

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Molekulare Studien zur Effizienz und Stabilität EBV-basierender extrachromosomaler Genvektoren



Manuel J. Deutsch

März 2009

Tag der Abgabe: 30.03.2009

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ruth Brack-Werner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Epstein-Barr Virus	1
1.1.1 <i>oriP</i>	3
1.1.2 EBNA1	6
1.2 DNA Replikation	8
1.3 Epigenetische Grundlagen und Kernmodelle	12
1.4 Das Epstein-Barr Virus als Genvektor	15
1.5 „High-Mobility-Group“-Proteine	17
1.6 Heterochromatisches Protein 1	19
1.7 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Oligonukleotide	22
2.1.2 Plasmide	22
2.1.3 Antikörper	25
2.1.4 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	25
2.1.5 Zelllinien	26
2.1.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges	26
2.2 Methoden	30
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	30
2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	30
2.2.1.2 Antibiotikazusätze	30
2.2.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> und Transformation von <i>E.coli</i>	30
2.2.1.4 Elektroporation von kompetenten <i>E.coli</i>	31
2.2.2 Zellkultur	31
2.2.2.1 Kultivierung	31
2.2.2.2 Aufbewahrung von Zellen	34
2.2.2.3 Transfektion	34

2.2.2.4 Elektroporation eukaryonter Zellen	35
2.2.2.5 Doxyzyklin-Behandlung	35
2.2.2.6 Erstellung stabiler Zelllinien	35
2.2.3 DNA-Arbeitstechniken	36
2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	37
2.2.3.3 Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	37
2.2.3.4 Enzymatische Modifikation von DNA	37
2.2.3.5 Präparative Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.3.6 HIRT-Extraktion	38
2.2.3.7 Plasmid-Rescue-Assay	38
2.2.3.8 Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP)	38
2.2.3.9 Quantitative PCR („Real Time“-PCR / RT-PCR)	40
2.2.3.10 Nicktranslation f. die Gewinnung v. DNA-Sonden	40
2.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten	41
2.2.4.1 Präparation von RIPA-Lysaten	41
2.2.4.2 Präparation von Kern-Extrakten	41
2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.2.4.4 Western-Blot gegen Proteine	41
2.2.4.5 Amidoblackfärbung	42
2.2.5 Mikroskopie	42
2.2.5.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläsern	42
2.2.5.2 Hypertone Behandlung	42
2.2.5.3 Fluoreszenz- <i>in-Situ</i> -Hybridisierung (FiSH)	43
2.2.5.4 Immunfluoreszenz-Färbung	44
2.2.5.5 ImmunoFiSH-Verfahren	44
2.2.5.6 Herstellung von Lebendzell-Beobachtungskammern	45
2.2.5.7 Immunkolokalisation von HepG2-Zellen	46
2.2.5.8 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)	46
2.2.5.9 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	47
2.2.5.10 Elektronische Bildbearbeitung	47

3. Ergebnisse	48
3.1 Lokalisationsbestimmung von EBV in Interphase-Nuklei	48
3.1.1 Etablierung EBV-spezifischer Sonden f. d. FiSH Verfahren	49
3.1.2 EBV lokalisiert i. d. perichromatischen Region des Nukleus	52
3.1.3 EBV kolokalisiert mit seinem viralen <i>trans</i> -Faktor EBNA1 i. d. perichromatischen Region des Interphase-Nukleus	56
3.1.4 EBV kolokalisiert bevorzugt mit Histonmodifikationen des aktiven Euchromatins	58
3.1.5 Die Integrität von <i>oriP</i> beeinflusst die Assoziation von EBV mit heterochromatischen Histonmodifikationen	64
3.1.5.1 Deletion von FR oder <i>oriP</i> führt zum Verlust der perichromatischen Lokalisation von miniEBV	67
3.1.5.2 Deletion von DS führt zu einer stärkeren Assoziation mit heterochromatischen Histonmodifikationen	71
3.2 Einfluss zellulärer Proteine auf die Funktion von <i>oriP</i>	74
3.2.1 Das Vektorsystem pCON	75
3.2.2 HP1 α vermittelt eine gute Retention, aber eine schlechte Replikation	78
3.2.3 HP1 α interagiert mit Orc5 und Orc6	88
3.2.4 Die HP1 α -abhängige Replikation wird von der funktionsfähigen Chromoshadow-Domäne negativ beeinflusst	93
4. Diskussion	97
4.1 EBV lokalisiert in euchromatischen Bereichen der perichromatischen Region in Interphase-Nuklei	98
4.2 Der Einfluss von <i>oriP</i> auf die Lokalisation EBV-basierender Genome	99
4.3 Die Bedeutung der EBV-Lokalisation für die Entwicklung gentherapeutischer Vektoren	101
4.4 Das pCON-Vektorsystem in der Genvektorentwicklung	102
4.5 sctetR::HMGA1a vermittelt eine gute Replikation und Retention, zeigt aber keine dominanten Histonmodifikationen an <i>oriP</i>	103
4.6 HP1 α interagiert über seine Hinge-Region mit Orc5 und Orc6	104

4.7 HP1 α ::sctetR-Fusionsproteine zeigen primär eine Retentions- vermittlung an <i>oriP</i>	106
4.8 Die Deletion einzelner Domänen von HP1 α ::sctetR führt zu Verlust oder Steigerung der Replikationskompetenz	107
4.9 Ausblicke in der Genvektorentwicklung	109
5. Zusammenfassung	110
6. Abkürzungsverzeichnis	111
7. Literaturverzeichnis	114
8. Anhang	127
8.1 zusätzliche Abbildungen	127
8.2 Lebenslauf	129
8.3 Publikationen	132
8.4 Danksagung	133
8.5 Erklärung	134

1. Einleitung

Um einen Einstieg in die Thematik EBV-basierender Genvektoren zu bieten, werden in diesem Kapitel die wichtigsten Grundlagen angesprochen. Dazu werden zunächst das Epstein-Barr-Virus selbst, die DNA-Replikation und epigenetische Grundlagen näher erläutert. Nach einer Einführung in das EBV-basierende Vektorsystem pCON folgt eine Erklärung der Funktion der zellulären Proteine HMGA1a und HP1 α .

1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

Die Grundlage eines virus-basierenden Genvektors bildet das entsprechende Virus selbst. In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über das dieser Arbeit zu Grunde liegende Virus vermittelt werden.

Das Epstein-Barr Virus (EBV), oder auch Herpesvirus 4, gehört zur Familie der γ -Herpesviridae. Das 1964 entdeckte EBV besteht aus doppelsträngiger DNA und besitzt eine Größe von 170 kbp (Abbildung 1.1). EBV infiziert primäre B-Lymphozyten durch Interaktion mit deren B-Zellrezeptor. Das Viruscapsid wird entlang des Mikrotubuli-Netzwerkes zum Kernporen-Komplex transferiert und dann in den Nukleus injiziert. Dort etabliert sich das Virus in seiner latenten Phase als extrachromosomales Replikon mit lebenslanger Persistenz (Kieff and Rickinson).

90% der Weltbevölkerung tragen latent etabliertes EBV in sich, die Mehrheit hiervon ohne symptomatische Erkrankung. Ein kleiner Anteil der infizierten Bevölkerung erkrankt an Tumoren, die mit der Infektion durch EBV assoziiert sind, oder deren Entstehung von EBV begünstigt wird. Zu diesen Krankheiten zählen unter anderem: Burkitt-Lymphome, Morbus Hodgkin, nasopharyngeale Karzinome und Darm-Karzinome. Individuen, die erst spät mit dem Virus infiziert werden, erkranken häufig an Infektiöser Mononukleose (Evans et al., 1968).

Trotz seiner Tumorigenität ist EBV ein vielversprechendes System für die Entwicklung extrachromosomaler gentherapeutischer Vektoren, da es sich effizient in den Wirtszellen etabliert und einmal pro Zellzyklus mit dem Wirtszell-Genom repliziert wird. Das Virus besitzt zwei funktionell getrennte Replikationsursprünge *oriLyt* und *oriP*. *oriLyt* ist der Replikationsursprung der lytischen Phase und wird aktiviert sobald das Virus in diese eintritt. Während der latenten Phase wird *oriP* als Replikationsursprung verwendet und ermöglicht es dem Virus in der späten S-Phase

einmal pro Zellzyklus repliziert zu werden. Dies geschieht unter Verwendung der zelleigenen Replikations-Maschinerie der Wirtszelle (Kieff and Rickinson). Durch *oriP* etabliert sich das Virus als stabil erhaltenes extrachromosomales Replikon, welches zuverlässig an die Tochterzellen weitergegeben wird (Nanbo et al., 2007). Sollte es möglich sein, die durch *oriP* und den dazugehörigen *trans*-Faktor EBNA1 vermittelte hoch effiziente Persistenz durch ein von zellulären Proteinen gesteuertes Vektorsystem zu erreichen, hätte man ein wertvolles Werkzeug für die Gentherapie geschaffen. Dort könnte der Vektor in Gen-defizienten Patienten zur Applikation des fehlenden Gens verwendet werden.

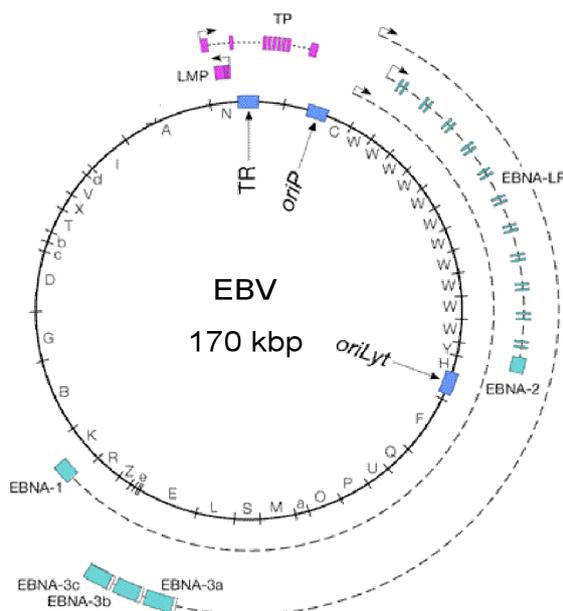


Abb.1.1: Übersicht über das Epstein-Barr Virus (EBV)

Das EBV-Genom besitzt eine Größe von 170 kbp und ist in seiner zirkulären Form durch kovalente Bindungen geschlossen. Die ursprünglich durch einen BamHI-Verdau erhaltenen DNA-Fragmente des Genoms sind durch Buchstaben an der Innenseite gekennzeichnet. So ist z. B. der C-Promotor an der mit „C“ markierten Stelle zu finden. Promotoren, Transkriptionseinheiten und die Gen-Produkte des latenten Zykluses von EBV sind an der Außenseite durch Pfeile (Promotoren), gestrichelte Linien (Transkriptionseinheiten) und türkise, bzw. violette, Rechtecke (Gen-Produkte) markiert. Die in blau dargestellten Rechtecke zeigen die Positionen der Terminal Repeats (TR), des latenten Replikationsursprungs (*oriP*) und des lytischen Replikationsursprungs (*oriLyt*).

1.1.1 *oriP*

Der Hauptfokus in der EBV-basierenden Genvektorentwicklung beruht auf dem latenten Replikationsursprung *oriP*. Dieser besteht aus einem 1,8 kbp langen DNA-Abschnitt und zeichnet sich durch seine beiden funktionell getrennten Komponenten, der Family of repeats (FR) und dem Dyad symmetry element (DS) aus (Abbildung 1.2). Beide Elemente interagieren mit dem viralen Transaktivator Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) vermittelt. Mit nur diesen beiden *cis*- und *trans*-Elementen ist es möglich, extrachromosomale Replikons in der Wirtszelle zu etablieren (Lupton and Levine, 1985; Reisman et al., 1985; Yates et al., 1984).

Das FR-Element besteht aus 21 teils ungleichen Kopien einer repetitiven 30 bp großen Sequenz und beinhaltet 20 Bindestellen für EBNA1. Diese Bindestellen sind, im Gegensatz zu denen im DS-Element, nicht abhängig von ihrer räumlichen Anordnung. Wenn FR von EBNA1 gebunden wird, vermittelt es die nukleäre Retention des extrachromosomalen Replikons, dessen zuverlässige Verteilung auf die Tochterzellen, die Assoziation an mitotische Chromosomen und verhindert den Plasmidverlust in proliferierenden Zellen (Kirchmaier and Sugden, 1995; Langle-Rouault et al., 1998; Wang et al., 2006). Durch die Assoziation der extrachromosomalen Replikons mit den mitotischen Chromosomen der Wirtszelle werden diese im „piggyback“ (Huckepack)-System an die Tochterzellen übertragen. Zusätzlich fungiert FR als *Enhancer* für Promotoren *in cis*, in einem Radius von ~10 kbp um den Cp-Promotor (Altmann et al., 2006; Gahn and Sugden, 1995; Kennedy et al., 2003; Wysokenski and Yates, 1989). Obwohl FR 20 Bindestellen für EBNA1 besitzt, ist es ausreichend, nur sieben dieser Stellen zu besetzen, um die Plasmidretention zu garantieren (Wysokenski and Yates, 1989). Durch 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass das Binden mehrerer EBNA1-Proteine an FR eine Barriere für das Fortschreiten der Replikationsgabel darstellt, und eine Termination auslöst (Ermakova et al., 1996; Gahn and Schildkraut, 1989; Wang et al., 2006).

Das DS-Element besteht aus vier EBNA1-Bindestellen die in Dyaden angeordnet sind und eine schwächere Bindeaffinität zu EBNA1 besitzen, als die Bindestellen im FR-Element (Reisman et al., 1985). Innerhalb einer Dyade sitzen die EBNA1-Bindestellen 21 bp auseinander. Die Distanz zwischen den beiden Dyaden beträgt 33

bp. Diese räumliche Anordnung ist für die Funktion von DS unbedingt notwendig und Veränderungen führen zu einem Verlust der Funktionalität (Baer et al., 1984). Aufgrund ihrer räumlichen Anordnung befinden sich beide Dyaden auf der gleichen Seite der DNA-Helix. Durch das Binden von EBNA1 wird die DNA eine leicht verbogen (Bashaw and Yates, 2001; Bochkarev et al., 1996; Frappier and O'Donnell, 1991; Harrison et al., 1994; Hsieh et al., 1993). Das DS-Element wird als primärer Replikationsursprung verwendet, unterstützt die Replikation in beide Richtungen. In einem wesentlich beschränkteren Ausmaß als FR kann auch DS die Aufrechterhaltung des extrachromosomalen Replikons vermitteln (Aiyar et al., 1998; Yates et al., 2000). Nahe des DS-Elements befindet sich eine Stelle helikal instabiler DNA, die eine leichtere Entwindung der DNA und dadurch die Replikations-Initiation ermöglicht (Polonskaya et al., 2004). Das Binden von EBNA1 an DS vermittelt die Rekrutierung von Komponenten der Replikations-Maschinerie wie den origin-recognition-complex (ORC) und die minichromosome-maintenance(MCM)-Proteine, welche den Prä-Replikations-Komplex (pre-RC) ausbilden (Gahn and Schildkraut, 1989; Schepers and Diffley, 2001). Dieser Komplex gebildet ist die Voraussetzung für die Replikation des extrachromosomalen Replikons unter Verwendung der zelleigenen Replikations-Maschinerie einmal pro Zellzyklus zusammen mit der Wirtszell-DNA.

Das DS-Element enthält zudem noch drei repetitive Nonamere, die denen in telomerischen Regionen der Wirtszell-DNA ähneln (Niller et al., 1995; Yates et al., 2000). Diese repetitiven Sequenzen werden von zellulären Proteinen die mit Telomeren assoziieren erkannt, wie z. B. dem human repressor activator protein 1 (hRap1), der Tankyrase und den TTAGGG-repeat binding factors (TRF1, TRF2) (Deng et al., 2003; Deng et al., 2002). hRap1 und TRF1 werden durch die Bindung von TRF2 an die Telomer-Sequenzen rekrutiert. TRF2 bindet in kooperativer Weise mit EBNA1 und verstärkt dessen Effizienz an DS um den Faktor 2 (Deng et al., 2002). Trotz dieses verstärkenden Effekts ist die Bindung von TRF2 nicht notwendig für die Funktion von DS (Deng et al., 2003; Deng et al., 2002; Julien et al., 2004; Wang et al., 2006; Yates et al., 2000).

Der letzte wichtige Bestandteil von *oriP* ist das Rep*-Element. Dieses kann als ein schwacher Ersatz von DS agieren und zeigt eine geringere replikative Aktivität. Das Rep*-Element besitzt keine repetitiven Nonamere und nur eine EBNA1-Bindestelle

(Kirchmaier and Sugden, 1998). Ein künstliches Einsetzen von acht Rep*-Elementen vermittelt ein mit DS vergleichbares Replikationsniveau (Wang et al., 2006). Sowohl DS als auch Rep* verwenden einen von seiner räumlichen Anordnung abhängigen Mechanismus, der die DNA entwindet und die Replikations-Maschinerie rekrutiert.

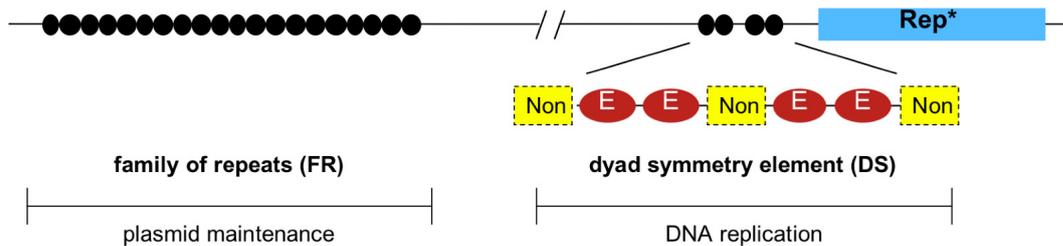


Abb.1.2: Schematische Darstellung von *oriP*

Der 1,8 kb große latente Replikationsursprung *oriP* besteht aus zwei funktionell getrennten Komponenten, der family of repeats (FR) und dem dyad symmetry element (DS). FR besteht aus 20 Bindestellen (schwarz ausgefüllte Kreise) für den viralen trans-Faktor EBNA1 und ist für die nukleäre Retention *oriP*-abhängiger Plasmide und deren Segregation auf die Tochterzellen verantwortlich. DS besteht neben 4 Bindestellen (schwarz ausgefüllte Kreise, bzw. rote Ellipsen in der vergrößerten Darstellung) für den viralen Transfaktor EBNA1 noch aus drei Nonameren (gelbe Rechtecke in der vergrößerten Darstellung) die durch das zelluläre Protein TRF2 gebunden werden. DS vermittelt die Replikation der *oriP*-abhängigen Plasmide. Das durch ein blaues Rechteck gekennzeichnete Rep*-Element kann in Abwesenheit von DS ebenfalls Replikation vermitteln, erreicht hierbei aber nur 1/8 der Replikationskompetenz von DS.

1.1.2 EBNA1

Um funktionsfähig zu sein benötigt *oriP* einen Interaktionspartner, das Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1), welches der einzig essentielle *trans*-Faktor für *oriP* ist und über mehrere Funktionen verfügt. EBNA1 bindet als Homodimer mit seiner überlappenden DNA-Binde- und Dimerisierungs-Domäne an seine Bindestellen in *oriP* (Abbildung 1.3).

Die bemerkenswertesten Domänen dieses 641 Aminosäuren (AS) großen Proteins sind die Linking Region 1 (LR1; AS 40-89) und die Linking Region 2 (LR2; AS 325-378) (Abbildung 1.3). Diese können miteinander interagieren und verknüpfen so zwei EBNA1-Elemente. Auf diese Weise werden die beiden Dyaden des DS miteinander verbunden und die EBNA1-abhängige Replikation unterstützt (Frappier and O'Donnell, 1991; Middleton and Sugden, 1992). Dies wird durch einen redundanten Mechanismus vermittelt, der auch noch funktional ist, wenn eine der beiden Regionen deletiert wird (Mackey and Sugden, 1999; Sears et al., 2004). LR1 und LR2 enthalten ein Glyzin-Arginin-Motif und binden dadurch an AT-reiche DNA (Aravind and Landsman, 1998; Sears et al., 2004).

Zusätzlich zu dieser gemeinsamen Funktion besitzen beide Regionen noch weitere, für sie spezifische Funktionen. LR1 enthält die Unique Region 1 (UR1), welche essentiell für die effiziente Transformation von primären B-Zellen ist. Virus-Derivate, die keine UR1 tragen, besitzen im Vergleich zum Wildtyp-Virus nur eine Transformationseffizienz von 0,1 % (Altmann et al., 2006). Die zweite Funktion von UR1 ist die Vermittlung der Transkriptions-Aktivierung und -Effizienz durch das Binden von EBNA1 an FR (Kennedy and Sugden, 2003; Wu et al., 2002).

LR2 wird von dem nukleolären Protein EBP2 gebunden. EBP2 ist ein essentielles Protein in der Ribosom-Biogenese (Shire et al., 1999). Die Interaktion von EBP2 und EBNA1 unterstützt die Replikon-Aufrechterhaltung in *Saccharomyces cerevisiae* (Kapoor and Frappier, 2003; Kapoor et al., 2001). In humanen Zellen konnte dieser Mechanismus bislang nicht nachgewiesen werden.

Die beiden Linking-Regions sind durch repetitive Glyzin-Glyzin-Alanin-Motiven (GGA) voneinander getrennt, die bis zu 200 Aminosäuren lang sein können. Diese könnten dazu beitragen, das Immunsystem des Wirtes zu umgehen, da sie eine Degradation durch das 26S-Proteasom und dadurch die Antigenpräsentation durch den major

histocompatibility complex (MHC) verhindern (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997).

Ein Kernlokalisationsignal (NLS) ist in den Aminosäuren 379-386 kodiert und interagiert mit der Kern-Import-Maschinerie der Wirtszelle (Fischer et al., 1997; Kim et al., 1997).

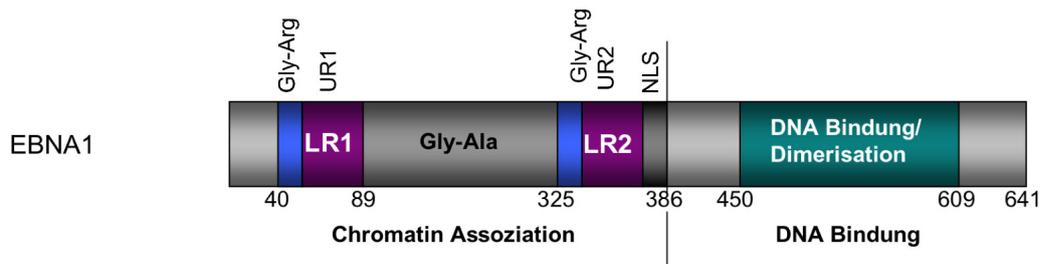


Abb.1.3: Schematische Darstellung EBNA1

Der virale *trans*-Faktor EBNA1 besteht aus den beiden Linking-Regions (LR1 und LR2; blaue und violette Rechtecke), den Glyzin-Glyzin-Alanin-Motive (dunkelgraues Rechteck), seinem Kernlokalisationsignal (schwarzes Rechteck) und der DNA-Binde/Dimerisierungs-Domäne (grünes Rechteck). LR1 (AS 20 – 89) und LR2 (AS 325 – 378) beinhalten die entsprechenden Unique-Regions UR1 und UR2 (violette Rechtecke) sowie Glyzin-Arginin-Reste (blaue Rechtecke). Die Glyzin-Arginin-Reste dienen dem Binden von EBNA1 an AT-reiche DNA. Die Glyzin-Glyzin-Alanin-Motive werden verwendet um das Immunsystem der Wirtszelle zu umgehen. Die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne dient der Bildung von EBNA1-Homodimeren und der Bindung von EBNA1 an seine Bindestellen auf *oriP*. Die Aminosäurepositionen für die einzelnen Domänen sind unter dem Schema angegeben und entsprechen der Konformation des in B95.8-Zellen exprimierten EBNA1.

1.2 DNA Replikation

Als nächstes soll das Augenmerk auf die DNA-Replikation gerichtet werden. Ein erfolgreich applizierter extrachromosomaler Genvektor muss, genauso wie das Erbgut der Wirtszelle, zuverlässig an Tochterzellen weitergegeben werden. Um die in der Zelle enthaltene Erbgut-Information an die Tochterzellen weitergeben zu können, muss die DNA einmal pro Zellzyklusphase repliziert werden. Dies findet in der Synthese-Phase (S-Phase) des eukaryonten Zellzykluses von Replikationsursprüngen (Origins) aus statt. Eukaryonte Zellen werden, im Gegensatz zu Prokaryonten, aufgrund ihrer großen Genome von mehreren Replikationsursprüngen aus repliziert. Dieser Vorgang ist stark kontrolliert, da ein fehlerhaftes Replizieren der DNA zu genomischer Instabilität und dadurch zum Zelltod führen kann.

