

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## HERPESVIRUS MACACA ARCTOIDES

EIN EBV-ÄHNLICHES VIRUS DER AFFENSPEZIES MACACA ARCTOIDES:

GENOMANALYSE UND BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JANINE RÖMPKE

aus Eisenach

Kiel 2019

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Andi Krumbholz  
Institut für Infektionsmedizin  
UKSH Campus Kiel

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Andreas Heinz Bodo Günther  
Klinik für Hämatologie/Onkologie und Stammzelltransplantation  
Helios Kliniken Schwerin

Tag der mündlichen Prüfung: 21.08.2020

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 09.12.2019

gez. Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Herpesviren	1
1.2 $\gamma$ -Herpesviren	2
1.3 Humanes Gammaherpesvirus 4	2
1.3.1 Primärinfektion	3
1.3.2 Genprodukte der Latenz	4
1.3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen	5
1.4 EBV-ähnliche Viren bei Affen	5
1.4.1 Macacines Gammaherpesvirus 4	5
1.4.2 Herpesvirus <i>Macaca arctoides</i>	6
1.5 Zielsetzung	6
<b>2 Methoden</b>	<b>8</b>
2.1 Material	8
2.1.1 Oligonukleotide	8
2.1.2 Zellkulturen	11
2.1.3 Bakterienstämme	11
2.1.4 Plasmide	11
2.1.5 Chemikalien und Enzyme	12
2.1.6 Isolierung, Markierung und Detektion von DNA	13
2.1.7 Geräte und Software	13
2.2 Allgemeine Methoden	14
2.3 Zellkulturen	14
2.3.1 Kultur eukaryoter Zellen	14
2.3.2 Kultur prokaryoter Zellen	15
2.4 Polymerase-Kettenreaktion	16
2.4.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion	16
2.4.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	17
2.4.3 DNA-Reinigung aus Agarosegel	18
2.5 Gentechnische Methoden	19
2.5.1 Klonierung von amplifizierter DNA	19
2.5.2 Plasmidextraktion	21
2.6 Sequenzierung und Annotation viraler DNA	22
2.6.1 Sequenzierung nach Sanger	22
2.6.2 <i>Next-generation</i> -Sequenzierung	22
2.6.3 Genomorganisation	22
2.7 Phylogenetische Analyse	23
2.8 <i>In situ</i> -Lysisgel nach Gardella	24
2.9 Southern-Blot-Analyse	24
2.9.1 Sondenherstellung	25
2.9.2 DNA-Transfer	26
2.9.3 Hybridisierung	27
2.9.4 Detektion	27

2.9.5	Zweitanalyse . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	Sequenzanalyse des HVMA-Genoms . . . . .	28
3.2	Phylogenetische Untersuchungen . . . . .	40
3.3	Untersuchungen zur viralen Persistenz von HVMA . . . . .	42
3.4	Bestimmung der Viruslast in Lymphozyten der Affenspezies <i>Macaca arctoides</i> . . . . .	44
3.4.1	Etablierung der quantitativen PCR: Intra- und Interassayreproduzierbarkeit . . . . .	45
3.4.2	Erstellung der Standardkurve . . . . .	47
3.4.3	Quantitative Analyse der viralen DNA aus der Zelllinie MAL-1 . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Sequenzierung des HVMA-Genoms . . . . .	50
4.1.1	Genomorganisation . . . . .	50
4.1.2	Latenzproteine . . . . .	51
4.1.3	EBV-assoziierte Malignome und HVMA als in vitro-Modell . . . . .	51
4.1.4	Wirtstropismus von EBV und HVMA . . . . .	52
4.1.5	Phylogenetische Untersuchungen . . . . .	53
4.2	Ort der Persistenz von HVMA in lymphoblastoiden Zelllinien . . . . .	54
4.3	Bestimmung der Viruslast in Lymphozyten der Affenspezies <i>Macaca arctoides</i> . . . . .	56
4.4	Ausblick . . . . .	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>65</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ACTB	$\beta$ -Aktin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C <sub>p</sub>	<i>Crossing-Point</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	<i>Direct repeat</i>
EA	<i>Early Antigen</i>
EBER	EBV-encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fw	<i>forward</i>
gp	Glykoprotein
HHV	Humanes Herpesvirus
HTRL	Herpesvirus <i>Macaca arctoides transformed rabbit lymphocytes</i>
HVMA	Herpesvirus <i>Macaca arctoides</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IR	<i>Internal repeat</i>
kb	Kilobasenpaare = 1.000 Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Agar	<i>Lysogeny Broth-Agar</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
LMP	Latentes Membranprotein
MAL-1	Macaca arctoides Lymphozyten-1
McHV-4	Macacines Gammaherpesvirus 4
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Next-generation-Sequenzierung</i>
nt	Nukleotid
OriLyt	<i>Origin of lytic replication</i>
OriP	<i>Origin of latent plasmid replication</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)

RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
rv	<i>reverse</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SOC-Medium	Super Optimal Broth-Medium mit 20 mM Glucose
SSC	<i>standard saline citrate</i> (Natriumchlorid-Natriumcitrat)
<i>Taq</i> -Polymerase	hitze stabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TR	<i>Terminal repeat</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VCA	Virales Capsid-Antigen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Herpesviren

Die historische Einordnung der einzelnen Viren zur Familie der *Herpesviridae* erfolgte nach der Morphologie des Virions. Somit wurden auch sich stark voneinander unterscheidende Viren unabhängig von ihrer Wirtsspezies in einer Familie zusammengefasst (Rickinson und Kieff 2007). Anhand des Genomaufbaus und der phylogenetischen Verwandtschaft wurde die Ordnung der Herpesvirales definiert und durch das *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) im Jahr 2005 in drei Familien eingeteilt: *Herpesviridae* (Viren von Säugetieren, Vögeln und Reptilien), *Alloherpesviridae* (Viren von Fischen und Amphibien) und *Malacoherpesviridae* (Viren von Muscheln). Die Zuordnung der einzelnen Spezies wird seitdem stetig aktualisiert und die Nomenklatur der Viren angepasst. Dieser Arbeit liegt die aktuelle Taxonomie aus dem Jahr 2016 zu Grunde (Adams et al. 2016).

Die Familie der *Herpesviridae* (Herpesviren) besteht aus drei Unterfamilien mit verschiedenen Genera, die in Tabelle 1.1 auszugsweise aufgelistet sind. Vor dem Aufkommen phylogenetischer Vergleiche erfolgte die Zuordnung zu den Subfamilien nach Pathogenität, Zelltropismus und den *in vitro*-Vermehrungseigenschaften (Roizman et al. 1981). Diese Zuordnung ließ sich phylogenetisch bestätigen. Die einzelnen Spezies der Humanen Herpesviren (HHV) werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckungen aufsteigend nummeriert, wobei bei einigen Viren die Eigennamen im Sprachgebrauch bevorzugt verwendet werden. Herpesviren sind in der Natur weit verbreitet. Im Laufe der Evolution haben sie sich sehr stark an ihren natürlichen Wirt adaptiert. Die ausgeglichene Virus-Wirt-Interaktion ist eine mögliche Erklärung für die häufig asymptomatisch verlaufende Primärinfektion und das Auftreten von Erkrankungen, wenn diese Balance z.B. im Rahmen einer Immunsuppression gestört wird oder das Virus eine neue Spezies infiziert (Aswad und Katzourakis 2014).

**Tabelle 1.1:** Auszug aus der Familie der *Herpesviridae*

Subfamilie	Genus	Spezies	Wirtsspezies
<i>α-Herpesviridae</i>	Simplexvirus	Herpes-simplex-Virus 1 (HHV-1)	Mensch
		Macacines Alphaherpesvirus 1	Makaken
	Varicellovirus	Varizella-Zoster-Virus (HHV-3)	Mensch
<i>β-Herpesviridae</i>	Cytomegalovirus	Humanes Cytomegalovirus (HHV-5)	Mensch
		Macacines Betaherpesvirus 3	Rhesusaffe
	Roseolovirus	Humanes Betaherpesvirus 6A (HHV-6A)	Mensch
<i>γ-Herpesviridae</i>	Lymphocryptovirus	Humanes Betaherpesvirus 7 (HHV-7)	Mensch
		Epstein-Barr-Virus (HHV-4)	Mensch
		Macacines Gammaherpesvirus 4	Rhesusaffe
	Rhadinovirus	Callitrichines Gammaherpesvirus 3	Weißbüschelaffe
		Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (HHV-8)	Mensch
		Macacines Gammaherpesvirus 5	Rhesusaffe
		Murines Gammaherpesvirus 4	Maus
Macavirus	Bovines Gammaherpesvirus 6	Rind	
Percavirus	Equides Gammaherpesvirus 2	Pferd	

Zusammengestellt aus Adams et al. 2016 und Davison 2007b

Alle *Herpesviridae* besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit 124 bis 230 Kilobasenpaaren (kb), das in einem ikosaedrischem Kapsid mit 162 Kapsomeren vorliegt (Rickinson und Kieff 2007). Zwischen dem Kapsid und der mit viralen Glykoproteinen assoziierten Hüllmembran befindet sich das Tegument (Rickinson und Kieff 2007). Herpesviren verfügen über ein großes Spektrum von Enzymen, die vor allem für den Nukleinsäurestoffwechsel und die Prozessierung von Proteinen von Bedeutung sind. Die Synthese der viralen DNA und die Assemblierung des Kapsids erfolgt im Zellkern der infizierten Zellen, der endgültige Zusammenbau des Virions findet im Zytoplasma statt (Rickinson und Kieff 2007). Während der lytische Replikationszyklus den Zelltod zur Folge hat, persistieren die Viren lebenslang als geschlossener DNA-Ring (Episom) in den latent infizierten Zellen (Longnecker und Neipel 2007). Ferner ist die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom unter anderem bei Epstein-Barr-Virus im Rahmen der Tumorentstehung beschrieben (Lestou et al. 1993).

## 1.2 $\gamma$ -Herpesviren

*In vitro* replizieren alle Vertreter der  $\gamma$ -*Herpesviridae* in Lymphozyten, wobei einige Vertreter auch in Epithelzellen lytische Infektionen hervorrufen können (Borza und Hutt-Fletcher 2002). Die Subfamilie der  $\gamma_1$ -*Herpesviridae* umfasst nur das Genus der Lymphokryptoviren, die vor allem B-Lymphozyten infizieren. Die Genera der Rhadinoviren, Macaviren und Percaviren werden als  $\gamma_2$ -*Herpesviridae* zusammengefasst. Durch horizontale Übertragung werden die Viren innerhalb einer Spezies direkt von Wirt zu Wirt weitergegeben (Rickinson und Kieff 2007).  $\gamma$ -Herpesviren können unter gewissen Bedingungen infizierte Zellen zur Proliferation anregen und Tumoren induzieren. Dabei handelt es sich um Lymphome, lymphoproliferative Erkrankungen, aber auch epitheliale Tumoren (Longnecker und Neipel 2007). Die Lymphokryptoviren sind das für diese Arbeit relevante Genus und kommen nur beim Menschen und Primaten vor (Longnecker und Neipel 2007). Im Folgenden werden für diese Arbeit relevante Vertreter der Subfamilie der  $\gamma_1$ -*Herpesviridae* vorgestellt.

## 1.3 Humanes Gammaherpesvirus 4

Das Humane Gammaherpesvirus 4 (HHV-4) oder auch Epstein-Barr-Virus (EBV) wurde von Epstein et al. 1964 in B-Zelllinien von Patienten mit Burkitt-Lymphomen entdeckt. Die von der Arbeitsgruppe beschriebenen Viruspartikel sahen dem bereits bekannten Herpes-simplex-Virus ähnlich. Henle und Henle 1965 erkannten, dass es sich dabei um eine neue Virusspezies handelt und nannten diese nach den Erstbeschreibern EBV. Aufgrund des Tropismus zu B-Lymphozyten und der in diesen Zellen induzierten Latenz wurde das Virus in die Subfamilie der  $\gamma$ -*Herpesviridae* eingeordnet (Roizman et al. 1981). Nach der Infektion persistiert das Virus lebenslang im Körper (Thorley-Lawson und Gross 2004). Zur Aufrechterhaltung der latenten Persistenz hat das Virus Mechanismen entwickelt vom Immunsystem des Menschen unerkannt zu bleiben (Middeldorp und Pegtel 2008). Weltweit beträgt die Durchseuchungsrate in der erwachsenen Bevölkerung mehr als 90 % (Niedobitek et al. 2001). Das EBV hat kanzerogenes Potenzial und wurde von der Weltgesundheitsbehörde als human-kanzerogen eingestuft (International Agency for Research on Cancer 2012).



Im EBV-Genom unterscheidet man einmalig vorkommende Abschnitte (*Unique*) von sich wiederholenden Sequenzabschnitten (*Repeats*). Die *Repeats* an den Genomenden (*Terminal repeat*, TR) umfassen 538 Basenpaare (bp). Die TR haben eine wichtige Aufgabe bei der Konformationsänderung der linearen DNA zum Episom sowie bei der Spaltung und Verpackung der DNA in die infektiösen Partikel (*Zimmermann und Hammerschmidt 1995*). Innerhalb des Genoms finden sich mehrere interne Wiederholungseinheiten (*Internal repeats*, IR). Die größte Wiederholungseinheit (IR1) umfasst 3.072 bp, wobei die Anzahl der Wiederholungen je nach Virusstamm variiert. Einigen Virusstämmen fehlen auch ganze Genomabschnitte, so dass die Genomlänge innerhalb der Epstein-Barr-Viren variabel ist (*Rickinson und Kieff 2007*). Das Virus hat drei Startpunkte für die DNA-Replikation: zwei *Origin of lytic replication* (*OriLyt*) für die Replikation in der lytischen Phase sowie den *Origin of latent plasmid replication* (*OriP*), der für die Replikation und die Aufrechterhaltung der Infektion in der latent infizierten Zelle von Bedeutung ist.

Das Genom des Virusstammes B95-8 wurde von *Baer et al. 1984* erstmalig vollständig sequenziert und dabei eine Genomgröße von ca. 172 kb mit mehr als 100 möglichen Genen bzw. Leserahmen (*Open reading frame*) ermittelt. Hierzu wurde das Genom mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut und die bei der elektrophoretischen Auftrennung entstandenen Fragmente der Größe nach mit Buchstaben benannt, wobei das größte Fragment die Bezeichnung "A" trägt usw. Die Genomfragmente wurden in Vektoren kloniert und die DNA sequenziert. Die Nomenklatur der Leserahmen von EBV erfolgt klassischerweise nach der Bezeichnung der beim Restriktionsverdau mit *Bam*HI entstandenen Fragmente. Demnach ist der Leserahmen *BARF1* der erste rechtswärtsgerichtete Leserahmen im A-Fragment des *Bam*HI-Verdaus (*Bam*HI A Rightward Open Reading Frame 1) (*Niedobitek et al. 2001*).

Die meisten dieser Gene codieren für virale Proteine. Ausgenommen sind davon unter anderem die beiden latent-transkribierten Gene EBER-1 und EBER-2 (*EBV-encoded RNA*, EBER), die nicht in Proteine translatiert werden (*Rickinson und Kieff 2007*). Bei den proteincodierenden Genen werden Proteine für die lytische und latente Phase der Virusreplikation unterschieden. Die Nomenklatur für die Proteine der lytischen Phase ist in der Literatur nicht ganz einheitlich. Die gebräuchlichste Bezeichnung ist nach ihrem Leserahmen oder ihrem Molekulargewicht in Kilo-Dalton (kDa), d.h. gp85 steht für Glykoprotein mit 85 kDa Molekulargewicht. Da die Glykoproteine (gp) der Hüllmembran innerhalb der Herpesviren konserviert sind und zwischen den einzelnen Spezies eine hohe Homologie aufweisen (*Mocarski 2007*), tragen diese Proteine meist zusätzlich die Bezeichnung nach der klassischen Nomenklatur für das Herpes-simplex-Virus. In der vorliegenden Arbeit wird für die Proteine der lytischen Phase der Name des Leserahmens, für die Genprodukte der latenten Phase der Proteinname als Bezeichnung verwendet.

### 1.3.1 Primärinfektion

Das EBV hat als einzigen natürlichen Wirt den Menschen, jedoch finden sich bei allen höheren Primaten EBV-ähnliche Viren (*Epstein 2001, Cho et al. 2001*). Obwohl EBV ein B-lymphotropes Virus ist, kann der lytische Replikationszyklus auch in Epithelzellen, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen ablaufen (*Rickinson und Kieff 2007*).

Die Übertragung von EBV erfolgt über den Speichel. Das erste Zielgewebe ist vermutlich das Epithel im Oropharynx, in dem zunächst eine Virusvermehrung über die lytische Replikation stattfindet. Der nächste Schritt ist die Infektion naiver B-Zellen, die vereinzelt subepithelial und im lymphatischen Gewebe des Oropharynx (Waldeyer Rachenring) vorkommen (Young und Rickinson 2004). In den infizierten B-Lymphozyten zirkularisiert die virale DNA und persistiert dauerhaft als extrachromosomales Episom (Decker et al. 1996).

### 1.3.2 Genprodukte der Latenz

Als Latenzprodukte werden die sechs Epstein-Barr nukleären Antigene (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP) sowie die drei latenten Membranproteine (LMP-1, -2A, -2B) bezeichnet. Die Latenzproteine spielen *in vitro* bei der Transformation von B-Lymphozyten zu latent infizierten lymphoblastischen Zelllinien eine wichtige Rolle (Young und Rickinson 2004). Insbesondere das EBNA-1 induziert die Vervielfältigung des Episoms durch die Bindung an den Replikationsstart *OriP* (Wysokenski und Yates 1989). Das LMP-1 erfüllt die Kriterien für ein potenzielles Onkogen. Es transformiert Nagetierfibroblasten und ist das wichtigste Protein für die Immortalisierung der Zellen *in vitro* (Young und Rickinson 2004). Neben diesen Proteinen können in allen latent infizierten Zellen nicht-codierende, nicht polyadenylierte RNAs, die sog. EBERs nachgewiesen werden. Diese bilden Komplexe mit zellulären Proteinen und sind so in die Regulation von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren involviert (Samanta et al. 2008).

Das Muster der viralen Latenzproteine ist charakteristisch für die einzelnen infizierten Subpopulationen der B-Lymphozyten (Thorley-Lawson und Gross 2004). In der Literatur werden diese Expressionsmuster als Transkriptionsprogramme und Latenzstadien bzw. Latenztypen bezeichnet. Insgesamt werden vier Programme unterschieden, die für die Umgehung der immunologischen Kontrollmechanismen des Wirtes von Bedeutung sind (Ning 2011). Im Latenzstadium 0 (*true latency*) werden keine viralen Proteine synthetisiert. Somit wird die infizierte Zelle weder vom Immunsystem erkannt, noch sind beim Wirt klinische Symptome festzustellen. Diese Gedächtniszellen bilden das Reservoir, das für die lebenslange Persistenz des Virus verantwortlich ist. Bis das Immunsystem das Virus soweit unter Kontrolle hat, dass sich die *true latency* einstellt, durchläuft das Virus die Latenzstadien III-I (Ning 2011). Eine Übersicht dieser Latenzstadien ist in Tabelle 1.2 aufgeführt.

**Tabelle 1.2:** Genexpressionsprofile der EBV-infizierten B-Lymphozyten

Programm	transkribierte Gene	infizierter B-Zell-Typ	Funktion
<i>True latency</i> (Latenz 0)	EBERs	Gedächtniszelle, Reservoir	lebenslange Persistenz
<i>EBNA-1 only</i> (Latenz I)	EBERs, EBNA-1	Gedächtniszelle, replizierend	Virusreplikation bei Zellteilung
<i>Default programme</i> (Latenz II)	EBERs, LMP-1, -2A, -2B, EBNA-1	Zentroblasten	B-Zell-Differenzierung zur Gedächtniszelle
<i>Growth programme</i> (Latenz III)	EBERs, LMP-1, -2A, -2B, EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, EBNA-LP	naive B-Zelle	Aktivierung zum Lymphoblast
Lytisch	alle lytischen Gene	Plasmazelle	Virusreplikation

Tabelle verändert nach Thorley-Lawson und Gross 2004

### 1.3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen

Neben der häufig asymptomatischen Primärinfektion und dem möglichen Krankheitsbild der Infektiösen Mononukleose, spielen vor allem EBV-assoziierte maligne Erkrankungen eine wichtige Rolle. Eine virale Genese von Tumorerkrankungen wird seit der Isolierung von EBV aus Burkitt-Lymphomzellen diskutiert. Das Potenzial zur Immortalisierung von B-Lymphozyten *in vitro* konnte bereits früh von *Henle et al. 1967* gezeigt werden. Die Anwesenheit von EBV konnte unter anderem beim Burkitt-Lymphom (*Epstein et al. 1964, Carbone et al. 2008*), dem klassischen Hodgkin-Lymphom (*Hashmi et al. 2017*) und bei lymphoproliferativen Erkrankungen im Rahmen einer Immunsuppression (*Gottschalk et al. 2005*) nachgewiesen werden. Aber auch Tumoren epithelialen Ursprungs wie das Nasopharynxkarzinom (*Niedobitek et al. 2001*) und Sarkome (*Tse und Kwong 2015*) können mit EBV assoziiert sein. Somit ist ein therapeutischer Angriffspunkt dieser Malignome die Therapie der EBV-Infektion (*Tse und Kwong 2015*).

## 1.4 EBV-ähnliche Viren bei Affen

Auf der Suche nach (kreuzreaktiven) Antikörpern gegen EBV-Proteine wurden Seren mehrerer Affenspezies analysiert (*Dunkel et al. 1972*). Dabei wurden eine Vielzahl von B-lymphotropen Herpesviren unter anderem in Schimpansen (*Landon et al. 1968*), Grünen Meerkatzen (*Boecker et al. 1980*) und Bärenmakaken (*Lapin et al. 1985*) entdeckt, die in ihrer Antigenität dem humanen EBV ähneln, sich aber auf genomischer Ebene unterscheiden.

### 1.4.1 Macacines Gammaherpesvirus 4

Für das in Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) entdeckte Lymphocryptovirus lautet die offizielle Bezeichnung des ICTV Macacines Gammaherpesvirus 4 (McHV-4). In der Literatur sind noch die älteren Bezeichnungen Cercopithecines Herpesvirus 15 und Rhesus Lymphocryptovirus zu finden (*Adams et al. 2016*). Das Virus wurde aus Lymphomzellen eines immunsupprimierten Rhesusaffen isoliert (*Rangan et al. 1986*). Nachdem das Genom von *Rivailler et al. 2002* vollständig sequenziert wurde, konnten 80 offene Leserahmen für EBV-ähnliche lytische und latente Gene ermittelt werden. Auf Aminosäureebene (Aminosäure, AS) liegt die Identität der lytischen Proteine zu EBV bei 70–90 %, die der latenten Proteine bei 30–80 %. Trotz der Unterschiede besitzen die Proteine eine ähnliche Funktion (*Wang 2013*).

Das Virus wird über Tröpfcheninfektion übertragen und repliziert in den Epithelien des Oropharynx, von wo aus B-Lymphozyten infiziert werden. Der natürliche Verlauf der Primärinfektion ist in der Regel asymptomatisch. Die Seroprävalenz bei zweijährigen Affen liegt bei nahezu 100 % (*Moghaddam et al. 1997*). Im Rahmen experimenteller Primärinfektionen konnte im Blut der Tiere über einen Zeitraum von 10 bis 16 Wochen eine Lymphozytose festgestellt werden, wobei es sich bei 60 % der Zellen um aktivierte B-Lymphozyten handelte. Die Affen entwickelten eine periphere Lymphadenopathie, wie sie auch im Rahmen der EBV-Primärinfektion gefunden werden kann. Eine Infektion der Tiere mit humanen EBV war nicht möglich (*Carville und Mansfield 2008*). Nicht-humane Primaten werden häufig für Organtransplantationsstudien verwendet. Im Rahmen der überdosierten immunsuppressiven Therapie entwickelten die virusinfizierten Tiere eine *Post-transplant lymphoproliferative disorder* (*Page et al. 2013*).

### 1.4.2 Herpesvirus *Macaca arctoides*

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem von *Lapin et al. 1985* aus der Affenspezies *Macaca arctoides* (Bärenmakaken) isolierten lymphotropen Herpesvirus *Macaca arctoides*, kurz HVMA. *In vitro* wurde die Zelllinie MAL-1 (*Macaca arctoides* Lymphozyten-1) etabliert (*Lapin et al. 1985*). Bisherige Analysen mittels Dichtegradzentrifugation ergaben typische Werte für Herpesviren von Primaten und eine ungefähre Genomgröße von 170 kb wurde ermittelt (*Kakubava et al. 1990a*). Der Nachweis von CD-Markern (*Cluster of differentiation*, CD) auf den MAL-1-Zellen diente der Zuordnung des Zelltyps. Die Immunphänotypisierung ergab die Expression des T-Zell-Markers CD2 sowie des B-Zell-Markers CD23 und eine  $\lambda$ -Leichtkettenrestriktion (*Agrba et al. 2004*). Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der Kultur um eine Mischung aus T- und B-Zellen handelt.

Eine Infektion und Transformation von humanen Nabelschnur-Lymphozyten mit HVMA war nicht möglich (*Meerbach et al. 2004*), jedoch ist das Virus in der Lage Lymphozyten von Nicht-Primaten zu infizieren und durch Transformation tödliche, generalisierte Lymphome auszulösen (*Timanovskaia et al. 1988*, *Kakubava et al. 1990b*). Bei der Infektion von Kaninchen mit HVMA entwickelten die Tiere ein symptomatisches Krankheitsbild mit Hepatosplenomegalie, Lymphknotenschwellung, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust. Von 32 infizierten Kaninchen bekamen 17 Tiere eine lymphoproliferative Erkrankung. Hierzu zählten maligne Lymphome sowie eine lymphozytäre Hyperplasie der Milz und parenchymatöser Organe. Die Zellen erfüllten in der histologischen Begutachtung Kriterien für Non-Hodgkin-Lymphome und zeigten einen hohen Malignitätsgrad (*Wutzler et al. 1995*).

Bei allen infizierten Kaninchen wurden im Serum mittels ELISA-Technik kreuzreaktive Antikörper gegen rekombinante EBV-Proteine des lytischen Replikationszyklus detektiert. Hierzu zählen Glykoproteine des viralen Capsid-Antigens (VCA gp 18 und VCA gp 23) sowie Glykoproteine des *Early Antigen* (EA gp54 und EA gp13). Antikörper gegen das Protein EBNA-1 konnten nicht nachgewiesen werden. Die MAL-1-Zellen selbst zeigten in der Immunfärbung eine Reaktivität gegenüber monoklonalen Antikörpern gegen die lytischen EBV-Antigene EA-D-rp54 (*BMRF1*-Leserahmen), EA-rp138 (*BALF2*-Leserahmen), VCA gp150 (*BcLF1*-Leserahmen) sowie EBNA-1 und EBNA-2. Eine Reaktivität mit EBV-LMP-1 Antikörpern konnte nicht nachgewiesen werden (*Wutzler et al. 1995*).

HVMA und EBV weisen in Bezug auf die Antigenexpression in B-Lymphozyten und den hervorgerufenen Krankheitsbildern eine große Homologie auf. Im Gegensatz zu EBV war es möglich, HVMA in einem Nicht-Primaten-Tiermodell zu etablieren (*Wutzler et al. 1995*), das als Grundlage für die weitere Erforschung und Therapie von EBV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen verwendet werden kann.

## 1.5 Zielsetzung

Herpesvirus *Macaca arctoides* ist das bislang erste  $\gamma_1$ -Herpesvirus, das die Fähigkeit besitzt, Kaninchenlymphozyten zu infizieren und zu transformieren (*Timanovskaia et al. 1988*). Somit ergibt sich Potenzial für die weitere Erforschung der EBV-induzierten Lymphome im Kleintiermodell.

Bisherige Arbeiten untersuchten vor allem biologische Eigenschaften und weniger die Genomorganisation des Herpesvirus *Macaca arctoides*. Erste Bemühungen um die Sequenzierung des viralen Genoms erfolgten am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena. Durch *Next-Generation-Sequenziertechnologie* (NGS) konnten ca. 75 % des Genoms (125.541 bp) identifiziert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten nun die verbliebenen Lücken im viralen Genom mittels spezifischer flankierender Oligonukleotide amplifiziert und durch Sequenzierung geschlossen werden. Die Sequenzinformationen sollten der Identifizierung viraler Gene und der phylogenetischen Einordnung des Virus innerhalb der Familie der *Herpesviridae* dienen. Bis zur endgültigen Einordnung wurden Vergleiche mit dem bei Rhesusaffen vorkommenden Macacinen Gammaherpesvirus 4 durchgeführt.

In einem weiteren Experiment sollte die Anzahl der Viruskopien pro MAL-1-Zelle ermittelt werden. Für diese Fragestellung wurde zunächst eine HVMA-spezifische quantitative PCR etabliert.

Der letzte Themenkomplex beschäftigte sich mit der Frage nach dem Grad der Persistenz des viralen Genoms in den transformierten Zellen. Als Methode wurde das *in situ*-Lysisgel nach Gardella mit anschließender Southern-Blot-Hybridisierung gewählt.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bilden eine Grundlage für die mögliche Verwendung der HVMA-infizierten lymphoblastoiden Zelllinien als alternatives EBV-Modell.

## 2 Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Oligonukleotide

Anhand bereits bekannter Genomabschnitte von HVMA wurden Oligonukleotide definiert und durch Fa. Biomers (Ulm) hergestellt (Tabelle 2.1). Die Definition der Oligonukleotide erfolgte in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers des Long PCR Enzyme Mix (ThermoFisher). Mit Hilfe des Online Tools *Oligonucleotide Analysis* ([www.geneinfinity.org](http://www.geneinfinity.org)) wurden die Schmelztemperaturen ermittelt. Die Angabe der Sequenzen der Oligonukleotide erfolgt in 5' – 3' Orientierung. Bei der Nomenklatur der Oligonukleotide wurden ungerade Zahlen für die Oligonukleotide auf dem Vorwärtsstrang (*forward*, fw) und gerade Zahlen für Oligonukleotide auf dem Gegenstand (*reverse*, rv) verwendet. Die Positionsangabe beziehen sich auf das Startnukleotid (Nukleotid, nt) bezogen auf den Vorwärtsstrang der längeren Virusvariante A.

