

Biológia Doktori Iskola, Immunológia Doktori Program  
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar  
Doktori Iskola- és Program vezetője: Prof. Erdei Anna

**Látens Epstein-Barr vírus genomok szabályozó  
régióinak epigenetikai jellemzése limfoid és  
nazofaringeális karcinóma sejtekben**

Doktori értekezés

Készítette: Vargáné Koroknai Anita

Kutatómunka: Országos Epidemiológiai Központ,  
Mikrobiológiai Kutatócsoport  
Témavezető: Dr. Minárovits János, M.D., Ph.D., az MTA doktora,  
a kutatócsoport vezetője

2009



# TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS .....	4
FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK .....	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	6
1.1. Az Epstein-Barr vírus jellemzése .....	6
1.1.1. A látens EBV fertőzés típusai .....	8
1.1.2. A látens EBV fertőzés során expresszáldó vírusgének és promótereik .....	10
1.1.3. A “Locus control” régió .....	14
1.2. Epigenetikai szabályozás .....	14
1.2.1. DNS metiláció .....	15
1.2.2. A DNS metiláció szerepe az EBV gének expressziójának szabályozásában .....	19
1.2.3. Hiszton modifikációk .....	21
1.2.3.1. A hiszton acetiláció .....	23
1.2.3.2. A hiszton metiláció .....	24
1.2.4. A hiszton modifikációk szerepe az EBV látens szabályozó régióinak működésében .....	25
2. CÉLKITŰZÉSEK .....	27
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	29
3.1. A vizsgálatokhoz felhasznált sejtvonalak, sejtenyésztés .....	29
3.2. DNáz I hiperszenzitivitási analízis .....	31
3.2.1. Nukleusz izolálás, DNáz I kezelés .....	31
3.2.2. Jelölő PCR reakció .....	32
3.2.3. Southern blot .....	33
3.3. DNS tisztítás .....	35
3.4. RNS tisztítás .....	36
3.5. RT-PCR .....	36
3.6. Real-time PCR .....	37
3.7. Kromatin Immunprecipitáció (ChIP) .....	40
3.8. Trichostatin A kezelés .....	44
3.9. Agaróz gélelektroforézis .....	45
4. EREDMÉNYEK .....	46
4.1. A DNáz I hiperszenzitivitási analízis eredménye .....	46

4.2. A látens EBV promóterek aktivitásának vizsgálata .....	50
4.3. A Trichostatin A kezelés hatása a C-promóter aktivitásra és az LMP2A expresszióra .....	52
4.4. A hiszton modifikációk kvantitatív analízise .....	53
5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE .....	62
6. ÖSSZEFOGLALÁS .....	68
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS .....	71
IRODALOMJEGYZÉK .....	72
MAGYAR ÉS ANGOL NYELVŰ RÖVID ÖSSZEFOGLALÓ .....	93
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	95

## BEVEZETÉS

A sejtek felépítését és működését elsősorban a bennük található gének kifejeződése határozza meg. Egy többsejtű élőlény minden sejtje (bizonyos immunsejtek és örökítő sejtek kivételével) azonos genetikai állománnyal rendelkezik, mégis a különböző génexpressziós mintázatok eltérő fenotípusok, funkciók kialakulására adnak lehetőséget. Jó példa erre a beteg szervezet egészséges és tumoros sejtjei, melyek gyakran főleg génexpressziós mintázatukban különböznek egymástól. Az eltérő expressziós mintázatok kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok megismerése tehát fontos részét képezi mind a fejlődésgenetikai-, mind a rákkutatásoknak.

A génexpresszió szabályozásának talán legfontosabb módja a gén transzkripciójának szabályozása, ami a genom poszttranszkripció módosulása, ill. a fehérje-DNS kölcsönhatások révén valósulhat meg. E szabályozásban központi szerepet játszik a dinamikus kromatinstruktúra, hiszen a kromatin felnyílásának és visszarendeződésének precíz koordinálása biztosítja a genetikai információ megfelelő helyen és időben történő hasznosítását (epigenetikai szabályozás). E szabályozás leglényegesebb elemei a DNS metiláció és a DNS-hez kapcsolódó hiszton fehérjék oldalláncainak modifikációi. A transzkripció aktivitás irányításában ezeknek a mechanizmusoknak bonyolult rendszere vesz részt, amelyek megismeréséhez az Epstein-Barr vírus jó modellrendszer, mivel 172 kbp hosszú genomja a látens fertőzés során episzómális, kromoszómaszerű formában van jelen a gazdasejtben, és a kromoszómális DNS-hez hasonlóan sejtciklusonként csak egyszer replikálódik. Mindemellett az EBV különböző látencia-típusait reprezentáló sejtvonalakban megfigyelhető eltérő promóterhasználat és génexpressziós mintázat optimális kísérleti rendszerként használható a kromatinstruktúra és a különböző hiszton modifikációk vizsgálatához.

Mivel az EBV összefüggésbe hozható számos emberi kórkép patogenezisével is, a differenciált génkifejeződéshez szükséges mechanizmusok megismerése mellett a kapott eredmények közvetlenül is elősegíthetik egy fontos humán patogén vírus működésének jobb megértését.

## FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK

5mC	5-metil-citozin
BL	Burkitt limfóma
ChIP	Kromatin Immunprecipitáció
Cl	klón
Cp	C-promóter
CpG	5'-citozin-guanin-3'
DNMT	DNS-(5-citozin)- <i>de novo</i> metiltranszferáz
DS	„dyad symmetry”
DTT	ditiotreitól
EBER	EBV által kódolt RNS
EBNA	EBV nukleáris antigén
EBV	Epstein-Barr vírus
FCS	„fetal calf serum”
FR	„family of repeats”
H3Kx	H3-as hiszton x. lizinje
HAT	Hiszton-acetiltranszferáz
HD	Hodgkin-kór
HDAC	Hiszton-deacetiláz
HS	Hiperszenzitív hely
LCL	Limfoblasztoid sejtvonal
LMP	látens membrán fehérje
LMP2Ap	látens membrán fehérje 2A-promóter
LMP1p	látens membrán fehérje 1-promóter
LRS	LMP-promóter szabályozó régió
LSD1	lizin specifikus demetiláz 1
MeCP	5mC-kötő fehérje
MI	Mononukleózis Infekcióza
NPC	Nazofaringeális karcinóma
oriP	látens replikációs origó
PCR	Polimeráz láncreakció
PTLD	„posttransplant lymphoproliferative disease”
Qp	Q-promóter
SDS	Na-dodecil-szulfát
TIC	totál input kromatin
Wp	W-promóter

# 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. Az Epstein-Barr vírus jellemzése

Az Epstein-Barr vírus (EBV; humán herpeszvírus 4) a *Herpesviridae* víruscsalád *Gammaherpesvirinae* alcsaládjának *Lymphocryptovirus* genusába tartozik. A vírus kettősszálú DNS genomja mintegy 172 kbp-t tartalmaz, melynek teljes szekvenciája ismert (Baer és mtsai, 1984).

Az Epstein-Barr vírus története 1958-ban kezdődött, amikor Denis Burkitt először írta le azt a később róla elnevezett limfómát, mely az Afrika egyenlítői részén endémikusan előforduló gyermekkori daganatos megbetegedések legnagyobb hányadáért volt felelős (Burkitt, 1958). 1964-ben Epstein volt az, aki a Burkitt limfóma (BL) kórokozóját azonosítva Herpeszvírus-szerű részecskéket fedezett fel BL-ből alapított sejtvonalak elektronmikroszkópos vizsgálata során (Epstein és mtsai, 1964).

Az endémikus BL 96%-ban EBV fertőzéshez kapcsolódik, míg a BL sporadikus változatában sokkal alacsonyabb ez az arány. Ami mindegyik BL-ban közös, az a 8-as kromoszómán helyet foglaló c-myc gén transzlokációja valamelyik immunoglobulin gén lókuszára (2p11-12, 14q32, 22q11). Ennek következményeképp az osztódó B sejtek képtelenek kilépni a folyamatos sejtosztódást fenntartó programból, és így állandóan aktív, osztódó fenotípust mutatnak, továbbá megfigyelhető a HLA-I antigének, bizonyos adhéziós molekulák, illetve EBV-fehérjék expressziójának gátlása is. A c-myc transzlokációja bár szükséges, de nem elégséges feltétele a BL kialakulásának. A transzlokáció következtében kialakuló c-myc „overexpresszió” ugyanis nemcsak proliferációt segítő hatása van, hanem érzékenyebbé is teszi a sejteket az apoptózissal szemben. Ezt a hatást viszont az EBV fertőzött sejtek anti-apoptotikus hatást biztosító emelt szintű bcl-2 és IL-10 expresszióval kompenzálni tudják, és ezen kívül mindig expresszálják az EBV által kódolt kis RNS-eket (EBER), melyek szintén erőteljes anti-apoptotikus tulajdonsággal rendelkeznek (Cherney és mtsai, 1994; Kitagawa és mtsai, 2000). Az EBV pozitivitáson kívül a BL kialakulásában szerepük lehet pl. az apoptózis kiváltásában fontos jelátviteli utak valamelyik génjét érintő mutációknak. Ilyen a BL-k nagy részében megfigyelt p53 tumor szupresszor gén mutációja. A limfóma sejtekre

jellemző továbbá, hogy immunreakciót nem váltanak ki, mert a BL fenotípusú sejtvonalakban az immunogén EBV-fehérjéket kódoló gének expressziója gátolt. Az egyedül kimutatható EBNA1 fehérje proteolitikus lebontását, valamint antigénként való, MHC-I-en történő bemutatását pedig akadályozzák a rajta található hosszú Gly-Ala ismétlődések (Klein, 1995; Levitskaya és mtsai, 1995).

A vírus a BL-n kívül daganatos megbetegedések széles spektrumával hozható összefüggésbe (Rickinson és Kieff, 1996; Baumforth és mtsai, 1999; Middeldorp és mtsai, 2002), így a Hodgkin kórral (HD), immunszuppresszált betegek limfoproliferatív megbetegedéseivel (X kromoszómához kötött limfoproliferatív szindróma (XLP); transzplantációt követően fellépő PTLN, vagy AIDS betegekben kialakuló limfoproliferatív kórképek), ill. a T/NK sejt limfómák nagy részével, közülük is kiemelve a 100%-os EBV szeropozitivitást mutató Lethal Midline Granulomát. Az EBV nemcsak limfómák, hanem epitéliális eredetű rákos elfajulások kialakulásáért is felelős lehet. Ezek közül a legfontosabb a nazofaringeális karcinóma (NPC), mely Délkelet-Ázsia egyes részeire jellemző daganatos megbetegedés, de ugyanígy kimutatható EBV gyomorrák vagy nyálmirigyrák sejtekből is (Shibata és Weiss, 1992; Osato és Imai, 1996), és egyes szerzők szerint a máj- és mellrák patogenezisében is szerepet játszhat (Hermann és Niedobitek, 2003; Glaser és mtsai, 2004). Az EBV mindemellett nemcsak a malignus transzformációk, ezáltal a tumoros megbetegedések, hanem kimutathatóan autoimmun betegségek (szklerózis multiplex, szisztémás lupusz eritematózusz, reumatoid artritisz) kialakulásának rizikófaktora is lehet (Niller és mtsai, 2008).

Az EBV-vel való fertőződés orális kontaktus révén, illetve szexuális úton történhet, és elsősorban B limfocitákat és bizonyos típusú hámsejteket érint. A fertőződés a CR2/CD21 sejt felszíni molekula és a gp350/220 virális glikoproteid kapcsolódása révén valósul meg. Az emberi populáció több mint 90 %-a felnőtt koráig átesik az EBV fertőzésen. A gyermekkori fertőzések általában tünetmentesek, míg a serdülő- és felnőttkori fertőzést gyakran fej- és torokfájás, láz, komolyabb esetekben Mononukleózis Infekcióza (MI) kíséri. A vírusgenomról átíródó látens proteinek a fertőzött B sejtek poliklonális expanzióját idézik elő. Ezeket a transzformált B blasztokat a gazdaszervezet gyorsan eliminálja a vírus lítikus ciklusában átíródó proteinek, ill. az EBV nukleáris antigének (EBNA3A, -3B, -3C) ellen irányuló T sejt immunválasszal. Ez a gyors és erőteljes T sejt aktiváció képezi az alapját az MI-nak. A primer fertőzés akut fázisa spontán befejeződik, és ezt követően a vírus a hosszú életű memória B sejtekben élethosszig perzisztál, miközben mind látens, mind lítikus

formában képes szaporodni. Bár vírusprodukción az egészséges emberek 20%-ában kimutatható, ezek a későbbi reaktivációk már nem okoznak tüneteket. Mivel a látens fertőzött memória B sejtekben a vírus megközelítőleg 80 promótere inaktív, és csak néhány nem immunogén virális fehérje termelődik, ezek a fertőzött sejtek az immunrendszer számára láthatatlanok maradnak. Így a vírus képes elmenekülni a CTL-mediálta immunválasz elől, és az élethosszig tartó perzisztencia fenntartható (Middeldorp és mtsai, 2002).

### 1.1.1. A látens EBV fertőzés típusai

Az EBV fertőzés során a sejtbe jutó lineáris vírusgenom az esetek többségében a „terminális repeateknél” (TR) fogva cirkularizálódik, és a továbbiakban episzómális formában perzisztál, de leírtak már kromoszómális DNS-be integrálódott EBV genomot tartalmazó sejt vonalakat is (Hurley és mtsai, 1991; Ohshima és mtsai, 1998). Az episzóma fenntartásáért a látencia során állandóan termelődő virális nukleáris antigén, az EBNA1 felelős. A sejtek osztódásakor a virális DNS is megkettőződik az *oriP*, azaz a látens replikációs origó segítségével, és a leánysejtekbe vándorol. A vírus ehhez a kromoszómaszerű osztódásához a sejt DNS replikációs apparátusát használja.

Látens EBV fertőzés során a vírus majdnem 100 génje közül mindössze a hat EBV nukleáris antigén (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP), a három látens membrán protein (LMP1, -2A, -2B), az EBER RNS-ek, illetve a *BamHI* A régió RNS-ei expresszáldhatnak különböző kombinációkban. A látens formában megfigyelhető génexpressziós mintázatok és az ennek háttérében álló eltérő promóter használat alapján a látens EBV fertőzés három alaptípusát szokták megkülönböztetni (1. ábra).

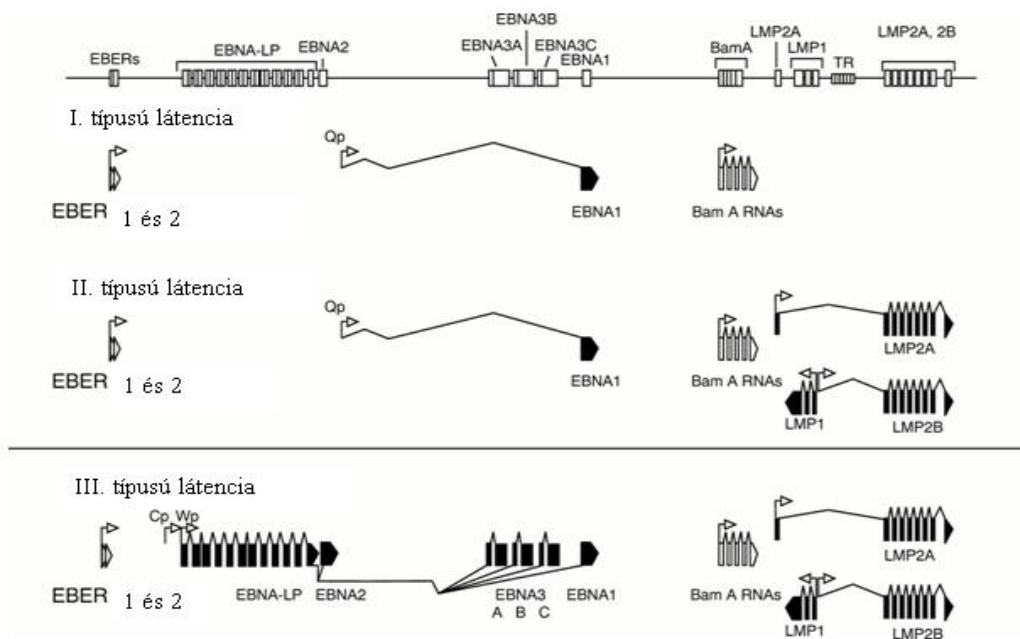
Az **I. típusú látencia** során a Q-promótert (Qp) használva az EBV nukleáris antigénjei közül csak az EBNA1 transzkriptum íródik át, a C-promóter (Cp), illetve W-promóter (Wp) nem működik. Szintén inaktívak a látens membrán proteinek expressziójáért felelős szabályozó régiók, vagyis az LMP-promóter szabályozó régió (LRS) és az LMP2A-promóter (LMP2Ap), aminek következtében az LMP-eket kódoló RNS-ek sem íródnak át. Ez a látencia-típus jellemző a friss BL biopsziákra, illetve az ezekből alapított stabil I. látencia-típusú BL sejt vonalakra.

A **II. típusú látencia** esetén (az I. látencia-típushoz hasonlóan) a Qp-t használva a nukleáris antigének közül csak az EBNA1 transzkriptum íródik át. Ezen felül azonban



ebben a látencia-típusban a megfelelő promoterről különböző mértékben egy vagy több LMP (LMP1 és/vagy LMP2A és/vagy LMP2B) transzkriptum is expresszálódik. II. típusú látencia figyelhető meg NPC, HD és EBV pozitív T/NK sejt limfómák esetén.

A **III. típusú látencia** során a megfelelő promoterekről valamennyi LMP, valamint a W (általában a fertőzés korai stádiumában) vagy a C- promoterről átíródva mind a hat EBNA transzkriptum expresszálódik. III. típusú látencia figyelhető meg a perifériás vérből izolált limfociták *in vitro* fertőzésével, vagy MI-betegek, illetve tünetmentes vírushordozók perifériás vér limfocitáinak megfelelő körülmények között való tenyésztésével létrehozott ún. limfoblasztoid sejtvonalakban (LCL), a III. típusú BL sejtvonalakban, a MI-ban szenvedők fertőzött mononukleáris sejtjeiben, a tünetmentes vírushordozók éretlen tonsilláris B sejtjeiben és általában az immunkárosodott egyének limfoproliferatív megbetegedései esetén.



**1. ábra:** Az EBV fertőzés három látencia alaptípusa.

Felül a lineáris vírusgenom elhelyezkedő látens EBV gének exonjai vannak feltüntetve. Alul a három látencia alaptípus során expresszálódó RNS-ek láthatók. Az egyes promoterek elhelyezkedését és az átírási irányt hegyes zászlók jelzik. Az egyes transzkriptumok exonjait teli (fehérjét kódoló RNS-ek) vagy üres (fehérjét nem kódoló RNS-ek) hasábok és nyilak szimbolizálják. Az alternatív splicing során kivágódó RNS részeket vékony vonalak jelölik. (Young és mtsai, 2000)

Fontos megjegyezni, hogy az EBER1 és EBER2 RNS-ek, valamint a *BamHI* A régió RNS-ei látencia-típustól függetlenül mindig expresszálódnak.

Az előbbieken ismertetett kategóriák nem kizárólagosak, a valóságban közöttük léteznek átmenetek, melyek gyakran csak az egyes gének expressziójának mértékében különböznek (Klein, 1995; Rickinson és Kieff, 1996; Young és mtsai, 2000).

### **1.1.2. A látens EBV fertőzés során expresszálódó vírusgének és promótereik**

A látens EBV fertőzés során kifejeződő vírusgének termékeinek legfontosabb funkciója egyrészt a gazdasejt folyamatos proliferációjának, illetve túlélésének biztosítása, másrészt a vírusfertőzés fenntartása a proliferáló gazdasejtben a különböző jelátviteli és transzkripcionális útvonalak szabályozásával.

Az **EBNA1** fehérje elsősorban az EBV replikációjának és transzkripciójának a szabályozásában, illetve a virális episzóma sejtekben való megtartásában vesz részt. Transzkripciója a fertőzés fázisának és a látencia típusának függvényében négy különböző promóterről történhet. A primer fertőzés kezdeti szakaszában az átíródás a Wp-ről történik, majd a sejt transzformálását követő promóter váltás következtében a transzkripció ezután már a Cp-ről megy végbe. A primer átírat eredménye egy policisztronos transzkript, mely az EBNA1-en kívül a többi EBV nukleáris antigén szekvenciáját is tartalmazza (Woisetschlager és mtsai, 1990). I-es és II-es típusú látencia esetén, ahol az EBNA1 az egyedüli expresszálódó EBNA, az átírás a metilált, s ezért inaktívvá vált Wp és Cp helyett a Qp-ről megy végbe (Tsai és mtsai, 1995; Schaefer és mtsai, 1997). A lítikus ciklusba való belépéskor viszont egy negyedik promóter, az Fp aktiválódik (Schaefer és mtsai, 1995a), melyről az EBNA1 a gazdasejt típusától és aktivációs állapotától függően különböző mértékben íródik át (Zettenberg és mtsai, 1999). Az EBNA1 fehérje valamennyi funkciója elsősorban a fehérje erős, szekvencia-specifikus DNS-kötő tulajdonságának köszönhető. Nagy affinitású EBNA1 kötőhelyek találhatók például a látens replikációs origót (*oriP*) alkotó “family of repeats” (FR) és “dyad symmetry” (DS) szekvenciákon, ezért feltételezik, hogy az EBNA1 jelentős szerepet játszik a vírusgenom replikációjának szabályozásában. Az EBNA1 fehérje elsődleges feladata, hogy a replikálódott episzómakat a mitózisok során a kondenzált kromoszómákhoz rögzítse és így megakadályozza az episzóma sejtosztódás során történő elvesztését (Marechal és mtsai, 1999). Az EBNA1 fehérje

negatív autoregulációval szabályozni képes saját expresszióját, mivel az *oriP* nagy affinitású EBNA1 kötőhelyeinek telítését követően a Q<sub>p</sub> alacsony affinitású helyeihez kapcsolódva gátolja a promóter működését (Davenport és mtsai, 1999).

Az **EBNA2** az első EBV protein, mely a vírusgenom sejtmagba való bejutását követően a W<sub>p</sub> és C<sub>p</sub> promóterekről expresszálódik. A Notch fehérje funkcionális homológjaként képes celluláris gének: a CD23 és CD21 B sejt aktivációs markerek (Cordier és mtsai, 1990), proto-onkogének: *c-myc* (Kaiser és mtsai, 1999), *c-fgr* (Knutson és mtsai, 1990) és az EBV virális génjeinek: LMP1 (Wang és mtsai, 1991), LMP2 (Tsang és mtsai, 1991) és a C<sub>p</sub>-ről átíródó EBNA 1-6 (Sung és mtsai, 1991) transzaktiválására is. Az EBNA2 a DNS-hez nem közvetlenül, hanem a CBF1 (C-promoter-kötő faktor 1), illetve a PU.1 („PU (purine rich) box binding protein 1”) celluláris DNS-kötő fehérjéken keresztül kapcsolódik (Ling és mtsai, 1993; Waltzer és mtsai, 1994). Fontos funkciója még, hogy az EBNA-LP-vel együtt indukálja a sejtek G<sub>0</sub> – G<sub>1</sub> fázisba való átmenetét (Sinclair és mtsai, 1994).

Az EBNA3 fehérjék (**EBNA3A**, **-3B**, **-3C**) az immortalizált sejtek elleni citotoxikus T sejt válasz fő célpontjai (Rickinson és Kieff, 1996). Valamennyi EBNA3 fehérje képes kötődni a CBF1 fehérjéhez és módosítani (az esetek többségében gátolni) az EBNA2 transzaktivációs hatását (Waltzer és mtsai, 1996; Robertson és mtsai, 1996a), de csak az EBNA3A és EBNA3C nélkülözhetetlen a B sejtek transzformálásához (Tomkinson és mtsai, 1993).

Az EBNA „leader” protein (**EBNA-LP**, EBNA5) az EBNA2-vel egy időben expresszálódik a W<sub>p</sub>-ről a frissen fertőzött B sejtekben. Mivel fokozza az EBNA2 transzaktivációs hatását (Harada és Kieff, 1997; Nitsche és mtsai, 1997), ill. képes kötődni a pRb retinoblasztóma fehérjéhez, ill. a p53 tumor szuppresszor fehérjéhez (Szekely és mtsai, 1993), szerepet játszhat a B sejtek immortalizációjában.

A látens membrán proteinek (**LMP-k**) olyan membránba ágyazott fehérjék, amelyek a nyirokszervekben található csíráközpontokban állandóan aktív receptor molekulák hatásával azonos hatást gyakorolnak a B sejtekre. Az LMP2A működése befolyásolja a B sejt receptor, az LMP1-é pedig a CD40 jelátviteli útját, tehát ezeknek a fehérjéknek az expressziója elősegíti, hogy a sejtek antigén vagy helper T sejt kapcsolódása nélkül túléljenek. Így azok a sejtek, melyek normális körülmények között aktivációs jel hiányában elpusztulnának a szelekciós lépések során, az EBV által termelt LMP-k közvetítette aktivációs jel hatására megmenekülhetnek az apoptózis elől.

Az **LMP1** fehérje hat transzmembrán doménből, valamint egy rövid N-terminális és egy hosszú C-terminális citoplazmatikus szakaszból áll (Kieff, 1996; Liebowitz és mtsai, 1986). B sejtekben az LMP1 a *bcl-2* indukcióján keresztül gátolja az apoptózist, továbbá képes utánozni a CD40 – CD40 ligand közvetítette NF $\kappa$ B szignál transzdukciós útvonalat. A CD40 molekulához, illetve a tumor nekrozis faktor (TNF) receptor család más tagjaihoz hasonlóan az aggregált LMP1 fehérjék C-terminális citoplazmatikus doménjeihez TNF receptor asszociált faktorok (TRAF), illetve TNF receptor asszociált „death” domének (TRADD) kapcsolódnak, amelyeken keresztül az LMP1 aktiválni képes az NF $\kappa$ B-t (Izumi és Kieff, 1997; Kaye és mtsai, 1993). Az LMP1 fehérje C-terminális részén keresztül ugyanakkor más jelátviteli utakat is képes aktiválni (Gires és mtsai, 1999). Az LMP1 transzkriptum a pozitív DNS szárlól (vagyis a pozitív szálon 3'-5' irányban) íródik át. A transzkriptum átírása vagy a *Bam*HI N - *Eco*RI D fragmenten található, ún. ED-L1 promóterről (Hudson és mtsai, 1985), vagy attól a pozitív szálon 3' irányban kb. 700 bázisnyira az első terminális repeat területén található ún. L1-TR promóterről (Sadler és Raab-Traub, 1995b) indul. Az LMP2B az LMP1-gyel ellentétes irányban, a negatív DNS szárlól (vagyis a pozitív szálon 5'-3' irányban) íródik át és a transzkriptum iniciációs pontja az ED-L1 promótertől a pozitív szálon 3' irányban több mint 200 bázisnyira található (Laux és mtsai, 1989; Sample és mtsai, 1989). Az LMP2B transzkripcióját, illetve az LMP1 ED-L1 promóterről történő átírását szabályozó régiók tehát valószínűleg jelentősen átfedik egymást. Ezt a közös szabályozó régiót, az irodalomban LMP-promóter szabályozó régiónak (LRS) szokták nevezni.

Az **LMP2A** és az **LMP2B** transzkriptumok csak az első exonjukban különböznek egymástól. Az LMP2A az LMP2A-promóterről (LMP2Ap), az LMP2B a kétirányú LRS-ről íródik át. Mivel az első exonok a lineáris vírusgenom 3' végén, míg a többi közös exon a lineáris vírusgenom 5' végén helyezkedik el, transzkripciójuk csak a lineáris vírusgenomok cirkularizációja után indulhat meg (Laux és mtsai, 1989; Sample és mtsai, 1989). Mind a két fehérje ugyanazokkal a transzmembrán és citoplazmatikus C-terminális doménekkal rendelkezik, az eltérő első exon miatt ugyanakkor az LMP2A-nak még egy rövid citoplazmatikus N-terminális doménje is van. Utóbbi doménjével az *src* protein tirozin kináz (PTK) család tagjaihoz képes kapcsolódni (Burkhardt és mtsai, 1992; Longnecker és mtsai, 1991). A PTK-k szubsztrátjaként gátolja azok aktivitását, következésképp gátolja a sejt felszíni immunglobulinok keresztkötését követő jelátviteli utak aktiválódását, így akadályozva a látens fertőzött sejtekben a vírus lítikus

reaktivációját, ezen kívül túlélési és differenciálódást gátló jelet szolgáltat a B sejt számára (Miller és mtsai, 1994a; 1994b; 1995). Az LMP2A fehérje egyes munkacsoportok szerint fontos szerepet játszik a B sejtek immortalizációjában (Brielseimer és mtsai, 1996), mások szerint nem szükséges ahhoz (Speck és mtsai, 1999; Konishi és mtsai, 2001).

