,33	-1,11
FAM46A	52,18	-1,11
GALNT3	24,20	-1,11
PRF1	24,09	-1,11

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
CSRNP2	65,32	-1,11
EHD3	115,18	-1,11
DHRS1	33,81	-1,11
SDCBP	206,43	-1,11
CCDC7	34,15	-1,11
ANKRA2	68,77	-1,11
EVC2	41,39	-1,10
HHAT	20,95	-1,10
HABP4	41,92	-1,10
MTM1	79,36	-1,10
RAB30	199,79	-1,10
CAPRN2	78,66	-1,10
LOC100505715	20,54	-1,10
C1orf63	337,33	-1,10
RASAL1	30,37	-1,10
PPP1R12B	122,32	-1,10
SLC25A45	23,94	-1,10
FAM184A	30,20	-1,10
LOC642852	24,60	-1,10
WDR66	21,18	-1,10
MARCH8	117,96	-1,09
NEDD4	25,02	-1,09
RNF24	26,81	-1,09
ARSA	53,07	-1,09
DTWD2	24,70	-1,09
GPR68	36,48	-1,09
ZNF483	23,12	-1,09
TNIP3	26,53	-1,09
PION	112,45	-1,09
TSC22D1	78,77	-1,09
TSPYL1	237,29	-1,09
CRY1	37,91	-1,09
CNR1	39,29	-1,09
LFNG	110,24	-1,09
MAGI3	26,43	-1,09
NCF1C	24,08	-1,09
GLCE	28,84	-1,09
AUH	48,16	-1,09
MAP2K3	118,32	-1,09
FTH1	1612,60	-1,08
SERINC1	304,57	-1,08
LRR8C8	163,72	-1,08
ANKAR	27,07	-1,08
KIF27	33,88	-1,08
ABCC5	69,13	-1,08
ANKRD44	819,71	-1,08
MFSD11	51,22	-1,08

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
EML6	239,68	-1,08
SYNJ1	72,37	-1,08
GIMAP2	112,83	-1,08
HDAC4	76,93	-1,07
MYO18A	328,67	-1,07
NAB2	99,77	-1,07
IFNAR2	121,49	-1,07
B4GALT1	336,87	-1,07
EGR3	53,75	-1,07
ARID5B	1058,79	-1,07
DNAJB2	98,21	-1,07
RASSF1	82,71	-1,07
SLCO4A1	63,82	-1,07
RFX1	39,46	-1,07
SLC7A5P2	95,42	-1,07
SCAND2	47,51	-1,07
KIAA1407	63,10	-1,07
KLHL3	30,05	-1,06
DNASE1	30,88	-1,06
SLC2A4RG	34,04	-1,06
CRTC3	245,48	-1,06
TAPT1	79,84	-1,06
PPIEL	23,81	-1,06
MYADM	80,38	-1,06
TMEM229B	24,16	-1,06
TRIM38	553,42	-1,06
HEXIM1	225,15	-1,06
KBTD3	22,36	-1,06
MPEG1	871,91	-1,05
PAN3-AS1	20,13	-1,05
NBR2	27,75	-1,05
SNORA71A	29,75	-1,05
GRAMD4	76,40	-1,05
KIAA0513	27,71	-1,05
CRLF3	222,24	-1,05
IDS	449,46	-1,05
BMPR2	159,29	-1,05
DISP1	33,26	-1,05
RAB3D	27,86	-1,05
LINC00152	31,70	-1,05
BBS9	60,03	-1,04
RAB31	87,55	-1,04
GAA	30,42	-1,04
CASP8	242,78	-1,04
COQ10A	27,46	-1,04
CYSLTR1	32,70	-1,04
TRIM62	42,46	-1,04