**Tabelle 2.1:** HVMA-spezifische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden für die Amplifikation der fehlenden Genomabschnitte, für die quantitative PCR zur Ermittlung der Viruskopien pro infizierter Zelle und zur Sequenzierung verwendet.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5' – 3')	Genomposition [nt]
HVMA 1 fw	AGGACCCAGACGCGTCTGGAG	15.493, 18.570, 21.650, 24.724, 27.801
HVMA 1a fw	AAGTGGACTTTTAGTTATTCTGCTCAGCCCAAC	15.352, 18.429, 21.509, 24.583, 27.660
HVMA 1b fw	GAAGACCCAGCGGCCATTCTCTCTGGTAACG	12.952, 16.029, 19.106, 22.183, 25.261, 28.337
HVMA 1c fw	AGAACTCTGGAGGACTTTAAAACCTCG	14.757, 17.834, 20.914, 23.988, 27.065
HVMA 2a rv	GCTGGTGATTGGAGGTATGCCTAGCACTTAC	30.181
HVMA 2b rv	CCTACTCGAGGCAGGCTTACATGGGAGTCTATG	14.469, 17.546, 20.626, 23.700, 26.777, 29.854
HVMA 2c rv	GGTTACTGCTTGTGGGTCTGTTCTTTGCCTAGC	30.252
HVMA 3 fw	TGGATCGCGCTAGGCAAAGAACAG	30.213
HVMA 3a fw	GCTGTAAAGTTTTGCCTGAACC	30.750
HVMA 4 rv	ATACGATTCTCCGTTCTAACC	30.884
HVMA 5a fw	CACCCAGATCGCAGAGATGTCTGGACACAAGAACC	31.065
HVMA 5b fw	AGTCAGAAATTATCACCTTGTCAACC	31.345
HVMA 5c fw	AAGAGAAAAGGCCAAGTCTGG	31.884
HVMA 5d fw	ACCACACACCTTCGAGTCC	32.465
HVMA 6a rv	TGTTTCGAGAATTCATGCATATGCAGAGTCAG	36.865
HVMA 6b rv	GCCAAACAACTCACAGTAAAACC	36.612
HVMA 6c rv	TCTCCAGACCCGGTGTAGTGC	36.183
HVMA 6d rv	ACCCAGCTGTAGTACCCTATTCC	35.666, 137.961
HVMA 6e rv	TAACCCAACGGGCTAAAATGACACACC	35.268, 137.563
HVMA 6h rv	TGTGCCACGGGGACC	34.617
HVMA 7a fw	GAAGGGATGAGTGTGTGC	7.079
HVMA 7b fw	TTCTGCTAGGGAGGAGATTAGCGTGGTTTTGAG	6.744

**Tabelle 2.1:** HVMA-spezifische Oligonukleotide: *Fortsetzung*

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5' – 3')	Genomposition [nt]
HVMA 8 rv	ATCCTAATATAGCTGGGTAGC	7.642, 7.670, 7.826, 7.929, 7.982
HVMA 9a fw	CTAGTG TAGGATAGCATATGC	7.603
HVMA 10 rv	GAGTAATTGCGTCACGG	8.233
HVMA 10c rv	CCTAGTATAGCCTTGGATAGCA	8.035
HVMA 11b fw	TACTTCCTACCCGGAACCCGAAACTCTG	9.642
HVMA 12c rv	GGCATTGCAGCATCACCAGGCATTGCAGAG	9.819
HVMA 12d rv	ATGTGTCCAGACCGGGTCTCTGGGACTGTC	12.734, 15.811, 18.888, 21.965, 25.042, 28.119
HVMA 12e rv	GCCTGAGTCCCTACTTTTAGG	14.634, 17.711, 20.791, 23.865, 26.942
HVMA 12f rv	GACACTCTGGGCTCTGAAGC	13.815, 16.892, 19.969, 23.046, 26.123, 29.200
HVMA 13a fw	GAGGTAGAGGAGGGAAACATGAGCGAGGTGATG	4.616
HVMA 14a rv	CCCTGACGTCGCGGAAATAGACCCGCTGACATAG	5.057
HVMA 15 fw	TGCACTGACTTTTGGCAG	5.663
HVMA 16a rv	AGATAGCAGAAAGCAACGTATGTGCGAATATGGC	6.861
HVMA 19a fw	CCTGTTTCGTGAGCTTGAGCGGAATCCTCAC	1.470
HVMA 21 fw	CTCCAGAAGTTCAAGATGGACTGTATTTCTAGC	37.178
HVMA 22 rv	TGCAGATCATCAACTACACTCAGCTCATTTTGG	38.458
HVMA 23a fw	ATTTTTTCAGACGCCGAGACGGACGACGAG	42.000
HVMA 24d rv	TCCTTCGAGCCCGAGATGTCCGTCTTCG	46.515
HVMA 25 fw	TACTCGATCGCCGTGAGCAGGGCCAGAAAGCG	50.975
HVMA 26 rv	GGCAGACGCCTCCGCCCTTTCGGATCCTCTCGG	54.021
HVMA 27 fw	TTGCATGATAGAATGGCCATAGGGTGGAGC	45.517
HVMA 28 rv	TCTCTTGGAAACAACGGGAAATAATGACGCTGTTGG	47.401
HVMA 29 fw	AGATCCGTGTTGACCGTCGCCGACTTGG	49.085
HVMA 30 rv	ATCATCTCCTCCCTGCCGGACCTCAACATCC	50.760
HVMA 31 fw	TCCTTAGCCTTGAGGGTCTCGGAGATGACG	54.984
HVMA 32 rv	AGAACGGGTCGCTCTGCTTGAAGTGAAGAGG	57.615
HVMA 33 fw	CCTTTGATTACAGCCAGGAGGACCTGATGC	60.405
HVMA 35a fw	ATCACAAAGTATCGCCTGTCCGAGAAATGG	67.723
HVMA 36 rv	TTCCTGGGCCACTACGTCAAGAGTTACAACC	65.016
HVMA 36a rv	TGGACCGGGCTTCGCGGAGCACATGC	68.110
HVMA 37 fw	TGCGTCAGCGTCTCAATCGTGCAAGGAATGC	68.464
HVMA 38 rv	TCTACCTCCACAAACACCACCTGACCTCCTTCTAC	70.000
HVMA 39 fw	ATCTGACCGTCCGCTTTCAAGTCTCTATGTCTGG	71.427
HVMA 39a fw	GGGGCTGGATGTTTCTGGTGGAGAACT	72.270
HVMA 40 rv	ACGCTTGGGAAAGATGGACCGAGTGGGTCAGC	82.885
HVMA 40a rv	AGTTCTCCACCAGAAACATCCAGCC	72.296
HVMA 41 fw	GAGGCGCAGTCTTTCGTTCTCCTTGGATTTGG	84.024
HVMA 41a fw	ACCTCTACCTTCTGGTTTGG	83.687
HVMA 42 rv	CCTTTTCCACAAGCCTTTGACGCAGCTACC	85.008

**Tabelle 2.1:** HVMA-spezifische Oligonukleotide: *Fortsetzung*

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz (5' – 3')	Genomposition [nt]
HVMA 42a rv	CGTTATTGTGCTCCTCCTGG	83.791
HVMA 43 fw	ACTCCAAGATGCAAGCCTTGATGATGTGC	89.525
HVMA 44 rv	GCCTATATCCTGGAAACCCATAGAATGACC	90.659
HVMA 44a rv	AGGATGAACTGCCACTGGGACTCC	90.551
HVMA 45 fw	TGAGAACCGTCATCAGTAAATCCGTCTCTCG	98.380
HVMA 45a fw	AGCCGGTCCAGGGCCAGGCAAAGG	98.751
HVMA 45b fw	TCCTCCGCTTCTTCCACACCTTTCAGG	98.951
HVMA 48 rv	TCTCTTTGCCGACGACGAGTCAACTCCATAGC	102.691
HVMA 49 fw	AAGGAGACAAGCACCATCACCTTCAGGCACAGC	107.528
HVMA 50 rv	TGACGACCTCCCACGTCTATGCCACTTCAACC	108.214
HVMA 51 fw	AGGTCACCGTGCCAACACCATCCAGC	111.908
HVMA 52 rv	CTCTCGGATCGCTCATTTCTGCATACTTGG	113.045
HVMA 53 fw	AGGTTACTGTTAGCCAATTTAAGCAGTTCCCATGC	135.082
HVMA 53b fw	TCCCAGGTATCCCGCTGAAATTGG	135.245
HVMA 53e fw	GGTTACTGTTAGCCAATTTAAGC	135.083
HVMA 53j fw	TTCACCTGGAAGGCAAGC	137.027
HVMA 54i rv	GCTTGCCTTCCAGGTGAA	137.046
HVMA 54j rv	GCTTAGGATACCTCCAGGATAAT	35.497, 137.884
HVMA 55 fw	TTTGCCTGAGGTGTGTTTGTGACTGCTGAGG	138.550
HVMA 56 rv	TTATCTCCATATGTGCCATGGACCAAGAATCG	139.255
HVMA 57a fw	GCAGTTGTAGATGGCCAATTTTATGGGCGAGTGG	145.895
HVMA 58a rv	CATTCCCCTGGCCGTGGACCACTACTTTGACAAGC	148.972
HVMA 59 fw	GTTTAGAAAGTTGCCAGAAAAGTCCGTCTCG	158.405
HVMA 60 rv	TGGTGGCCATTCCATCGTTAAAACAGGAGGTAACC	159.432
HVMA 61 fw	AGGCTGTAGGCAGGGTTGTTCTGCTCAAGG	162.912
HVMA 64 rv	GCACGAAAACAACACCCTTGCCCTTTTCAAACCTCC	166.416
HVMA 65 fw	TACTGCTTAGAGAGGCTGGCGCGGATATGG	166.192
HVMA 66 rv	ACGGCACGTCAAGTCATGCGTGATGGGGAATGTGG	1.833

Die Sequenzen der Oligonukleotide für die Amplifikation von genomischem  $\beta$ -Aktin (ACTB) wurde von *Takacova et al. 2009*, die Sequenzen für den pJET1.2/blunt-Vektor vom Hersteller (ThermoFisher) übernommen. Da die relativ kurzen TOPO<sup>®</sup>-Oligonukleotide des Herstellers (Invitrogen) nicht für alle Anwendungen verwendet werden konnten, wurden die angegebenen Sequenzen um einige Nukleotide verlängert (Tabelle 2.2). Die Herstellung der Oligonukleotide erfolgte ebenfalls durch Fa. Biomers.

**Tabelle 2.2:** Weitere Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Vektor/Spezies	Position [nt]
TOPO M13 long fw	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCA	pCR <sup>TM</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	205
		pCR <sup>TM</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	205
TOPO M13 long rv	TAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTC	pCR <sup>TM</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	405
		pCR <sup>TM</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	447



**Tabelle 2.2:** Weitere Oligonukleotide: *Fortsetzung*

Oligonukleotid	Sequenz (5' – 3')	Vektor/Spezies	Position [nt]
pJET fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	pJET1.2/blunt	309
pJET rv	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	pJET1.2/blunt	427
ACTB fw	CCAACCGCGAGAAGATGACC	Macaca Chromosom 3	
ACTB rv	GATCTTCATGAGGTAGTCAGT	Macaca Chromosom 3	

Die im Vergleich zum Hersteller zusätzlich eingefügten Nukleotide in den TOPO M13 long Oligonukleotiden sind unterstrichen.

### 2.1.2 Zellkulturen

Die Zelllinien MAL-1 und Ramos wurden freundlicherweise von Prof. Roland Zell aus dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie HTRL (HVMA-transformed rabbit lymphocytes, HTRL) wurde von Dr. Michael Schacke, ebenfalls aus dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena, etabliert und bislang nicht publiziert. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank im S2-Bereich durchgeführt.

**Tabelle 2.3:** Eukaryote Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Spezies	$\gamma$ -Herpesvirus	Referenz
Ramos	afrikanisches Burkitt-Lymphom	<i>Homo sapiens</i>	virusfrei	<i>Klein et al. 1974</i>
Raji	amerikanisches Burkitt-Lymphom	<i>Homo sapiens</i>	EBV positiv	<i>Pulvertaft 1964</i>
MAL-1	malignes Lymphom	<i>Macaca arctoides</i>	HVMA positiv	<i>Lapin et al. 1985</i>
HTRL	malignes Lymphom	Kaninchen ( <i>Oryctolagus</i> )	HVMA positiv	unveröffentlicht

### 2.1.3 Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) (One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5 $\alpha$ -T1R Competent Cells, Invitrogen Life Technologies) verwendet.

### 2.1.4 Plasmide

Die Verwendung von Plasmiden diente der dauerhaften Sicherstellung und Vervielfältigung der zuvor amplifizierten DNA. Alle drei verwendeten Vektoren enthalten unter anderem ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin. Es wurden die Plasmide pCR<sup>®</sup> 2.1.-TOPO<sup>®</sup> Vektor, pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> Vektor (beide Invitrogen Life Technologies) und pJET1.2/blunt-Cloning Vector (ThermoFisher) verwendet.

## 2.1.5 Chemikalien und Enzyme

**Tabelle 2.4:** Chemikalien und Enzyme

Reagenz	Hersteller
Agarose	Invitrogen life technologies GmbH, Darmstadt
Ampuwa Spüllösung (Aqua dest.)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
<i>Bgl</i> III	ThermoFisher, Dreieich
Brom-Phenol-Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Eco</i> RI	ThermoFisher, Dreieich
<i>Eco</i> RV	ThermoFisher, Dreieich
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisessig (Essigsäure 96 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidumbromid-Lösung	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ficoll PM 40	GE Healthcare, Solingen
Glycerin 99,5 %	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
<i>Hind</i> III	ThermoFisher, Dreieich
Isopropanol absolut	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lithiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Maleinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Natriumcitrat	Ambresco, Ohio (USA)
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid-Pellets	J.T. Baker, Deventer (Niederlande)
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Proteinase K	Qiagen, Hilden
RNase A	ThermoFisher, Dreieich
RPMI 1670	PAA Laboratories, Cölbe
Salzsäure 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Sodium dodecyl sulfate, SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Super Optimal Broth-Medium mit 20 mM Glucose, SOC	Invitrogen Life Technologies
Standard Saline Citrate, SSC	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat, TPA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, TRIS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
X-Gal-Pulver	ThermoFisher, Dreieich

## 2.1.6 Isolierung, Markierung und Detektion von DNA

**Tabelle 2.5:** Reagenzien und Reagenzsysteme für DNA-Arbeiten

Produkt	Anwendung	Hersteller
BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Sanger-Sequenzierung	ThermoFisher, Dreieich
DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II	Southern-Blot-Analyse	Roche Diagnostik, Mannheim
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Zellkultur	Qiagen, Hilden
DreamTaq PCR Master Mix	DNA-Amplifikation	ThermoFisher, Dreieich
GeneJET PCR Purification Kit	DNA-Aufreinigung	ThermoFisher, Dreieich
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Plasmid-Isolierung	ThermoFisher, Dreieich
GeneJET Plasmid Midiprep Kit	Plasmid-Isolierung	ThermoFisher, Dreieich
Long PCR Enzyme Mix	DNA-Amplifikation	ThermoFisher, Dreieich
Maxima SYBR-Green qPCR Master Mix	DNA-Amplifikation	ThermoFisher, Dreieich
NucleoSpin® Gel and PCR Clean up	DNA-Aufreinigung	Macherey Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Nylonmembran, positiv geladen	Southern-Blot-Analyse	Roche Diagnostik, Mannheim
O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Gelelektrophorese	ThermoFisher, Dreieich
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Gelelektrophorese	ThermoFisher, Dreieich
O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Gelelektrophorese	ThermoFisher, Dreieich
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA-Polymerase	DNA-Amplifikation	ThermoFisher, Dreieich

## 2.1.7 Geräte und Software

**Tabelle 2.6:** Laborausstattung

Laborgerät	Name	Hersteller
Gelelektrophorese Stromquelle	EPS 301 Power Supplies	GE Healthcare, Solingen
Gelelektrophorese Kammer	Eigenbau	Universität Erlangen
Geldokumentation UV-System	UV-System	Intas, Göttingen
Inkubator	CO <sub>2</sub>	Binder, Tuttlingen
	HT Multitron	Infors, Einsbach
	B 50	Memmert, Schwabach
Kapillar-Sequenzierer	DNA Analyser 3700	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Magnetrührer	Combimag REA	IKA, Staufen
Mikroskop	CK 2	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	ME76V-BB/XEG	Samsung, Schwalbach/Ts.
PCR-Block	Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
	LightCycler II	Roche Diagnostik, Mannheim
pH-Meter	Seven easy S20	Mettler Toledo, Gießen
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, Konstanz
Sicherheitswerkbank	HeraSafe KS	ThermoFisher, Dreieich
Southern-Blot-Dokumentation	LAS 3000	Fujifilm Europe, Düsseldorf

**Tabelle 2.6:** Laborausstattung: *Fortsetzung*

Laborgerät	Name	Hersteller
Southern-Blot-Hybridisierung	Hybridizer HB-1000	UVP, Upland (USA)
UV-Spektrophotometer	NanoDrop 2000	ThermoFisher, Dreieich
Vortexer	Vortex genius 3	IKA, Staufen
wippender Plattformschüttler	Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge	Biofuge fresco 17	ThermoFisher, Dreieich
	Heraeus Multifuge 4KR	ThermoFisher, Dreieich

**Tabelle 2.7:** Software

Software	Anwendung	Hersteller
Intas GDS	Agarose Gel Dokumentation	Intas, Göttingen
LAS-3000 Image Reader	Southern-Blot-Dokumentation	Fujifilm Europe, Düsseldorf
LightCycler Software 3.5.3	quantitative PCR	Roche Diagnostik, Mannheim
MEGA 6.0	DNA-Annotation, Phylogenetik	The Biodesign Institute, Tempe (USA)
NanoDrop 2000	DNA-Konzentration	ThermoFisher, Dreieich
Oligonucleotide Analysis	Design Oligonukleotide	Geneinfinty, San Diego (USA)
Omnigraffle Pro 5.4.4	Grafiken	The Omni Group, Seattle (USA)
Pixelmator 3.3.1	Grafiken	Pixelmator Company, Wilna (Litauen)
Viral Genome Organizer 3.1	Leserahmenidentifizierung	University of Victoria (Kanada)

## 2.2 Allgemeine Methoden

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel, die UV-Spektrophotometrie zur Konzentrationsbestimmung, die Ethanol-fällung von DNA, die Phenol-Chloroform-Reinigung und der enzymatische Restriktionsverdau sind übliche Verfahren im Umgang mit Nukleinsäuren. Diese wurden nach laborinternen Methoden in Anlehnung an etablierte Standardprotokolle nach *Sambrook und Russel 2001* durchgeführt und werden hier nicht näher erläutert.

## 2.3 Zellkulturen

### 2.3.1 Kultur eukaryoter Zellen

**Kulturbedingungen:** Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium (Phenolrot-Zusatz) supplementiert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (alle PAA Laboratories GmbH) bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kulturen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:2 bis 1:3 geteilt. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (S2-Bedingungen) durchgeführt.

**DNA-Extraktion:** Die Isolierung viraler (und genomischer) DNA aus  $5 \times 10^6$  MAL-1-Zellen erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Extraktionssystems (DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit, Qiagen) nach Angaben

des Herstellers. Die DNA wurde als Ausgangsmaterial für die Amplifikation der fehlenden HVMA-Sequenzen mittels qualitativer PCR verwendet. Für die quantitative Analyse wurde DNA aus jeweils  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^5$  MAL-1-Zellen isoliert und in 200  $\mu\text{l}$  eluiert. Die Zellzählung erfolgte in den vier Eckquadraten der Neubauer-Kammer in zehnfacher Vergrößerung mit 10  $\mu\text{l}$  unverdünnter Zellsuspension. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde durch UV-Spektrophotometrie (NanoDrop 2000) bestimmt und das Eluat bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

**Induktion der lytischen Phase:** Als Positivkontrolle für das *in situ*-Lysisgel nach Gardella wurde die latent infizierte Raji-Zelllinie verwendet. Diese produziert keine infektiösen EBV-Partikel und enthält 50 bis 60 Episomen pro Zelle (Decker et al. 1996, Gardella et al. 1984). Durch die Zugabe von 100 ng/ml TPA zum Kulturmedium kann der lytische Replikationszyklus von EBV induziert werden (Davies et al. 1991). Das *in situ*-Lysisgel wurde 72 h nach Induktion durchgeführt.

### 2.3.2 Kultur prokaryoter Zellen

**Tabelle 2.8:** Nährmedien und Reagenzien für prokaryote Zellen

Medium	Zusammensetzung
<i>Lysogeny Broth</i> -Medium, LB-Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl; pH 7
<i>Lysogeny Broth</i> -Agar, LB-Agar	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl; 15 g/l Agar; pH 7
X-Gal Lösung	20 mg/ml X-Gal (Lösungsmittel DMSO)

**Anzucht:** Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Flüssigkultur (LB-Medium) und auf festen Nährböden (LB-Agar). Zur Selektion wurden alle Nährmedien mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin versetzt. Flüssigkulturen wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei  $37^\circ\text{C}$  und 220 rpm inkubiert. Festmedien wurden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet.

**Transformation:** Die bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagerten *E. coli*-Bakterien wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz auf die Bakteriensuspension gegeben und der Ansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Im  $42^\circ\text{C}$  heißen Wasserbad erfolgte für 40 s der Hitzeschock. Zum Verschluss der Poren wurde der Ansatz anschließend kurz auf Eis abgekühlt und nach der Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  SOC-Medium (Invitrogen Life Technologies) für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Heizblock inkubiert. Nach 1 h wurde die Suspension auf LB-Agar, versetzt mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin, in einer Petrischale mit 9 cm Durchmesser ausplattiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Bei der Verwendung des TOPO<sup>®</sup>-Vektors wurden für die Blau-Weiß-Selektion vor dem Ausplattieren der Bakterien 50  $\mu\text{l}$  X-Gal-Lösung gleichmäßig auf dem Agar verteilt und die Platte für 60 min stehen gelassen.

**Dauerkultur:** Zur dauerhaften Konservierung der Bakterien wurde eine Flüssigkultur in LB-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin angeimpft und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Ansatz wurde mit dem gleichen Volumenanteil 99,5 % Glycerin versetzt, die Suspension auf mehrere Kryoröhrchen verteilt und die Bakterien bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.4.1 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Bei der konventionellen, qualitativen *Polymerase chain reaction* (PCR) durchläuft der Ansatz eine vorgegebene Anzahl von Zyklen und wird im Anschluss mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Dieses Verfahren wurde für die Amplifikation der fehlenden Genomabschnitte von HVMA mit drei verschiedene kommerziellen Amplifikationssystemen (alle ThermoFisher) und für die Sondenherstellung der Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzt.

Die Phusion Hot Start II und der Long PCR Enzyme Mix wurden für die Amplifikation von großen Fragmenten bis 11 kb verwendet. Alle enthaltenen Polymerasen verfügen über eine Korrekturlesefunktion. Kurze Genomabschnitte bis ca. 3 kb wurden mit der DreamTaq amplifiziert. Die PCR wurde nach Herstellerangaben mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 durchgeführt. In Abhängigkeit von der Schmelztemperatur (*melting temperature*,  $T_m$ ) der Oligonukleotide wurde die *Annealing*-Temperatur bei jeder Amplifikation individuell nach den Vorgaben des Herstellers angepasst. Die Differenz der Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotidpaare beträgt weniger als 5 °C. Die Reaktionsbedingungen und der Reaktionsansatz sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Als Ausgangsmaterial diente die aus MAL-1-Zellen isolierte (virale und genomische) DNA. Je nach Ausbeute wurden 100–200 ng DNA eingesetzt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde der Reaktionsmix unter zwei sterilen Arbeitsbänken in zwei verschiedenen Räumen angesetzt. Zunächst wurde der Reaktionsansatz ohne die DNA pipettiert und die Proben in einem zweiten Schritt hinzugegeben. Der Ablauf der PCR erfolgte automatisiert im *Thermocycler* T3000.

**Tabelle 2.9:** Qualitative PCR: Reaktionsansatz und -bedingungen

Anpassung der Bedingungen für Genomabschnitte mit einem hohem Anteil an Guanin-Cytosin (HVMA [5a/6a] und HVMA [53/56]): Initiale Denaturierung bei 98 °C für 5 min, Denaturierung pro Zyklus 98 °C für 30 s.

Polymerase	Ansatz	Reaktionsbedingungen	
Long PCR Enzyme Mix	5 µl 10x Long PCR Puffer	94 °C	3 min
	1 µl dNTP Mix (10 mmol/l)	94 °C	20 s
	2 µl DMSO	$T_m - 5\text{ °C}$	30 s
	1 µl fw-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	68 °C	7 min x 10
	1 µl rv-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	94 °C	20 s
	0,5 µl Long PCR Enzyme Mix (5 U/µl)	$T_m - 5\text{ °C}$	30 s
	ad 49 µl nukleasefreies Wasser	68 °C	7 min 5 s x 25
	1 µl DNA (100–200 ng)	68 °C	10 min
	Phusion Hot Start II	10 µl 5x Phusion GC Puffer	98 °C
1 µl dNTP Mix (10 mmol/l)		98 °C	30 s
1,5 µl DMSO		$T_m + 3\text{ °C}$	30 s
2,5 µl fw-Oligonukleotid (20 pmol/µl)		72 °C	30 s/kb x 35
2,5 µl rv-Oligonukleotid (20 pmol/µl)		72 °C	10 min
0,5 µl Phusion Hot Start II (2 U/µl)			
ad 49 µl nukleasefreies Wasser			
1 µl DNA (100–200 ng)			

**Tabelle 2.9:** Qualitative PCR: Reaktionsansatz und -bedingungen *Fortsetzung*

Polymerase	Ansatz	Reaktionsbedingungen	
DreamTaq	25 µl DreamTaq PCR Master Mix	95 °C	5 min
	1 µl fw-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	95 °C	30 s
	1 µl rv-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	T <sub>m</sub> - 5 °C	60 s
	ad 49 µl nukleasefreies Wasser	72 °C	30 s/kb x 40
	1 µl DNA (100–200 ng)	72 °C	10 min

## 2.4.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative PCR (qPCR) wird auch als *Real-time quantitative PCR* (Echt-Zeit-PCR) bezeichnet. Neben der Taq-DNA-Polymerase ist im gebrauchsfertigen Mastermix (Maxima SYBR-Green qPCR Master Mix, ThermoFisher) der Farbstoff SYBR Green I enthalten, der doppelsträngige DNA bindet. Hierdurch wird eine hohe Signalstärke erreicht, die am Ende jedes Zyklus laut Herstellerangaben im Kanal F1 des Light-Cyclers detektiert wird. In jedem Zyklus wird die Ausgangsmenge an DNA verdoppelt, so dass sich eine exponentielle Vervielfältigung ergibt. Zu Beginn der Amplifikation erhält man ein schwaches Signal, das von der Hintergrundfluoreszenz nicht abgrenzbar bleibt. In den letzten Zyklen erreicht das Signal ein Plateau, da immer mehr Störfaktoren die Reaktion beeinflussen. Hierzu zählen beispielsweise der Verbrauch der Oligonukleotide und die Erschöpfung der Polymeraseaktivität. Zur Auswertung verwendet man die dazwischenliegende exponentielle Phase. Der Schwellenwertzyklus ist der Zyklus, bei dem das erste detektierbare Signal entsteht, d.h. sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Der C<sub>t</sub>-Wert (*Cycle threshold* für Schwellenwertzyklus) oder C<sub>p</sub>-Wert (*Crossing point* für Kreuzungspunkt) beschreibt den Anfang der exponentiellen Phase. Damit nun eine Aussage über die ursprünglich vorliegende Menge an DNA getroffen werden kann, wird parallel zur Probe noch ein Standard mit bekannter DNA-Menge amplifiziert und das Ergebnis mit Hilfe einer hinterlegten Standardkurve analysiert. Laut Herstellerangaben berechnet die Light Cycler Software den C<sub>p</sub>-Wert automatisiert im sogenannten *Second derivative maximum*-Verfahren (Zhao und Fernald 2005). Tabelle 2.10 zeigt Reaktionsansatz und -bedingungen.

Nach Beendigung der eigentlichen PCR folgt eine Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Spezifität der Amplifikate. Bei Steigerung der Temperatur von 60 °C auf 95 °C wird kontinuierlich das Fluoreszenzsignal registriert. Überschreitet die Temperatur den Schmelzpunkt des Amplikons, trennt sich der Doppelstrang. In Folge fällt das Fluoreszenzsignal kontinuierlich ab, da SYBR Green I bei einzelsträngiger DNA nicht interkalieren kann.

**Tabelle 2.10:** Quantitative PCR: Reaktionsansatz und -bedingungen

Polymerase	Ansatz	Reaktionsbedingungen	
Maxima Hot Start Taq	12,5 µl Maxima SYBR Green Master Mix	95 °C	10 min
	1,5 µl fw-Oligonukleotid (5 pmol/µl)	95 °C	15 s
	1,5 µl rv-Oligonukleotid (5 pmol/µl)	60 °C	30 s
	ad 20 µl nukleasefreies Wasser	72 °C	30 s x 40
	5 µl DNA	60–95 °C	10 min

**Standardkurve:** Aus der aus MAL-1-Zellen isolierten DNA wurden mit Hilfe der HVMA-spezifischen Oligonukleotidpaare [3a/4] und [41a/42a] Amplifikate hergestellt. Nach Ligation der Amplifikate in einen Vektor (pJET), erfolgte die Transformation in *E. coli*. Anschließend wurde die Identität mittels Sequenziermethode nach Sanger bestätigt. Die Plasmide wurden mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher) aus den Bakterien extrahiert und gereinigt und anschließend die Konzentration durch UV-Spektrophotometrie (NanoDrop 2000) ermittelt. Für die Umrechnung der DNA-Konzentration in Kopien/ $\mu\text{l}$  benötigt man die molare Masse der DNA (660 g/mol pro Basenpaar) und die Avogadro-Konstante ( $6 \times 10^{23}$  Plasmidkopien pro mol DNA). Die Umrechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Kopien}/\mu\text{l} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ Kopien / mol} \cdot \text{Konzentration [ng}/\mu\text{l}] \cdot 1 \times 10^{-9}}{\text{Größe der DNA [bp]} \cdot 660 \text{ g/mol}}$$

Tabelle 2.11 zeigt die berechneten Kopienzahlen anhand der gemessenen DNA-Konzentration. Anschließend wurden die Standards auf  $1 \times 10^9$  Kopien/ $\mu\text{l}$  eingestellt und eine geometrische Verdünnungsreihe mit den Stufen  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$ , 1 und  $1 \times 10^{-1}$  Kopien/ $\mu\text{l}$  hergestellt. Vor Erstellung der Standardkurve wurde die Reproduzierbarkeit der Standardergebnisse überprüft. Dazu erfolgte ein Vergleich der  $C_p$ -Werte und der Schmelztemperatur in sechs verschiedenen Ansätzen.

**Tabelle 2.11:** Berechnung der Plasmid-Kopien für HVMA-Standardreihe

Zielsequenz	Amplifikat [bp]	Vektor + Amplifikat [bp]	Konzentration [ng/ $\mu\text{l}$ ]	Kopienzahl [/ $\mu\text{l}$ ]
HVMA [3a/4]	135	3.109	117,7	$3.4 \times 10^{10}$
HVMA [41a/42a]	105	3.079	99,2	$2.9 \times 10^{10}$

Länge pJET: 2974 bp

**Probenanalyse:** Als Ausgangsmaterial dienten drei verschiedene DNA-Präparationen aus jeweils  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^5$  MAL-1-Zellen, die jeweils in 200  $\mu\text{l}$  Flüssigkeit eluiert wurden. Wenn sich in 200  $\mu\text{l}$  Eluat die DNA von  $5 \times 10^6$  MAL-1-Zellen befindet, so befindet sich in 5  $\mu\text{l}$  eingesetztem Probenvolumen die DNA von 125.000 Zellen usw. Die drei DNA-Präparationen wurden nun so eingestellt, dass sich, ausgehend von der eingesetzten Zellzahl, pro 5  $\mu\text{l}$  Probenvolumen die DNA aus 100.000, 10.000 oder 1.000 Zellen befand. Diese wurden dann in Anlehnung an die Verdünnungen der Standardreihen bis zu einer Stufe von  $1 \times 10^{-1}$  Zellen pro 5  $\mu\text{l}$  Probenvolumen jeweils um den Faktor zehn verdünnt. Jede Zielsequenz wurde aus jeder hergestellten Verdünnungsstufe dreimal amplifiziert. Anhand des mitgeführten Standards und der hinterlegten Standardkurve berechnet die LightCycler Software die Konzentration in Kopien/ $\mu\text{l}$ . Zur Berechnung der Anzahl der Viruskopien pro eingesetztem Probenvolumen (5  $\mu\text{l}$ ) wurde das Ergebnis mit fünf multipliziert.

### 2.4.3 DNA-Reinigung aus Agarosegel

Zunächst wurde 1  $\mu\text{l}$  des PCR-Produktes in 1 % Agarose in mit Ethidiumbromid versetztem 1x TBE elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert (analytisches Gel). War eine Bande der erwartenden Größe sichtbar wurden die verbliebenen 49  $\mu\text{l}$  des PCR-Produktes ebenfalls in 1 % Agarose in 1x TBE elektrophoretisch aufgetrennt (präparatives Gel), unter UV-Licht fotografiert und dokumentiert.