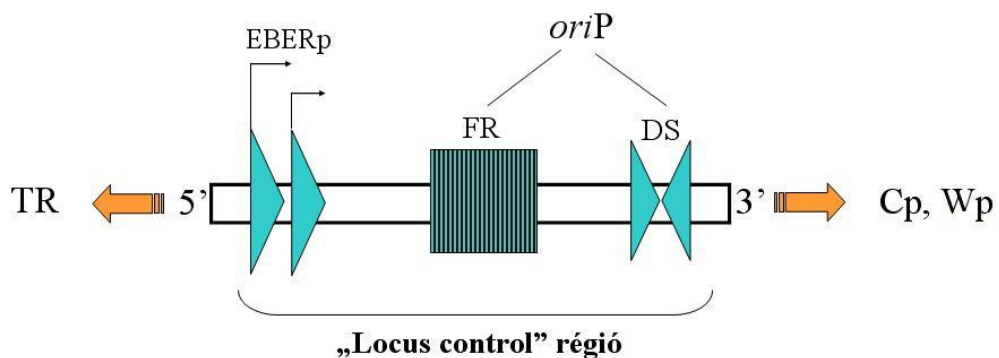
Az LMP2B fehérjét eddig még nem, csak a transzkriptumot sikerült kimutatni, a fehérje funkciójáról pedig még csak kevés ismerettel rendelkezünk (Bornkamm és Hammerschmidt, 2001). Rechsteiner és mtsai (2007) nemrégiben kimutatták, hogy mivel az LMP2B negatívan szabályozza az LMP2A aktivitást, ill. kiváltja a BCR keresztkötését, szerepet játszhat a vírus látensből a lítikus ciklusba való lépésében.

Az Epstein-Barr vírus két nukleáris lokalizációjú RNS-ét (**EBER1, -2**) kódoló gének sejt- és látencia-típustól függetlenül mindig aktívak. Ezen gének transzkriptumai az EBV legnagyobb mennyiségben expresszálandó termékei. Az EBER géneket nagy valószínűséggel az RNS polimeráz III (Pol III) írja át, bár 5' régiójukban a tipikus RNS polimeráz II (Pol II) átíráshoz szükséges elemek is megtalálhatók. Az EBER RNS-ek hossza 166 illetve 172 bp, nem rendelkeznek sem poli-A farokkal, sem guanin-sapkával és fehérjetermék sem készül róluk. Döntően a sejtmagon belül illetve a perinukleáris citoplazmában helyezkednek el (Nanbo és Takada, 2002), ahol ribonukleoprotein komplexekben található meg (Glickman és mtsai, 1988). Az EBER RNS-ek szerepe a mai napig sem igazán tisztázott. Egyes munkacsoportok szerint az EBER RNS-ek antiapoptotikus hatással rendelkeznek (Komano és mtsai, 1999). Mások szerint nincs ilyen tulajdonságuk (Ruf és mtsai, 2000), és a B sejtek transzformálásához sem szükségesek (Swaminathan és mtsai, 1991). Yajima és mtsai (2005) azonban kimutatták, hogy az EBER-ek jelentősen hozzájárulnak egy BL sejtvonal tumorigenitásához. Mindemellett az EBER1 gén „upstream” promóterének szekvenciáján c-Myc kötőhely található, és *in vivo* a c-Myc kötődését is sikerült igazolnunk (Niller és mtsai, 2003).

A *Bam*HI I régióban található promóterről a szomszédos ***Bam*HI A** régión keresztül olyan poli(A)-farokkal rendelkező, alternatívan szerkesztett **RNS-ek** családja íródik át, melyek 3' vége azonos (Brooks és mtsai, 1993; Sadler és Raab-Traub, 1995a). Az RNS-ek által kódolt fehérjék szerkezete még nem pontosan ismert, azonban úgy tűnik, hogy a fehérjék *in vivo* expresszálandók (Gilligan és mtsai, 1991) és egyikük valószínűleg a Notch4 ligand-kötő doménjéhez kapcsolódva fokozni képes az LMP1 expressziót (Kusano és Raab-Traub, 2001).

### 1.1.3. A „Locus control” régió

A látens, episzómalis EBV genomok egy feltételezett „Locus control” régión (LCR) keresztül (Niller és mtsai, 2004) kapcsolódnak a nukleáris mátrixhoz (Jankelevich és mtsai, 1992). Ezt a régiót nyitott kromatinstruktúra jellemzi, és feltételezhetően az EBV genom *Bam*HI C fragmentjén belül elhelyezkedve az EBER1 és 2 transzkripció egységek 5' végétől kiindulva egészen a látens vírusreplikációs origó (*ori*P) 3' végéig tart (2. ábra). A celluláris gének LCR-jei meghatározott szerepet játszanak a génexpresszió és a promóter aktivitás szabályozásában és klasszikus enhancerként és kromatin „insulator” elemekként működnek. Feltehetőleg az EBV-ben hasonló szerepe lehet ennek a régiónak. Az LCR-ek jól jellemezhetőek DNáz I hiperszenzitív helyekkel, ahová specifikus nukleáris faktorok kötődhetnek. A DNáz I kromatinhoz való hozzáférése jól tükrözi az egyes szabályozó faktorok kromatinhoz való hozzáférését is (Li és mtsai, 2002). Az ilyen nyitott kromatinstruktúrájú, génszabályozás tekintetében fontos helyeket az ún. DNáz I hiperszenzitivitási analízissel lehet jól térképezni (ld. 3.2. fejezet).



2. ábra: Az EBV feltételezett "Locus control" régiója.

## 1.2. Epigenetikai szabályozás

A genom a bázisok sorrendje által meghatározott genetikai információ mellett poszt-szintetikus módosításoknak köszönhető ún. epigenetikus többletinformációt is tartalmaz. Ennek feladata, hogy koordinálja és biztosítsa a genetikai információ

megfelelő helyen és időben történő hasznosítását. Az epigenetikai információ elsősorban a gének expressziójának szabályozásában jelenik meg, és ezáltal szerepet játszik az embriogenezis és a szöveti differenciálódás szabályozásában (Li és mtsai, 1992; Okano és mtsai, 1999), a kromoszómák megfelelő szerkezetének kialakításában (Jones és Wolffe, 1999), az X kromoszóma inaktiválásában (Panning és Jaenisch, 1996; 1998; Boggs és mtsai, 2002), az integrált virális genomok, endogén retrovírusok és transzpozonok inaktiválásában (Doerfler és mtsai; 1995, Yoder és mtsai, 1997b; Walsh és mtsai, 1998), a genomikus bevéődés (imprinting) kialakításában (Li és mtsai, 1993), valamint fontos szerepet tölt be a tumorképzésben is (Laird és Jaenisch, 1996; Pfeifer és mtsai, 2000; Robertson és Jones, 2000).

Az epigenetikai szabályozás a DNS metilációján, vagy különböző hiszton modifikációkon keresztül valósulhat meg. A hiszton modifikáció a hiszton fehérjék N-terminálisán elhelyezkedő aminosavak oldalláncainak acetilációja, foszforilációja, metilációja, vagy ubiquitinálódása lehet.

Az epigenetikai szabályozás részének tekintik újabban a géncsendesítésben szerepet játszó Polycomb represszor fehérje komplexeket (Pirota, 1997; Guitton és Berger, 2005; Swigut és Wysocka, 2007), valamint a microRNS-eket (miRNS) is (Bartel, 2004). Az EBV legalább 17 különböző miRNS-t expresszál a látens fertőzés során, melyeknek különféle szerepük lehet a vírus életciklusában (Cai és mtsai, 2006).

### **1.2.1. DNS metiláció**

Valamennyi élőlény DNS-ében a négy alapvető bázisfajtán kívül ún. ritka bázisok is találhatóak, amelyek a polinukleotid-lánc elkészülte után, posztszintetikus módosítás révén keletkeznek. A gerincesek DNS-ében ezek közül egyedül a citozin 5. pozícióban történő metilációja során létrejövő 5-metil-citozin (5mC) található meg, mely az összes citozin körülbelül 2-10%-át teszi ki (Razin és Riggs, 1980; Ehrlich és Wang, 1981). Emlősökben az 5mC-ok nagy többsége az 5'-citozin-guanin-3' (CpG) palindrom dinukleotidban, mindkét DNS szálon szimmetrikusan elhelyezkedve található (Gruenbaum és mtsai, 1981).

A DNS metiláció az egyik legjobban vizsgált posztszintetikus módosítás. A genom globális metilációs mintázatának kialakításában, fenntartásában és dinamikus változtatásában nagy, DNS-(5-citozin)-metiltranszferázokat (DNMT) tartalmazó

multiprotein komplexek vesznek részt. A metilációs mintázatot fenntartó DNMT1 enzim szubsztrátja elsősorban a hemimetilált DNS, így a replikáció során biztosítja, hogy az újonnan szintetizálódó DNS szál a templátéval azonos metilációs mintázattal rendelkezzen. A DNMT3A és DNMT3B enzimek ezzel szemben *de novo* metiltranszferáz aktivitással is rendelkeznek, és így a mindkét szálon metilálatlan DNS-en a szükségesnek megfelelő új metilációs mintázat kialakítására is képesek (Robertson, 2001). Ezeknek az enzimeknek alapvető szerepére hívja fel a figyelmet, hogy a DNMT3B mutációja egy ritka autoszómális, recesszíven öröklődő humán megbetegedés, az ún. ICF szindróma (Immundeficiencia, Centromerikus heterokromatin instabilitás és Faciális rendellenességek) kialakulását okozza (Robertson, 2001), míg a humán *de novo* metiltranszferázok egerekben megtalálható homológjait kiütve súlyos fejlődési rendellenességek alakulnak ki (Okano és mtsai, 1999).

A DNS metiláció reverzibilis folyamat. A demetiláció elvben három féle módon következhet be: passzív (replikáció-függő) módon, aktív (enzimatis) úton, vagy a kettő kombinációjával. Passzív demetiláció esetén a fenntartó metiláz a replikációk során nem egészíti ki a szülői szálnak megfelelően az új szálon a metilációs mintázatot, így két sejtosztódást követően a sejtek felében az adott hely teljesen metilálatlan lesz. Aktív demetiláció elvileg történhet a metil-csoport direkt lehasításával a metil-CpG-kötő fehérjék családjába tartozó MBD2b fehérje hatására (Ramchandani és mtsai, 1999), vagy 5-metil-citozin-DNS-glikozilázok (5-MCDG) bázis excíziós reparációjával (Jost és mtsai, 1995). Ezt a felfedezést ugyanakkor két másik munkacsoportnak nem sikerült igazolnia (Ng és mtsai, 1999; Wade és mtsai, 1999).

Arra, hogy a DNS metiláció hogyan fejt ki transzkripciót gátló hatását, több mechanizmus is elképzelhető. Az első és legkézenfekvőbb az, hogy a citozin ötös pozíciójának metilációja direkt módon akadályozza egyes transzkripciós faktorok kötődését a DNS-hez, gátolva ezzel az RNS átíródását. Ez a folyamat azonban csak azon transzkripciós faktorok esetében tudja magyarázni a gátlást, melyek kötőhelyeiken tartalmaznak CpG dinukleotidot, ráadásul ezzel a mechanizmussal nehezen magyarázható nagyobb domének átíródásának gátlása, vagy teljes kromoszómák inaktívvá válása. Azt, hogy ez a mechanizmus mégis szerepet játszik a transzkripció szabályozásában, bizonyítják azok a vizsgálatok, melyek a CTCF szerepét vizsgálták a genomiális imprintingben egerek H19/Igf2 lókusznán (Bell és Felsenfeld, 2000). A CTCF (CCCTC binding factor) egy 11 cink-ujjat tartalmazó transzkripciós faktor.

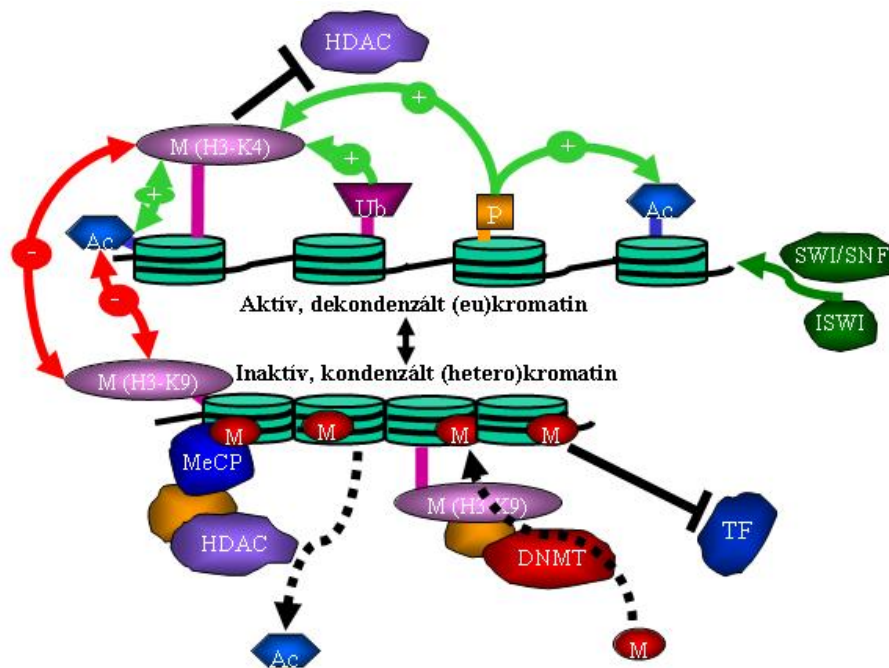


Nagymértékben konzervált és általánosan elterjedt fehérje a gerincesek körében, mely képes blokkolni az enhancer – promóter interakciókat. Egyik ismert kötőhelye a c-myc onkogén promóterének szabályozó régiója (Filippova, 1996). Bell és Felsenfeld vizsgálatai kimutatták, hogy a DNS metiláció gátolja a CTCF kötődését, ezáltal az nem tudja kifejteni enhancereket gátló hatását, így az Igf2 transzkripciója végbemehet. Munkacsoportunk azonban nemrégiben kimutatta, hogy a CTCF képes kötődni a bizonyos EBV pozitív sejtvonalakban erősen metilált Rep\*-Cp régióhoz is (Salamon és mtsai, 2009), tehát a DNS metiláció minden bizonnyal nem kizárólagos meghatározója a CTCF kötődésnek.

Számos megfigyelés ugyanakkor azt mutatja, hogy a DNS metiláció elsősorban indirekt módon fejt ki hatását, és így a transzkripciót nagyobb távolságból is gátolni képes. Ez a mechanizmus olyan proteinek létét feltételezi, melyek szelektíven tudnak kötődni a metilált DNS-hez. Az első olyan proteint, mely már egy darab metilált CpG dinukleotidot is képes felismerni és kötődni hozzá, 1992-ben azonosították (Lewis és mtsai, 1992). A metil-CpG-kötő fehérje (MeCP) kötődése egyrészt közvetlenül gátolhatja a transzkripció faktorok, ill. az RNS polimeráz bekötődését és/vagy működését, másrészt különböző korepresszor fehérjékkel léphet kapcsolatba, melyeken keresztül a lokális kromatinstruktúrát olyan kompakt, transzkripcionálisan inaktív formává képes alakítani, amely megakadályozza az iniciációs komplex összeszerelődését és/vagy az aktiváló transzkripció faktorok bekötődését, ill. működését (Ehrlich és Wang, 1981). A MeCP2 két strukturális doménnel rendelkezik: egy metil-CpG-kötő doménnel (Methyl-CpG Binding Domain, MBD) és egy transzkripció gátló doménnel (Transcriptional Repression Domain, TRD). Az utóbbi egyrészt sztérikus gátlással közvetlenül akadályozhatja transzkripció faktorok kötődését, másrészt számos más regulátor proteinnel léphet kölcsönhatásba (Robertson, 2001).

A DNS metiláció és a hiszton modifikációk együttesen alakítják ki a transzkripció aktivitásnak megfelelő kromatinstruktúrát (3. ábra). A DNS metiláció és a hiszton modifikációs mechanizmusok közötti kölcsönhatásokat számos eredmény igazolta. Ezek a mechanizmusok különböző hisztonok eltérő aminosav-farkait érinthetik, és mintázattól függően fejtik ki hatásukat a transzkripcióra. Az MeCP2 és még három metil-CpG-kötő fehérje (MBD1-3) képes komplexet alkotni a hiszton-deacetilázzal (HDAC) (Jones és mtsai, 1998; Ng és mtsai, 1999; Wade és mtsai, 1999). Ez a kapcsolat lokálisan a hiszton farkak deacetilálódását eredményezi, aminek hatására

kondenzált kromatinszerkezet jön létre, ezáltal a transzkripciós faktorok kevésbé férnek hozzá kötőhelyeikhez. Ezek a komplexek tehát hozzájárulnak a metiláció-mediáltta géncsendesítéshez (Li, 1999; Jones és Wolffe, 1999; Robertson, 2001). Nemrégiben mutattak ki kapcsolatot a DNS metiláció és a H3K4 hiszton di- és trimetilációk (H3K4me2, H3K4me3) között is. Azt találták, hogy a DNS metilációnak fontos szerepe van a H3K4me2 és H3K4me3 hiszton modifikációk kizárásában, ill. a zárt kromatinszerkezet kialakulásában, és ez a hatás lokálisan, csak a metilált DNS régió 200bp-os környezetében érvényesül (Okitsu és Hsieh, 2007).



3. ábra: A kromatinszerkezet epigenetikus szabályozása.

Aktív kromatinstruktúra esetén általában a DNS demetilációja és bizonyos hiszton aminosav oldalláncok acetilációja (Ac), foszforilálódása (P), ubiquitinálódása (Ub), továbbá egyes pozíciók (pl.: a H3-as hiszton 4-es pozícióban lévő lizinje: H3-K4) metilálódása (M) figyelhető meg. A DNS metiláció a transzkripciós faktorok (TF) bekötődésének közvetlen gátlásával, illetve metilált citozin kötő fehérjék (MeCP) közvetítésével a hiszton-deacetilázok (HDAC) adott helyre toborzásán keresztül, kondenzált kromatinstruktúra kialakításával gátolja a transzkripciót. A H3-as hiszton 9-es lizinje (H3-K9) metilációjának hatására a környező DNS szakasz metilálódik. Az egyes hiszton-oldallánc modifikációk között jellegzetes kölcsönhatások figyelhetők meg (piros nyíl: gátlás; zöld nyíl: aktiválás). SWI/SNF és ISWI: ATP-dependens kromatin remodelling komplexek.

### 1.2.2. A DNS metiláció szerepe az EBV gének expressziójának szabályozásában

Mivel az Epstein-Barr vírus szekvenciájában a limfotróp gamma-herpeszvírusok többségéhez hasonlóan relatív CpG dinukleotid hiány és ugyanakkor TpG és CpA dinukleotid többlet figyelhető meg, feltételezték, hogy a látens EBV genomok a gazdasejtekben erőteljesen metilálódnak (Honest és mtsai, 1989; Takács és mtsai, 2001a). CpG-metiláció-érzékeny, illetve CpG-metiláció-inszenzitív restrikciós enzimpárokkal történő emésztés, majd ezt követő Southern-blot és hibridizáció segítségével az EBV számos látens promóter régiójában sikerült bizonyítani a DNS metiláció szabályozó szerepét. A későbbiekben biszulfid modifikáláson alapuló technikákat alkalmazva kiegészítették, illetve újabbakkal bővítették az eredményeket. A modifikálási reakció lényege, hogy a Na-biszulfittal reagáló nem metilált citozinok uracillá alakulnak, míg az 5-metil-citozinok ( $5^mC$ ) citozinok maradnak. Az ezt követő PCR-reakciókban az uracilok timinként fognak megjelenni, míg az  $5^mC$ -ok továbbra is citozinokként. Ebből következően a szekvenálást követő szekvencia analízis során az ismert eredeti szekvenciával összehasonlítva megállapítható, hogy melyik citozinok voltak metiláltak, és a metiláció a tisztított DNS-populáció hozzávetőleg mekkora hányadában fordult elő (Frommer és mtsai, 1992; Clark és mtsai, 1994).

Ezekben a munkákban egy-két kivételtől eltekintve valamennyi EBV-t tartalmazó szövet-, ill. sejttípust megvizsgáltak: így Burkitt limfóma biopsziákat és a belőlük alapított sejtvonalakat, *in vitro* létrehozott limfoblasztoid sejtvonalakat, nazofaringeális karcinóma biopsziákat és a belőlük származó, nude egerekben passzált tumorokat, gyomor karcinóma biopsziákat, Hodgkin limfómákat, letális közepvonali granulomákat, immunkárosodott egyének limfoproliferatív megbetegedéseit, valamint egészséges véradók perifériás véréből izolált B sejteket.

Az eredmények azt mutatták, hogy az EBV fő látens promótereinek többsége általában hipometilált, vagy teljesen metilálatlan, ha az adott promóter aktív, míg általában erőteljesen metilált, ha az adott promóter inaktív. Ez a fordított összefüggés volt jellemző a **C-promóterre** (Minarovits és mtsai, 1994a; 1994b; Robertson és mtsai, 1995b; 1996b; Robertson és Ambinder, 1997a; 1997b; Takacs és mtsai, 1998; Bakos és mtsai, 2007), a **W-promóterre** (Jansson és mtsai, 1992; Paulson és Speck, 1999; Tierney és mtsai, 2000) és az **LMP-promóter szabályozó régióra** (Minarovits és mtsai, 1991; 1994a; 1994b; Hu és mtsai, 1991; Takacs és mtsai, 2001b). Az **LMP2A-**

**promóter** esetében is az volt megfigyelhető, hogy a metiláció mértéke jó összefüggést mutat a promóter aktivitásával, de bizonyos I. és II. látencia-típusú sejtvonalakban a metilációs mintázat különbségeket mutatott, kisebb vagy nagyobb hipometilált régiók voltak megfigyelhetők bennük (Salamon és mtsai, 2003). Ezzel szemben valamennyi vizsgált mintában, aktivitásától függetlenül mindig teljesen metilálatlannak bizonyult a **Q-promóter** (Schaefer és mtsai, 1997; Paulson és Speck, 1999; Tao és mtsai, 1998; Bakos és mtsai, 2007). A mindig átíródó **EBER1** és **EBER2** kis magi RNS-ek kódoló és szabályozó régiói egyetlen *HpaII* hely kivételével ugyancsak minden mintában metilálatlannak bizonyultak (Minarovits és mtsai, 1992). Az EBV látens replikációjáért felelős **oriP régió** a *HpaII/MspI* emésztés alapján túlnyomórészt metilálatlannak bizonyult (Ernberg és mtsai, 1989; Hu és mtsai, 1991; Falk és Ernberg, 1993), biszulfid-szekvenálással viszont már metilált CpG dinukleotidokat is ki lehetett mutatni a régióban (Falk és mtsai, 1998).

A DNS metilációnak a látens EBV promóterek szabályozásában betöltött szerepét funkcionális vizsgálatok is igazolták. Így például 5-azacitidin kezelés az I. látencia-típusú Rael sejtek egy alpopulációjában a lítikus ciklust aktiválja, nagyobb részükben pedig EBNA2→6 és LMP1 expressziót indukál, miközben a C- és W-promóter demetilálódik és reaktiválódik (Masucci és mtsai, 1989; Robertson és mtsai, 1995b; Robertson és Ambinder, 1997b). A Wp, Cp és a Q-promóter, valamint az LRS *in vitro* metilációja gátolja az adott promóterek transzkripcióját (Jansson és mtsai, 1992; Minarovits és mtsai, 1994b; Robertson és mtsai, 1995b; Robertson és Ambinder, 1997b; Tao és mtsai, 1998), és ugyanez figyelhető meg az EBER1- és EBER2-promóter *in vitro* metilációja esetén is (Banati és mtsai, 2008). Érdekes módon ugyanakkor a W-promóter metilációja nemcsak saját magát, hanem a C-promótert is gátolja (Paulson és Speck, 1999), az EBV *oriP* régiójának metilációja viszont éppen hogy fokozza a tőle 3' irányban körülbelül 2 kb-nyi távolságra elhelyezkedő C-promóter aktivitását (Robertson és Ambinder, 1997b).

A DNS metiláció lényeges szerepet tölt be az Epstein-Barr vírus életciklusában és immunrendszerrel való védelmében. A citotoxikus T sejtek által felismert EBV nukleáris antigének ugyanis a látens C-promóterről íródhatnak át, mely a Hodgkin- és Burkitt limfómák esetében is erősen metilált, inaktív állapotban van, megakadályozva ezzel az immundomináns proteinek átíródását.

### 1.2.3. Hiszton modifikációk

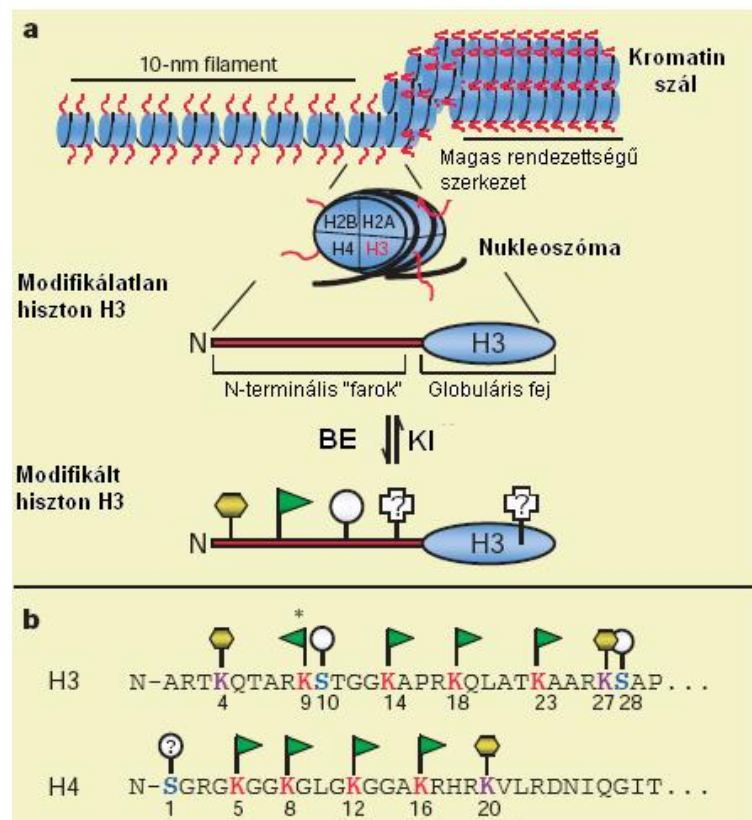
A hisztonok nagymértékben konzervált fehérjék. A nukleoszómák építőköveiként funkciójuk az eukarióta kromatinstruktúra kialakítása, dinamikus kontrollja és ezáltal a genom potenciális információtartalmának megnövelése. Két, egymással szemben álló hipotézis alapján a hiszton modifikációk hatása: „a”: strukturális elven alapul, „b”: létezik egy ún. „hiszton kód” (Strahl és Allis, 2000, Jenuwein és Allis, 2001), ami szerint a különböző hiszton modifikációk eltérő kombinációi eltérő hatással vannak a kromatinstruktúrára, és így a transzkripcióra. Ez utóbbi esetben a lehetséges kombinációk nagy száma miatt a hiszton modifikációk információnövelő képessége sokkal nagyobb, mint az egyszerű strukturális hatás esetén.

A kromatin DNS-ből, hisztonokból, és nem-hiszton fehérjékből áll. A kromatinszálak ismétlődő nukleoszóma egységekből épülnek fel, aminek magját a négy belső hiszton fehérje (H2A, H2B, H3, H4) dimerjei adják (*4.a. ábra*). A mag köré kb. 146 bp hosszú dupla szálú DNS kettős hélice tekeredik. A nukleoszómákat összekötő DNS kapcsolja egymás után, és ehhez a DNS-hez kapcsolódik az ötödik hiszton fehérje, a H1 (Luger és mtsai, 1997).

A hiszton fehérjék különböző modifikációi (acetiláció, metiláció, foszforizáció, ubiquitináció, szumoiláció és ADP-ribosziláció) elsősorban a hisztonok N-terminális farkain jelennek meg (*4.b. ábra*). Ez alól kivételt képez az ubiquitináció, melyet a H2A és H2B hisztonok C-terminális végein figyeltek meg, továbbá a legutóbbi tanulmányok poszt-transzlációs módosulásokat mutattak ki a hisztonok globuláris feji régiójában is (Zhang és mtsai, 2003). A hiszton modifikációk legnagyobbbrészt a hisztonok N-terminális farkának lizin aminosavait érintik. A lizin aminosavak  $\epsilon$ -amino-csoportja metilálódhat, acetilálódhat, ubiquitinálódhat, míg az ATP  $\gamma$ -foszforilcsoportja általában a hisztonok szeril-oldalláncára kerül. Ezekon kívül az arginin oldalláncok metilálódása is lehetséges (Lachner és mtsai, 2003; Ehrenhofer-Murray, 2004). Míg a hiszton acetiláció és az arginin metiláció főleg a génexpresszió aktiválásával, a foszforiláció pedig a mitotikus kromoszóma-kondenzációval (Goto és mtsai, 1999; Wei és mtsai, 1999) hozható összefüggésbe, addig a hiszton metiláció hatását nem lehet általánosítani. Bizonyos lizinek metilációja (pl. H3K4) az eukromatinhoz, a génaktivációhoz, míg másoké (pl. H3K9) a heterokromatinhoz, a génrepresszióhoz kapcsolhatók. Az ubiquitináció a hisztonok lebontásán keresztül vezet aktivitásnövekedéshez, a

szumoiláció pedig a kromatin hiszton és nem-hiszton fehérjének reverzibilis kötésével közvetlen vagy közvetett módon képes transzkripció gátlást okozni (Gill, 2005; Iniguez-Lluhi, 2006). Megfigyelték továbbá, hogy a hisztonok ADP-riboszilációja a DNS sérülésekor megnövekszik, ezért feltételezik, hogy ennek a modifikációnak a DNS-javító mechanizmusokban lehet szerepe (Althaus és mtsai, 1994).