Die doppelsträngige DNA-Helix muss, um repliziert werden zu können, durch die Aktivität einer DNA-Helikase entwunden werden. Das Laden der DNA-Helikase wird in eukaryonten Zellen durch einen mehrstufigen Prozess vorbereitet. Durch das Binden des origin-recognition-complex (ORC) an DNA werden potentielle Replikationsursprünge festgelegt. ORC bildet dort eine interaktive Plattform für den Zusammenbau des Prä-Replikations-Komplexes (pre-RC), welcher zusätzlich zu den Proteinen Orc1-6 aus Cdt1, Cdc6 und dem MCM2-7-Komplex besteht (Diffley, 1995). Der pre-RC wird während des Übergangs von der G1- in die S-Phase zum Prä-Initiations-Komplex (pre-IC). Nach dessen Aktivierung kommt es zur Entwindung der DNA am Replikationsursprung und zur Rekrutierung des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes (Lei and Tye, 2001). Nachdem die Primase einen (ca. 20 bp langen) RNA-Primer synthetisiert hat, wird dieser von der DNA-Polymerase α um ~20 Nukleotide verlängert. Die durch die Entwindung entstehenden DNA-Einzelstränge werden durch Einzelstrang-bindende Proteine wie das replication protein A (RPA) stabilisiert. Nach dem RF-C-vermittelten Laden des proliferating cell nuclear antigen (PCNA), welches wie eine Ringklemme für die DNA funktioniert, wird die Replikation von den Polymerasen δ und ϵ weitergeführt (Abbildung 1.4). Am sogenannten Vorwärts-Strang (leading strand) erfolgt die DNA-Synthese kontinuierlich durch die Aktivität der Polymerase ϵ in 5'-3'-Richtung. Am sogenannten Rückwärts-Strang (lagging strand) ist dies aufgrund der Richtung der

Polymerasen-Aktivität von Polymerase δ nicht möglich (Kunkel and Burgers, 2008). Hier werden mehrere RNA-Primer auf den DNA-Strang synthetisiert und von den Polymerasen verlängert. Die Okazaki-Fragmente enden am Start-Primer des vorangegangenen Okazaki-Fragmentes. Das RNA-Startstück wird von RNase H entfernt, durch DNA ersetzt und die beiden Fragmente durch DNA-Ligase I miteinander verknüpft. Nach der Synthese der Tochterstränge erfolgt die Termination der Replikation durch das Aufeinandertreffen zweier Replikationsgabeln.

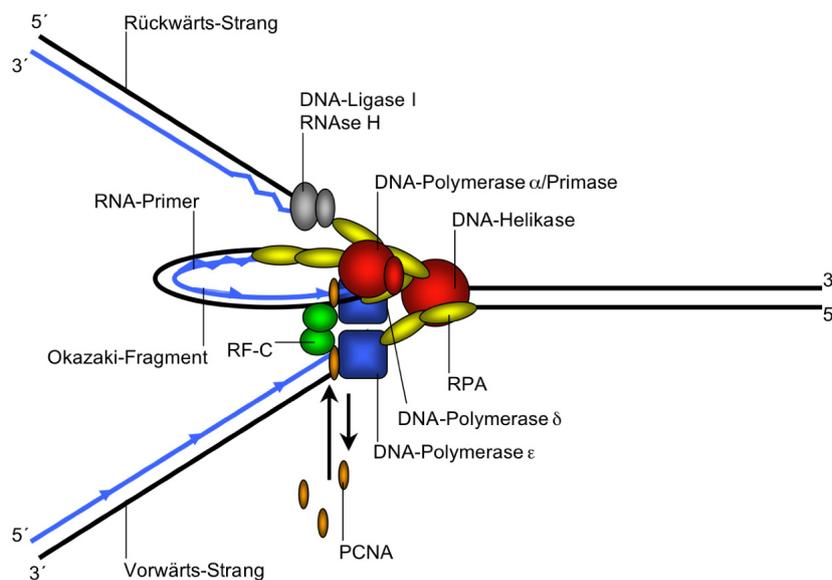


Abb.1.4.: Schematische Darstellung einer Replikationsgabel

(gemäß Alberts „Molecular Biology of the Cell“, vierte Auflage); Nach dem Entwinden der DNA (schwarzer Strang) durch die DNA-Helikase (rot ausgefüllter Kreis) werden die Einzelstränge durch RPA (gelb ausgefüllte Ellipsen) gebunden. Nach der Synthese eines RNA-Primers und dessen Verlängerung (beides vermittelt durch DNA-Polymerase α und Primase; rot ausgefüllter Kreis mit rot ausgefüllter Ellipse) wird die DNA in 5'-3'-Richtung von den Polymerasen ϵ und δ (blau ausgefüllte Rechtecke) synthetisiert (blauer Strang). Der Vorwärts-Strang wird kontinuierlich durch Polymerase ϵ , der Rückwärts-Strang in Okazaki-Fragmenten durch Polymerase δ synthetisiert. Die RNA-Primer der Okazaki-Fragmente werden durch RNase H entfernt und die Fragmente werden durch DNA-Ligase I miteinander verknüpft (grau ausgefüllte Ellipsen). Eine Stabilisierung der DNA-Stränge erfolgt durch das von RF-C (grün ausgefüllte Kreise) vermittelte Laden der Ringklemme PCNA (orange ausgefüllte Kreise).

Der origin-recognition-complex (ORC)

Grundvoraussetzung für die Replikation der DNA ist die Bildung des Prä-Replikativen Komplexes. Einer der wichtigsten Bestandteile dieses Komplexes ist der origin-recognition-complex (ORC). Durch die Bindung von ORC an DNA werden in der G1-Phase potentielle Replikationsursprünge markiert. ORC wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* als Komplex beschrieben, der an die ARS-Konsensus-Sequenzen der Replikationsursprünge bindet (Bell and Stillman, 1992). ORC besteht aus sechs Untereinheiten, die gemäß ihrer Größe als Orc1 bis Orc6 bezeichnet werden. In *S.cerevisiae* ist Orc1 mit ~104 kDa die größte und Orc6 mit ~50kDa die kleinste Untereinheit des Komplexes. In höheren Eukaryonten wurden die Proteine Orc1-5 durch Analysen der Sequenzhomologie als zu den *S.cerevisiae*-Proteinen homolog identifiziert. Die verschiedenen Orc6-Proteine sind zueinander homolog, zeigen aber keine große Sequenzhomologie zu den Proteinen aus *S.cerevisiae*. Die Assoziation und Funktion von Orc6 in Vertebraten ist bislang kontrovers diskutiert (Dhar et al., 2001; Ranjan and Gossen, 2006). In *S.cerevisiae* führt die Assoziation von Orc6 mit ORC zu dessen Stabilisierung und wird zum Eintritt in die S-Phase benötigt (Semple et al., 2006). In Metazoen wurde Orc6 erstmals in *Drosophila melanogaster* im Komplex mit den restlichen ORC-Proteinen nachgewiesen (Chesnokov et al., 1999). In *D.melanogaster* hingegen trägt Orc6 zur Erkennung von Replikationsursprüngen bei und ist essentiell für die replikativen Funktionen von ORC (Balasov et al., 2007).

Die ORC-Untereinheiten Orc2-5 bilden einen Kern-Komplex mit dem Orc1 zellzyklusabhängig interagiert. Humanes ORC ist in der Metaphase nicht an Replikationsursprüngen nachweisbar und lässt vermuten, dass diese in jedem Zellzyklus neu besetzt werden müssen (Abdurashidova et al., 2003; Gerhardt et al., 2006). Die Expression von Orc1, dessen Bindung essentiell für die Ausbildung des pre-RC ist, wird in Säugerzellen durch den Transkriptionsfaktor E2F Zellzyklusabhängig kontrolliert (Ohtani et al., 1996). In der S-Phase wird chromatingebundenes Orc1 phosphoryliert und durch das 26S-Proteasom abgebaut (Li and DePamphilis, 2002). Nach der Initiation der DNA-Replikation ist Orc1 nicht mehr am Chromatin nachweisbar (Ohta et al., 2003; Tatsumi et al., 2003).

Obwohl viele ORC-Untereinheiten Homologien zur Familie der AAA⁺-ATPasen besitzen, zeigen nur die Untereinheiten Orc1, Orc4 und Orc5 ATPase-Aktivität (Neuwald et al., 1999). Die Integrität dieser ATP-Bindemotive ist essentiell für die Funktionalität von ORC. Darüber hinaus hat die Bindung von ATP an einige ORC-Untereinheiten einen starken Einfluss auf die Struktur und Bildung von ORC und stimuliert dessen Bindung an DNA (Ranjan and Gossen, 2006).

Nach der Bindung an DNA bildet ORC eine Binde-Plattform für weitere Komponenten des pre-RC (Abbildung 1.5), welcher am G1/S-Übergang aktiviert wird (Bell, 2002; Diffley, 1995). Im Gegensatz zu den ARS-Sequenzen in *S.cerevisiae* gibt es in humanen Zellen zwar ortsspezifische Initiationsereignisse (Giacca et al., 1994), aber es gibt keine Sequenzspezifität für die Bindung von ORC (Vashee et al., 2003). Dieser offensichtliche Widerspruch wird dadurch erklärt, dass die Erkennung von Replikationsursprüngen in humanen Zellen durch epigenetische Faktoren hervorgerufen wird (Gilbert, 2004; Schaarschmidt et al., 2004; Thomae et al., 2007).

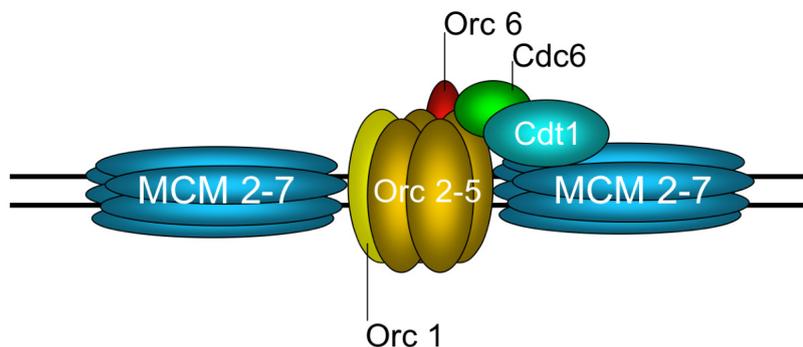


Abb. 1.5: Darstellung des prä-Replikations Komplexes (pre-RC)

Der in der G1-Phase zusammengesetzte prä-Replikations-Komplex (pre-RC) besteht aus: ORC-Kernkomplex (orange ausgefüllte Ellipsen), Orc6 (rot ausgefüllte Ellipse), Orc1 (gelb ausgefüllte Ellipse; wird in der Mitose wieder an Orc2-6 reassoziert), MCM 2-7-Komplex (blau ausgefüllte Ellipsen, assoziiert mit ORC in der G1-Phase), Cdc6 (grün ausgefüllte Ellipse, bindet an ORC in der frühen G1-Phase), Cdt1 (türkis ausgefüllte Ellipse, assoziiert mit ORC in der G1-Phase und verhindert eine Re-Replikation).

1.3 Epigenetische Grundlagen und Kernmodelle

Die stabile Etablierung eines extrachromosomalen Genvektors ist nicht nur von seiner Fähigkeit repliziert werden zu können. Da derartige Vektoren bisher eine niedrige Etablierungseffizienz zeigen wird angenommen, dass epigenetische Faktoren bei der Etablierung eine Rolle spielen (Leight and Sugden, 2001). Bisher gibt es allerdings keine Studien zur epigenetischen Einordnung von EBV im Zellkern. Zum besseren Verständnis des Terminus Epigenetik werden hier die Grundlagen der Chromatin-Struktur und Zellkern-Architektur erläutert.

In eukaryonten Zellen liegt die DNA als Chromatin, einem Komplex aus DNA, Histon- und Nicht-Histon-Proteinen, vor. Die Histon-Proteine bilden ein Histonoktamer aus jeweils zwei H2A, H2B, H3 und H4 Proteinen (Luger et al., 1997). Um dieses Histonoktamer sind in einer $1\frac{3}{4}$ Windung 146 bp DNA gewunden und bilden so die kleinste Grundeinheit des Chromatins, das Nukleosom.

Die aus dem Nukleosom herausragenden aminoterminalen Enden der Histone sind Ziel posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierungen, Methylierungen, Acetylierungen, ADP-Ribosylierungen und Ubiquitinylierungen (Kouzarides, 2007). Diese Modifikationen regulieren zusammen mit Prolin-Isomerisierungen, den Aktivitätszustand des Chromatins. Dieser „Histone Code“ wirkt sich unter anderem auf die Chromatin-bezogenen Prozesse der Transkription, DNA-Reparatur und DNA-Replikation aus (Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2007; Strahl and Allis, 2000; Turner, 1993). Über die Histonmodifikation wird die Dichte und Aktivität des Chromatins bestimmt. Durch Trimethylierung der Lysine 9 und 27 des Histon-Proteins 3 wird das Chromatin in eine stärker kondensierte, heterochromatische Form gebracht (Bannister et al., 2001). Heterochromatin ist im Zellkern meist in der Peripherie und um den Nukleolus lokalisiert (Zinner et al., 2006). Neben dem Heterochromatin existiert das sogenannte Euchromatin, welches durch Histonmodifikationen gekennzeichnet ist, die eine offene Chromatininformation begünstigen. Zu diesen Modifikationen zählen die Trimethylierung des Lysins 4 von Histon 3 sowie die Acetylierung von Lysin 9 am gleichen Histon (Heintzmann and Sheppard, 2007). Euchromatin zeichnet sich durch seine höhere Transkriptionswahrscheinlichkeit aus und lokalisiert eher in Richtung Kernmitte (Zinner et al., 2006). So wird z. B. die Replikation in euchromatischen Bereichen in

der frühen S-Phase durchgeführt und die in heterochromatischen Bereichen in der späten S-Phase (Leonhardt et al., 2000). Die durch Histonmodifikationen hervorgerufene Verteilung des Chromatins im Interphase-Zellkern lässt sich vereinfacht so einteilen, dass inaktive Bereiche in der Peripherie und aktive Bereiche in der Mitte lokalisieren (Sadoni et al., 1999).

Der Zellkern stellt ein hoch-komplexes und kompartimentalisiertes Organell dar. Spezifische Prozesse finden nicht global im ganzen Zellkern statt, sondern sind meist spezialisierten (nukleären) Domänen zugeordnet (Spector, 2001). So finden Transkription und Replikation in „Fabriken“ statt, die mehrmals pro Nukleus existieren. Hier werden mehrere Transkriptions- oder Replikationsereignisse an einer Stelle hoher Aktivität zusammengefasst und abgewickelt. Diese „Fabriken“ befinden sich an der Grenze zwischen den chromatischen Regionen und dem sogenannten Interchromatin Compartment (IC) (Cremer et al., 2006). Dieses Kompartiment ist für die Mobilität der Proteine im Nukleus unerlässlich und bildet einen wichtigen Bestandteil der Kernarchitektur. Ein umfassendes Verständnis dieser Architektur konnte bisher noch nicht errungen werden. Es gibt derzeit mehrere Modelle, die die Organisation und Dynamik des Zellkerns beschreiben (Abbildung 1.6).

Die gängigsten Modelle haben gemeinsam, dass Chromosomen in ihrem dekondensierten Zustand ein spezifisches Chromatin-Territorium (CT) einnehmen und diese CTs durch ein Interchromatin-Compartment (IC) oder eine Interchromosom-Domäne (ICD) getrennt sind. Die Modelle unterscheiden im Grad der Ausstülpung und Vermengung zweier benachbarter CTs. In Abbildung 1.6-A ist das Modell gezeigt das postuliert, dass an der Oberfläche der CTs aktive Gene (grüne Kreise) liegen, die von den Proteinen der Interchromosom-Domäne transkribiert werden. Hier werden nur benachbarte aktive Gene z. B. in Transkriptionsfabriken (graue Kreise) zusammengefasst (Visser et al., 2000). Eine höhere Mobilität des Chromatins wird in Abbildung 1.6-B angenommen. In dem sogenannten Interchromatin-Compartment-Modell, werden aktive Gene aus zwei CTs zu gemeinsamen Transkriptionsfabriken gebracht. Das Chromatin bildet distinkte Schleifen, die in das Interchromatin-Compartment (IC) hinausragen (Cremer et al., 2006). Im letzten Modell in Abbildung 1.6-C sind die CTs so weit dekondensiert, dass sich benachbarte CTs miteinander vermischen und an Transkriptionsfabriken lokalisieren. Das sogenannte Lattice-Modell beschreibt aber

auch eine durch starke CT-Vermischung hervorgerufene Auflösung des eigentlichen Chromatin-Territoriums (Branco and Pombo, 2006). Gerade das Lattice-Modell und das Interchromatin-Compartment-Modell wurden kontrovers diskutiert. Da bisher durchgeführte Experimente das Interchromatin-Compartment-Modell favorisieren, wird dieses im Kontext dieser Arbeit verwendet.

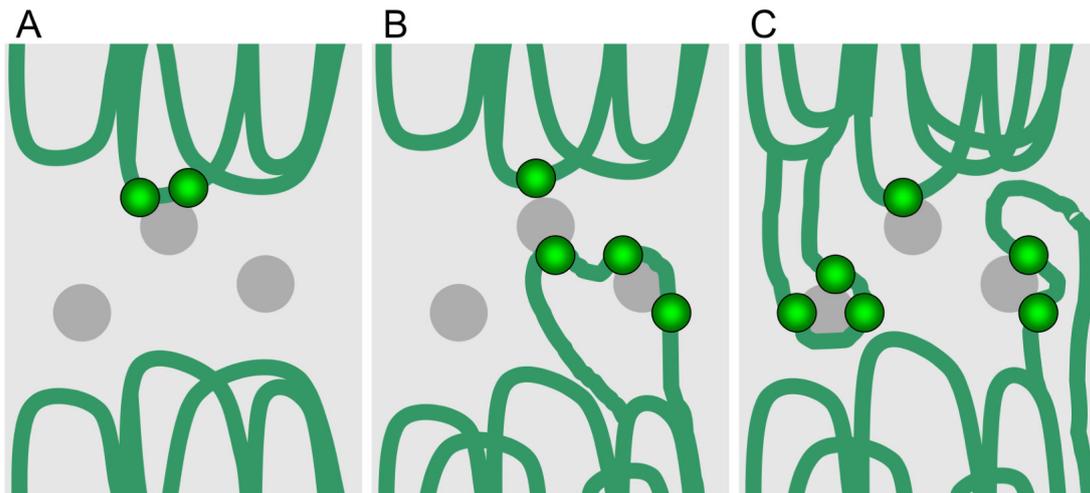


Abb.1.6.: Schematische Darstellung verschiedener Kernmodelle

(gemäß (Fraser and Bickmore, 2007))

A) Interchromosom-Domain Modell (ICD): Hier werden nur aktive Gene (hellgrün- ausgefüllte Kreise) aus der gleichen oder nahe zueinander benachbarten chromatischen Domäne (dunkelgrüne Areale) zu den Transkriptionsfabriken (dunkelgrau ausgefüllte Kreise) in den Zwischenraum (hellgrau Areal) zwischen den Chromatindomänen ausgestülpt. In diesem Modell besitzt das Chromatin nur eine eingeschränkte Mobilität.

B) Interchromatin-Compartment Modell (IC): In diesem Modell ragen aktive Genregionen des Chromatins weit in den als Interchromatin-Compartment bezeichneten Zwischenraum hinein. An Transkriptionsfabriken treffen aktive Regionen verschiedener Chromatin-Domänen zusammen.

C) Lattice-Modell: Hier besitzen die Chromatin-Domänen die höchste Mobilität und Dynamik und es kommt zu einer starken Vermischung verschiedener Chromatin-Domänen. An den Transkriptionsfabriken finden sich mehrere aktive Regionen der Chromatin-Domänen.

1.4 Das Epstein-Barr Virus als Genvektor

Die Verwendung EBV-basierender Genvektoren wird durch zwei wichtige Eigenschaften des Virus interessant gemacht: der zuverlässigen Replikation durch die Wirtszell-Maschinerie und die Segregation auf die Tochterzellen. Der Einsatz des Gesamt-Virus als Genvektor ist nicht möglich, da das Virus selbst tumorigen ist. Auch eine Verwendung sogenannter mini-EBVs ist nicht möglich. Diese kleineren, ungefähr 80 kbp großen, EBV-Genome besitzen zwar nur die latenten Gene des Virus, können aber immer noch B-Zellen transformieren. Diese Tumorigenität von EBV im latenten Zustand wird primär durch das Transmembran-Protein LMP1 vermittelt (Kempkes et al., 1995a; Kempkes et al., 1995b).

Der beste Ansatz für die Erschaffung eines EBV-basierenden Genvektors liegt in der Verwendung eines Basisvektors, der sich auf den latenten Replikationsursprung *oriP* und seines *trans*-Faktors EBNA1 beschränkt. Beispielsweise wurde mit einem *oriP*/EBNA1-Vektor erfolgreich der humane-Faktor IX (hFIX) als Transgen in Mäusen appliziert (Stoll and Calos, 2002). Durch einmalige Gabe des Genvektors wurde eine stabile Proteinexpression über einen Zeitraum von acht Monaten erzielt.

Obwohl dies sehr vielversprechend ist, sind die molekularen und funktionellen Mechanismen von *oriP* und EBNA1 bisher unzureichend aufgeklärt. So ist zum Beispiel nicht klar, ob das mit der LR2 von EBNA1 interagierende Protein EBP2 für die zuverlässige Segregation von EBV-basierenden Plasmiden auf Tochterzellen notwendig ist oder nicht. In Yeast-Two-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von LR2 und EBP2 für die Segregation essentiell ist (Shire et al., 1999). Wird für die Segregation allerdings ein Fusionsprotein aus EBP2 und der DNA-Bindedomäne von EBNA1 verwendet, kommt es zu einem Verlust der Plasmide (Sears et al., 2004). Der molekulare Zusammenhang der beiden Proteine ist weiterhin unklar. Ein wesentlicher Kritikpunkt an diesem Genvektorsystem ist die potentielle Tumorigenität von EBNA1 selbst. Der virale *trans*-Faktor kann in transgenen Mäusen B-Zell-Lymphome auslösen (Tsimbouri et al., 2002) und ist daher in einem therapeutischen Genvektorsystem nicht verwendbar.

Daher ist es unerlässlich, tiefere Einblicke in die grundlegenden Mechanismen des *oriP*-EBNA1-Systems zu gewinnen. Idealerweise werden die viralen Elemente durch

funktionsanalogue, zelluläre Faktoren ersetzt. Erste Versuche, die viralen Elemente *in cis* zu ersetzen erfolgten durch die Substitution von DS durch menschliche ARS(autonomous replicating sites)-Element (Krysan et al., 1989). Hier konnte, bei durch EBNA1-FR-Interaktion-vermittelter Segregation, die Replikation der Plasmide über einen Zeitraum von zwei Monaten hinweg aufrechterhalten werden. Später wurde gezeigt, dass das DS-Element durch Orc2-bindende DNA-Regionen ersetzt werden kann um eine EBNA1-unabhängige Replikation zu erzielen (Gerhardt et al., 2006). Die so erzeugten Plasmide waren für mehrere Wochen stabil.

Erste Versuche Substitutionen *in trans* einzuführen erfolgten 2001. Ausgehend von der Beobachtung, dass EBNA1 an AT-reiche DNA bindet (Aravind and Landsman, 1998; Sears et al., 2004), wurden Fusionsproteine zwischen der DNA-Binde/Dimerisierungsdomäne von EBNA1 und dem ebenfalls an AT-reiche DNA bindenden Protein HMGA1a hergestellt (Hung et al., 2001). Das hier eingesetzte Fusionsprotein vermittelte eine gute Segregation der *oriP*-Plasmide auf die Tochterzellen. Ähnliche Experimente mit einem Fusionsprotein aus HMGB (HMG1) und der EBNA1-DNA-Binde/Dimerisierungsdomäne zeigten keine Segregation, da HMG1 nicht an mitotische Chromosomen bindet (Sears et al., 2003).

Um weiterführende Erkenntnisse über mögliche Substitutionen an *oriP* und/oder EBNA1 zu gewinnen, wurde in unserem Labor das konditionale Vektorsystem pCON entwickelt (Ehrhardt et al., 2008). In diesem System wurden FR und/oder DS durch eine äquivalente Anzahl an tet-Operatoren (tetO) ersetzt. Fusionsproteine aus dem tet-Repressors und einem zellulären Protein können so auf ihre Fähigkeit untersucht werden, Replikation bzw. Segregation zu unterstützen. Die Funktion der DNA-Binde/Dimerisierungsdomäne von EBNA1 wird in diesem Zusammenhang von der DNA-Binde-Domäne des tet-Repressors (tetR) übernommen. Die mechanistische Aktivierung und Assoziation, die im Fall von EBNA1 über LR1 und LR2 vermittelt wird, wird im pCON-System durch das an tetR geknüpfte Fusionsprotein vermittelt. Die Interaktion zwischen tetO und tetR kann durch die Zugabe von Doxzyklin unterbunden werden. Dieses variable und konditional steuerbare System ermöglicht eine Untersuchung potentieller zellulärer Substituenten für das *oriP*-System nach ihrer Einsatzmöglichkeit an FR, DS oder an beiden Elementen. Durch das Identifizieren verschiedener Substituenten ist es möglich je nach erwünschter Replikations- und Segregationskompetenz unterschiedlicher Fusionsproteine im

pCON-System einzusetzen und so einen individuell steuerbaren Genvektor zu erschaffen.

In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass das Protein HMGA1a in Form eines tetR-Fusionsproteins sowohl die Segregation als auch die Replikation von Plasmiden unterstützt (Thomae et al., 2007). Von diesem Standpunkt ausgehend wurde HMGA1a im pCON-System als Protein verwendet das EBNA1 in der zu untersuchenden Funktion ersetzt und dient so als Referenz. Im Vergleich hierzu wurde in dieser Arbeit das heterochromatische Protein HP1 α als Fusionsprotein auf eine mögliche Replikationskompetenz-Vermittlung und Segregationskompetenz hin getestet. HP1-Proteine zeigen in *D.melanogaster* eine Interaktion mit ORC und binden an das Chromatin. In den folgenden Abschnitten werden die Funktionen der beiden eben angesprochenen Protein-Familien detaillierter erläutert.