Anschließend wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Die DNA-Extraktion aus dem Gel wurde mit einem kommerziellen Extraktionskit (NucleoSpin® Gel and PCR Clean up, Macherey Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt und die Konzentration und Reinheit des Eluats mittels UV-Spektrophotometrie (NanoDrop 2000) bestimmt.

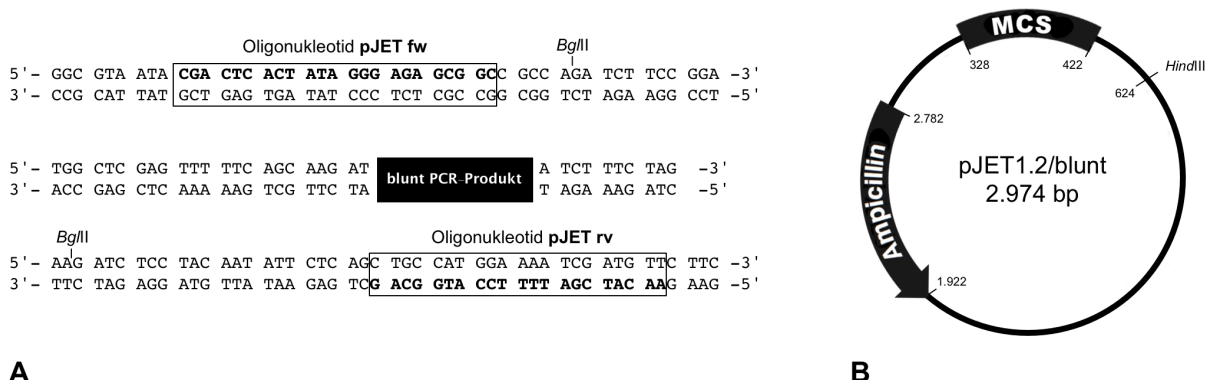
## 2.5 Gentechnische Methoden

### 2.5.1 Klonierung von amplifizierter DNA

Für die dauerhafte Konservierung von Amplifikaten haben sich spezielle Klonierungsvektoren etabliert. Bei Vektoren (Plasmide) handelt es sich um extrachromosomale DNA von Bakterien, die bei der bakteriellen Zellteilung mit vervielfältigt wird. Diese trägt häufig Resistenz- und/oder Toxingene und kann zwischen einzelnen Bakterien ausgetauscht werden (sog. Konjugation), wobei dieser Mechanismus bei den verwendeten Bakterien und Plasmiden nicht natürlich vorkommt. Alle verwendeten Vektoren tragen die Information für eine Antibiotikaresistenz (Ampicillin). *E. coli* besitzt keine natürliche Resistenz gegenüber Ampicillin. Bakterien ohne Plasmid können deshalb auf Nährböden mit Ampicillin-Zusatz nicht anwachsen. Die Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und 5 µl des Ansatzes für die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien verwendet. Zur Steigerung der Effizienz der Ligation, sollte das PCR-Produkt im dreifachen Überschuss zum Vektor vorliegen. Vor jeder Ligation wurde das optimale Verhältnis mittels folgender Formel ermittelt:

$$\text{PCR-Produkt [ng]} = \frac{\text{Menge Vektor [ng]} \cdot \text{Größe PCR-Produkt [kb]}}{\text{Größe Vektor [kb]}}$$

**Klonierung von Fragmenten mit glatten Enden:** Der pJET1.2/blunt-Cloning Vector umfasst 2.974 bp, enthält eine Resistenzkassette für Ampicillin und eine multiple Klonierungsstelle (*Multiple cloning site*, MCS), in der sich die Insertionsstelle für das PCR-Produkt befindet (Abbildung 2.1). Für den Restriktionsverdau wurden die Enzyme *Bgl*III und *Hind*III verwendet.

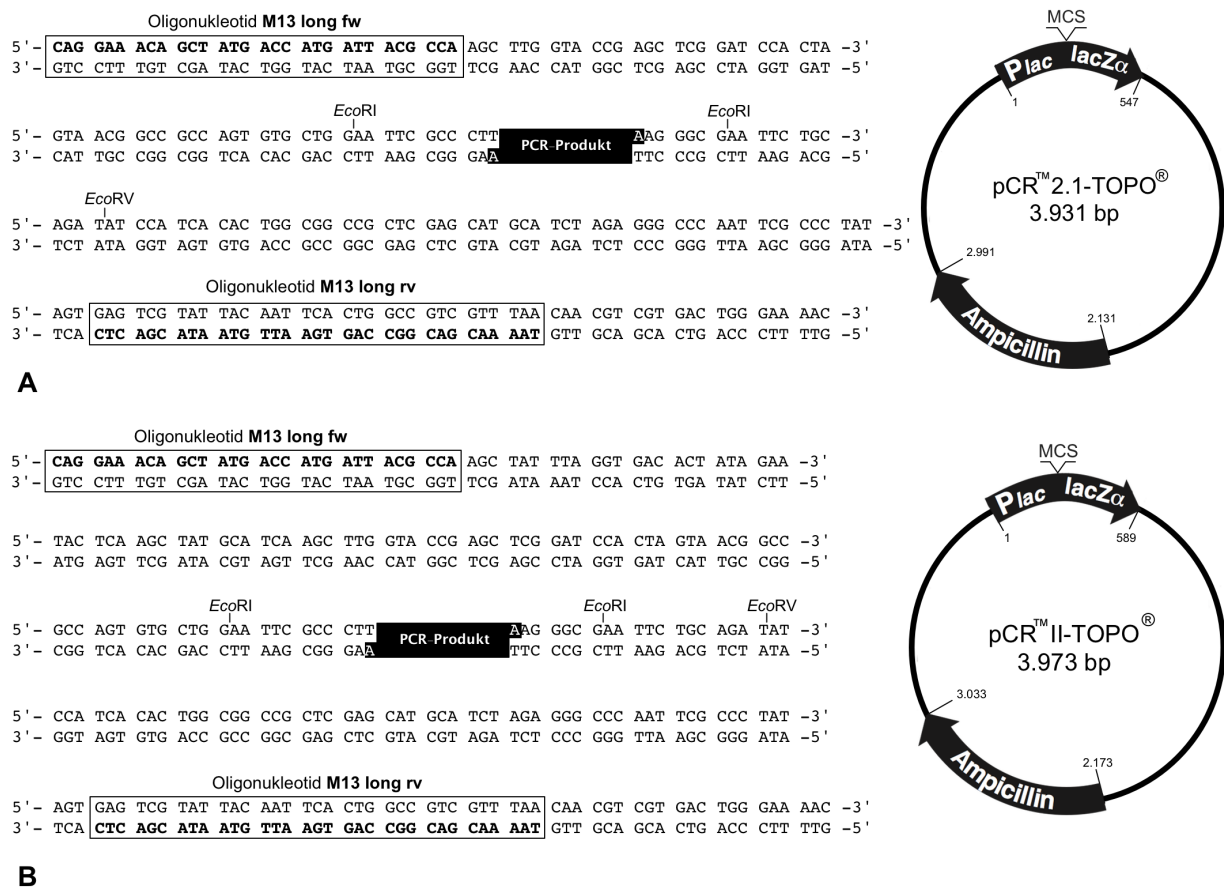


**Abbildung 2.1.** Vektor-Karte des pJET1.2/blunt

**A:** Aufbau der *Multiple cloning site* (MCS): Insertionsstelle des PCR-Produktes, Bindungsstellen der Oligonukleotide, Schnittstelle von *Bgl*III. **B:** Übersichtskarte zirkulärer Vektor. Lage der MCS, Ampicillin-Resistenzkassette, Schnittstelle von *Hind*III (verändert in Anlehnung an die Abbildung des Herstellers ThermoFisher).

Da der Vektor kein *lacZ $\alpha$* -Gen enthält ist eine Blau-Weiß-Selektion der Bakterienkolonien mittels X-Gal nicht möglich. Die Insertionsstelle für PCR-Produkte hat keinen T-Überhang, sondern glatte Enden (*blunt*). Zum Verknüpfen der Enden wird das Enzym T4-Ligase benötigt, eine Spontanligation ist aufgrund des fehlenden Überhangs nicht möglich. PCR-Produkte mit A-Überhang (Long PCR Enzyme Mix und DreamTaq) können nur nach vorherigem Entfernen des Überhangs mittels *Blunting*-Enzym in den Vektor eingebracht werden (*sticky end* Protokoll).

**Klonierung von Fragmenten mit TA-Überhang:** Die beiden Plasmide pCR<sup>®</sup> 2.1.-TOPO<sup>®</sup> Vektor (3.931 bp) und pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> Vektor (3.973 bp) sind ähnlich aufgebaut (Abbildung 2.2). Beide Vektoren enthalten ein Resistenzgen für Ampicillin, das *lacZ $\alpha$* -Gen und eine MCS. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den Enzymen *EcoRI* und *EcoRV*. Für die Klonierung können nur PCR-Produkte mit A-Überhang verwendet werden. Da das überhängende Adenin spontan an das Thymin des TOPO<sup>®</sup>-Vektors bindet, entfällt die Zugabe einer Ligase.



**Abbildung 2.2.** A: Vektor-Karte des pCR<sup>®</sup> 2.1.-TOPO<sup>®</sup>; B: Vektor-Karte des pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>. Für beide Vektoren jeweils vergrößerte Darstellung der MCS im *lacZ $\alpha$* -Gen und Lage der Ampicillin-Resistenzkassette. Angabe der Insertionsstelle des PCR-Produktes, der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme sowie der Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide (verändert in Anlehnung an die Abbildung des Herstellers Invitrogen).

Das Enzym  $\beta$ -Galactosidase ist ein Tetramer und hydrolysiert das Substrat X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff. Jedes der vier Monomere besteht aus einem  $\alpha$ - und einem  $\omega$ -Fragment (Sambrook und Russel 2001). Laut Hersteller liegt in den verwendeten Vektoren das Gen für das  $\alpha$ -Fragment in der MCS im Bereich der Insertionsstelle für PCR-Produkte. Ist ein PCR-Produkt erfolgreich in den Vektor

ligiert worden, so kann das *lacZ $\alpha$* -Gen nicht mehr abgelesen werden und die bakterielle  $\beta$ -Galactosidase ist funktionslos (Alpha-Komplementation). Anhand einer unterschiedlichen Färbung der Bakterienkolonien auf Nährböden mit X-Gal ist somit die Unterscheidung zwischen leeren Plasmiden (blau) und Plasmiden mit ligierter DNA (weiß) möglich und wird daher auch als Blau-Weiß-Selektion bezeichnet.

## 2.5.2 Plasmidextraktion

Zur Überprüfung welche Bakterienkolonie ein Plasmid mit dem PCR-Produkt aufgenommen hat, wurde das Plasmid wieder aus dem Bakterium extrahiert, mit Restriktionsenzymen verdaut und die Größe der entstehenden Banden im Agarosegel beurteilt. Anschließend wurde aus der Plasmid-DNA eine PCR mit vektorspezifischen Oligonukleotiden (Tabelle 2.2) durchgeführt, das Reaktionsprodukt elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA aus dem ausgeschnittenen Agarosegel extrahiert. Zur Bestätigung der Korrektheit der inserierten DNA wurde im Anschluss eine DNA-Sequenzierung (Sanger-Methode) durchgeführt. Die Plasmid-Präparation erfolgte hauptsächlich nach einem laborinternen Protokoll. In mehreren Schritten werden in diesem Verfahren die bakteriellen Bestandteile eliminiert und die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt.

**Tabelle 2.12:** Puffer für Plasmidextraktion

Puffer	Zusammensetzung
Puffer 1	10 mmol/l EDTA pH 8,0; 25 mmol/l TRIS/HCl pH 8,0; 100 $\mu$ g/ml RNaseA
Puffer 2	0,2 mol/l NaOH; 1 % SDS
Puffer 3	3 mol/l Kaliumacetat; pH 5,5 mit Eisessig

Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezchtet. Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei 10 °C. Der Ansatz wurde bei 3.000 x g für 10 min in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Sediment wurde in 300  $\mu$ l 4 °C kaltem Puffer 1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 300  $\mu$ l Puffer 2 zugegeben, das Gefäß mehrfach invertiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300  $\mu$ l 4 °C kalter Puffer 3 hinzupipettiert, der Ansatz invertiert und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 15 min bei 16.000 x g, wurden die gefällten Zellbestandteile von der im Überstand befindlichen DNA getrennt. In einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 600  $\mu$ l Isopropanol absolut vorgelegt und 800  $\mu$ l Überstand dazugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die DNA sammelt sich nun am Boden des Reaktionsgefäß. Der Überstand wurde abgesaugt und die DNA mit 800  $\mu$ l 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 x g wurde die Flüssigkeit vollständig abgesaugt und die DNA für ca. 5 min an der Luft getrocknet. Nachdem die DNA in 50  $\mu$ l nukleasefreiem Wasser gelöst wurde, erfolgte die Analyse des Plasmids mittels Restriktionsverdau.

Für einige Anwendungen (z.B. NGS, Standardreihe für quantitative PCR, FISH-Sonden) erfolgte die Präparation mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit oder GeneJET Plasmid Midiprep Kit (beide ThermoFisher) nach den Angaben des Herstellers. Die beiden Reagenzsysteme unterscheiden sich lediglich in den Volumina der Bakterienkultur, den Arbeitsvolumina der einzelnen Schritte und der Gesamtmenge des extrahierten Plasmids.

## 2.6 Sequenzierung und Annotation viraler DNA

### 2.6.1 Sequenzierung nach Sanger

Der Ansatz erfolgte mit dem BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) nach Herstellerangaben. Im BigDye sind fluoreszenzmarkierte Nukleotide und die Polymerase enthalten. Als Menge wurden zwischen 20 und 60 ng DNA eingesetzt und die PCR automatisiert im *Thermocycler* T3000 durchgeführt (Tabelle 2.13). Die Analyse der PCR erfolgte mittels Kapillar-Sequenzierautomaten (DNA Analyser 3700, Applied Biosystems) am Institut für Klinische Molekularbiologie im Zentrum für Molekulare Biowissenschaften auf dem Campus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Das übermittelte Elektropherogramm der Sequenzierung wurde mittels MEGA-Software (The Biodesign Institute) ausgewertet und die Nukleotide in die bereits vorliegende Sequenz von HVMA eingepflegt. Mit dieser Methode konnten mit jeder Sequenzierung bis zu 900 nt identifiziert werden. Wurde die korrekte Identität eines Klons bestätigt, erfolgte eine Midi-Präparation (GeneJET Plasmid Midiprep Kit, ThermoFisher) für den Versand an Prof. Roland Zell aus dem Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena. Dort wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Groth aus dem Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI) Jena die Sequenzierung mittels NGS durchgeführt. Ein Teil der Plasmide wurde am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Jena für die Herstellung von Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) von Chromosomenpräparationen verwendet.

**Tabelle 2.13:** Sequenzierung nach Sanger: Reaktionsansatz und -bedingungen

Ansatz	Reaktionsbedingungen
1 µl BigDye Ready Reaction Mix	96 °C 1 min
0,5 µl 5x <i>Sequencing Buffer</i>	96 °C 10 s
1 µl Oligonukleotid (5 pmol/µl)	52 °C 5 s
1 µl DNA (20–60 ng)	60 °C 4 min x 25
ad 10 µl nukleasefreies Wasser	

### 2.6.2 Next-generation-Sequenzierung

Die mittels Midi-Präparationen gereinigte HVMA-DNA (Abschnitt 2.5.2) diente als Ausgangsmaterial für die NGS, die in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Groth am Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI) Jena erfolgte. Die Sequenzierreaktion selbst wurde mit der Illumina-Methode im *paired-end*-Verfahren mit einer Leselänge von 100 nt durchgeführt. Nach dem Zusammenfügen der erhaltenen kurzen Sequenzen zu mehreren fortlaufenden Sequenzen (*contigs*), wurden diese elektronisch übermittelt. Dann erfolgte das Einpflegen und Anpassen an die bereits vorliegenden DNA-Abschnitte mittels MEGA-Software und die funktionelle Zuordnung der Sequenz.

### 2.6.3 Genomorganisation

Mit Hilfe des Programmes *Viral Genome Organizer* wurde das HVMA-Genom analysiert und zunächst nur Leserahmen mit mehr als 360 nt überprüft. Die DNA-Sequenz wurde von dem Programm in AS-Sequenzen translatiert und die Sequenzen manuell mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* der Protein-

Datenbank des NCBI abgeglichen. Hierbei wurde vor allem auf Ähnlichkeiten zu EBV-Proteinen geachtet und in Analogie dazu die Bezeichnung der Leserahmen übernommen. Für kleinere Proteine (z.B. aus dem *BNLF2B*-Leserahmen) wurden die Leserahmenlängen entsprechend reduziert und gezielt in dem zu erwarteten Bereich (analog zur Lage bei EBV) gesucht. Anschließend wurde der Grad der Übereinstimmung der potentiellen AS-Sequenzen zu EBV (HHV-4 Wildtyp, GenBank: NC\_007605) im *pairwise distance*-Verfahren mittels MEGA-Software ermittelt (Nei und Kumar 2000). Zum Auffinden der Wiederholungseinheiten wurden die entsprechenden Sequenzen des EBV Wildtypes mit den anzunehmenden Abschnitten im HVMA-Genom verglichen. Nachdem die Alinierung manuell durchgeführt wurde, berechnete das Programm MEGA die Nukleotid-Identität im *pairwise distance*-Verfahren.

## 2.7 Phylogenetische Analyse

Für die Einordnung von HVMA innerhalb der Familie der Herpesviren wurden zwei phylogenetische Rekonstruktionen durchgeführt: die Erste auf Basis der aneinandergereihten Kerngene der Herpesviren, die Zweite anhand der AS-Sequenz der DNA-Polymerase.

Die Grundlage zur Berechnung des ersten Stammbaumes waren 41 Gene die bei allen Herpesviren konserviert sind und auch als Kerngene (*core genes*) bezeichnet werden (Ehlers et al. 2008). Bei den Genprodukten handelt es sich vor allem um Strukturproteine und Enzyme, die für die Synthese, Prozessierung und Verpackung der DNA von Bedeutung sind (Davison 2007a). In der Datenbank des NCBI lagen proteincodierenden-Sequenzen von 21 Gammaherpesviren zum Vergleich vor, zusätzlich wurden jeweils zwei Vertreter der Alpha- und Betaherpesviren mit einbezogen. Für jedes der Kerngene wurde die proteincodierende Nukleotidsequenz der einzelnen Viren in ihre AS-Sequenz übersetzt, diese automatisiert verglichen und angeordnet (aliniert). Anschließend wurde die Sequenzen wieder in Nukleotidsequenzen übersetzt und so die alinierten Sequenzen der Kerngene für jedes Virus aneinandergereiht. Somit ergaben sich Sequenzen zwischen 61.146 und 77.973 nt. Die Reihenfolge orientierte sich anhand der Lage der Leserahmen im Genom von EBV. Eine Übersicht der Bezeichnungen und die gewählte Reihenfolge der Kerngene bei jedem Virus findet sich im Anhang (Tabelle 7.1).

Die AS-Sequenz der DNA-Polymerase diente ebenfalls zur Ermittlung der Verwandtschaftsverhältnisse von HVMA. Dafür wurden zum Vergleich Sequenzen von 99 Gammaherpesviren und fünf Vertreter der Alpha- und Betaherpesviren ausgewählt. Da ein Teil der Sequenzen nur partiell vorlag, wurde der alinierte Bereich auf eine Länge von ca. 700 Aminosäuren beschränkt. Die Referenznummer der Vergleichssequenzen in der NCBI Datenbank sind im phylogenetischen Stammbaum aufgeführt.

Für beide Analysen wurde die Berechnung des Stammbaumes mit dem Programm MEGA 6 durchgeführt (Tamura et al. 2013). Die Alinierung der AS-Säuresequenzen erfolgte automatisiert mittels *MUSCLE*. Für die *Gap Penalties* wurden die Voreinstellungen belassen: *Gap Open* -2,9, *Gap Extend* 0, *Hydrophobicity Multiplier* 1,2. Als *Clustering*-Methode wurde UPGMA ausgewählt (Edgar 2004). Vor der eigentlichen Stammbaumberechnung wurde zunächst das beste Substitutionsmodell ermittelt. Die gewählten Parameter sind in Tabelle 2.14 aufgeführt. Als Rekonstruktionsmethode zur Erstellung eines *Nearest-neighbor interchange*-Baumes wurde das *Maximum-likelihood*-Verfahren angewendet. Zur Berechnung der Signifikanz wurde das etablierte *Bootstrap*-Verfahren mit 1.000 Wiederholungen ausgewählt. Eine Entwicklung aus einer gemeinsamen Stammform (monophyletisch) kann bei einer *Bootstrap*-Unterstützung von mehr als 70 % angenommen werden (Hillis und Bull 1993).

**Tabelle 2.14:** Berechnungsmodelle für die phylogenetische Analysen

Angegeben sind die verwendeten Substitutionsmodelle zur Berechnung der *Maximum-likelihood*-Bäume, Modelle für die Erstellung des initialen Baumes mit dem *Neighbor-joining*-Verfahren. Bei beiden Berechnungen wurden Lücken oder fehlende Daten partial entfernt (Cutoff 95 %).

Analyse	Initialer Baum	Substitutionsmodell	Referenz
Kerngene (Nukleotid-Sequenz)	MCL	GTR+G+I	<i>Nei und Kumar 2000</i>
DNA-Polymerase (AS-Sequenz)	JTT	LG+G+I	<i>Le und Gascuel 2008</i>

## 2.8 *In situ*-Lysisgel nach Gardella

*Gardella et al. 1984* beschrieben eine Elektrophoresetechnik, die Zellen direkt im Gel lysiert und die Unterscheidung von linearer und zirkulärer DNA durch Auftrennung im elektrischen Gleichstromfeld ermöglicht. Zur Spezifizierung des Bandenmusters wurde anschließend eine Hybridisierung des Southern-Blot mit spezifischen Digoxigenin-markierten-Sonden durchgeführt.

**Tabelle 2.15:** Lösungen für das *in situ*-Lysisgel

Reagenzien	Zusammensetzung
Trenngel	0,75 % Agarose in 1x TBE
Lysisgel	0,8 % Agarose; 2 % SDS; 1 mg/ml Proteinase K in 1x TBE
Probenpuffer	20 % Ficoll; 0,01 % Bromphenolblau; 50 µg/ml RNaseA in 1x TBE
Waschpuffer	10 mmol/l Natriumhydrogenphosphat

Das horizontale *in situ*-Lysisgel wurde in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurden 120 ml Trenngel in der Mikrowelle aufgekocht, auf ca. 50 °C abgekühlt und dann ca. 0,9 cm hoch in eine Gelkammer von 18,5 cm x 7,5 cm ohne Probenkamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die oberen 2 cm mit einem Skalpell ausgeschnitten und vorsichtig entfernt. An die Kante zum Trenngel wurde nun der Probenkamm mit 1,1 cm breiten Zinken gesetzt. Das Lysisgel wurde ohne Proteinase K aufgekocht und auf ca. 30 °C abgekühlt. Anschließend wurde Proteinase K zugefügt und in den ausgeschnittenen Anteil der Gelkammer gegossen. Nachdem das Lysisgel vollständig erstarrt war, wurde es in den Kühlraum gebracht und mit vorgekühlten 1x TBE-Puffer überschichtet. Von jeder Zellreihe wurden  $2 \times 10^6$  Zellen dreimal in je 1.000 µl kaltem PBS gewaschen und bei 100 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in 60 µl frischem Probenpuffer aufgenommen und in die Tasche des Gels pipettiert. Bei 0,8 V/cm (15 V) lysierten die Zellen für 3 h in den Probenaschen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung für ca. 20 h mit 4,5 V/cm (83 V) im Kühlraum bei 8 °C. Das Gel wurde aus der Kammer entfernt, 30 min in Waschpuffer gewaschen und für den Southern-Blot-Transfer vorbereitet (Abschnitt 2.9.2).

## 2.9 Southern-Blot-Analyse

Der DNA-Transfer (*Blotting*) auf Membranen wurde ursprünglich von *Southern 1975* entwickelt und diente der dauerhaften Fixierung von DNA auf einer Membran. In dieser Arbeit wurde das Kapillar-Blot-Verfahren für den Transfer der viralen und genomischen DNA des *in situ*-Lysisgels nach Gardel-

la verwendet. Unter Ausnutzung der Kapillarkraft von Flüssigkeiten wurde die DNA mit Hilfe eines Transferpuffers aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran übertragen. Anschließend erfolgte die Markierung der übertragenen DNA mit spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden und die Signaldetektion der Banden mittels Chemilumineszenz. Die Sondenherstellung, die Hybridisierung und die Signaldetektion erfolgte mit dem DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit II (Roche) mit laborinternen Modifikationen (Wussow 2009).

**Tabelle 2.16:** Puffer für Transfer, Hybridisierung und Detektion von DNA

Puffer	Zusammensetzung
Denaturierungspuffer	0,6 mol/l NaCl; 0,4 mol/l NaOH
Neutralisierungspuffer	0,5 mol/l TRIS; 1,5 mol/l NaCl; pH 7,5 mit 37 % HCl
20x SSC	3 mol/l NaCl; 0,3 mol/l Natriumcitrat; pH 7,0 mit 37 % HCl
TE-Puffer	10 mmol/l TRIS-HCl pH 7,5; 1 mmol/l EDTA
10x Maleinsäurepuffer	1 mol/l Maleinsäure; 1,5 mol/l NaCl; 1,625 mol/l NaOH; pH 7,5 mit 4 mol/l NaOH
Waschpuffer (W1)	2x SSC; 0,1 % SDS
Waschpuffer (W2)	0,1x SSC; 0,1 % SDS
Waschpuffer (W3)	1x Maleinsäurepuffer; 0,3 % Tween-20
Blockpuffer	1x Maleinsäurepuffer; 10 % Blockierungsreagenz
Detektionspuffer	100 mmol/l TRIS; 100 mmol/l NaCl; pH 9,5 mit 37 % HCl
Strip-Puffer	0,2 mol/l NaOH; 0,1 % SDS

### 2.9.1 Sondenherstellung

Im Vorfeld wurden die gewählten DNA-Sequenzen des Makaken- und HVMA-Genoms zunächst auf ihre Identität zu humaner DNA bzw. EBV überprüft. Die ACTB-Sonde hat einen GC-Gehalt von 56 % und umfasst 236 bp. Die Übereinstimmung zu humanen ACTB beträgt 98,3 % (*Homo sapiens* ACTB, GenBank: NM\_0011101, mRNA Position 341 – 576). Das Amplifikat HVMA [37/38] hat einen GC-Gehalt von 66 % und umfasst 1.537 bp. Der gewählte DNA-Abschnitt liegt bei EBV im Bereich des *BSLF1* und *BSRF1*-Leserahmens und weist eine Sequenzübereinstimmung von 86,9 % auf (HHV-4 Wildtyp, GenBank: NC\_007605, nt 74.025 – 75.543). Im Vorfeld wurde mit den ACTB-spezifischen Oligonukleotiden und der DreamTaq-PCR genomische Makaken-DNA, mit dem Long PCR Enzyme Mix und den Oligonukleotiden HVMA [37/38] virale DNA aus der MAL-1-Zelllinie amplifiziert. Die Amplifikate wurden in Plasmide eingebracht und die Korrektheit mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Die gereinigte Plasmid-DNA diente als Ausgangsmaterial für die PCR zur Herstellung der Sonden.

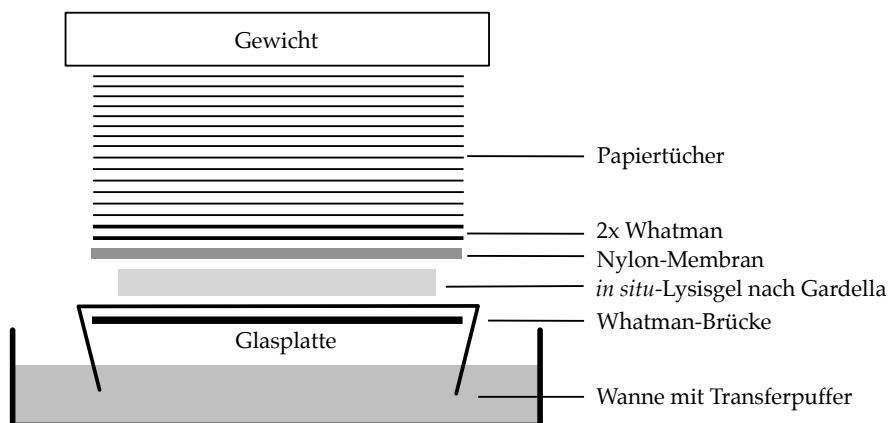
Für jede Sonde wurde mit den ACTB- bzw. HVMA [37/38]-Oligonukleotiden DNA im Doppelansatz aus den gereinigten Plasmiden amplifiziert und die Reaktionsprodukte ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up (Macherey Nagel) gereinigt. Beide PCR-Ansätze einer Zielsequenz wurden zusammen in 20 µl nukleasefreiem Wasser eluiert, die Konzentration mit UV-Spektrophotometrie (NanoDrop 2000) bestimmt und 1 µl Eluat mittels Gelelektrophorese analysiert (Reinheitskontrolle).

Für die DIG-Markierung wurden 1-2 µg DNA mit nukleasefreiem Wasser auf 16 µl Volumen aufgefüllt, der Ansatz für zehn Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert und anschließend kurz auf Eis ab-

gekühlt. Nach der Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  DIG-High-Prime-Reagenz wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  0,2 mol/l EDTA (pH 8,0) und der Inkubation für 10 min bei 65 °C im Heizblock stoppte die Markierungsreaktion. Für die Ethanol-fällung der DNA wurden 2,5  $\mu\text{l}$  4 mol/l Lithiumchlorid und 75  $\mu\text{l}$  Ethanol absolut zugegeben und der Ansatz für 30 min bei -80 °C stehen gelassen. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 h bei 4 °C und 16.000 x g. Das Zentrifugat wurde zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  kaltem 70 % Ethanol gewaschen und abschließend in 50  $\mu\text{l}$  TE-Puffer resuspendiert. Zur Ermittlung der Effektivität der Markierungsreaktion wurden beide Sonden seriell um den Faktor 10 verdünnt, je 1  $\mu\text{l}$  Probenvolumen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) aufgebracht und die Membran bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Fixierung unter UV-Licht für 2 min erfolgte die Signaldetektion (Abschnitt 2.9.4).

### 2.9.2 DNA-Transfer

Durch Depurinierung für 10 min in 0,25 mol/l HCl wurde die DNA in kleinere Fragmente gespalten und damit ein effektiver Transfer auf die Nylonmembran ermöglicht. Zwei Waschschritten für jeweils 5 min in destilliertem Wasser, folgte die Denaturierung für zweimal 15 min in Denaturierungspuffer. Einem weiteren Waschriff von 5 min in Aqua dest. folgte die Neutralisierung für zweimal 15 min in Neutralisierungspuffer. Während der letzten Inkubationsphase wurde die Nylonmembran auf Gelgröße zugeschnitten, 1 min in Aqua dest. angefeuchtet und für mindestens 5 min in 10x SSC-Puffer äquilibriert. Der Aufbau des Southern-Blots ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Die Öffnungen der Probestaschen des Gels zeigen in Richtung der Wanne.



**Abbildung 2.3.** Aufbau Southern-Blot; Seitansicht

Der kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom wurde durch einen ca. 15 cm hohen Stapel saugfähiger Papiertücher mit einem Gewicht von ca. 400 g gewährleistet.

Der Transfer erfolgte mit 10x SSC-Puffer für ca. 12 h über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran zur Orientierung markiert, kurz in Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet. Nach der UV-Fixierung für 2 min wurde die Membran für die Hybridisierung mit einer spezifischen DIG-markierten Sonde vorbereitet. Zur Überprüfung der Effizienz des Transfers wurde das verbliebene Gel für 15 min in 1x TBE mit 1 mg/l Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht fotografiert (Transferkontrolle).