A fent említett hiszton modifikációk általában reverzibilisek, így a megfelelő modifikációs mintázat kialakításában egymással ellentétes hatású enzimpárok vesznek részt.



**4. ábra:** A kromatinszerkezet és a hiszton modifikációk

**a:** Általános kromatinszerkezet. A hisztonok N-terminális farki része (pirossal jelölve) nagymértékben konzervált és kinyúlik a kromatinszálból. A H3-as hiszton N-terminálisán különféle poszt-transzlációs módosulások fordulhatnak elő: metiláció (sárga hatszög), acetiláció (zöld zászló) és foszforizáció (fehér kör), de más modifikációk is megjelenhetnek, akár a globuláris doménen is. **b:** A H3-as és H4-es hisztonok N-terminális aminosavainak lehetséges modifikációi. A potenciálisan acetilálódni képes lizinek (K) pirossal, a metilálódók lilával, míg a foszforilálódni képes szerinek (S) kékekkel vannak jelölve. A \*-gal jelzett H3-as lizin-oldallánc acetiláció és metiláció célpontja is lehet. (Strahl és Allis, 2000)

### 1.2.3.1. A hiszton acetiláció

A hiszton acetiláció talán a legtöbbet tanulmányozott hiszton modifikáció. Eredetileg az aktív transzkripcióval hozták kapcsolatba (Struhl, 1998), majd később úgy találták, hogy szerepe lehet a géncsendesítésben (Deckert és Struhl, 2001; Mulholland és mtsai, 2003), a DNS javító mechanizmusokban és a sejtciklus szabályozásában is (Carozza és mtsai, 2003).

A hisztonok acetilációját a hiszton-acetiltranszferáz (HAT) enzimek végzik, melyek katalizálják egy acetil-csoport áthelyezését az acetil-CoA-ról a hisztonok N-terminális farkának valamelyik lizin  $\epsilon$ -amino-csoportjára. A HAT enzimek nagy multiprotein-komplexekben működnek. Eddig két fő szupercsaládjukat azonosították, a GNAT (Gnc5-rokon N-acetiltranszferáz) és az alapító tagjai után elnevezett MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) szupercsaládot. Az ide tartozó enzimek a négy nukleoszómális hiszton acetilációján kívül más transzkripciós faktorok acetilálására is képesek, globális transzkripciós koaktivátorokként szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában, a differenciációban, és az apoptózisban is (Roth és mtsai, 2001; Carozza és mtsai, 2003).

A hiszton acetiláció reverzibilis folyamat. A lizin oldalláncok deacetilálását a hiszton-deacetilázok (HDAC) katalizálják. A HDAC enzimeknek emlősökben három osztálya van (de Ruijter és mtsai, 2003). Több vizsgálat is igazolta, hogy a HDAC-ok működése nem redundáns, az I. osztályba tartozó enzimek szinte kizárólag a sejtmagban találhatóak, míg a II. osztályba tartozó HDAC-ok celluláris jelek hatására a sejtmag és a citoplazma között ingáznak. Emellett az embrionális fejlődés során különböző HDAC szintek figyelhetők meg, ami valószínűleg arra utal, hogy az embriogenezis egyes stádiumaiban különböző HDAC-ok vesznek részt (McGraw és mtsai, 2003).

A hiszton acetiláció hatására a legtöbb esetben megnövekedik a transzkripciós aktivitás. Ennek egyik oka az, hogy a pozitív töltésű lizin oldalláncot az acetil-csoport semlegesíti, ezáltal megszűnik a kölcsönhatás a negatív töltésű DNS foszfát gerinc és a lizin oldallánc között, valamint a nukleoszóma magjában található más hisztonok farkainak negatív töltésű aminosavai és a lizin között, aminek következményeként fellazul a kompakt kromatinstruktúra, és a DNS hozzáférhetővé válik a transzkripciós komplex számára. Ezen kívül elősegíti a nukleoszómák odébb csúszását, ami szintén a transzkripció iniciációs helyének szabaddá tételét jelenti (Kingston és Narlikar, 1999).

A másik lehetséges magyarázat szerint az acetilált hiszton új felszín ad az acetilált hiszton felismerő doménnel rendelkező fehérjék számára. Az egyik ilyen ismert acetilált lizin felismerő domén a bromodomén, ami sok, emberben több mint 30 transzkripció-, és kromatin-szabályozó fehérje része (Yang, 2004).

### **1.2.3.2. A hiszton metiláció**

A hiszton acetilációval ellentétben a hiszton metiláció kémiaiailag sokkal stabilabb, és mivel sokáig nem izoláltak hiszton-demetilázt, irreverzibilisnek gondolták. Ez az elképzelés egészen addig tartotta magát, amíg 2004-ben Shi és mtsai felfedeztek egy lizin-specifikus hiszton-demetilázt (LSD1), ami az első vizsgálatok szerint a H3 lizin 4 metilációs (H3K4me) hely aminoszén-oxidáz homológ demetiláza.

A lizin oldalláncokra a hiszton lizin metiltranszferáz (HMT) egy, kettő vagy három metil-csoportot képes kapcsolni (Rea és mtsai, 2000). A rekombináns LSD1 szubsztrátja a mono-, vagy dimetil H3K4, aminek demetilálását egy oxidatív reakció katalizálásával végzi. Ennek során a metilált aminocsoport oxidálódik, imin képződik, aminek hidrolizálásával létrejön a módosulatlan lizin, és melléktermékként egy formaldehid.

Bizonyos lizinek metilációja (pl. H3K4me1-3, H3K27me1, H3K36me3, H3K79me3) a génaktivációval, míg másoké (pl. H3K9me2-3, H3K27me2-3) a géncsendesítéssel hozhatók összefüggésbe. Számos kutatócsoport vizsgálta eddig ezen hiszton modifikációk fontosságát. CHIP-on-chip módszer segítségével meghatározták, hogy az egyes hiszton metilációk a promóterek mely területein és milyen mértékben látnak el szabályozó szerepet. Így pl. megállapították, hogy a H3K4me2 esetében az iniciációs ponttól “upstream” és “downstream” irányban mutatható ki jelentős eltérés az aktív és az inaktív gének esetében, ezzel ellentétben a H3K4me3 modifikáció az iniciációs pont területén fontos (Barski és mtsai, 2007).



#### 1.2.4. A hiszton modifikációk szerepe az EBV látens szabályozó régióinak működésében

Az EBV kettősszálú, episzómális állapotban jelenlévő DNS-e a sejt fehérjéit felhasználva kromoszómaszerű szerkezetet alkot a gazdasejtben. A látens fertőzés során expresszálandó néhány virális fehérje transzkripcióját a kromatinstruktúra változtatásával és más fehérjék bekötődésének elősegítésével a hiszton kovalensen módosító celluláris enzimek szabályozzák.

A hiszton módosulásokat immunoblottal, áramlási citometriával, Western-blottal, hiszton-deacetiláz inhibitorok (pl. Trichostatin A; TSA) alkalmazásával, ill. Kromatin Immunprecipitációval (ld. 3.7. fejezet) lehet vizsgálni. Igaz a hiszton modifikációk látens EBV promóterekre gyakorolt hatását még kevésbé kimerítően tanulmányozták, szabályozásban betöltött szerepüket már több EBV-t hordozó sejtvonalban és számos NPC mintában is megvizsgálták.

Az LMP-promóter szabályozó régió (**LRS**) hiszton acetilációs analízise pozitív összefüggést mutatott a hiszton H3 és H4 acetiláltsági szintje és az LMP1 expresszió mértéke között Burkitt limfómából alapított és limfoblasztoid sejtvonalakban (Sjöblom-Hallén és mtsai, 1999; Wang és mtsai, 2000; Park és Faller, 2002; Chau és Lieberman, 2004), valamint EBV pozitív NPC sejtvonalban is (Nishikawa és mtsai, 2004). Utóbbi sejtvonalban ki tudták mutatni az LMP1 expressziójának növekedését hiszton-deacetiláz inhibitor (TSA) kezelés hatására is. Kimutatták továbbá, hogy hiszton-acetiltransferázokkal kölcsönhatva az EBNA2 *in vivo* aktiválja az LMP1 transzkripciót (Wang és mtsai, 2000; Alazard és mtsai, 2003). A hiszton acetiláció mértéke korrelál a transzkripció aktivitással a **C-promóter** esetében is (Alazard és mtsai, 2003; Chau és Lieberman, 2004), amit alátámasztott az a megfigyelés, miszerint a promóterre gátlólag ható EBNA3C protein komplexet képez HDAC enzimekkel (Knight és mtsai, 2003). Az eddigi tapasztalatokkal megegyezően aktív **Wp** és **EBER-promóterek** vizsgálatok során szintén magasnak találták a hiszton acetiláltsági szintet (Chau és Lieberman, 2004). A hisztonok acetiláltsági szintjének megnövekedése az EBV reaktivációjával, a lítikus ciklus beindulásával is kapcsolatba hozható, így valószínű, hogy a látens fertőzés fenntartásában, így a lítikus proteinek, ill. a korai fehérjék transzkripciójának repressziójában a hiszton deacetilációnak fontos szerepe van (Chang és Liu, 2000; Jenkins és mtsai, 2000).

A hiszton metilációk közül eddig a H3K4 és a H3K9 metilációt vizsgálták. Azokban a sejtvonalakban, ahol az adott promóter aktív, magas volt a H3K4 metiláltsági szintje, míg az erőteljes H3K9 metiláció az adott promóter inaktivitásával mutatott összefüggést. Ezt az összefüggést igazolták az **LRS**, a **C-promóter**, a **W-promóter**, és a minden sejtvonalban aktív **EBER-promóterek** esetében is (Chau és Lieberman, 2004).

A vírus látens replikációs origója (**oriP**) állandóan nagyfokú hiszton acetiláltságot és kiterjedt H3K4 metilációt mutat, amit valószínűleg az origó felismerő komplex (ORC) és az EBNA1 folyamatos kötődése alakíthat ki (Chau és Lieberman, 2004).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Hogy megértsük az Epstein-Barr vírus látencia típustól függő eltérő promóterhasználatát és az ebből adódó génextpressziós különbségeket, célul tűztem ki az EBV főbb látens promótereinek (Cp, Qp, LMP2Ap, LMP1p) szabályozási mechanizmusainak átfogó vizsgálatát EBV-t hordozó, különböző látencia típusú limfoid sejtvonal-párokon és nazofaringeális karcinóma sejtvonalban.

**(1) Első lépésként DNáz I hiperszenzitív analízis segítségével kívántam feltérképezni az EBV feltételezett „Locus control” régiójának, az e régióhoz közeli Cp, valamint az LCR-től távol eső Qp hiperszenzitív helyeit a három fő látencia típusba tartozó reprezentatív sejtvonalakban, mivel:**

- eddig még nem folytattak átfogó tanulmányokat az EBV „Locus-control” régiójának hiperszenzitív helyeire nézve.
- a kapott eredmények függvényében további finomtérképezésre lenne lehetőségünk, amivel pontosabban lokalizálhatjuk a génregulációban fontos szerepet játszó szekvenciákat.

**(2) Munkám során RNS izolálást, majd RT PCR-t követő Real-time PCR segítségével kívántam meghatározni az egyes sejtvonalak C- és Q-promóter aktivitását, ill. LMP2A és LMP1 expressziós szintjét, hogy:**

- megerősítsem, ill. az eddig kevésbé tanulmányozott C666-1 NPC sejtvonal esetében kiegészítsem az irodalomban közölt expressziós adatokat.
- segítséget nyújtson a hiszton modifikációs vizsgálatoknál nyert adatok kiértékeléséhez.

Az általam vizsgálni kívánt limfoid sejtvonalak DNS metilációs mintázatát munkacsoportunk már korábban megvizsgálta, és nemrégiben a kutatásaimban szereplő egyetlen EBV pozitív nazofaringeális karcinóma sejtvonal, a C666-1 DNS metilációs térképét is elkészítette. Az eredmények összefüggést mutattak az egyes látens

promóterek metiláltsága és aktivációja között. Hogy teljes képet kapjunk az EBV látens promótereinek epigenetikai szabályozási mechanizmusairól, célul tűztük ki ezen promóterek átfogó hiszton modifikációs analízisét is.

Mivel eddig még nem tanulmányozták áthatóan a különböző látencia típusba tartozó sejtvonal-párok esetében az egyes hiszton modifikációk génszabályozásban betöltött szerepét, az LMP2A-promóter tekintetében pedig egyáltalán nincsenek erre vonatkozó irodalmi adatok, ezért:

**(3) Munkám során Kromatin Immunprecipitációt követő Real-time PCR segítségével kívántam meghatározni, hogy van-e összefüggés az egyes látens promóterek hiszton H3 és H4 acetiláltsági szintje, valamint a dimetilált H3K4 módosulás előfordulása, és a transzkripció aktivitás között, és ha van, akkor ez az összefüggés milyen jellegű.**

**(4) Ezen kívül az LMP1p esetében vizsgálni kívántam azt is, hogy a promóter különböző régióiban (szabályozó régió, iniciációs hely, kódoló régió) változik-e az egyes hiszton modifikációk szintje.**

A hiszton acetiláció promóter szabályozó szerepének megerősítése végett:

**(5) Hiszton-deacetiláz inhibitor alkalmazását követően izolált teljes RNS-ből készített RT-PCR-t követő Real-time PCR segítségével kívántam meghatározni a hiszton acetiláció szerepének jelentőségét a C-promóter aktivitásának és az LMP2A transzkripciójának szabályozásban, ill. a kezelt mintákból kromatint is izolálva vizsgálni kívántam a H4-es hiszton acetiláltsági szintjének változását az adott promótereket nem használó sejtvonalak esetében.**

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. A vizsgálatokhoz felhasznált sejtvonalak, sejttenyésztés

Kísérleteim során jól karakterizált, az EBV-t látens hordozó, a vírus három fő látencia-típusát képviselő sejtvonalakat használtam, melyek a kísérletek alatt végig megőrizték látencia-típusukat. Az egyes sejtvonalak látens promóter használata és az egyes sejtek által expresszált vírusgének felsorolása az *1. táblázatban* található.

Valamennyi sejtvonalat 10% FCS-t, 2mM glutamint, 50 egység/ml penicillint és 50 µg/ml sztreptomicint tartalmazó RPMI 1640 médiumban, 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett 37°C-on szuszpenziós kultúrában tenyésztettük.

Munkám során a Burkitt limfóma biopsziák fenotípusát megőrző, azaz a nukleáris antigének közül csak az EBNA1-et (a Q-promóterről) expresszáló, látens membrán proteinek pedig nem expresszáló, I. látencia-típusú Burkitt limfóma vonalak csoportjából a Rael-t és a Mutu-BL-I-Cl-216-ot (továbbiakban Mutu-I), míg a III. látencia-típusú Burkitt limfóma vonalak közül a Mutu-BL-III-Cl-99-t (továbbiakban Mutu-III) vizsgáltam (Altiok és mtsai, 1992; Gregory és mtsai, 1990). A Mutu-III az I. látencia-típusú Mutu klónok tenyésztése során bekövetkezett spontán látencia-típus váltás révén jött létre.

A humán B sejtek szinte bármilyen fejlődési stádiumban hatékonyan fertőzhetőek EBV-vel, aminek során III. látencia-típusú, EBV pozitív limfoblasztoid sejtvonalak (LCL) jönnek létre. Ezek közül a Rael vírusgenomjával immortalizált CB-M1-Ral-STO-t (továbbiakban CBM1) vizsgáltam. Mindkét III. látencia-típusba tartozó sejtvonal (Mutu-III, CBM1) a C-promótert használja a 6 nukleáris antigén átírásához, és mindhárom látens membrán proteint (LMP1, LMP2A, LMP2B) expresszálják (Altiok és mtsai, 1992; Metzenberg, 1990). A látens ciklus során ezeken kívül a mindegyik sejtvonalban állandóan, nagy aktivitással expresszálódó EBER1, EBER2, ill. *BamHI* A fragmentek íródnak át (Minarovits és mtsai, 1992).

Olyan nazofaringeális karcinóma sejtvonalat, amelyikben a vírusgenom több passzálás után is fennmarad, eddig csak egyet sikerült alapítani. Ez a C666-1 EBV pozitív epiteliális sejtvonal, amelyet a II. látencia-típusba soroltak be (Cheung és mtsai,

1999). A II. látencia-típusú sejtvonalak az I. látencia-típusúakhoz hasonlóan a nukleáris antigének közül csak az EBNA1-et expresszálják, és korlátozott mértékben látens membrán proteinek is kifejeznek.

*1. táblázat. A vizsgálatokban szereplő sejtvonalak látens promóterhasználat, és a sejtek által expresszált vírusgének.*

Sejtvonala	Promóterek					Vírusgének		
	Wp	Cp	Qp <sup>c</sup>	LMP-2Ap	LMP1p	EBNA1	EBNA2, -3A, -3B, -3C, -LP	LMP1, -2A, -2B
<b>I-es látencia</b> - Mutu-BL-I-CI-216 <sup>a</sup> - Rael <sup>b</sup> (BL I)	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>II-es látencia</b> - C666-1 (NPC)	-	-	+	+/-	+/-	+	-	+/-
<b>III-as látencia</b> - Mutu-BL-III-CI-99 <sup>a</sup> - CB-M1-Ral-STO <sup>b</sup> (LCL)	-	+	-	+	+	+	+	+

„+” jel esetén a megfelelő promóter aktív, illetve a megfelelő vírusgén expresszálódik.

„-” jel esetén a megfelelő promóter inaktív, illetve a megfelelő vírusgén nem expresszálódik.

„+/-” jel esetén a minták egy részében a megfelelő promóter aktív, másik részében nem, illetve a megfelelő vírusgén is csak a minták egy részében fejeződik ki.

<sup>a</sup> A Mutu-BL-I-CI-216 és a Mutu-BL-III-CI-99 ugyanazt a vírust hordozza.

<sup>b</sup> A Rael és a CB-M1-Ral-STO ugyanazt a vírust hordozza.

<sup>c</sup> A Q-promóter esetében a leginkább elfogadott eredményeket (Schaefer és mtsai, 1995b; Nonkwelo és mtsai, 1996; Tsai és mtsai, 1995; Zetterberg és mtsai, 1999; Rickinson és Kieff, 1996) tüntetem fel.

## 3.2. DNáz I hiperszenzitivitási analízis

A DNáz I hiperszenzitiv helyek (HS) (ld. 1.1.3. fejezet) a DNáz I hiperszenzitivitási „assay” segítségével jól térképezhetők. Ez a módszer azonban csak ún. durva térképezést tesz lehetővé, ezért a feltérképezett hiperszenzitiv helyeket +/- 100 bp-os pontossággal érdemes figyelembe venni. A módszer során először nukleuszt izoláltam a vizsgálni kívánt sejtvonalakból, majd az izolált nukleuszt különböző koncentrációjú DNáz I enzimmel emésztettem (Aronow és mtsai, 1995). A DNáz I kezelt és kezeletlen kontrol mintákból izolált DNS-t ezután megemésztettem a megfelelő restrikciós enzimekkel, majd Southern-blottal analizáltam, amihez Digoxigeninnel (DIG) jelölt hibridizációs próbákat alkalmaztam.

### 3.2.1. Nukleusz izolálás, DNáz I kezelés

A kiindulási sejtvonalakat felnövesztettem, hogy a kiindulási sejtszám elérje a  $10^6$  sejt/ml-t. A sejteket lecentrifugáltam (400g, 5 perc), majd a pelletet mostam jéghideg PBS-sel (1 liter steril desztillált vízben oldott 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH). A csapadékot ezután 1 ml 0.3 M szukrózt és 0.5% Tween 40-et tartalmazó Puffer A oldattal (10mM Hepes KOH pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1mM EGTA, 0.5mM DTT – ez utóbbit közvetlen a bemérés előtt adjuk hozzá) szuszpendáltam fel. Ezután elkészítettem az ún. „sucrose-cushion”-t: 5 ml 1.5 M szukróz tartalmú Puffer A oldatra rétegeztem az előzőleg felsuszpendált mintát, majd erre még 2 ml 0.3 M szukrózt és 0.5% Tween 40-et tartalmazó Puffer A oldatot mértem. Ezt az elegyet 4000g-vel 10 percig centrifugáltam. A leülepedett nukleáris pelletet ezután 1 ml 0.3 M szukrózt tartalmazó Puffer A oldatban vettem fel, majd háromszor mostam 1 ml hideg DNáz I pufferrel (10mM Hepes KOH pH 8.0, 50mM KCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 3mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1% Tween 40, 8% glicerol).

Az így izolált nukleuszok 200 $\mu$ l-ét növekvő koncentrációjú (0, 4 és 10 egység) RQ1 DNáz enzimmel (Promega) emésztettem szobahőmérsékleten 10 percig, majd hozzáadtam 200 $\mu$ l Stop puffert (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 20mM EGTA, 100mM NaCl, 1% SDS, 0.6 mg/ml Proteináz K), amivel 55°C-on inkubáltam egy éjszakán keresztül. Másnap hozzáadtam 4 $\mu$ l RNáz A-t (10 mg/ml), és 2 óra hosszára

37°C-ra tettem. Ezután még 12µl Proteináz K-val (20 mg/ml) emésztettem a mintákat 55°C-on 2 órát, majd DNS-t tisztítottam. A kapott DNS-t 30-40µl TE-ben (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) vettem fel.

### 3.2.2. Jelölő PCR reakció

A Southern-blothoz használt hibridizációs próbák jelöléséhez Digoxigenint (DIG) használtam, ami nagy érzékenységgű, nem radioaktív detektálást tesz lehetővé. A próbák szintéziséhez tervezett primereket a restriktív emésztéshez használt enzimek (*EcoRV*, *KpnI*, *XhoI*) hasítási helyéhez közel terveztem, szekvenciájuk a 2.A. táblázatban található.

A próbák amplifikálása és DIG-gel való jelölése egyidejűleg, a jelölő PCR reakció során zajlott úgy, hogy a „DIG DNA Labeling Mix”-ben (Roche) lévő Digoxigeninnel jelölt dUTP beépült a PCR termék szekvenciájába.

A reakció 50µl végtérfogatban 1µl steril desztillált vízben oldott tisztított DNS-t (LCL-721 EBV pozitív sejtvonalból izolált DNS), 5µl „DIG DNA Labeling Mix”-et (1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0.65mM dTTP, 0.35mM DIG-dUTP), mindkét szál-specifikus primerből 10 pmol-t, 1.5 egység *Taq* polimerázt (Promega) valamint az enzimnek megfelelő 1x puffert (10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100) tartalmazott. A reakció körülményeit a 2.B. táblázat foglalja össze.

A jelölés sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, ugyanis a beépült DIG-dUTP nagyobb molekulásúlya miatt a feljelölődött PCR termék lassabban fut a kontrol termékénél, ahol normál dNTP mixet (1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1mM dTTP) használtam.



**2. táblázat:** **A:** A hibridizációs próbák szintéziséhez használt primerek. **B:** Az amplifikálás körülményei.

**A.**

Primerek elnevezése (helyük a szekvenciában)*	Primerek szekvenciája 5' – 3'
1. <b>KpnI-Lu</b> (9924-9944) <b>KpnI-LI</b> (10302-10281)	ctg gag gaa gtca tgc cac ag ggc aag aac aca ggc aat c
2. <b>KpnI-Ru</b> (10328-10349) <b>KpnI-RI</b> (10674-10657)	cca cgg gaa aaa gaa tag ctt c gtt tcg ccg gca ttc ttg
3. <b>EcoRV-Lu</b> (8561- 8582) <b>EcoRV-LI</b> (8978-8955)	gtt gcc cat agc cat aaa ttc g gct gtc acg gtt tta ttt aca tgg
4. <b>EcoRV-Ru</b> (9009-9033) <b>EcoRV-RI</b> (9370-9349)	gga ccc ttt tac taa ccc taa ttc g ctg agt ggc ttt cat cct gga g
5. <b>XhoI-Lu</b> (13450-13468) <b>XhoI-LI</b> (13733-13711)	gtg tca gtc ccc cct gca g gca ggc tta cat ggg agt cta tg
6. <b>XhoI-Ru</b> (13745-13763) <b>XhoI-RI</b> (14166-14148)	gcc tcc aga gcc cct ttt g gca gcg cag cca acc ata g
7. <b>QpU</b> (60701-60721) <b>QpL</b> (61130-61110)	ggt aaa ctc gtg cct gag gag gca gtt gga gca gta cac acg

\* A zárójelben levő számok a primernek a prototípus B95-8 szekvenciáján (Baer és mtsai, 1984) lévő pozícióját jelentik.

**B.**

Primer párok	Amplifikációs körülmények	Ciklusszám
1, 3-6.	95°C 1', 55°C 1', 72°C 1'	35
2, 7	95°C 1', 60°C 1', 72°C 1'	35

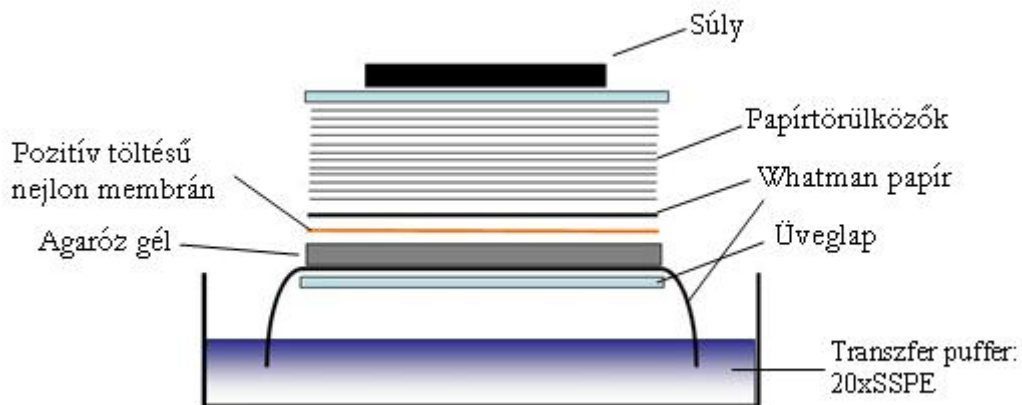
**3.2.3. Southern-blot**

Minta-előkészítés: a DNáz-kezelt minták 10µg-ját az épp használni kívánt próbától függően 200 egység *EcoRV*, *KpnI* vagy *XhoI* restriktív enzimmel (New England Biolabs) emésztettem meg. Az emésztett mintát fenol-kloroform-

izoamilalkoholos extrakció után alkohollal kicsaptam, felvettem 12µl desztillált vízben, majd 3µl „loading dye”-t (brómfenolkék:glicerin:víz, 1:4:4) adtam hozzá.

Az így előkészített mintákat és a DIG-jelölt mólsúly markert (DIG Ladder III, Roche) 1µl 10 mg/ml-es etídium-bromidot tartalmazó 0.8%-os agaróz gélen futtattam 15 percig 50V-on, majd 2 óra 15 percig 100V-on.

A megfuttatott gél először Depurináló oldatban (250mM HCl) áztattam 10 percig, majd 2x20 percig Denaturáló oldatban (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) mostam, hogy egyszálúsítsam a gélben lévő DNS-t, ezután a megfelelő pH visszaállítása érdekében szintén 2x20 percig Neutralizáló oldatban (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.5) billegtettem. Végül a gél 10 percig ázott a blottoláshoz is használt 20xSSPE pufferben (3 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02 M EDTA, pH 7.4). A transzferhez az 5. ábra szerint építettem fel a blottot, és egy éjszakán keresztül blottoltam.



5. ábra: A Southern-blot felépítése.

A pozitív töltésű nejlon membránra átvitt DNS membránhoz való kötődését 4 perces UV megvilágítással stabilizáltam. Ezután a membránt 2 órát pre-hibridizáltam 42°C-on 10ml Standard pufferben (50% deionizált formamid, 5xSSC (20xSSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na-citrát, pH 7.0), 0.1% N-laurozilszarkozin, 0.02% SDS, 2% sovány tejpor), majd rámértem 5ml hibridizáló oldatot – mely 5µl, előzőleg denaturált (95°C 3 perc) DIG-jelölt próbát tartalmazó Standard puffer –, és egy éjszakán át hibridizáltam 42°C-on.

