

OTKA ZÁRÓJELENTÉS (F48921)

1. A korábbi munkáinkban leírt, jól karakterizált látens Epstein-Barr vírus (EBV) genomokat hordozó, I. látencia-típusú Rael és Mutu-BL-I-cl-216 Burkitt lymphoma (BL) sejtvonalakban, továbbá a III. látencia-típusú CBM1-Ral-STO lymphoblastoid (LCL), illetve Mutu-BL-III-cl-99 Burkitt lymphoma sejtvonalakban kompetitív-quantitatív PCR, valamint real-time PCR segítségével meghatároztuk az egyes sejtvonalak által hordozott EBV genomok számának egymáshoz viszonyított arányát. Eredményeink szerint az I. látencia-típusú sejtvonalakban mintegy 6-10-szer több EBV genom található, mint a III. látencia-típusú sejtvonalakban [közöletlen eredmény].

2. A Rael, Mutu-BL-I-cl-216, CBM1-Ral-STO és Mutu-BL-III-cl-99 sejtvonalakban, továbbá a II. látencia-típusú C666-1 nasopharyngealis carcinoma (NPC) sejtvonalban (jelenleg a világon az egyetlen EBV pozitív NPC sejtvonal; 5) meghatároztuk a virális Q-promoter (Qp), C-promoter (Cp), LMP-promoter-szabályozó-régió (LRS), LMP2A-promoter (LMP2Ap), valamint az EBER1- és EBER2-promoterek (EBER1p és EBER2p) területén a hiszton acetiláció *in vivo* mértékét. Az egyes régiókban a hiszton acetiláció mértékének meghatározásához acetilált H3 (AcH3) és acetilált H4 (AcH4) hiszton ellenes, poliklonális ellenanyagok és specifikus primerek felhasználásával végzett kromatin immunoprecipitációs (ChIP) assay-t, míg a precipitált DNS mennyiségi meghatározásához kezdetben kompetitív-quantitatív PCR-t, majd a későbbiekben real-time PCR-t alkalmaztunk.

E módszerek segítségével sikerült kimutatnunk, hogy az I. látencia-típusú sejtvonalakhoz viszonyítva a III. látencia-típusú sejtvonalakban a Cp 14-17-szer, illetve 9-13-szor, az LRS 13-14-szer, illetve 11-13-szor, az LMP2Ap pedig 5-9-szer, illetve 16-23-szor több, míg a C666-1 sejtvonalban a Cp és LRS közel azonos mennyiségű, az LMP2Ap pedig 13-34-szer, illetve 26-28-szor több AcH3, illetve AcH4 fehérjét tartalmaz. A Qp területén ezzel szemben a III. látencia-típusú sejtvonalakhoz viszonyítva az I. látencia-típusú sejtvonalakban 7-10-szer, illetve 4-5-ször, míg a C666-1 sejtvonalban 82-96-szor, illetve 27-33-szor több AcH3, illetve AcH4 fehérje található. Az EBER1p és EBER2p a CBM1-Ral-STO-hoz képest a Mutu-BL-I-cl-216-ban 2-szer, a Mutu-BL-III-cl-99-ben 3-szor, míg a Rael-ben 4-szer több mennyiségű AcH4 fehérjét tartalmazott. Ugyanezen régió a Mutu-BL-III-cl-99-hez képest a Mutu-BL-I-cl-216-ban 3-szor, a CBM1-Ral-STO-ban 4-szer, míg a Rael-ben 9-szer több mennyiségű AcH3 fehérjét tartalmazott [8, 9, 10, közöletlen eredmény].

3. A Qp, Cp, LRS, LMP2Ap, EBER1p és EBER2p-ről induló transzkripció mértékének megállapításához real-time RT-PCR reakciókat fejlesztettünk ki (a kapott értékeket az RNS integritás kontroljaként használt β -aktin gén expressziójához viszonyítottuk). Ezek segítségével megerősítettük az általunk és mások által az egyes promoterekre vonatkozó korábban közölt expressziós eredményeket [2, 8, 9, 10, 12, közöletlen eredmény].

4. A Rael, Mutu-BL-I-cl-216, CBM1-Ral-STO és Mutu-BL-III-cl-99 sejtvonalak esetében meghatároztuk az optimális Trichostatin A (TSA) kezelés dóziséját és időtartamát. A kísérletek során a sejtek megfelelő promotereinek AcH4 tartalmát és ezen keresztül a hiszton deacetyláz gátló TSA kezelés hatását ChIP assay segítségével mértük. Valamennyi sejtvonal és promotor esetében optimális időtartamnak, illetve dózissnak a sejtek 16 órán keresztül 800nM végkoncentrációjú TSA-val történő kezelése bizonyult. Valamennyi sejtvonal esetében a TSA kezelés mellett a fehérjeszintézist gátló cikloheximiddel (CHX), illetve TSA és CHX kombinációjával is elvégeztük a kísérleteket. A vizsgálatok során real-time RT-PCR segítségével megmértük az egyes promoterekről induló transzkripció mértékét.