### 2.9.3 Hybridisierung

Die Membran wurde in eine Glasröhre überführt und bei 42,5 °C für 30 min im Hybridisierer HB-1000 mit vorgewärmtem *DIG Easy Hyb granules* äquilibriert (Prähybridisierung). Nach etwa 20 min wurde die benötigte Sondenmenge entnommen, für 10 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und sofort zu 10 ml frischer, vorgewärmter Hybridisierungslösung (*DIG Easy Hyb granules*) gegeben. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt, die Hybridisierungslösung auf die Membran gegeben und die Membran bei 42,5 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entfernt und bei -20 °C eingefroren. Vor Wiedergebrauch musste die Sonde zunächst für 10 min bei 68 °C im Wasserbad denaturiert werden.

Nach Entfernung der Hybridisierungslösung folgten zwei Waschriffe für je zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer W1 und anschließend zweimal 15 min bei 62 °C mit vorgewärmtem Waschpuffer W2. Die Membran wurde von der Glasröhre in eine Schale auf einem wippenden Plattformschüttler überführt und die Detektion mittels Chemilumineszenz durchgeführt.

### 2.9.4 Detektion

Auf einem wippendem Plattformschüttler folgte ein Waschriff für 5 min in Waschpuffer W3. Anschließend wurde die Membran mit Blockpuffer in eine Folie eingeschweißt und für 45 min äquilibriert. Der Blockpuffer wurde entfernt und die Membran mit frischem Blockpuffer mit 1:10.000 verdünntem und mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin Antikörper (Anti-DIG-AP) für 30 min inkubiert. Nach zwei weiteren Waschriffen in Waschpuffer W3 für jeweils 15 min, folgte die Äquilibration für 5 min in Detektionspuffer (wippender Plattformschüttler). Das Chemilumineszenzsubstrat für die alkalische Phosphatase (CSPD) wurde 1:100 in Detektionspuffer verdünnt, zusammen mit der Membran in eine Folie eingeschweißt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Signalverstärkung wurde das Substrat entfernt, die eingeschweißte Membran für 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend das Chemilumineszenzsignal im LAS 3000 im detektiert.

### 2.9.5 Zweitanalyse

Für die zweite Hybridisierung mit der zellgenomischen ACTB-Sonde musste die EBV- und HVMA-spezifische [37/38]-Sonde von der Membran entfernt werden (*Stripping*). Zunächst wurde die Membran für 1 min in Aqua dest. gespült, in ein frisches Hybridizer-Glasröhrchen überführt, zweimal 15 min bei 37 °C in vorgewärmtem *Strip*-Puffer inkubiert und anschließend zweimal 5 min bei Raumtemperatur mit 2x SSC gewaschen. Nach Prähybridisierung mit vorgewärmtem *DIG Easy Hyb granules* für 30 min bei 42,5 °C erfolgte die Hybridisierung mit der ACTB-Sonde und anschließender Signaldetektion wie unter Abschnitt 2.9.4 beschrieben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Sequenzanalyse des HVMA-Genoms

Am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena konnten im Jahr 2012 mittels NGS 125.541 bp (ca. 75 %) des HVMA-Genoms sequenziert werden. Hierbei ergaben sich 19 Nukleotidsequenzen, die zum eng verwandten McHV-4 annotiert wurden. Der Übergang zwischen den bekannten Nukleotidsequenzen wurde dann mittels HVMA-spezifischer Oligonukleotide (Tabelle 2.1) amplifiziert, in Vektoren ligiert und die gereinigte DNA erneut in Zusammenarbeit mit Dr. Marco Groth aus dem Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V. (FLI) Jena mittels NGS analysiert. In Tabelle 3.1 sind die hergestellten Amplifikate und ihre Lage im Genom aufgelistet. Bezogen auf das Gesamtgenom wurden 93 % mittels NGS analysiert. Kleinere Genomabschnitte und Bereiche, die mittels NGS nicht vollständig erfasst wurden, konnten teilweise mit HVMA-spezifischen Oligonukleotiden und Sanger-Sequenzierung abgedeckt werden (ca. 6 % der Genominformation).

**Tabelle 3.1:** Amplifizierte HVMA-Genomabschnitte

Die Positionsangaben der Amplifikate beziehen sich auf die Virusvariante A mit 166.590 bp. Das Amplifikat 1T 1b/2b liegt im Bereich der größten Wiederholungseinheit IR1 und kommt somit mehrfach im Genom vor. Die Positionsangabe bezieht sich auf die erste Wiederholung. Kleinere Genomabschnitte, oder Bereiche, die mittels NGS nicht gut abgedeckt werden konnten, wurden mittels Sequenziermethode nach Sanger sequenziert.

Name	Oligos	Polymerase	Vektor	Klon	Amplifikat [bp]	Start [nt]	Stop [nt]
2T 19a/14a	19a/14a	LR	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	2	3.588	1.470	5.057
cP 13a/16a	13a/16a	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	c	2.246	4.616	6.861
3P 15/10	15/10	HS	pJET1.2/blunt	3	2.418	5.663	8.233
2T 7a/8	7a/8	LR	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	2	7.079	7.982	904
2P 7b/12c	7b/12c	HS	pJET1.2/blunt	2	3.094	6.744	9.837
5T 11b/12d	11b/12d	LR	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	5	3.091	9.642	12.734
1T 11b/12e	11b/12e	LR	pCR <sup>®</sup> 2.1.-TOPO <sup>®</sup>	1	4.994	9.642	14.634
1T 1b/2b	1b/2b	LR	pCR <sup>®</sup> 2.1.-TOPO <sup>®</sup>	1	1.518	12.952	14.469
7P 1c/2a	1c/2a	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	7	3.117	27.065	30.252
cP 1a/2c	1a/2c	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	c	2.589	27.660	30.181
3P 3/4*	3/4	DT <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	3	672	30.213	30.884
1T 5a/6a*	5a/6a	LR	pCR2.1-TOPO	1	5.801	31.065	36.865
2T 21/22	21/22	LR	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	2	1.281	37.178	38.458
1T 23a/24d	23a/24d	LR	pCR2.1-TOPO	1	4.516	42.000	46.515
12P 27/28	27/28	HS	pJET1.2/blunt	12	1.885	45.517	47.401
5T 29/30	29/30	LR	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	5	1.676	49.085	50.760
2T 25/26	25/26	LR	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup>	2	3.047	50.975	54.021
1T 31/32	31/32	LR	pCR <sup>®</sup> 2.1.-TOPO <sup>®</sup>	1	2.632	54.984	57.615
1P 33/36	33/36	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	1	4.612	60.405	65.016
2P 37/38	37/38	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	2	1.537	68.464	70.000
PCR 39/40	39/40	LR	nicht kloniert		11.459	71.427	82.885
6T 39/40a*	39/40a	LR	pCR2.1-TOPO	6	870	71.427	72.296

**Tabelle 3.1:** Amplifizierte HVMA-Genomabschnitte: *Fortsetzung*

Name	Oligos	Polymerase	Vektor	Klon	Amplifikat [bp]	Start [nt]	Stop [nt]
4P 41/42	41/42	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	4	985	84.024	85.008
1P 43/44	43/44	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	1	1.135	89.525	90.659
1P 45/48	45/48	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	1	4.312	98.380	102.691
2P 49/50*	49/50	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	2	687	107.528	108.214
1P 51/52	51/52	HS	pJET1.2/blunt	1	1.138	111.908	113.045
5T 53/56	53/56	LR	pCR <sup>®</sup> 2.1.-TOPO <sup>®</sup>	5	4.113	135.082	139.255
1P 55/56*	55/56	HS	pJET1.2/blunt	1	706	138.550	139.255
2T 57a/58a	57a/58a	LR	pCR <sup>®</sup> 2.1.-TOPO <sup>®</sup>	2	3.078	145.895	148.972
1P 59/60	59/60	HS	pJET1.2/blunt	1	1.028	158.405	159.432
1P 61/64	61/64	HS	pJET1.2/blunt	1	3.505	162.912	166.416
5P 65/66*	65/66	LR <sup>1</sup>	pJET1.2/blunt	5	2.232	166.192	1.833

Oligos = zur Amplifikation verwendete Oligonukleotid-Paare; LR = Long Range PCR Enzym; HS = Phusion Hot Start II; DR = Dream Taq

\* Sequenzierung mittels Sanger-Methode

<sup>1</sup> Klonierung in pJET1.2/blunt nach Entfernen des A-Überhanges

Dabei zeigte sich, dass in der Kultur der MAL-1-Zellen zwei nebeneinander vorkommende Virusvarianten existieren: Variante A mit 166.590 bp und Variante B mit 166.437 bp. Die Virusvariante B hat an Position 7.760–7.912 eine Deletion und enthält eine abweichende Sequenz in den flankierenden Bereichen. Die Divergenz befindet sich in einem nicht codierenden Bereich und ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Verglichen mit dem Genom von EBV (HHV-4 Wildtyp, GenBank: NC\_007605) befindet sich die Stelle, relativ gesehen, im Bereich des latenten Replikationsursprungs *OriP*.

Variante A	7.749	<b>GCATATGCT</b> ACCCAATATTAGGATAGCATATGCTACCCTAGTGTAGGATA	7.800
Variante B		<b>GCATATGCTA</b> .....	
Variante A	7.799	GTATATGCTACCCAGCTATATTAGGATAGCATATGCTACCCAATACTAGG	7.850
Variante B		.....	
Variante A	7.849	ATAGCATATGCTACCAAATATTAGGATAGCATATGCTACCCTAGTATAGG	7.900
Variante B		.....	
Variante A	7.899	ATAGCATATGCTACCCAGCTATATTAGGATAGTATATGCTACCCTAGTAT	7.950
Variante B		.....TCCTACACTAGGGTAGCATATGCTACCCAATATATC	
Variante A	7.949	AGGATAGCATATGCTACCCAGCTATATTAGGATTAT <b>ATATGCTACCTAAG</b>	8.000
Variante B		AGGATAGTATATGCTATCCAACCTACATTAGGATAG <b>CATATGCTACCTAAG</b>	

**Abbildung 3.1.** Alinierung der Variationsstelle der HVMA-Varianten

Die fettgedruckten Bereiche flankieren die Variationsstelle. Die Positionsangaben beziehen sich auf die längere Virusvariante A.

Alle folgende Beschreibungen und Positionsangaben beziehen sich auf die Virusvariante A. Das Genom umfasst 166.590 bp. Es können einmalig vorkommende Abschnitte, von sich wiederholenden Sequenzabschnitten (*Repeats*) unterschieden werden. Analog zum EBV konnten *Internal repeats* (IR1 bis IR4) und *Direct repeats* wiedergefunden werden. Tabelle 3.2 zeigt die Lage der ermittelten Wiederholungseinheiten im HVMA-Genom.

**Tabelle 3.2:** Wiederholungseinheiten im HVMA-Genom

Angegeben wird die Anzahl der Wiederholungen und die Position der Wiederholungseinheiten im HVMA-Genom. Die prozentuale Nukleotidübereinstimmung bezieht sich auf die erste Wiederholungssequenz des Referenzgenomes des HHV-4 Wildtyp (GenBank: NC\_007605). Für die Wiederholungseinheit IR2 konnte nur der Bereich von vier Wiederholungen mittels Sequenzierung nach Sanger ermittelt werden. Die Wiederholungseinheit IR3 ist nicht durch eine sich wiederholende Nukleotidsequenz definiert, sondern codiert für die variable Wiederholung der Aminosäuren Glycin-Alanin-Serin. Jede dritte Wiederholung des IR4 besteht aus zwei zusätzlichen Guanin-Basen (Länge 94 bp).

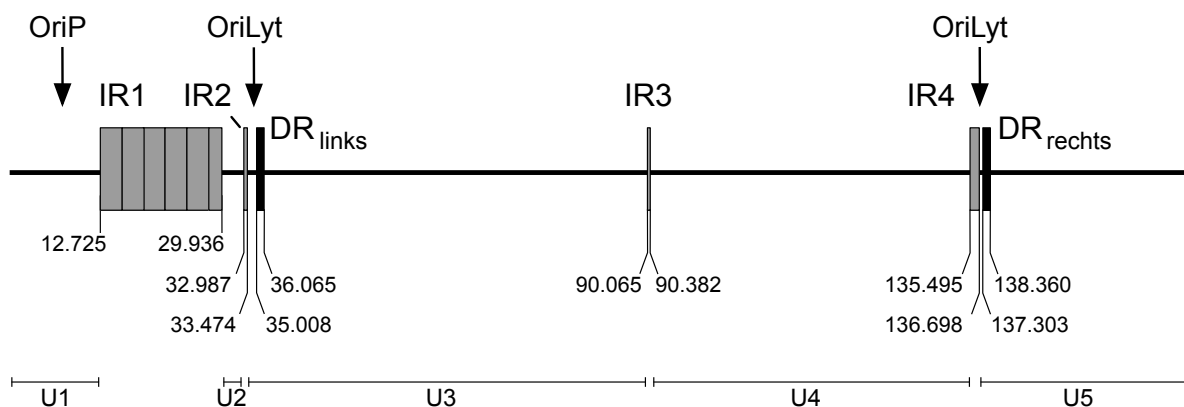
	<i>Internal repeat 1</i>	<i>Internal repeat 2</i>	<i>Internal repeat 3</i>	<i>Internal repeat 4</i>	<i>Direct repeat</i>
Größe	3.077 bp	122 bp	320 bp	92 bp	1.058 bp
Wiederholungen	5,6	> 4	1	14	2
Identität EBV	84,4 %	92,6 %	70,8 %	90,0 %	90,9 %
Position [nt]	12.725 – 15.801	33.572 – 33.693	90.065 – 90.382	135.495 – 135.586	35.008 – 36.065
	15.802 – 18.878	33.694 – 33.815		135.587 – 135.678	137.303 – 138.360
	18.879 – 21.955	33.816 – 33.937		135.679 – 135.772 <sup>1</sup>	
	21.956 – 25.032	33.938 – 34.059		135.773 – 135.864	
	25.033 – 28.109			135.865 – 135.956	
	28.110 – 29.936			135.957 – 136.050 <sup>1</sup>	
				136.051 – 136.142	
				136.143 – 136.234	
				136.235 – 136.328 <sup>1</sup>	
				136.329 – 136.420	
				136.421 – 136.512	
				136.513 – 136.606 <sup>1</sup>	
				136.607 – 136.698	
				136.699 – 136.790	

<sup>1</sup> Repeat umfasst 94 bp

Der Bereich der größten Wiederholungseinheit (IR1) konnte nur in Teilen identifiziert werden. Die erste und letzte Wiederholung des IR1 wurden vollständig sequenziert. Dabei zeigte sich, dass die letzte Wiederholungseinheit aus nur 1.827 bp statt wie erwartet 3.077 bp besteht, was 59,4 % des IR1 entspricht. Die genaue Anzahl der *Repeats* konnte nicht abschließend ermittelt werden. In Anlehnung an das McHV-4 wurde eine Anzahl von fünf kompletten und einem partiellem *Repeat* (5,6 Kopien) eines Motivs von 3.077 bp angenommen (Rivailler et al. 2002). Die kleinere Wiederholungseinheit IR2 umfasst 122 bp. Am 5'-Ende konnten vier Wiederholungen erfolgreich sequenziert werden, am 3'-Ende war eine Sequenzierung bis in den repetitiven Bereich nicht möglich. Die endgültige Anzahl der Wiederholungen konnte nicht ermittelt werden. Durch Restriktionsenzymverdau des Amplifikates, das die IR2-Sequenz enthält (1T 5a/6a) und anschließender Analyse im Agarosegel konnte der Bereich auf ca. 1.350 bp geschätzt werden. Somit sind bis zu elf Wiederholungen möglich. Die Sequenz des *BHRF1*-Leserahmens ist demnach nur partiell bekannt. Im Leserahmen EBNA-1 befindet sich die Wiederholungseinheit IR3. Bei EBV codiert dieser Bereich für Glycin-Alanin-Wiederholungen, die unter anderem den Abbau des Proteins im Proteasom verhindern (Levitskaya et al. 1995). Bei HVMA konnten auf AS-Basis variable Wiederholungen von Glycin, Alanin und Serin ermittelt werden. Die vierte Wiederholungseinheit IR4

befindet sich im LF3-Leserahmen. Das 92 bp Motiv wiederholt sich insgesamt 14-mal, wobei jede dritte Wiederholung zwei zusätzliche Guanin-Basen enthält.

Weiterhin finden sich im HVMA-Genom *Direct repeats* (DR). Hierbei handelt es sich um eine 1.058 bp-Nukleotidsequenz, die zweimal im Genom vorkommt und in der Nähe der beiden kleinen Wiederholungseinheiten IR2 und IR4 liegt (Abbildung 3.2). Der Übergang des 3'-Endes zum 5'-Anfang wurde mittels Sanger-Methode vollständig sequenziert. Eine repetitive Sequenz an den Genomenden (*Terminal repeats*), wie sie typischerweise bei Gammaherpesviren vorkommt (Roizman und Baines 1991), konnte nicht identifiziert werden. Die Replikationsursprünge *OriP* (nt 7.503–9.421) und *OriLyt* (nt 33.949–35.648 und nt 136.905–138.184) liegen im Bereich der *Unique regions* und sind ebenfalls in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3.2.** Lage der Wiederholungseinheiten und Replikationsursprünge im Genom von HVMA. HVMA-Genom in linearer Darstellung mit Angabe der Wiederholungseinheiten an ihrer relativen Position im Vergleich zum Gesamtgenom. Die Bereiche zwischen den *Repeats* werden als *Unique regions* (U) bezeichnet. Drei Startpunkte für die Replikation: einen während der Latenz (*OriP*) und zwei im Rahmen der lytischen Replikation (*OriLyt*). Abbildung in veränderter Form durch Krumbholz und Roempke et al. 2019 veröffentlicht.

Für jeden der 93 ermittelten offenen Leserahmen (91 mögliche Proteine, 2 EBERs) im HVMA-Genom konnte ein Korrelat im EBV-Genom gefunden werden (Tabelle 3.3). Jeder Leserahmen befindet sich, relativ gesehen, an der gleichen Stelle. Umgekehrt konnten, mit Ausnahme des Leserahmens *BI'LF4*, alle EBV-Gene bei HVMA wiedergefunden werden. Somit hat das Virus das gleiche Genrepertoire wie EBV. Die Lage der Leserahmen im HVMA-Genom ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Das Genom wurde in die Datenbank des NCBI aufgenommen (GenBank: MG471437).

**Tabelle 3.3:** Gene und Genprodukte von HVMA im Vergleich zu EBV  
 Lage der offenen Leserahmen im HVMA-Genom und Bestimmung der Übereinstimmung der potentiellen AS-Sequenzen zu EBV (Wildtyp, Referenzsequenz: NC\_007605.1) mittels der Software MEGA. Nukleotidübereinstimmung zwischen den nicht-translatierten EBV-*encoded* RNAs: EBER-1 82,6%, EBER-2 66,6%.  
 Tabelle in veränderter Form durch *Krumholz und Roempke et al. 2019* veröffentlicht.

Leserahmen	HVMA				EBV Wildtyp			
	Exon	Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS	Funktion (EBV)	
LMP-2A		162.047	1.778	498	498	55,0 %	funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit zum B-Zell-Rezeptor;	
	LMP-2A e1	162.047	162.402				Aufrechterhaltung der Latenz	
	LMP-2A e2	179	393					
	LMP-2A e3	473	571					
	LMP-2A e4	652	900					
	LMP-2a e5	981	1.065					
	LMP-2a e6	1.178	1.319					
	LMP-2A e7	1.378	1.591					
	LMP-2A e8	1.669	1.778					
LMP-2B		180	1.778	370	378	59,1 %	moduliert LMP-2A	
	LMP-2Be1	180	393					
	LMP-2B e2	179	393					
	LMP-2B e3	473	571					
	LMP-2B e4	652	900					
	LMP-2B e5	981	1.065					
	LMP-2B e6	1.178	1.319					
	LMP-2B e7	1.378	1.591					
	LMP-2B e8	1.669	1.778					
BNRF1		1.835	5.788	1.317	1.318	79,7 %	Tegumentprotein	
EBER1		6.722	6.895				Synthese autokriner Wachstumsfaktoren, keine Translation	
EBER2		7.052	7.219				Synthese autokriner Wachstumsfaktoren, keine Translation	

Tabelle 3.3: HVMA-Gene und -Genprodukte im Vergleich zu EBV-Proteinen: Fortsetzung

Leserahmen	Exon	HVMA				EBV Wildtyp				Funktion (EBV)
		Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS	Größe (AS)	Identität AS	
BCRF1		9.786	10.319	177	176	85,1 %	176	85,1 %	homolog zu humanem Interleukin-10	
EBNA-LP		12.198	30.298	365	506	57,4 %	506	57,4 %	Immortalisierung	
	EBNA-LP e1	12.198	12.199							
	EBNA-LP e2	15.289	15.349							
	EBNA-LP e3	15.431	15.562							
	EBNA-LP e4	18.364	18.426							
	EBNA-LP e5	18.508	18.639							
	EBNA-LP e6	21.443	21.503							
	EBNA-LP e7	21.586	21.716							
	EBNA-LP e8	24.520	24.580							
	EBNA-LP e9	25.662	24.793							
	EBNA-LP e10	27.597	27.657							
	EBNA-LP e11	27.739	27.657							
	EBNA-LP e12	30.081	30.113							
EBNA-LP e13	30.197	30.298								
BCRF2 (BWRF1.1)		13.257	14.414	385	383	70,3 %	383	70,3 %	Funktion unbekannt	
BWRF1.2		16.334	17.491	385	383	70,3 %	383	70,3 %	Funktion unbekannt	
BWRF1.3		19.411	20.568	385	383	70,3 %	383	70,3 %	Funktion unbekannt	
BWRF1.4		22.488	23.645	385	383	70,3 %	383	70,3 %	Funktion unbekannt	
BWRF1.5		25.565	26.722	385	383	70,3 %	383	70,3 %	Funktion unbekannt	
EBNA-2		30.843	32.291	482	487	46,1 %	487	46,1 %	Immortalisierung, Etablierung der Latenz	
BHLF1 (partial)		34.912	33.572	> 447	660		660		Phosphoprotein 85	
BHRF1		36.699	37.271	190	191	68,0 %	191	68,0 %	Homolog zum humanem bcl-2-Proteinkogen	
BFLF2 <sup>1</sup>		39.368	38.412	319	318	84,6 %	318	84,6 %	Kernmatrixprotein, Kapsidausschleusung aus dem Kern	

Tabelle 3.3: HVMA-Gene und -Genprodukte im Vergleich zu EBV-Proteinen: Fortsetzung

Leserahmen	Exon	HVMA				EBV Wildtyp				Funktion (EBV)
		Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS		
BFLF1 <sup>1</sup>		40.955	39.381	524	525	86,0 %			Kernprotein, Kapsidtransport	
BFRF1A <sup>1</sup>		40.954	41.355	133	135	86,9 %			interagiert mit Terminase	
BFRF1 <sup>1</sup>		41.315	42.310	331	336	80,1 %			Protein der inneren Kernmembran, Kapsidausschleusung aus dem Kern	
BFRF2		42.214	44.034	606	591	82,0 %			essentiell für Virionproduktion	
BFRF3 <sup>1</sup>		43.958	44.464	168	176	77,3 %			Kapsidprotein p18	
BPLF1 <sup>1</sup>		53.502	44.506	2.998	3.149	76,2 %			Tegumentprotein, beeinflusst während Infektion DNA-Ausschleusung aus dem Kapsid	
BORF1 <sup>1</sup>		57.273	58.346	357	364	91,3 %			Kapsidstruktur, Triplex-Komplex: Monomer	
BOLF1 <sup>1</sup>		57.274	53.489	1.261	1.239	78,2 %			interagiert mit Tegumentprotein ( <i>BPLF1</i> )	
BORF2 <sup>1</sup>		58.409	60.886	825	826	88,5 %			Ribonukleotidreduktase: große Untereinheit	
BaRF1 <sup>1</sup>		60.899	61.807	302	302	95,1 %			Ribonukleotidreduktase: kleine Untereinheit	
BMRF1 <sup>1</sup>		61.900	63.114	404	404	89,1 %			DNA-Polymerase: Untereinheit	
BMRF2		63.119	64.195	358	357	87,0 %			Membranprotein, Rezeptor für zelluläres Integrin	
BMLF1		66.216	64.837	459	438	83,1 %				
BSLF2		66.314	66.436	40	40	66,7 %				
BSLF2/BMLF1 <sup>1</sup>		66.436	64.837	498	479	81,9 %			mRNA Exportfaktor	
		66.269	64.837							
	BSLF2/BMLF1 e2	66.436	66.373							
BSLF1 <sup>1</sup>		69.032	66.405	875	874	87,5 %			Helikase-Primase-Komplex: Primase	
BSRF1 <sup>1</sup>		69.075	69.746	223	218	90,4 %			Tegumentprotein	
BLLF3 <sup>1</sup>		70.643	69.804	279	278	87,0 %			dUTPase	
BLRF1 <sup>1</sup>		70.717	71.025	102	102	73,9 %			Glykoprotein N, bildet Komplex mit gM ( <i>BBRF3</i> )	
BLRF2		71.096	71.587	163	162	77,6 %			Kapsidprotein p23	



Tabelle 3.3: HVMA-Gene und -Genprodukte im Vergleich zu EBV-Proteinen: Fortsetzung

Leserahmen	Exon	HVMA				EBV Wildtyp				Funktion (EBV)
		Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS	Identität AS	
BLLF1		74.111	71.604	835	907	64,3 %			Glykoprotein gp350, bindet CD21	
BLLF2		72.163	71.744	139	148	61,4 %			Funktion unbekannt	
EBNA-3A		74.202	77.044	919	944	41,7 %			interagiert mit DNA-Bindeprotein, Immortalisierung	
EBNA-3B	EBNA-3A e1	74.202	74.567							
	EBNA-3A e2	74.651	77.044							
EBNA-3C	EBNA-3B e1	77.271	79.723	791	938	48,3 %			interagiert mit DNA-Bindeprotein	
	EBNA-3B e2	77.271	77.621							
EBNA-3C	EBNA-3C e1	77.699	79.723							
	EBNA-3C e2	79.848	83.120	1.064	992	46,3 %			interagiert mit DNA-Bindeprotein, Immortalisierung	
BZLF2	EBNA-3C e1	79.848	80.198							
	EBNA-3C e2	80.277	83.120							
BZLF1		83.841	83.167	224	223	80,7 %			gp42, bildet Komplex mit gH (BXLF2) und gL (BKRF2), bindet MHC Klasse II, Zellfusion	
BZLF1		85.065	83.940	248	245	74,5 %			ZEBRA-Protein, initiiert lytische Replikation	
	BZLF1 e3	84.065	83.940							
	BZLF1 e2	84.259	84.155							
BRLF1	BZLF1 e1	85.068	84.553							
		87.117	85.282	611	605	79,5 %			Transkriptionsfaktor im Rahmen der lytischen Replikation	
BRRF1		87.095	88.024	309	310	88,3 %			Verstärkt Induktion der lytischen Replikation	
BRRF2		88.171	89.730	519	537	64,3 %			Tegumentprotein	
EBNA-1		89.765	91.396	543	641	66,1 %			Immortalisierung, Aufrechterhaltung der Latenz	
BKRF2 <sup>1</sup>		91.478	91.891	137	137	83,2 %			Glykoprotein L, bildet Komplex mit gH (BXLF2) und gp42 (BZLF2)	
BKRF3 <sup>1</sup>		91.873	92.640	255	255	95,1 %			Uracil-DNA Glykosylase	

Tabelle 3.3: HVMA-Gene und -Genprodukte im Vergleich zu EBV-Proteinen: Fortsetzung

Leserahmen	HVMA				EBV Wildtyp			
	Exon	Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS	Funktion (EBV)	Funktion (EBV)
BKRF4		92.651	93.370	239	217	68,5 %	Tegumentprotein	Tegumentprotein
BBLF4 <sup>1</sup>		95.844	93.412	810	809	93,4 %	Helikase-Primase-Komplex: Helikase	Helikase-Primase-Komplex: Helikase
BBRF1 <sup>1</sup>		95.789	97.633	614	613	93,2 %	Portalprotein an Kapsidecke, Komplex mit Terminase	Portalprotein an Kapsidecke, Komplex mit Terminase
BBRF2 <sup>1</sup>		97.536	98.372	278	278	92,3 %	Tegumentprotein	Tegumentprotein
BBLF2/BBLF3 <sup>1</sup>		100.684	98.369	720	723	77,9 %	Helikase-Primase-Komplex	Helikase-Primase-Komplex
	BBLF2/BBLF3 e2	98.982	98.369					
	BBLF2/BBLF3 e1	100.684	99.133					
BBRF3 <sup>1</sup>		100.784	102.004	406	405	92,1 %	Glykoprotein M, bildet Komplex mit gN (BDRF1)	Glykoprotein M, bildet Komplex mit gN (BDRF1)
BBLF1 <sup>1</sup>		102.706	102.488	72	75	70,8 %	Tegumentprotein, Virion-Ausschleusung	Tegumentprotein, Virion-Ausschleusung
BGLF5 <sup>1</sup>		104.073	102.661	470	470	93,7 %	alkalische Exonuklease	alkalische Exonuklease
BGLF4 <sup>1</sup>		105.349	104.057	430	429	93,0 %	Virion-Proteinkinase	Virion-Proteinkinase
BGLF3.5		105.689	105.225	154	153	87,1 %	Tegumentprotein	Tegumentprotein
BGLF3 <sup>1</sup>		106.674	105.676	332	332	88,1 %	Terminase-Bindeprotein, Chaperon	Terminase-Bindeprotein, Chaperon
BGRF1/BDRF1 <sup>1</sup>		106.673	112.119	690	690	93,8 %	Terminase-Untereinheit: ATPase	Terminase-Untereinheit: ATPase
	BGRF1/BDRF1 e1	106.673	107.608					
	BGRF1/BDRF1 e2	110.983	112.119					
BGLF2 <sup>1</sup>		108.608	107.598	336	336	88,2 %	Tegumentprotein, bindet BBLF1-Protein	Tegumentprotein, bindet BBLF1-Protein
BGLF1 <sup>1</sup>		110.094	108.586	502	507	77,2 %	Tegumentprotein	Tegumentprotein
BDLF4		110.786	110.064	240	225	86,7 %	Funktion unbekannt	Funktion unbekannt
BDLF3		112.921	112.130	263	234	58,3 %	Glykoprotein der Hülle, gp150	Glykoprotein der Hülle, gp150
BDLF2		114.170	112.986	394	420	67,3 %	Tegumentprotein	Tegumentprotein
BDLF1 <sup>1</sup>		115.085	114.180	301	301	97,4 %	Kapsidstruktur, Triplex-Komplex: Dimer	Kapsidstruktur, Triplex-Komplex: Dimer
BcRF1		119.245	121.533	762	750	83,5 %	komplexiert mit TATT-Komplex in Promotorregion von latenten Genen	komplexiert mit TATT-Komplex in Promotorregion von latenten Genen

Tabelle 3.3: HVMA-Gene und -Genprodukte im Vergleich zu EBV-Proteinen: Fortsetzung