A hibridizált membránt ezután 2x15 percig szobahőn „Low stringency” pufferben (2xSSC, 0.1% SDS), majd 2x15 percig 65°C-on „High stringency” pufferben

(0.1xSSC, 0.1% SDS) mostam, közben rázattam. Ezt követően 1 órát inkubáltam szobahőn Maleinsav pufferben (150mM NaCl, 100mM Maleinsav, pH 7.5) beoldott 1% Blocking reagensben (Roche), amit 10µl Digoxygeninre specifikus anti-DIG-AP-Fab (Roche) ellenanyagot tartalmazó 50ml 1%-os Blocking reagensben való 30 perces inkubálás követett. Az ellenanyag feleslegét 2x15 perces „Washing” pufferes (0.3% Tween 20-at tartalmazó Maleinsav puffer) mosással mostam le, majd a membránt 5 percre Detekciós pufferbe (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, pH 9.5) merítettem. Végül Detekciós pufferben 1:200-hoz hígítottam „CDP-Star”-t (Roche) – ami az anti-DIG ellenanyagon lévő alkalikus-foszfátáz (AP) szubsztrátja –, egyenletesen eloszlattam a membrán felszínén, és 5 percig inkubáltam. A CDP-Star enzimmel való reakciójának eredményeképp felszabaduló fluoreszcens fényt röntgen filmmel tudtam detektálni.

### **3.3. DNS tisztítás**

A sejteket először 1500g-vel 10 percig 4°C-on centrifugáltam. Ezt követően a sejtledeket 2x egymás után foszfát-pufferolt sóban (PBS) szuszpendáltam, majd centrifugáltam, végül a sejteket TE pufferben (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) szuszpendáltam. A sejtszuszpenzió 1 ml-éhez ezután 10 ml extrakciós puffert (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA, 20 µg/ml RNáz, 0.5% SDS) adtam és 1 órán át 37°C-on inkubáltam. Az elegyhez ezután 100 µg/ml végkoncentrációban Proteináz K-t (Roche) adtam, és 3 órán át 50°C-on inkubáltam. A mintákhoz ezután egy térfogat 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)-lel telített fenolt mértem, majd 10 perces forgatást követően 15 percig szobahőmérsékleten 5000g-vel centrifugáltam. A felső vizes fázist ezután egy másik csőbe átpipettáztam, és a fenti fenolos tisztítást még kétszer megismételtem. A felső vizes fázis tisztítását a fenolos tisztításhoz hasonló módon ezután azonos térfogatú kloroformmal is elvégeztem. Ezt követően a vizes fázishoz 0.2 térfogat 10 M ammónium-acetátot és 2 térfogat abszolút etanolt adtam, óvatosan összekevertem, majd 5 percig szobahőmérsékleten 5000g-vel centrifugáltam. Az így kapott DNS csapadékot ezután 70%-os etanollal 2x mostam, majd szobahőmérsékleten szárítottam, és steril desztillált vízben oldottam fel. A DNS oldat koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel, 260 és 280 nm-es hullámhosszúságokon mértem meg.

### 3.4. RNS tisztítás

Az  $5-10 \times 10^6$  sejtet tartalmazó szuszpenziót először 1500g-vel 10 percig 4°C-on centrifugáltam, majd a sejtüledéket 1 ml TRI Reagensben (Sigma) ismételt pipettázással szuszpendáltam fel. Ezután a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd 0.2 ml kloroform hozzáadása után erőteljesen összeráztam, amit 10 percig tartó szobahőmérsékleten végzett inkubálás követett. Az elegyet 12000g-vel 15 percig 4°C-on centrifugáltam. A fugalást követően az elegy három fázisra vált szét: egy alsó, piros fázisra, ami a fehérjéket tartalmazta; egy DNS-t tartalmazó középső fázisra; és egy felső, színtelen, vizes fázisra, amiben az RNS volt. Ezt a felső vizes fázist átvittem egy új Eppendorf csőbe, és 0.5 ml izopropanolt adtam hozzá. 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd 12000g-vel, 10 percig, 4°C-on centrifugáltam. A leülepedett RNS-ről leszívtam a felülúszót, majd 1 ml 70%-os etanollal mostam. Vortexelés után 7500g-vel 5 percig 4°C-on centrifugáltam. A felülúszó eltávolítása után az RNS üledéket hagytam beszáradni, végül 30 $\mu$ l RNáz-mentes (Gibco) vízben vettem fel.

Az RNS oldat tisztaságának ellenőrzésére, és a koncentráció meghatározására UV spektrofotométerben 260, ill. 280 nm-es hullámhosszokon mértem az oldat abszorbanciáját.

Egyes PCR primerek (pl. az LMP2Ap-hez használt primerek) szekvenciájának elhelyezkedése miatt a tisztított RNS-t DNáz I enzimmel kezeltem, hogy átírás ténylegesen csak az mRNS szekvenciájáról történhessen. A DNáz kezeléshez 1 egység RQ1 DNáz-t (Promega) használtam 5 $\mu$ g RNS-hez a megfelelő pufferes környezetben (40mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>), 20 $\mu$ l végtérfogatban, és a mintákat 30 percig 37°C-on inkubáltam. A reakciót az enzim Stop oldatával (2 $\mu$ l 20mM EGTA pH 8.0) állítottam le, majd inaktiváltam az enzimet 65°C-on 10 percig.

### 3.5. RT-PCR

A reverz transzkripció PCR-t 5  $\mu$ g RNS-ből, vagy 1  $\mu$ g DNáz-kezelt RNS-ből (LMP2Ap esetén) kiindulva végeztem. Az átíráshoz használt génspecifikus primereket (Metabion) a 4. táblázatban tüntettem fel. Az RNS-hez 1-1 $\mu$ l 2 pmol/ $\mu$ l-es specifikus primert és 1 $\mu$ l 10mM dNTP mixet (Promega) adtam, majd a térfogatot kiegészítettem

13µl-re RNáz-mentes vízzel. Az elegyet PCR gépben 5 percig 65°C-on inkubáltam, majd minimum 1 percig jégre tettem. Ezután hozzáadtam 4µl 5x „First-Strand” Puffert (Invitrogen; 250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 1µl 0.1 M ditiotreitolt (DTT, Invitrogen), 1µl RNaseOUT rekombináns ribonukleáz inhibitor (Invitrogen, 40 U/µl), és 1µl SuperScript III reverz transzkriptázt (Invitrogen, 200 U/µl). A mintákat ezután PCR gépben 50 percig 42°C-on, majd 15 percig 70°C-on inkubáltam.

**4. táblázat:** Az RT reakcióhoz használt primerek.

Promóter	Primer elnevezése (helye a szekvenciában)*	Primer szekvenciája 5' – 3'
Cp	<b>CRT</b> (11651-11636)	acg tgc agg agg ctg t
Qp	<b>K1</b> (108143-108127)	ctt ggc cct gat cct gag ccg ccc gg
LMP2Ap	<b>L4RT</b> (239-222)	tca gca gtt tcc ttt gtg
LMP1p	<b>LMP1RT</b> (168897-168912)	cca aaa gct gcc aga t
β-aktin	<b>ACTBe5RT</b> (1226-1207) <sup>#</sup>	tgt aac gca act aag tca tag

\* A zárójelben levő számok a primernek a prototípus B95-8 szekvenciáján (Baer és mtsai, 1984) lévő pozícióját jelentik.

<sup>#</sup> A zárójelben levő számok a primernek a NM\_001101 akcessziós számú ACTB mRNS szekvencián lévő pozícióját jelentik.

### 3.6. Real-time PCR

A valós idejű vagy Real-time PCR alkalmas DNS kvantitatív analízisére, tehát ennek segítségével meghatározható a különböző minták relatív DNS koncentrációja. A módszert cDNS templáttal génexpresszió meghatározásra, és Kromatin Immunprecipitáció során nyert DNS templáttal a hiszton acetilációs, ill. -metilációs szint meghatározására használtam.

A reakciót 20µl végtérfogatban végeztem. 10.8µl PCR tisztaságú vízhez (Roche) 3.2µl MgCl<sub>2</sub>-t (25mM, Roche), 1-1µl 5 pmol/µl forward és reverse primert adtam, ill. 2µl-t a LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I „Hot Start” reakció elegyből (Roche), ami FastStart Taq DNS polimerázt, reakció puffert, dNTP-t, 10mM MgCl<sub>2</sub>-t, és SYBR Green I festéket tartalmaz. Ezt a keveréket 20µl-es LightCycler kapillárisba

mértem át, majd a templát 2 $\mu$ l cDNS-t, vagy ChIP DNS-t többszörös pipettázással mostam bele az elegybe. A kapillárisokat adapterekkel Eppendorf centrifugában rövid ideig 600g-vel fugáltam, hogy a reakció keverék a kapillárisok aljára jusson, majd a kapillárisokat a LightCycler készülék tartójába helyeztem, és a PCR reakciót a LightCycler 2.0 (Roche) készülékben futtattam le.

A reakciót 10 perc 95°C-os denaturációval kezdtem, mivel a FastStart *Taq* DNS polimeráz a *Taq* DNS polimeráznak egy olyan termostabil rekombinánsa, amire egy hőre leváló gátló csoportot tettek, ezzel megakadályozva, hogy a specifikus körülményeknél alacsonyabb hőmérsékleten a primerek hozzákötődjenek a DNS-hez, és elongáció történjen. A 10 perc 95°C-os denaturáció alatt az enzimről leválik a gátló csoport, a kétszálú DNS-ből pedig egyszálú DNS lesz. Ezt a 45 ciklusos amplifikációs lépés követte. Minden ciklus három részből állt, egy 3 s-os 95°C-os denaturációs lépésből, egy a primer anellálási hőjének megfelelő hőmérsékletű (ld. 5. táblázat) 5 s-os anellálási részből, és egy 72°C-os, a termék hosszától függő hosszúságú (ld. 5. táblázat) elongációs lépésből. Ezután a termék specificitásának megállapítására olvadási görbét is felvettünk. Ez a minta 95°C-os 5 s-os denaturációját követő gyors 45°C-ra lehűtése után, lassú 0.2°C/s-os újbóli 95°C-ra történő felfűtéséből állt. A Real-time PCR-hez használt primereket és az amplifikáció pontos körülményeit az 5. táblázatban tüntettem fel.

A SYBR Green I a lézer megvilágításból nyert többletenergiát oldatban rotációs energiává alakítja, és így nem emittál, míg a duplaszálú DNS-hez kötődve a rotáció gátolt. Az így foton formájában leadott többletenergia 530 nm-en detektálható. A bekötődött SYBR Green I mennyisége, és így a detektált jel nagysága arányos a kettős szálú DNS hosszával és mennyiségével. A detektálás minden ciklusban az elongációs lépés végén, illetve az olvadási görbe felvétele során, a 45°C-ról 95°C-ra való fűtés alatt folyamatosan történt. Mivel a SYBR Green I minden duplaszálú DNS-hez képes kötődni – beleértve az aspecifikus terméket és az esetlegesen dimerizálódó primereket is –, a hibás koncentráció érték elkerülése érdekében a kapott PCR termékeket az olvadási görbe analízisen kívül még minden esetben agaróz gél-elektroforézissel is ellenőriztem.

Az egyes minták egymáshoz viszonyított koncentrációját úgy kaptam meg, hogy minden egyes primer pár esetén egy kiválasztott minta 10x-es hígítási sorából standard görbét vettem fel, és a többi minta relatív koncentrációját ez alapján számoltam ki a szoftver segítségével.

Expresszió vizsgálat esetén a mérést egy minden sejtvonalban egyaránt kifejeződő génre, a béta-aktinra ( $\beta$ -aktin, ACTB) is elvégeztem, hogy figyelembe vehessem a kiindulási sejtszámban való esetleges eltéréseket. A relatív expressziós értékeket tehát úgy kapjuk, hogy a látens promóterre specifikus primerekkel mért értékeket korrigáljuk a béta-aktin mérésénél kapott értékekkel.

**5. táblázat:** A Real-time PCR primerei. **A:** A látens EBV promóterek expressziós vizsgálatához használt primerek; **B:** A ChIP-DNS-ek méréséhez használt primerek.

**A.**

Promóter	Primer elnevezése (helye a szekvenciában)*	Primer szekvenciája 5' – 3'	Anellációs hő (T <sub>m</sub> ) és elongációs idő
<b>Cp</b>	<b>C1.1</b> (11337-11361)	gat cag atg gca tag aga caa gga c	T <sub>m</sub> =63°C
	<b>C1.2</b> (11642-11626/11479-11473)	agg ctg ttt ctt cag tc/g gtt tag	72°C 7 sec
<b>Qp</b>	<b>Q2</b> (62433-62453)	gga tag cgt gcg cta ccg gat	T <sub>m</sub> =63°C
	<b>K2</b> (108101-108081)	cct cct cgt cct cgt cct ctt	72°C 15 sec
<b>LMP2Ap</b>	<b>L5b</b> (166698-166720)	cga tga gga acg tga atc taa tg	T <sub>m</sub> =60°C
	<b>L4e</b> (80-61)	caa tta cag gca ggc ata ctg gat tc	72°C 10 sec
<b>LMP1p</b>	<b>LMP1codU</b> (169119-169128 /169207-169213)	gag cag gag ggt ga/t cat cag	T <sub>m</sub> =63°C
	<b>LMP1codL</b> (169371-169349)	cgc tac tgt ttt ggc tgt aca tc	72°C 8 sec
<b><math>\beta</math>-aktin</b>	<b>ACTBe4</b> (974-994) <sup>#</sup>	ggc ggc acc acc atg tac cct	T <sub>m</sub> =67→64
	<b>ACTBe5</b> (1175-1155) <sup>#</sup>	agg ggc cgg act cgt cat act	72°C 8 sec

\* A zárójelben levő számok a primernek a prototípus B95-8 szekvenciáján (Baer és mtsai, 1984) lévő pozícióját jelentik.

<sup>#</sup> A zárójelben levő számok a primernek a NM\_001101 akcessziós számú ACTB mRNS szekvencián lévő pozícióját jelentik.

## B.

Promóter	Primer elnevezése (helye a szekvenciában)*	Primer szekvenciája 5' – 3'	Anellációs hő (T <sub>m</sub> ) és elongációs idő
Cp	Cpbrack1 (10981-11005)	gtg cgt cga gtg cta tct ttg gaa c	T <sub>m</sub> =62°C
	BCRII-4 (11110-11087)	act ttg cga gcc ctg cgt ctt gag	72°C 6 sec
Qp	QChIP1 (62294-62317)	cac cac etc cct gat aat gtc ttc	T <sub>m</sub> =63°C
	QChIP2 (62429-62406)	gcc ttt tca agc act ttc gtt ttc	72°C 6 sec
LMP2Ap	TP1p1 (166127-166152)	gaa gcc cac ggg gtt tat gtt tct g	T <sub>m</sub> =67°C
	TP1p4 (166410-166386)	agt tcc tga gag csc agg ggt ctc	72°C 13 sec
LMP1p regulátor régió	LMP1pU (169724-169741)	ggg caa gct gtg gga atg	T <sub>m</sub> =60°C
	LMP1pL (169911-169892)	ctc acc tga acc ccc cta aa	72°C 8 sec
LMP1p iniciációs hely	RPA1 (169372-169392)	cca aga gga gaa gga gag	T <sub>m</sub> = 63°C
	RPA2 (169590-169570)	ggc cta cat ccc aag aaa cac	72°C 10 sec
LMP1p kódoló régió	LMP1e3 (168802-168826)	cca aag gag atc aac caa tag agt c	T <sub>m</sub> =61°C
	LMP1e2 (169122-169103)	tcc tgc tca tgc etc tct gg	72°C 13 sec
BALF2	SDA27 (162475-162496)	ggg tct tgt ggt agg tgt tga g	T <sub>m</sub> =64°C
	SDA28 (162621-162599)	cca gga aca tca aga tca aga ac	72°C 6 sec

\* A zárójelben levő számok a primernek a prototípus B95-8 szekvenciáján (Baer és mtsai, 1984) lévő pozícióját jelentik.

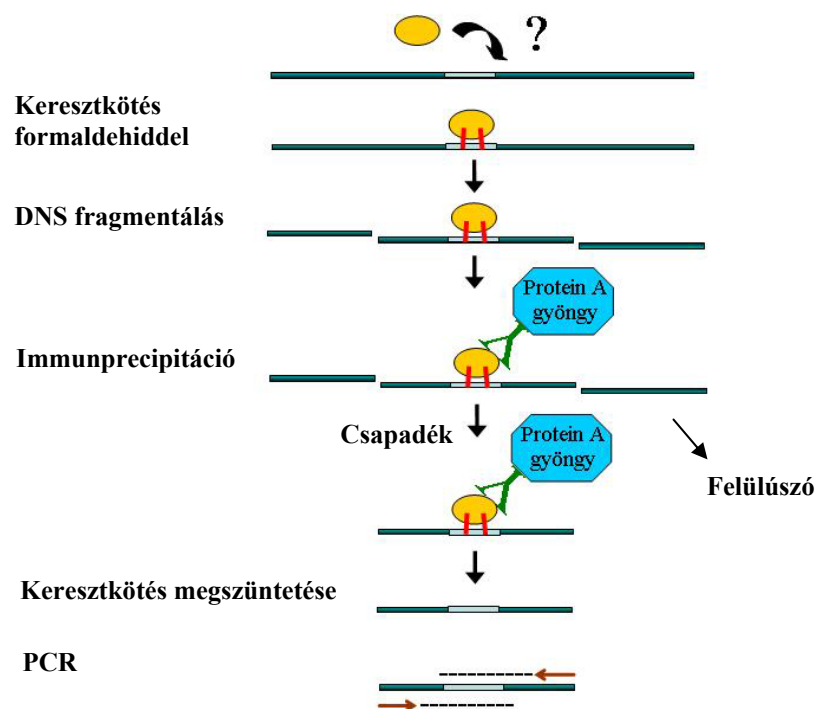
### 3.7. Kromatin Immunprecipitáció (ChIP)

A ChIP módszerrel a DNS-fehérje interakciók *in vivo* kimutatására van lehetőségünk. Az eljárás során kémiai reakcióval kovalensen keresztkötjük az adott sejtvonalban a DNS-hez kapcsolódó fehérjéket, majd az izolált kromatint 500-1000 bp-os darabokra törjük. A vizsgálni kívánt fehérjére, esetemben a különbözőképpen modifikált hiszton fehérjékre specifikus ellenanyaggal, és az ellenanyag Fc-részéhez kapcsolódó Protein-A-agaróz gyöngyökkel kiprecipitáljuk a teljes DNS állományból a kívánt fehérjéhez kapcsolódó DNS fragmentumokat. Ezek után kvantitatív módszerekkel összehasonlítható, hogy a vizsgálni kívánt fehérje a kérdéses DNS



darabhoz kötődve milyen arányban volt megtalálható különböző sejtvonalakban *in vivo*. Tehát a Kromatin Immunprecipitációt követő Real-time PCR reakcióval meg tudtam határozni, hogy a különböző látencia-típusú sejtvonalak egyes látens promótereikhez kapcsolódó hisztonok különböző modifikációi, mint a H3 és H4 hiszton acetiláció, ill. a H3-lizin4 hiszton metiláció egymáshoz képest milyen arányban volt jelen.

A Kromatin Immunprecipitációt kisebb módosításokkal a Weinmann és Farnham (2002) által közölt metodika alapján végeztem, a módszer lényeges lépéseit a 6. ábrán vázoltam fel.



6. ábra: A Kromatin Immunprecipitáció folyamata.

A kiindulási sejtvonalakat felnövesztettem, hogy a kiindulási sejtszám elérje a  $10^6$  sejt/ml-t. A sejteket tartalmazó médium 44 ml-ét 50ml-es falkon csövekbe vittem át, 37%-os formaldehidet (Sigma) adtam hozzá úgy, hogy a végkoncentrációja 1% legyen, majd 10 percig, a csöveket billegtetve, szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezalatt kialakultak a DNS és az ahhoz *in vivo* kötődő fehérjék közötti stabil kovalens kötések. A reakciót 2.5 M-os, 0.125 M végkoncentrációjú glicinnel (Sigma) állítottam le, hogy az aspecifikus kötések kialakulását megakadályozzam. 5 perces 600g-vel, 4°C-on történő centrifugálást követően a mintákat 5 ml jéghideg PBS-ben mostam. Újabb 5

perces 600g-vel, 4°C-on történő centrifugálás után a pelletet 1 ml jéghideg PBS-ben felfuszpendáltam, majd 1.5 ml-es Eppendorf csövekbe vittem át. Ezután 5 percig 1500g-vel, 4°C-on centrifugáltam, amit a felülúszó teljes leszívása után 1 ml Sejt lízis puffer (5 mM PIPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP40) hozzámerése követett. A minta felfuszpendálása után 5 percig jégen inkubáltam, utána 5 percig 1500g-vel, 4°C-on centrifugáltam, majd az üledékhez ismét 1 ml Sejt lízis puffert mértem. Újabb 5 percig jégen inkubáltam a mintákat, majd 5 perc 1500g-vel, 4°C-on történt centrifugálás után a leülepedett sejtmagról leszívtam a felülúszót, és az üledékhez 2 ml, proteáz inhibitor (Roche) tartalmazó Nukleusz lízis puffert (50 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS) adtam. A mintákat 10x 30 s-ig szonikáltam, közben 1-1 perc szünetet tartva. Így a DNS-t a kívánt 500-1000 bp nagyságú fragmentumokra tördeltem. 5 perc 15000g-vel, 4°C-on végzett centrifugálást követően a felülúszót új csövekbe vittem át.

(A szonikált lizátum 100µl-ét 6µl 5M NaCl és 2µl RNáz A (10 mg/ml) hozzáadása után 65°C-on inkubáltam 4 órán keresztül a DNS-fehérje kapcsolatok megszüntetéséért, majd 4µl Proteináz K (20mg/ml) hozzáadása után DNS-t tisztítottam. A kapott DNS-t 2%-os agaróz gélen megfuttatva vizsgáltam a szonikálás minőségét.)

A felülúszó 100 µl-éhez 900 µl IP dilúciós puffert (0,01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl) adtam, majd 20 µl 10 µg/µl-es szonikált hering sperma DNS-t (Sigma), 18 µl 12 mg/ml-es tRNS-t (Sigma), valamint 80 µl előzőleg elkészített, aktivált 50%-os Protein-A-agaróz gyöngyöt (Sigma) mértem hozzá.

(Az 50%-os Protein-A-agaróz gyöngyöt liofilizált Protein-A-agaróz gyöngy TE pufferben (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) történő duzzasztása, és TE-vel végzett négyszeri mosása, majd a lecentrifugált gyöngy térfogatával egyenlő térfogat TE-ben való szuszpendálása után, 400 µg/ml végkoncentrációjú szonikált hering sperma DNS, és 1 mg/ml végkoncentrációjú BSA (New England Biolabs) hozzáadásával nyerjük.)

Az elegyet 30 percig szobahőmérsékleten, forgó állványon inkubáltam. Ezzel a lépéssel előtisztítottam a kromatint. 1 percig 1500g-vel centrifugáltam, majd a felülúszó egyik feléhez 2µl 1 µg/µl koncentrációjú, az adott hiszton modifikációra specifikus ellenanyagot, a másik feléhez 2µl 1µg/µl koncentrációjú immunizálatlan nyúl széruma ellen termeltetett IgG-t adtam (ld. 6. táblázat). Ez utóbbi mintát mint specifikus ellenanyag nélküli kontrollt fogom használni a későbbiekben. A csöveket megvortexeltem, majd 4°C-on inkubáltam egy éjszakán keresztül.

Másnap a mintákat 30 percig, forgó állványon 30µl aktivált 50%-os Protein-A-agaróz gyönggyel inkubáltam. Ez idő alatt a kovalens kötésekkel stabilizált kérdéses fehérje-DNS-fragmentum komplexeket specifikusan felismerő ellenanyagok Fc részükkel hozzákötődtek a gyöngyök felszínén lévő Protein-A molekulákhoz. Így a teljes kromatint tartalmazó mintából azon DNS darabok, amelyekhez a vizsgált fehérje (modifikált hiszton) *in vivo* kapcsolódik, kiprecipitálhatóvá váltak 1 perces 1500g-vel, 4°C-on történő centrifugálást követően. A specifikus ellenanyag nélküli minta felülúszóját mint totál input kromatint (TIC), a későbbiekben pozitív kontrollként használhattam, mivel ez tartalmazza a teljes bevitt kromatinmennyiséget. (Ezeket a TIC mintákat a 65°C-on történő „reverse crosslink” lépésig félretettem, majd utána a többi mintához hasonlóan jártam el velük.)

A csapadékokat egyszer 1 ml Low Salt pufferben (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl), egyszer 1 ml High Salt pufferben (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl), és kétszer 1 ml LiCl Wash pufferben (0.25 M LiCl, 1% NP40, 1% deoxikólsav, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) mostam. A mosások között 10 percig inkubáltam a mintákat, majd 1500g-vel 1 percig centrifugáltam. Ezután kétszer 1 ml TE-ben mostam a pelletet. Ezt 250µl frissen elkészített Elúciós puffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS) hozzáadása követte, amiben 15 percig forgó állványon inkubáltam. Eközben az ellenanyag-fehérje-DNS komplexek leváltak a protein A-agaróz gyöngyökről. A mintákat 1500g-vel 1 percig centrifugáltam, majd a felülúszókat új Eppendorf csövekbe vittem át. A pellethez újabb 250µl elúciós puffert adtam, és 15 percig forgó állványon újra eluáltam. Az 1 perces 1500g-vel végzett centrifugálás végén a felülúszót hozzáadtam az előzőleg eluált felülúszóhoz, így csövenként 500µl mintát kaptam. A fehérje és a DNS molekulák között létrehozott kovalens kötések 20µl 5 M NaCl hozzáadása után 4-5 órás (vagy egy éjszakás) 65°C-on történő inkubálással szüntettem meg („reverse crosslink”).

Ezután 2µl 10 mg/ml Proteináz K hozzámérése következett. Egy óráig 50°C-os vízfürdőben inkubáltam a mintákat, majd a DNS izolálásához csövenként 1 térfogat fenol-kloroform-izoamilalkoholt (25:24:1) adtam. Erős összerázást, és 10 perces 9000g-s centrifugálást követően a felülúszókat új csövekbe mértem át, és 1µl lineáris poliakrilamidot (LPA; Sigma), 0.1 térfogat 3 M pH 5.2 Na-acetátot, valamint 1 térfogat izopropanolt adtam hozzájuk, majd -20°C-on egy órát precipitáltam. 17000g-vel 30 percig centrifugáltam a mintákat, majd a felülúszó leszívása után 1 ml 70%-os etil-

alkoholt mértem a csapadékra, ezt újabb 5 perc 17000g-s centrifugálás követte. Végül a felülúszó minél teljesebb leszívása után a mintákat hagytam megszáradni, és a DNS-t 30µl steril desztillált vízben vettem fel.

A specifikus és aspecifikus ellenanyaggal kezelt, valamint a TIC-et tartalmazó mintákat ezután Real-time PCR-rel analizáltam (ld. 3.6. fejezet).

**6. táblázat:** A ChIP-hez használt ellenanyagok

Ellenanyag megnevezése	Ellenanyag típusa
Anti-acetyl-Histone H3	nyúlban termeltetett, poliklonális IgG, ( <i>Upstate</i> , 06-599)
Anti-acetyl-Histone H4	nyúlban termeltetett, poliklonális IgG, ( <i>Upstate</i> , 06-598)
Anti-dimethyl-Histone H3 (Lys4)	nyúlban termeltetett, poliklonális IgG, ( <i>Upstate</i> , 07-030)
Normal rabbit IgG (kontrol)	nyúlban termeltetett, poliklonális IgG, ( <i>Santa-Cruz Biotechnology</i> , SC-2027)

### 3.8. Trichostatin A kezelés

A Trichostatin A (TSA) egy természetes hidroxamát származék, ami az I. és II. osztályba tartozó hiszton-deacetilázok hatékony inhibitora. TSA kezelés hatására a hisztonok acetiláltsági szintje megemelkedik, így megemelkedik azoknak a géneknek az expressziója, amelyek transzkripciójára a hiszton nagyobb fokú acetiláltsága pozitív hatással van.

Annak érdekében, hogy biztosak lehessünk benne, hogy a génexpresszió növekedését az adott promóteren található hisztonok acetiláltsági fokának növekedése okozta, és nem közvetett módon transzaktivációs mechanizmus áll az expresszió fokozódásának hátterében, a kezeletlen kontroll és a TSA kezelt minta mellett fehérje szintézis gátló cikloheximiddel (CHX) kezelt, és a TSA és CHX együttes hatását mutató kettős kezelésű mintákat is vizsgáltunk.

A kezelést 50 ml kb.  $10^6$  sejt/ml koncentrációjú sejttenyészethez 12µl TSA (1 mg/ml; Sigma), és/vagy 50µl CHX (10 mg/ml; Sigma) hozzáadásával végeztük, majd a

sejtekből 16 óra elteltével izoláltunk RNS-t, ill. kromatint is, hogy Kromatin Immunprecipitációval is igazoljuk a TSA hatását.