1.5 „High-Mobility-Group“-Proteine

Die Familien der „High-Mobility-Group“ bilden die zweithäufigste Komponente der Chromatin-Proteine. Der Name dieser Proteingruppe stammt von deren hoch mobilem Laufverhalten in der Gelelektrophorese. HMG-Proteine lassen sich in drei Familien aufteilen; die HMGN-, HMGB- und HMGA-Proteine. Diese Einteilung richtet sich nach ihren Chromatin-Bindeeigenschaften.

HMGN-Proteine binden unabhängig von der DNA-Sequenz durch Interaktion mit den Nukleosomen an das Chromatin (West, 2004). Sie lassen sich in den fünf Varianten HMGN1, HMGN2, HMGN3a, HMGN3b und HMGN4 finden. Diese Proteine binden dynamisch an das Chromatin und kompetitieren mit Histon H1 um Bindestellen am Chromatin. Diese Konkurrenz steigert die Zugänglichkeit des Chromatins und begünstigt dessen euchromatischen Status (Bianchi and Agresti, 2005).

HMGB-Proteine binden durch ihre HMG-Box-Domänen, die aus drei zu einem Keil gefalteten α -Helices bestehen, an DNA (Czura et al., 2001). In Säugern sind drei HMGB-Proteine (früher HMG1-Proteine) bekannt, HMGB1, HMGB2 und HMGB3. Sie tragen zwei HMG-Box-Domänen mit denen sie in die kleine Furche der DNA eindringen und diese in einen Winkel von über 90° verbiegen können (Thomas and Travers, 2001). Durch diese DNA-Biegung wird die Bindung anderer Proteine

erleichtert, z. B. Nukleosom-Remodellierung durch den CHRAC-Remodelling-Komplex (Bonaldi et al., 2002).

HMGA-Proteine binden durch ihre „AT-hook“-Motive an asymmetrische AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA (Reeves and Nissen, 1990). Zu dieser Proteinfamilie gehören HMGA1a, HMGA1b und HMGA2. Diese Proteine beeinflussen am Chromatin stattfindende Aktivitäten wie Transkription und DNA-Reparatur (Bianchi and Agresti, 2005). Sie besitzen drei der namensgebenden AT-hook-Motive und, wie andere HMG-Proteine auch, eine saure carboxyterminale Domäne. Der Abstand zwischen diesen AT-hook-Motiven unterscheidet sich zwischen den Mitgliedern dieser Proteinfamilie. HMGA1a (Abbildung 1.7) konkurriert, ähnlich den HMGN-Proteinen, mit Histon H1 um Bindestellen am Chromatin (Bonney et al., 1999). HMGA-Proteine fungieren durch die Bildung von *Enhancosomen* als architektonische Transkriptionsfaktoren. Hierbei wird die von HMGA-Proteinen hervorgerufene Biegung der DNA verwendet, um die Interaktion von Transkriptionsproteinen gegenüber deren Zielsequenzen zu erhöhen (Yie et al., 1999). Zusätzlich zu dieser Aktivität ist bekannt, dass HMGA1a mit den Heterochromatin-Proteinen HP1 α und HP1 β interagiert und zur Ausbildung von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci beitragen kann (Brocher and Hock, 2007).

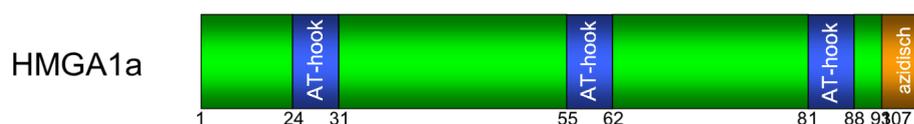


Abb.1.7: Schematische Darstellung von HMGA1a

Das 107 Aminosäuren große Protein besitzt drei AT-hook-Motive (blaue Rechtecke) mit denen es an AT-reiche DNA binden kann. Die azidische Domäne ist als oranges Rechteck dargestellt. Die Aminosäurepositionen für die einzelnen Domänen sind unter dem Schema angegeben.

1.6 Heterochromatisches Protein 1

Die Familie der Heterochromatischen-Protein-1 (HP1)-Proteine wird von Chromobox-Genen (CBX) kodiert und wurde zuerst in *D.melanogaster* beschrieben. Im Menschen kodiert das Gen CBX5 für HP1 α , CHX1 für HP1 β und CBX3 für HP1 γ (Norwood et al., 2004). Die HP1-Familie gehört zu einer Proteinsuperfamilie die sich durch **Chromatin-Organisations-modifizierende**(Chromo)-Domänen auszeichnet (Abbildung 1.7). Diese Chromo-Domäne ist in der N-terminalen Hälfte des Proteins zwischen den Aminosäuren 30-60 lokalisiert und evolutionär konserviert (Jones et al., 2000). Die Chromo-Domäne bildet eine negativ geladene globuläre Domäne die mehr für die Interaktion mit Proteinen geeignet ist als zum Binden von DNA (Ball 1997). Über diese Domäne binden HP1-Proteine an das trimethylierte Lysin 9 von Histon 3 (H3K9me3) (Platero et al., 1995). Die zweite charakteristische Domäne dieser Proteine ist die im C-Terminus liegende Chromoshadow-Domäne. Diese Domäne ähnelt strukturell der Chromo-Domäne und bildet eine etwa gleich große globuläre Domäne aus (Cowieson et al., 2000). Die Chromoshadow-Domäne dient als Protein-Protein-Interaktions-Domäne nach der Bindung von HP1 an H3K9me3-Cluster. Verbunden sind die beiden Domänen durch die sogenannte Hinge-Region, welche weniger konserviert ist als die beiden funktionellen Domänen. Die Struktur dieser Region ist flexibel und liegt exponiert an der Proteinoberfläche (Singh and Georgatos, 2002). Die Hinge-Region ist durch posttranslationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung sehr anpassungsfähig. Durch in dieser Regulationsdomäne induzierte Veränderungen beeinflusst die Lokalisation, Interaktion und Funktion des Proteins (Badugu et al., 2005; Koike et al., 2000; Lomberk et al., 2006; Zhao et al., 2001).

HP1-Proteine lokalisieren größtenteils im Heterochromatin (HP1 α , Hp1 β), vermögen aber auch euchromatische Regionen zu erkennen (HP1 γ) (Minc et al., 2000). Diese Lokalisation ist in den unterschiedlichen Interaktionspartnern der jeweiligen Proteine begründet (Lomberk et al., 2006).

Die Hauptfunktion der HP1 α/β -Proteine ist die Bildung von Heterochromatin. HP1 α/β -Proteine werden zu H3K9me3-Clustern rekrutiert und bindet die HP1 α/β -spezifische Methyltransferase SU(VAR)3-9 (Bannister et al., 2001). SU(VAR)3-9 methyliert weitere H3K9-Loci und bildet so zusätzliche Bindestellen für HP1 α/β . Im Gegenzug

wird von den HP1 α/β -Proteinen mehr SU(VAR)3-9 rekrutiert und die Methylierung breitet sich über den Genlokus aus (Lachner et al., 2001; Stewart et al., 2005). Durch das Zusammenspiel der drei Komponenten H3K9me3, HP1 α/β und SU(VAR)3-9 werden die speziellen Chromatinzustände, die für das Heterochromatin typisch sind, generiert und die Gen-Aktivität in diesen Regionen stillgelegt.

Zusätzlich vermögen HP1 α/β -Proteine mit Proteinen der nukleären Lamina, Komponenten der DNA-Replikation und Reparatur, sowie transkriptionellen Regulatoren zu interagieren (Kourmouli et al., 2000; Melcher et al., 2000; Murzina et al., 1999; Pak et al., 1997a; Yamamoto et al., 2004). In *D.melanogaster* interagiert Orc2 mit HP1 und wirkt sich in Interphase und Mitose auf die Organisation von Chromatin-Domänen aus (Pak et al., 1997b). In Mäusen konnte durch Yeast-Two-Hybrid-Experimente und Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass murines HP1 mit Orc1, Orc2 und Cdc6 interagiert (Auth et al., 2006). Ein weiterer Faktor, der die Funktionen von HP1 und ORC verknüpft, ist das HP1/ORC-assoziierte Protein (HOAP), das durch Interaktion mit ORC eine Rekrutierung von HP1 an das ORC-gebunden Chromatin vermittelt (Shareef et al., 2003). Wie sich HP1-Proteine auf die Funktion von *oriP* und damit auf die Funktion eines Genvektors auswirken ist bisher nicht untersucht worden.

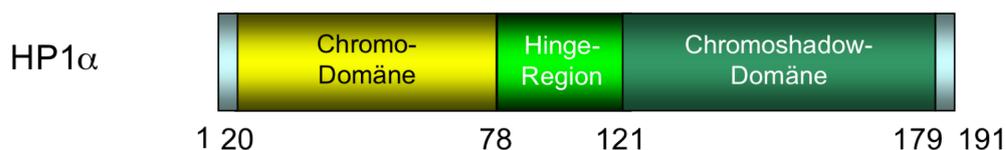


Abb.1.8.: Schematische Darstellung von HP1 α

Das heterochromatische Protein HP1 α besteht aus drei verschiedenen Domänen. Über die Chromo-Domäne (gelbes Rechteck) bindet das Protein an Histon 3, das an Lysin 9 trimethyliert ist. Die Hinge-Region (hellgrünes Rechteck) zeichnet sich durch ihre RNA- und Chromatin-Bindemöglichkeit aus und ist potentiell eine Regulations-Domäne. Die Protein-Protein-Interaktion von HP1 α wird durch die Chromoshadow-Domäne (dunkelgrünes Rechteck) vermittelt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

EBV stellt eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung gentherapeutischer extrachromosomaler Vektoren dar. Da das Virus selbst tumorigen ist, kann es nicht direkt als Vektor verwendet werden. Die EBV zueigene Replikationskompetenz und stabile Segregation auf die Tochterzellen kann in extrachromosomalen Vektorsystemen jedoch von großem Nutzen sein. In dieser Arbeit sollen die molekularen Grundlagen für ein extrachromosomales Vektorsystem untersucht und weiterentwickelt. Die Vorteile von EBV sollten in EBV-basierenden Vektoren erhalten bleiben und das tumorigene Potential sollte ausgeschaltet werden.

Bisher ist nicht bekannt wo und wie sich EBV-Genome im Nukleus etablieren. Aus der nukleären Lokalisation des Wildtyp-Virus können Rückschlüsse darauf gezogen werden, welche Faktoren für eine erfolgreiche Etablierung extrachromosomaler Genome notwendig sind. Des Weiteren ist es bislang unklar, ob und wie sich die einzelnen Elemente des latenten Replikationsursprungs *oriP* auf die Etablierung extrachromosomaler Genome auswirken. Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wird die epigenetische Lokalisation von EBV und der Einfluss der *oriP*-Integrität auf diese untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wird das konditionale Vektorsystem pCON dahingehend weiterentwickelt, dass eine Trennung der Replikations- und Retentionsfunktionen von *oriP* vorgenommen wird. Durch die Untersuchung verschiedener Substituenten für EBNA1 an *oriP* soll es ermöglicht werden, Replikation und Segregation unabhängig voneinander steuern zu können und die Vektoren durch diese zellulären Substituenten, konditional regulierbar, gezielt in bestimmte Kernregionen zu leiten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und Sigma-Aldrich synthetisiert. Die entsprechenden Sequenzen sind im Methodik-Kapitel enthalten (Tabelle 2.2).

2.1.2 Plasmide

Falls nicht anders angegeben, wurden die Plasmide im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die folgende Auflistung ist ein Auszug aus der im Helmholtz-Zentrum gespeicherten Datenbank.

p2832	<i>oriP</i> -Reporterplasmid (Gerhardt et al., 2006)
p2891	miniEBV <i>w_{oriP}</i> (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p2906	miniEBV Δ <i>oriP</i> (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p2908	miniEBV <i>oriP</i> flankiert von <i>loxP</i> -Arealen (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p2909	miniEBV Δ FR (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p2910	miniEBV Δ DS (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p2912	miniEBV ektopisches FR (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p2913	miniEBV ektopisches DS (Elisabeth Ott, Helmholtz-Zentrum München)
p3231	20xtetO-DS Reporterplasmid (Dagmar Pich, Helmholtz-Zentrum München)
p3311	20xtetO-4xtetO Reporterplasmid (Dagmar Pich, Helmholtz-Zentrum München)
p3315	FR-4xtetO Reporterplasmid (Dagmar Pich, Helmholtz-Zentrum München)

p3333	pCMV → sctetR::HMGA1a; 20xtetO-4xtetO (Dagmar Pich, Helmholtz-Zentrum München)
p3463	pCMV → HP1 α ::sctetR (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
p3473	pCMV → HP1 α ::sctetR; 20xtetO-DS (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
p3474	pCMV → HP1 α ::sctetR; 20xtetO-4xtetO (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Orc1-YC (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Orc2-YC (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Orc3-YC (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Orc4-YC (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Orc5-YC (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Orc6-YC (Andreas Thomae, Helmholtz-Zentrum München)
	pCMV → HA-Fos-YC (Hu et al., 2002)
	pCMV → FLAG-Jun-YN (Hu et al., 2002)
	pCMV → FLAG-HP1 α -YN (Brocher and Hock, 2007)
	pCMV → FLAG-CD-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → FLAG-Hinge-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → FLAG-CSD-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → FLAG-CD+Hinge-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → FLAG-Hinge+CSD-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → FLAG- Δ CD-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → FLAG- Δ CSD-YN (Robert Hock, Universität Würzburg)
	pCMV → SAF-A::sctetR; 20tetO-DS
	pCMV → Topo2a::sctetR; 20tetO-DS
	pCMV → CD::sctetR; 20tetO-DS

pCMV → CD::sctetR; 20tetO-4xtetO
pCMV → Hinge::sctetR; 20xtetO-DS
pCMV → Hinge::sctetR; 20xtetO-4xtetO
pCMV → CSD::sctetR; 20xtetO-DS
pCMV → CSD::sctetR; 20xtetO-4xtetO
pCMV → CD+Hinge::sctetR; 20xtetO-DS
pCMV → CD+Hinge::sctetR; 20xtetO-4xtetO
pCMV → Hinge+CSD::sctetR; 20tetO-DS
pCMV → Hinge+CSD::sctetR; 20tetO-4xtetO
pCMV → ΔCD::sctetR; 20xtetO-DS
pCMV → ΔCD::sctetR; 20xtetO-4xtetO
pCMV → ΔCSD::sctetR; 20xtetO-DS
pCMV → ΔCSD::sctetR; 20xtetO-4xtetO

2.1.3 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die Antikörper wurden nach Erhalt aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Primäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestell.nr.	Markierung
EBNA1	Ratte	1:1	Kremmer, HHZ	1H4	-
BrdU	Maus	1:200	Roche	11170376001	-
SC35	Maus	1:200	Sigma	S4045	-
LaminB	Kaninchen	1:200	Abcam	ab16048	-
H3K4me3	Kaninchen	1:200	Abcam	ab8580	-
H3K9me3	Kaninchen	1:200	Abcam	ab8898	-
H3K27me3	Kaninchen	1:200	Upstate	17-622	-
H3K9ac	Kaninchen	1:200	Abcam	ab4441-50	-
Snf2h	Kaninchen	1:200	Abcam	ab3749	-
HP1 alpha	Kaninchen	1:200	Abcam	ab9057	-
tetR	Kaninchen	1:1000	Kremmer, HHZ	-	-

Sekundäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestell.nr.	Markierung
Digoxigenin	Maus	1:200	Dianova	200-162-156	Cy3
mouse	Ziege	1:200	Invitrogen	A11029	Alexa488
rabbit	Ziege	1:200	Invitrogen	A11034	Alexa488
rat	Ziege	1:200	Invitrogen	A11006	Alexa488
Ratte	Ziege	1:10000	BD-BioSciences	-	hrPOX

Tabelle 2.1: Antikörperübersicht

HHZ: Helmholtz-Zentrum; hrPOX: horse-radish-peroxidase

2.1.4 Escherichia coli-Stämme

- DH5a F-; *lac*-; *recA1*; *endA1*; *hsdR17*; $\Delta(lacZYA-argF)$, U169, F80d*lacZ* Δ M15; *supE44*; *thi-1*; *gyrA96*; *relA1* (Hanahan, 1983)
- DH10B F-; *mcrA*; $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, Φ 80d*lacZ* Δ M15; $\Delta lacX74$; *deoR*; *recA1*; *endA1*; *araD139*; $\Delta(ara, leu)7697$; *galU*; *galK*; λ -; *rpsL*; *nupG* (GibcoBRL)

2.1.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren des Helmholtz-Zentrums München oder wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Eine genaue Übersicht befindet sich im Kapitel 2.2.2 Zellkultur.

2.1.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und Sonstiges

Sofern nicht anders aufgeführt, wurde die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, in reiner Form (pro analysi) bezogen.

Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge

BectonDickinson GmbH, Heidelberg

Antikörper, Plastik-Reagenzgefäße, Zellkulturflaschen

Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA

Gene-Pulser II Elektroporationsgerät, 10 ml Poly-Prep-Säulen

Calbiochem GmbH, Frankfurt am Main

Dithioerithiol (DTT), Hygromycin B, Neomycin, Puromycin

Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Acrylamid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Phenol, Roti-Block[®], Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA) Pulver

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

BioPhotometer, Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge 5415, PCR-Maschine Mastercycler personal

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparationskit für Plasmidpräparationen (JetStar)

General Electric Healthcare, München

ECL-Western-Blotting-Analysis-System, Hybond™-ECL-Zellulosemembran,
Protein A-Sepharose

Hartenstein, Würzburg

Deckgläser (18 mm rund), Objektträger, Pinzetten

Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Semi-Dry Blotting System, DyNAQuant Fluorimeter

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Antikörper, HEPES, L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penizillin,
Streptomycin, Trypsin-EDTA, Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640,
Zellkulturmedium DMEM, Benchmark Protein Ladder not prestained, β -Mercapto-
Ethanol

Leica Microsystems, Bensheim

Leica TCS SP2 Konfokal-Mikroskop

Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin Extract II Kit zur DNA-Aufreinigung

Marabu, Tamm

Fixogum Kollagen-kleber

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme, DNA-Leiter 1kbp, DNA-Leiter-Mix

Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt

Bromphenolblau, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glukose, Glycerin, Glyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Salzsäure, Saccharose, Tetramethylendiamin (TEMED), Triton X-100

Millipore, Schwalbach

Wasserentsalzungsanlage Milli-RO 60 PLUS; Antikörper (Upstate)

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 1,8 ml, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 6-Loch-Platten

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme

PAA-Laboratories, Wien, Österreich

G418-Sulfat (Neomycin)

PE-Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab-Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektroporationsküvetten, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Promega, Mannheim

Antikörper, Taq-Polymerase, Pfu-Turbo-Polymerase, dNTPs

Quiagen, Hilden

Polyfect Zelltransfektionsreagenz

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Antikörper, BrDU, dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, Klenow-Fragment, DNA Polymerase I, Restriktionsenzyme, Light-Cycler™, Light-Cycler™-Fast-Start-DNA-Master-SYBR-Green-I, HD-Fugene Transfektionsreagenz, complete Protease Inhibitor EDTAf free

Sigma-Aldrich Chemie, München

Ampicillin, DMSO, Dithioerithiol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Natriumfluorid, Natriumpyrophosphat, Triton X-100, Monolaurat (Tween 20), Rinderserumalbumin (BSA) gelöst, Doxycyclin

Scientific Volume Imaging, Hilversum, Niederlande

Huygens-Essential-Suite Dekonvolutions- und 3D-Rekonstruktions-Software

Thermo Scientific, Karlsruhe

Orbitalschüttler, Brutschränke

Vector Laboratories, Kalifornien, USA

VectaShield™-Mountig-Medium

Zeiss, Göttingen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Escherichia coli wurden in Flüssigkultur bei 37 °C und 220 rpm in Orbitalschüttlern gezüchtet. Das hierzu verwendete LB-Medium (Luria-Berthani-Broth: 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl), 0,5 % (w/v) Hefeextrakt) wurde in entionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert. LB-Agar-Platten wurden mit LB-Medium und 1,2 % (w/v) Agar hergestellt. Antibiotika wurden nach Bedarf nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Die Kultivierung der Bakterien auf Agar-Platten erfolgte nach dem Ausstreichen der Bakterien mit einem Drygalski-Spatel bei 37 °C über einen Zeitraum von 16-20 Stunden. Kulturen auf Agar-Platten wurden z. T. für einige Tage bei 4 °C gelagert um für Folgeexperimente zur Verfügung zu stehen.

Dauerkulturen wurden aus Übernacht-Kulturen gewonnen, welche mit Glycerin (10 % Endkonzentration) versetzt und bei -80 °C gelagert wurden.

2.2.1.2 Antibiotikazusätze

Stammlösungen für die verwendeten Antibiotika wurden durch das Lösen des Antibiotikums in Wasser bzw. Ethanol hergestellt und gemäß Sambrook et al. in der entsprechenden Endkonzentration eingesetzt (Sambrook et al., 1989).

2.2.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E.coli* und Transformation von *E.coli*

Chemisch-kompetente *E.coli* zur Transformation wurden gemäß des Inoue-Protokolls hergestellt und mit den in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden transformiert (Sambrook et al., 1989).

2.2.1.4 Elektroporation von kompetenten *E.coli*

E.coli die für eine elektrische Transformation kompetent waren, wurden mit einem „Gene Pulser II“ der Firma Biorad nach Herstellerangaben elektroporiert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung

Alle Zelllinien wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert.

Raji-Zellen:

Raji-Zellen wurden in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von 2-8 x 10⁵ Zellen/ml gehalten.

DG75-Zellen:

DG75-Zellen (B-Zellen) wurden in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von 2-8 x 10⁵ Zellen/ml gehalten.

LCL2089:

Die mit EBV infizierte lymphoblastoide Zelllinie LCL2089 wurde in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von 4-8 x 10⁵ Zellen/ml gehalten.

LCL2908:

Die mit dem mini-EBV 2908(wt *oriP*) infizierte lymphoblastoide Zelllinie LCL2908 wurde in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin

und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von $4-8 \times 10^5$ Zellen/ml gehalten.

LCL2910:

Die mit dem mini-EBV 2910(Δ DS) infizierte lymphoblastoide Zelllinie LCL2910 wurde in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von $4-8 \times 10^5$ Zellen/ml gehalten.

LCL2912:

Die mit dem mini-EBV 2912(ektopische FR) infizierte lymphoblastoide Zelllinie LCL2912 wurde in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von $4-8 \times 10^5$ Zellen/ml gehalten.

LCL2913:

Die mit dem mini-EBV 2913(ektopisches DS) infizierte lymphoblastoide Zelllinie LCL2913 wurde in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von $4-8 \times 10^5$ Zellen/ml gehalten.

Namalwa-Zellen:

Namalwa-Zellen wurden in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10 % FCS, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von $2-8 \times 10^5$ Zellen/ml gehalten.

HEK293-Zellen:

Die semi-adhärenenten HEK293-Zellen wurden in DMEM, dem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Beim Erreichen von 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen 1:8 - 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin abgelöst, resuspendiert und in frisches Vollmedium überführt.

HEK293-EBNA1-Zellen:

Die EBNA1-produzierenden, semi-adhärenenten HEK293-Zellen wurden in DMEM, dem 10 % FCS, 220 µg/ml Kanamycin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Beim Erreichen von 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen 1:8 - 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin abgelöst, resuspendiert und in frisches Vollmedium überführt.

HEK293-2089-Zellen:

Die stabil mit EBV transfizierten, semi-adhärenenten HEK293-Zellen wurden in DMEM, dem 10 % FCS, 80 µg/ml Hygromycin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Beim Erreichen von 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen 1:8 - 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin abgelöst, resuspendiert und in frisches Vollmedium überführt.

HEK293-EBNA1::sctetR-Zellen:

Die EBNA1::sctetR-produzierenden, semi-adhärenenten HEK293-Zellen wurden in DMEM, dem 10 % FCS, 220 µg/ml Neomycin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Beim Erreichen von 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen 1:8 - 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin abgelöst, resuspendiert und in frisches Vollmedium überführt.

HEK293-EBNA1/EBNA1::tetR-Zellen:

Die EBNA1- und EBNA1::tetR-produzierenden, semi-adhärenenten HEK293-Zellen wurden in DMEM, dem 10 % FCS, 220 µg/ml Neomycin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Beim Erreichen von 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen 1:8 - 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin abgelöst, resuspendiert und in frisches Vollmedium überführt.

HepG2-Zellen:

Die adhärenenten HepG2-Zellen wurden in DMEM, dem 10 % FCS, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 5 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Beim Erreichen von 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen 1:6 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einmaligen Waschen mit PBS mit 2 ml Trypsin abgelöst, resuspendiert und in frisches Vollmedium überführt.

2.2.2.2 Aufbewahrung von Zellen

Eukaryonte Zellen können für eine Langzeitlagerung in einem Gemisch aus 10 % DMSO und 90 % FCS in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurden die Cryotubes (10⁷-Zellen pro 2-ml-Gefäß) der Firma Nunc in einer Einfrierhilfe des gleiche Herstellers, welche einen Mantel aus 80 %igem Isopropanol besitzt, auf -80 °C abgekühlt. Die Lagerung erfolgt dann in einem Flüssigstickstofftank. Um die Zellen wieder in Kultur nehmen, wurden diese in einem 37 °C warmen Wasserbad rasch aufgetaut, in 15 ml vorgewärmtem Vollmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Vollmedium überführt.