Leserahmen	Exon	HVMA				EBV Wildtyp				Funktion (EBV)
		Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS	Größe (AS)	Identität AS	
BcLF1 <sup>1</sup>		119.246	115.101	1.381	1.381	1.381	96,1 %	1.381	96,1 %	Hauptkapsidprotein
BTRF1 <sup>1</sup>		121.520	122.731	403	403	4245	89,2 %	4245	89,2 %	Vermittler der zyttoplasmatischen Ausschleusung
BXLF2 <sup>1</sup>		124.848	122.728	706	706	706	84,0 %	706	84,0 %	Glykoprotein H, gp85, bildet Komplex mit gL (BKRF2), Fusion mit Zielzelle
BXRF1 <sup>1</sup>		126.654	127.397	247	247	248	84,6 %	248	84,6 %	Kernprotein, Funktion unbekannt
BXLF1 <sup>1</sup>		126.655	124.850	601	601	607	90,6 %	607	90,6 %	Thymidinkinase
BVRF1 <sup>1</sup>		127.213	128.919	568	568	570	85,9 %	570	85,9 %	Tegumentprotein, bedeckt Portalproteine des Kapsids bei reifen Virionen
BVLF1		129.704	128.889	271	271	272	87,9 %	272	87,9 %	Funktion unbekannt
BVRF2 <sup>1</sup>		129.730	131.595	621	621	605	78,9 %	605	78,9 %	Protease, involviert in die Reifung des Kapsidproteins p40 (BdRF1)
BdRF1 <sup>1</sup>		130.543	131.595	350	350	345	77,5 %	345	77,5 %	Kapsidprotein p40
BILF2		132.390	131.629	253	253	248	73,3 %	248	73,3 %	Glykoprotein der Hülle, gp78, Funktion unbekannt
LF3		137.363	135.354	670	670	924	51,4 %	924	51,4 %	Funktion unbekannt
LF2		145.709	144.420	429	429	429	93,1 %	429	93,1 %	Funktion unbekannt
LF1		147.064	145.670	464	464	469	78,6 %	469	78,6 %	Funktion unbekannt
BILF1		148.011	147.073	312	312	312	81,8 %	312	81,8 %	Glykoprotein der Hülle, gp60, Funktion unbekannt
BALF5 <sup>1</sup>		151.884	148.837	1.015	1.015	1.015	95,1 %	1.015	95,1 %	DNA-Polymerase: kalatytische Untereinheit
ECRF4 <sup>2</sup>		150.364	151.500	378	378					Funktion unbekannt
BALF4 <sup>1</sup>		154.481	151.887	864	864	857	87,5 %	857	87,5 %	Glykoprotein B, gp110, Fusion mit Zelle
BARF0		154.741	156.156	471	471	471	75,2 %	471	75,2 %	Funktion unbekannt
BALF3 <sup>1</sup>		156.522	154.468	684	684	789	88,7 %	789	88,7 %	Rolle bei Synthese und Verpackung der DNA
BALF2 <sup>1</sup>		159.928	156.539	1.129	1.129	1.128	94,4 %	1.128	94,4 %	Bindung von einzelsträngiger DNA

Tabelle 3.3: HVMA-Gene und -Genprodukte im Vergleich zu EBV-Proteinen: Fortsetzung

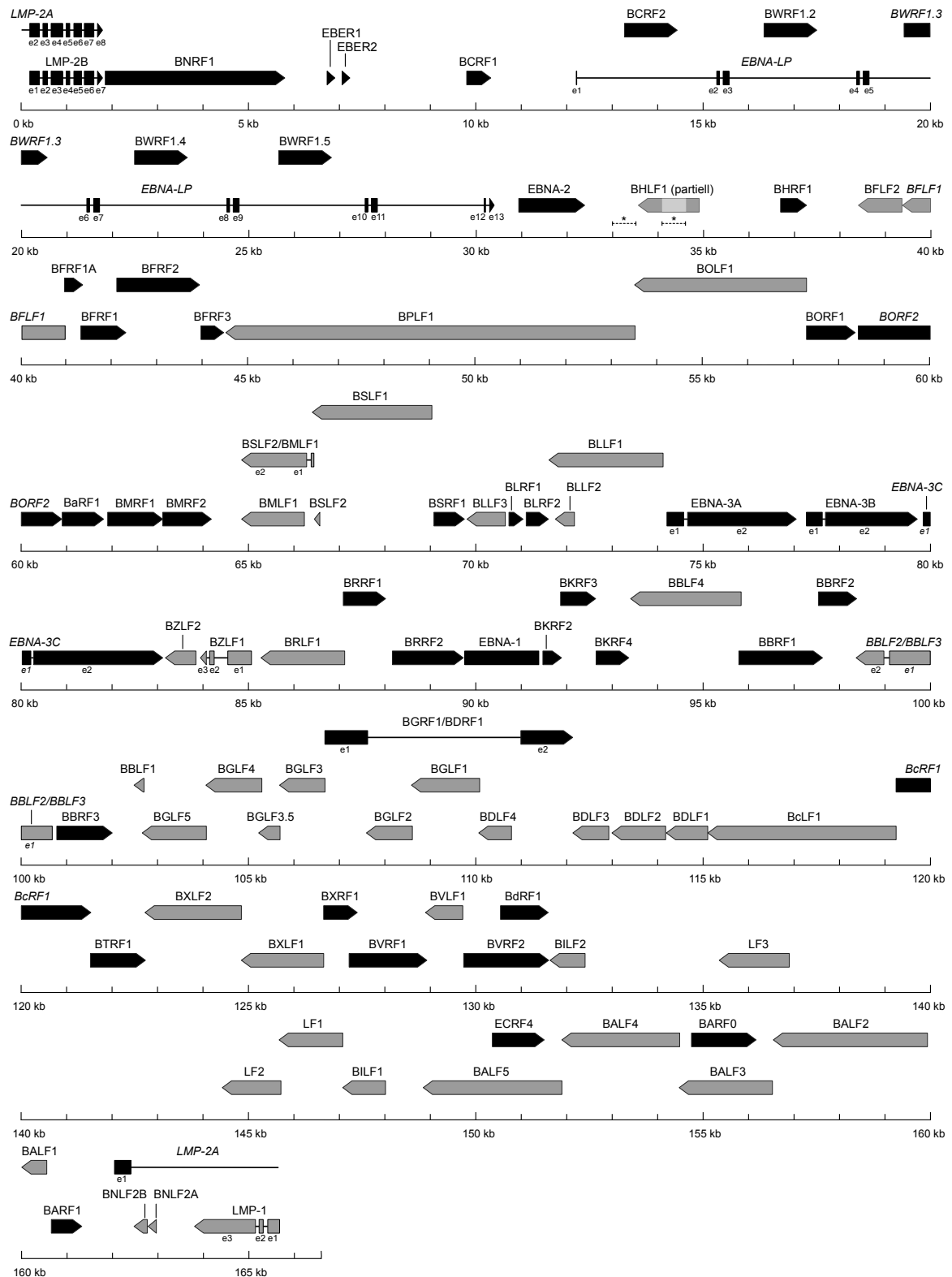
Leserahmen	HVMA				EBV Wildtyp			
	Exon	Start (nt)	Stop (nt)	Größe (AS)	Größe (AS)	Identität AS	Funktion (EBV)	Funktion (EBV)
BALF1		160.561	160.013	182	220	85,8 %	Homolog zu humanem bcl-2-Proteogen, Gegenregulator zum <i>BHRF1</i> -Genprodukt	Homolog zu humanem bcl-2-Proteogen, Gegenregulator zum <i>BHRF1</i> -Genprodukt
BARF1		160.661	161.326	221	221	75,1 %	bindet und inaktiviert den humanen <i>Colony Stimulating Factor 1</i>	bindet und inaktiviert den humanen <i>Colony Stimulating Factor 1</i>
BNLF2B		162.779	162.483	98	101	64,4 %	Funktion unbekannt	Funktion unbekannt
BNLF2A		162.967	162.788	59	60	53,8 %	Vermittler eines Immunevasionsmechanismus	Vermittler eines Immunevasionsmechanismus
LMP-1		165.678	163.814	561	386	49,1 %	Immortalisierung, inhibiert zelluläre Apoptose	Immortalisierung, inhibiert zelluläre Apoptose
	LMP-1 e3	165.150	163.814					
	LMP-1 e2	165.321	165.235					
	LMP-1 e1	165.678	165.417					

gL = Glykoprotein L, gH = Glykoprotein H, gM = Glykoprotein M, gN = Glykoprotein N, MHC = Major Histocompatibility Complex

<sup>1</sup> Proteine innerhalb der Familie der Herpesviren konserviert (*core genes*)

<sup>2</sup> Leserahmen beim Epstein-Barr Wildtyp nicht definiert

Funktion zusammengestellt aus Davison 2007a, Young et al. 2007, Fossum et al. 2009, Aubry et al. 2012, Chiu et al. 2014, Gruffat et al. 2012, Thompson und Kurzrock 2004 und Sample et al. 2009



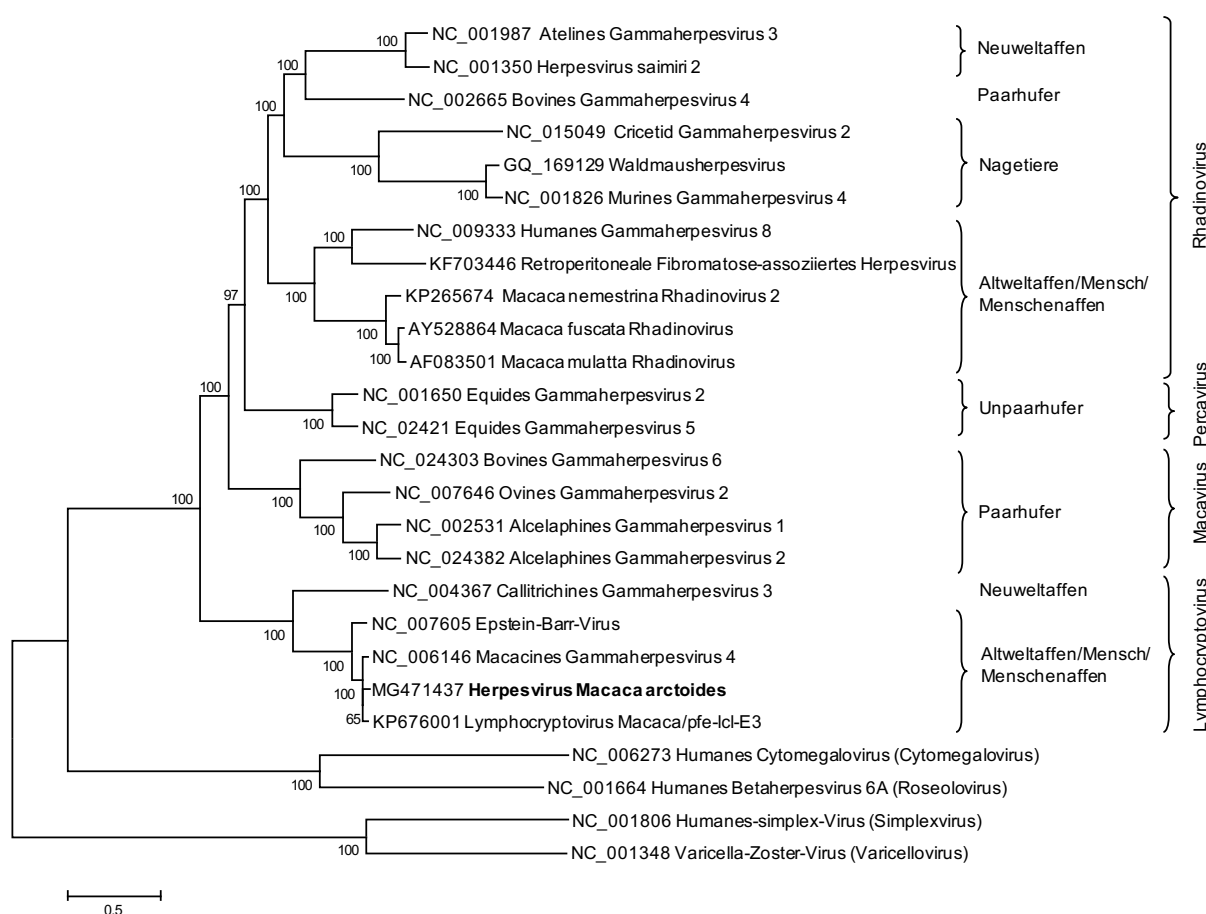
**Abbildung 3.3.** HVMA-Genomorganisation

Dargestellt ist die Lage und Größe der offenen Leserahmen im HVMA-Genom der Virusvariante A. Die latenten Gene (LMPs, EBERs, EBNAs) wurden nach dem Genprodukt bezeichnet, die Gene der lytischen Phase analog zur Nomenklatur der *Bam*HI-Leserahmen von EBV. Die Orientierung der Leserahmen ist durch unterschiedliche Farben (schwarz = vorwärts, grau = rückwärts) und die Pfeilspitze angezeigt. Ggf. Angabe der Exons (Exon, e). Der Grad der Übereinstimmung der Proteine der einzelnen Leserahmen im Vergleich zu EBV ist in Tabelle 3.3 aufgelistet. Abbildung in veränderter Form durch *Krumbholz und Roempke et al. 2019* veröffentlicht.

## 3.2 Phylogenetische Untersuchungen

Bei den errechneten Stammbäumen handelt es sich um ungewurzelte Stammbäume, die die Verwandtschaft der Spezies untereinander darstellen (Brown 2002). Für die Einordnung von HVMA innerhalb der Familie der Herpesviren wurden zwei Analysen durchgeführt. Beide Stammbäume zeigten die Zugehörigkeit des Herpesvirus *Macaca arctoides* zu dem Genus der Lymphokryptoviren.

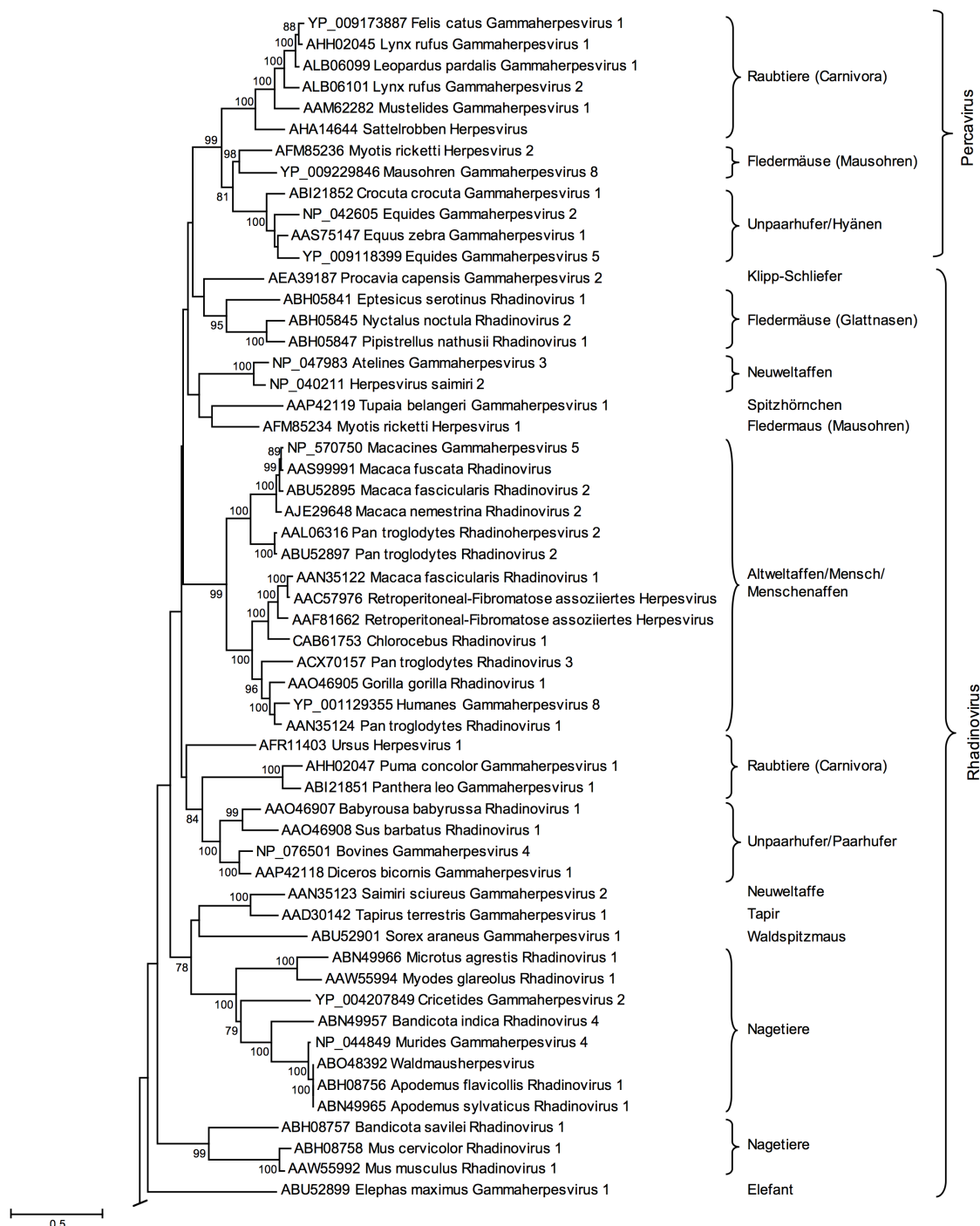
Die Grundlage der ersten Berechnung waren 41 Kerngene, die bei allen Herpesviren konserviert sind. Die Alinierung jedes Kerngens erfolgte anhand der AS-Sequenzen, die Berechnung des Stammbaumes auf Basis der proteincodierenden Nukleotidsequenz. Nach der Alinierung wurden die Nukleotidsequenzen für jedes Virus in der gleichen Abfolge aneinandergereiht und der Stammbaum (Abbildung 3.4) berechnet.



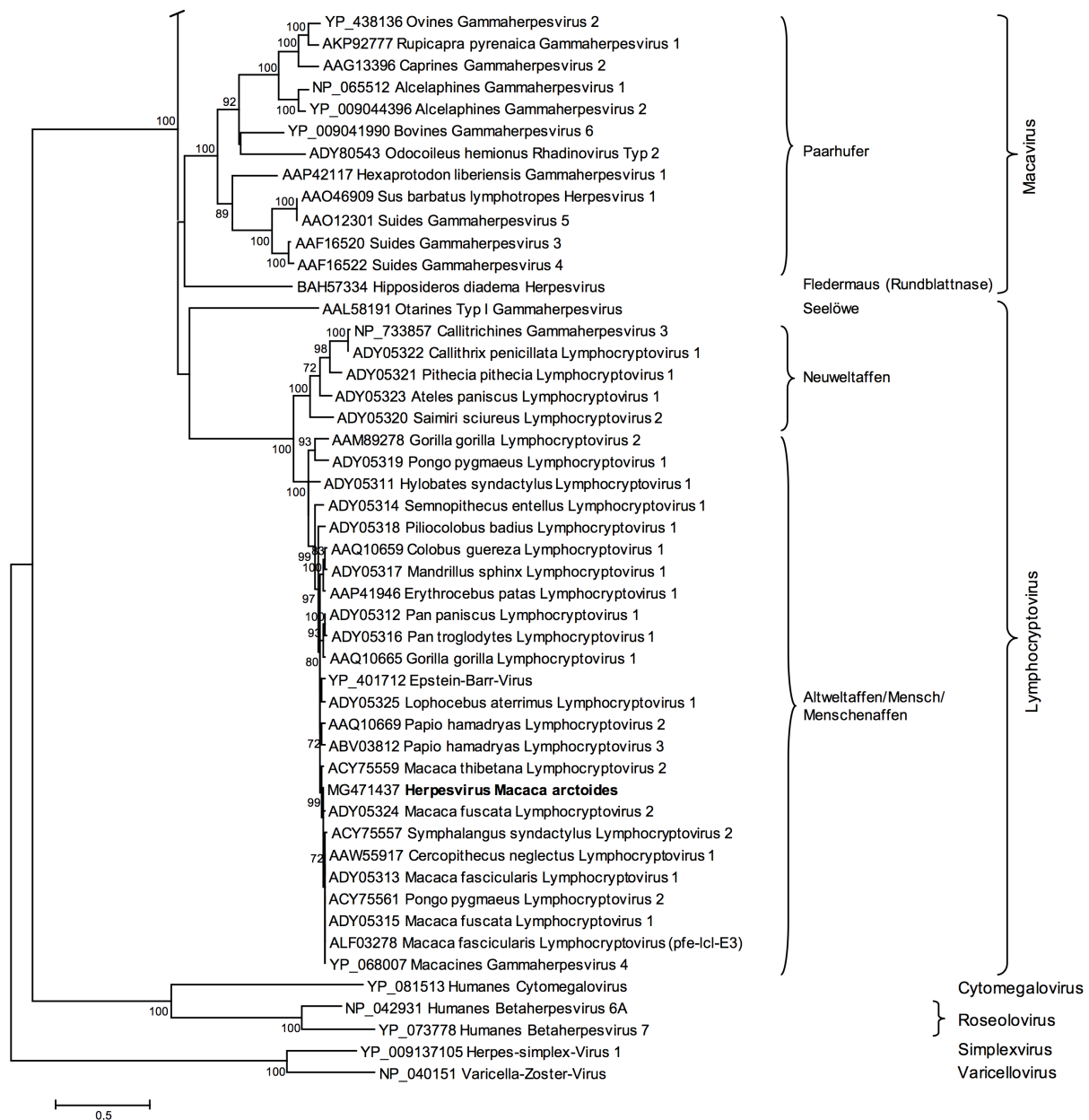
**Abbildung 3.4.** Ungewurzelter Stammbaum: Kerngene der Gammaherpesviren

Das Herpesvirus *Macaca arctoides* ist am engsten mit Lymphokryptoviren von Altweltaffen verwandt. Insgesamt wurden 26 Nukleotidsequenzen analysiert. Gruppierung der einzelnen Viren anhand der Klassifizierung ihrer Wirtsspezies und den Genus der Herpesviren. Alinieren der Aminosäuresequenzen der Genprodukte von 41 Kerngenen mittels *MUSCLE* und Zusammenfügen der jeweiligen proteincodierenden Nukleotidsequenzen eines Virus zu einer Gesamtsequenz (Anhang, Tabelle 7.1). Der Stammbaum ist maßstabsgetreu, der angegebene Maßstab gibt die Anzahl der Substitutionen pro Position an. Die Zahlen an den Kreuzungspunkten geben die *Bootstrap*-Werte in % an. Bei Werten größer 70 % ist die Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorfahren anzunehmen (Hillis und Bull 1993). Abbildung in veränderter Form durch Krumbholz und Roempke et al. 2019 veröffentlicht.

Die zweite Verwandtschaftsanalyse erfolgte anhand der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase (Abbildungen 3.5 und 3.6). Zum Vergleich lagen die Sequenzen von weiteren 99 Gammaherpesviren verschiedener Tierespezies sowie fünf Referenzsequenzen von Vertretern der Alpha- und Betaherpesviren vor. Dabei wurde auch auf nur partiell bekannte Sequenzen zurückgegriffen und der alinierte Bereich auf eine Länge von ca. 700 AS eingeschränkt.



**Abbildung 3.5.** DNA-Polymerase der Gammaherpesviren  
Ungewurzelter Stammbaum, Gruppierung der Viren anhand der Klassifizierung ihrer Wirtsspezies und den Genus der Herpesviren. Insgesamt wurden 105 Aminosäuresequenzen analysiert. Darstellung der Perca- und Rhadinoviren, Fortsetzung des Stammbaumes in Abbildung 3.6.



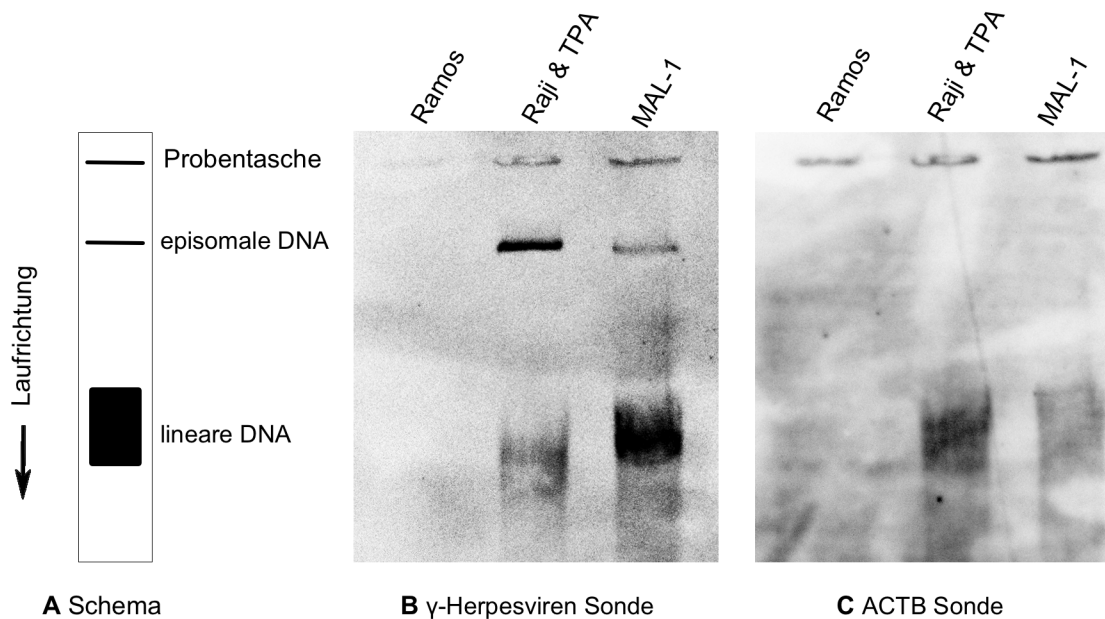
**Abbildung 3.6.** DNA-Polymerase der Gammaherpesviren: *Fortsetzung* von Abbildung 3.5. Der Stammbaum ist maßstabsgetreu, der angegebene Maßstab gibt die Anzahl der Substitutionen pro Position an. Die Zahlen an den Kreuzungspunkten geben die *Bootstrap*-Werte in % an. Werte < 70% wurden aus dem Stammbaum entfernt. Abbildung in veränderter Form durch *Krumbholz und Roempke et al. 2019* veröffentlicht.

### 3.3 Untersuchungen zur viralen Persistenz von HVMA

Die humane Zelllinie Ramos ist nicht mit EBV infiziert (*Klein et al. 1974*) und diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde die humane Zelllinie Raji eingesetzt, die latent mit EBV infiziert ist (*Pulvertaft 1964*) und bereits von *Decker et al. 1996* auf das Vorkommen von linearer und episomaler DNA im *in situ*-Lysigel nach *Gardella* analysiert wurde. Der Nachweis einer linearen Virus-DNA-Bande gilt als Ausdruck einer aktiven Virusproduktion (*Gardella et al. 1984*). Alle Zellen wurden 72 h vor Versuchsbeginn im Verhältnis 1:2 bis 1:3 geteilt und die virusinfizierten Zelllinien zur Induktion des lytischen Replikationszyklus mit 100 ng/ml TPA versetzt.



Zur Etablierung der Methode wurde zunächst ein Vorversuch mit drei Zelllinien durchgeführt. Die schematische Auswertung der Banden im *in situ*-Lysisgel nach Gardella und die Ergebnisse der Southern-Blot-Analyse sind in Abbildung 3.7 gezeigt. Zum Nachweis viraler DNA wurde die HVMA-Sonde [37/38] verwendet, die im Folgenden als  $\gamma$ -Herpesvirensode bezeichnet wird. Für den Nachweis genomischer DNA wurde die virale Sonde von der Nylonmembran entfernt und die Membran anschließend mit der ACTB-Sonde hybridisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die eingesetzte virale Sonde spezifisch ist. Für HVMA wurde in der untersuchten Zelllinie MAL-1 das Vorliegen von viraler DNA im Bereich der Proben tasche, der episomalen sowie der linearen Position erbracht.

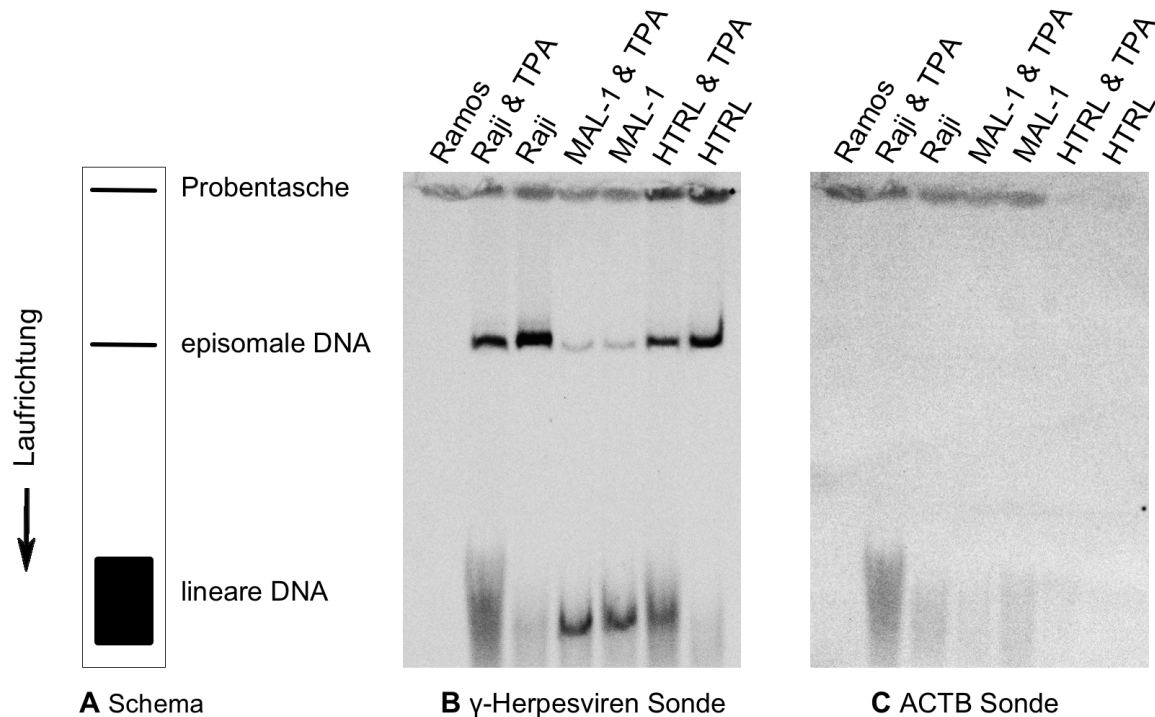


**Abbildung 3.7.** Vorversuch: Untersuchung der Zelllinie MAL-1 mittels *in situ*-Lysisgel nach Gardella. Von jeder Zelllinie wurden  $2 \times 10^6$  Zellen elektrophoretisch aufgetrennt, die entstandenen Banden nach dem Transfer auf eine Nylonmembran (Southern-Blot) mit DIG-markierten Sonden hybridisiert und das Chemilumineszenzsignal detektiert. **A:** schematische Darstellung; Die virale DNA wandert in Abhängigkeit der Genomstruktur unterschiedlich weit. Die episomale (zirkuläre) DNA stellt sich als scharf abgrenzbare Bande dar. Lineare DNA legt die längste Laufstrecke zurück und imponiert als breite Bande. **B:** Hybridisierung mit  $\gamma$ -Herpesviren-Sonde; Nachweis viraler DNA im Bereich der Proben tasche, der episomalen und der linearen Position für die virusinfizierten Zelllinien Raji und MAL-1. **C:** Ablösen der  $\gamma$ -Herpesviren-Sonde und Re-Hybridisierung mit der Sonde zum Nachweis von ACTB. Nachweis im Bereich der Proben tasche bei allen drei Zelllinien. Im Bereich des Episoms ist für die zelluläre DNA kein Signal erkennbar.

Im eigentlichen Versuch wurde zusätzlich zur Zelllinie MAL-1, die durch Dr. Michael Schacke (Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena) etablierte Zelllinie HTRL (HVMA-transformed rabbit lymphocytes) untersucht. Dabei handelt es sich um HVMA-induzierte Tumoren aus Kaninchen, die nach Mazeration in Nacktmäuse injiziert wurden. Die transplantierten Kaninchentumorzellen konnten sich in den Nacktmäusen zu Tumoren entwickeln, wurden anschließend aus den Mäusen gewonnen und in Zellkultur überführt. Hierbei handelt es sich also um HVMA-positive Kaninchenzellen.