A TSA kezelés hatására a Mutu-BL-I-cl-216 sejtvonalban a Cp aktivitása kilencszeresére, az LRS aktivitása pedig kétszeresére növekedett, míg a Rael, CBM1-Ral-STO és Mutu-BL-III-cl-99 sejtvonalak esetében a fenti promoterekről átíródó RNS-ek mennyisége nem változott. A TSA kezelés az LMP2Ap-ről induló transzkripciót a Mutu-BL-I-cl-216 sejtekben háromszorosára növelte, míg a Rael esetében közel a felére csökkentette. A TSA kezelés az EBER1p-ről induló transzkripciót valamennyi sejtvonalban közel kétszeresére növelte, míg az EBER2p-ről induló transzkripciót nem befolyásolta. A TSA kezelés egyik sejtvonalban sem változtatta meg a Qp-ről induló transzkripció mértékét. A Cp, EBER1p és EBER2p esetében a TSA és CHX kombinációjával történő kezelés hatására valamennyi vizsgált sejtvonalban a TSA kezelése után mért értékekkel közel azonos eredményeket kaptunk, míg a CHX kezelés önmagában nem okozott változást. Érdekes módon valamennyi sejtvonal esetében a CHX kezelés önmagában, vagy kombinációban, a megfelelő CHX nélküli mintához képest nagyjából kétszeresére növelte az LMP1, illetve LMP2A mRNS-ek mennyiségét. A TSA kezelés hatásaiért tehát valamennyi promotor esetében elsősorban az adott promoteren elhelyezkedő hiszton fehérjék acetiláltságának fokozódása és nem egy, a TSA kezelés hatására ujjonnan átíródó fehérje transzaktivációs hatása felelős [8, 9, 10, közöletlen eredmény].

5. A kísérletek során biszulfít modifikálást követő direkt szekvenálás segítségével vizsgáltuk az egyes promoterek metilációs mintázatait. Kimutattuk, hogy a C666-1 sejtvonalban a Cp, valamint az LMP2Ap erőteljesen metilált, míg a Qp teljesen metilálatlan [2, 9], az EBER1 és EBER2 kódoló régiókat és promotereket is magába foglaló terület pedig a Rael, Mutu-BL-I-cl-216, CBM1-Ral-STO, Mutu-BL-III-cl-99 és C666-1 sejtvonalakban minimális mértékben metilált, vagy teljesen metilálatlan [12]. Igazoltuk továbbá, hogy a TSA, illetve CHX kezelések egyik sejtvonalban és promoteren sem változtatták meg a (már korábbi publikációinkban közölt; 13, 14) DNS metilációs mintázatokat [közöletlen eredmény].

6. Transzfekciós kísérletek, *in vitro* DNáz I footprinting, valamint elektroforetikus mobilitási shift assay (EMSA) segítségével igazoltuk, hogy az EBER régió CpG dinukleotidjainak metilálása gátolja az EBER promoterek aktivitását [3].

7. Két I. látencia-típusú EBV pozitív BL biopsziából (RU és RX; 11), valamint két nude egérben passzált EBV pozitív NPC biopsziából (NPC-C15 és NPC-C18; 11) RNS-t valamint DNS izoláltunk, illetve formaldehiddel keresztkötött szonikált kromatin-lizátumot készítettünk (a biopsziák esetében utóbbi művelet jelentős módosításokat igényelt a sejtvonalakon történő vizsgálatokhoz képest). Real-time RT-PCR segítségével megállapítottuk, hogy a Cp valamennyi biopsziában teljesen inaktív, az LMP2Ap és LRS a BL biopsziákban a LCL-ekhez képest alacsony aktivitást mutat, míg az NPC-C15 és NPC-C18 esetében az LMP2Ap-re alacsony, az LRS-re pedig közepes fokú aktivitás jellemző. Az izolált DNS biszulfít-modifikálást követő direkt szekvenálása kimutatta, hogy valamennyi biopsziában a Qp, EBER1p és EBER2p teljesen metilálatlanok, az LRS és az LMP2Ap vegyes metilációs mintázatot mutat, míg a Cp erőteljesen metilált. A ChIP vizsgálatok segítségével az összes biopsziában a Qp, EBER1p és EBER2p területén magas fokú, míg a Cp-n alacsony fokú hiszton acetilációt tudtunk kimutatni. A BL biopsziákban az LRS és LMP2Ap területén kis mennyiségű acetilált hiszton találtunk, míg az NPC biopsziákban az LRS közepes fokú, az LMP2Ap pedig magas fokú hiszton acetilációt mutatott [közöletlen eredmények].