2.2.2.3 Transfektion

Alle Transfektionen erfolgten mit 2 µg Plasmid-DNA gemäß Herstellerangaben in 6-Loch-Platten. HEK-Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von 3 x 10⁵ Zellen/Loch ausgesät und mit Polyfect in einem Verhältnis von 6:1 transfiziert. HepG2-Zellen

wurden am Vortag in einer Dichte von 3×10^5 Zellen/Loch ausgesät und mit HD Fugene in einem VErhältnis von 5:2 transfiziert.

2.2.2.4 Elektroporation eukaryonter Zellen

Die Elektroporation der eukaryonten Zellen erfolgte mit einem Gene-Pulser II gemäß Herstellerangaben.

2.2.2.5 Doxzyklin-Behandlung

Wo angegeben, wurden die transfizierten Zellen Doxzyklin-abhängigen Plasmid-Verlust-Experimenten unterzogen. Hierzu wurde Doxzyklin in einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ in das Medium zugesetzt. Selektionsmarker wurden während der Doxzyklin-Behandlung nicht zugesetzt. Während dieser Behandlung wurde das Medium alle 48 Stunden gewechselt.

2.2.2.6 Erstellung stabiler Zelllinien

Für die ChIP-Experimente wurden HEK293- und HEK293-EBNA1-Zelllinien etabliert die das Fusionsprotein HP1 α ::sctetR stabil exprimieren. Hierzu wurden die Zellen gemäß des Standardprotokolls transfiziert und für zwei Wochen unter Selektion gehalten. Die in dieser Zeit auswachsenden Kolonien wurden separat mit trypsinetränktem Whatman-Papier in 6-Loch-Platten überführt. Sobald die Einzelzellklone in den 6-Loch-Platten ausgewachsen waren, wurden sie erst in 7 cm und später in 15 cm großen Zellkulturschalen weiterkultiviert. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Western-Blot-Analyse untersucht. Klone, die ein positives Resultat für die Proteinexpression zeigten, wurden gemäß des Standardprotokolls zur späteren Verwendung eingefroren.

2.2.3 DNA-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet (Mullis et al., 1986). Alle PCR-Reaktionen wurden mit der Pfu-Turbo DNA-Polymerase nach Herstellerangaben angesetzt. Die Annealing-Temperatur wurde gemäß der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide gewählt (siehe Tabelle 2.2). Die DNA-Fragmente wurden nach der Reaktion mit einem Nucleospin-Extract-II-Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt und die Länge der Fragmente wurde in einem 0,8 %igen Agarosegel durch Gelelektrophorese bestimmt.

Verwendet für die Klonierung von:	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3') (vorwärts/rückwärts)	Schmelztemperatur
SAF-A::sctetR	ACC AAA ATC AAC GGG ACT TTC C CTG GAG ATG GGT TCG TGC TG	68,8 °C 68,1 °C
Topo2a::sctetR	CCC CCC CCG CGG GCC ACC ATG GAA GTG TCA CCA TTG CAG CCC CCC ATC GAT GCC CCC AAA CAG ATC ATC TTC	57,3 °C 73,2 °C
HP1 α ::sctetR	AGA ATT CAT GGG AAA GAA AAC CAA G TAT CGA TGC TCT TTG GCT GTT TCT TT	65,9 °C 65,7 °C
CD::sctetR	AGA ATT CAT GTATGT TGT GGA GAA G TAT CGA TCT TTT TCA TAA ATT CAG AAA TT	62,0 °C 62,7 °C
Hinge::sctetR	AGA ATT CAT GTA TAA GAA GAT GAA GGA G TAT CGA TTC TCT CAA AGC CCC	61,7 °C 64,1 °C
CSD::sctetR	AGA ATT CAT GGG ACT GGA ACC AGA A TAT CGA TAT GCA TGT CAG TCT CTC TTC	69,3 °C 67,9 °C
CD+Hinge::sctetR	AGA ATT CAT GTATGT TGT GGA GAA G TAT CGA TTC TCT CAA AGC CCC	62,0 °C 64,1 °C
Hinge+CSD::sctetR	AGA ATT CAT GTA TAA GAA GAT GAA GGA G TAT CGA TAT GCA TGT CAG TCT CTC TTC	61,7 °C 67,9 °C
Δ CSD::sctetR	AGA ATT CAT GGG AAA GAA AAC CAA G TAT CGA TTC TCT CAA AGC CCC G	65,9 °C 68,1 °C
Δ CD::sctetR	AGA ATT CAT GTA AAG AAG AAT GAA GGA GG TAT CGA TGC TCT TTG GCT GTT TCT TT	64,3 °C 65,7 °C

Tabelle 2.2: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide

2.2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde mit einem DyNAQuant Fluorimeter der Firma Hofer gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.3 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Die benötigten Plasmide wurden durch Maxi- oder Mini-Präparationen aus *E.coli* gewonnen. Hierzu wurde die alkalische Lyse gemäß Birnboim (Birnboim, 1983) verwendet. Die Plasmide wurden durch Ethanol- bzw. Isopropanolfällung (Sambrook et al., 1989) präzipitiert und in TE (TE: 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) resuspendiert.

2.2.3.4 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktion von DNA: Die Restriktion, oder der Verdau, von DNA wurde mit den vom Hersteller empfohlenen 10x Puffer-Konzentrationen durchgeführt. Die eingesetzte Enzymmenge, Temperatur und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und dem Volumen des Ansatzes. Eine Inaktivierung der Enzyme erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Ligation von DNA: Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden: Um Religationsereignisse zu vermeiden wurde die 5'-Phosphatgruppe der DNA abgespalten. Dies wurde mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.5 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die zu präparierende DNA wurde durch ein 0,8 %iges TAE-Agarosegel, dem 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde, aufgetrennt. Die Fragmente wurden unter einer 254 nm UV-Lampe analysiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die so präparierten Fragmente wurden mit dem Nucleospin-Extract-II-Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.3.6 HIRT-Extraktion

Zur Präparation von extrachromosomaler DNA aus HEK-Zellen wurde eine konfluente 15-cm-Zellkulturschale nach Absaugen des Mediums mit 5 ml TEN-Puffer (TEN-Puffer: 10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) gewaschen. Durch Zugabe von 1,5 ml TEN-Puffer und 1,5 ml 2x HIRT-Puffer (HIRT-Puffer: 20 mM Tris pH 7,5; 1,2 % SDS; 20 mM EDTA) wurden die Zellen lysiert (Hirt, 1966). Das Lysat wurde in 12-ml-Röhrchen überführt und für zwei Minuten rotiert. Zur Fällung der Proteine und der genomischen DNA aus dem Lysat wurden 750 μ l 5 M NaCl-Lösung zugegeben und die Röhrchen wurden durch vorsichtiges Überkopf-Schütteln gemischt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach der Zentrifugation (4 °C, 20000 x g, 1 h) wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit 70 %igem und 100 %igem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen.

2.2.3.7 Plasmid-Rescue-Assay

Nach der Isolation der DNA durch die Hirt-Methode wurde diese auf ihren Gehalt von extrachromosomalen Plasmiden hin untersucht. Dazu wurden 500 ng Hirt-DNA mit dem *dam*-Methylierungsspezifischen Restriktionsenzym DpnI verdaut, um nicht replizierte DNA zu spalten. Die aus dem *E.coli*-Stamm DH5 α stammende transfizierte DNA wurde durch die *dam*-Methylase modifiziert. In menschlichen Zellen replizierte DNA ist nicht mehr *dam*-methyliert. Nach der Spaltung der DNA wurde diese erneut mit Isopropanol gefällt, entsalzt und in Wasser aufgenommen. Anschließend wurden elektrokompetente *E.coli* DH10B mit der DNA transformiert und auf Agarplatten mit Ampizillin ausplattiert. Nach einer Inkubation für 16 h bei 37 °C konnten die auswachsenden Kolonien gezählt werden.

2.2.3.8 Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP)

Um Histonmodifikationen an *oriP* nachweisen zu können, wurde das Verfahren der Chromatin-Immuno-Präzipitation angewendet. Dazu wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS durch die Zugabe von 2 ml Trypsin pro Zellkulturschale abgelöst und dreimal in PBS gewaschen. Dem folgte ein Fixierungsschritt mit 2 %

Formaldehyd bei Raumtemperatur. Die Fixierung wurde nach 10 Minuten durch die Zugabe von Glyzin (Endkonzentration 125 mM) gestoppt und die Zellen wurden dreimal bei 4 °C mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen im 5 ml LB1-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 10 % Glycerin; 0,5 % NP40; 0,25 % Triton X-100) resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Dieser Schritt wurde mit LB2-Puffer (25 mM HEPES pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA) wiederholt. Zur Sonifizierung der Zellen wurden diese in 2 ml LB3-Puffer (25 mM HEPES pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 0,5 % Sarcosyl; 0,1 % DOC) resuspendiert und bei 20-40 % Output mit einer Ultraschall-Sonde sonifiziert. Nach der Zentrifugation (4 °C; 13200 rpm; 15 Minuten) wurde die DNA-Konzentration des Überstandes auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

Die für die Präzipitation verwendeten Sepharose-Kügelchen wurden nach dreimaligem Waschen in Block-Lösung (5 % BSA; 0,003 % Herings-Sperma; 0,2 % Protease-Inhibitor; 0,1 % Triton X-100; in PBS) in einem Volumen von 200 – 300 μ l mit 5 – 10 μ g Antikörpern bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurde erneut dreimal mit Block-Lösung gewaschen. Die Sepharose-Kügelchen wurden zusätzlich mit 20 μ g IgG-Antikörper und 1 mg Chromatin-Lösung für 2 Stunden bei 4 °C vorgereinigt um unspezifische Hintergrundaktivitäten zu minimieren.

Die spezifische Bindung des präparierten Chromatins an die mit Antikörpern beschichteter Sepharose-Kügelchen erfolgte mit 100-500 μ g Chromatin über Nacht. Im Anschluss daran wurden die Sepharose-Kügelchen auf Säulen transferiert und sequenziell mit RIPA-Puffer (1mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5 % DOC; 1 % NP40; 50 mM Tris pH 8,0), LiCl-Puffer (250 mM LiCl; 0,1 % SDS; 0,5 % DOC; 1 % NP40; 50 mM Tris pH 8,0) und TE gewaschen. Nach der Elution bei 65 °C wurde die Fixierung bei 65 °C über Nacht revertiert. Nach einem RNase- und Proteinase K-Verdau für 4 h bei 56 °C wurden die Chromatin-Proben mit einem Nucleospin-Extrakt-II-Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt und in 20 – 50 μ l TE aufgenommen. Die so gewonnene DNA wurde dann in den anschließenden quantitativen RT-PCRs verwendet.

2.2.3.9 Quantitative PCR („Real Time“-PCR / RT-PCR)

Die „real time“-PCR (RT-PCR) diente der Quantifizierung der in der Chromatin-Immuno-Präzipitation angereicherten DNA. Die hierbei verwendeten Oligonukleotide für *oriP* wurden in unserem Labor schon mehrfach verwendet und publiziert (Gerhardt et al., 2006). Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Light-Cyclers der Firma Roche. Der hier verwendete kommerzielle „Light-Cycler PCR Reaction Mix“ enthält den Farbstoff SYBR-Green, welcher sich während der Reaktion in die amplifizierte doppelsträngige DNA einlagert. Die emittierte Fluoreszenz wird vom Gerät nach jedem Zyklus gemessen (Higuchi et al., 1993). Zum Errechnen der Standardkurve wurden Verdünnungen der zu detektierenden Plasmide eingesetzt. Ein Standard-Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 10 μ l enthielt 1-2 μ l DNA, 1,6 μ l $MgCl_2$ (25 mM ; Roche), 0,5 μ l Oligonukleotid-Mix und 1 μ l Polymerase-Mix (inklusive dNTPs, SYBR-Green und „hot Start“-Polymerase; Roche). Für die Quantifizierung wurden die Angaben des Herstellers verwendet und die Schmelzkurven mit der Light-Cycler-Software (Version 3.01) errechnet. In Referenz zur Standardkurve wurde dann die Kopienzahl der zu quantifizierenden DNA-Probe und dadurch die Anreicherung der im ChIP untersuchten Antigene bestimmt.

2.2.3.10 Nicktranslation für die Gewinnung von DNA-Sonden

Um die für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung benötigten DNA-Sonden zu generieren wurde die Methode der Nicktranslation verwendet. 1 μ g DNA wurde in 100 μ l NT-Mix (0,5 M Tris; 50 mM $MgCl_2$; 0,05 % BSA; 1 μ l Polymerase I; 0,025 μ l DNase I; 10 mM β -Mercapto-Ethanol; 20 μ M Digoxigenin-dUTP; 50 μ M ACG-Nukleotidmix; 10 μ M T-Nukleotide) für 60 Minuten bei 16 °C inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch die Zugabe von 2 μ l 0,5 M EDTA und 0,5 μ l 10 %iges SDS gestoppt. Die Länge der erhaltenen Digoxigenin-markierten Fragmente wurde mittels Gelelektrophorese in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

Die markierte Sonden-DNA wurde durch Ethanol-Fällung präzipitiert und in 15 μ l deionisiertem Formamid resuspendiert. Nach der Zugabe von 15 μ l Hybridisierungsmix (20 % Dextransulfat in 2x SSC) wurden die fertigen DNA-Sonden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

2.2.4.1 Präparation von RIPA-Lysaten

Zur Herstellung von RIPA-Zelllysaten wurden 1×10^6 Zellen von den Zellkulturschalen durch eine Trypsin-Behandlung geerntet. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in einem Eppendorfgefäß mit 200 μ l RIPA-Puffer für 30 Minuten auf Eis lysiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz bei 16000 g für 30 Minuten abzentrifugiert und der Überstand, das RIPA-Lysat, bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.2 Präparation von Kern-Extrakten

Im Zellkern lokalisierte Proteine wurden für Western-Blot-Analysen aus Kernextrakten gewonnen. Die Zellen wurde dazu durch Trypsin abgelöst und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 500 μ l eiskaltem HB⁺⁺-Puffer (10 mM HEPES; 10 mM KCl; 10 % Glyzerin; 0,34 M Sucrose; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM ATP; 1 mM DTT; Proteinase-Inhibitor Complete – Roche) resuspendiert. Durch die zehnmünütige Inkubation in HB⁺⁺-Puffer, der mit 0,05 % Triton X-100 versetzt war, wurden die Zellen zum Platzen gebracht, so dass nur noch die Zellkerne in der Suspension vorlagen. Die Zellkerne wurden durch zweimaliges Waschen in HB⁺⁺-Puffer von den Zelltrümmern gereinigt. Nach dem Abzentrifugieren (4 °C; 1400 rpm; 10 Minuten) wurden die Zellkerne entsprechend dem Protokoll für RIPA-Lysate aufgeschlossen und gelagert.

2.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Proteine in den RIPA- und Kern-Lysaten wurde gemäß des Protokolls nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976).

2.2.4.4 Western-Blot gegen Proteine

Die im Western-Blot untersuchten Proteine wurden gemäß des Standard-Protokolls für die Elektrophorese von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Blot-Verfahren (Towbin et al., 1979) auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Detektiert wurden die Proteine mit

spezifischen primären Antikörper gegen die DNA-Bindedomänen des tet-Repressors (Kaninchen-anti-tetR; Kremmer, Helmholtz-Zentrum München) oder gegen EBNA1 (Ratte-anti-EBNA1 1H4; Kremmer, Helmholtz-Zentrum München). Die Primären Antikörper wurden dann mit Peroxidasegekoppelten sekundären Antikörpern gemäß des ECL Western-Blotting-Protokolls von Amersham Life Science nachgewiesen.

2.2.4.5 Amidoblackfärbung

Zur Ladekontrolle der Gele und Membranen wurde eine Färbung mit Amidoblack-Lösung nach der Protein-Detektion an den Membranen durchgeführt. Dies erfolgte nach Herstellerangaben der Firma Sigma-Aldrich.

2.2.5 Mikroskopie

2.2.5.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläsern

Zellen die in Suspensionskulturen kultiviert wurden, mussten für eine Immunfluoreszenz-Färbung oder Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung zuerst auf geeignete Deckgläser aufgebracht werden. Dazu wurden 18 mm durchmessende Rund-Deckgläser in 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 6-Loch-Platten mit je 300 μ l Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma) überschichtet. Nach einer einstündigen Inkubation wurde das überschüssige Poly-L-Lysin abgesaugt, die Deckgläser mit destilliertem Wasser gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet.

Zum Aufbringen der Zellen wurden pro Deckglas 3×10^5 Zellen in ein 15-ml-Falcon überführt, abzentrifugiert (Raumtemperatur, 1250 rpm, 10 Minuten) und in 200 μ l Medium resuspendiert. Nach der Equilibration der getrockneten Deckgläser mit PBS wurde die Zellsuspension auf die Deckgläser pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 15 Minuten inkubiert.

2.2.5.2 Hypertone Behandlung

Für einige Experimente mussten die Zellen vor der Fixierung einer hypertonen Behandlung unterzogen werden. Dazu wurden die Zellen für 2 Minuten mit Medium

inkubiert welches zu 10 % aus 20x PBS bestand (Albiez et al., 2006). Nach dieser Behandlung wurden die Zellen sofort fixiert.

2.2.5.3 Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FiSH)

Plasmide und EBV-Genome wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierungsverfahrens visualisiert. Dieses Verfahren wurde mit und ohne vorangegangene hypertone Behandlung (hyperFiSH) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 4 %igen PFA-Lösung (4 % PFA in PBS) fixiert und dreimal mit 0,05 %iger Triton-Lösung (0,05 % Triton X-100 in PBS) gewaschen. Nach einer 20-minütigen Permeabilisierung mit 0,5 %iger Triton-Lösung (0,5 % Triton X-100 in PBS) wurde erneut dreimal mit 0,05 %iger Triton-Lösung gewaschen. Die für die Hybridisierung notwendige Denaturierung der DNA erfolgte durch die Inkubation der Zellen in 0,1 M HCl für 6 Minuten. Die Zellen wurden nach einer Equilibration in 2x SSC in einem 50/50-Gemisch aus Formamid und 4x SSC über Nacht bei 4 °C gelagert.

Zur Hybridisierung selbst wurden die Deckgläser mit je 5 μ l der entsprechenden DNA-Sonde versetzt und mit Fixogum-Kollage-Klebstoff (Marabou) auf Objektträgern fixiert. Sobald der Klebstoff getrocknet war, wurden die Objektträger für 2 Minuten bei 75 °C inkubiert um die DNA aufzuschmelzen. Die Hybridisierungsreaktion der DNA-Sonde mit ihrer Ziel-DNA erfolgte durch die Inkubation der Objektträger bei 37 °C für 72 Stunden.

Die Detektion der DNA-Sonden erfolgte nach je dreimaligem Waschen mit 2x SSC (bei 37 °C) und 0,1x SSC (bei 60 °C). Nach der Equilibration mit 4x SSC und einem dreißig-minütigen Inkubieren mit Blockier-Lösung (4 % BSA in 4x SSC mit 0,2 % Tween 20) wurden die DNA-Sonden durch fluoreszenz-gekoppelte Digoxigenin-spezifische Antikörper (Maus-anti-Digoxigenin-Cy3) detektiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4x SSC / 0,2 % Tween 20 wurde die DNA mit DAPI gegengefärbt und die Deckgläser wurden mit Vectashield-Mounting-Medium (Vector Laboratories) auf frische Objektträger aufgebracht. Die so entstandenen Präparate wurden mit Nagellack versiegelt und bis zur Betrachtung unter dem Mikroskop bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Für Metaphase-Spreitungen wurden die Zellen in Methanol-Eisessig-Gemisch fixiert und in einem 60 °C warmen Wasserbad auf Objektträger getropft. Die fertigen Objektträger wurden gemäß der oben beschriebenen Technik hybridisiert und detektiert.

2.2.5.4 Immunfluoreszenz-Färbung

Um Proteine nachzuweisen wurden diese mit dem konventionellen Verfahren der Immunfluoreszenz-Färbung visualisiert. Dieses Verfahren wurde mit und ohne vorangegangene hypertone Behandlung durchgeführt. Die Zellen wurden dazu nach dem Fixierungs-Schritt (10 Minuten mit 2 % PFA-Lösung) dreimal mit einer 0,15 %igen Triton-Lösung (0,15 % Triton X-100 in PBS) permeabilisiert und für dreimal 10 Minuten mit Blockier-Lösung (1 % BSA; 0,15 % Glyzin; in PBS) blockiert. Die Proteine wurden mit primären Antikörpern bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden durch das sequentielle Waschen für je 5 Minuten mit PBS, 0,15 %iger Triton-Lösung, PBS und Blockierlösung entfernt. Die primären Antikörper wurden mit für sie spezifischen sekundären Antikörpern detektiert und die angefärbten Zellen wurden im Anschluss daran dreimal mit PBS gewaschen. Nach der DNA-Gegenfärbung mit DAPI wurden die Zellen analog zum FiSH-Verfahren auf Objektträger aufgebracht, versiegelt und gelagert.

2.2.5.5 ImmunoFiSH-Verfahren

Die gleichzeitige Detektion von Proteinen und DNA ist kompliziert, da die meisten Antigene durch die für die DNA-Detektion notwendigen Denaturierungen nicht mehr von ihren Antikörpern erkannt werden können. Um dieses Problem zu umgehen haben wir in unserem Labor ein Kombinationsverfahren aus einer Immunfluoreszenz-Färbung und einer im Anschluss daran stattfindenden Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung etabliert.

Die Zellen wurden dazu nach dem Fixierungs-Schritt (10 Minuten mit 2 % PFA-Lösung) dreimal mit einer 0,15 %igen Triton-Lösung (0,15 % Triton X-100 in PBS) permeabilisiert und für dreimal 10 Minuten mit Blockier-Lösung (1 % BSA; 0,15 % Glyzin; in PBS) blockiert. Die Proteine wurden mit primären Antikörpern bei 4 °C über

Nacht inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden durch das sequentielle Waschen für je 5 Minuten mit PBS, 0,15 %iger Triton-Lösung, PBS und Blockierlösung entfernt. Die primären Antikörper wurden mit für sie spezifischen sekundären Antikörpern detektiert und die angefärbten Zellen wurden im Anschluss daran dreimal mit PBS gewaschen. Dem folgte ein zweiter Fixierungs-Schritt für 10 Minuten mit einer 2 %igen PFA-Lösung. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Glyzin-Lösung (20 mM Glyzin in PBS) wurden die Zellen dreimal mit 2x SSC gewaschen. Der Denaturierung mit 0,1 M HCl für 6 Minuten folgte ein dreimaliges Waschen mit 2x SSC. Die Zellen wurden in einem 50/50-Gemisch aus Formamid und 4x SSC über Nacht bei 4 °C gelagert.

Zur Hybridisierung selbst wurden die Deckgläser mit je 5 μ l der entsprechenden DNA-Sonde versetzt und mit Fixogum-Kollage-Klebstoff auf Objektträgern fixiert. Sobald der Klebstoff getrocknet war, wurden die Objektträger für 2 Minuten bei 75°C inkubiert um die DNA aufzuschmelzen. Die Hybridisierungsreaktion der DNA-Sonde mit ihrer Ziel-DNA erfolgte durch die Inkubation der Objektträger bei 37 °C für 72 Stunden.

Die Detektion der DNA-Sonden erfolgte nach je dreimaligem Waschen mit 2x SSC (bei 37 °C) und 0,1x SSC (bei 60 °C). Nach der Equilibration mit 4x SSC und einem dreißigminütigen Inkubieren mit Blockier-Lösung (4 % BSA in 4x SSC mit 0,2 % Tween 20) wurden die DNA-Sonden durch fluoreszenz-gekoppelte Digoxigenin-spezifische Antikörper (Maus-anti-Digoxigenin-Cy3) detektiert. Nach dreimaligem Waschen mit 4x SSC / 0,2 % Tween 20 wurde die DNA mit DAPI gegengefärbt und die Deckgläser wurden mit Vectashield-Mounting-Medium (Vector Laboratories) auf frische Objektträger aufgebracht. Die so entstandenen Präparate wurden mit Nagellack versiegelt und bis zur Betrachtung unter dem Mikroskop bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2.5.6 Herstellung von Lebendzell-Beobachtungskammern

Mit Fixogum-Kollage-Klebstoff wurde ein an einer Seite offener Ring mit dem Durchmesser eines Deckglases aufgetragen. Dazu wurden abgeschnittene 200 μ l-Spitzen auf die Tube des Klebstoffes aufgesteckt. Nach dem Trocknen des Klebstoffes konnten die Kammern benutzt werden. Zum Montieren der Deckgläser

der wurden 5 μ l Zellkulturmedium in den gehärteten Klebstoffring pipettiert und das Deckglas mit der Zellseite nach unten auf den Ring aufgesetzt. Das Deckglas wurde mit Nagellack fixiert und die Zellen konnten so bis zu 30 Minuten lang beobachtet werden.