Die Durchführung des *in situ*-Lysisgels erfolgte wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, jedoch wurden nur  $1 \times 10^6$  Zellen in 40  $\mu$ l Probenpuffer aufgenommen und in Geltaschen (ca. 0,5 cm) pipettiert. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Zugabe von TPA Auswirkungen auf die Zelllinien MAL-1 und HTRL hat und sich die ggf. nur latent infizierten Zellen in den lytischen Replikationszyklus überführen lassen.

Abbildung 3.8 zeigt das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse mittels  $\gamma$ -Herpesvirensonde und anschließendem Nachweis von ACTB. Nach der Hybridisierung mit der  $\gamma$ -Herpesvirensonde lässt sich bei den Zelllinien Raji- und HTRL der Effekt der Induktion erkennen. Bei beiden Zelllinien konnte ein zusätzliches Signal in der linearen Position detektiert werden. Das Detektionsmuster für die Zelllinie MAL-1 war für die induzierten und nicht-induzierten Zellen gleich.



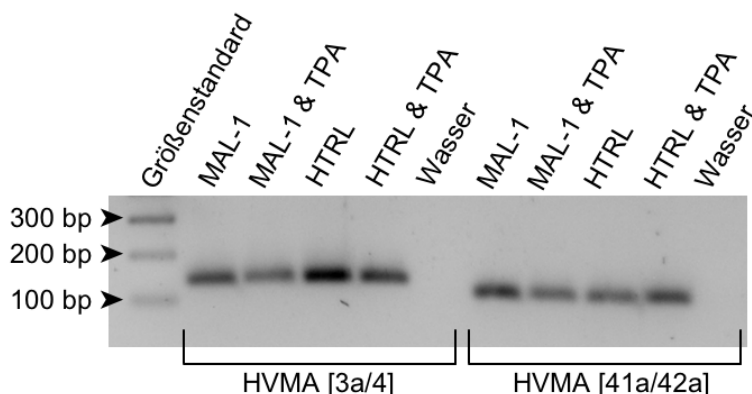
**Abbildung 3.8.** Untersuchung der Zelllinien MAL-1 und HTRL mittels *in situ*-Lysisgel nach Gardella. Von jeder Zelllinie wurden  $1 \times 10^6$  Zellen elektrophoretisch aufgetrennt, die entstandenen Banden nach dem Transfer auf eine Nylonmembran (Southern-Blot) mit DIG-markierten Sonden hybridisiert und das Chemilumineszenzsignal detektiert. **A:** schematische Darstellung **B:** Hybridisierung mit  $\gamma$ -Herpesviren-Sonde; Nachweis viraler DNA im Bereich der Tasche und der episomalen Position für alle virusinfizierten Zelllinien (Raji, MAL-1 und HTRL). Für die lineare Position Nachweis viraler DNA bei den mit TPA-induzierten virusinfizierten Zelllinien (Raji, MAL-1 und HTRL) und der nicht-induzierten Zelllinie MAL-1. **C:** Ablösen der  $\gamma$ -Herpesviren-Sonde und Re-Hybridisierung mit der Sonde zum Nachweis von ACTB. Nachweis bei den induzierten und nicht-induzierten Zelllinien Ramos, Raji und MAL-1 im Bereich der Probentaschen. Schwaches Signal im Bereich der Kaninchen-Zelllinie HTRL. *Anmerkung:* Beim Pipettieren der EBV-positiven Raji-Zelllinie in die Probentasche ist ein Teil des Materials in die Tasche der Negativkontrolle (Ramos) gelaufen, trotz sorgfältiger Entfernung aus der Probentasche ist noch ein Signal mit der  $\gamma$ -Herpesviren-Sonde detektierbar und ist als Kontamination zu verstehen. Die Spezifität der Sonde konnte durch den Vorversuch (Abbildung 3.7) bereits gezeigt werden. Abbildung in veränderter Form durch Krumbholz und Roempke et al. 2019 veröffentlicht.

### 3.4 Bestimmung der Viruslast in Lymphozyten der Affenspezies

#### *Macaca arctoides*

Für die Quantifizierung der Viruslast in MAL-1-Zellen wurden zwei Zielsequenzen aus unterschiedlichen Abschnitten des viralen Genoms ausgewählt: HVMA [3a/4] aus dem EBNA-2-Leserahmen (latentes Gen) und HVMA [41a/42a] aus dem *BZLF1*-Leserahmen (sehr frühes Gen). Zur Überprüfung der Spezifität des Amplifikates wurde das Reaktionsprodukt der PCR-Läufe mit den Oligonukleotidpaaren HVMA [3a/4] und HVMA [41a/42a] im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und hinsichtlich der

Bandengröße analysiert (Abbildung 3.9). Nur jeweils eine Bande der entsprechenden Größe wurde wiedergefunden und in den folgenden Messungen nur noch die Schmelztemperatur der Amplifikate zur Überprüfung der Spezifität verwendet.



**Abbildung 3.9.** Elektrophoretische Auftrennung der qPCR-Produkte  
Auftrennung im Agarosegel (1 %) mit Ethidiumbromid und Fotodokumentation unter UV-Licht (inverse Darstellung). Bei den HVMA-infizierten Zelllinien MAL-1 und HTRL findet sich eine Bande in erwarteter Größe: HVMA [3a/4] 135 bp und HVMA [41a/42a] 105 bp. In der Wasserkontrolle ist kein Produkt entstanden.

### 3.4.1 Etablierung der quantitativen PCR: Intra- und Interassayreproduzierbarkeit

Das Vorgehen für die Erstellung der Referenzkonstrukte ist in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für die geometrische Verdünnungsreihe mit den Stufen  $1E+06$ ,  $1E+05$ ,  $1E+04$ ,  $1E+03$ ,  $1E+02$ ,  $1E+01$ ,  $1E+00$  und  $1E-01$  Kopien/ $\mu$ l erfolgten insgesamt sechs Messungen aus jeder Verdünnungsstufe. Je drei Ansätze wurden an einem Tag analysiert (Intraassayreproduzierbarkeit, PCR-Lauf I-III) und dann jeweils ein Ansatz an drei weiteren Tagen (Interassayreproduzierbarkeit, PCR-Lauf IV-VI). Die eingesetzten Verdünnungen wurden hinsichtlich ihrer  $C_p$ -Werte und Schmelztemperaturen ausgewertet. In Tabelle 3.4 sind die  $C_p$ -Einzelwerte angegeben, die Fluoreszenzverläufe aus diesen Messungen werden in Abbildung 3.10 gezeigt. Ein  $C_p > 36,00$  wurde als negativ bewertet, die Verdünnung liegt somit außerhalb der Nachweisgrenze der PCR. Diese Werte wurden bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt.

**Tabelle 3.4:** *Crossing points* der Verdünnungsreihe der Referenzkonstrukte

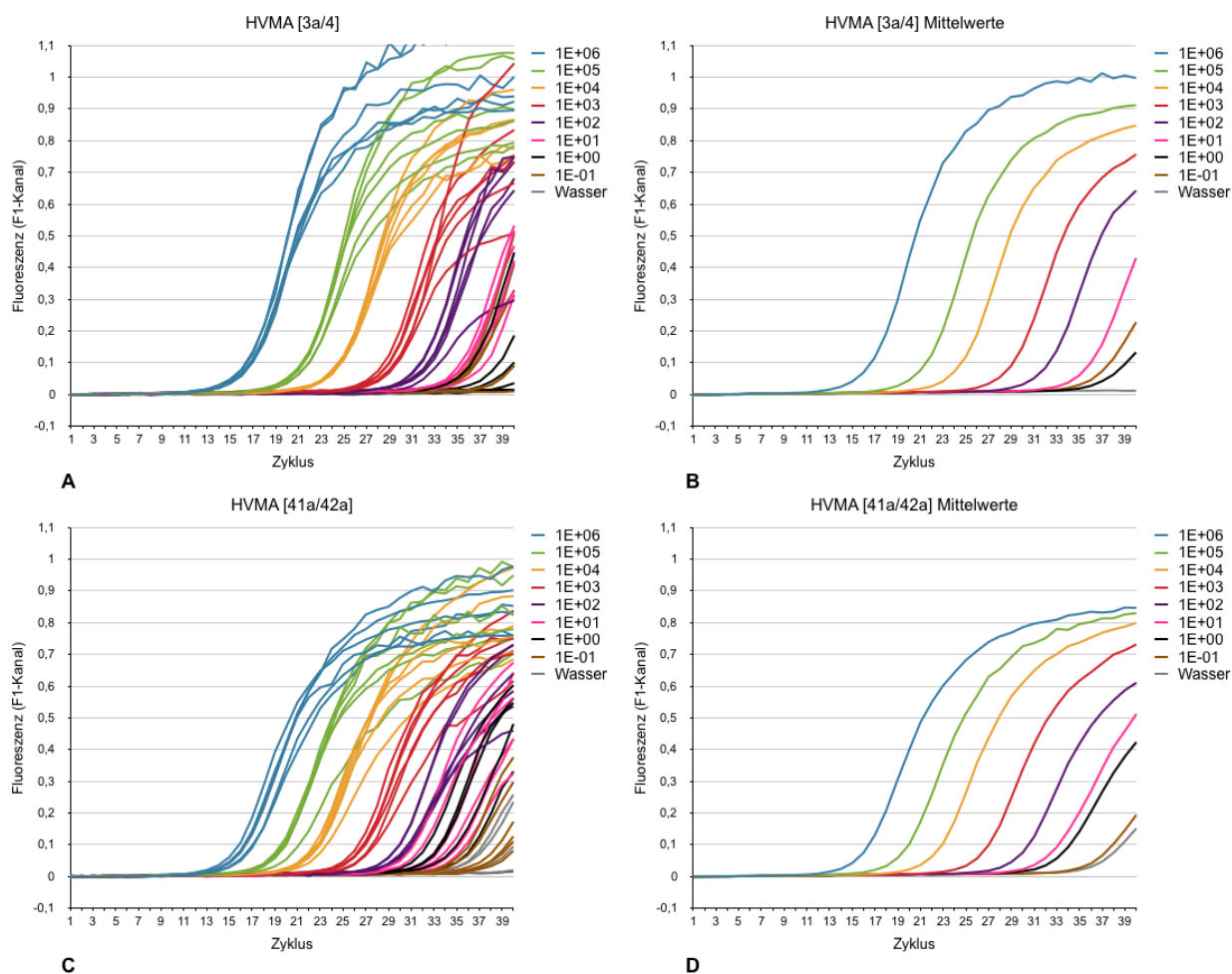
Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse werden die  $C_p$  aus sechs Messungen sowie der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung der jeweiligen Verdünnungsstufe gezeigt. Drei Messungen erfolgten an einem Tag (Intraassayreproduzierbarkeit, PCR-Lauf I-III) sowie je eine Messung an einem weiteren Tag (Interassayreproduzierbarkeit, PCR-Lauf IV-VI).

Kopien/ $\mu$ l	PCR-Lauf						Mittelwert $\pm$ SD
	I	II	III	IV	V	VI	
HVMA [3a/4]							
$1E+06$	16,48	16,89	16,51	16,62	16,66	16,27	$16,57 \pm 0,21$
$1E+05$	20,89	21,19	21,31	21,61	21,50	21,08	$21,26 \pm 0,27$
$1E+04$	24,38	24,15	24,25	24,28	24,56	24,05	$24,28 \pm 0,18$
$1E+03$	29,96	28,43	28,14	28,85	28,53	28,44	$28,73 \pm 0,65$
$1E+02$	31,47	31,04	31,40	32,23	32,11	31,80	$31,68 \pm 0,45$
$1E+01$	> 36,00	> 36,00	> 36,00	> 36,00	> 36,00	> 36,00	

**Tabelle 3.4:** qPCR: *Crossing points* der Verdünnungsreihe der Referenzkonstrukte: *Fortsetzung*

Kopien/ $\mu$ l	PCR-Lauf						Mittelwert $\pm$ SD
	I	II	III	IV	V	VI	
HVMA [41a/42a]							
1E+06	16,28	15,53	15,08	15,89	15,88	16,24	15,82 $\pm$ 0,45
1E+05	19,05	19,30	18,65	19,32	19,30	19,96	19,26 $\pm$ 0,43
1E+04	21,67	22,19	21,87	22,65	22,12	22,47	22,16 $\pm$ 0,36
1E+03	25,67	26,68	26,11	26,13	26,14	26,75	26,25 $\pm$ 0,40
1E+02	29,45	29,22	29,22	30,37	29,91	29,64	29,64 $\pm$ 0,45
1E+01	30,99	30,49	35,29	33,23	> 36,00	*	32,50 $\pm$ 2,21
1E+00	32,43	32,76	31,52	> 36,00	35,50	33,35	33,11 $\pm$ 1,49

\* keine Messung, da Kapillare zerbrochen; SD = Standardabweichung

**Abbildung 3.10.** Fluoreszenzkurven der Referenzkonstrukte

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden mit den Verdünnungen der Referenzkonstrukte insgesamt sechs Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Gezeigt werden die Kurvenverläufe aus sechs Einzelmessungen im F1-Kanal des LightCyclers aus den Verdünnungsstufen 1E+06, 1E+05, 1E+04, 1E+03, 1E+02, 1E+01, 1E+00, 1E-01 Kopien/ $\mu$ l und der Wasserkontrolle mit den angegebenen HVMA-spezifischen Oligonukleotiden. **A, C:** Kurvenverlauf, Einzelwerte. **B, D:** Kurvenverlauf, Mittelwerte.

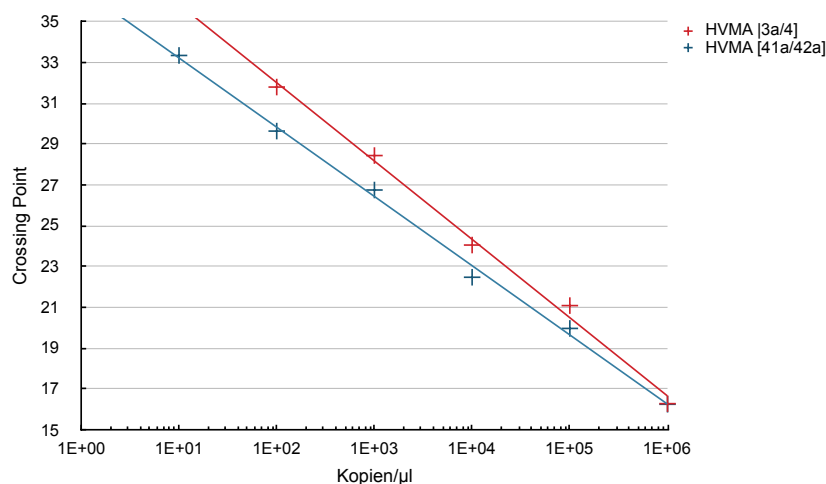
Die Messung der Schmelztemperaturen erfolgte am Ende jeder PCR und diente der Spezifitätsüberprüfung des Messsignals. Für die beiden Zielsequenzen konnten folgende Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ermittelt werden:

HVMA [3a/4]: Amplifikat  $82,0 \pm 0,31$  °C, Wasserkontrolle  $75,9 \pm 1,55$  °C

HVMA [41a/42a]: Amplifikat  $83,4 \pm 0,11$  °C, Wasserkontrolle  $74,5 \pm 1,51$  °C

### 3.4.2 Erstellung der Standardkurve

Der Vergleich des  $C_p$  einer unbekannt Probe mit dem eines bekannten Standards ist eine etablierte Methode zur Bestimmung der Anzahl von DNA-Kopien. Zunächst wurde die PCR mit einer geometrischen Verdünnungsreihe des Referenzkonstruktes durchgeführt. Trägt man die  $C_p$  gegen die eingesetzten Standardkonzentrationen auf, kann man eine resultierende Regressionsgerade (Standardkurve) ermitteln. Diese wird in der Software hinterlegt und bildet die Basis für die automatisierte Berechnung der Kopienzahl/ $\mu$ l und ist in Abbildung 3.11 gezeigt.



**Abbildung 3.11.** Regressionsgeraden der Standardreihen, halblogarithmisch. Aufgetragen sind die  $C_p$  gegen die Konzentration der Referenzkonstrukte (Kopien/ $\mu$ l) und die so ermittelte Regressionsgerade für die Bestimmung der Virus-Kopien in den MAL-1-Zellen.

Als Ausdruck des linearen Zusammenhanges kann das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  bzw.  $r^2$  ermittelt werden. Ein Wert von 1 drückt einen linearen Zusammenhang aus (Eckstein 2014). Mit Hilfe der Steigung (Slope) der Regressionsgerade kann mit der Formel  $\text{Effizienz} = 10^{-1/\text{Slope}}$  die Effizienz bestimmt werden, wobei der optimale Wert zwei ist (Verdopplung der DNA-Ausgangsmenge pro Zyklus). Als Maß für die Streuung der Einzelwerte der Standardkurve berechnet die LightCycler-Software die mittlere quadratische Abweichung (Fehler). Die ermittelten Parameter der Standardkurven sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

**Tabelle 3.5:** qPCR: Parameter der Standardkurve

Zielsequenz	Korrelationswert $r^*$	$R^2$	$Slope^*$	Fehler <sup>*</sup>	Effizienz
HVMA [3a/4]	-0,998	0,996	-3,842	0,165	1,821
HVMA [41a/42a]	-0,999	0,998	-3,397	0,126	1,969

\* Ermittlung durch LightCycler-Software

### 3.4.3 Quantitative Analyse der viralen DNA aus der Zelllinie MAL-1

Als Ausgangsmaterial dienten drei DNA-Präparationen aus  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^5$  Zellen, die geometrisch verdünnt wurden (siehe Abschnitt 2.4.2). Aus jeder hergestellten Verdünnungsstufe wurden die beiden HVMA-Zielsequenzen jeweils dreimal amplifiziert. Bei jeder Messung wurde ein Standard mitgeführt. Die LightCycler-Software ermittelte aus den gemessenen Werten und der hinterlegten Standardkurve die Probenkonzentration in Kopien/ $\mu\text{l}$  mittels der *Second Derivative Maximum*-Methode. Da die Verdünnungen so eingestellt wurden, dass sich die DNA von 100.000 Zellen etc. im eingesetzten Probenvolumen von 5  $\mu\text{l}$  befindet, wurden die Ergebnisse mit fünf multipliziert. Die so errechneten Einzelmesswerte finden sich im Anhang (Tabelle 7.1). Teilt man den Mittelwert der Kopien/Zellzahl durch die eingesetzte Zellzahl, so erhält man die viralen Kopien/Zelle. Da es sich um eine logarithmische Verdünnungsreihe handelt, muss das unterschiedliche Gewicht der Werte berücksichtigt werden. Daraus erfolgte die Berechnung des geometrischen Mittels (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6:** qPCR: Zusammenfassung Bestimmung der Viruskopien pro MAL-1-Zelle

Aus den in Tabelle 7.1 angegebenen Einzelmesswerten für die Kopien pro Verdünnungsstufe sowie den jeweiligen  $C_p$ -Werten wurde für jede DNA-Verdünnungsstufe das arithmetische Mittel berechnet (Kopien/Zellzahl). Für diese Mittelwertberechnung wurden nur DNA-Verdünnungen mit mindestens drei Messwerten berücksichtigt. Der Mittelwert der Kopien pro Zellzahl geteilt durch die Anzahl der eingesetzten Zellzahl, ergibt die Anzahl der Kopien pro Zelle. Berechnung des geometrischen Mittel aus den Kopien/Zelle mit Angabe der geometrischen Standardabweichung.

Zielsequenz	Zellzahl absolut	arithmetisches Mittel $\pm$ SD		
		$C_p$	Kopien/Zellzahl	Kopien/Zelle
HVMA [3a/4]	100.000	$17,42 \pm 0,56$	$3,352\text{E}+06 \pm 7,978\text{E}+05$	33,5
	10.000	$21,41 \pm 1,59$	$4,701\text{E}+05 \pm 2,817\text{E}+05$	47,0
	1.000	$25,41 \pm 1,62$	$5,751\text{E}+04 \pm 3,376\text{E}+04$	57,5
	100	$28,76 \pm 1,56$	$7,287\text{E}+03 \pm 3,890\text{E}+03$	72,9
	10	$32,24 \pm 1,39$	$8,938\text{E}+02 \pm 4,270\text{E}+02$	89,4
		<i>geom. Mittel <math>\pm</math> geom. SD:</i>		<i>56,8 <math>\pm</math> 1,41</i>
HVMA [41a/42a]	100.000	$17,01 \pm 0,33$	$3,026\text{E}+06 \pm 6,408\text{E}+05$	30,3
	10.000	$19,89 \pm 1,19$	$6,521\text{E}+05 \pm 2,473\text{E}+05$	65,2
	1.000	$23,05 \pm 0,88$	$7,619\text{E}+04 \pm 2,059\text{E}+04$	76,2
	100	$26,52 \pm 0,89$	$7,313\text{E}+03 \pm 2,073\text{E}+03$	73,1
	10	$30,10 \pm 0,92$	$6,646\text{E}+02 \pm 2,472\text{E}+02$	66,5
	1	$33,44 \pm 1,32$	$6,182\text{E}+01 \pm 3,033\text{E}+01$	61,8
		<i>geom. Mittel <math>\pm</math> geom. SD:</i>		<i>59,7 <math>\pm</math> 1,37</i>

SD = Standardabweichung, geom. = geometrisch

Folgende Kopienzahlen konnten ermittelt werden (geometrisches Mittel  $\pm$  geometrische Standardabweichung):

HVMA [3a/4]:  $56,8 \pm 1,41$  Kopien/Zelle

HVMA [41a/42a]:  $59,7 \pm 1,37$  Kopien/Zelle

Mittelwert:  $58,2 \pm 2,05$  Kopien/Zelle

## 4 Diskussion

Herpesviren kommen bei vielen Spezies vor und werden in drei Subfamilien eingeteilt:  $\alpha$ -Herpesviridae,  $\beta$ -Herpesviridae und  $\gamma$ -Herpesviridae. Das  $\gamma$ -Herpesvirus EBV persistiert nach der Primärinfektion lebenslang in humanen Lymphozyten und gilt als Auslöser für die Entstehung von malignen Erkrankungen (Chen et al. 1995). Hierzu zählen unter anderem das Burkitt-Lymphom, das Nasopharynxkarzinom und lymphoproliferative Erkrankungen im Rahmen der Immunsuppression (Thorley-Lawson und Allday 2008). Die Entwicklung von therapeutischen oder präventiven Impfstoffen gegen EBV wird dadurch erschwert, dass keine geeigneten *in vivo*-Kleintiermodellen zur Verfügung stehen und EBV ausschließlich humane Zellen infiziert (Chatterjee et al. 2014). Die Immunogenität eines rekombinanten LMP-2-Proteins konnte bereits bei Nagetieren gezeigt werden und ist ein erster Ansatz zur Entwicklung eines Impfstoffes (Lin et al. 2016).

Auf der Suche nach alternativen Virusmodellen wurden Affenspezies gezielt nach (kreuzreaktiven) Antikörpern gegen EBV-Proteine in der Hoffnung untersucht, EBV-ähnliche Viren zu entdecken und so ein alternatives Tiermodell etablieren zu können. Der Umgang und die Versorgung von Affen gestaltet sich allein aus ethischen Gründen problematischer als die Haltung von Nagetieren. Von Lapin et al. 1985 wurde in Lymphomen der Affen-Spezies *Macaca arctoides* ein neues Herpesvirus entdeckt und Herpesvirus *Macaca arctoides* (HVMA) benannt. Timanovskaia et al. 1988 konnten früh zeigen, dass HVMA in der Lage ist Kaninchen-Lymphozyten zu infizieren, zu transformieren und tödliche Lymphome auszulösen. Die Etablierung dieses Kleintiermodells wurde durch mehrere Arbeitsgruppen vorangetrieben und das Virus vor allem auf seine biologischen Eigenschaften hin untersucht (Timanovskaia et al. 1988, Wutzler et al. 1995 und Meerbach et al. 2004). Kenntnisse über die Genomorganisation von HVMA und die Identität der Genprodukte zu EBV sind für das Verständnis und die Untersuchung von malignen EBV-assoziierten Erkrankungen von großer Bedeutung.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Gewinnung von Grundkenntnissen über HVMA und der Auseinandersetzung mit folgenden Fragestellungen:

1. Wie ist das Genom organisiert und wie ähnlich sind sich HVMA und EBV?
2. Wie ist das Virus phylogenetisch innerhalb der Familie der Herpesviren einzuordnen?
3. Wie liegt das virale Genom in den infizierten Zellen vor?
4. Wie hoch ist die Viruslast pro infizierter MAL-1-Zelle?

## 4.1 Sequenzierung des HVMA-Genoms

### 4.1.1 Genomorganisation

Im HVMA-Genom konnten insgesamt 93 mögliche offene Leserahmen identifiziert werden. Der Vergleich der möglichen AS-Sequenzen mit EBV hat Übereinstimmungen zwischen 41,8 % (EBNA-3A, Latenzprotein) und 97,4 % (*BDLF1*, Kapsidstruktur) ergeben. Bei den meisten der sogenannten Kerngenen, die bei allen Herpesviren konserviert sind (*Ehlers et al. 2008*), finden sich Übereinstimmungen größer 80 %. Eine AS-Gleichheit von weniger als 60 % findet sich unter anderem bei allen Latenzproteinen.

Die Hauptkriterien für das Auffinden offener Leserahmen sind das Vorhandensein des Startcodons ATG, das für die Aminosäure Methionin codiert sowie die drei Stopcodons TAA, TAG und TGA. Durch Sequenzierfehler oder Nukleotidpolymorphismen können Start- und Stopcodons artifiziell oder real verändert sein und ggf. funktionell inaktiv oder aktiv werden. Somit ist es möglich, dass potenzielle Proteine nicht identifiziert werden können. Mögliche AS-Sequenzen werden durch Abgleich mit Datenbanken bereits bekannter Sequenzen überprüft. Gene, die individuell bei nur einer Virus-Spezies vorkommen oder nur eine geringe Übereinstimmung aufweisen, werden somit nicht zuverlässig erkannt (*Davison 2007a*). Die erstellte Genkarte von HVMA (Abbildung 3.3) ist somit eine Auswertung anhand des Vergleichs mit vorhandenen Daten.

Das Verfahren der NGS hat technische Limitierungen, die insbesondere bei der *de novo* Sequenzierung von Wiederholungseinheiten zu tragen kommen. Bei der NGS werden kurze Sequenzen bis ca. 100 nt generiert und anhand von überlappenden Bereichen zu einer längeren Sequenz zusammengesetzt. Umfasst die Wiederholungssequenz mehr Nukleotide als die NGS am Stück erstellt, kann es beim Zusammensetzen zu Fehlanordnungen kommen (*Treangen und Salzberg 2012*). Die Bereiche mit besonders hohem GC-Gehalt bzw. die Genomabschnitte, in denen die Wiederholungseinheiten zu finden sind, wurden deshalb zusätzlich mittels Sequenzierung nach Sanger analysiert. Mit diesem Verfahren konnten DNA-Abschnitte mit bis zu 900 nt erfolgreich sequenziert werden.

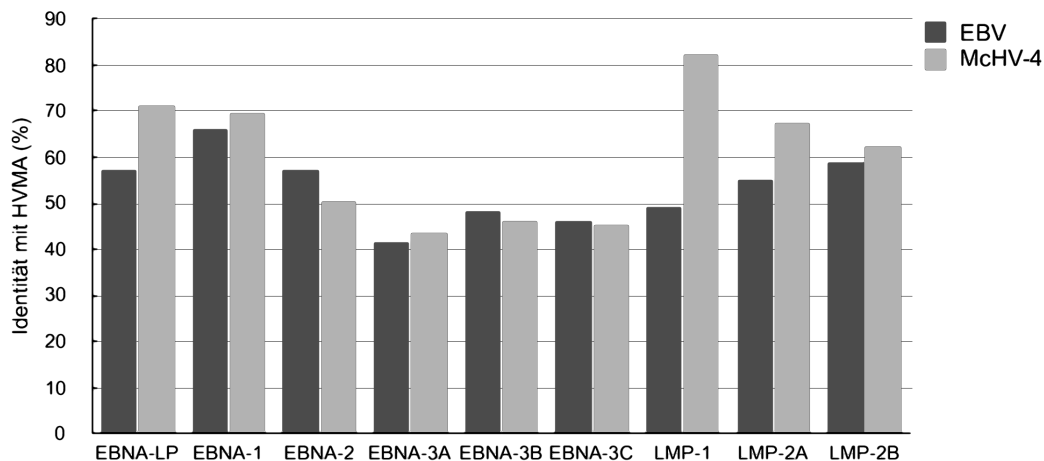
Anhand des Vorkommens und der Lokalisation der Wiederholungseinheiten im viralen Genom werden die Herpesviren in die Klassen A-F eingeteilt (*Davison 2007a*). Das HVMA lässt sich am ehesten der Klasse C zuordnen, in die auch das humane EBV gehört. Als Ausschlusskriterium für die Gruppenzugehörigkeit gilt das Fehlen der *Terminal repeats* an den Genomenden. Eine unvollständige Sequenzierung dieses Bereiches kann weitestgehend ausgeschlossen werden. Das Fragment 5P 65/66 überspannt den Bereich von Nukleotid 166.192 bis 1.833. Die im Agarosegel ermittelte Größe des Amplifikates entspricht hierbei der mittels Sanger-Methode sequenzierten Gesamtlänge.

Mit den vorhandenen Sequenzieretechniken war es nicht möglich, die Anzahl der *Repeats* der größten Wiederholungseinheit IR1 zu ermitteln. Eine Amplifikation des Bereiches zur Abschätzung der Größe mittels Agarosegelelektrophorese ist nicht gelungen. Anhand der Daten der NGS konnten 5 vollständige Wiederholungen antizipiert werden. Im Bereich der kleinen Wiederholungseinheit IR2 konnten ca. 1.350 bp nicht sequenziert werden. Somit ist, bei bekannter Gesamtgröße, unklar wie viele Wiederholungen des 122 bp Motivs vorkommen. Die angegebene Gesamtgenomgröße von 166.590 bp bei Virusvariante A ist somit nur eine Schätzung.



### 4.1.2 Latenzproteine

Die AS-Sequenzen der Latenzproteine des HVMA haben im Vergleich zum EBV eine Identität von weniger als 60 %. Der Vergleich der Latenzproteine des McHV-4 (Rivailler *et al.* 2002) und des Lymphokryptovirus *Macaca/pfe-lcl-E3* (Kamperschroer *et al.* 2016) mit EBV, hat für alle Latenzproteine ebenfalls eine Übereinstimmung von weniger als 60 % ergeben. Dennoch besteht beim McHV-4 eine funktionelle Analogie zu den EBV-Proteinen (Wang 2013). Somit ist für HVMA das Gleiche anzunehmen. Die Abbildung 4.1 zeigt die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der Latenzproteine von HVMA im Vergleich zu EBV und McHV-4.



**Abbildung 4.1.** Identität der Latenzproteine im Vergleich zu EBV und McHV-4

Gezeigt wird die prozentuale Übereinstimmung der Latenzproteine von HVMA zu EBV (Wildtyp, GenBank: NC\_007605) und dem McHV-4 (GenBank NC\_006146). Die Übereinstimmung der AS-Sequenzen zu EBV beträgt bei allen Produkten weniger als 60 %. Die höchste Übereinstimmung mit McHV-4 findet sich beim LMP-1 (82,4 %). Die höhere Übereinstimmung deckt sich mit den Ergebnissen der phylogenetischen Analyse, die zeigt, dass HVMA näher mit McHV-4 verwandt ist.