Gen	Mittelwert d. norm. Reads	log2-fache Änderung
TEP1	315,66	-1,04
CASP9	35,66	-1,04
GVINP1	486,67	-1,04
NFIX	26,37	-1,04
NOD1	46,44	-1,03
SNTB1	50,45	-1,03
SKI	146,38	-1,03
FOXO3	82,69	-1,03
ZNF449	22,16	-1,03
ZDBF2	110,48	-1,03
ODF2L	113,40	-1,03
TLR9	153,65	-1,03
LOC100508120	31,97	-1,03
KCNK6	30,11	-1,03
MAP3K9	39,29	-1,03
RNF19A	278,24	-1,03
TRIM66	51,14	-1,03
RIPK3	68,62	-1,02
ZMAT1	122,28	-1,02
KIAA0355	189,87	-1,02
EXT1	49,04	-1,02
APBB1	48,85	-1,02
ARHGAP12	115,76	-1,02
MAST3	240,60	-1,02
SMPD3	33,96	-1,02
L3MBTL3	118,40	-1,02
CYB561D1	58,72	-1,02
C9orf95	77,84	-1,02
FTX	36,92	-1,02
ANKRD42	24,57	-1,02
RECK	25,08	-1,02
C5orf45	78,48	-1,01
RNF149	82,29	-1,01
USP53	111,29	-1,01
CNO	30,52	-1,01
SCAI	89,89	-1,01
RAP2B	130,79	-1,01
RBMS1	86,91	-1,01
WDSUB1	53,41	-1,01
LENG8	577,91	-1,00
SYNE2	2639,64	-1,00
POLD4	177,69	-1,00
CCDC109B	169,47	-1,00
CCDC84	49,63	-1,00
SIPA1L3	531,29	-1,00
ABHD15	47,60	-1,00

10 PRÄSENTATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden auf internationalen Kongressen und Veranstaltungen präsentiert:

17. - 21. Mai 2017

Toronto, Kanada

5th Annual Meeting of the International Society of Extracellular Vesicles (ISEV)

Poster: „Recombinant EVs and VLPs are tools to study the function of packaged viral RNAs from Epstein-Barr-Virus (EBV)“

3. – 7. Mai 2016

Rotterdam, Niederlande

4th Annual Meeting of the International Society of Extracellular Vesicles (ISEV)

Poster: „ Functional analysis of packaged viral RNAs from Epstein-Barr-Virus (EBV) by using recombinant exosomes“

22. – 27. Juni 2014

Dresden, Deutschland

Summer School on Infection Research

Poster: “Functional characterization of RNAs from Epstein-Barr Virus“

11 DANKSAGUNG

Diese letzten Seiten möchte ich nutzen, um allen zu danken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben:

Prof. Dr. Reinhard Zeidler für das interessante Projekt, die sehr gute Betreuung, seine Unterstützung und Motivation, sowie für viele Ideen, Diskussionen und die Möglichkeit, an internationalen Konferenzen teilzunehmen.

Prof. Dr. Barbara Adler für die Bereitschaft, die Funktion der Zweitgutachterin für diese Arbeit zu übernehmen.

Den Mitgliedern meines Thesis Komitees **Prof. Dr. Kempkes** und **Prof. Dr. Conzelmann**.

Ein großes Dankeschön geht an:

- **Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt** für die Diskussionen im „Kuschelseminar“, konstruktive Kritik und die Einarbeitung in die Technik der Maxi-EBV-Klonierung.
- **Prof. Dr. Andreas Moosmann** für die T-Zellklone, Antikörper und Hilfe bei allen immunologischen Fragen.
- **Dagmar Pich** für die Hilfe bei der Maxi-EBV-Klonierung und für viele technische Tipps, die mir die Arbeit erleichtert haben.
- **Dr. Alexander Buschle** für die Hilfe bei der Planung der RNA-Sequenzierung, sowie der darauffolgenden Datenanalyse
- **Dr. Stefan Krebs** für die Durchführung der RNA-Sequenzierung.
- **PD Dr. Josef Mautner, Dr. Dinesh Adhikary** und **Dr. Julia Damaschke** für die Bereitstellung zahlreicher T-Zellklone.
- Alle **Blutspender** und **Patienten**, die ihre Adenoide der Forschung bereitstellten.

Außerdem möchte ich mich bei meiner **Arbeitsgruppe** und allen **Kolleginnen und Kollegen des Labors 205** für die angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre und gemeinsamen Unternehmungen bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an:

Judith, für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Bereichen. **Manuel**, für die Hilfe beim Arbeiten mit miRNAs. **Kathrin**, für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor und bei Kongressen. **Bettina**, für die zahlreichen motivierenden Gespräche innerhalb und außerhalb des Labors und natürlich die super Zusammenarbeit im Laboralltag.

Vielen Dank an **meine Freunde** aus der Heimat, die mich oft besucht und für die nötige Abwechslung gesorgt haben.

Zu guter Letzt möchte ich **meiner Familie** danken:

meinen Großeltern, meinen Eltern und Geschwistern für eure Anteilnahme, sowie die bedingungslose Unterstützung und Motivation, ohne die ich nie so weit gekommen wäre.

Thomas, danke für alles.