2.2.5.7 Immunkolokalisation in HepG2-Zellen

Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden in 2 % Formamid in PBS bei Raumtemperatur fixiert und anschließend kurz in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese 5 Minuten auf Eis mit vorgekühlter 0,5 %iger Triton-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten mit Blockier-Lösung (1 % BSA; 0,15 % Glyzin; in PBS) wurden die Proteine mit primären Antikörpern bei 4 °C über Nacht markiert. Die überschüssigen Antikörper wurden durch das sequentielle Waschen für je 5 Minuten mit PBS, 0,15 %iger Triton-Lösung, PBS und Blockierlösung entfernt. Die primären Antikörper wurden mit für sie spezifischen sekundären Antikörpern detektiert und die angefärbten Zellen wurden im Anschluss daran dreimal mit PBS gewaschen. Nach der DNA-Gegenfärbung mit DAPI wurden die Zellen analog zum FiSH-Verfahren auf Objektträger aufgebracht, versiegelt und gelagert.

2.2.5.8 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

HepG2-Zellen wurden 16 Stunden vor der Transfektion in der Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 35-mm-Zellkulturschale auf 4 Deckgläsern ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmide (1 μ g pro Plasmid) wurden in 100 μ l Optimem in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt. Ohne an den Rand des Gefäßes zu stoßen wurden 5 μ l HD-Fugene Transfektionsreagenz zugegeben und mit der DNA/Optimem-Lösung gemischt. Nach einer 15minütigen Inkubation wurde der Transfektionsansatz mit 400 μ l HepG2-Medium zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 22 – 26 Stunden wurden die Deckgläser für die Lebendzellbeobachtungen oder Immunkolokalisationen herangezogen.

2.2.5.9 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen in dieser Arbeit wurden an einem Leica TCS SP2 Konfokal-System und einem Ölimmersionsobjektiv (HCX PI APO ldb. Blue 63x 1.4) bei einer Scangeschwindigkeit von 800 mW aufgenommen. Es wurden die Laserlinien 405 nm (Dioden-Laser), 488 nm (Argon-Laser), 514 nm (Argon-Laser), 543 nm (Gre-Neon-Laser), 561 nm (Helium-Neon-Laser) und 633 nm (Helium-Neon-Laser) verwendet.

2.2.5.10 Elektronische Bildbearbeitung

Nachdem die Aufnahmen der Zellen mit dem Mikroskop gemacht wurden, wurden die Bilder mit dem Bildbearbeitungsprogramm Huygens Essential Suite der Firma Scientific Volume Imaging dekonvolviert. Im Anschluss daran wurden die aufgenommenen Zellen mit Hilfe des Programmes 3D-rekonstruiert und Kolokalisationsmessungen durchgeführt. Zum Teil wurden Einzelbilder aus den erhaltenen 3D-Objekten extrahiert und mit dem Bearbeitungsprogramm ImageJ für Vorträge und Posterpräsentationen weiterbearbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Lokalisationsbestimmung von EBV in Interphase-Nuklei

EBV stellt ein hervorragendes Modellsystem für die Entwicklung gentherapeutischer Vektoren dar. Die erfolgreiche Etablierung des Virus als extrachromosomales Replikon im Zellkern der Wirtszelle ist wahrscheinlich von epigenetischen Faktoren abhängig (Leight and Sugden, 2001). Bisher wurde EBV nur in mitotischen Zellen als an die Chromosomen angehängtes Genom beschrieben (Kanda et al., 2001) und es wurden keine Studien hinsichtlich der räumlichen und funktionalen Lokalisation des Virus in Interphase-Zellkernen angestrebt.

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wird die Lokalisation von EBV in Interphasezellen in Bezug auf bestimmte Aktivitätszentren im Zellkern und den Zustand des Chromatins untersucht. Ziel ist es herauszufinden, ob EBV bestimmte Regionen im Nukleus als Aufenthaltsort bevorzugt und inwiefern sich die Integrität des latenten Replikationsursprungs auf diese bevorzugte Lokalisation auswirkt.

Die Untersuchung erfolgt durch mikroskopische Kombinationsverfahren aus Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FiSH). Die erhaltenen Daten erlauben eine Korrelation mit biochemischen Methoden, die im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet werden.

Es wird gezeigt, dass sich EBV in der perichromatischen Region des aktiven Euchromatins des Interphase-Nukleus befindet und dort kolokalisierend mit dem viralen *trans*-Faktor EBNA1 vorliegt. Dies gilt sowohl für das 170 kbp große EBV-Genom als auch für miniEBV-Genome, welche nur die latenten Gene von EBV tragen und eine Größe von 82 kbp besitzen. In beiden wird eine bevorzugte Lokalisation in H3K9ac- und K3K4me3-Regionen beobachtet.

3.1.1 Etablierung EBV-spezifischer Sonden für das FiSH-Verfahren

Für die Durchführung der Lokalisationsbestimmung in Interphase-Nuklei wurde auf das bildgebende Verfahren der Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung (FiSH) zurückgegriffen. Hierbei werden DNA-Regionen durch das Hybridisieren mit markierten, für diese Region spezifischen DNA-Sonden für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Dieses Fluoreszenzsignal kann dann mit anderen, ebenfalls fluoreszenzmarkierten, Signalen, wie z. B. dem Gesamt-Chromatin, korreliert werden. Die Detektion der Fluoreszenzsignale als dreidimensionaler Bildstapel in einem Konfokal-Mikroskop erlaubt es den Zellkern als Ganzes zu rekonstruieren und so das Signal der DNA-Sonden in dessen Kontext einzuordnen.

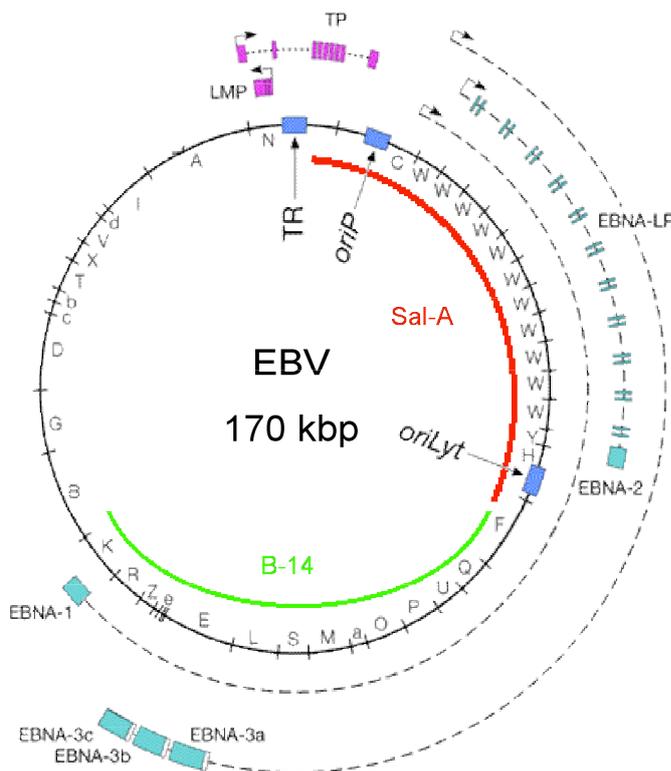


Abb. 3.1: Vergleich der DNA-Sonden mit dem EBV-Genom

Das EBV-Gesamtgenom umspannt 170 kbp. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden für das FiSH-Verfahren umspannen jeweils 55 kbp. cMABA-SalA (rot) beinhaltet den latenten Replikationsursprung *oriP* und den lytischen Replikationsursprung *oriLyt*. cMABA-B14 (grün) umspannt die auf cMABA-SalA folgenden 55 kbp.

Um die EBV-DNA mittels FiSH nachweisen zu können, muss die spezifische Sonde mit Hapten-gekoppelten dUTP markiert und auf die Ziel-DNA hybridisiert werden (Abbildung S1). Als Sonden-DNA wurden das Cosmid-Fragment cMABA-SaIA und das Cosmid-Fragment cMABA-B14 verwendet (Polack et al., 1984). cMABA-SaIA umfasst die ersten 55 kbp von EBV, cMABA-B14 umfasst die nächsten 55 kbp nach dem cMABA-SaIA-Fragment (Abbildung 3.1).

Die mittels Nick-Translation hergestellten DNA-Sonden wurden entweder mit Biotin-16-dUTP oder mit Digoxigenin-11-dUTP markiert und bei 75 °C auf die zu markierende DNA in den fixierten und permeabilisierten Zellen hybridisiert.

Um die Spezifität der DNA-Sonden zu überprüfen, wurden sie zunächst auf Metaphase-Spreitungen der Zelllinie Namalwa hybridisiert, welche eine integrierte Kopie von EBV besitzen (Abbildung S2). Die hier zu beobachtenden Fluoreszenzsignale zeigten eine spezifische Färbung für das integrierte EBV.

Im weiteren Verlauf der Etablierung wurden die DNA-Sonden in Zellen getestet, die ihre 3D-Struktur bei der Fixierung behalten haben. Da in dieser Arbeit eine räumliche Einordnung des EBV-Signals in den Nukleus erfolgen sollte, mussten die Zellen so fixiert werden, dass ihre 3D-Struktur unbeeinträchtigt bleibt. Die technisch einfachere Fixierungsmethode die für das Herstellen von Metaphase-Spreitungen angewendet wurde, ist hier nicht einsetzbar.

Zum Testen der beiden Sonden in 3D-fixierten Zellen wurden die DNA-Sonden mit HEK293-2089 Zellen, welche extrachromosomales EBV tragen, hybridisiert (Abbildung 3.2). Beide Sonden lieferten ein gut detektierbares Signal. Die deutlichen Kollokalisationsfoci zeigen die Hybridisierung beider Sonden mit dem Virus. Eine Hybridisierung der Sonden mit EBV-negativen HEK293Zellen zeigte kein Fluoreszenzsignal (Abbildung S3).

Durch die Etablierungsexperimente konnte sichergestellt werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Sonden für EBV spezifisch waren. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nur die DNA-Sonde cMABA-SaIA verwendet, da sie unter anderem den latenten Replikationsursprung *oriP* umspannt und so sowohl für die Detektion der EBV-Gesamtgenome, als auch der mini-EBV-Genome verwendbar ist.

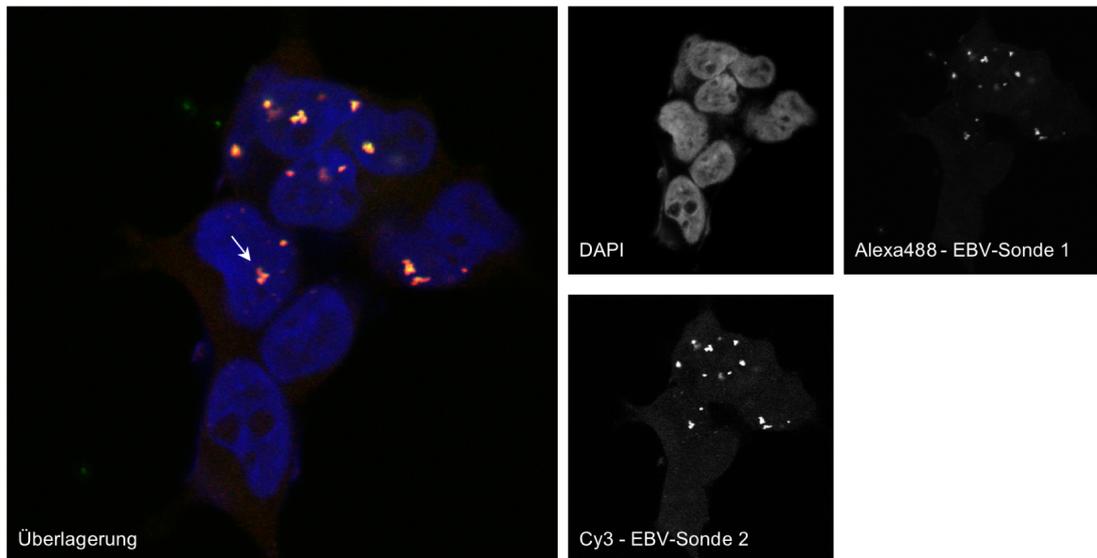


Abb. 3.2: Spezifische Erkennung von EBV durch die DNA-Sonden

Einzelbild aus dem aufgenommenen Bilderstapel. 3D-fixierte HEK293-2089-Zellen wurden mit der DNA-Sonde cMABA-SalA (rot, Sonde 2) und der DNA-Sonde cMABA-B14 (grün, Sonde 1) hybridisiert. Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt (blau). Beide DNA-Sonden zeigen deutliche Signale und kolokalisieren in gelben Mischsignalen (siehe Pfeil).

3.1.2 EBV lokalisiert in der perichromatischen Region des Nukleus

Nach dem Etablieren der DNA-Sonden konnte die räumliche Einordnung der EBV-Genome in den Interphase-Nukleus begonnen werden. Es ist bekannt, dass EBV die zelluläre Replikations-Maschinerie verwendet um als extrachromosomales Replikon erhalten zu werden. Darüber hinaus erfolgt auch die Transkription mit Hilfe zellulärer Proteine. Dazu muss das Virus sich in oder an Domänen befinden, die es ihm ermöglichen, leicht mit an diesen Prozessen beteiligten Proteinen zu interagieren. Diese Interaktion ist im Interphase-Nukleus nicht überall im gleichen Maße gegeben. So sind Chromatin-dichte Regionen für Proteine weniger zugänglich als Regionen die weniger dicht gepacktes Chromatin besitzen.

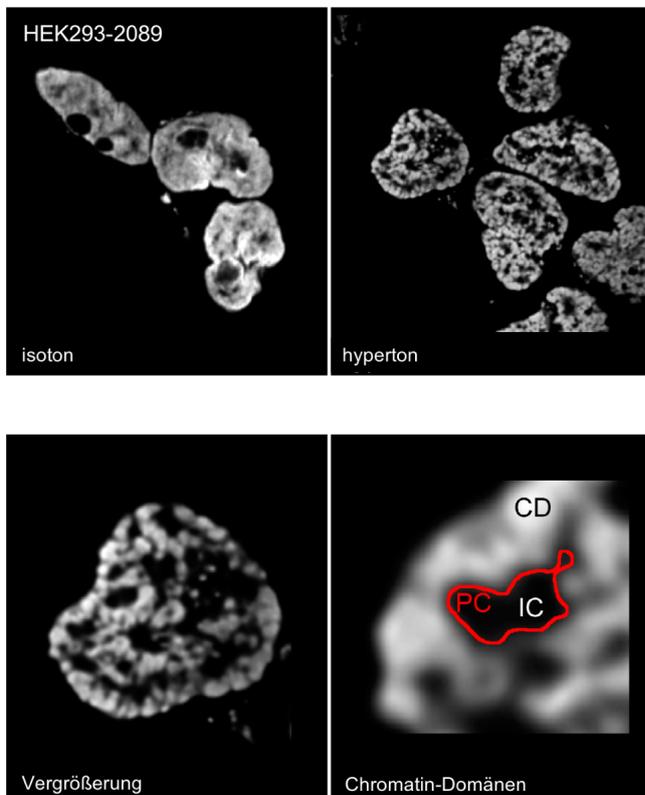


Abb. 3.3: Visualisierung der perichromatischen Region

Links oben: Zellkerne im isotonen Zustand. Die Nukleoli sind als dunkle rundliche Regionen erkennbar. Chromatin-dichtere Bereiche (helle bis weiße Areale) und weniger chromatin-dichte Bereiche (mittelgraue bis dunkelgraue Areale) sind sichtbar; Rechts oben: Zellkerne im hypertonen Zustand. Die durch die hypertone Behandlung hervorgerufene Kondensation des Chromatins zeigt die vergrößerte Interchromatin-Domäne (dunkle Areale), siehe auch Vergrößerungen unten. Die helle Chromatin-Domäne (CD) hebt sich von der dunklen Interchromatin-Domäne (IC) ab. Die Grenze zwischen beiden Domänen bildet die perichromatische Region (PC), dargestellt in rot.

Erste Untersuchungen zur Lokalisation von EBV im Interphase-Nukleus erfolgten durch die Behandlung der EBV-tragenden Zellen mit einem hypertonen Puffer vor der Fixierung. Die hypertone Behandlung ruft eine starke, aber reversible Kondensation des Chromatins hervor und erlaubt es so zwischen den drei Kern-Regionen, Chromatin-Domäne, Interchromatin-Domäne und perichromatischer Region zu unterscheiden (Albiez et al., 2006) (Abbildung 3.3). Durch die induzierte Kondensation des Chromatins wird die als „Verkehrstunnel“ verwendete Interchromatin-Domäne leicht vergrößert und ist deutlich erkennbar. Das Grenzgebiet zwischen der Chromatin-Domäne und der Interchromatin-Domäne ist die perichromatische Region, in der das Chromatin in einem lockereren Zustand vorliegt und in der nukleäre Prozesse wie die Transkription und Replikation stattfinden (Cremer et al., 2006).

Grundsätzlich gibt es drei Möglichkeiten für eine potentielle Lokalisation von extrachromosomalen EBV-Genomen (Abbildung 3.4).

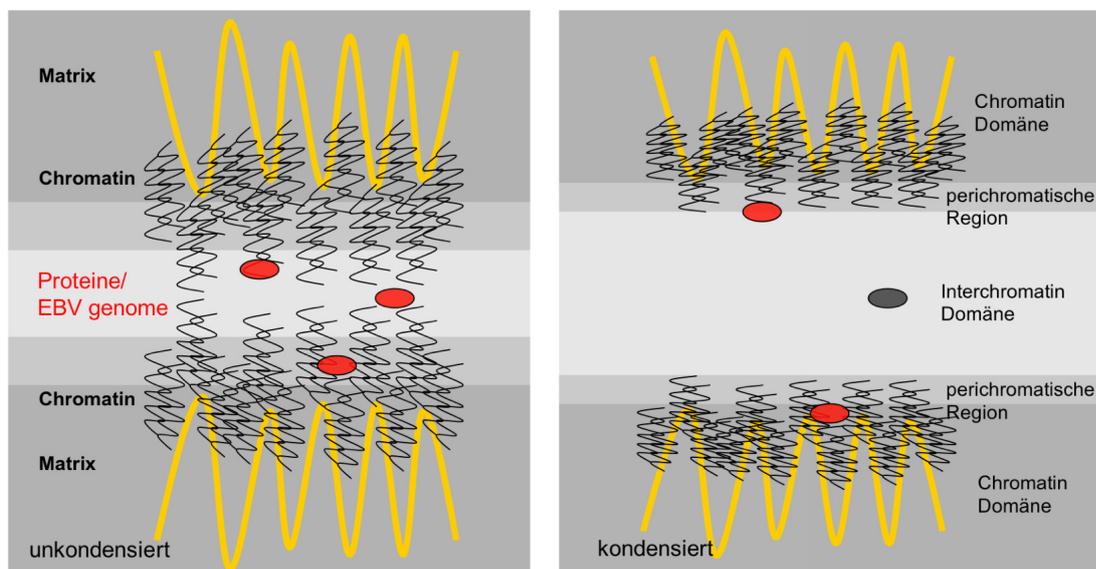


Abb. 3.4: Unterscheidung der Kern-Domänen mittels hypertoner Behandlung

Schematische Darstellung der möglichen Lokalisation von EBV-Genomen im Interphase-Nukleus. Linke Seite: isotoner Zustand; Rechte Seite: hypertoner Zustand. Nach der hypertonen Behandlung liegen perichromatisch lokalisierte EBV-Genome benachbart zum kondensierten Chromatin vor und können dort durch FiSH visualisiert werden. EBV-Genome die tief in der Chromatin-Domäne sitzen kolokalisieren nach hypertoner Behandlung mit dem Chromatin, nicht an das Chromatin gebundene EBV-Genome liegen frei in der Interchromatin-Domäne vor.

Die erste Möglichkeit ist eine perichromatische Lokalisation. Das EBV-Genom lagert sich an das stark dekondensierte Chromatin dieser Region an und ragt in die Interchromatin-Domäne hinaus. Diese Region ist für Proteine leicht zugänglich und ist der Ort der Replikation und Transkription. Nach hypertoner Behandlung liegen hier lokalisierte EBV-Genome benachbart zu der stark kondensierten Chromatin-Domäne, kolokalisierten aber nicht mit dieser.

Die zweite Möglichkeit ist eine chromatische Lokalisation, bei der sich die EBV-Genome an die Wirtszell-DNA anlagern und in die stärker kondensierten Bereiche des Chromatins verlagert werden. Diese Bereiche sind für Proteine und vor allem für Proteinkomplexe schwerer zugänglich und müssen erst dekondensiert werden um z. B. repliziert werden zu können. Nach hypertoner Behandlung liegen hier lokalisierte EBV-Genome kolokalisierend mit dem Chromatin vor.

Die dritte Möglichkeit beschreibt die Lokalisation von EBV-Genomen als freie nicht-chromatinassoziierte Teilchen in der Interchromatischen Domäne. Diese fungiert als „Verkehrstunnel“ für nukleäre Proteine zwischen den Chromatin-Domänen und bietet eine hohe, aber möglicherweise stochastische, Interaktionsmöglichkeit mit Replikations- und Transkriptionsfaktoren. Eine Lokalisation in dieser Domäne bedeutet, dass die extrachromosomalen Genome während der Interphase nicht fest an die Wirtszell-DNA gebunden vorliegen und sich vor jeder Mitose an diese anlagern müssen. Eine nicht erfolgende prä-mitotische Anlagerung der Genome an die Wirtszell-DNA hätte zu Folge, dass die Segregation auf die Tochterzellen nicht gewährleistet ist.

Eine Untersuchung der EBV-Genome hinsichtlich der vorgestellten Möglichkeiten erfolgte durch die Hybridisierung der DNA-Sonde cMABA-SalA auf im hypertonen Zustand fixierten Zellen. Nach dem Aufnehmen der gefärbten Zellen mittels Konfokal-Mikroskopie wurden die erhaltenen Bildstapel dekonvolviert und in dreidimensionale Objekte umgewandelt. Die Auswertung zur Lokalisation der EBV-Genome im Verhältnis zum Chromatin der Wirtszelle wurde sowohl für die einzelnen Bilder als auch für die rekonstruierten Objekte durchgeführt (Abbildung 3.5).

Es wurden drei verschiedene Zelllinien zu diesen Experimenten herangezogen. Die erste Zelllinie HEK293-2089 trägt das gesamte EBV-Genom durch Transfektion stabil in sich. Die als zweite Zelllinie verwendeten Raji-Zellen sind eine Burkitt-

Lymphom-Zelllinie und tragen als etablierter Tumor das gesamte EBV-Genom in sich. Die dritte Zelllinie, LCL2089-Zellen, wurde durch die Infektion primärer B-Zellen mit EBV generiert. Durch die drei unterschiedlichen Zelllinien ist es uns möglich zu untersuchen ob die Lokalisation von EBV durch die Art der EBV-Applikation variiert.

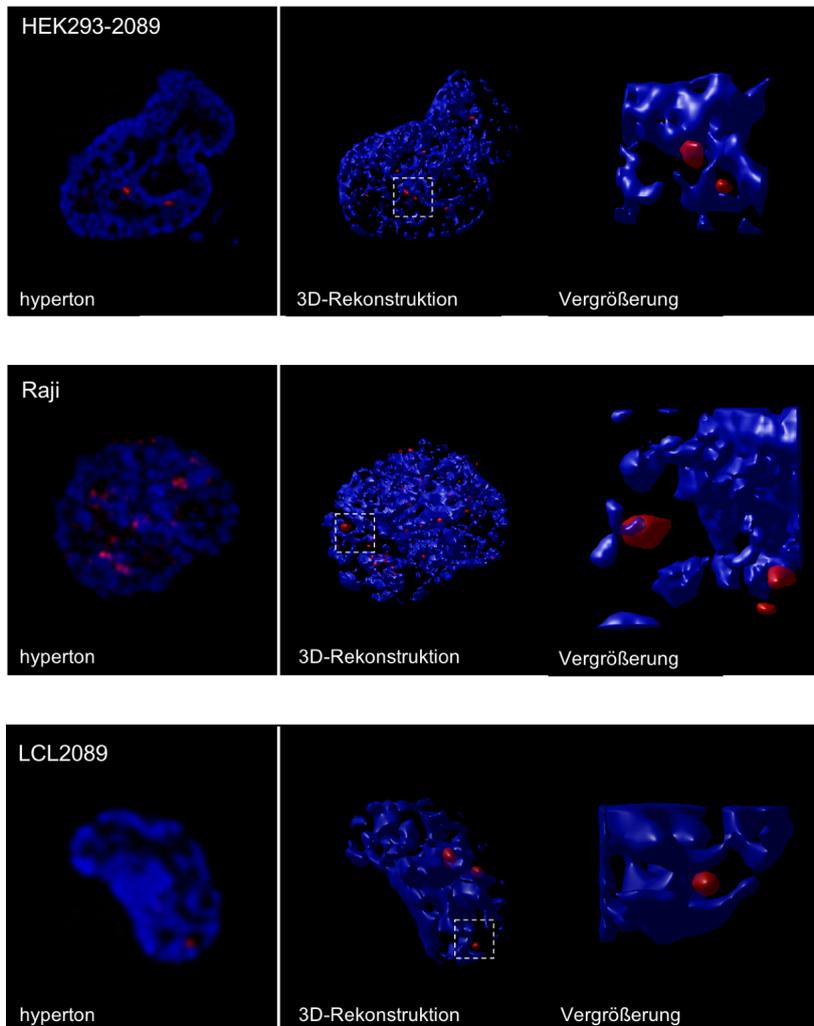


Abb. 3.5: Visualisierung der EBV-Genome in HEK293-2089, Raji und LCL2089 in hypertonen behandelten Zellen

Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln und rekonstruierte 3D-Objekte der entsprechenden Zelllinien. DNA-Färbung mit DAPI (blau); Das EBV-Genom wurde mit Hilfe von Cy3-markierten Sonden dargestellt (rot). Nach Dekonvolution wurden die Zellen mittels der Huygens Essential Suite Software als 3D-Objekt rekonstruiert (Mitte); Die einzelnen EBV-Signale wurden in Bezug auf die kondensierten Chromatinbereiche untersucht (siehe Vergrößerung). In allen untersuchten Zelllinien zeigt sich eine perichromatische Lokalisation der EBV-Genome. Es liegen keine mit dem Chromatin kolokalisierenden oder im Interchromatin frei situierten EBV-Signale vor.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine deutliche perichromatische Lokalisation der EBV-Genome. In keiner Zelllinie wurden EBV-Signale beobachtet die mit der Chromatin-Domäne kolokalisieren oder frei in der Interchromatin-Domäne vorliegen. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die EBV-Genome während der Interphase in der durch dekondensiertes Chromatin gekennzeichneten perichromatischen Region des Zellkerns vorliegen. Hier ist es dem Virus möglich, leicht mit den zellulären Proteinen für Replikation und Transkription zu interagieren. Die EBV-Genome bleiben während des Zellzykluses an das Wirtszell-Chromatin assoziiert und müssen vor der Mitose nicht an dieses reassoziieren.