Eine mögliche Erklärung für die starke Varianz bei den Latenzproteinen ist die Adaptation der einzelnen Viren an ihre Wirtsspezies, gerade auch im Sinne der genomischen Integration und Immortalisierung der infizierten Zelle. Ein Teil der latenten Proteine interagiert mit zellulären Faktoren und vermittelt so die Transformation und Immunevasion der Zelle (Ning 2011). Somit ist eine strenge Anpassung an die Wirtszelle unabdingbar. Obwohl die Wirte des HVMA und des McHV-4 zur Gattung der Makaken gehören (Fleagle 2015, Lapin *et al.* 1985, Rivailler *et al.* 2002), ist es erstaunlich, dass sich diese Viren in diesem Punkt so grundlegend unterscheiden. Dies ist, neben der Phylogenetik, ein weiteres Kriterium dafür, dass es sich um zwei verschiedenen Virusspezies handelt und HVMA nicht nur eine Variante des McHV-4 darstellt. Bei den verwendeten AS-Sequenzen handelt es sich um hypothetische Proteine anhand der ermittelten offenen Leserahmen und dem Abgleich mit bekannten Proteinen. Eine funktionelle Proteinanalyse kann diese Hypothese verifizieren.

### 4.1.3 EBV-assoziierte Malignome und HVMA als *in vitro*-Modell

Das EBV verfügt über Genprodukte, die die Proliferation von B-Lymphozyten fördern und somit als potentielle onkogene Risikofaktoren angesehen werden. Zwar ist EBV mit malignen Erkrankungen assoziiert, jedoch persistiert das Virus *in vivo* nicht durch Immortalisierung der B-Zelle, sondern etabliert sich

mit dem *true latency*-Transkriptionsprogramm in der Gedächtniszelle (Thorley-Lawson 2005). Die Entartung der Zellen begründet sich also nicht allein durch die Infektion mit EBV, sondern bedarf auch noch einer Störung in der Biologie des Virus oder der Wirtszelle. Gleichzeitig bietet die Infektion die Möglichkeit eines therapeutischen Angriffspunkts, wie beispielsweise die Übertragung von EBV-spezifischen T-Lymphozyten (Tse und Kwong 2015). Insbesondere die Latenzproteine spielen bei der Onkogenese eine wichtige Rolle (Tempera und Lieberman 2014). In Malignomzellen konnten drei Expressionsmuster der Latenzproteine identifiziert werden, die den Latenztypen I-III entsprechen und für die jeweiligen Tumorentitäten charakteristisch sind (Thorley-Lawson 2005). Der Latenztyp korreliert hierbei mit der Immunkompetenz des Patienten. Erkrankungen vom Latenztyp III finden sich bei Immunkompromittierten, wie beispielsweise Patienten mit primärem Immundefekt oder assoziiert mit einer HIV-Infektion. Lymphoproliferativen Erkrankungen vom Latenztyp I oder II finden sich hingegen bei Immunkompetenten (Tse und Kwong 2015). Eine Übersicht wird in Tabelle 4.1 gezeigt.

**Tabelle 4.1:** Latenzstadien der EBV-assoziierten Malignome

Latenzstadium	exprimierte Gene	assoziierte Malignome
Latenz I	EBERs, EBNA-1	Magenkarzinom, Burkitt-Lymphom
Latenz II	EBERs, LMP-1, -2A, -2B, EBNA-1	Nasopharynxkarzinom, Morbus Hodgkin
Latenz III	EBERs, LMP-1, -2A, -2B, EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, EBNA-LP	<i>Post-transplant lymphoproliferative disorder</i> , Lymphome unter iatrogenen Immunsuppression, HIV-assoziierte Lymphome und Sarkome

HIV = Humanes Immunodefizienz Virus

zusammengestellt aus Thorley-Lawson und Gross 2004 und Tse und Kwong 2015

Für die Nutzung von HVMA als Modell ist demnach das Wissen um den Latenztyp von zentraler Bedeutung. Bei den beiden HVMA-infizierten Zelllinien MAL-1- und HTRL konnten zwei verschiedene Latenzformen nachgewiesen werden. Während die Zelllinie MAL-1 (Spezies *Macaca arctoides*) dem Latenztyp III entspricht, ist die Zelllinie HTRL (Spezies Kaninchen) eher dem Latenztyp II zuzuordnen (Krumbholz und Roempke et al. 2019). Ferner wurde *in vitro* bei Zellen, die ursprünglich aus Burkitt-Lymphomen (BL) isoliert wurden, beobachtet, dass in hohen Passagezahlen ein Wechsel des Latenztyp I hin zum Latenztyp III stattgefunden hat (Chen et al. 1995). Gegen eine mögliche Verwendung der HTRL-Zelle als Modell für das BL, spricht neben dem Fehlen der drei BL-typischen Translokationen im Karyogramm auch das Vorhandensein von T-Zell Markern (Krumbholz und Roempke et al. 2019).

#### 4.1.4 Wirtstropismus von EBV und HVMA

Die Rolle von EBV bei der Tumorgenese und seine Fähigkeit zur Manipulation des humanen Immunsystems, haben das Virus in den Fokus der Forschung gerückt. Für die Erforschung grundlegender Kenntnisse über die virale Pathogenese benötigt man ein stabiles *in vivo* Tiermodell. Da EBV ausschließlich humane Zellen infizieren kann, bemühte man sich um die Suche nach einem alternativen Tiermodell mit phylogenetisch eng verwandten Lymphokryptoviren. Diese konnten bislang nur bei Primaten, nicht aber bei Nagetieren nachgewiesen werden (Chatterjee et al. 2014). Das bei Wildmäusen vorkommende Murine Herpesvirus 4 (MuHV-4) zählt zu dem Genus der Rhadinoviren, ist das nächst verwandte

Nicht-Primatenvirus und in der Lage *Mus musculus* zu infizieren (Barton et al. 2011). Die Immunantwort der Tiere kann die Virusreplikation nur schwer kontrollieren und die Sterblichkeit ist sehr hoch. Das Reservoir von latent infizierten Zellen bilden vor allem Makrophagen, aber auch B-Lymphozyten und dendritische Zellen der Milz. Durch die Unterschiede von MuHV-4 zu EBV bezüglich des Zelltropismus, der Tumorgenese und der Immunantwort des Wirtes, ist dieses Infektionsmodell jedoch nur eingeschränkt geeignet (Barton et al. 2011, Chatterjee et al. 2014).

Mäuse mit einer homozygoten Mutation im *Severe combined immunodeficiency*-Gen (SCID-Gen) stellen eine Alternative dar. Diese Tiere sind nicht in der Lage B- oder T-Lymphozyten zu bilden und sind dadurch tolerant gegenüber spezie fremden Zellen. Somit ist die Transplantation von humanen Lymphozyten (Xenotransplantation) und eine Infektion mit EBV möglich. Im Folgenden kann das Auftreten von Lymphomen beobachtet und Lymphomzellen *in vitro* angezüchtet werden. Limitierungen dieses Tiermodells sind die Abwesenheit von humanen Epithelzellen sowie die eingeschränkte Differenzierung von naiven B-Zellen zu Gedächtnis- und Plasmazellen (Chatterjee et al. 2014).

Die Aufnahme von EBV in die Zielzelle wird vor allem durch zwei Proteine vermittelt: das gp350/220 (*BBLF1*), das den Komplement-Rezeptor 2 bindet und das an HLA Klasse II Moleküle bindende gp42 aus dem *BZLF2*-Leserahmen (Li et al. 1995, Borza und Hutt-Fletcher 2002). Da das EBV ausschließlich humane Zellen infizieren kann, liegt die Vermutung nahe, dass die beiden viralen Proteine nur humane Rezeptoren binden können. Gelingt es diese beiden Proteine zu modifizieren, wäre das EBV möglicherweise im Stande auch nicht-humane Zellen zu infizieren. Im Gegensatz zu EBV ist HVMA in der Lage seine Speziesbarriere zu überwinden und Kaninchenlymphozyten zu infizieren (Timanovskaia et al. 1988, Wutzler et al. 1995, Meerbach et al. 2004). Ersetzt man die EBV-Gene *BBLF1* bzw. *BZLF2* durch die des HVMA, wäre eine EBV-Infektion von nicht-humanen Zellen denkbar.

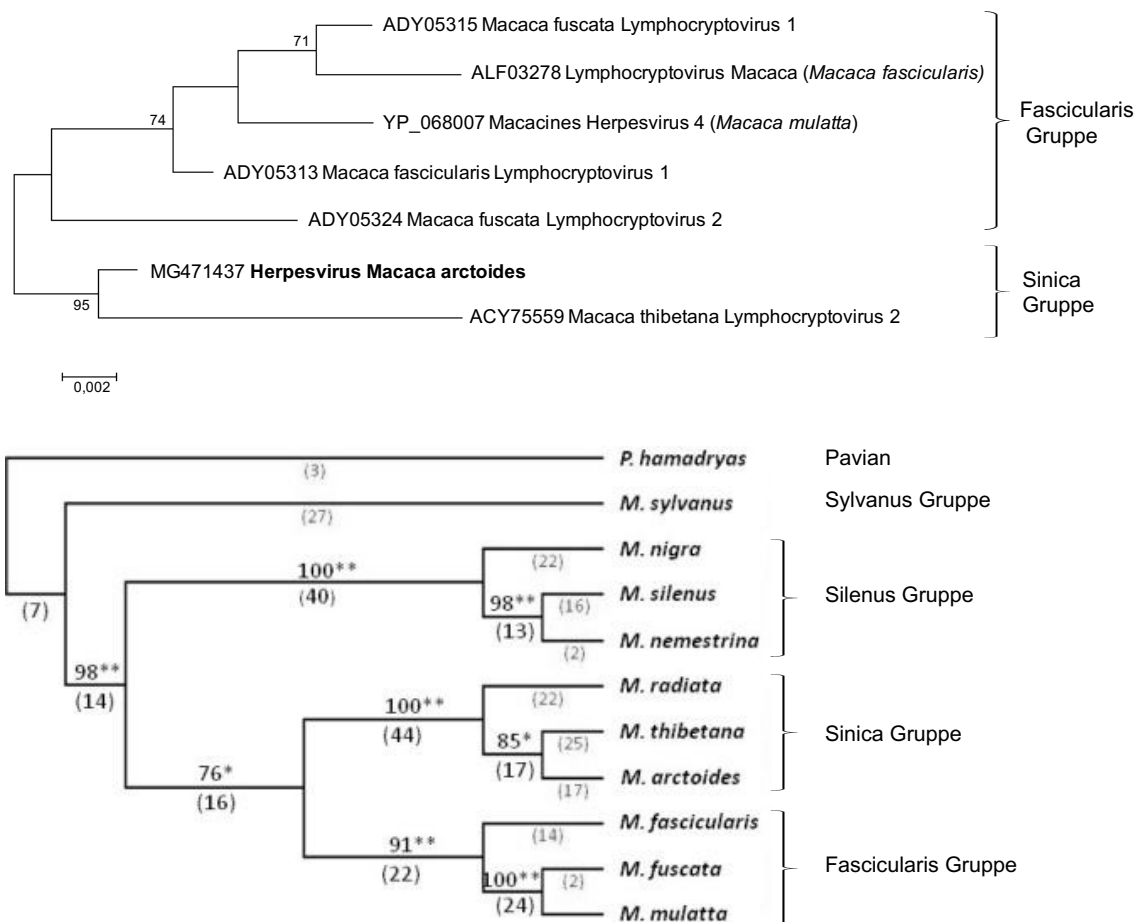
Die Infektion von humanen Nabelschnurlymphozyten mit HVMA war nicht möglich (Meerbach et al. 2004). Dennoch stellt sich die Frage, ob es sich bei diesen Lymphozyten um lymphozytäre Stammzellen oder naive B-Lymphozyten gehandelt hat. Eine Wiederholung des Infektionsversuches mit naiven B-Zellen könnte dieser Fragestellung nachgehen.

HVMA-Epitope reagieren mit Antikörpern gegen das EBV (Wutzler et al. 1995, Meerbach et al. 2004). Unter der Voraussetzung, dass Antikörper gegen HVMA-Proteine auch kreuzreaktiv auf EBV-Epitope reagieren, könnte man HVMA oder HVMA-EBV-Hybride als Impfstoff verwenden und somit die EBV-Infektion in frühen Lebensjahren verhindern. Dadurch könnte gerade in Regionen mit hoher Inzidenz von Burkitt-Lymphomen die Häufigkeit dieser Erkrankung gesenkt werden.

#### 4.1.5 Phylogenetische Untersuchungen

Das HVMA wurde aufgrund seiner biologischen Eigenschaften bereits zur Gruppe der Lymphokryptoviren gezählt (Lapin et al. 1985). Durch diese Arbeit konnte durch die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen die Zuordnung bestätigt werden. Die Bezeichnung Herpesvirus *Macaca arctoides* entspricht nicht der empfohlenen Nomenklatur des ICTV. Deshalb wird als offizielle Bezeichnung der Name *Macaca arctoides* Gammaherpesvirus 1 vorgeschlagen (Krumbholz und Roempke et al. 2019).

McGeoch *et al.* 2006 haben den Begriff der Co-Evolution verwendet, um das parallele Entwickeln der Viren mit ihren Wirtsspezies zu beschreiben. Demnach sollten sich die Verwandtschaftsverhältnisse der Wirte bei den dazugehörigen Viren finden. Li *et al.* 2009 haben basierend auf im Genom enthaltenen kurzen repetitiven Sequenzen (Alu-Sequenzen) einen Stammbaum der Familie der Makaken erstellt. Während *Macaca arctoides* und *Macaca thibetana* zur Sinica-Gruppe zählen, gehören die Spezies *Macaca mulatta*, *Macaca fuscata* und *Macaca fascicularis* der Fascicularis-Gruppe an. Diese Einteilung findet sich auch bei den Lymphokryptoviren (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2.** Stammbaum der Lymphokryptoviren der Affenspezies *Macaca*

**A:** Stammbaum der Lymphokryptoviren, ggf. zusätzliche Angabe der Wirtsspezies. Berechnung des Stammbaumes auf der Basis der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase analog zum Vorgehen in Abschnitt 2.7. **B:** Stammbaum der Makaken (*Macaca*, M.), Pavian: *Papio hamadryas*, *P. hamadryas*. Abbildung verändert nach Li *et al.* 2009.

## 4.2 Ort der Persistenz von HVMA in lymphoblastoiden Zelllinien

Für die Erforschung antiviraler Therapeutika sind Kenntnisse zum Ort der Persistenz eines Virus in der infizierten Zelle und der Status des viralen Replikationszyklus (latent oder lytisch) essentiell. Für HVMA war bislang nicht abschließend geklärt, wie und in welcher Form das Genom in der Wirtszelle vorliegt. Durch die Analyse der HVMA-infizierten Zelllinien MAL-1- und HTRL im *in situ*-Lysisgel nach Gardella (Gardella *et al.* 1984), Southern-Blot und anschließender Hybridisierung mittels spezifischen DIG-markierten Sonden, konnten durch die vorgelegte Arbeit erstmalig Ergebnisse erbracht wer-

den. Als Positivkontrolle diente die latent mit EBV-infizierte Zelllinie Raji. Bei dieser Zelllinie ist das Virus genomisch integriert und es liegen pro Zelle ca. 50 Kopien als extrachromosomale geschlossene zirkuläre DNA (Episom) im Kern vor (Yates und Guan 1991, Takakuwa et al. 2004). Die Koexistenz episodaler und chromosomal integrierter viraler DNA in verschiedenen EBV-positiven, lymphoblastoiden Zelllinien (einschließlich Raji) wurde durch Delecluse et al. 1993 mittels *in situ*-Lysisgel nach Gardella und FISH-Analyse von Chromosomenpräparationen untersucht. Delecluse et al. 1993 wiesen im *in situ*-Lysisgel nach Gardella nach der Hybridisierung mittels EBV-spezifischer Sonde ein Signal im Bereich der Probenaschen nach. Bei der Chromosomenanalyse mittels FISH-Technik konnte die Integration viraler DNA in verschiedene Chromosomen gezeigt werden.

Bei der durchgeführten Analyse konnte in allen virusinfizierten Zelllinien (MAL-1, HTRL und Raji) mit der  $\gamma$ -Herpesviren- und der ACTB-Sonde ein Signal im Bereich der Probenaschen detektiert werden. Der Nachweis viraler und genomischer DNA kann als Zeichen der genomischen Integration gewertet werden (Decker et al. 1996). Bei der Auswertung der ACTB-Hybridisierung zeigte sich für die Zelllinie HTRL kein Nachweis von genomischer DNA in der Probenasche, die genomische Integration konnte durch FISH-Analysen nachgewiesen werden (Krumbholz und Roempke et al. 2019). Vergleicht man die AS-Sequenz des ACTB des Menschen (GenBank: NP\_001092), *Macaca fascicularis* (GenBank: NP\_001271954, da für *Macaca arctoides* in der NCBI keine Daten vorlagen) und der Kaninchen (GenBank: NP\_001095153), zeigt sich eine AS-Identität von 99,7%. Vergleicht man die Nukleotidsequenz der sequenzierten ACTB-Sonde von *Macaca arctoides* mit dem entsprechenden Bereich der proteincodierenden Nukleotidsequenz des Kaninchens (NM\_001101683, mRNA nt 341–576) sieht man eine Übereinstimmung von 91,9%. Somit ist es erstaunlich, dass das Kaninchen-ACTB nicht zuverlässig detektiert werden kann. Die Spezieszugehörigkeit der Zelllinien MAL-1 und HTRL konnte durch das Vorhandensein der makaken- bzw. kaninchentypischen Karyotypen bestätigt werden (Krumbholz und Roempke et al. 2019).

Bei virusinfizierten Zellen unterscheidet man zwei Zelltypen. In den produktiv infizierten Zellen werden durch die Aktivierung des lytischen Replikationszyklus infektiöse Partikel hergestellt und freigesetzt, was den Zelltod zur Folge hat (Longnecker und Neipel 2007). Produktiv infizierte Zellen können über das Vorkommen einer linearen Virusbande im *in situ*-Lysisgel identifiziert werden (Gardella et al. 1984). Zellen, die nur latent mit Virus infiziert sind und die lebenslange Infektion des Wirtes sicherstellen, werden als nicht produktive bzw. abortiv infizierte Zellen bezeichnet (Adams 1979). Bei diesen Zellen kann im *in situ*-Lysisgel eine lineare Virusbande nicht nachgewiesen werden (Gardella et al. 1984). Die EBV-positive Zelllinie Raji ist nicht produktiv (Adams 1979). Durch die chemische Induktion mit TPA wurde der lytische Replikationszyklus induziert und durch das Vorhandensein der linearen Virusbande im *in situ*-Lysisgel gezeigt. Die beiden HVMA-positiven Zelllinien MAL-1 und HTRL wurden ebenfalls mit TPA versetzt und das Bandenmuster der induzierten mit denen der nicht-induzierten Zellen verglichen. Während bei der HTRL- und Raji-Zelllinie der Effekt des TPA durch den Nachweis einer linearen Virusbande zu erkennen ist, ist bei der MAL-1-Zelllinie kein Unterschied ersichtlich. Folglich handelt es sich bei der Raji- und HTRL-Zelllinie um nicht produktive Zellen, die nur latent mit dem Virus infiziert sind. Die MAL-1-Zelllinie befindet sich im lytischen Replikationszyklus und ist somit eine produktiv infizierte Zelllinie.

### 4.3 Bestimmung der Viruslast in Lymphozyten der Affenspezies

#### *Macaca arctoides*

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Zahl der HVMA-Kopien pro MAL-1-Zelle quantifiziert. Die in Tabelle 4.2 angegebenen Zielsequenzen wurden als repräsentative Abschnitte des viralen Genoms ausgewählt und mittels *Real-Time*-PCR quantifiziert.

**Tabelle 4.2:** qPCR: HVMA-Zielsequenzen

Oligonukleotide	Amplikonlänge	Genomposition [nt]	Leserahmen	Protein
HVMA [3a/4]	135 bp	30.750–30.884	EBNA-2	EBNA-2
HVMA [41a/42a]	105 bp	83.839–83.943	<i>BZLF1</i>	ZEBRA

Die durchschnittlich ermittelte Anzahl von 58,2 Viruskopien pro Zelle lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Verteilung innerhalb der Zelle zu. Die Anzahl der genomischen Integrationen variiert von Zelle zu Zelle (*Krumbholz und Roempke et al. 2019*). Die geringere Signalintensität der episomalen Bande der Zelllinie MAL-1 im Vergleich zur Raji-Zelllinie (50 Kopien/Zelle) im *in situ*-Lysisgel lässt darauf schließen, dass deutlich weniger Episomen pro Zelle vorliegen.

### 4.4 Ausblick

Für die weitere Beschreibung der Zelllinie HTRL ist die Bestimmung der Viruskopien pro infizierter Zelle interessant. Dazu könnten neben den bereits etablierten Standards noch ein bis zwei neue Zielsequenzen aus anderen Genomabschnitten ausgewählt werden. In diesem Rahmen wäre auch die Ermittlung der Anzahl der Episomen nach Separation mittels Dichtegradientenzentrifugation denkbar. Um die Effektivität möglicher antiviraler Substanzen zu untersuchen, könnte die in dieser Arbeit etablierte quantitative PCR ebenso Anwendung finden.

Die Einbringung des HVMA-Genoms in einen BAC-Vektor (*Bacterial Artificial Chromosome*) bietet die Möglichkeit, durch Rekombination einzelne HVMA-Gene auszuschalten, auszutauschen oder zu markieren. Damit könnte der enge Wirtstropismus von EBV umgangen und weitere *in vitro*- und *in vivo*-Modelle (z.B. Epithelzellen, Kleintiere) etabliert werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Herpesvirus *Macaca arctoides* (HVMA) hat die Fähigkeit bei Bärenmakaken (*Macaca arctoides*) und Kaninchen Lymphome auszulösen. Die transformierten Kaninchen-Lymphozyten können in Nacktmäuse übertragen werden, sind in der Lage in diesen Versuchstieren anzuwachsen (HVMA-transformed rabbit lymphocytes, HTRL) und sich zu Lymphomen zu entwickeln. Als enger Verwandter des humanen Epstein-Barr-Virus (EBV) konnten für HVMA ähnliche biologische Eigenschaften gezeigt werden. Da EBV nur humane Zellen infiziert, ergeben sich für dieses Gammaherpesvirus Schwierigkeiten bei der Etablierung eines Tiermodells. Diese Probleme lassen sich durch das für HVMA bereits bestehende Kleintiermodell umgehen. Somit können die Pathomechanismen von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen und sich daraus ergebende Therapieansätze besser erforscht werden. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Analyse der Genomorganisation des HVMA, die Bestimmung der zellassozierten Viruslast, die Form der Persistenz in den infizierten Zellen sowie die Analyse der virale Replikationsform.

Am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena konnte durch *Next-Generation-Sequenzier*technologie ca. 75 % des Genoms identifiziert werden. Die verbliebenen Lücken wurden durch spezifische Amplifikation der fehlenden Bereiche mit anschließender Sequenzierung nahezu vollständig geschlossen, so dass nun die Sequenz von 99 % des HVMA-Genoms vorliegt. Basierend auf den gewonnenen Sequenzinformationen konnten 93 offene Leserahmen und die Lage der Wiederholungseinheiten identifiziert werden. Die Aminosäuresequenzen der offenen Leserahmen wurden auf ihre Übereinstimmung zu EBV überprüft und die Nomenklatur der EBV-Gene übernommen.

Für die phylogenetische Einordnung von HVMA wurden zwei Analysen durchgeführt. Der erste Stammbaum beruhte auf der zusammengesetzten Nukleotidsequenz von 41 Kerngenen, die bei allen Herpesviren konserviert sind. Hier lagen zum Vergleich die Sequenzen von 21 Gammaherpesviren und je zwei Vertretern der Alpha- und Betaherpesviren vor. Die zweite Berechnung basierte auf der Aminosäuresequenz der DNA-Polymerase, zum Vergleich lagen die Sequenzen von 99 Gammaherpesviren und fünf Vertretern der Alpha- und Betaherpesviren vor. Beide Analysen zeigten, dass das HVMA zu den Lymphokryptoviren zu zählen ist und die nächste Verwandtschaftsbeziehung zu EBV und zu Viren von Altweltaffen besteht.

Für die Bestimmung der Anzahl der Viruskopien in einem transformierten Affenlymphozyt (*Macaca arctoides* Lymphozyt 1, MAL-1) wurde eine quantitative PCR etabliert. Die so ermittelte Viruslast beträgt ca. 58,2 Kopien/MAL-1.

Die HVMA-infizierten Zelllinien MAL-1 und HTRL wurden hinsichtlich der viralen Genomintegration und der Replikationsform mittels *in situ*-Lysisgel nach Gardella und anschließender Southern-Blot-Hybridisierung untersucht. Bei beiden Zelllinien liegt das Virus extrachromosomal als geschlossene zirkuläre DNA (Episom) vor und ist vermutlich ebenso in das Wirtsgenom integriert. In Hinblick auf die vorliegende Replikationsform unterscheiden sie sich jedoch. So befindet sich MAL-1 vermutlich im lytischen Replikationszyklus, während HTRL eher latent infiziert ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, A. (1979): The state of the virus genome in transformed cells and its relationship to host cell DNA. In: Epstein, M. A., Achong, B. G. (Hrsg.), *The Epstein-Barr Virus*, Kap. 8, S. 155–183, Springer Verlag, Berlin.
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfacon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Gorbalenya, A. E., Davison, A. J. (2016): Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*, 161(10), 2921–2949.
- Agrba, V. Z., Lapin, B. A., Medvedeva, N. M., Yakovleva, L. A. (2004): Immunophenotypical characteristics of permanent cultures of lymphoid cells from *Papio hamadryas* and *Macaca arctoides*. *Biull Eksp Biol Med*, 137(2), 190–194.
- Aswad, A., Katzourakis, A. (2014): The first endogenous herpesvirus, identified in the tarsier genome, and novel sequences from primate rhadinoviruses and lymphocryptoviruses. *PLoS Genet*, 10(6), e1004332.
- Aubry, V., Mure, F., Mariame, B., Deschamps, T., Wyrwicz, L. S., Manet, E., Gruffat, H. (2014): Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex. *J Virol*, 88(21), 12825–12838.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C. (1984): DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310(5974), 207–211.
- Barton, E., Mandal, P., Speck, S. H. (2011): Pathogenesis and host control of gammaherpesviruses: lessons from the mouse. *Annual Review Immunology*, 29, 351–397.
- Boecker, J. F., Tiedemann, K. H., Bornkamm, G. W., zur Hausen, H. (1980): Characterization of an EBV-like virus from African green monkey lymphoblasts. *Virology*, 101(1), 291–295.
- Borza, C. M., Hutt-Fletcher, L. M. (2002): Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 8(6), 594–599.
- Brown, T. A. (2002): Molecular Phylogenetics. In: Brown, T. A. (Hrsg.), *Genomes*, Kap. 16, S. 1–44, Garland Science, New York, 2 Aufl.
- Carbone, A., Gloghini, A., Dotti, G. (2008): EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *Oncologist*, 13(5), 577–585.
- Carville, A., Mansfield, K. G. (2008): Comparative pathobiology of macaque lymphocryptoviruses. *Comp Med*, 58(1), 57–67.



- Chatterjee, B., Leung, C. S., Munz, C. (2014): Animal models of Epstein Barr virus infection. *J Immunol Methods*, 410, 80–87.
- Chen, F., Zou, J. Z., di Renzo, L., Winberg, G., Hu, L. F., Klein, E., Klein, G., Ernberg, I. (1995): A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *J Virol*, 69(6), 3752–3758.
- Chiu, S.-H., Wu, M.-C., Wu, C.-C., Chen, Y.-C., Lin, S.-F., Hsu, J. T.-A., Yang, C.-S., Tsai, C.-H., Takada, K., Chen, M.-R., Chen, J.-Y. (2014): Epstein-Barr virus BALF3 has nuclease activity and mediates mature virion production during the lytic cycle. *J Virol*, 88(9), 4962–4975.
- Cho, Y., Ramer, J., Rivaller, P., Quink, C., Garber, R. L., Beier, D. R., Wang, F. (2001): An Epstein-Barr-related herpesvirus from marmoset lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(3), 1224–1229.
- Davies, A. H., Grand, R. J., Evans, F. J., Rickinson, A. B. (1991): Induction of Epstein-Barr virus lytic cycle by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters requires active protein kinase C. *J Virol*, 65(12), 6838–6844.
- Davison, A. J. (2007a): Comparative analysis of the genomes. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Hrsg.), *Human Herpesviruses - Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, Kap. 2, S. 1–34, Cambridge University Press, New York.
- Davison, A. J. (2007b): Overview of Classification. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Hrsg.), *Human Herpesviruses - Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, Kap. 1, S. 1–7, Cambridge University Press.
- Decker, L. L., Klamon, L. D., Thorley-Lawson, D. A. (1996): Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol*, 70(5), 3286–3289.
- Delecluse, H. J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., Bornkamm, G. W. (1993): Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol*, 67(3), 1292–1299.
- Dunkel, V. C., Pry, T. W., Henle, G., Henle, W. (1972): Immunofluorescence tests for antibodies to Epstein-Barr virus with sera of lower primates. *J Natl Cancer Inst*, 49(2), 435–440.
- Eckstein, P. (2014): *Repetitorium Statistik*, S. 110–111. Springer Gaber, Wiesbaden, 8 Aufl.
- Edgar, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32(5), 1792–1797.
- Ehlers, B., Dural, G., Yasmum, N., Lembo, T., de Thoisy, B., Ryser-Degiorgis, M.-P., Ulrich, R. G., McGeoch, D. J. (2008): Novel mammalian herpesviruses and lineages within the Gammaherpesvirinae: cospeciation and interspecies transfer. *J Virol*, 82(7), 3509–3516.
- Epstein, M. A. (2001): Reflections on Epstein-Barr virus: some recently resolved old uncertainties. *J Infect*, 43(2), 111–115.

- Epstein, M. A., Achong, B. G., Barr, Y. M. (1964): Virus Particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1(7335), 702–703.
- Fleagle, J. G. (2015): Old World Monkeys: Cercopithecines. In: Fleagle, J. G. (Hrsg.), *Primate Adaption and Evolution*, Kap. 6, S. 122–125, Elsevier, London, 3. Aufl.
- Fossum, E., Friedel, C. C., Rajagopala, S. V., Titz, B., Baiker, A., Schmidt, T., Kraus, T., Stellberger, T., Rutenberg, C., Suthram, S., Bandyopadhyay, S., Rose, D., von Brunn, A., Uhlmann, M., Zeretzke, C., Dong, Y.-A., Boulet, H., Koegl, M., Bailer, S. M., Koszinowski, U., Ideker, T., Uetz, P., Zimmer, R., Haas, J. (2009): Evolutionarily conserved herpesviral protein interaction networks. *PLoS Pathog*, 5(9), e1000570.
- Gardella, T., Medveczky, P., Sairenji, T., Mulder, C. (1984): Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *J Virol*, 50(1), 248–254.
- Gottschalk, S., Rooney, C. M., Heslop, H. E. (2005): Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med*, 56, 29–44.
- Gruffat, H., Kadjouf, F., Mariame, B., Manet, E. (2012): The Epstein-Barr virus BcRF1 gene product is a TBP-like protein with an essential role in late gene expression. *J Virol*, 86(11), 6023–6032.
- Hashmi, A. A., Hussain, Z. F., Hashmi, K. A., Zafar, M. I., Edhi, M. M., Faridi, N., Khan, M. (2017): Latent membrane protein 1 (LMP1) expression in Hodgkin lymphoma and its correlation with clinical and histologic parameters. *World J Surg Oncol*, 15:89.
- Henle, G., Henle, W. (1965): Evidence for a Persistent Viral Infection in a Cell Line Derived from Burkitt's Lymphoma. *J Bacteriol*, 89(1), 252–258.
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., Henle, G. (1967): Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science*, 157(3792), 1064–1065.
- Hillis, D. M., Bull, J. J. (1993): An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Syst Biol*, 42(2), 182–192.
- International Agency for Research on Cancer (2012): Biological Agents: Epstein-Barr Virus. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100B, 49–80.
- Kakubava, V. V., Agrba, V. Z., Timanovskaia, V. V., Brzhikhachek, B. (1990a): [Analysis of B-lymphotropic oncogenic herpesvirus of *Macaca arctoides*]. *Eksp Onkol*, 12(6), 44–46.
- Kakubava, V. V., Lapin, B. A., Timanovskaia, V. V., Agrba, V. Z., Novozhilov, S. V., Semenova, S. V. (1990b): [Comparative analysis of genomes of oncogenic B-lymphotropic herpesviruses reproducing in cell lines obtained from different monkey species]. *Biull Eksp Biol Med*, 110(12), 643–645.
- Kamperschroer, C., Gosink, M. M., Kumpf, S. W., O'Donnell, L. M., Tartaro, K. R. (2016): The genomic sequence of lymphocryptovirus from cynomolgus macaque. *Virology*, 488, 28–36.