8. Chau és *mtsai*. [4] 2006-ban, illetve Day és *mtsai*. [7] 2007-ben közölték, hogy a CCCTC-kötő faktor (CTCF) a Rep* és Cp közötti régióban látencia-típus specifikusan, míg a Qp és EBER1p területén látencia-típustól függetlenül *in vivo* mindig kimutatható. A Rep* és Cp közötti régióhoz (Rep*-Cp) kapcsolódó CTCF Chau és *mtsai*. [4] szerint gátolná, míg Day és *mtsai*. [7]

szerint aktiválná a Cp-t. Ezen ellentmondás, illetve a CTCF fehérjének a magasabb rendű kromatin szerkezet (és így a lokális hiszton modifikációk és DNS metiláció) kialakításában és fenntartásában betöltött szerepe miatt CHIP, DMS *in vivo* footprinting és EMSA segítségével különböző látencia-típusú, jól karakterizált lymphoid és epitheliális sejtvonalakban, továbbá NPC biopsziákban vizsgáltuk a CTCF fehérje fenti régiókhoz történő *in vivo* kötődését, illetve biszulfid modifikálást követő direkt szekvenálással a Rep* és Cp közötti régió metilációs mintázatait.

Eredményeink azt mutatták, hogy a CTCF fehérjének a Rep*-Cp, illetve Qp régiókhoz történő *in vivo* kötődése, nem mutat összefüggést a Cp, illetve Qp aktivitásával, valamint a sejtek látencia-típusával. Kimutattuk továbbá, hogy a Rep*-Cp kötőhely környékén található CpG dinukleotidok metilációja nem befolyásolja a CTCF fehérje kötődését, illetve, hogy a CTCF fehérje kötődése nem vezet feltétlenül a kötőhely közvetlen környékének demetilálásához [12].

9. EBV-t hordozó lymphoid sejtvonalak nem lymphoid eredetű sejtvonalakkal történő fúziója ún. „szomatikus sejt hibrideket” eredményez. Ezekben a hibrid sejtvonalakon az EBV látens promotereinek szabályozásában részt vevő epigenetikus mechanizmusok szövet-specifikus működése kiválóan modellezhető. Így az EBV által transzformált KR4 LCL és az epitheliális HeLa sejtvonalak fúziójával keletkezett KH1 és KH2 hibrid sejtvonalak esetében a Cp inaktiválódik, míg az EBNA2 deléciót hordozó P3HR-1 BL sejtvonal és a HL60 myeloid sejtvonal fúziójával létrehozott HP1 hibrid esetében a Wp inaktivációjával párhuzamosan a Cp aktiválódik [1, 6]. Mivel a fentiek alapján e sejtvonalak epigenetikus szabályozási mechanizmusainak vizsgálata az OTKA pályázatomban munkatervében leírtak logikus folytatása, ezért a KR4, KH1, KH2, P3HR-1 és HL60 sejtvonalakban a C-, Q- és LMP2A-promoterek transzkripció aktivitását real-time-RT-PCR, míg DNS metilációs mintázatait biszulfid modifikálást követő direkt szekvenálással vizsgáltuk.

Eredményeink szerint a Cp rendkívül magas fokú expressziót mutat a HP1, közepesen magas aktivitást a KR4 és rendkívül alacsony mértékű aktivitást a KH1, KH2 és P3HR-1 sejtvonalakban. Az LMP2Ap magas aktivitást mutat a KR4, közepes aktivitást a HP1, míg alacsony aktivitást a P3HR1 sejtvonalban és nem volt kimutatható a KH1 és KH2 sejtvonalakban. A Qp magas aktivitást mutatott a KH1 és KH2, míg rendkívül alacsony expressziót a KR4, P3HR-1 és HP1 sejtvonalakban. A Cp a KR4-ben teljesen metilálatlannak, a KH1 és KH2 sejtvonalakban minimális mértékben metiláltak, a P3HR-1 sejtvonalban erőteljesen metiláltak, míg a HP1 sejtvonalban közepes mértékben metiláltak bizonyult. Az LMP2Ap a KR4, KH1 és KH2 sejtvonalakban minimális mértékben metiláltak, míg a P3HR1 és HP1 sejtvonalakban

közepes mértékben metilálóznak bizonyult. A Qp valamennyi sejtvonalban teljesen metilálatlan [közöletlen eredmény].