3.1.3 EBV kolokalisiert mit seinem viralen trans-Faktor EBNA1 in der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus

Da EBV in der perichromatischen Region des Wirtszell-Nukleus lokalisiert werden konnte, sollte nun, in Vorbereitung auf die Kolokalisations-Studie mit zellulären Proteinen, überprüft werden, ob EBV mit dem viralen *trans*-Faktor EBNA1 zusammen nachweisbar ist.

Dazu wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen EBNA1 gefolgt von einer Hybridisierung gegen das EBV-Genom durchgeführt (Abbildung 3.6). Da sich die bisher verwendeten Zelllinien nicht in der Lokalisation von EBV unterschieden haben, wurden die folgenden Experimente nicht an allen drei Zelllinien durchgeführt. Als primäres Modellsystem wurden meist Raji-Zellen verwendet und je nach experimentellem Bedarf wurde eine weitere Zelllinie hinzugezogen. Die Kolokalisation von EBNA1 und EBV-Genomen wurde in Raji und HEK293-2089 untersucht.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine deutliche Kolokalisation zwischen dem viralen *trans*-Faktor und den EBV-Genomen. In den hyperton behandelten Zellen wird die perichromatische Lokalisation besonders hervorgehoben. Auch in den isoton behandelten Zellen zeigt sich die Lokalisation in weniger chromatin-dichten, perichromatischen Bereichen des Nukleus. Die beiden Signale verhalten sich sowohl in den isoton behandelten Zellen als auch in den hyperton behandelten Zellen gleich. Dies lässt darauf schließen, dass die funktionale Lokalisation von EBV und mit ihm

interagierenden Proteinen nicht durch die hypertone Behandlung beeinträchtigt wurde und keine Artefakte erzeugt wurden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass sich mehr EBNA1-Foci in den Zellen befinden als EBV-Genome. Es ist bekannt, dass pro Zelle mehr EBNA1-Proteine als EBV-Genome vorhanden sind (Sternas et al., 1990). So zeigen Raji-Zellen eine Kopienzahl von 40.000 EBNA1-Proteinen und nur 40 EBV-Genome. Dies zeigte sich auch in den fluoreszenz-gefärbten Zellen. Es lagen EBNA1-Foci vor, die nicht mit EBV kolokalisierten, wogegen EBV-Foci immer EBNA1 enthielten. Es wird vermutet, dass EBNA1 zusätzliche Binde-Plattformen für EBV über den Wirtszell-Nukleus verteilt bildet.

Die Visualisierung von EBV-Genomen in Kombination mit einem, durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper nachgewiesenen, Protein war erfolgreich. Daher konnte nun mit der Kolokalisations-Studie zwischen EBV und nukleären Aktivitätszentren, nukleären Proteinen und anderen definierten Kernregionen begonnen werden.

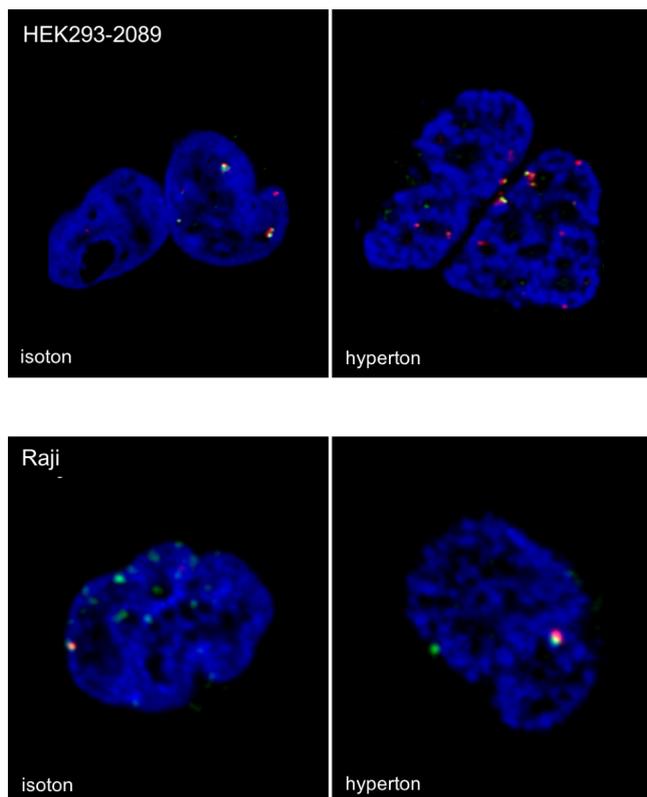


Abb. 3.6: Perichromatische Kolokalisation von EBV und EBNA1

Einzelbilder aus den für jede Zelllinie aufgenommenen Bilderstapeln; DNA-Färbung mit DAPI (blau); Immunfluoreszenz für EBNA1 (grün); EBV-Sonde (rot); Sowohl in HEK293-2089-Zellen als auch in Raji-Zellen zeigte sich im isotonen (links) und hypertonen (rechts) Zustand eine deutliche Kolokalisation zwischen EBV und EBNA1.

3.1.4 EBV kolokalisiert bevorzugt mit Histonmodifikationen des aktiven Euchromatins

Die perichromatische Lokalisation der EBV-Genome führte zu der Hypothese, dass die viralen Genome in bestimmten Aktivitätszentren, wie z. B. Transkriptionsfabriken oder Replikationsfabriken vorliegen. Diese Aktivitätszentren liegen ebenfalls in der perichromatischen Region. Es wäre auch möglich, dass EBV nicht mit bestimmten Aktivitätszentren, sondern mit bestimmten Regionen des Zellkerns, wie dem Euchromatin oder dem Heterochromatin kolokalisiert. Um dies genauer zu untersuchen, wurden für diese Aktivitätszentren und Regionen spezifische Marker in Kombination mit EBV nachgewiesen.

Unter Verwendung des etablierten Kombinationsverfahrens aus Immunfluoreszenz und Fluoreszenzhybridisierung wurde ermittelt, ob EBV mit Proteinen/Faktoren der nukleären Peripherie (LaminB1), Spleiß-Zentren (SC35), heterochromatischen Regionen (HP1 α), Replikationszentren (BrdU-Einbau) oder Orten der Transkription (Pol II) kolokalisiert. Die Zellen wurden im isotonen Zustand fixiert, gefärbt und mittels Konfokal-Mikroskopie aufgenommen (Abbildung 3.7).

Für manche der hier untersuchten Marker konnten sporadisch Kolokalisations-Ereignisse beobachtet werden (Abbildung 3.7; SC35, HP1 α). Die hier beobachteten Kolokalisationen waren allerdings nicht als bevorzugte Kolokalisation zu bewerten. Eine Assoziation von EBV mit der nukleären Peripherie ist auszuschließen und die wenigen Kolokalisations-Ereignisse mit Aktivitätszentren für Replikation, Transkription und für HP1 α sind auf zufällige Ereignisse zurückzuführen.

Da keine bevorzugte Korrelation zwischen EBV und nukleären Aktivitätszentren hergestellt werden konnte wurde in weiterführenden Experimenten nach einer Korrelation mit epigenetischen Markern gesucht. Die Organisation des Zellkerns ist starken Regulationen unterworfen und seine räumliche Struktur, oder Architektur, spiegelt dies wider. Die Dichte und damit Zugänglichkeit des Chromatins wird durch Modifikationen der Nukleosom-bildenden Histone gesteuert. Die im Rahmen dieser Experimente verwendeten Histonmodifikationen beziehen sich auf die Methylierung oder Acetylierung des Histonproteins 3. Eine Trimethylierung von Lysins 9 des Histons 3 (H3K9me3) bewirkt eine Kompaktierung des Chromatins und die Bildung des fakultativen Heterochromatins (Peng and Karpen, 2007). Durch Trimethylierung

des Lysins 27 am gleichen Histon (H3K27me3) wird ebenfalls eine Kompaktierung des Chromatins unter Bildung des konstitutiven Heterochromatins hervorgerufen. Eine Trimethylierung von Lysin 4 an Histon 3 (H3K4me3) führt zu einer Dekompaktierung des Chromatins und zu einer besseren Zugänglichkeit dessen. Diese Histonmodifikation ist, ebenso wie die Acetylierung von Lysin 9 an Histon 3 (H3K9ac), ein Kennzeichen aktiver Gene und des Euchromatins (Rice and Allis, 2001). Diese Histonmodifikationen nehmen im Zellkern auch spezifische räumliche Strukturen an (Zinner et al., 2006), was Einfluss auf die Lokalisation der Virus-Genome haben könnte.

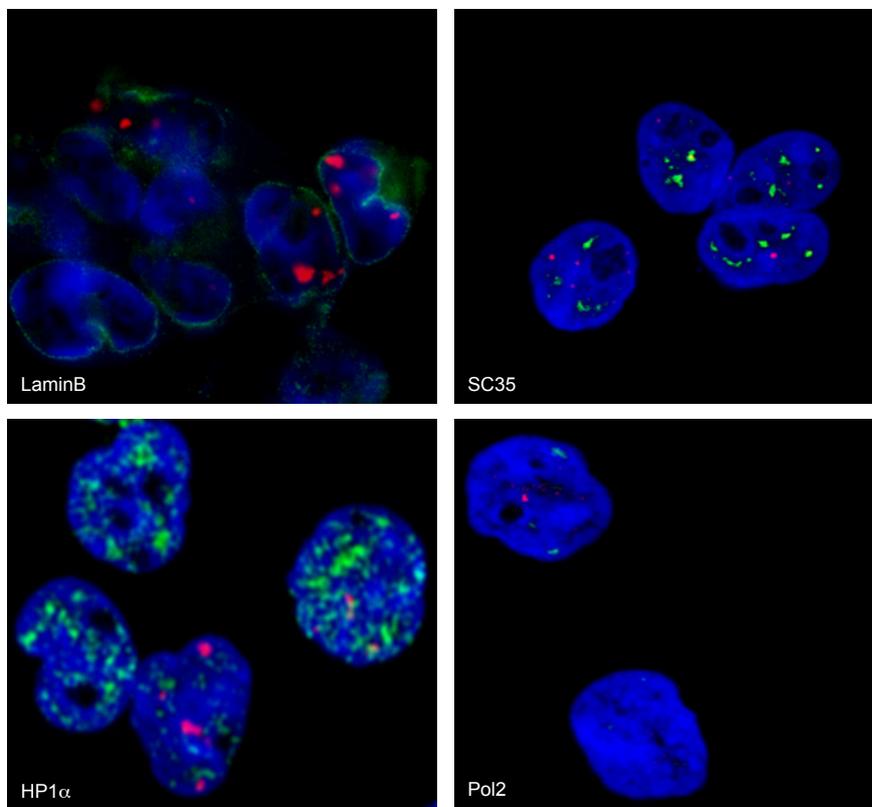


Abb. 3.7: Kolokalisations-Studie zwischen EBV und zellulären Marker-Proteinen Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln. DNA-Färbung mit DAPI (blau), entsprechendes zelluläres Marker-Protein (grün), EBV-Sonde (rot). HEK293-2089-Zellen wurden im isotonen Zustand gefärbt und hybridisiert. Es zeigt sich keine Kolokalisation zwischen EBV und LaminB1 und Pol-II-Foci. Eine sporadische, aber nicht bevorzugte Kolokalisation zwischen EBV und SC35, sowie EBV und HP1 α , ist zu beobachten.

Eine Untersuchung hinsichtlich der Assoziation von EBV mit Histonmodifikationen ist zudem von Interesse, da EBV selbst von Histonen besetzt ist und wie das Chromatin der Wirtszelle aktivierenden und stilllegenden Modifikationen unterworfen ist. Eine Korrelation des Virus mit Histonmodifikationen in der Wirtszelle könnte somit auch Aufschluss auf den bevorzugten Modifikationszustand der Histone des Virus-Genoms geben. Die Untersuchung der verschiedenen Histonmodifikationen wurde in Raji-Zellen (Abbildung 3.8) und LCL2089-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.9).

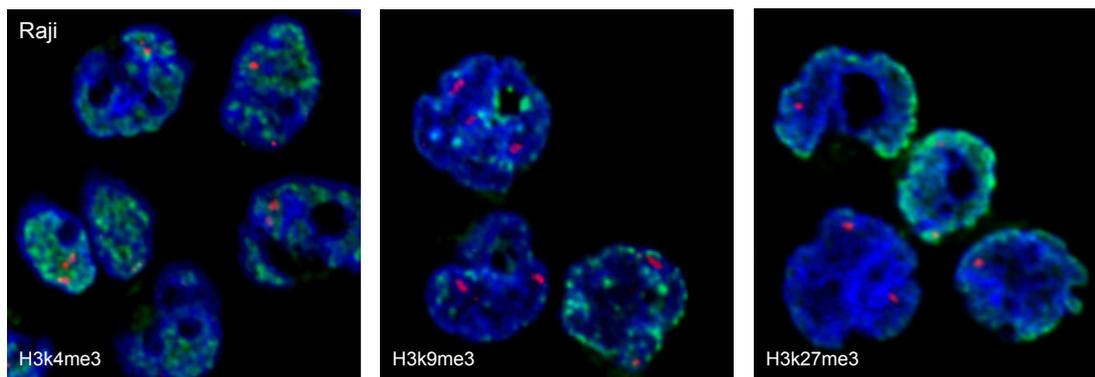


Abb. 3.8: Kolokalisation zwischen Histonmodifikationen und EBV in Raji

Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln. DNA-Färbung mit DAPI (blau), entsprechende Histonmodifikation (grün), EBV-Sonde (rot). Die EBV-Genome zeigen eine bevorzugte Lokalisation mit, oder Assoziation an, H3K4me3-Regionen. Eine Assoziation an oder Kolokalisation mit H3K9me3-Regionen wird gemieden. H3K27me3-Regionen werden weder bevorzugt noch gemieden.

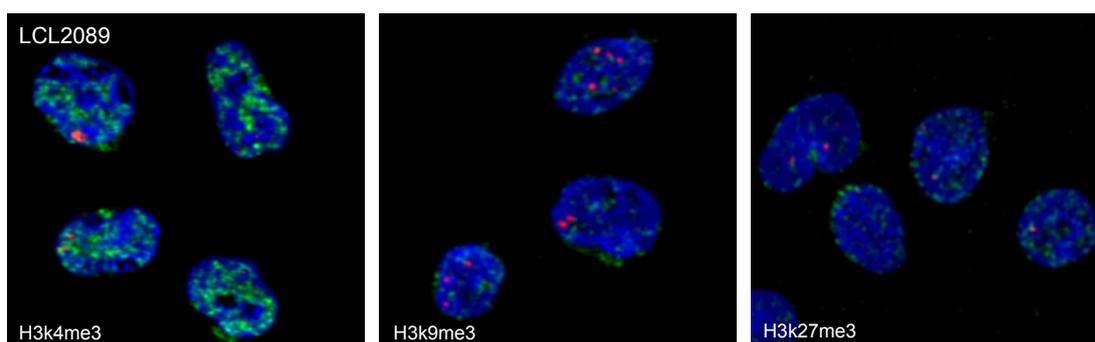


Abb. 3.9: Kolokalisation zwischen Histonmodifikationen und EBV in LCL2089

Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln. DNA-Färbung mit DAPI (blau), entsprechende Histonmodifikation (grün), EBV-Sonde (rot). Die EBV-Genome zeigen eine bevorzugte Lokalisation mit, oder Assoziation an, H3K4me3-Regionen. Eine Assoziation an oder Kolokalisation mit H3K9me3-Regionen wird gemieden. H3K27me3-Regionen werden weder bevorzugt noch gemieden. Die in Raji-Zellen beobachtete Lokalisation wurde hier bestätigt.

Es konnte in beiden untersuchten Zelllinien eine bevorzugte Assoziation der EBV-Genome an oder Kolokalisation der EBV-Genome mit der Trimethylierung des Lysins 4 von Histon 3 gezeigt werden (Tabelle 3.1). Dieser Beobachtung steht die deutliche Meidung des Markers für fakultatives Heterochromatin (H3K9me3) entgegen. An Lysin 27 trimethyliertes Histon 3, welches das konstitutive Heterochromatin kennzeichnet, wird weder auffällig gemieden, noch wird die Assoziation mit ihm bevorzugt. Eine Assoziation mit der entsprechenden Histonmodifikation wurde angenommen wenn das EBV-Signal direkt an die Histonmodifikation angelagert war, aber noch nicht mit dieser kolokalisierte.

	Anzahl der ausgewerteten Zellen	EBV Cluster, die mit der Methylierung mind. teilweise colokalisieren	EBV Cluster, die an die Methylierung assoziiert sind	EBV Cluster, die nicht mit der Methylierung assoziiert sind
Raji-cells				
H3K4me3	47	57,5% (+/-26,87)	42,5% (+/-26,87)	0,00%
H3K9me3	50	8,9% (+/-17,46)	29,6% (+/-24,11)	62,1% (+/-24,4)
H3K27me3	49	32,3% (+/-25,05)	32,6% (+/-20,88)	35% (+/-27,31)
LCL-2089				
H3K4me3	20	63,2% (+/-13,5)	36,8% (+/-13,5)	0,00%
H3K9me3	24	14,6% (+/-14,75)	37,9% (+/-14,55)	47,6% (+/-17,81)
H3K27me3	21	20,9% (+/-17,49)	54,5% (+/-13,95)	25,5% (+/-14,17)

Tabelle 3.1: Vergleich der Assoziation von EBV mit Histonmethylierungen

Ein zusammenfassender Vergleich der unternommenen Kolokalisations-Studie zwischen EBV und Histonmethylierungen. Neben dem Anteil der Zellen die das entsprechende Kolokalisationsmuster zeigen ist in Klammern die Standardabweichung angegeben. EBV zeigt in beiden untersuchten Zelllinien eine deutliche Präferenz in der Assoziation mit H3K4me3-Regionen. Eine Assoziation mit H3K9me3 wird weitgehend vermieden. Die Histonmodifikation H3K27me3 wird weder gemieden noch bevorzugt.

Um den beobachteten Sachverhalt noch besser einschätzen zu können wurde ein Wilcoxon-Rangsummen-Test für die eben beschriebenen Histontrimethylierungs-Experimente durchgeführt. Mit Hilfe dieses mathematischen Tests konnten p-Werte für die getroffenen Aussagen berechnet werden. Dazu wurden randomisiert angeordnete Fluoreszenz-Signale generiert und die ihrer Lokalisation entsprechenden Assoziations- und Kolokalisations-Raten bestimmt. Diese Raten wurden mit den experimentell bestimmten Daten verglichen um die

Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, mit der das gleiche Ergebnis durch Zufall erzielt wurde. Je niedriger diese Wahrscheinlichkeit ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die experimentelle Beobachtung nicht zufällig ist (Dr. Achim Tresch, persönliche Kommunikation). Die Aussage „EBV assoziiert bevorzugt mit H3K4me3-Regionen“ konnte mit einem p-Wert von 10^{-6} als sehr wahrscheinlich bewertet werden. Die Aussage „EBV meidet die Assoziation mit H3K9me3-Regionen“ wurde mit einem p-Wert von 10^{-6} ebenfalls als sehr wahrscheinlich eingestuft. Auch die Aussage „EBV zeigt keine bevorzugte Assoziation mit H3K28me3-Regionen“ wurde mit einem p-Wert von 10^{-5} als sehr wahrscheinlich bewertet. Die getroffenen Aussagen sind also korrekt getroffen worden und dienen in weiteren Experimenten als Bezugspunkt.

Die bevorzugte Lokalisation von EBV in H3K4me3-Regionen zeigt, dass sich das Virus in den aktiven Bereichen des Euchromatins aufhält. Um dies weiter zu bestätigen wurde eine Kombinationsfärbung gegen EBV und die, ebenfalls für das Euchromatin kennzeichnende, Acetylierung von Lysin 9 an Histon 3 durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden Raji-Zellen und HEK293-2089-Zellen verwendet (Abbildung 3.10).

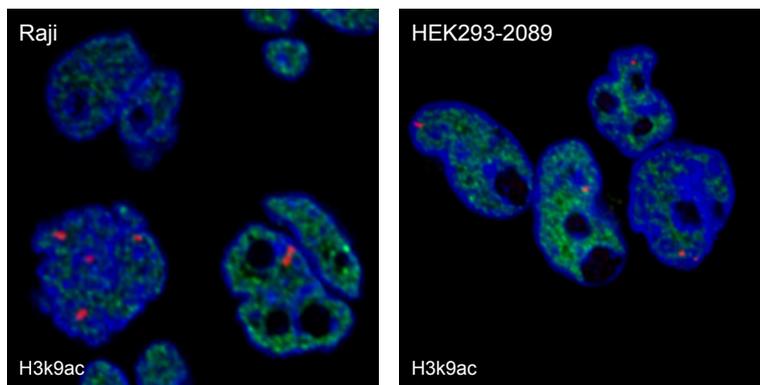


Abb. 3.10: Kolokalisation zwischen Histonacetylierung und EBV in Raji und HEK293-2089

Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln. DNA-Färbung mit DAPI (blau), entsprechende Histonmodifikation (grün), EBV-Sonde (rot). Die EBV-Genome zeigen in beiden untersuchten Zelllinien eine bevorzugte Lokalisation mit, oder Assoziation an, H3K9ac-Regionen. Dies bestätigt die in Raji-Zellen und LCL2089-Zellen beobachtete bevorzugte Assoziation mit H3K4me3-Regionen des aktiven Euchromatins.

Die Kolokalisations-Experimente zwischen der Acetylierung von Lysin 9 des Histons 3 zeigten auch hier eine deutliche Kolokalisations- und Assoziationspräferenz zwischen der Histonmodifikation und EBV (Tabelle 3.2). Die Kolokalisations-Rate war hier sogar größer als die der H3K4me3-Regionen mit EBV. Dies kann daran liegen, dass H3K9ac-Regionen für die offene Chromatinstruktur des Euchromatins kennzeichnend sind und H3K4me3-Regionen die aktiven Regionen in Euchromatin selbst umfassen.

Die hier gemachten Beobachtungen lassen darauf schließen, dass EBV im euchromatischen Teil der perichromatischen Region lokalisiert ist. Dort profitiert es von der offenen Chromatinstruktur und der durch sie vermittelten hohen Verfügbarkeit zellulärer Proteine. Die Lokalisation in dieser epigenetischen Region kann ausschlaggebend für eine erfolgreiche Etablierung als extrachromosomales Replikon sein. Um zu überprüfen ob diese Lokalisation durch *oriP* beeinflusst wird, wurden weitere Experimente mit mini-EBVs durchgeführt.

	Anzahl der ausgewerteten Zellen	EBV Cluster, die mit der Acetylierung mind. teilweise colokalisieren	EBV Cluster, die an die Acetylierung assoziiert sind	EBV Cluster, die nicht mit der Acetylierung assoziiert sind
Raji-cells				
H3K9ac	25	78,5% (+/-14,91)	21,5% (+/-14,91)	0,00%
HEK293-2089				
H3K9ac	20	85,5% (+/-22,45)	14,5% (+/-22,45)	0,00%

Tabelle 3.2: Vergleich der Assoziation von EBV mit Histonacetylierung

Ein zusammenfassender Vergleich der durchgeführten Kolokalisations-Studie zwischen EBV und Histonmethylierungen. Neben dem Anteil der Zellen die das entsprechende Kolokalisationsmuster zeigen ist in Klammern die Standardabweichung angegeben. EBV zeigt in beiden untersuchten Zelllinien eine deutliche Präferenz in der Assoziation mit H3K9ac-Regionen.

3.1.5 Die Integrität von *oriP* beeinflusst die Assoziation von EBV mit heterochromatischen Histonmodifikationen

In der gentherapeutischen Anwendung eines EBV-basierenden Systems würde die Replikation und Segregation von *oriP* abhängig sein (Abbildung 3.11). Daher muss geklärt werden, welchen Einfluss der latente Replikationsursprung *oriP*, bzw. welchen Einfluss seine Einzelkomponenten FR und DS, auf die Lokalisation der EBV-Genome nehmen. Die EBV-Gesamtgenome lokalisieren, wie in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, im euchromatischen Teil der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus. Diese Lokalisation sollte ebenfalls mit kleineren, primär von *oriP* abhängigen Vektoren erreicht werden. So würde eine Etablierung des Vektors als extrachromosomales Replikon begünstigt. Das EBV-Gesamtgenom kann im latenten Zustand von mehreren Replikationsursprüngen aus replizieren, nicht nur von seinem latenten Replikationsursprung *oriP* aus (Little and Schildkraut, 1995; Norio et al., 2000). In miniEBV-Genomen, die eine Größe von 82 kbp besitzen, findet die Replikation primär am latenten Replikationsursprung *oriP* statt, was sie zu einem geeigneten System zur Untersuchung des Einflusses von *oriP* und dessen Einzelkomponenten FR und DS auf die Lokalisation der EBV-Genome im Interphase-Nukleus macht.