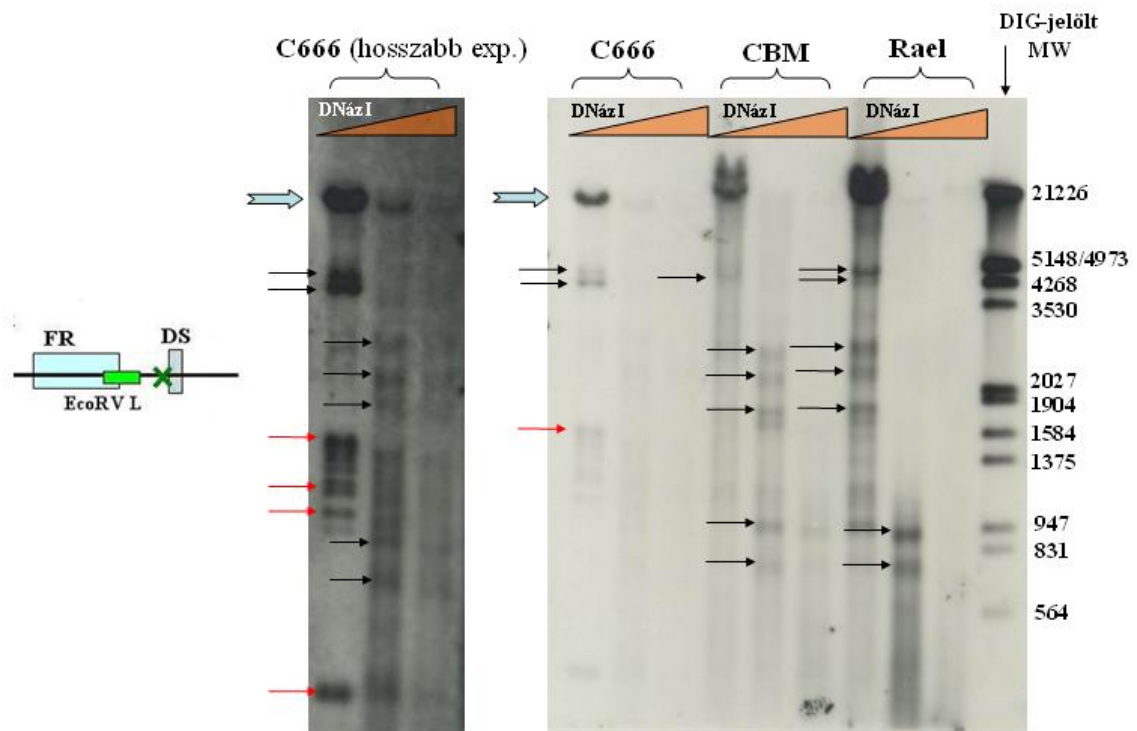
### **3.9. Agaróz gélelektroforézis**

A PCR-ek, ill. Real-time PCR-ek hatékonyságát és a termékek specifikusságát 5 $\mu$ l PCR termék 2%-os, 1xTAE-ban (0.4 M Tris, 0.4 M ecetsav, 0.02 M EDTA) feloldott, 0.5  $\mu$ g/ml Etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen történő elektroforetikus elválasztásával ellenőriztem. A mintákat 2 $\mu$ l 38% glicerint, és 13% OrangeG-t tartalmazó steril desztillált víz hozzáadásával vittem fel a géltre, és 1xTAE futtató pufferben, horizontális kádban 10 percig 50 V-on, majd 50 percig 100 V-on futtattam meg. Az eredményt UV megvilágításban dokumentáltam.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A DNáz I hiperszenzitivitási analízis eredménye

A DNáz I hiperszenzitiv helyek térképezését a 3.2. fejezetben leírtak szerint végeztem el. Az EBV „Locus control” régiójának, ill. az LCR-hez közeli Cp vizsgálatának eredményeit a 8. ábrán és a 7. táblázatban foglaltam össze, ill. egy kísérletet kiválasztva külön szemléltettem a Southern-blot eredményeként kapott hiperszenzitiv helyeket jelentő „band”-eket (7. ábra).



7. ábra: A „Locus control” régió DNáz I hiperszenzitivitási analízisének blot-képe az *EcoRV* restriktív enzim hasítási helyének bal oldalára tervezett próbával (*EcoRV L*), 3 vizsgált sejtvonalban.

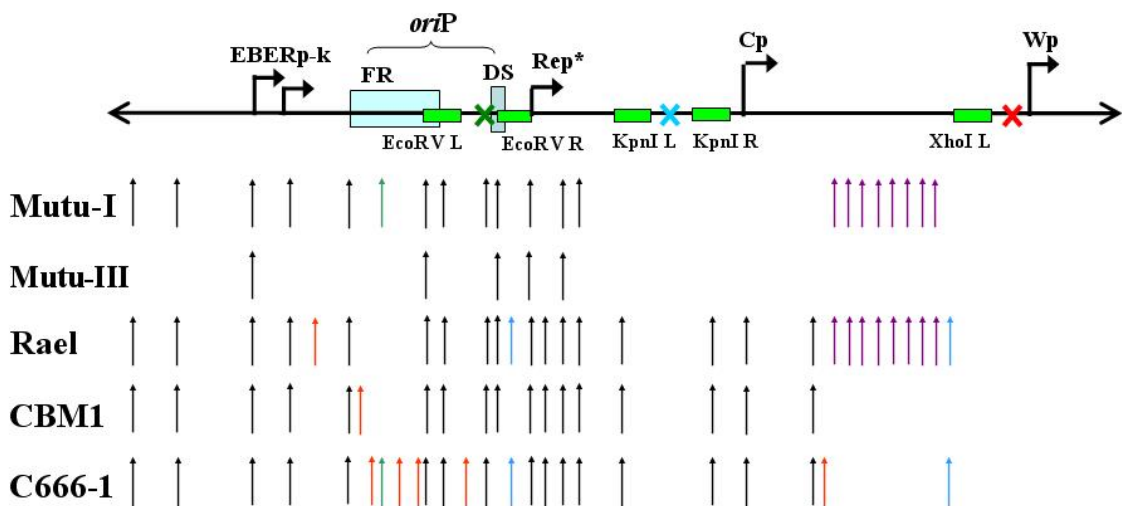
A kísérletben használt hibridizációs próba (zöld téglalap) az *oriP* régió „family of repeats” (FR) és „dyad symmetry” (DS) elemei között, az *EcoRV* hasítóhelytől (8994 bp-nál; zöld X) balra helyezkedik el. A világoskék nyíl az *EcoRV* enzim hasítási termékét jelöli. A fekete nyilak a mindhárom sejtvonalban előforduló közös hiperszenzitiv helyeket (HS), míg a piros nyilak az egyedi HS-eket jelentik.

Az eredmények kiértékeléséhez először ábrázoltam a DIG-jelölt molsúly marker (MW) egyes tagjainak molekuláris tömegét a futási távolságuk függvényében. Az így kapott görbe pontjaira illesztve a hiperszenzitív helyeket jelentő „band”-ek futási távolságát, meg tudtam állapítani az egyes „band”-ek méretét. A hiperszenzitív helyek EBV genom-beli pozícióját a „band”-ek mérete és az adott restriktív enzim hasítóhelyének ismeretében határoztam meg. Mivel a DNáz I hiperszenzitivitási analízis csak ún. durva térképezést tesz lehetővé, a kapott HS-k pontossága +/- 100 bp.

7. táblázat: A megfigyelt hiperszenzitív helyeknek a prototípus B95-8 szekvenciájához viszonyított (Baer és mtsai, 1984) pozíciói az EBV feltételezett „Locus control” régiójában és a C-promóteren. A táblázatban használt színek magyarázata a szövegben található.

Hiperszenzitív helyek (kbp)							
	Mutu-I	Mutu-III	Rael	CBM1	C666-1		
	1	4,5	-	4,5	4,5	4,5	
	2	4,9	-	4,9	4,9	4,9	
	3	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	EBERp-k
	4	6,8	-	6,8	6,8	6,8	
	5	-	-	7	-	-	
	6	7,3	-	7,3	7,3	7,3	
	7	-	-	-	7,4	-	
	8	-	-	-	-	7,5	FR
	9	7,6	-	-	-	7,6	
	10	-	-	-	-	7,8	
	11	-	-	-	-	8	
	12	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	
	13	8,3	-	8,3	8,3	8,3	
	14	-	-	-	-	8,7	DS
	15	9	-	9	9	9	
	16	9,1	9,1	9,1	9,1	-	
	17	-	-	9,2	-	9,2	
	18	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	
	19	-	-	9,4	9,4	9,4	Rep*
	20	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	
	21	9,7	-	9,7	9,7	9,7	
	22	-	-	10	10	10	
	23	-	-	10,7	10,7	10,7	
	24	-	-	11	11	11	Cp
	25	-	-	11,7	11,7	11,7	
	26	-	-	-	-	11,8	
	27	11,9	-	11,9	-	-	
	28	12,1	-	12,1	-	-	
	29	12,3	-	12,3	-	-	
	30	12,4	-	12,4	-	-	
	31	12,6	-	12,6	-	-	
	32	12,8	-	12,8	-	-	
	33	12,9	-	12,9	-	-	
	34	13	-	13	-	-	
	35	-	-	13,1	-	13,1	

A 35 feltérképezett hiperszenzitív helyből 17 a vizsgált sejtvonalak mindegyikében, de legalább három sejtvonalban megtalálható volt. Ezek a közös helyek feketével vannak feltüntetve. Pirossal jelöltem azokat a hiperszenzitív helyeket, amelyek csak egy sejtvonalra voltak jellemzőek. Az ilyen egyedi HS-ek mintegy 70%-át (7-ből 5-öt) a C666-1 sejtvonalnál figyeltem meg. Egy HS-t találtam, amely csak a Mutu-I és a C666-1 sejtvonalban (zölddel jelölve), ill. 2 helyet, ami csak a Rael és a C666-1 sejtvonalban (késsel jelölve) jelent meg. A Mutu-I és Rael esetében ezeken kívül még egy hiperszenzitív régiót találtam, ami a nukleoszómális elrendezésre jellemző 200 bp-os „létrás” mintázatot mutatja (bordóval jelölve, 27-34 HS-k) (ld. 7. táblázat és 8. ábra)



**8. ábra:** A feltérképezett hiperszenzitív helyek látens EBV promóterekhez viszonyított elhelyezkedése.

Az ábra felső részén az egyes enzimhasító-helyeket (zöld X: *EcoRV*- 8994 bp-nál, kék X: *KpnI* - 10312 bp-nál, piros X: *XhoI* - 13734 bp-nál) és a hasítóhelyek két oldalán elhelyezkedő hibridizációs próbák látens EBV promóterekhez viszonyított pozícióját (zöld téglalapok) és elnevezését tüntettem fel. Ez alatt nyilakkal ábrázoltam a vizsgált 5 sejtvonalban kapott 35 HS EBV promóterekhez viszonyított elhelyezkedését, ahol a fekete nyilak a közös, a piros nyilak a kizárólag egy sejtvonalban megjelenő egyedi HS-eket jelentik. Zöld nyíl jelzi a csak a Mutu-I és C666-1 sejtvonalban, kék nyíl a csak a Rael és C666-1 sejtvonalban megjelenő HS-eket, míg a kizárólag a Mutu-I és Rael sejtvonalaknál megjelenő hiperszenzitív régiót bordó nyilakkal ábrázoltam.



A feltérképezett 35 hiperszenzitív helyből 14 található a feltételezett „Locus control” régió területén, 7 db a „dyad symmetry” és C-promóter közti területen (Rep\*), 12 a Cp régióban, ill. 2 helyet találtam az EBER régiótól 5’ irányban is.

A „Locus control” régiótól kb. 50 kbp-nyira 3’ irányban elhelyezkedő Q-promóteren is elvégeztük a hiperszenzitivitási analízist, melynek eredményeképpen 8 hiperszenzitív helyet térképeztem fel (8. táblázat; a táblázatban használt színek megegyeznek a korábban leírtakkal). A kapott HS-ek leginkább a Qp-t aktívan használó sejtvonalakban (Mutu-I, Rael, C666-1) voltak megfigyelhetők, a Qp-t nem használó Mutu-III és CBM1 esetében csak egy HS-t találtam. (Az egyes promóterekre vonatkozó expressziós adatokat a 4.2. fejezetben ismertetem bővebben.)

**8. táblázat:** A Q-promóter területén megfigyelt hiperszenzitív helyeknek a prototípus B95-8 szekvenciájához viszonyított (Baer és mtsai, 1984) pozíciói.

Hiperszenzitív helyek (kbp)					
	Mutu-I	Mutu-III	Rael	CBM1	C666-1
1	-	-	-	-	61,3
2	-	-	61,4	-	-
3	61,5	-	61,5	-	-
4	61,7	-	61,7	-	61,7
5	62	-	62	-	-
6	-	-	-	-	62,3
7	62,5	-	62,5	-	62,5
8	62,8	62,8	62,8	62,8	62,8

## 4.2. A látens EBV promóterek aktivitásának vizsgálata

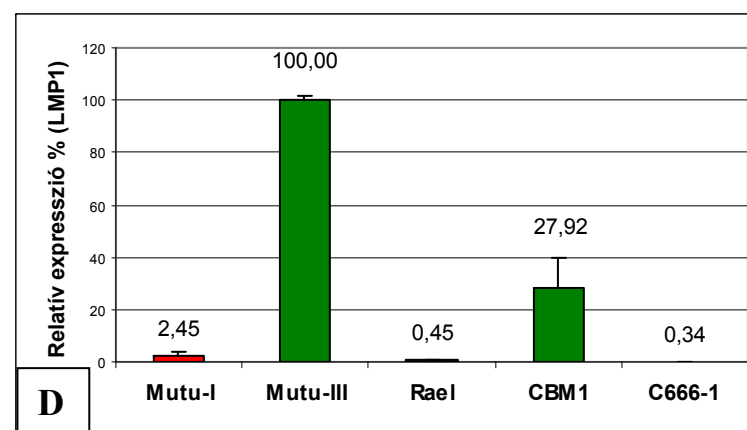
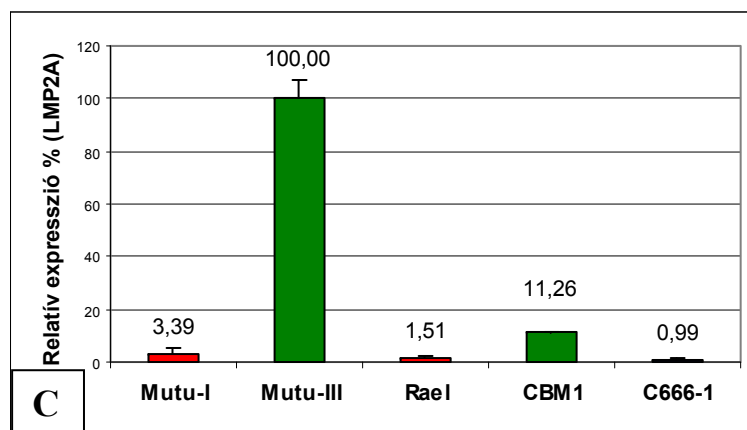
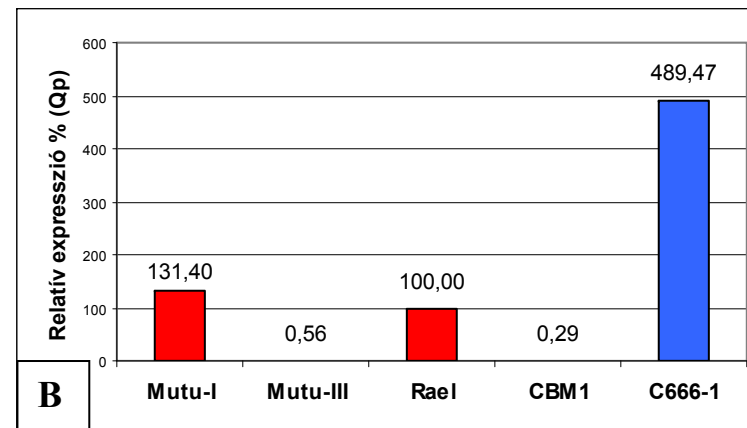
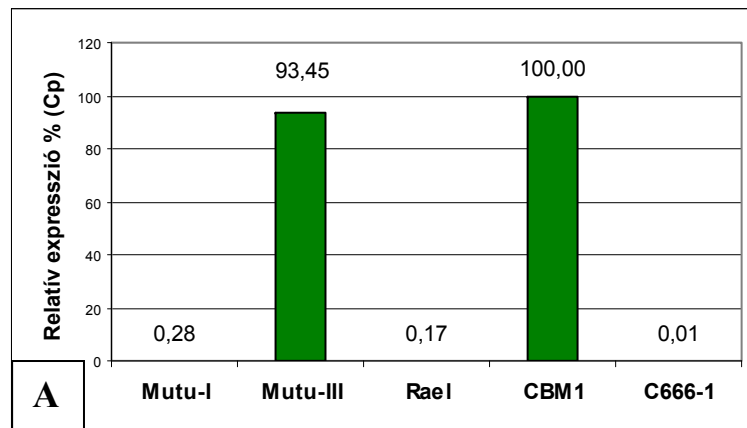
Az expressziós vizsgálatokat a 3.5 és 3.6. fejezetekben leírtak szerint végeztem el és értékeltem. Az eredményeket a 9. *ábra* tartalmazza oszlopdiagram formájában.

A **C-promóter** aktivitásának vizsgálatánál azt tapasztaltam, hogy a III. látencia-típusba tartozó, tehát a Cp-t használó sejtvonalakban (Mutu-III, CBM1) a vártnak megfelelően magas volt a promóter aktivitás, míg a promótert nem használó sejtvonalakban (Mutu-I, Rael, C666-1) ez az expressziós szint 3-4 nagyságrenddel alacsonyabbnak bizonyult. (9.A. *ábra*)

Ennek ellenkezője volt megfigyelhető a **Q-promóter** esetében, ahol az aktív Qp-rel rendelkező I-es látencia-típusú sejtvonalak (Mutu-I, Rael) expressziós szintje igen magas volt, miközben a III. látencia-típusú sejtvonalakban (Mutu-III, CBM1), ahol a Qp inaktív, a Raelnél tapasztalt expressziós szintnek alig 0.2-0.5%-a volt megfigyelhető. Kiugróan magas, a Raelhez viszonyítva is közel 5-szörös promóter aktivitást tapasztaltam viszont a C666-1 NPC sejtvonala esetében. (9.B. *ábra*)

Az **LMP2A** expressziója a Mutu-III sejtvonalaiban volt a legnagyobb mértékű, és a szintén III-as látencia-típusú, LMP2A-t kifejező CBM1 sejtvonala is tízszer magasabb LMP2A expressziót mutatott, mint az LMP2A-t nem használó sejtvonalak (Mutu-I, Rael, C666-1). (9.C. *ábra*)

Az LMP2A-nál megfigyelthez hasonló eredményeket kaptam az **LMP1** expressziós vizsgálatánál is. (9.D. *ábra*)



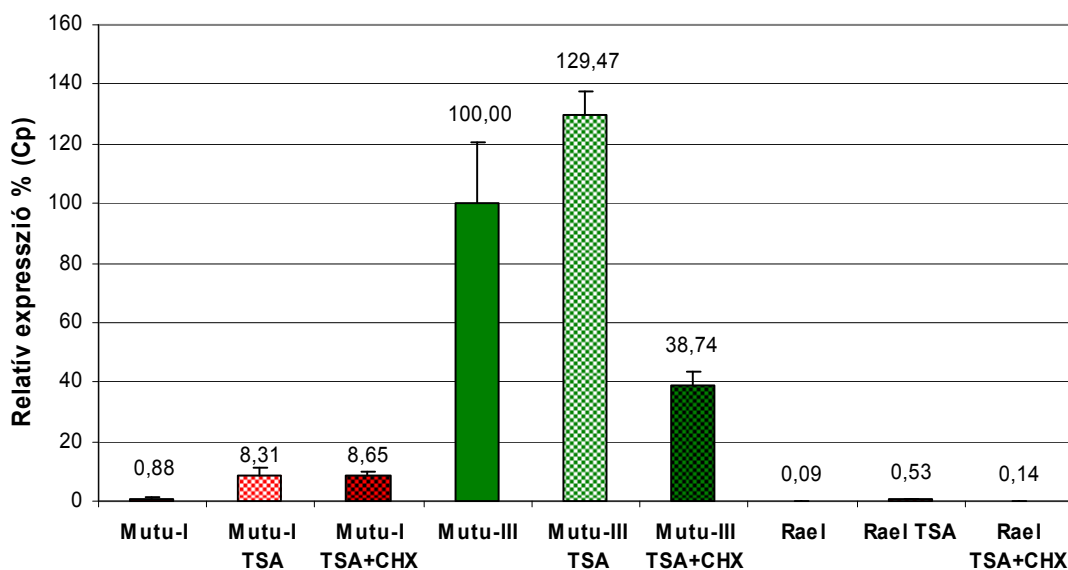
**9. ábra:** Az EBV látens promótereinek aktivitása a különböző látencia-típusú sejtvonalakban.

Az (A) ábra a Cp-, a (B) a Qp aktivitását, a (C) az LMP2A-, a (D) pedig az LMP1 expressziós szintjét mutatja. Pirossal jelöltem az I-es, zölddel a III-as és kékkel a II-es látencia-típusú sejtvonalakat. Mutu-I=Mutu-BL-I-CI-216, Mutu-III=Mutu-BL-III-CI-99, CBM1=CB-M1-Ral-STO

### 4.3. A Trichostatin A kezelés hatása a C-promóter aktivitásra és az LMP2A expresszióra

A Trichostatin A (TSA) kezelést a 3.8. fejezetben leírtak szerint végeztem el. Azt kívántuk ezzel megállapítani, hogy a hiszton-deacetiláz inhibitorok gátlása miatt megemelkedett hiszton acetiláltság milyen mértékben képes változtatni a Cp aktivitásán, ill. az LMP2A expresszión.

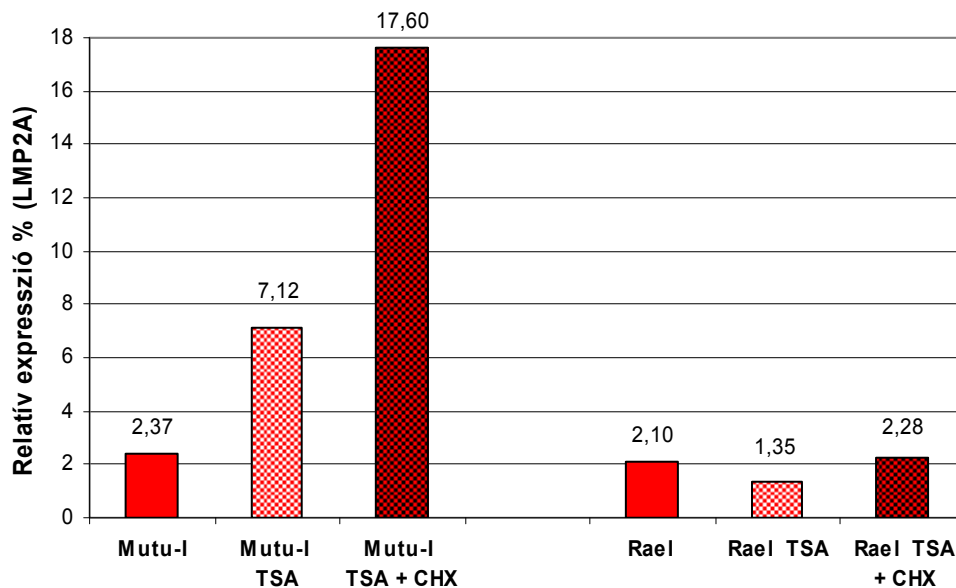
A 10. ábrán jól látható, hogy a TSA önmagában és cikloheximiddel (CHX) együtt alkalmazva is transzkripciót indukált a Cp-ről az alacsony Cp aktivitást mutató Mutu-I sejtvonalban, de ez az érték még a kb. 10-szeres aktiváció-növekedés ellenére sem érte el a Cp-t használó Mutu-III-nál tapasztalt magas promóter aktivitást. Ezzel szemben a szintén Cp inaktív Rael esetében a kezelés kevésbé bizonyult hatásosnak.



10. ábra: A TSA kezelés hatása a C-promóter aktivitásra BL sejtvonalakban.

A TSA kezelés önmagában is kb. háromszorosára növelte az LMP2Ap aktivitását a fehérjét alacsonyan expresszáló Mutu-I sejtvonalban, míg a TSA-t CHX-szel kombinálva további 2.5-szeres aktivitás növekedés volt megfigyelhető. Az LMP2Ap-t szintén nem használó Rael-nél viszont TSA kezelés hatására enyhe aktivitás csökkenést tapasztaltunk, a kombinált kezelés eredménye pedig szinte megegyezett a

kontrol értékkel. A 11. ábrán bemutatott eredményeket a Mutu-III átlagos LMP2A expressziójának százalékos arányában fejeztem ki.



11. ábra: A TSA kezelés hatása az LMP2A expresszióra I-es típusú BL sejtvonalakban.

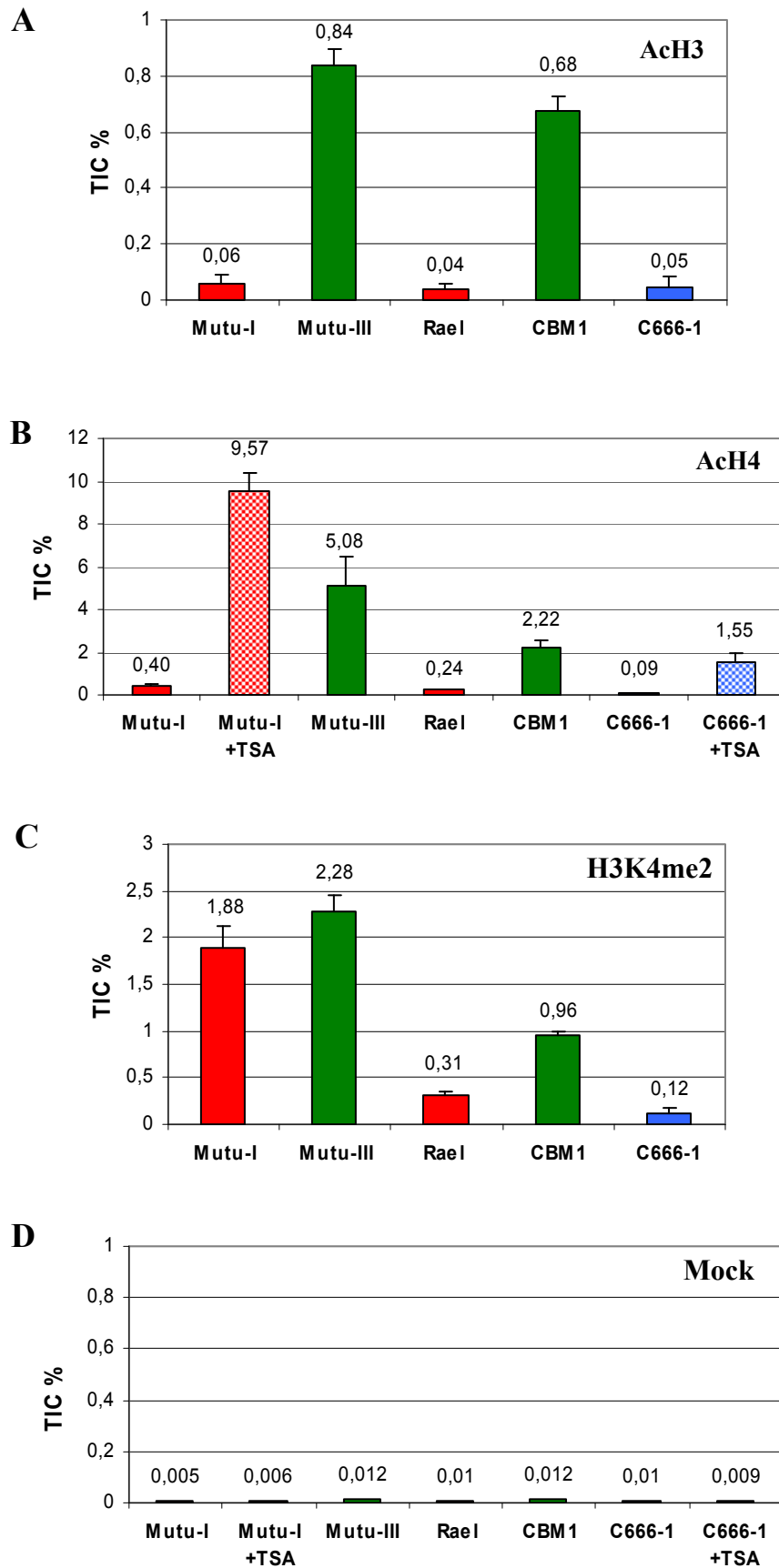
#### 4.4. A hiszton modifikációk kvantitatív analízise

Munkám során a 3.6. és 3.7. fejezetekben leírtak szerint három hiszton modifikációt vizsgáltam, a H3 és H4 hiszton acetilációt (AcH3, AcH4), illetve a H3-as hiszton 4-es pozícióban lévő lizinének (K4) dimetilációját (H3K4me2). Mivel az EBV genom különböző kópiaszámban van jelen az egyes sejtvonalakban, így azonos kiindulási sejtszám esetén sem tükröznék a mért értékek a valós arányokat, az eredményeket a totál input kromatin százalékában (TIC %) adtam meg. A totál input kromatin az adott sejtvonalból a Kromatin Immunprecipitáció során felhasznált teljes kromatinmennyiséget jelenti (ld. még: Anyagok és Módszerek, 42. oldal). Ennek megfelelően, ha minden sejtvonal eredményét a saját totál input kromatinjának arányában számoljuk, akkor egymással is összehasonlítható értékeket kapunk.