Az eredmények alapján elmondható, hogy a fenti sejtekben a hibridizáció során fellépő promoter aktivitás változások szabályozásában a DNS metiláció nem játszik kulcsfontosságú szerepet. A hiszton acetiláció esetleges szerepét, jelenleg is folyó kísérleteinkben kívánjuk tisztázni.

10. Valamennyi felsorolt kísérlet alatt a sejtvonalakon többször elvégzett EBNA-2 immunoblot vizsgálatok eredményei megfeleltek a sejtek várt látencia-típusának, vagyis a vizsgált sejtvonalakban a sejtenyésztés során nem történt látencia-típus-váltás. A sejteken szintén többször elvégzett ZEBRA immunoblot vizsgálatok ezen kívül igazolták, hogy valószínűleg egyik sejtvonal sem indította meg sejtjeinek jelentős részében a vírus lítikus szaporodását.

Hivatkozások (az OTKA pályázat eredményeit tartalmazó közlemények vastagon vannak szedve):

1. Altiok E, Minarovits J, Hu LF, Contreras-Brodin BA, Klein G, and 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.*89:905-9.
2. **Bakos A, Banati F, Koroknai A, Takacs M, Salamon D, Minarovits-Kormuta S, Schwarzmann F, Wolf H, Niller HH, and 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.**
3. **Banati F, Koroknai A, Salamon D, Takacs M, Minarovits-Kormuta S, Wolf H, Niller HH, and Minarovits J. (2008). CpG methylation silences the activity of the RNA polymerase III transcribed EBER-1 promoter of Epstein-Barr virus. *FEBS Lett.* 582:705-709.**
4. Chau CM, Zhang XY, McMahon SB, and Lieberman PM. (2006). Regulation of Epstein-Barr virus latency type by the chromatin boundary factor CTCF. *J Virol.* 80:5723-5732.
5. Cheung ST, Huang DP, Hui AB, Lo KW, Ko CW, Tsang YS, Wong N, Whitney BM, and Lee JC. (1999). Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. *Int. J Cancer* 83:121-126.
6. Contreras-Brodin BA, Anvret M, Imreh S, Altiok E, Klein G, and Masucci MG. (1991). B cell phenotype-dependent expression of the Epstein-Barr virus nuclear antigens EBNA-2 to EBNA-6: studies with somatic cell hybrids. *J. Gen. Virol.* 72:3025-33.
7. Day L, Chau CM, Nebozhyn M, Rennekamp AJ, Showe M, and Lieberman PM. (2007). Chromatin profiling of Epstein-Barr virus latency control region. *J Virol.* 81:6389-6401.
8. **Fejer G, Koroknai A, Banati F, Györi I, Salamon D, Wolf H, Niller HH, and Minarovits J. (2008). Latency type-specific distribution of epigenetic marks at the alternative promoters Cp and Qp of Epstein-Barr virus. *J Gen. Virol.* 89:1364-1370.**
9. **Gerle B, Koroknai A, Fejer G, Bakos A, Banati F, Szenthe K, Niller HH, Wolf H, Minarovits J, and Salamon D. (2007). Acetylated Histone H3 and H4 mark the upregulated LMP2A-promoter of Epstein-Barr virus in lymphoid cells. *J Virol.* 81:13242-13247.**
10. **Koroknai A, Banati F, Szenthe K, Niller HH, Wolf H, Salamon D, Minarovits J. Regional differences in the level of histone acetylation but not in the level of histone methylation at the promoter region of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Előkészületben.***
11. Minarovits J, Minarovits-Kormuta S, Ehlin-Henriksson B, Falk K, Klein G, and Ernberg I. (1991). Host cell phenotype-dependent methylation patterns of Epstein-Barr virus DNA. *J. Gen. Virol.* 72:1591-1599.
12. **Salamon D, Banati F, Koroknai A, Ravasz M, Szenthe K, Bathori Z, Bakos A, Niller HH, Wolf H, Klein E, and Minarovits J. (2009). Binding of CTCF *in vivo* to the 5' region of the Epstein-Barr virus latency promoter Cp is unaffected by CpG methylation and does not correlate with Cp activity. *J Gen. Virol.* (Elfogadva), doi:10.1099/vir.0.007344-0.**
13. Salamon D, Takacs M, Schwarzmann F, Wolf H, Minarovits J, and Niller HH. (2003). High-resolution methylation analysis and *in vivo* protein-DNA binding at the promoter of the viral oncogene LMP2A in B cell lines carrying latent Epstein-Barr virus genomes. *Virus Genes* 27:57-66.
14. Salamon D, Takacs M, Ujvari D, Uhlig J, Wolf H, Minarovits J, and Niller HH. (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.