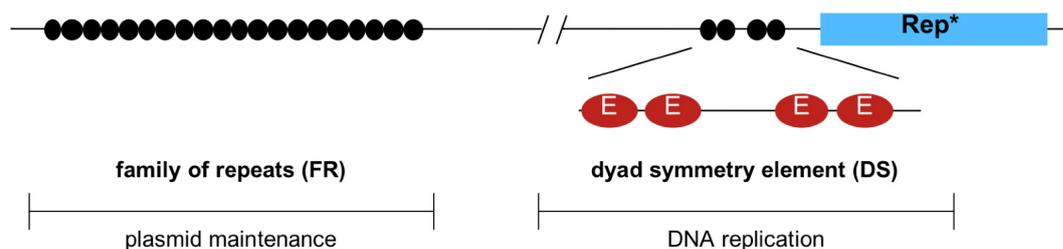


Abb. 3.11: Schematische Darstellung von *oriP*

oriP besteht aus zwei funktionell getrennten Komponenten, der family of repeats (FR) und dem dyad symmetry element (DS). FR besteht aus 20 Bindestellen (schwarz ausgefüllte Kreise) für den viralen trans-Faktor EBNA1 und ist für die nukleäre Retention *oriP*-abhängiger Plasmide und deren Segregation auf die Tochterzellen verantwortlich. DS besteht aus 4 Bindestellen (schwarz ausgefüllte Kreise, bzw. rote Ellipsen in der vergrößerten Darstellung) für den viralen Transfaktor EBNA1 und vermittelt die Replikation der *oriP*-abhängigen Plasmide. Das durch ein blaues Rechteck gekennzeichnete Rep*-Element kann in Abwesenheit von DS ebenfalls Replikation vermitteln, erreicht hierbei aber nur 1/8 der Replikationskompetenz von DS.

Es ist bisher unklar ob die Lokalisation durch das als Replikator funktionierende DS-Element, durch das für die Plasmid-Segregation notwendige FR-Element, oder durch ein Zusammenspiel beider Komponenten vermittelt wird. Um dies zu untersuchen wurden in unserem Labor verschiedene Mutanten des *oriP*-tragenden miniEBVs generiert (Abbildung 3.12). Hierzu wurde als Ausgangspunkt das ursprüngliche miniEBV p1478.A (Schepers and Diffley, 2001) dahingehend modifiziert, dass links und rechts von Wildtyp-*oriP* *loxP*-Stellen eingefügt wurden. Das so erhaltene miniEBV wurde mit p2908-*oriP* bezeichnet.

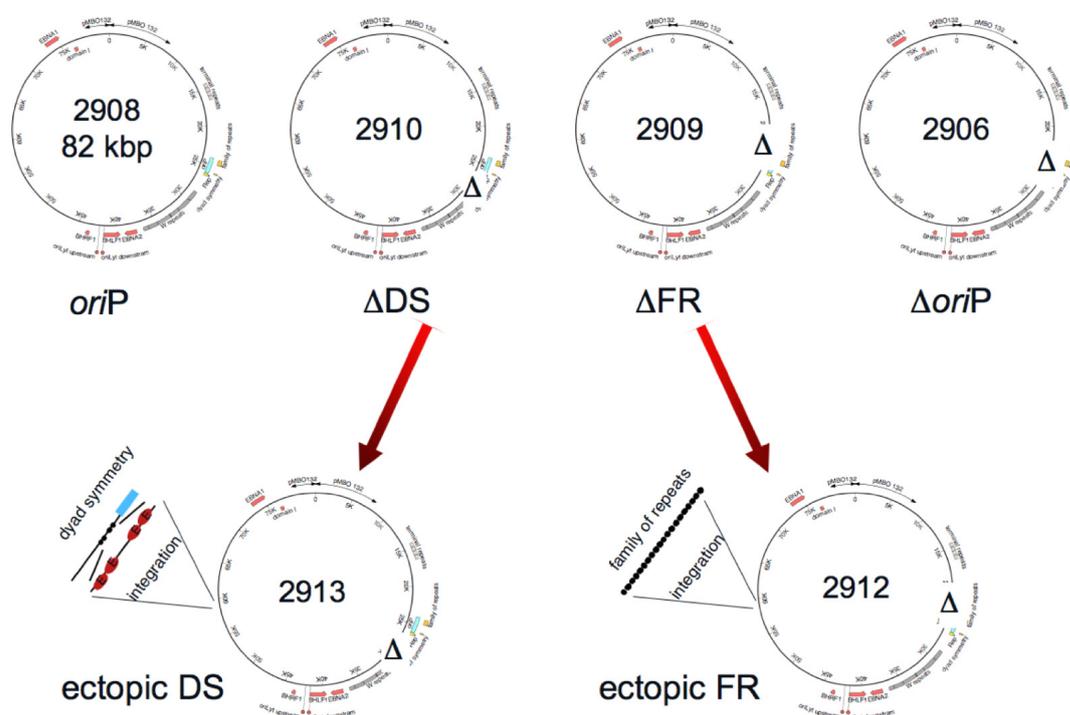


Abb. 3.12: Schematische Darstellung der generierten miniEBV-Genome

Ausgehend von dem 82 kbp großen miniEBV p2908-*oriP*, das ein von *loxP*-Stellen flankiertes Wildtyp-*oriP* besitzt, wurden verschiedene Mutanten erzeugt. Die Deletionsmutante p2906- Δ *oriP* besitzt kein *oriP*. Der Deletionsmutante p2910- Δ DS fehlt das DS-Element. Das fehlende DS-Element wurde in p2913-eDS in einer 30 kbp entfernten *BstEII*-Schnittstelle eingesetzt um den Einfluss der Integrität von *oriP* auf dessen Funktion zu untersuchen. Die Deletionsmutante p2909- Δ FR besitzt kein FR-Element. Das fehlende FR-Element wurde in p2912-eFR in einer 30 kbp entfernten *BstEII*-Schnittstelle eingesetzt um den Einfluss der Integrität von *oriP* auf dessen Funktion zu untersuchen.

miniEBV p2910- Δ DS wurde durch eine 140 bp umspannende Deletion des 114 bp großen DS-Elements erzeugt. Das entfernte DS-Element wurde dann in eine 30 kbp entfernte BstEII-Schnittstelle eingefügt um p2913-eDS zu erzeugen. Dieses miniEBV sollte dazu dienen, den Einfluss einer ektopischen Veränderung des *oriP*-Kontextes zu untersuchen. Hier waren zwar beide Elemente des Replikationsursprunges noch vorhanden, aber die natürliche Integrität war unterbrochen worden. In gleicher Weise wurden die Deletionsmutante p2909- Δ FR, welche kein FR-Element besitzt, und das miniEBV p2912-eFR, welches ein an der 30 kbp entfernten BstEII-Schnittstelle eingefügtes FR-Element besitzt, generiert. Eine durch Cre-Rekombinase-Aktivität geschaffene Komplet-Deletion von *oriP* in miniEBV p2906- Δ *oriP* diene als Negativkontrolle.

Die oben beschriebenen Mutanten wurden im Vorfeld zu den Lokalisations-Studien in unserem Labor auf die Funktionalität von *oriP* hin untersucht (Deutsch et al, 2009). Hierbei zeigte sich, dass p2909- Δ FR nach der Transfektion in eine Helferzelllinie nicht in der Lage war, infektiösen Virus zu generieren. Um miniEBV-Genome in Virionen zu verpacken verwendet man häufig sogenannte Helferzelllinien. Diese unterliegen nach der Kotransfektion der miniEBV-Genome zusammen mit BALF4-Plasmiden, welche die Virusproduktion aktivieren, dem lytischen Zyklus und produzieren Viren die das entsprechende miniEBV enthalten. Die in das Zellkulturmedium abgegebenen Viren konnten im Fall von p2909- Δ FR keine primären B-Zellen transformieren und verhielten sich entsprechend der Negativkontrolle p2906- Δ *oriP*. Die anderen miniEBV-Mutanten zeigten eine normale Infektion und Transformation primärer B-Zellen und erlaubten die Etablierung der stabilen lymphoblastoiden Zelllinien LCL2908-*oriP*, LCL2910- Δ DS, LCL2912-eFR und LCL2913-eDS.

Die so generierten Zelllinien konnten im weiteren Verlauf dieser Arbeit für Lokalisations-Analysen verwendet werden.

3.1.5.1 Deletion von FR oder *oriP* führt zum Verlust der perichromatischen Lokalisation von miniEBV-Genomen

In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden: 1) Ist DS oder FR allein ausreichend um eine Lokalisation der miniEBV-Genome in den euchromatischen Teil der perichromatischen Region zu vermitteln? 2) Ist die Kombination beider Elemente für die Lokalisation der miniEBV-Genome in den euchromatischen Teil der perichromatischen Region notwendig? 3) Hat die räumliche Integrität von *oriP* einen Einfluss auf die Lokalisation der miniEBV-Genome.

Zuerst sollte untersucht werden ob die verschiedenen miniEBV-Mutanten, ähnlich zu den Beobachtungen in Gesamt-EBV-tragenden Zelllinien, mit dem viralen *trans*-Faktor EBNA1 in der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus kolokalisieren. Dazu wurden die mittels Virusinfektion generierten Zelllinien LCL2908-*oriP*, LCL2910- Δ DS, LCL2912-eFR und LCL2913-eDS im hypertonen Zustand für EBNA1 und EBV-Genome gefärbt und mit einem Konfokal-Mikroskop aufgenommen (Abbildung 3.13).

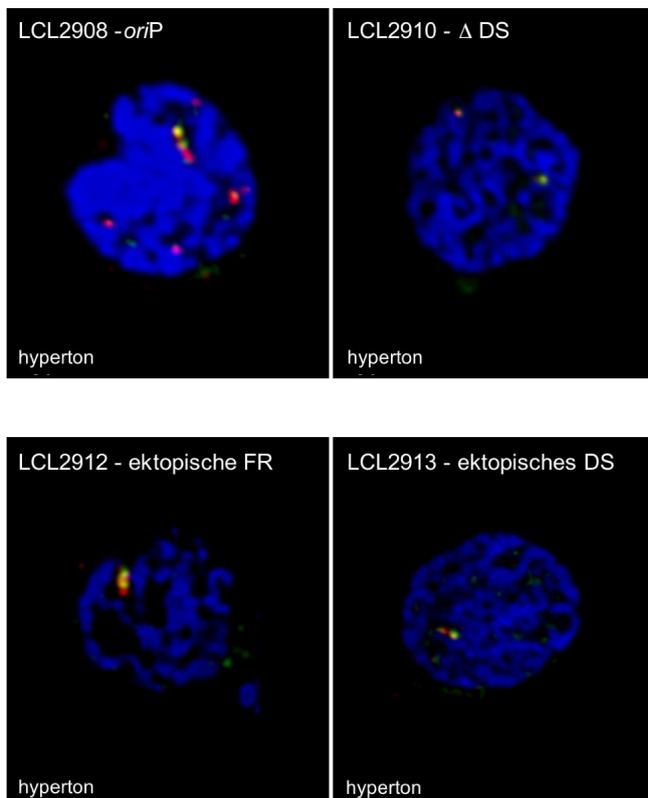


Abb. 3.13: Kolokalisation von miniEBVs mit EBNA1 in der perchromatischen Region Einzelbilder aus den für jede Zelllinie aufgenommenen Bilderstapeln; DNA-Färbung mit DAPI (blau); EBNA1 (grün); EBV-Sonde (rot); In allen Zelllinien zeigte sich im hypertonen Zustand eine deutliche Kolokalisation zwischen EBV und EBNA1 in der perichromatischen Region.

LCL2912-eFR zeigte zum Zeitpunkt der Kolokalisations-Studien Probleme in der Kultivierung. Daher wurde diese Zelllinie im Rahmen der Immunfluoreszenz-Experimente durch mit p2912-eFR transfizierte DG75-Zellen ersetzt.

Die vier untersuchten Zelllinien zeigten eine deutliche Kolokalisation der miniEBV-Genome mit den viralen *trans*-Faktor EBNA1 in der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus. Diese Beobachtung stimmt mit der für EBV-Gesamtgenome getroffenen Beobachtung in Raji-Zellen und HEK293-2089-Zellen überein (Tabelle 3.3). Die mit p2912-eFR transfizierten DG75-Zellen zeigten einen geringen Prozentsatz zytosolischer Lokalisation des miniEBV-Genoms. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Zellen mittels Elektroporation zwei Tage vor der Fixierung für die mikroskopische Untersuchung transfiziert wurden und nicht alle miniEBV-Genome in den Zellkern eingewandert waren.

	Raji	293-2089	2908	2910	2912 (transf)	2913
ausgewertete Zellen	23	42	26	28	29	30
perichromatische Lokalisation	95,65%	85%	84,62%	96,43%	65,52%	93,33%
chromatische Lokalisation	0%	0%	0%	0%	0%	0%
interchromatische Lokalisation	4,35%	0%	0%	0%	0%	0%
zytosolische Lokalisation	0%	0%	0%	0%	17,24%	0%
kein Signal	0%	15%	15,38%	3,57%	17,24%	6,67%

Tabelle 3.3: Vergleich der perichromatischen Lokalisation von EBV-Gesamtgenomen und miniEBV-Genomen

Ein zusammenfassender Vergleich der perichromatischen Lokalisation von EBV-Gesamtgenomen in Raji-Zellen und HEK293-2089-Zellen, sowie der miniEBV-Genome in LCL2908-*oriP*, LCL2910- Δ DS, LCL2913-eDS und in mit p2912-eFR transfizierten DG75-Zellen. In allen untersuchten Zelllinien zeigte sich eine deutlich bevorzugte Lokalisation der EBV-Genome in der perichromatischen Region. Die beobachteten zytosolischen Signale in mit p2912-eFR transfizierten DG75-Zellen sind auf die der Fixierung vorangegangene Elektroporation zurückzuführen.

Da sich weder die räumliche Trennung der beiden Elemente von *oriP*, noch die Deletion des DS-Elements negativ auf die perichromatische Lokalisation der miniEBV-Genome ausgewirkt hatte, wurde vermutet, dass das FR-Element der entscheidende Faktor innerhalb von *oriP* ist. Um diese Vermutung zu bestätigen,

wurden die beiden miniEBV-Genome die kein transformierendes Potential hatten, p2906- $\Delta oriP$ und p2909- ΔFR , in DG75-Zellen transfiziert. Dies erfolgte analog zu der Transfektion dieser Zellen mit p2912-FR mittels Elektroporation. Im Fall von p2912-eFR konnten die transfizierten mini-EBV-Genome nach zwei Tagen durch das Kombinationsverfahren aus Immunfluoreszenz und Fluoreszenzhybridisierung in der perichromatischen Region nachgewiesen werden. Nun galt es zu untersuchen ob sich FR-defiziente mini-EBV-Genome dort ebenfalls nach zwei Tagen etablieren können. Zwei Tage nach der Elektroporation wurden die transfizierten Zellen dem etablierten Kombinationsverfahren unterworfen und mittels Konfokal-Mikroskopie aufgenommen (Abbildung 3.14). Die Transfektion mit p2906- $\Delta oriP$ diente hier als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde p2908-*oriP* transfiziert.

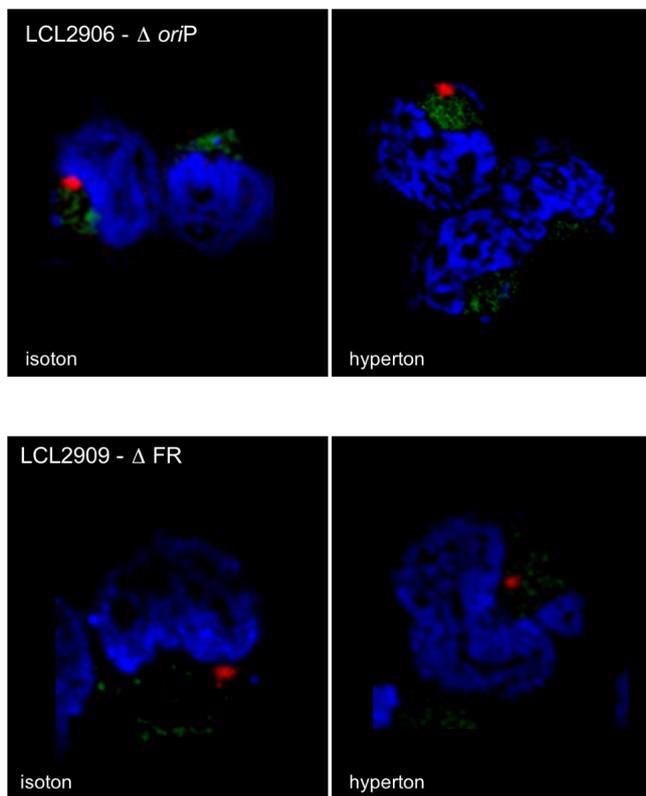


Abb. 3.14: Keine Lokalisation von p2906- $\Delta oriP$ und p2909- ΔFR in der perichromatischen Region

Einzelbilder aus den für jede Zelllinie aufgenommenen Bilderstapeln; DNA-Färbung mit DAPI (blau); EBNA1 (grün); EBV-Sonde (rot); In beiden Fällen zeigte sich in den transfizierten Zellen weder im isotonen Zustand (links), noch im hypertonen Zustand (rechts) eine Lokalisation der miniEBV-Genome in der perichromatischen Region. Eine Bildung der in anderen Zelllinien vorhandenen EBNA1-Foci konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Die transfizierten Zellen zeigten für p2906- $\Delta oriP$ und p2909- ΔFR stark abweichende Verteilungen der miniEBV-Genome (Tabelle 3.4). Es konnten sowohl in der Interchromatin-Domäne als auch im Zytosol der Zellen miniEBV-Genome gefunden werden. Der Anteil an nicht perichromatisch-lokalisierten Genomen war deutlich höher als der in der Positivkontrolle. Die Zahl der perichromatisch lokalisierten miniEBV-Genome für p2909- ΔFR waren im Vergleich zur Positivkontrolle um 50 % reduziert. Die Zahl der perichromatisch lokalisierten miniEBV-Genome für p2906- $\Delta oriP$ war im Vergleich zur Positivkontrolle um 80 % reduziert.

	2906	2909	2908
ausgewertete Zellen	83	55	74
perichromatische Lokalisation	16,87%	43,64%	86,49%
chromatische Lokalisation	0%	0%	0%
interchromatische Lokalisation	42%	16%	0%
zytosolische Lokalisation	24,10%	20%	1,35%
kein Signal	16,87%	20,00%	12,16%

Tabelle 3.4: Verlust der perichromatischen Lokalisation der miniEBV-Genome in Abwesenheit von FR

Ein zusammenfassender Vergleich der perichromatischen Lokalisation der in DG75-Zellen transfizierten miniEBV-Genome p2908-*oriP*, p2906- $\Delta oriP$ und p2909- ΔFR . p2908-*oriP* dient als Positivkontrolle, p2906- $\Delta oriP$ dient als Negativkontrolle. Durch die Deletion von FR sinkt der Prozentsatz der perichromatisch lokalisierten miniEBV-Genome um 50 %, durch die Deletion von *oriP* sinkt der Prozentsatz der perichromatisch lokalisierten miniEBV-Genome um 80 %.

Die perichromatische Lokalisation von miniEBV-Genomen im Interphase-Nukleus zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Präsenz des FR-Elements in den untersuchten miniEBV-Genomen. Eine Deletion des DS-Elements hatte, gleich der ektopischen Modifikation von *oriP*, keinen starken Einfluss auf die perichromatische Lokalisation der Genome. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass FR der ausschlaggebende Faktor für die Etablierung extrachromosomaler Replikons in der perichromatischen Region ist.

3.1.5.2 Deletion von DS führt zu einer stärkeren Assoziation mit heterochromatischen Histonmodifikationen

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, ob FR ebenfalls für die Assoziation der miniEBV-Genome mit dem offenen Chromatin-Zustand des Euchromatins maßgebend ist. Analog zu der in Raji-Zellen untersuchten Kolokalisation der EBV-Genome mit Histonmodifikationen wurden auch hier entsprechende Experimente durchgeführt. Dazu wurden die beiden Zelllinien LCL2908-*oriP* und LCL2910- Δ DS verwendet. LCL2908-*oriP* diente hierbei als Positivkontrolle um den natürlichen epigenetischen Hintergrund der miniEBV-Genome zu bestimmen (Abbildung 3.15). LCL2910- Δ DS sollte dazu dienen den Einfluss von FR auf die Lokalisation der miniEBV-Genome zu zeigen (Abbildung 3.16). Beide Zelllinien wurden hinsichtlich der Kolokalisation der miniEBV-Genome mit den Histonmodifikationen H3K4me₃, H3K9me₃ und H3K27me₃ untersucht.

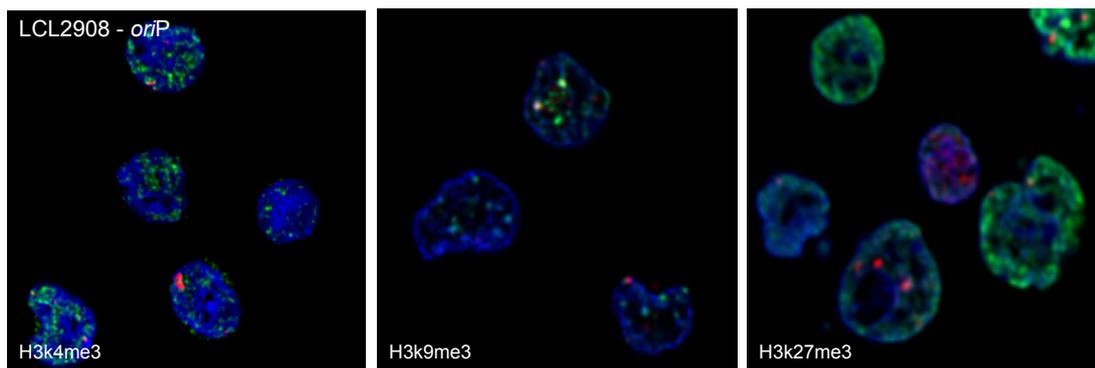


Abb. 3.15: Kolokalisation zwischen Histonmodifikationen und miniEBV p2908-*oriP* Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln. DNA-Färbung mit DAPI (blau), entsprechende Histonmodifikation (grün), EBV-Sonde (rot). Die miniEBV-Genome zeigten eine bevorzugte Lokalisation mit, oder Assoziation an, H3K4me₃-Regionen. Eine Assoziation an oder Kolokalisation mit H3K9me₃-Regionen wurden weder bevorzugt noch gemieden. H3K27me₃-Regionen zeigten eine erhöhte Kolokalisation mit den miniEBV-Genomen.

In LCL2908-*oriP* konnte eine, wie auch in Raji- und HEK293-2089-Zellen beobachtete, bevorzugte Lokalisation der miniEBV-Genome an H3K4me₃-Regionen gezeigt werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in der Lokalisation der EBV-Gesamtgenome zeigten die miniEBV-Genome hier eine höhere Assoziation mit heterochromatischen Histonmodifikationen, wie H3K9me₃ und H3K27me₃. Die Assoziation mit H3K9me₃ zeigte nicht mehr das in Gesamt-EBV-tragenden Zellen

beobachtete Meiden der Histonmodifikation. Die Assoziation mit H3K27me3 ließ sich als leicht bevorzugte Lokalisation interpretieren.

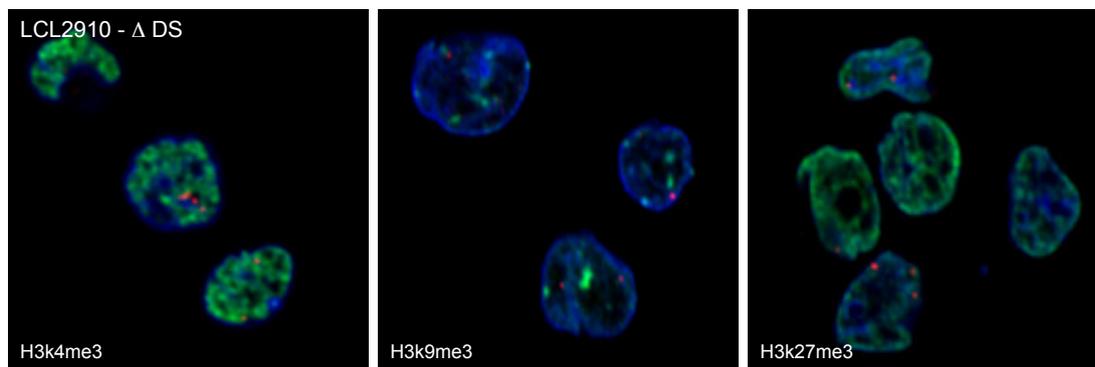


Abb. 3.15: Kolokalisation zwischen Histonmodifikationen und miniEBV p2910- Δ DS Einzelbilder aus den aufgenommenen Bilderstapeln. DNA-Färbung mit DAPI (blau), entsprechende Histonmodifikation (grün), EBV-Sonde (rot). Die miniEBV-Genome zeigten eine bevorzugte Lokalisation mit, oder Assoziation an, H3K4me3-Regionen. Eine Assoziation an oder Kolokalisation mit H3K9me3-Regionen wurden weder bevorzugt noch gemieden. H3K27me3-Regionen zeigten eine höhere Kolokalisation mit den miniEBV-Genomen p2910- Δ DS als mit den miniEBV-Genomen p2908-*oriP*.