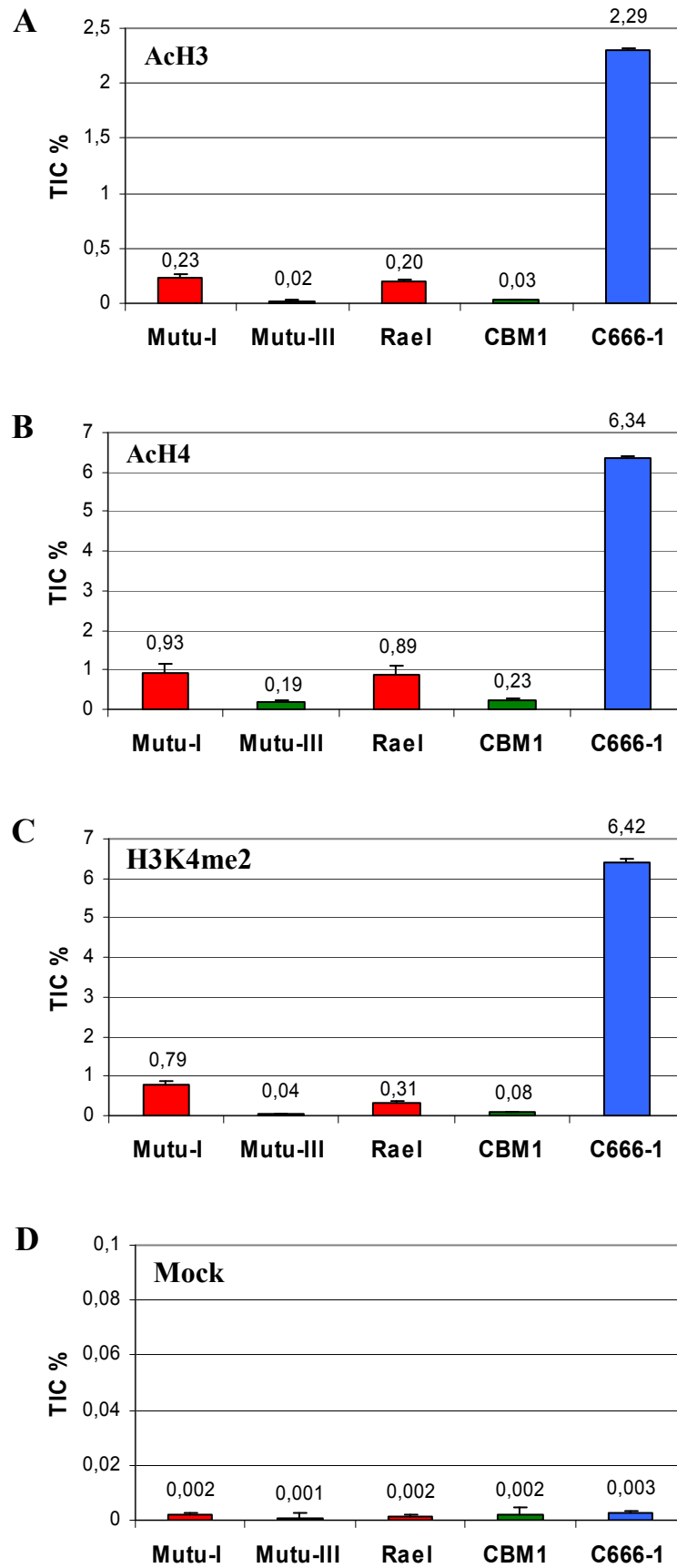
Eredményeimet a 12-16. ábrákon oszlopdiagram formájában foglaltam össze, ahol egységesen pirossal jelöltem az I-es, zölddel a III-as és kézzel a II-es látencia-típusú sejtvonalakat.

A **C-promóter** hiszton acetilációs vizsgálata (12.A. és B. ábra) azt mutatta, hogy az aktív Cp H3 és H4 hisztonjai nagymértékben acetiláltak. Ha összehasonlítjuk az ugyanazon EBV genomot tartalmazó I-es (inaktív Cp) és III-as (aktív Cp) látencia-típusú sejtpárokat, akkor azt láthatjuk, hogy a Cp-t használó CBM1-nél 17-szer nagyobb mértékű a H3-as hiszton acetiláltsága (AcH3), mint a Cp-t nem használó Rael sejtvonalban, míg az aktív Cp-t tartalmazó Mutu-III 14-szeres AcH3 dúsulást mutat a Cp-t nem használó Mutu-I-hez képest. Az I-es látencia-típusú sejtvonalakhoz hasonlóan Cp-inaktív C666-1 H3-as hiszton acetiláltsága is igen alacsonynak bizonyult. Hasonló eredményeket kaptam a H4-es hiszton acetiláció tekintetében is: 9-, ill. 13-szoros dúsulás figyelhető meg a CBM1, ill. Mutu-III sejtvonalban (ahol a Cp aktív) a Cp-t nem használó Raelhez, ill. Mutu-I-hez képest, valamint a C666-1 is erősen hipoacetilált volt. A Mutu-I és C666-1 TSA kezelésének hatására a H4 acetilációs szint jelentősen megnövekedett, mely a Mutu-I-nél meghaladta a Mutu-III-nál kapott értéket is. Bár az irodalomban is aktiváló hatásúként leírt H3K4me2 jól korrelál bizonyos promóterek aktivitásával, meglepetésre összehasonlítható mértékű H3K4me2 szintet detektáltunk a promóter-használatukban eltérést mutató két Mutu klón esetében. Ezzel ellentétben a H3K4 dimetilációs szint háromszor magasabb volt a CBM1 (aktív Cp), mint a Rael (inaktív Cp) sejtvonalban. A legalacsonyabb H3K4me2 jelet a C666-1 sejtvonalnál mértem (12.C. ábra). Az aspecifikus ellenanyaggal kezelt („Mock”-precipitált) mintáknál nem tapasztaltam dúsulást (12.D. ábra).

A **Q-promóter** hiszton modifikációs analízise emelkedett AcH3, AcH4 és H3K4me2 szintet mutatott aktív Qp esetében (Mutu-I, Rael, C666-1), ellentétben az alacsony Qp aktivitást mutató sejtvonalakkal (Mutu-III, CBM1). Kiemelkedően magas – az I-es látencia-típusú sejtvonalaknál (Mutu-I, Rael) kapott értékek 7-10-szerese – volt ezen modifikációk szintje a C666-1 esetében, ami nagyon jól korrelál az itt megfigyelt nagymértékű Qp aktivitással is. A „Mock”-precipitált minták itt is minden esetben alacsony értékeket adtak. (13. ábra)



**12. ábra:** A H3 (A) és H4 (B) hiszton acetilációk, ill. a H3K4 dimetiláció (C) szintje, és a “Mock”-precipitált (aszpecifikus ellenanyaggal végzett) ChIP eredményei (D) a C-promóteren.



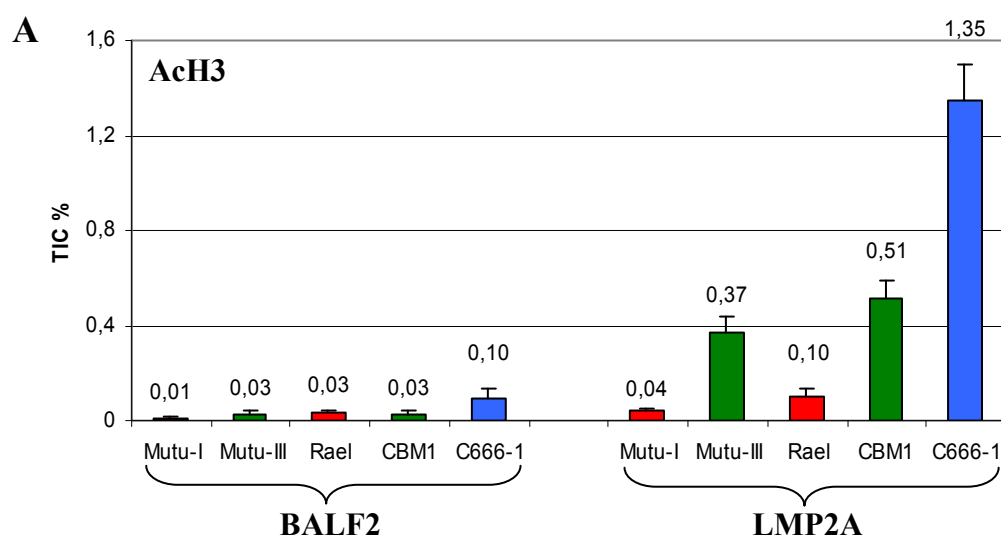
**13. ábra:** A H3 (A) és H4 (B) hiszton acetilációk, ill. a H3K4 dimetiláció (C) szintje, és a “Mock”-precipitált (aszpecifikus ellenanyaggal végzett) ChIP eredményei (D) a **Q**-promóteren



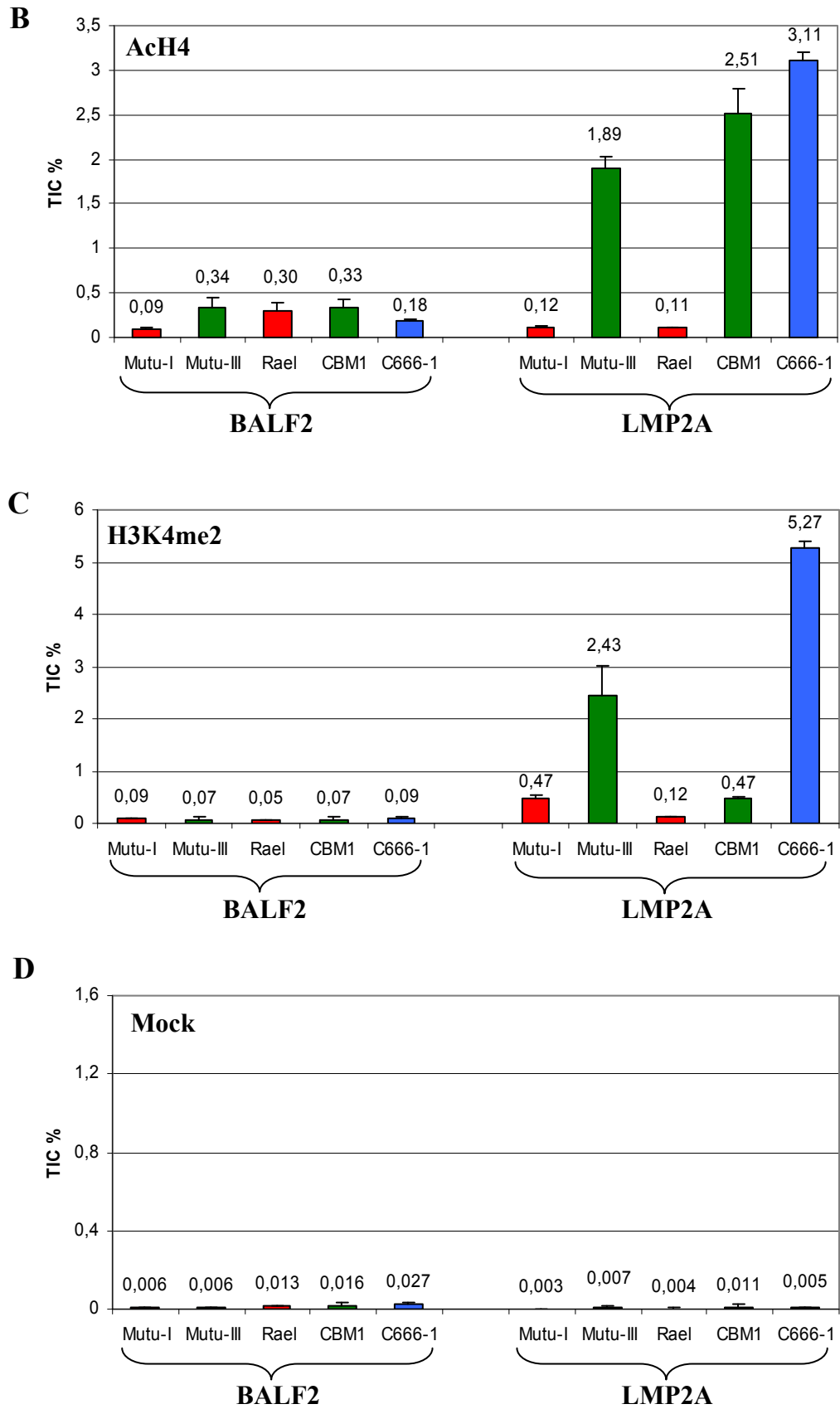
Az **LMP2Ap** vizsgálatánál kontrollként használtunk egy, az LMP2Ap-tól kb. 3.5 kb-ra „upstream” elhelyezkedő, lítikus gént kódoló régiót, a BALF2-t, amely a látens sejtvonalakban inaktív, és. Ez a régió alacsony szintű H3 acetilációt és szintén alacsony vagy gyengén emelkedett H4 acetilációt mutatott a limfoid sejtvonalakban (Mutu-I, Mutu-III, Rael, CBM1). Az LMP2A-promóterek viszont nagymértékben acetiláltak voltak az erős (Mutu-III) vagy visszafogott (CBM1) LMP2Ap aktivitást mutató sejtvonalak esetén, míg az alacsony LMP2A expressziót mutató limfoid sejtvonalak (Mutu-I, Rael) hiszton acetilációs szintje is alacsonynak bizonyult (14.A. és B. ábra). A limfoid sejtvonalak H3K4me2 analízise alacsony dimetilációs szintet mutatott a BALF2 gén kódoló régiójában, míg az LMP2Ap-en ez a hiszton módosulás erőteljes volt a Mutu-III, közepes mértékű a Mutu-I és CBM1, ill. alacsony szintű a Rael sejtvonal esetében (14.C. ábra).

Meglepetésre a C666-1 nazofaringeális karcinóma sejtvonalban mindhárom hiszton módosulás szintje igen magas volt az LMP2Ap-en (és alacsony vagy enyhén emelkedett a BALF2 régióban), annak ellenére, hogy ebben a sejtvonalban alacsony LMP2A aktivitást mértünk.

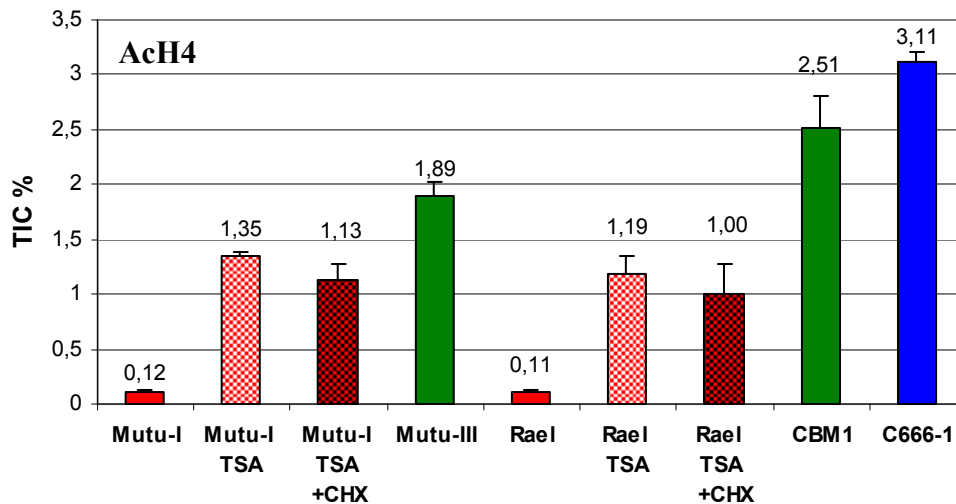
TSA kezelés, ill. TSA és CHX együttes alkalmazása erőteljes H4 acetiláció-növekedést váltott ki a kezelt Mutu-I és Rael sejtvonalakban, melyeknek szintje összehasonlítható volt a III-as látencia-típusú sejtvonalaknál kapott értékekkel (15. ábra).



14.A. ábra: A H3 hiszton acetiláció szintje az **LMP2A**-promóteren és a kontrol **BALF2** régióban.



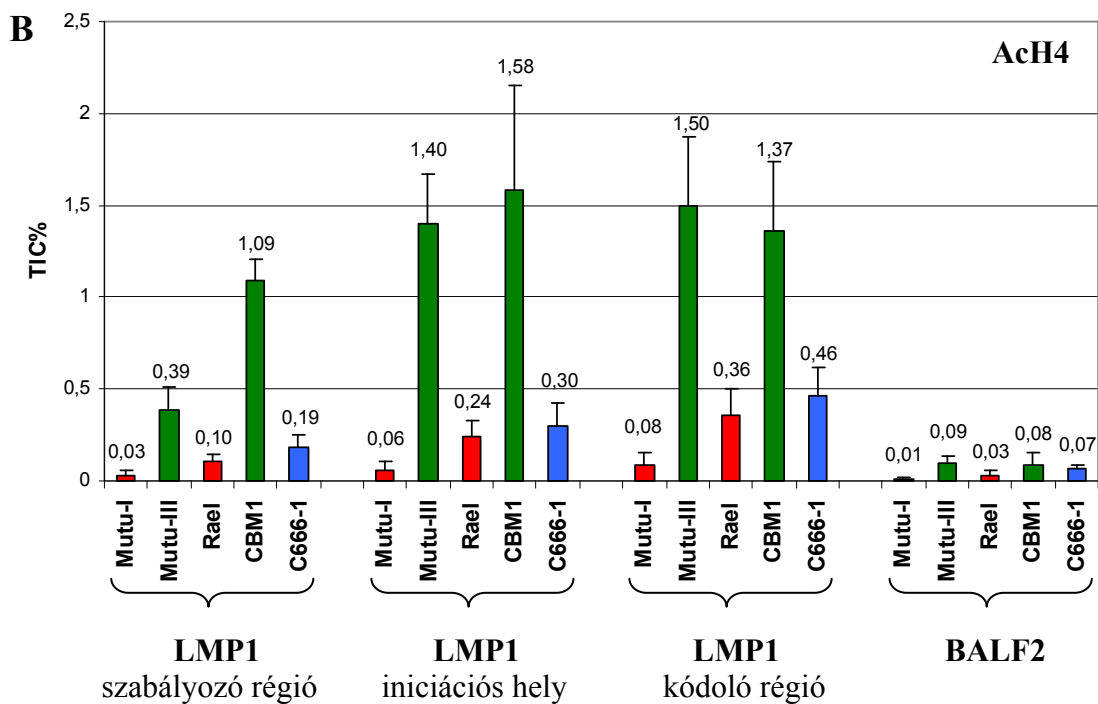
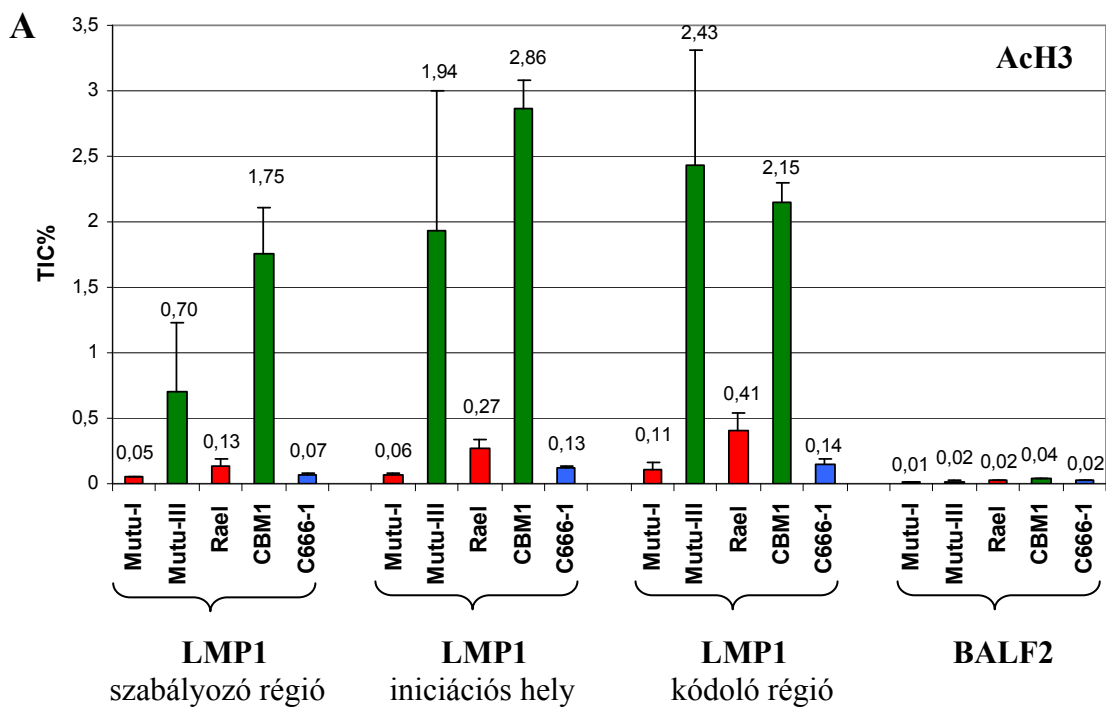
**14. ábra (folyt.):** A H4 hiszton acetiláció (B) és a H3K4 dimetiláció (C) szintje, ill. a „Mock”-precipitált (aszpecifikus ellenanyaggal végzett) ChIP eredményei az **LMP2A-promóter**en és a kontrol BALF2 régióban.



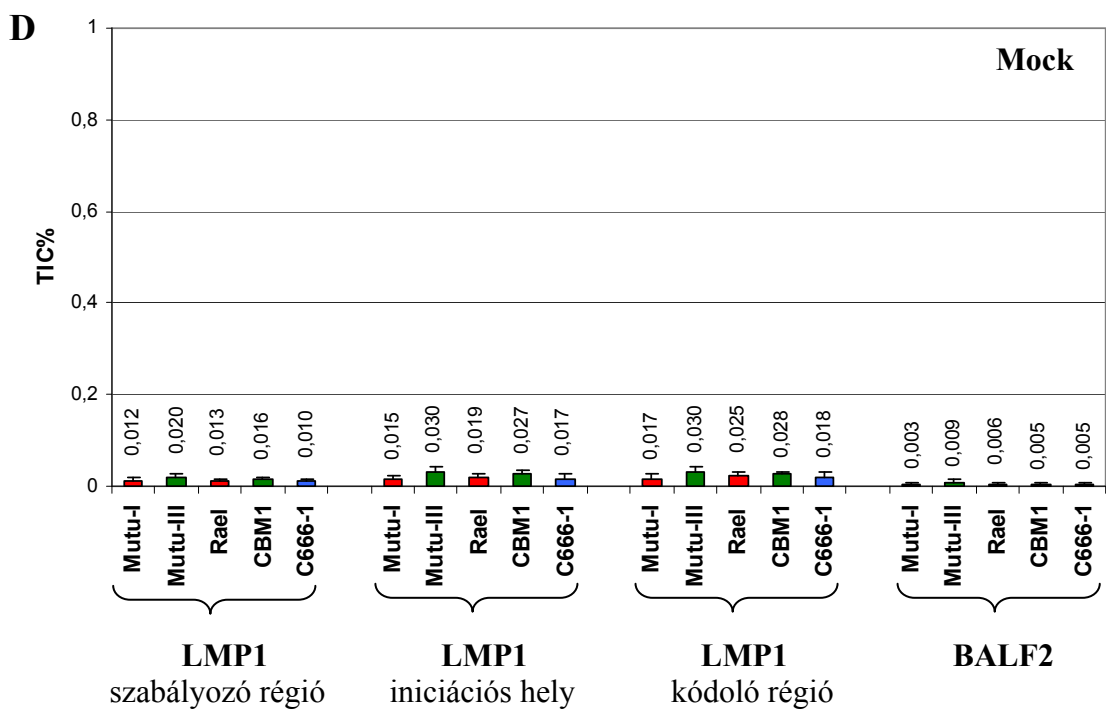
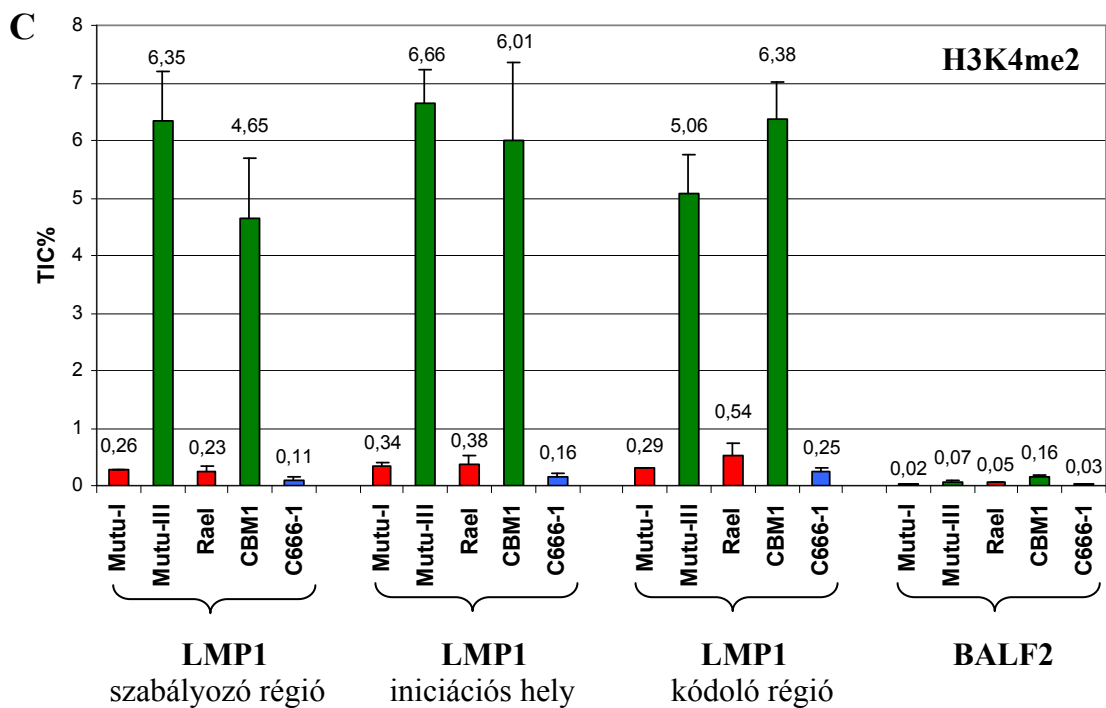
15. ábra: A TSA kezelés hatása a H4 hiszton acetilációra az LMP2Ap-en.

Az **LMP1**-promóter hiszton modifikációs analízisét a promóter szabályozó régióján kívül az iniciációs helyre és a kódoló régióra is kiterjesztettük, így a promóternek mintegy 1100 bp-nyi részét vizsgáltuk. Negatív kontrolként ebben az esetben is a látens sejtvonalakban inaktív BALF2 kódoló régiót használtuk.

Az eredmények azt mutatták, hogy az aktív LMP1p-k (Mutu-III, CBM1) magasan acetiláltak a promóter mindhárom vizsgált régiójában, és ez az acetiláció az iniciációs helyen és a kódoló régióban a legnagyobb mértékű. Az alacsony LMP1 expressziót mutató limfoid sejtvonalak közül a Raelnél enyhe Ach3 és Ach4 emelkedést tapasztaltam a kódoló régió felé haladva, míg a Mutu-I H3 és H4 acetiláltsága végig alacsony maradt. Az LMP1-et szintén alig expresszáló C666-1 Ach3 szintje mindhárom vizsgált LMP1 régióban alacsony volt, ugyanakkor a H4 acetiláció mértéke a szabályozó régióban megközelítette a Mutu-III értékét, és bár a másik két régióban már nem érte el azt, folyamatosan növekedett a kódoló régió felé haladva. A BALF2 kontrol régióban a hisztonok acetilációs szintje alacsony volt. (16.A. és B. ábra) A H3K4 dimetilációt vizsgálva igen magas metilációs értékeket tapasztaltam mindhárom régióban a III-as látencia-típusú, LMP1-et használó sejtvonalakban (Mutu-III, CBM1), mely egyes esetekben az LMP1p inaktív sejtvonalaknál (Mutu-I, Rael, C666-1) mért értékek 20-30-szorosa volt. A BALF2 régió H3K4me2 szintje ennél is alacsonyabbnak bizonyult (16.C. ábra). Az aspecifikus ellenanyaggal kezelt („Mock”-precipitált) mintáknál itt sem tapasztaltam dúsulást (16.D. ábra).



16.A. és B. ábra: A H3 (A) és H4 (B) hiszton acetilációk szintje az *LMP1*-promóter egyes régióiban, ill. a kontrol BALF2 régióban.



**16.C. és D. ábra:** A H3K4 hiszton dimetiláció (C) szintje és a „Mock”-precipitált (aszpecifikus ellenanyaggal végzett) ChIP eredményei az **LMP1**-promóter egyes régióiban, ill. a kontrol **BALF2** régióban.

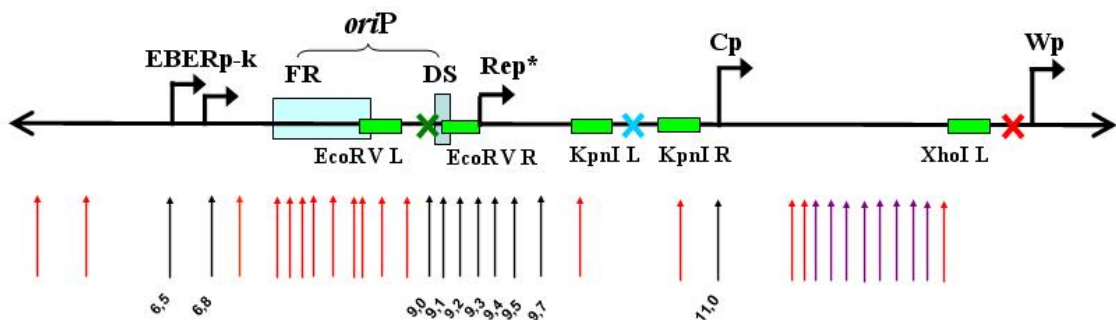
## 5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az EBV „Locus control” régiójában feltérképezett nagyszámú hiperszenzitív hely (HS) a kapott egyedi, sejtvonala specifikitást mutató HS-ek ellenére is e régió látencia-típustól független nyitott kromatinstruktúráját feltételezi. Ez nem meglepő, hiszen az LCR területén lévő EBER-ek látencia-típustól függetlenül mindig kifejeződnek, és a látens replikációs origó (*oriP*) is minden esetben aktív. A kapott eredmények továbbá jó összefüggést mutatnak az EBERp-ken és az *oriP* régióban megfigyelt aktiváló hiszton modifikációk magas szintjével is (Chau és Lieberman, 2004). A finomtérképezésre használt, 1 bp-os pontosságú *in vivo* „genomic footprinting” (fehérje-lábnyom) technikával már korábban kimutatott lehetséges protein-kötő helyek pozíciói jól egyeznek az általam feltérképezett, +/- 100 bp pontosságú hiperszenzitív helyek pozícióival az EBERp-k (Niller és mtsai, 2003), az *oriP* (Niller és mtsai, 1995) és a Rep\* (Niller és mtsai, 2001) vizsgált régióinak tekintetében is (17. ábra). Az *oriP* régió belül eddig csak a „dyad symmetry”-t (DS) vizsgálták ezzel a technikával, a DNáz I hiperszenzitivitási analízis során viszont több HS-t mutattunk ki a „family of repeats” (FR) területén is. Ennek alapján mindenképpen érdemes lenne ezt a régiót további finomtérképezésnek alávetni, különös tekintettel az e régióban egyedi HS-eket mutató C666-1-re (17. ábra).

A Mutu-I és Rael sejtvonala knál a Cp régió területén megfigyelt nukleoszómális elrendezésre utaló mintázat az I-es látencia-típusú sejtvonala Cp inaktivitásával lehet összefüggésben. A szintén inaktív Cp-vel jellemezhető C666-1 nazofaringeális karcinóma sejtvonala knál ugyanakkor nem figyeltük meg ezt a mintázatot. A Cp területén talált HS-k a fent említetteken kívül nem mutattak látencia-típus specifikusságot. Összevetve a Cp HS analízisének eredményeit a Cp korábbi *in vivo* „footprinting” analízisének (Salamon és mtsai, 2001) adataival, a rövid vizsgált régió következtében csak egy pozícióban (11 kbp-nál) találtunk egyezést. A Cp régióban kapott nagyszámú HS alapján mindenképpen érdemes lenne elvégezni a promóter még eddig nem vizsgált régióinak „footprinting” vizsgálatát is.

Az LCR-nél tapasztaltakkal ellentétben a „Locus control” régiótól kb. 50 kbp-ra 3' irányban elhelyezkedő Q-promóteren már látencia-típus specifikus hiperszenzitív helyeket térképeztem fel, melyek jól korreláltak a Qp aktivitásával és az aktiváló hiszton modifikációk jelenlétével (ld. lentebb). Érdekes azonban, hogy a Qp *in vivo*

„footprinting” analízise egy, a Qp-t nem használó sejtvonalaknál megjelenő, feltételezhetően represszor jellegű protein kötőhelyétől eltekintve látencia-típustól független fehérje-kötő mintázatot mutatott a promóter vizsgált régiójában (Salamon és mtsai, 2001). Elképzelhető, hogy e represszor fehérje bekötődése úgy módosítja a kromatin szerkezetét, hogy a transzkripció már nem tud elindulni, és ez megmagyarázza a hiperszenzitív helyek hiányát az inaktív Qp-knél.



17. ábra: A "Locus control" régió és a C-promóter feltérképezett hiperszenzitív helyeinek aránya a "footprinting" analízissel is vizsgált protein-kötő helyekhez.

Az ábra felső részén az egyes enzimhasító-helyeket (zöld X: *EcoRV*- 8994 bp-nál, kék X: *KpnI* - 10312 bp-nál, piros X: *XhoI* - 13734 bp-nál) és a hasítóhelyek két oldalán elhelyezkedő hibridizációs próbák látens EBV promóterekhez viszonyított pozícióját (zöld négyszögek) és elnevezését tüntettem fel. Ez alatt nyilakkal ábrázoltam a vizsgált 5 sejtvonalban kapott 35 HS EBV promóterekhez viszonyított elhelyezkedését. A fekete, számmal is ellátott nyilak jelentik a korábban „footprinting” analízissel is vizsgált protein-DNS kötő helyek pozícióival egyező HS-k elhelyezkedését. A nyilak alatti számok a hiperszenzitív helyeknek a prototípus B95-8 szekvenciájához (Baer és mtsai, 1984) viszonyított pozícióját jelzik kbp-ban. Piros nyilakkal ábrázoltam a még finomtérképezésre váró régiók HS-einek helyzetét. A kizárólag a Mutu-I és Rael sejtvonalaknál megjelenő nukleoszómális mintázatra utaló hiperszenzitív régiót bordó nyilakkal ábrázoltam.

Az egyes látens EBV promóterek (Cp, Qp, LMP1p, LMP2Ap) **expressziós vizsgálatával** egy érzékeny kvantitatív módszerrel sikerült igazolnom az irodalomban leírt látencia-típusokra jellemző adatokat (Rickinson és Kieff, 1996). Bár a Real-time PCR érzékenysége miatt az adott promótert nem használó sejtvonalak esetén is kimutatható volt minimális promóter aktivitás, ez azonban a legtöbb esetben a promótert aktívan használó sejtvonalaknál mért értékek 1%-át sem tette ki. A II-es látencia-típusú NPC biopsziák (Chen és mtsai, 1995) és NPC sejtvonal (Cheung és mtsai, 1999) LMP1 és LMP2A expressziójára vonatkozó eddigi ellentmondásos megfigyelések

kiegészíthetők azzal, hogy a C666-1 NPC sejtvonalon az I-es látencia-típusoknál mért értékekhez hasonlóan alacsony LMP1p, ill. LMP2Ap aktivitást mértem.

Az EBV látens promóterein végzett **hiszton modifikációs analízis**ről elmondható, hogy a vizsgált aktiváló hatású hiszton acetilációk és a szintén aktiváló hatással bíró H3K4 dimetiláció jelenléte az esetek többségében – az irodalomban leírtakkal megegyezően – jól korrelált a promóter-aktivitással.

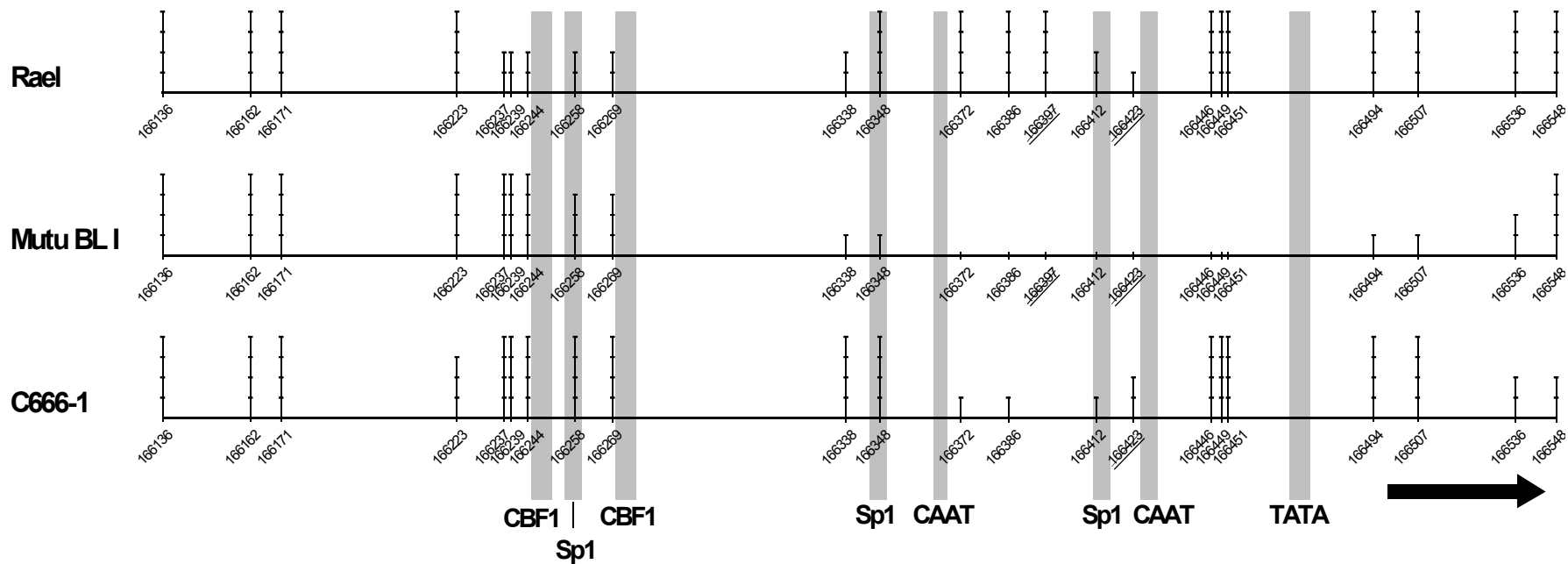
Az aktív **C-promótere**knél kapott magas, és az inaktívknál megfigyelt alacsony H3 és H4 acetilációs szint jó összefüggést mutatott az inaktív Cp szabályozó régiójának nagymértékű DNS metilációjával (Altiok és mtsai, 1992; Minarovits és mtsai, 1994b; Robertson és mtsai, 1995; Salamon és mtsai, 2001; Bakos és mtsai, 2007), hiszen a metilált CpG-ben gazdag régiókhoz gyakran hiszton-deacetilázok kapcsolódnak (Jones és mtsai, 1998; Nan és mtsai, 1998; Fuks és mtsai, 2000). Eredményeink azt mutatták, hogy az EBV genomok aktív C-promótereinek egy AcH3 és AcH4-ben gazdag területen lokalizálódnak, mely hasonlít a Roh és mtsai (2005) által leírt, a humán T sejtek aktív kromatin doménjeinél megfigyelt acetilációs szigetekhez. A hiszton acetilációknak a C-promóter szabályozásában betöltött szerepét igazolta továbbá az is, hogy a hiszton-deacetiláz inhibitor a kezelt Mutu-I és Rael sejtvonalakban megnövekedett Cp aktivitást, ill. a Mutu-I és C666-1 sejtvonalakban emelkedett AcH4 szintet eredményezett. A H3K4 dimetiláció vizsgálatánál viszont nem várt eredményt is kaptunk. A Mutu-I-nél ugyanis, az inaktív Cp ellenére magas H3K4me2 szintet mértünk, mely ellentmond a korábban leírtaknak, miszerint szoros korreláció van a Cp aktivitás és a H3K4 dimetilációs szint között (Chau és Lieberman, 2004). Ez az ellentmondás könnyen magyarázható sejtenyésztes-beli különbségekkel. A Mutu-I-nél a Cp-n tapasztalt magas H3K4me2 szint pedig – a  $\beta$ -globin gének inaktív promótereinél megfigyeltekhez hasonlóan (Schneider és mtsai, 2004) – hozzájárulhat a kromatin ún. „készenléti” állapotának fenntartásához, mely alapja lehet például a vírus promóterváltásának.

Míg a Cp szabályozásában mind a DNS metiláció, mind a hiszton modifikációk (ld. fent) szerepet játszanak, addig a **Q-promóter** aktivitásától függetlenül mindig metilálatlan (Tao és mtsai, 1998; Salamon és mtsai, 2001; Bakos és mtsai, 2007). Megfigyeléseink alapján az aktív Cp-hez hasonlóan a limfoid és epitéliális sejtek aktív Q-promótereinek is AcH3 és AcH4-ben gazdag acetilációs szigetekhez köthetők, ill. magas H3K4 dimetilációs szinttel jellemezhetők. Az aktív Qp-n megfigyelt magas hiszton acetilációs és H3K4me2 szint a C666-1 sejtvonalon esetében volt a legnagyobb mértékű,



mely jól korrelált az itt tapasztalt kiemelkedően nagy promóter aktivitással is. Eredményeink részben különböznek a korábban Day és mtsai (2007) által leírtaktól, ők ugyanis nem detektáltak AcH3 dúsulást a Mutu-I aktív Q-promóterén, ugyanakkor a mi méréseinkkel egyező, emelkedett H3K4me2 szintet tapasztaltak a Mutu-I és Raji (egy Qp-t nem használó BL sejtvonallal) esetében is. A kísérletek eredményei közti eltérések feltehetőleg setvonal-, sejttenyésztés- és módszerhasználat-beli különbségekből adódhatnak. Az itt felsorolt hiszton modifikációkon kívül a Qp aktivitás szabályozásában feltételezzük még egy gátló protein szerepét is (Salamon és mtsai, 2001).

Az **LMP2Ap** hiszton modifikációs analízise megmutatta, hogy a korábban megfigyelt DNS metiláció – LMP2A expresszió negatív összefüggés mellett (Salamon és mtsai, 2003), létezik a transzkripció hiszton acetilációval és H3K4 dimetilációval mutatott pozitív korrelációja is. A limfoid sejtek aktív LMP2A-promóterein megfigyelt emelkedett H3 és H4 hiszton acetiláltsága, magas H3K4me2 szintje, valamint az LMP2A-t alacsonyán expresszáló Mutu-I hiszton-deacetyláz inhibitor (TSA) kezelés hatására tapasztalt megnövekedett promóter-aktivitása és AcH4 szint emelkedése kivétel nélkül mind ezen hiszton modifikációknak az LMP2Ap szabályozásában betöltött szerepét igazolja. A TSA-kezelés eredményei mindemellett rámutattak arra is, hogy ez a reguláló szerep nem kizárólagos: a DNS metiláció és a hiszton deacetyláció együttesen vesznek részt a transzkripció gátlásában, és bizonyos CpG-k metiláltsága kiemelkedően fontos a szabályozásban. A két alacsony LMP2A expresszióval jellemezhető BL sejtvonallal közül ugyanis csak a Mutu-I esetén sikerült TSA-val, ill. TSA+CHX kombinációjával LMP2A aktivitást indukálni, a Raelben nem. Ennek hátterében az állhat, hogy az I. látencia-típusú sejtvonalakban az LMP2Ap átlagosan magas metilációs szintje mellett eltérések figyelhetők meg a transzkripció iniciációs helyétől 5' irányban elhelyezkedő CpG dinukleotidok metiláltsági állapotában (18. ábra). A Rael sejtvonallal ezen a helyen is erősen metilált CpG-ket találunk, míg a Mutu-I-ben egy nagyobb hipometilált/metilátlan régiót. Mindebből arra következtethetünk, hogy ennek a régióknak a DNS metilációs állapota befolyásolhatja a hiszton acetiláltsági szint növelésével elérhető transzkripciónövekedést. Ezen kívül a Mutu-I-nél megfigyelt (a CBM1-gyel azonos mértékű) gyenge H3K4me2 emelkedés – egy már nyitottabb kromatinszerkezetet feltételezve – is magyarázhatja a Mutu-I TSA-val való jobb indukálhatóságát.



**18. ábra:** Az *LMP2A* megszekvenált régiójának metilációs mintázata a *Rael*, *Mutu-I* és *C666-1* sejtvonalakban.

A számok és a függőleges oszlopok a CpG dinukleotidok citozinjainak a prototípus B95-8 szekvenciájához (Baer és mtsai, 1984) viszonyított pozícióját jelölik. Az aláhúzott számok olyan CpG dinukleotidokat jelölnek, amelyek hiányoznak a B95-8 szekvenciából. A citozinok metiláltságának mértékét a függőleges oszlopok magassága reprezentálja: egy egység: 0-25%, két egység: 25-50%, három egység: 50-75%, négy egység: 75-100%. A teljesen metilálatlan CpG dinukleotidok citozinjait rövid vonalak jelölik a megfelelő pozícióban. A függőleges szürke sávok a korábban leírt hipotetikus *in vitro* kötőhelyeket mutatják. Az *LMP2A* transzkripciójának iniciációs helyét vastag fekete nyíl jelzi. Mutu BL I = Mutu-BL-I-CI-216, CBF1 = C-promóter kötő fehérje (Gerle és mtsai, 2007)

A C666-1 NPC sejt vonal esetén meglepetésre – az alacsony LMP2A expresszió ellenére is – nagymértékű H3 és H4 acetiláltságot és magas H3K4me2 szintet detektáltunk az LMP2Ap-n. Ezen ellentmondásos eredmények alapján feltételezzük, hogy az aktiváló hiszton modifikációk hatását a DNS metiláció ellensúlyozza, ugyanis a C666-1-ben az LMP2Ap regulátor régiójának és a transzkripció iniciációs hely környezetének CpG dinukleotidjai erősen metiláltak, csak a két CAAT-box közti területen találunk egy hipometilált régiót, amely a Mutu-I-ben megfigyelnél kisebb és a Raelhez hasonlóan nem terjed ki a transzkripció iniciációs helyére (18. ábra). Hogy tisztázzuk, ezek a megfigyelések specifikusan a C666-1 sejtekre jellemzőek, vagy NPC sejt vonal-beli sajátosságok, további EBV pozitív NPC sejt vonalak és biopsziák vizsgálatára lenne szükség.

Az aktív **LMP1-promóterek**nél tapasztalt, a promóter vizsgált régióiban (szabályozó régió, iniciációs hely, kódoló régió) megfigyelt magas hiszton acetilációs- és H3K4 dimetilációs szint jól korrelált mind az expressziós adatokkal, mind pedig az aktív LMP1p-k szabályozó régiójának és iniciációs helyének hipometilációjával (Takacs és mtsai, 2001). Az aktiváló hiszton modifikációk teljes promóter régióra kiterjedő magas szintje nyitott kromatinstruktúrát feltételez az aktív LMP1p régiókban. Ezzel szemben más inaktív LMP1p-khez hasonlóan a C666-1 sejt vonal ezen régiója szintén nagymértékben hipermetilált (az erre vonatkozó adatokat még nem közöltük le).

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során episzómális EBV genomokat látenszen hordozó, a vírus három fő látencia-típusát reprezentáló limfoid sejtvonal-párokon és nazofaringeális karcinóma sejtvonalban vizsgáltam az EBV feltételezett „Locus control” régiójának, C- és Q-promóterének hiperszenzitív helyeit, valamint az EBV főbb látens promótereinek aktivitását, ill. aktiváló hiszton modifikációit.

Főbb megállapításaim a következők:

- 1) Az EBV „Locus control” régiójában és a közeli Cp területén összesen 35 közös, ill. egyedi hiperszenzitív helyet térképeztem fel, melyek nem mutattak látencia-típus specificitást; a kapott egyedi hiperszenzitív helyek is inkább sejtípus-specifikusak voltak.
- 2) Az I-es látencia-típusú sejtvonalakban a Cp egy régiója nukleoszómális elrendezésre utaló mintázatot mutatott, mely ezen sejtvonalak Cp inaktivitásával lehet összefüggésben.
- 3) Az LCR-nél tapasztaltakkal ellentétben a Qp-en 8 látencia-típus specifikus hiperszenzitív helyet térképeztem fel, melyek jól korreláltak a Qp aktivitásával és az aktiváló hiszton modifikációk jelenlétével.
- 4) Az EBV főbb látens promótereinek általam megfigyelt aktivitása egyezik az irodalomban leírtakkal, mely szerint az I-es látencia-típusú limfoid sejtvonalakban a Cp, LMP1p és LMP2Ap inaktív, a Qp pedig aktív, míg a III-as látencia-típusnál ennek fordítottja figyelhető meg.
- 5) Az eddig kevésbé vizsgált, II-es látencia-típusúnak leírt C666-1 NPC sejtvonalnál alacsony Cp aktivitást, alacsony LMP1 és LMP2A expressziós szintet, valamint kiemelkedően magas Qp aktivitást figyeltem meg. Ez alapján a C666-1 esetünkben nem a II-es, hanem az I-es látencia-típusra jellemző expressziós mintázatot mutatta.

- 6) A C-promóter hiszton modifikációs vizsgálata során megfigyeltük, hogy az aktív Cp-k nagymértékben acetiláltak és magas H3K4 dimetilációs szintet mutatnak. Az inaktív Cp-knél ezen hiszton modifikációk szintje alacsony volt, kivéve a Mutu-I-nél megfigyelt magas H3K4me2 szintet. A Mutu-I Cp-n tapasztalt nagymértékű H3K4 dimetiláltsága hozzájárulhat a kromatin ún. „készenléti” állapotának fenntartásához, mely alapja lehet például a vírus promóterváltásának.
- 7) A TSA kezelés az I-es látencia-típusú, Cp-t nem használó Raelben kismértékben, de a Mutu-I sejtvonalba jelentősen megnövelte a Cp aktivitást, és emelkedett H4 acetilációs szintet eredményezett a Mutu-I és C666-1 sejtvonalakban.
- 8) A Q-promóter területén vizsgált mindhárom hiszton modifikáció, a H3 és H4 hiszton acetiláció, ill. a H3K4 hiszton metiláció is erős pozitív korrelációt mutatott a Qp aktivitásával. Kiemelkedően magas volt ezen modifikációk szintje a C666-1 esetében, ami nagyon jól korrelál az itt megfigyelt nagymértékű Qp aktivitással is.
- 9) A limfoid sejtek aktív LMP2A-promóterei is emelkedett H3 és H4 acetiláltságot és magas H3K4me2 szintet mutattak. A két alacsony LMP2A expresszióval jellemezhető BL sejtvonala közül azonban csak a Mutu-I esetén sikerült TSA-val, ill. TSA+CHX kombinációjával LMP2A aktivitást indukálni, a Raelben nem, miközben a TSA kezelés mindkét sejtvonalba emelkedett H4 acetilációs szintet eredményezett. Ennek hátterében az I. látencia-típusú sejtvonala magas LMP2Ap metilációs szintje mellett megfigyelhető, a transzkripció iniciációs helyétől 5' irányban elhelyezkedő CpG dinukleotidok metiláltsági állapotában lévő eltérések állhatnak. A Rael sejtvonalba ezen a helyen is erősen metilált CpG-eket találunk, míg a Mutu-I-ben egy nagyobb hipometilált/metilálatlan régiót. Ennek a régióknak a DNS metilációs állapota tehát befolyásolhatja a hiszton acetiláltsági szint növelésével elérhető transzkripciónövekedést.
- 10) Figyelemre méltó továbbá, hogy a C666-1 nazofaringeális karcinóma sejtvonala az inaktív LMP2A ellenére magas hiszton acetilációs szintet és magas H3K4 dimetiláltságot mutatott. Ezen ellentmondásos eredmények alapján feltételezzük, hogy az aktiváló hiszton modifikációk hatását a DNS metiláció ellensúlyozza,

ugyanis a C666-1-ben az LMP2Ap regulátor régiójának és a transzkripció iniciációs hely környezetének CpG dinukleotidjai erősen metiláltak.

- 11) Az aktív LMP1-promótereknek mind a szabályozó régiója, mind az iniciációs helye és kódoló régiója nagymértékben acetilált volt és magas a H3K4 dimetilációs szintet mutatott.

A DNáz I hiperszenzitivitási analízis alapján megállapítható, hogy az EBV feltételezett „Locus control” régiója látencia-típustól függetlenül nyitott kromatinstruktúrával rendelkezik. A Cp régióban az I-es látencia-típusú, Cp-t nem használó sejtvonalakban megjelenő nukleoszómális elrendeződésre utaló mintázatot kivéve nincsenek látencia-típus specifikus jellemzők a kromatinszerkezetre vonatkozóan, míg a Qp régió a promótert használó sejtvonalakban nyitott, a promótert nem használó sejtvonalakban pedig kompaktabb kromatinszerkezettel rendelkezik. Ezt a megfigyelést az aktív Qp-ken megfigyelhető aktiváló hiszton modifikációk jelenléte tovább erősíti.

A vizsgált aktiváló hatású hiszton acetilációk és a szintén aktiváló hatással bíró H3K4 dimetiláció jelenléte az esetek többségében jól korrelál a látens EBV promóterek aktivitásával, tehát ezen hiszton modifikációk fontos szerepet töltenek be a látens EBV promóterek szabályozásában. A hiszton modifikációk vizsgálata, és különösen a TSA-kezelés eredményei rámutattak arra is, hogy a DNS metiláció és a hiszton deacetiláció együttesen vesznek részt a transzkripció gátlásában, és bizonyos CpG-k metiláltsága kiemelkedően fontos a szabályozásban.

## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Minárovits Jánosnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a doktori munkám elvégzéséhez, köszönöm rengeteg segítségét, és hogy mindenben támogatott.

Köszönettel tartozom dr. Salamon Dánielnek hasznos szakmai tanácsaiért, ötleteiért, és a sok segítségért.

Köszönöm Dr. Hans Helmut Nillernek, hogy többször is lehetőségem volt a Regensburgi Egyetem Orvosi-mikrobiológiai- és Higiéniai Intézetében mellette dolgozni, új módszereket elsajátítani.

Hálával tartozom Bánáti Ferencnek, hogy bármikor bármivel fordulhattam hozzá, tanácsokkal látott el, és lelkesített.

Köszönöm a labor (egykori) szakedzőt és Ph.D. hallgatóinak, Szenthe Kálmánnak, Báthori Zoltánnak és Tereh Tamásnak, hogy segítették munkámat és biztosították számomra a jó munkahangulatot.

Köszönettel tartozom Dr. Minárovitsné Kormuta Zsuzsának a sejtenyésztésben nyújtott sok-sok segítségéért, továbbá minden kedves kollégámnak, akik segítettek munkámat.

Köszönet illeti Gerle Borbálát és Fejér Györgyöt a Kromatin Immunprecipitáció elvégzésében nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom Családomnak: Szüleimnek türelmükért és minden támogatásért, amit Tőlük kaptam; Nagypapámnak, hogy mindvégig támogatott anyagilag, és Kedves Férjemnek – Mindenért!

## IRODALOMJEGYZÉK

Alazard, N., Gruffat, H., Hiriart, E., Sergeant, A., Manet, E. (2003). Differential hyperacetylation of histones H3 and H4 upon promoter-specific recruitment of EBNA2 in Epstein-Barr virus chromatin. *J. Virol.* 77:8166-8172.

Althaus, F.R., Hofferer, L., Kleczkowska, H.E., Malanga, M., Naegeli, H., Panzeter, P.L. & Realini, C.A. (1994). Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. *Mol. Cell. Biochem.* 138:53-59.

Altiok, E., Minarovits, J., Hu, L.F., Contreras-Brodin, B., Klein, G., Ernberg, I. (1992). Host-cell-phenotype-dependent control of the BCR2/BWR1 promoter complex regulates the expression of Epstein-Barr virus nuclear antigens 2-6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:905-909.

Aronow, B.J., Ebert, C.A., Valerius, T., Potter, S.S., Wiginton, D.A., Witte, D.P., Hutton, J.J. (1995). Dissecting a locus control region: facilitation of enhancer function by extended enhancer-flanking sequences. *Mol. Cell. Biol.* Vol 15, No. 2:1123-1135.

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., Séguin, C., Tuffnell, P.S., and Barrell, B.G. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310:207-211.

Bakos, A., Banati, F., Koroknai, A., Takacs, M., Salamon, D., Minarovits-Kormuta, S., Schwarzmann, F., Wolf, H., Niller, H.H., Minarovits, J. (2007). High resolution analysis of CpG methylation and in vivo protein-DNA interactions at the alternative Epstein-Barr virus latency promoters Qp and Cp in the nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1. *Virus Genes* 35:195-202.

Banati, F., Koroknai, A., Salamon, D., Takacs, M., Minarovits-Kormuta, S., Wolf, H., Niller, H.H., Minarovits, J. (2008). CpG-methylation silences the activity of the RNA



polymerase III transcribed EBER-1 promoter of Epstein-Barr virus. FEBS Lett. 582(5):705-9.

Barski, A., Cuddapah, S., Zaho, K., et al. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in human genome. Cell 129:823-837.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanisms, and function. Cell 116:281-297.

Baumforth, K.R.N., Young, L. S., Flavell, K. J., Constandinou, C., Murray, P.G. (1999). The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol; 52:307-322.

Bell, A.C., Felsenfeld, G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. Nature 405 (6785):482-485

Boggs, B., Cheung, P., Heard, E., Spector, D.L., Chinault, A.C., Allis, C.D. (2002). Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. Nat. Genet. 30:73-76.

Bornkamm, G.W., Hammerschmidt, W. (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 356:437-459.

Brielmeier, M., Mautner, J., Laux, G., Hammerschmidt, W. (1996). The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. J. Gen. Virol. 77:2807-2818.

Brooks, L.A., Lear, A.L., Young, L.S., Rickinson, A.B. (1993). Transcripts from the Epstein-Barr virus *Bam*HI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. J. Virol. 67:3182-3190.

Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Kieff, E., Longnecker, R. (1992). An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with *src* family tyrosine kinases. J. Virol. 66:5161-5167.

Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br. J. Surg.* 45:218-223.

Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., Cullen, B.R. (2006). Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog.* 2(3): e23.

Carozza, M., Utley, R. T., Workman, J. L., Cote, J. (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19:321-329.

Chang, L.K., Liu, S.T. (2000). Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Res.* 28:3918-3925.

Chau, C.M., Lieberman, P.M. (2004). Dynamic chromatin boundaries delineate a latency control region of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 78:12308-12319.

Chen, F., Hu, L. F., Ernberg, I., Klein, G., Winberg, G. (1995). Coupled transcription of Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-1 and LMP-2B genes in nasopharyngeal carcinomas. *J. Gen. Virol.* 76:131-138.

Cherney, B.W., Bhatia, K., Tosato, G. (1994). A role for deregulated c-Myc expression in apoptosis of Epstein-Barr virus-immortalized B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12967-12971.

Cheung, S.T., Huang, D.P., Hui, A.B., Lo, K.W., Ko, C.W., Tsang, Y.S., Wong, N., Whitney, B.M., Lee, J.C. (1999). Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer* 83:121-126.

Clark, S.J., Harrison, J., Paul, C.L., Frommer, M. (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl. Acids Res.* 22:2990-2997.

Cordier, M., Calender, A., Billaud, M. et al. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome

induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.* 64:1002-13.

Davenport, M.G., Pagano, J. (1999). Expression of EBNA1 mRNA is regulated by cell cycle during Epstein-Barr virus type-I latency. *J. Virol.* 73:3154-61.

Deckert, J., Struhl, K. (2001). Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol. Cell. Biol.* 21:2726-2735.

Doerfler, W., Orend, G., Schubbert, R., Fichteler, K., Heller, H., Wigenbus, P., Schroer, J. (1995). On the insertion of foreign DNA into mammalian genomes – mechanism and consequences. *Gene* 157:1-2.

Ehrenhofer-Murray, A.E. (2004). Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur. J. Biochem.* 271:2335-2349.

Ehrlich, M., Wang, R.Y.H. (1981) 5-methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science* 212:1350-1357.

Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1:702-703.

Ernberg, I., Falk, K., Minarovits, J., Busson, P., Tursz, T., Masucci, M.G., Klein, G. (1989). The role of methylation in the phenotype-dependent modulation of Epstein-Barr nuclear antigen 2 and latent membrane protein genes in cells latently infected with Epstein-Barr virus. *J. Gen. Virol.* 70:2989-3002. Lásd még erratum: *J. Gen. Virol.* (1990) 71:499.

Falk, K., Ernberg, I. (1993). An origin of DNA replication (*oriP*) in highly methylated episomal Epstein-Barr virus DNA localizes to a 4.5-kb unmethylated region. *Virology* 195:608-615.

Falk, K., Szekely, L., Aleman, A., Ernberg, I. (1998). Specific methylation patterns in two control regions of Epstein-Barr virus latency: the LMP-1-coding upstream regulatory region and an origin of DNA replication (*oriP*). *J. Virol.* 72:2969-2974.

Filippova, G.A., Fagerlie, S., Klenova E.M., Myers C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J and Lobanenkov V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16:2802–2813.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1827-1831.

Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat.Genet.* 24:88-91.

Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Cur. Op. Gen. & Dev.* 15:536–541

Gilligan, K.J., Rajadurai, P., Lin, J.C., Busson, P., Abdel-Hamid, M., Prasad, U., Tursz, T., Raab-Traub, N. (1991). Expression of the Epstein-Barr virus *Bam*HI A fragment in nasopharyngeal carcinoma: evidence for a viral protein expressed *in vivo*. *J. Virol.* 65:6252-6259.

Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.* 18:3064-3073.

Glaser, L. S., Hsu, L. J., Gulley, L. M. (2004). Epstein-Barr Virus and Breast Cancer: State of the Evidence for Viral Carcinogenesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13:688-697.

Glickman, J.N., Howe, J.G., Steitz, J.A. (1988). Structural analysis of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles in Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Virol.* 62:902-911

Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Takahashi, T. et al. (1999). Identification of novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol.Chem.* 274:25543-25549.

Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B. (1990). Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J. Gen. Virol.* 71:1481-1495.

Gruenbaum, Y., Stein, R., Cedar, H., Razin, A. (1981). Methylation of CpG sequences in eukaryotic DNA. *FEBS Lett.* 124:67-71.

Guitton, A.E., Berger, F. (2005). Control of reproduction by Polycomb Group complexes in animals and plants. *Int. J .Dev. Biol.* 49(5-6):707-16.

Harada, S., Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* 71:6611-6618.

Herrmann, K. & Niedobitek, G. (2003). Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J. Pathol.* 199:140-145.

Honess, R.W., Gompels, U.A., Barrell, B.G., Craxton, M., Cameron, K.R., Staden, R., Chang, Y.N., Hayward, G.S. (1989). Deviations from expected frequencies of CpG dinucleotides in herpesvirus DNAs may be diagnostic of differences in the states of their latent genomes. *J. Gen. Virol.* 70:837-855.

Hu, L.F., Minarovits, J., Cao, S.L., Contreras-Salazar, B., Rymo, L., Falk, K., Klein, G., Ernberg, I. (1991). Variable expression of latent membrane protein in nasopharyngeal carcinoma can be related to methylation status of the Epstein-Barr virus BNLF-1 5'-flanking region. *J. Virol.* 65:1558-1567.

Hudson, G.S., Farrell, P.J., Barrell, B.G. (1985). Two related but differentially expressed potential membrane proteins encoded by the *EcoRI* Dhet region of Epstein-Barr virus B95-8. *J. Virol.* 53:528-535.

Hurley, E.A., Agger, S., McNeil, J.A., et al. (1991). When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J. Virol.* 65:1245- 54.

Iniguez-Lluhi, J.A. (2006). For a healthy histone code, a little SUMO in the tail keeps the acetyl away. *ACS Chem. Biol.* 1(4):204–206.

Izumi, K.M., Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12592-12597.

Jankelevich, S., Kolman, J.L., Bodnar, J.W., Miller, G. (1992). A nuclear matrix attachment region organizes the Epstein-Barr viral plasmid in Raji cells into a single DNA domain. *EMBO J.* 11:1165-1176.

Jansson, A., Masucci, M., Rymo, L. (1992). Methylation of discrete sites within the enhancer region regulates the activity of the Epstein-Barr virus *BamHI* W promoter in Burkitt lymphoma lines. *J. Virol.* 66:62-69.

Jenkins, P.J., Binné, U.K., Farrel, P.J. (2000). Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J. Virol.* 74:710-720.

Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat.Genet.* 19:187-191.

Jones, P.L., Wolffe, A.P. (1999). Relationship between chromatin organization and DNA methylation in determining gene expression. *Cancer Biology* 9:339-347.

Jost, J.P., Siegmund, M., Sun, L., Leung, R. (1995). Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methyl-cytosine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* 270:9734-9739.

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene *c-myc* is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* 73:4481-4484.

Kaye, K.M., Izumi, K.M., Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9150-9154.

Kieff, E. (1996). Epstein-Barr virus. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., (Editors). *Virology*, Vol. 2, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. 2343-2396.

Kingston, R.E., Narlikar, J.G. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13:2339-2352.

Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., Takada, K., (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* 15;19:6742-50.

Klein, G. (1995). EBV-B cell interactions: immortalization, rescue from apoptosis, tumorigenicity (A short review). *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* 43:97-105.

- Knight, J.S., Lan, K., Subramanian, C., Robertson, E.S. (2003). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J. Virol.* 77:4261-4272.
- Knutson, J. (1990). The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J. Virol.* 64:2530-4.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., Takada, K. (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 73:9827-9831.
- Konishi, K., Maruo, S., Kato, H., Takada, K. (2001). Role of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A on virus-induced immortalization and virus activation. *J. Gen. Virol.* 82:1451-1456.
- Kusano, S., Raab-Traub, N. (2001). An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J. Virol.* 75:384-395.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J., Jenuwein, T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Science* 116:2117-2124.
- Laird, P.W., Jaenisch, R. (1996). The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annu. Rev. Genet.* 30:441-464.
- Laux, G., Economou, A., Farrell, P.J. (1989). The terminal protein gene 2 of Epstein-Barr virus is transcribed from a bidirectional latent promoter region. *J. Gen. Virol.* 70:3079-3084.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V. et al. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus antigen-1. *Nature* 375:685-8.
- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppensen, P., Klein, F., Bird, A.P. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell* 69: 905-914



Li, E. (1999) The mojo of methylation. *Nature Gen.* 23: 5-6

Li, E., Beard, C., Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365.

Li, E., Bestor, T.H., Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926.

Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood* 100(9):3077-3086.

Liebowitz, D., Wang, D., Kieff, E. (1986). Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 58:233-237.

Ling, P.D., Rawlins, D.R., Hayward, S.D. (1993). The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9237-9241.

Longnecker, R., Durker, B., Roberts, T.M., Kieff, E. (1991). An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J. Virol.* 65:3681-3692.

Luger, K., Mader, A.W, Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260.

Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., Nicolas, J.C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J. Virol.* 73:4385-4392.

Masucci, M.G., Contreras-Salazar, B., Ragnar, E., Falk, K., Minarovits, J., Ernberg, I., Klein, G. (1989). 5-Azacytidine upregulates the expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA-2) through EBNA-6 and latent membrane protein in the Burkitt's lymphoma line Rael. *J. Virol.* 63:3135-3141.

McGraw, S., Robert, C., Massicotte, L., Sirard, M. A. (2003). Quantification of histone acetyltransferase and histone deacetylase transcripts during early bovine embryo development. *Biol. Reprod.* 68:383-389.

Metzenberg, S. (1990). Levels of Epstein-Barr virus DNA in lymphoblastoid cell lines are correlated with frequencies of spontaneous lytic growth but not with levels of expression of EBNA-1, EBNA-2, or latent membrane protein. *J. Virol.* 64:437-444.

Middeldorp, J.M., Brink, A.A.T.P., Brule van den, A.J.C., Meijer, C.J.L.M. (2002). Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 45:1-36.

Miller, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Kieff, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2:155-166.

Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., Bolen, J.B., Longnecker, R. (1994a). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:772-776.

Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Longnecker, R. (1994b). Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in sIg-mediated signal transduction. *Infectious Agents and Disease* 3:128-136.

Minarovits, J., Hu, L.F., Imai, S., Harabuchi, Y., Kataura, A., Minarovits-Kormuta, S., Osato, T., Klein, G. (1994a). Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas. *J. Gen. Virol.* 75:77-84.

Minarovits, J., Hu, L.F., Marcsek, Z., Minarovits-Kormuta, S., Klein, G., Ernberg, I. (1992). RNA polymerase III – transcribed EBER 1 and 2 transcription units are

expressed and hypomethylated in the major Epstein-Barr virus – carrying cell types. *J. Gen. Virol.* 73:1687-1692.

Minarovits, J., Hu, L.F., Minarovits-Kormuta, S., Klein, G., Ernberg, I. (1994b). Sequence-specific methylation inhibits the activity of the Epstein-Barr virus LMP 1 and BCR2 enhancer-promoter regions. *Virology* 200:661-667.

Minarovits, J., Minarovits-Kormuta, S., Ehlin-Henriksson, B., Falk, K., Klein, G., Ernberg, I. (1991). Host cell phenotype-dependent methylation patterns of Epstein-Barr virus DNA. *J. Gen. Virol.* 72:1591-1599.

Mulholland, N. M., Soeth, E., Smith, C. L. (2003). Inhibition of MMTV transcription by HDAC inhibitors occur independent changes in chromatinremodelling and histone acetylation. *Oncogene* 22:4807-4818.

Myöhänen, S., Wahlfors, J., Jänne, J. (1994). Automated fluorescent genomic sequencing as applied to the methylation analysis of the human ornithine decarboxylase gene. *DNA Sequence* 5:1-8.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389.

Nanbo, A., Takada, K. (2002). The role of Epstein Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev. Med. Virol.* 12:321-326.

Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Burner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* 23:58-61.

Niller, H.H., Glaser, G., Knüchel, R., Wolf, H. (1995). Nucleoprotein complexes and DNA 5'-ends at oriP of Epstein-Barr virus. *J. Biol. Chem.* 26;270(21):12864-8.

Niller, H.H., Salamon, D., Ilg, K., Koroknai, A., Banati, F., Bäuml, G., Rucker O. L., Schwarzmann, F., Wolf, F., Minarovics, J. (2003). The *in vivo* binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoded RNA (EBER) 1 suggest a specific role for EBV in lymphomagenesis. *Med. Sci. Monit.* 9(1):HY1-9.

Niller, H.H., Salamon, D., Banati, F., Schwarzmann, F., Wolf, H., Minarovits, J. (2004). The LCR of EBV makes Burkitt's lymphoma endemic. *Trends in Microbiology* 12 (11): 495-499.

Niller, H.H., Salamon, D., Takacs, M., Uhlig, J., Wolf, H., Minarovits, J. (2001). Protein-DNA interaction and CpG methylation at rep\*/vIL-10p of latent Epstein-Barr virus genomes in lymphoid cell lines. *Biol Chem.* 382(10):1411-9.

Niller, H.H., Wolf, H., Minarovits, J. (2008). Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: Implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 41(4):298-328.

Nishikawa, J., Kis, L.L., Liu, A., Zhang, X., Takahara, M., Bandobashi, K., Kiss, C., Nagy, N., Okita, K., Klein, G., Klein, E. (2004). Upregulation of LMP1 expression by histone deacetylase inhibitors in an EBV carrying NPC cell line. *Virus Genes* 28:117-124.

Nitsche, F., Bell, A., Rickinson, A. (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J. Virol.* 71:6619-6628.

Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A., Sample, J. (1996). Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J. Virol.* 70:623-627.

- Ohshima, K., Suzumiya, J., Kanda, M., Kato, A., Kikuchi, M. (1998). Integrated and episomal forms of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV associated disease. *Cancer. Lett.* 122:43-50.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257.
- Okitsu, C.Y., Hsieh, C-L. (2007). DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. *Mol. Cell. Biol.* 27(7):2746-2757.
- Osato, T. & Imai, S. (1996). Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 7:175-182.
- Park, J.H., Faller, D.V. (2002). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 induction by histone deacetylase inhibitors mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 expression and homotypic aggregation. *Virology* 303:345-363.
- Panning, B., Jaenisch, R. (1996). DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev.* 10:1991-2002.
- Panning, B., Jaenisch, R. (1998). RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93:305-308.
- Paulson, E.J., Speck, S.H. (1999). Differential methylation of Epstein-Barr virus latency promoters facilitates viral persistence in healthy seropositive individuals. *J. Virol.* 73:9959-9968.
- Pfeifer, G.P., Tang, M.S., Denissenko, M.F. (2000). Mutation hotspots and DNA methylation. Jones, P.A., Vogt, P.K. (Editors). *Current Topics in Microbiology and Immunology. DNA methylation and cancer.* Springer-Verlag, Heidelberg. 249:1-19.
- Pirrotta, V. (1997). PcG complexes and chromatin silencing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7(2):249-58.

Ramchandani, S., Bhattacharya, S.K., Cervoni, N., Szyf, M. (1999). DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6107-6112.

Razin, A., Riggs, D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science* 210:604-610

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Poning, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593-599.

Rechsteiner, M.P., Berger, C., Zauner, L., Sigrist, J.A., Weber, M., Longnecker, R., Bernasconi, M., Nadal, D. (2007). Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J. Virol.* 82(4):1739-1747

Rickinson, A.B., Kieff, E. (1996). Epstein-Barr virus. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., (Editors). *Virology*, Vol. 2, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. 2397-2446.

Robertson, K.D. (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20: 3139-3155

Robertson, K.D., Ambinder, R.F. (1997a). Methylation of the Epstein-Barr virus genome in normal lymphocytes. *Blood* 90:4480-4484.

Robertson, K.D., Ambinder, R.F. (1997b). Mapping promoter regions that are hypersensitive to methylation-mediated inhibition of transcription: application of the methylation cassette assay to the Epstein-Barr virus major latency promoter. *J. Virol.* 71:6445-6454.

Robertson, K.D., Hayward, S.D., Ling, P.D., Samid, D., Ambinder, R.F. (1995b). Transcriptional activation of the Epstein-Barr virus latency C promoter after 5-azacytidine treatment: evidence that demethylation at a single CpG site is crucial. *Mol. Cell. Biol.* 15:6150-6159.

Robertson, K.D., Jones, P.A. (2000). DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 21:461-467.

Robertson, E.S., Lin, J., Kieff, E. (1996a). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ $\kappa$ . *J. Virol.* 70:3068-3074.

Robertson, K.D., Manns, A., Swinnen, L.J., Zong, J.C., Gulley, M.L., Ambinder, R.F. (1996b). CpG methylation of the major Epstein-Barr virus latency promoter in Burkitt's lymphoma and Hodgkin's disease. *Blood* 88:3129-3136.

Roh, T.Y., Cuddapah, S., Zhao, K. (2005). Active chromatin domains are defined by acetylation islands defined by genome wide mapping. *Genes Dev.* 19:542-552.

Roth, S.Y., Denu, J.M. & Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 81–120.

Ruf, I.K., Rhine, P.W., Yang, C., Cleveland, J.L., Sample, J.T. (2000). Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of burkitt lymphoma cell independently of an effect on apoptosis. *J. Virol.* 74:10223-10228.

de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* 370:737-749.

Sadler, R.H., Raab-Traub, N. (1995a). Structural analysis of the Epstein-Barr virus *Bam*HI A transcripts. *J. Virol.* 69:1132-1141.

Sadler, R.H., Raab-Traub, N. (1995b). The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase latent membrane protein 1 mRNA initiates from a TATA-less promoter within the first terminal repeat. *J. Virol.* 69:4577-4581.

Salamon, D., Banati, F., Koroknai, A., Ravasz, M., Szenthe, K., Bathori, Z., Bakos, A., Niller, H.H., Wolf, H., Minarovits, J. (2009). Binding of CTCF *in vivo* to the region

located between Rep\* and C-promoter of Epstein-Barr virus is unaffected by CpG methylation and does not correlate with Cp activity. *J. Gen. Virol.* in press

Salamon, D., Takacs, M., Schwarzmann, F., Wolf, H., Minarovits, J., Niller, H. H. (2003). High-resolution methylation analysis and *in vivo* protein-DNA binding at the promoter of viral oncogene LMP2A in B cell lines carrying latent Epstein-Barr virus genomes. *Virus Genes* 27:1, 57-66.

Salamon, D., Takacs, M., Ujvari, D., Uhlig, J., Wolf, H., Minarovits, J., Niller, H.H. (2001). Protein-DNA binding and CpG methylation at nucleotide resolution of latency associated promoters Qp, Cp and LMP1p of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 75:2584-2596.

Sample, J., Liebowitz, D., Kieff, E. (1989). Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes. *J. Virol.* 63:933-937.

Schaefer, B.C., Strominger, J.L., Speck, S.H. (1995a). The Epstein-Barr virus BamHI F promoter is an early lytic promoter: lack of correlation with EBNA 1 gene transcription in group 1 Burkitt's lymphoma cell lines. *J. Virol.* 69:5039-47.

Schaefer, B.C., Strominger, J.L., Speck, S.H. (1995b). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10565-10569.

Schaefer, B.C., Strominger, J.L., Speck, S.H. (1997). Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol. Cell. Biol.* 17:364-377.

Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell. Biol.* 6:73-77.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941-953.



Shibata, D. & Weiss, L. M. (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 140:769-774.

Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G., Farrell, P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* 13:3321-8.

Sjöblom-Hallén, A., Weiwen, Y., Jansson, A., Rymo, L. (1999). Silencing of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene by the Max-Mad1-mSin3A modulator of chromatin structure. *J. Virol.* 73:2983-2993.

Speck, P., Kline, K.A., Cheresch, P., Longnecker, R. (1999). Epstein-Barr virus lacking latent membrane protein 2 immortalizes B cells with efficiency indistinguishable from that of wild-type virus. *J. Gen. Virol.* 80:2193-2203.

Strahl, B. D., Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.

Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12:599-606.

Sung, N.S., Kenney, S., Gutsch, D., Pagano, J.S. (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 65:2164-9.

Swigut, T., Wysocka, J. (2007). H3K27 demethylases, at long last. *Cell.* 131(1):29-32.

Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Klein, G., Wiman, K.G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5455-9.

Swaminathan, S., Tomkinson, B., Kieff, E. (1991). Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1546-1550.

Takacs, M., Myöhänen, S., Altiok, E., Minarovits, J. (1998). Analysis of methylation patterns in the regulatory region of the latent Epstein-Barr virus promoter BCR2 by automated fluorescent genomic sequencing. *Biol. Chem.* 379:417-422.

Takacs, M., Salamon, D., Myöhänen, S., Li, H., Segesdi, J., Ujvari, D., Uhlig, J., Niller, H.H., Wolf, H., Berencsi, G., Minarovits, J. (2001b). Epigenetics of latent Epstein-Barr virus genomes: high resolution methylation analysis of the bidirectional promoter region of latent membrane protein 1 and 2B genes. *Biol. Chem.* 382:699-705.

Takacs, M., Segesdi, J., Balog, K., Mezei, M., Toth, G., Minarovits, J. (2001a). Relative deficiency in CpG dinucleotides is a widespread but not unique feature of *Gammaherpesvirinae* genomes. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 48:349-357.

Tao, Q., Robertson, K.D., Manns, A., Hildesheim, A., Ambinder, R.F. (1998). The Epstein-Barr virus major latent promoter Qp is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive. *J. Virol.* 72:7075-7083.

Tierney, R.J., Kirby, H.E., Nagra, J.K., Desmond, J., Bell, A.I., Rickinson, A.B. (2000). Methylation of the transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation. *J. Virol.* 74:10468-10479

Tsai, C.N., Liu, S.T., Chang, Y.S. (1995). Identification of a novel promoter located within the *Bam* HI Q region of the Epstein-Barr virus genome for the EBNA 1 gene. *DNA Cell. Biol.* 14:767-776.

Tsang, S.F., Wang, F., Izumi, K.M., Kieff, E. (1991). Delineation of the cis-acting element mediating EBNA-2 transactivation of latent infection membrane protein expression. *J. Virol.* 65:6765-71.

Tomkinson, B., Robertson, E., Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 67:2014-2025.

- Wade, P.A., Geggion, A., Jones, P.L., Ballestar, E., Aubry, F., Wolffe, A.P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* 23:62-66.
- Walsh, C.P., Chaillet, J.R., Bestor, T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous retrovirus is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* 20:116-117.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., Manet, E. (1994). The human Jk recombination signal sequence binding protein (RBP-Jk) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J.* 13:5633-5638.
- Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., Manet, E. (1996). Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-Jk-EBNA-2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-Jk to DNA. *J. Virol.* 70:5909-5915.
- Wang, L., Grossman, S.R., Kieff, E. (2000). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:430-435.
- Wang, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I., Kieff, E. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J. Virol.* 64:3407-16.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M.A. & Allis, C.D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97:99-109.
- Weinmann, A. S. & Farnham, P. J. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* 26:37-47.
- Woisetschlager, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., Speck, S.H. (1990). Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1725-9.

Yajima, M., Kanda, T., Takada, K. (2005). Critical role of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 79(7):4298-4304.

Yang, X-J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signalling. *BioEssays* 26:1076-1087.

Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13:335-340.

Young, L.S., Dawson, C.W., Eliopoulos, A.G. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 53:238-247.

Zhang, L., Eugeni, E.E., Parthun, M.R., Freitas, M.A. (2003). Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* 112:77–86.

Zetterberg, H., Stenglein, M., Jansson, A., Rickstein, A., Rymo, L. (1999). Relative levels of EBNA1 gene transcripts from the C/W, F and Q promoters in Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cells in latent and lytic stages of infection. *J. Gen. Virol.* 80:457-465.

## MAGYAR ÉS ANGOL NYELVŰ RÖVID ÖSSZEFOGLALÓ

### Látens Epstein-Barr vírus genomok szabályozó régióinak epigenetikai jellemzése limfoid és nazofaringeális karcinóma sejtekben

Az Epstein-Barr vírus (EBV) epitéliális sejteket és B sejteket fertőző humán herpeszvírus, mely vírusprodukciónélkül, látens formában perzisztál a gazdasejtekben. A virális génexpresszió és promóterhasználat a vírus látencia-típusának függvénye. I-es típusú látencia esetén a vírus 6 nukleáris antigénje (EBNA) közül a Q-promóterről (Qp) átíródó transzkriptorról csak az EBNA1 expresszálódik, a C-promóter (Cp) inaktív és a látens membrán proteinek (LMP1, LMP2) sem expresszálódnak. Ezzel ellentétben III-as típusú látencia esetén az EBV minden egyes látens génje kifejeződik, a Cp-ről mind a 6 EBNA átíródik, míg a Qp inaktív.

A génexpresszió szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok szoros kapcsolatot mutatnak a kromatinstruktúra nyitott vagy kompakt formájával. Az emlős sejtekben a több gén együttes kifejeződését biztosító „Locus control” régiók (LCR) ún. DNáz I hiperszenzitív helyekkel (HS) rendelkeznek. Ezért az EBV feltételezett LCR-jének jellemzésére DNáz I hiperszenzitivitási analízist végeztünk öt különböző látencia-típusú, EBV-t hordozó limfoid és nazofaringeális karcinóma sejtvonalon. Az analízist kiterjesztettük a Cp és Qp területére is. Az LCR és Cp területén minden sejtvonalban közös vagy egyedi HS helyeket találtunk, melyek nem korreláltak a látencia típusával. Ezzel ellentétben a Qp területén látencia-típus specifikus HS-eket detektáltunk.

Mivel a különböző hiszton-oldalláncok modifikációi kulcsfontosságú szerepet játszanak az emlősök génexpressziójának szabályozásában a kromatinstruktúra megváltoztatása révén, következő lépésként Kromatin Immunprecipitáció segítségével megvizsgáltuk a C, Q, LMP1 és LMP2A promóterek H3 és H4 hisztonjainak acetilációs szintjét, ill. a H3-as hiszton 4-es pozícióban lévő lizinének (H3K4) dimetiláltságát EBV-t hordozó, különböző látencia-típusú limfoid sejtvonal-párokban és nazofaringeális karcinóma sejtvonalban. Eredményeink magas hiszton acetilációs szintet és nagymértékű H3K4 dimetiláltságot mutattak az aktív promóterek esetén. Ezen hiszton modifikációk látens EBV promóterek szabályozásában betöltött szerepét igazolta az is, hogy hiszton-deacetiláz gátlóval történő kezelés hatására az inaktív promótereknél expresszió-növekedést és acetilációs szint emelkedést figyeltünk meg.

## **Epigenetic analysis of the regulatory regions of latent Epstein-Barr virus genomes in lymphoid and nasopharyngeal carcinoma cell lines**

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus, which infects epithelial cells and B cells, respectively, and normally persists in a latent state without virus production. The viral gene expression and promoter usage depend on the latency type. Out of six EBV encoded nuclear antigens (EBNAs) only the EBNA1 protein is expressed from a transcript initiated at the Q-promoter (Qp) in latency type I, while the C-promoter (Cp) and the promoters coding membrane proteins (LMP1 and LMP2) are silenced. In contrast, latency type III is characterized through the expression of all latency genes; proteins EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP are expressed from Cp, and Qp is inactive.

The regulatory mechanisms of gene expression are associated with open or closed chromatin structures. In eukaryotic cells co-expression of multiple genes is ensured by „Locus control” regions (LCRs) that possess DNase I hypersensitive sites (HSs). We performed therefore, DNase I hypersensitivity assays to characterize the putative LCR of EBV using five EBV carrying lymphoid and nasopharyngeal carcinoma cell lines with different latency types. We extended our analysis to Cp and Qp as well. The common and unique HSs found at the LCR and Cp did not correlate with the latency type. In contrast we detected latency type specific HSs at Qp.

Because histone acetylation and histone H3K4 methylation regulates gene expression through opening the chromatin structure for the transcription, we examined the acetylation state of H3 and H4 histones and the level of histone H3K4 dimethylation at latent EBV promoters Cp, Qp, LMP1p and LMP2Ap in latent EBV genomes carried by lymphoblastoid cells of type I and type III latency and a nasopharyngeal carcinoma cell line using Chromatin Immunoprecipitation combined with Real-time PCR. We observed high level of histone acetylation and H3K4 dimethylation at the active promoters, so we concluded that histone modifications play an important role in the regulation of latent EBV promoters. These results were also proven by histone-deacetylase inhibitor treatment, as the histone-deacetylase inhibitor induced transcription and resulted in higher histone acetylation level at inactive promoters.

# **AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK**

## **MELLÉKLET**