- Klein, G., Giovanella, B., Westman, A., Stehlin, J. S., Mumford, D. (1974): An EBV-genome-negative cell line established from an American Burkitt lymphoma; receptor characteristics. EBV infectibility and permanent conversion into EBV-positive sublines by in vitro infection. *Intervirology*, 5(6), 319–334.
- Krumbholz, A., Roempke, J., Liehr, T., Groth, M., Meerbach, A., Schacke, M., Maschkowitz, G., Fickenscher, H., Klapper, W., Sauerbrei, A., Wutzler, P., Zell, R. (2019): *Macaca arctoides* gammaherpesvirus 1 (strain herpesvirus *Macaca arctoides*): virus sequence, phylogeny and characterisation of virus-transformed macaque and rabbit cell lines. *Med Microbiol Immunol*, 208, 109–129.
- Landon, J. C., Ellis, L. B., Zeve, V. H., Fabrizio, D. P. (1968): Herpes-type virus in cultured leukocytes from chimpanzees. *J Natl Cancer Inst*, 40(1), 181–192.
- Lapin, B. A., Timanovskaya, V. V., Yakovleva, L. A. (1985): Herpesvirus HVMA: A new representative in the group of the EBV-like B-lymphotropic herpesviruses of primates. *Haematol Blood Transfus*, 29, 312–313.
- Le, S. Q., Gascuel, O. (2008): An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol*, 25(7), 1307–1320.
- Lestou, V. S., De Braekeleer, M., Strehl, S., Ott, G., Gadner, H., Ambros, P. F. (1993): Non-random integration of Epstein-Barr virus in lymphoblastoid cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*, 8(1), 38–48.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., Masucci, M. G. (1995): Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, 375(6533), 685–688.
- Li, J., Han, K., Xing, J., Kim, H.-S., Rogers, J., Ryder, O. A., Disotell, T., Yue, B., Batzer, M. A. (2009): Phylogeny of the macaques (Cercopithecidae: *Macaca*) based on Alu elements. *Gene*, 448(2), 242–249.
- Li, Q., Turk, S. M., Hutt-Fletcher, L. M. (1995): The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *J Virol*, 69(7), 3987–3994.
- Lin, X., Chen, S., Xue, X., Lu, L., Zhu, S., Li, W., Chen, X., Zhong, X., Jiang, P., Senname, T. S., Zheng, Y., Zhang, L. (2016): Chimerically fused antigen rich of overlapped epitopes from latent membrane protein 2 (LMP2) of Epstein-Barr virus as a potential vaccine and diagnostic agent. *Cell Mol Immunol*, 13(4), 492–501.
- Longnecker, R., Neipel, F. (2007): Introduction to the human  $\gamma$ -herpesviruses. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Hrsg.), *Human Herpesviruses - Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, Kap. 22, S. 1–35, Cambridge University Press, New York.
- McGeoch, D. J., Rixon, F. J., Davison, A. J. (2006): Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res*, 117(1), 90–104.
- Meerbach, A., Friedrichs, C., Thust, R., Wutzler, P. (2004): Transformation of rabbit lymphocytes by an Epstein-Barr virus-related herpesvirus from *Macaca arctoides*. *Arch Virol*, 149(6), 1083–1094.

- Middeldorp, J. M., Pegtel, D. M. (2008): Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape. *Semin Cancer Biol*, 18(6), 388–396.
- Mocarski, E. (2007): Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Hrsg.), *Human Herpesviruses - Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, Kap. 4, S. 1–33, Cambridge University Press, New York.
- Moghaddam, A., Rosenzweig, M., Lee-Parritz, D., Annis, B., Johnson, R. P., Wang, F. (1997): An animal model for acute and persistent Epstein-Barr virus infection. *Science*, 276(5321), 2030–2033.
- Nei, M., Kumar, S. (2000): *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Niedobitek, G., Meru, N., Delecluse, H. J. (2001): Epstein-Barr virus infection and human malignancies. *Int J Exp Pathol*, 82(3), 149–170.
- Ning, S. (2011): Innate immune modulation in EBV infection. *Herpesviridae*, 2:1.
- Page, E. K., Courtney, C. L., Sharma, P., Cheeseman, J., Jenkins, J. B., Strobert, E., Knechtle, S. J. (2013): Post-transplant lymphoproliferative disorder associated with immunosuppressive therapy for renal transplantation in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Exp Toxicol Pathol*, 65(7-8), 1019–1024.
- Pulvertaft, R. J. V. (1964): Cytology of Burkitt's Tumor (African Lymphoma). *Lancet*, 1(7327), 238–240.
- Rangan, S. R., Martin, L. N., Bozelka, B. E., Wang, N., Gormus, B. J. (1986): Epstein-Barr virus-related herpesvirus from a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) with malignant lymphoma. *Int J Cancer*, 38(3), 425–432.
- Rickinson, A. B., Kieff, E. (2007): Epstein-Barr virus. In: Fields, B., Knipe, D., Howley, P., Griffin, D. (Hrsg.), *Fields virology ed.*, Bd. II, Kap. 68, S. 2603–2700, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, 5. Aufl.
- Rivailler, P., Jiang, H., Cho, Y.-G., Quink, C., Wang, F. (2002): Complete nucleotide sequence of the rhesus lymphocryptovirus: genetic validation for an Epstein-Barr virus animal model. *J Virol*, 76(1), 421–426.
- Roizman, B., Baines, J. (1991): The diversity and unity of Herpesviridae. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 14(2), 63–79.
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., Rapp, F., Sheldrick, P., Takahashi, M., Wolf, K. (1981): Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 16(4), 201–217.
- Samanta, M., Iwakiri, D., Takada, K. (2008): Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene*, 27(30), 4150–4160.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2001): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 3. Aufl.

- Sample, J. T., Marendy, E. M., Hughes, D. J., Sample, C. E. (2009): The Epstein-Barr virus genome. In: Damania, B., Pipas, J. M. (Hrsg.), DNA Tumor Viruses, Kap. 11, S. 241–258, Springer Science+Business Media, New York.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98(3), 503–517.
- Takacova, M., Holotnakova, T., Vondracek, J., Machala, M., Pencikova, K., Gradin, K., Poellinger, L., Pastorek, J., Pastorekova, S., Kopacek, J. (2009): Role of aryl hydrocarbon receptor in modulation of the expression of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Biochem J*, 419(2), 419–425.
- Takakuwa, T., Luo, W.-J., Ham, M. F., Sakane-Ishikawa, F., Wada, N., Aozasa, K. (2004): Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *Am J Pathol*, 164(3), 967–974.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30(12), 2725–2729.
- Tempera, I., Lieberman, P. M. (2014): Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, 26, 22–29.
- Thompson, M. P., Kurzrock, R. (2004): Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res*, 10(3), 803–821.
- Thorley-Lawson, D. A. (2005): EBV the prototypical human tumor virus - just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol*, 116(2), 251–261.
- Thorley-Lawson, D. A., Allday, M. J. (2008): The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol*, 6(12), 913–924.
- Thorley-Lawson, D. A., Gross, A. (2004): Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med*, 350(13), 1328–1337.
- Timanovskaia, V. V., Voevodin, A. F., Iakovleva, L. A., Markarian, D. S., Ivanov, M. T. (1988): [Malignant lymphoma in rabbits induced by the administration of herpes virus-containing material from brown macaques]. *Eksp Onkol*, 10(3), 47–51.
- Treangen, T. J., Salzberg, S. L. (2012): Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat Rev Genet*, 13(1), 36–46.
- Tse, E., Kwong, Y.-L. (2015): Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp Mol Med*, 47, e136.
- Wang, F. (2013): Nonhuman primate models for Epstein-Barr virus infection. *Curr Opin Virol*, 3(3), 233–237.
- Wussow, F. (2009): Seamless Manipulation of the Varicella-Zoster Virus Genome via Bacterial Artificial Chromosome Engineering. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

- Wutzler, P., Meerbach, A., Farber, I., Wolf, H., K, S. (1995): Malignant lymphomas induced by an Epstein-Barr virus-related herpesvirus from *Macaca arctoides* - a rabbit model. *Arch Virol*, 140(11), 1979–1995.
- Wysokenski, D. A., Yates, J. L. (1989): Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 63(6), 2657–2666.
- Yates, J. L., Guan, N. (1991): Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol*, 65(1), 483–488.
- Young, L. S., Arrand, J., Murray, P. (2007): EBV gene expression and regulation. In: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P. S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Hrsg.), *Human Herpesviruses - Biology, Therapy and Immunoprophylaxis*, Kap. 27, S. 1–66, Cambridge University Press, New York.
- Young, L. S., Rickinson, A. B. (2004): Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 757–768.
- Zhao, S., Fernald, R. D. (2005): Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol*, 12(8), 1047–1064.
- Zimmermann, J., Hammerschmidt, W. (1995): Structure and role of the terminal repeats of Epstein-Barr virus in processing and packaging of virion DNA. *J Virol*, 69(5), 3147–3155.

## 7 Anhang

**Tabelle 7.1:** qPCR: Ermittlung der Viruskopien pro MAL-1-Zelle, Einzelmesswerte  
 Einzelmesswerte der Viruskopien entsprechend der eingesetzten Zellzahl (Kopien/Zellzahl) für jeden PCR-Lauf mit den angegebenen HVMA-spezifischen Oli-  
 gonukleotiden. Bestimmung des arithmetischen Mittelwerts pro Zellzahl. Als Material dienten drei DNA-Präparationen aus MAL-1-Zellen mit unterschiedlicher  
 Ausgangszellzahl (I, II, III aus  $5 \times 10^6$  Zellen, IV, V, VI aus  $1 \times 10^6$  Zellen und VII, VIII, IX aus  $1 \times 10^5$  Zellen).

Zielsequenz	Zellzahl	PCR-Lauf									Mittelwert		
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX			
HVMA [3a/4]	100.000	3,774E+06	3,851E+05	2,432E+06									3,352E+06
	10.000	7,710E+05	8,400E+05	4,817E+05	2,124E+05	1,775E+05	3,390E+05						4,703E+05
	1.000	1,067E+05	1,056E+05	7,870E+04	1,870E+04	2,279E+04	3,131E+04	3,687E+04	5,085E+04	6,610E+04			5,751E+04
	100	1,267E+04	1,333E+04	1,099E+04	3,434E+03	4,797E+03	4,501E+03	4,447E+03	5,410E+03	6,020E+03	7,287E+03		
	10	1,603E+03	1,523E+03	9,195E+02	4,164E+02	4,118E+02	6,900E+02	6,680E+02	9,630E+02	8,505E+02	8,938E+02		
	1	1,460E+02	1,969E+02	<5,215E+01	<8,455E+01	<8,455E+01	<8,455E+01	<1,500E+02	<1,500E+02	<1,500E+02	<1,500E+02		
HVMA [41a/42a]	100.000	3,625E+06	2,350E+06	3,104E+06									3,026E+06
	10.000	8,400E+05	8,650E+05	9,230E+05	3,988E+05	4,543E+05	4,318E+05						6,521E+05
	1.000	8,700E+04	9,815E+04	1,056E+05	5,060E+04	5,570E+04	5,185E+04	9,150E+04	7,340E+04	7,195E+04	7,619E+04		
	100	8,675E+03	9,205E+03	1,016E+04	5,150E+03	4,713E+03	5,235E+03	7,715E+03	9,040E+03	5,920E+03	7,313E+03		
	10	8,220E+02	1,024E+03	9,440E+02	5,310E+02	8,160E+02	6,375E+02	4,753E+02	3,393E+01	3,928E+01	6,646E+02		
	1	5,300E+01	9,135E+01	9,410E+01	1,618E+01	2,340E+01	<1,618E+01	<1,196E01	<1,196E01	4,724E+01	6,182E+01		

**Tabelle 7.2:** Leserahmenbezeichnung der Kerngene der Herpesviren

Zu jedem Virus wurde die Genbank-Nummer (*Accession number*) und die hinterlegte Bezeichnung des jeweiligen Leserahmens in der NCBI-Datenbank angegeben. Bei fehlender Angabe war der Leserahmen nicht definiert. Tabelle in veränderter Form durch *Krumholz und Roempke et al. 2019* veröffentlicht.

Abfolge	AIHV-1	AIHV-2	AHV-3	BoHV-4	BoHV-6	CaHV-3	CMV	CrHV-2	EBV	EHV-2
1.	NC_002531.1	NC_024382.1	NC_001987.1	NC_002665.1	NC_024303.1	NC_004367.1	NC_006273.2	NC_015049.1	NC_007605.1	NC_001650.2
	gp67	ORF 69	gp67	gp69	ORF 69	gp67	UL53	ORF 69	BFLF2	ORF 69
2.	gp66	ORF 68	gp66	gp68	ORF 68	gp66	UL52	ORF 68	BFLF1	ORF 68
3.	gp65	ORF 67A	gp65	gp67	ORF 67A		UL51	ORF 67A	BFRF1A	ORF 67A
4.	gp64	ORF 67	gp64	gp66	ORF 67	gp65	UL50	ORF 67	BFRF1	ORF 67
5.	gp62	ORF 65	gp62	gp64	ORF 65	gp63	UL48A		BFRF3	ORF 65
6.	gp61	ORF 64	gp61	gp63	ORF 64	gp62	UL48	ORF 64	BPLF1	ORF 64
7.	gp60	ORF 63	gp60	gp62	ORF 63	gp61	UL47	ORF 63	BOLF1	ORF 63
8.	gp59	ORF 62	gp59	gp61	ORF 62	gp60	UL46	ORF 62	BORF1	ORF 62
9.	gp58	ORF 61	gp58	gp60	ORF 61	gp59	UL45	ORF 61	BORF2	ORF 61
10.	gp56	ORF 59	gp56	gp58	ORF 59	gp57	UL44	ORF 59	BMRF1	ORF 59
11.	gp54	ORF 57		gp56	ORF 57		UL69	ORF 57	BSLF2/BMLF1	ORF 57
12.	gp53	ORF 56	gp53	gp55	ORF 56	gp54	UL70	ORF 56	BSLF1	ORF 56
13.	gp52	ORF 55	gp52	gp54	ORF 55	gp53	UL71	ORF 55	BSRF1	ORF 55
14.	gp51	ORF 54	gp51	gp53	ORF 54	gp52	UL72	ORF 54	BLLF3	ORF 54
15.	gp50	ORF 53	gp50	gp52	ORF 53	gp51	UL73	ORF 53	BLRF1	ORF 53
16.	gp43	ORF 47	gp44	gp46	ORF 47	gp41	UL115	ORF 47	BKRF2	ORF 47
17.	gp42	ORF 46	gp43	gp45	ORF 46	gp40	UL114	ORF 46	BKRF3	ORF 46
18.	gp40	ORF 44	gp41	gp43	ORF 44	gp38	UL105	ORF 44	BBLF4	ORF 44
19.	gp39	ORF 43	gp40	gp42	ORF 43	gp37	UL104	ORF 43	BBRF1	ORF 43
20.	gp38	ORF 42	gp39	gp41	ORF 42	gp36	UL103	ORF 42	BBRF2	ORF 42
21.	gp36/37	ORF 40/41	gp37/38	gp39/40	ORF 40/41	gp34/gp35	UL102	ORF 40	BBLF2/BBLF3	ORF 40
22.	gp35	ORF 39	gp36	gp38	ORF 39	gp33	UL100	ORF 39	BBRF3	ORF 39
23.	gp34	ORF 38	gp35	gp37	ORF 38	gp32	UL99	ORF 38	BBLF1	ORF 38



Tabelle 7.2: Leserahmenbezeichnung der Kerngene der Herpesviren *Fortsetzung*

Abfolge	AIHV-1	AIHV-2	AtHV-3	BoHV-4	BoHV-6	CalHV-3	CMV	CrHV-2	EBV	EHV-2
24.	gp33	ORF 37	gp34	gp36	ORF 37	gp31	UL98	ORF 37	BGLF5	ORF 37
25.	gp32	ORF 36	gp33	gp35	ORF 36	gp30	UL97	ORF 36	BGLF4	ORF 36
26.	gp31	ORF 34	gp31	gp33	ORF 34	gp28	UL95	ORF 34	BGLF3	ORF 34
27.	gp25	ORF 29	gp24	gp28	ORF 29		UL89	ORF 29	BGRF1/BDRF1	ORF 29
28.	gp29	ORF 33	gp29	gp32	ORF 33	gp26	UL94	ORF 33	BGLF2	ORF 33
29.	gp28	ORF 32	gp28	gp31	ORF 32	gp25	UL93	ORF 32	BGLF1	ORF 32
30.	gp23	ORF 26	gp21	gp25	ORF 26	gp21	UL85	ORF 26	BDLF1	ORF 26
31.	gp22	ORF 25	gp20	gp24	ORF 25	gp20	UL86	ORF 25	BcLF1	ORF 25
32.	gp20	ORF 23	gp18	gp22	ORF 23	gp18	UL88	ORF 23	BTRF1	ORF 23
33.	gp19	ORF 22	gp17	gp21	ORF 22	gp17	UL75	ORF 22	BXLF2	ORF 22
34.	gp17	ORF 20	gp15	gp19	ORF 20	gp15	UL76	ORF 20	BXRF1	ORF 20
35.	gp16	ORF 19	gp14	gp18	ORF 19	gp14	UL77	ORF 19	BVRF1	ORF 19
36.	gp14	ORF 17	gp12	gp16	ORF 17	gp12	UL80	ORF 17	BVRF2	ORF 17
37.					ORF 17.5		UL80.5	ORF 17.5	BdRF1	ORF 17.5
38.	gp10	ORF 9	gp7	gp8	ORF 9	gp7	UL54	ORF 9	BALF5	ORF 9
39.	gp09	ORF 8	gp6	gp7	ORF 8	gp6	UL55	ORF 8	BALF4	ORF 8
40.	gp08	ORF 7	gp5	gp6	ORF 7	gp5	UL56	ORF 7	BALF3	ORF 7
41.	gp07	ORF 6	gp4	gp5	ORF 6	gp4	UL57	ORF 6	BALF2	ORF 6

AIHV-1 = Alcelaphines Herpesvirus 1; AIHV-2 = Alcelaphines Herpesvirus 2; AtHV-3 = Atelines Herpesvirus 3; BoHV-4 = Bovines Herpesvirus 4; BoHV-6 = Bovines Herpesvirus 6; CalHV-3 = Callitrichines Herpesvirus 3; CMV = Humanes Cytomegalovirus; CrHV-2 = Cricetides Herpesvirus 2; EBV = Epstein-Barr Virus; EHV-2 = Equides Herpesvirus 2

Tabelle 7.2: Leserahmenbezeichnung der Kerngene der Herpesviren: Fortsetzung

Abfolge	EHV-5	HHV-6A	HHV-8	HSV-1	HVMA	McHV-4	MfusRHV	MmulRHV	MnemRHV-2	MuHV-4
1.	NC_026421.1	NC_001664.2	NC_009333.1	NC_001806.2	MG471437	NC_006146.1	AY528864.1	AF083501.3	KP265674.1	NC_001826.2
2.	ORF 69	U37	ORF 69	UL31	BFLF2	BFLF2	JM143	74	ORF 69	ORF 69
3.	ORF 68	U36	ORF 68	UL32	BFLF1	BFLF1	JM140	73	ORF 68	ORF 68
4.	ORF 67A	U35	ORF 67A	UL33	BFRF1A	BFRF1			ORF 67.5	
5.	ORF 67	U34	ORF 67	UL34	BFRF1	BFRF1	JM137	72	ORF 67	ORF 67
6.	ORF 65	U32	ORF 65	UL35	BFRF3	BFRF3	JM133	70	ORF 65	
7.	ORF 64	U31	ORF 64	UL36	BPLF1	BPLF1	JM124	69	ORF 64	ORF 64
8.	ORF 63	U30	ORF 63	UL37	BOLF1	BOLF1	JM123	68	ORF 63	ORF 63
9.	ORF 62	U29	ORF 62	UL38	BORF1	BORF1	JM122	67	ORF 62	ORF 62
10.	ORF 61	U28	ORF 61	UL39	BORF2	BORF2	JM119	66	ORF 61	ORF 61
11.	ORF 59	U27	ORF 59	UL42	BMRF1	BMRF1	JM116	64	ORF 59	ORF 59
12.	ORF 57	U42	ORF 57	UL54	BSLF2/BMLF1		JM97	54	ORF 57	ORF 57
13.	ORF 56	U43	ORF 56	UL52	BSLF1	BSLF1	JM94	53	ORF 56	ORF 56
14.	ORF 55	U44	ORF 55	UL51	BSRF1	BSRF1	JM93	52	ORF 55	ORF 55
15.	ORF 54	U45	ORF 54	UL50	BLLF3	BLLF3	JM91	51	ORF 54	ORF 54
16.	ORF 53	U46	ORF 53	UL49A	BLRF1	BLRF1	JM90	50	ORF 53	ORF 53
17.	ORF 47	U82	ORF 47	UL1	BKRF2	BKRF2	JM78	45	ORF 47	ORF 47
18.	ORF 46	U81	ORF 46	UL2	BKRF3	BKRF3	JM77	44	ORF 46	ORF 46
19.	ORF 44	U77	ORF 44	UL5	BBLF4	BBLF4	JM73	42	ORF 44	ORF 44
20.	ORF 43	U76	ORF 43	UL6	BBRF1	BBRF1	JM72	41	ORF 43	ORF 43
21.	ORF 42	U75	ORF 42	UL7	BBRF2	BBRF2	JM70	40	ORF 42	ORF 42
22.	ORF 40	U74	ORF 40	UL8	BBLF2/BBLF3		JM68	38/39	ORF 40	ORF 40
23.	ORF 39	U72	ORF 39	UL10	BBRF3	BBRF3	JM66	37	ORF 39	ORF 39
24.	ORF 38	U71	ORF 38	UL11	BBLF1	BBLF1		36	ORF 38	ORF 38
25.	ORF 37	U70	ORF 37	UL12	BGLF5	BGLF5	JM65	35	ORF 37	ORF 37

Tabelle 7.2: Leserahmenbezeichnung der Kerngene der Herpesviren: Fortsetzung

Abfolge	EHV-5	HHV-6A	HHV-8	HSV-1	HVMA	McHV-4	MfusRHV	MmulRHV	MnemRHV-2	MuHV-4
25.	ORF 36	U69	ORF 36	UL13	BGLF4	BGLF4	JM64	34	ORF 36	ORF 36
26.	ORF 34	U67	ORF 34	UL14	BGLF3	BGLF3	JM61	32	ORF 34	ORF 34
27.	ORF 29	U66	ORF 29	UL15	BGRF1/BDRF1		JM59/52	31/26	ORF 29	ORF 29a/29b
28.	ORF 33	U65	ORF 33	UL16	BGLF2	BGLF2	JM56	30	ORF 33	ORF 33
29.	ORF 32	U64	ORF 32	UL17	BGLF1	BGLF1	JM55	29	ORF 32	ORF 32
30.	ORF 26	U56	ORF 26	UL18	BDLF1	BDLF1	JM49	23	ORF 26	ORF 26
31.	ORF 25	U57	ORF 25	UL19	BcLF1	BcLF1	JM45	22	ORF 25	ORF 25
32.	ORF 23	U59	ORF 23	UL21	BTRF1	BTRF1	JM42	20	ORF 23	ORF 23
33.	ORF 22	U48	ORF 22	UL22	BXLF2	BXLF2	JM38	19	ORF 22	ORF 22
34.	ORF 20	U49	ORF 20	UL24	BXRF1	BXRF1	JM33	17	ORF 20	ORF 20
35.	ORF 19	U50	ORF 19	UL25	BVRF1	BVRF1	JM32	16	ORF 19	ORF 19
36.	ORF 17	U53	ORF 17	UL26	BVRF2	BVRF2	JM29	14	ORF 17	ORF 17
37.	ORF 17.5	U53.5	ORF 17.5	UL26.5	BdRF1				ORF 17.5	
38.	ORF 9	U38	ORF 9	UL30	BALF5	BALF5	JM14	7	ORF 9	ORF 9
39.	ORF 8	U39	ORF 8	UL27	BALF4	BALF4	JM12	6	ORF 8	ORF 8
40.	ORF 7	U40	ORF 7	UL28	BALF3	BALF3	JM10	5	ORF 7	ORF 7
41.	ORF 6	U41	ORF 6	UL29	BALF2	BALF2	JM5	4	ORF 6	ORF 6

EHV-5 = Equides Herpesvirus 5; HHV-6A = Humanes Herpesvirus 6A; HHV-8 = Humanes Herpesvirus 8; HSV-1 = Herpes-simplex-Virus 1; HVMA = Herpesvirus *Macaca arctoides*; McHV-4 = Macacines Herpesvirus 4; MfusRHV = *Macaca fasciata* Rhadinovirus; MmulRHV = *Macaca mulatta* Rhadinovirus; MnemRHV-2 = *Macaca nemestrina* Rhadinovirus 2; MuHV-4 = Murides Herpesvirus 4

Tabelle 7.2: Leserahmenbezeichnung der Kerngene der Herpesviren: Fortsetzung

Abfolge	OvHV-2	pfe-1d-E3	RFHV	SaHV-2	VZV	WMHV
	NC_007646.1	KP676001.1	KF703446.1	NC_001350.1	NC_001348.1	GQ169129.1
1.	ORF 69	BFLF2	ORF 69	gp70	ORF 27	ORF 69
2.	ORF 68	BFLF1	ORF 68	gp69	ORF 26	ORF 68
3.	ORF 67A	nt 30.079 – 30.480	ORF 67A		ORF 25	ORF 67A
4.	ORF 67	BFRF1	ORF 67	gp68	ORF 24	ORF 67
5.	ORF 65	BFRF3	ORF 65	gp66	ORF 23	ORF 65
6.	ORF 64	BPLF1	ORF 64	gp65	ORF 22	ORF 64
7.	ORF 63	BOLF1	ORF 63	gp64	ORF 21	ORF 63
8.	ORF 62	BORF1	ORF 62	gp63	ORF 20	ORF 62
9.	ORF 61	BORF2	ORF 61	gp62	ORF 19	ORF 61
10.	ORF 59	BMRF1	ORF 59	gp60	ORF 16	ORF 59
11.	ORF 57	nt 54.252 – 55.711 & nt 55.814 – 55.877	ORF 57	gp58	ORF 4	ORF 57
12.	ORF 56	BSLF1	ORF 56	gp57	ORF 6	ORF 56
13.	ORF 55	BSRF1	ORF 55	gp56	ORF 7	ORF 55
14.	ORF 54	BLLF3	ORF 54	gp55	ORF 8	ORF 54
15.	ORF 53	BLRF1	ORF 53	gp54	ORF 9A	ORF 53
16.	ORF 47	BKRF2	ORF 47	gp48	ORF 60	ORF 47
17.	ORF 46	BKRF3	ORF 46	gp47	ORF 59	ORF 46
18.	ORF 44	BBLF4	ORF 44	gp45	ORF 55	ORF 44
19.	ORF 43	BBRF1	ORF 43	gp44	ORF 54	ORF 43
20.	ORF 42	BBRF2	ORF 42	gp43	ORF 53	ORF 42
21.	ORF 40	BBLF2/BBLF3	ORF 40	gp41/42	ORF 52	ORF 40
22.	ORF 39	BBRF3	ORF 39	gp40	ORF 50	ORF 39
23.	ORF 38	BBLF1	ORF 38	gp39	ORF 49	ORF 38
24.	ORF 37	BGLF5	ORF 37	gp38	ORF 48	ORF 37

Tabelle 7.2: Leserahmenbezeichnung der Kerngene der Herpesviren: Fortsetzung

Abfolge	OvHV-2	pfe-lcl-E3	RFHV	SaHV-2	VZV	WMHV
25.	ORF 36	BGLF4	ORF 36	gp37	ORF 47	ORF 36
26.	ORF 34	BGLF3	ORF 34	gp35	ORF 46	ORF 34
27.	ORF 29	nt 96.213 – 97.148 & nt 100.523 – 101.659	ORF 29	gp30	ORF 42 (45)	ORF 29
28.	ORF 33	BGLF2	ORF 33	gp34	ORF 44	ORF 33
29.	ORF 32	BGLF1	ORF 32	gp33	ORF 43	ORF 32
30.	ORF 26	BDLF1	ORF 26	gp27	ORF 41	ORF 26
31.	ORF 25	BcLF1	ORF 25	gp26	ORF 40	ORF 25
32.	ORF 23	BTRF1	ORF 23	gp24	ORF 38	ORF 23
33.		BXLF1				
34.	ORF 20	BXRF1	ORF 20	gp21	ORF 35	ORF 20
35.	ORF 19	BVRF1	ORF 19	gp20	ORF 34	ORF 19
36.	ORF 17	BVRF2	ORF 17	gp18	ORF 33	ORF 17 (nt 29.131 – 30.765 )
37.	ORF 17.5	nt 120.155 – 121.195	ORF 17.5		ORF 33.5	ORF 17 (nt 29.131 – 30.000)
38.	ORF 9	BALF5	ORF 9	gp10	ORF 28	ORF 9
39.	ORF 8	BALF4	ORF 8	gp9	ORF 31	ORF 8
40.	ORF 7	BALF3	ORF 7	gp8	ORF 30	ORF 7
41.	ORF 6	BALF2	ORF 6	gp7	ORF 29	ORF 6

OvHV-2 = Ovines Herpesvirus 2; pfe-lcl-E3 = *Macaca fascicularis* Lymphokryptovirus; RFHV = Retroperitoneal-Fibromatose-assoziiertes

Herpesvirus; SaHV-2 = Herpesvirus saimiri 2; VZV = Varicella-Zoster-Virus; WMHV = Waldmauserherpesvirus

ORF = *Open Reading Frame*, offener Leserahmen;

# Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. med. Helmut Fickenscher, der mir die Möglichkeit gab am Institut für Infektionsmedizin an meiner Promotion zu arbeiten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Andi Krumbholz für die enge und gute wissenschaftliche Betreuung. Danke, dass du an dieses Projekt und meine Fähigkeiten geglaubt hast.

Prof. Dr. Roland Zell vom Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikum Jena danke ich für die Hilfestellung und Beratung bei der Genomanalyse und das Korrekturlesen der ersten Fassung.

Allen Laborkollegen der virologischen Forschung danke ich für die Unterstützung und das nette Arbeitsklima. Ines, du hattest immer ein offenes Ohr für mich und meine Probleme. Auch wenn wir eigentlich nie verstanden haben was die Andere da eigentlich macht. Für die technische Hilfe und Anregung zur Verfassung dieser Arbeit mittels LaTeX danke ich Gregor. Du hast mir Denkanstöße geliefert und warst eine große Hilfe zur Überwindung der anfänglichen Schreibblockade.

Ein besonderer Dank gilt Niklas, der mich durch alle Höhen und Tiefen meines Studiums begleitet hat. Danke Moritz, ohne dich würde ich noch immer pipettieren.

Der Weg vom ersten Eintrag in das Laborbuch bis zur Abgabe der fertigen Dissertation ist lang. Während dieser Zeit braucht man Menschen, die einem Hilfestellung bei praktischen und organisatorischen Fragen geben, ihr Wissen teilen, konstruktive Kritik üben und auch Trost und Zuversicht spenden können. Diese Menschen habe ich während dieser Zeit gefunden und alle haben auf ihre Weise zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Möglichste getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe