

OTKA T 042727

Fehérje-DNS kölcsönhatások és metilációs mintázat analízise Epstein-Barr vírus onkogénjeinek regulátor régióiban nazofaringeális karcinóma sejtekben

Témavezető: Dr Minárovits János

Országos Epidemiológiai Központ,

Mikrobiológiai Kutatócsoport

Kutatási célunk az Epstein-Barr vírus (EBV) ún. II. típusú látenciáját szabályozó mechanizmusok molekuláris szintű megértése volt. Ezt az tette lehetővé, hogy rendelkezésünkre állott a C666-1 nazofaringeális karcinóma (NPC) vonal, amely folyamatos *in vitro* passzálások során sem veszítette el az EBV genomokat (szemben az *in vitro* tenyésztett NPC sejtvonalak többségével).

Mivel limfoid sejtekben a látens EBV promótereket DNS metiláció és fehérje-DNS kölcsönhatások regulálják, részletes metilációs és fehérje-kötési térképeket készítettünk NPC sejtekben is.

A C666-1 sejtekben az EBNA 1 nukleáris proteint kódoló RNS átírat a genom *Bam*H1 Q fragmentumára lokalizált promóterről (Qp) iniciálódik. Ezzel szemben az alternatív promóter, Cp, inaktív. Aktívak EBER 1 és 2 gének promóterei (termékeik proteint nem kódoló kis RNS molekulák). A látens membrán fehérjét kódoló LMP1 és LMP2A gének ezzel szemben nem expresszálódnak.

Biszulfid-modifikált DNS minták genomikus szekvenálásával megállapítottuk, hogy az aktív promóterek (Qp, EBER1p, EBER2p) metilálatlanok C666-1 sejtekben. Ezen kívül metilálatlannak bizonyult az „enhancer” működésű látens replikációs origó (*oriP*) is. Ezzel szemben az inaktív Cp, LMP1p és LMP2p erősen metiláltak voltak. Két nude egérben passzált NPC vonal vizsgálata hasonló eredménnyel járt.

Az „*in vivo footprinting*” módszerével megállapítottuk, hogy az inaktív Cp-hez nem kapcsolódik fő celluláris regulátora, a CBF1 (C promoter binding factor 1) nukleáris protein. Ezzel szemben az aktív Qp számos nukleáris fehérje és EBNA 1 „lennyomatát” mutatta. A III. típusú látenciára jellemző fehérje-DNS kölcsönhatás (a 62416-os guanin DMS hiperszenzitivitása, egy feltételezett represszor fehérje kapcsolódása az inaktív Qp-hez) ugyanakkor C666-1 sejtekben (Qp aktív) nem volt észlelhető. Ez megerősíti korábbi adatainkat.

Az EBER 1 promóterhez hasonló fehérjék kötődtek C666-1 sejtekben, mint limfoid sejtekben. Ugyanakkor NPC/epitheliális sejt specifikus fehérje-DNS kölcsönhatásokat is észleltünk.

Mivel EBER 1 és 2 valamennyi vizsgált sejttypusban hipometilált, megvizsgáltuk, hogy *in vitro CpG metiláció* gátolja-e expressziójukat. EBER 1 és 2 hordozó metilált és metilálatlan plazmidot transzfektáltunk EBV negatív sejt vonalakba és real-time PCR-rel vizsgáltuk kifejeződésüket. CpG metiláció jelentősen csökkentette mind EBER 1, mind EBER 2 expresszióját. Beállítottuk az „*in vitro DNase I footprinting*” módszerét, és ennek segítségével megvizsgáltuk nukleáris fehérjék kötődését metilált vagy metilálatlan EBER 1 génhez, illetve annak 5' szabályozó régiójához. CpG metiláció gátolta a celluláris c-Myc és ATF fehérjék kapcsolódását az EBER 1 gén 5' régiójához. Az intragenikus RNS polimeráz III kötőhelyek footprint mintázata csak kissé módosult CpG metilációt követően. Valószínűsíthető, hogy a CpG metiláció nukleáris fehérjék kapcsolódásának közvetlen gátlásával blokkolja az EBER1p aktivitását.

Qp minden vizsgált sejtben metilálatlannak bizonyult, aktivitásától függetlenül. Korábbi adataink alapján III típusú látenciában egy represszor fehérje kötődését feltételezzük a Qp szabályozó régióban. Mivel a hiszton fehérjék módifikációi

befolyásolják a kromatin szerkezetet és a promóterek aktivitását, beállítottuk a ***kromatin immunprecipitáció*** módszerét egyes módosított hisztonok detektálására. Megállapítottuk, hogy az acetilált H3 és H4 hisztonok szintje korrelál Cp aktivitásával limfoid és C666-1 sejtekben. Ezzel szemben az aktív Qp a lizin 4-es pozícióban dimetilált hiszton H3-ban (H3MK4) gazdag. Ez valószínűsíti, hogy H3MK4 közrejátszik Qp aktivitásának szabályozásában.

A kutatási témával kapcsolatos, közlésre elküldött kéziratok:

Agnes Bakos, Ferenc Banati, Anita Koroknai, Maria Takacs, Daniel Salamon, Susanna Minarovits-Kormuta, Fritz Schwarzmann, Hans Wolf, Hans Helmut Niller, and Janos Minarovits: 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

Ferenc Banati, Anita Koroknai, Daniel Salamon, Maria Takacs, Susanna Minarovits-Kormuta, Hans Wolf, Hans Helmut Niller and Janos Minarovits: CpG methylation silences the activity of RNA polymerase III transcribed EBER 1 promoter of Epstein-Barr virus

György Fejér, Anita Koroknai, Ferenc Banati, Ildiko Györy, Daniel Salamon, Hans Wolf, Hans Helmut Niller, and Janos Minarovits: Epigenetic Marks at the Alternative Latency Promoters of Epstein-Barr Virus: Cp Usage Is Controlled by Acetylated Histones H3 and H4 whereas Active Qp is Enriched in Histone H3 Dimethylated at Lysine 4