In LCL2910- Δ DS zeigte sich ebenfalls die bevorzugte Lokalisation der miniEBV-Genome an H3K4me3-Regionen. Hier war das Ausmaß der Assoziation mit H3K27me3 noch höher als in LCL2908-*oriP* (Tabelle 3.5). Die erhöhte Lokalisation der miniEBV-Genome in LCL2910- Δ DS mit heterochromatischen Histonmodifikationen zeigte, dass sich die Integrität von *oriP* auf die Lokalisation der miniEBV-Genome auswirkt. Obwohl FR für die Transformation und die perichromatische Lokalisation ausschlaggebend war, zeigte sich, dass DS und FR zusammen für die primär euchromatische Lokalisation in der perichromatischen Region benötigt werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl das EBV-Gesamtgenom, als auch die miniEBV-Genome im euchromatischen Teil der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus lokalisiert sind. Dort kolokalisieren sie mit dem viralen *trans*-Faktor EBNA1 und profitieren von der hohen Verfügbarkeit von und Interaktionsmöglichkeit mit zellulären Proteinen. Um einen erfolgreich etablierbaren

Genvektor zu schaffen, sollte er so konzipiert werden, dass er auch in diese epigenetische Region des Zellkerns gelangt und dort verweilt.

	Anzahl der ausgewerteten Zellen	EBV Cluster, die mit der Methylierung mind. teilweise colokalisieren	EBV Cluster, die an die Methylierung assoziiert sind	EBV Cluster, die nicht mit der Methylierung assoziiert sind
LCL2908 - <i>oriP</i>				
H3K4me3	24	72,8% (+/-20,62)	27,2% (+/-20,62)	0,00%
H3K9me3	23	28,7% (+/-11,51)	31,2% (+/-9,74)	40,9% (+/-7,64)
H3K27me3	39	51,4% (+/-18,05)	33,3% (+/-16,32)	15,3% (+/-14,91)
LCL2910 - Δ DS				
H3K4me3	27	67,9% (+/-15,98)	32,1% (+/-15,98)	0,00%
H3K9me3	22	27,8% (+/-16,36)	38,4% (+/-9,66)	33,8% (+/-18,24)
H3K27me3	27	56,6% (+/-15,85)	41,25 (+/-15,6)	3,1% (+/-10,67)

Tabelle 3.5: Vergleich der Assoziation von miniEBV p2908-*oriP* und miniEBV p2910- Δ DS mit Histonmethylierungen

Ein zusammenfassender Vergleich der durchgeführten Kolokalisations-Studie zwischen EBV und Histonmethylierungen. Neben dem Anteil der Zellen die das entsprechende Kolokalisationsmuster zeigen ist in Klammern die Standardabweichung angegeben. EBV zeigt in beiden untersuchten Zelllinien eine deutliche Präferenz in der Assoziation mit H3K4me3-Regionen. Eine Assoziation mit H3K9me3 wird weder gemieden noch bevorzugt. Die Histonmodifikation H3K27me3 zeigte eine erhöhte Assoziation mit den miniEBV-Genomen. Diese ist bei p2910- Δ DS höher als bei p2908-*oriP* und ist auf das Fehlen von DS im *oriP*-Kontext zurückzuführen. miniEBV-Genome zeigen eine generell höhere Assoziation mit heterochromatischen Histonmodifikationen als EBV-Gesamtgenome.

3.2 Einfluss zellulärer Proteine auf die Funktion von *oriP*

Die Entwicklung gentherapeutischer Vektoren auf der Basis von EBV ist sehr vielversprechend. Dies beruht auf dessen Effizienz der Replikation und Retention, die vermittelten Kernständigkeit der Genome, die diesen Virus auszeichnet. Die letztendlich in der Therapie eingesetzten Vektoren dürfen allerdings keine viralen Komponenten mehr enthalten um die Gesundheit des Patienten zu schützen. Die Weiterverwendung von viralen Komponenten könnte ansonsten, wie im Fall der EBNA1-abhängigen Tumorbildung, pathogen wirken. Daher sollte nun erforscht werden, wie der virale *trans*-Faktor EBNA1 in seiner Funktion an FR und DS durch zelluläre Proteine ersetzt werden kann.

Die dazu durchgeführten Untersuchungen erfolgten anhand des in unserem Labor entwickelten konditionalen Vektorsystems pCON. In diesem Vektorsystem kann die Bindung von EBNA1 an FR und DS durch die Bindung zellulärer Fusionsproteine an entsprechende, an Stelle von FR und DS eingefügte Binderegionen ersetzt werden. Dies ermöglichte es uns zu untersuchen, welche zellulären Proteine EBNA1 in seiner Funktion an FR und DS ersetzen können. Das so erlangte Wissen kann genutzt werden um in der Entwicklung gentherapeutischer Vektoren die Replikations- und Retentionsfunktion des applizierten Vektors getrennt voneinander zu steuern und das Niveau des Vektors so zu kontrollieren.

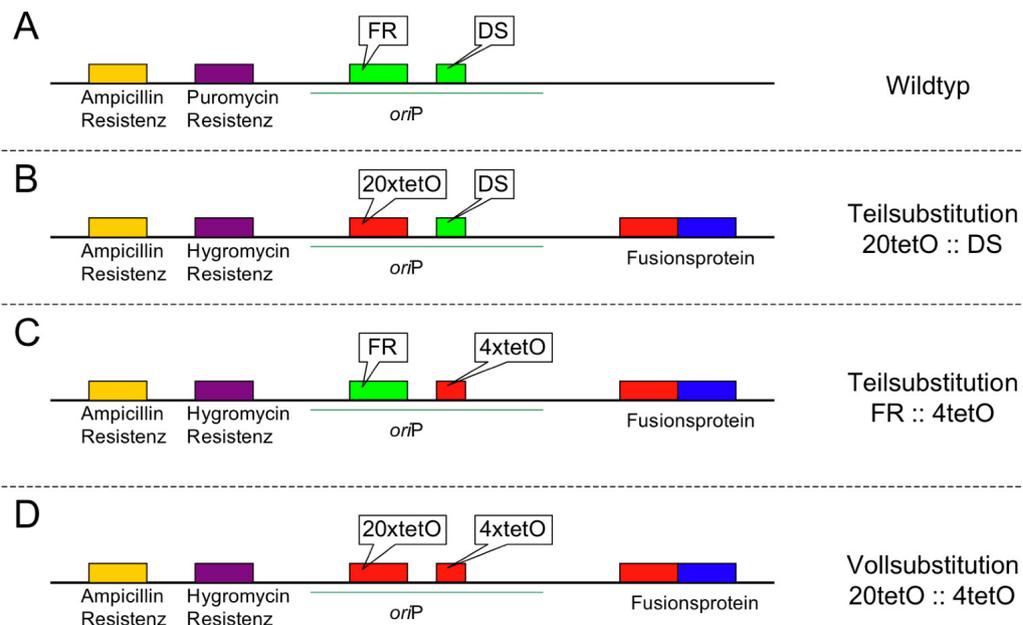
Mit Hilfe des pCON-Systems wurde gezeigt, dass EBNA1 durch das Protein HMGA1a in seiner Funktion an FR und DS ersetzt werden kann. Eine Substitution von EBNA1 mit dem zellulären Protein HP1 α zeigte eine primär retenierende Funktion an FR und eine schwache Replikation an DS. Durch die Verwendung einzelner Domänen von HP1 α konnte eine reine Retentionsfunktion des Proteins erzielt werden.

3.2.1 Das Vektorsystem pCON

Da die folgenden Experimente im Vektorsystem pCON durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle kurz das grundlegende Verständnis zur Funktion und zu den Möglichkeiten des Systems geschaffen werden. Das Vektorsystem basiert auf dem latenten Replikationsursprung von EBV und trägt nur dieses virale Element in sich. Zur Selektion in pro- bzw. eukaryonten Zellen befindet sich noch je eine für die entsprechenden Organismen nutzbare Resistenzkassette auf dem Plasmid. Das Plasmid selbst trägt keine Gensequenz für die Transkription von EBNA1 auf sich und kann im Wildtyp-Zustand nur in Zellen erhalten werden, die EBNA1 zur Verfügung stellen.

Das Vektorsystem wurde durch die Substitution der einzelnen *oriP*-Elemente durch synthetische tet-Operatoren(tetO)-Oligonukleotide modifiziert (Pich et al., 2008) (Abbildung 3.17). tet-Operatoren sind prokaryontischen Ursprungs und kommen in eukaryontischen Zellen nicht vor. Die 20 EBNA1-Bindestellen in FR wurden durch 20x tetO ersetzt, die 4 Bindestellen für EBNA1 in DS wurden mit 4x tetO ersetzt. Die tetO-Motive werden in ihrem prokaryonten Kontext von den DNA-Bindedomänen des tet-Repressors(tetR) gebunden. Diese Bindung erfolgt nach der Dimerisierung zweier tet-Repressoren. Durch die Applikation von Doxyzyklin ändert sich die Struktur der DNA-Binddomänen der tet-Repressoren und diese können nicht mehr an tetO binden. Die Dimerisierung und Bindung der tet-Repressoren kann durch zwei mit einem Linker verbundene tetR-DNA-Bindedomänen(sctetR), die als durchgehende Nukleinsäuren-Kette vorliegen, erreicht werden. Durch das Fusionieren der zu untersuchenden zellulären Proteine an sctetR kann so der Einfluss des entsprechenden Proteins an FR und/oder DS untersucht werden (Abbildung 3.18). Die Verwendung des tetO-sctetR-Systems in den pCON-Vektoren erlaubt es, die Interaktion durch Doxyzyklin-Zugabe konditional zu steuern ohne in die Funktionen der eukaryonten Zellen einzugreifen. Die Fusion an sctetR hat zudem noch den Vorteil, dass pro DNA-Bindedomänen-Dimer nur eine funktionelle Domäne, das fusionierte Protein (HMGA1a, HP1 α), vorhanden ist und so keine „Brückenartefakte“ erzeugt werden können. Die zu untersuchenden Proteine werden auf die entsprechenden pCON-Vektoren kloniert um eine transiente Beobachtung zu ermöglichen.

Durch die Substitution von EBNA1 an DS ist es möglich Aufschluss auf die Funktion ORC-interagierender Proteine in der DNA-Replikation erhalten. Substitutionen von EBNA1 an FR ermöglichen es, den Vektor in bestimmte Kern-Domänen zu lenken und den Einfluss der dort vorherrschenden Chromatin-Zustände auf die Vektor-Etablierung zu untersuchen.



DS: Replikationskompetenz; FR: Retention, Segregation

Abb. 3.17: Das Vektorsystem pCON

In seinem Wildtyp-Zustand (A) ist das Plasmid in seiner Replikationskompetenz und Retention von EBNA1 abhängig. EBNA1 muss hier von der Zelle bereitgestellt werden, in die das Plasmid transfiziert wird. Durch die Substitution von FR (B) oder DS (C) kann die entsprechende Funktion von dem auf dem Plasmid sitzenden Fusionsprotein übernommen werden. Die nicht substituierte Region bleibt EBNA1-abhängig. Werden beide *oriP*-Elemente ersetzt (D) übernimmt das Fusionsprotein die Funktion von EBNA1 an FR und DS. Das Plasmid ist nicht mehr von EBNA1 abhängig.

Im folgenden Abschnitt wurden zwei Proteine in Bezug auf Ihre Funktion an DS und FR hin untersucht, HMGA1a und HP1 α . HMGA1a wurde in unserem Labor bereits eingehend auf seine Interaktion mit dem origin-recognition-complex (ORC), welcher für die Ausbildung des prä-replikativen Komplexes notwendig ist, und seine DNA-Bindeaktivität hin untersucht (Thomae et al., 2007). Im pCON-System vermittelt es sowohl eine gute Retention des Plasmids, als auch eine gute Replikationskompetenz

(Pich et al., 2008). Dieses Protein diente daher in den folgenden Experimenten als Positivkontrolle.

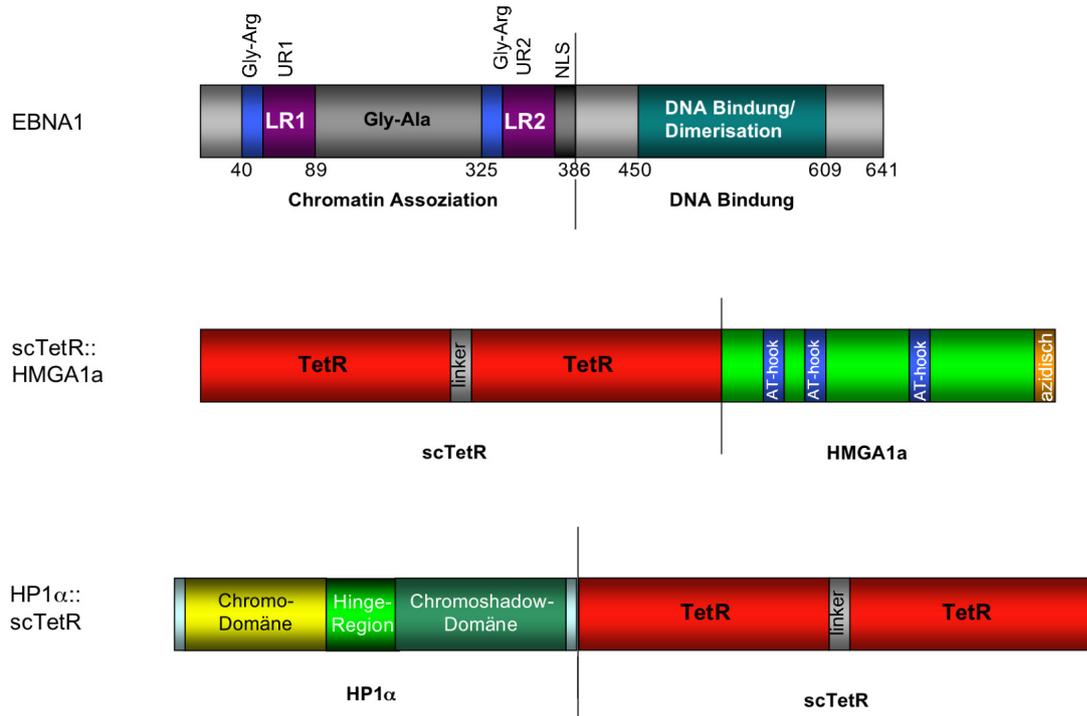


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der mit pCON verwendeten Proteine EBNA1 als *trans*-Faktor für sich im Wildtyp-Zustand befindliche und teilsubstituierte pCON-Plasmide; scTetR::HMGA1a dient als Positivkontrolle, das es sowohl die Retention als auch die Replikation von pCON-Plasmiden vermittelt (Pich et al., 2008). HP1α::scTetR besitzt drei Domänen mit getrennten Funktionen: die Chromo-Domäne (CD) vermittelt die Interaktion mit H3K9me3-Regionen; die regulative Hinge-Region besitzt DNA- und RNA-Bindeeigenschaften; die Chromoshadow-Domäne (CSD) dient der Protein-Protein-Interaktion (Lomberk et al., 2006).

HP1α::scTetR wurde als Fusionsprotein im pCON-System gewählt weil es durch seine CD-vermittelte H3K9me3-Bindung eine heterochromatische Lokalisation der Plasmide induzieren kann. So war es möglich den Einfluss des epigenetischen Umfelds auf die Plasmid-Etablierung zu untersuchen. Eine Lokalisation an die nukleäre Matrix sollte durch das Fusionsprotein aus dem Scaffold-Attachment-Factor-A (SAF-A) und scTetR erzielt werden. Zur Lokalisation der Plasmide an Chromatin-Regionen die aktiv umstrukturiert werden, sollte ein Fusionsprotein aus der Topoisomerase 2α (Topo2a) und scTetR dienen. Im Fall von SAF-A::scTetR und Topo2a::scTetR war die Etablierung der Plasmide nicht möglich. Die pCON-Vektoren wurden während der Selektion der Zellen verloren.

3.2.2 HP1 α vermittelt eine gute nukleäre Retention, aber eine schlechte Replikation

Um zu untersuchen ob HP1 α die Funktion von EBNA1 an FR und/oder DS ersetzen kann, wurden HP1 α ::sctetR tragende Plasmide im Kontext der Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) und der Teilsubstitution (20x tetO – DS) verwendet. Die Plasmide wurden in HEK293- und HEK293-EBNA1-Zellen transfiziert. Die EBNA1-unabhängige Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) sollte in beiden Zelllinien gleichermaßen Aufschluss auf eine mögliche Funktion von HP1 α an FR und DS zeigen. Die Teilsubstitution (20xtetO – EBNA1) sollte zeigen ob HP1 α die Retention der Plasmide durch seine Präsenz an FR vermitteln kann. Die Replikation war hier immer noch abhängig von EBNA1. Als Kontrollen dienten hier das vollständig EBNA1-abhängige Wildtyp-Plasmid (FR – DS) und das EBNA1-unabhängige vollsubstituierte Plasmid HMGA1a::sctetR-20xtetO-4xtetO (Abbildung 3.19).

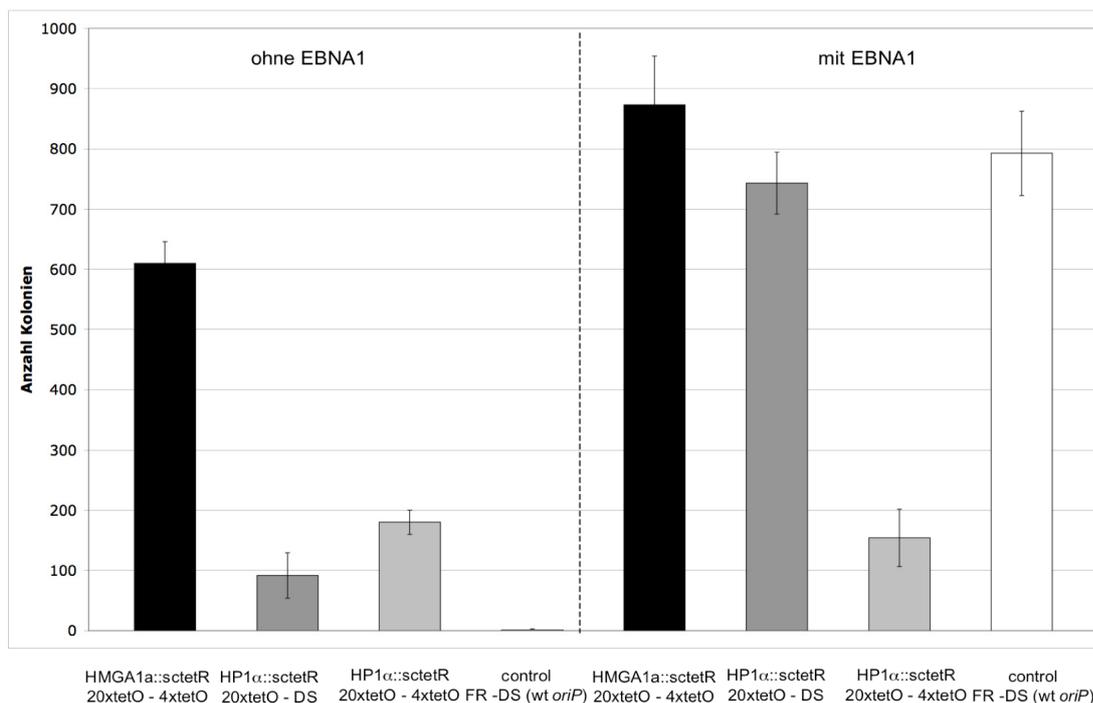


Abb.3.19: Auswertung Plasmid-Rescue-Assay HP1 α

Links: Auswertung in HEK293-Zellen; Vollsubstitution mit sctetR::HMGA1a zeigt hohe Kolonienzahl; Wildtyp-Kontrolle zeigt keine Kolonien; Vollsubstitution mit HP1 α ::sctetR zeigt Kolonien; aber weniger als sctetR::HMGA1a; Teilsubstitution mit HP1 α ::sctetR-abhängiger FR zeigt noch weniger Kolonien als die Vollsubstitution. Rechts: Auswertung in HEK293-EBNA1-Zellen; Wildtyp-Kontrolle zeigt hohe Kolonienzahl und Teilsubstitution mit HP1 α ::sctetR wird durch EBNA1-Bindung an DS auf Wildtyp-Niveau angehoben. n=3

Die Evaluierung der Plasmid-Etablierung erfolgte durch den Plasmid-Rescue-Assay. In diesem Verfahren wird das Maß der Plasmid-Stabilität in den transfizierten Zellen gemessen. In Relation zu den Kontrollen kann eine Aussage getroffen werden ob die Plasmide gut oder schlecht erhalten blieben und ob die durch das Fusionsprotein vermittelte Etablierung erfolgreich war.

Die durch HMGA1a::sctetR-vermittelte Replikation und Retention der Plasmide war in beiden Zelllinien sehr gut und entspricht dem durch EBNA1-hervorgerufenen Niveau im Wildtyp-Plasmid (FR – DS). Dies zeigt sich im Vergleich des schwarzen und des weißen Balkens in der rechten Hälfte von Abbildung 3.19. Die Plasmid-Rescue-Assays zur HP1 α -abhängigen Plasmid-Etablierung zeigten, dass HP1 α in der Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) nur eine mäßige Plasmid-Etablierung zuließ. Sie war im Vergleich mit der von HMGA1a::sctetR-vermittelten Etablierung um drei Viertel geringer. Die Teilsubstitution (20x tetO – DS) in Abhängigkeit von HP1 α ::sctetR zeigte eine schlechte Etablierung in Abwesenheit von EBNA1 (Abbildung 3.19, linke Hälfte), konnte aber in Anwesenheit von EBNA1 auf Wildtyp-Niveau angehoben werden (Abbildung 3.19, rechte Hälfte). Dies ließ auf eine durch HP1 α ::sctetR vermittelte Bindung der Plasmide an H3K9me3-Regionen am Zellkern und die dadurch erzielte gute Retention schließen. HP1 α ::sctetR zeigte an DS eine schwache Replikationsvermittlung. Die Interaktion von HP1 α mit ORC wurde in *D.melanogaster* und *M.musculus* beschrieben und scheint auch im Menschen vorzuliegen (Auth et al., 2006; Pak et al., 1997).

Die Expression der Fusionsproteine wurde während der Experimente an zwei Zeitpunkten untersucht. Zuerst geschah dies mittels Western-Blot-Analysen zwei Tage nach der Transfektion der pCON-Plasmide, um zu zeigen, dass die Zellen zu Beginn des Experimentes die entsprechenden Fusionsproteine produzieren (Abbildung 3.20). Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Fusionsproteine detektiert. HP1 α ::sctetR zeigte im Western-Blot meist eine Doppelbande bei 76 kDa und bei 80 kDa. Diese Doppelbande wird durch Modifikationen am Protein hervorgerufen. sctetR::HMGA1a zeigte eine deutliche Bande bei 65 kDa. Zusätzlich wurde in den HEK293-EBNA1-Zellen die Expression von EBNA1 kontrolliert. Zu Beginn des Experimentes waren alle benötigten Proteine vorhanden.

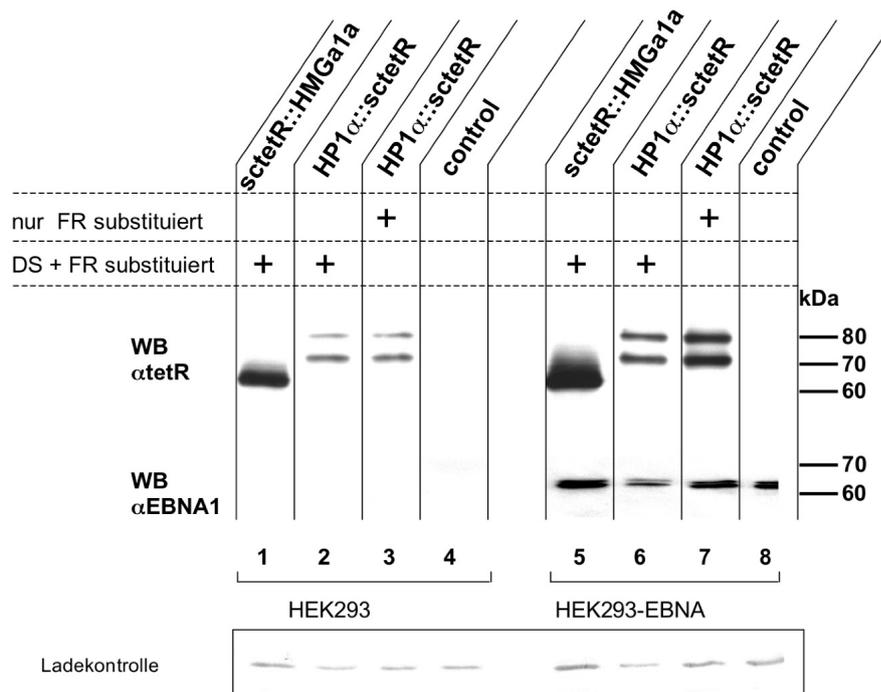


Abb.3.20: Western-Blot gegen Fusionsproteine und EBNA1 (2 Tage nach der Transfektion)

Zwei Tage nach der Transfektion sind in beiden Zelllinien die entsprechenden Fusionsplasmide nachweisbar; sctetR::HMGA1a (~65 kDa); HP1 α ::sctetR (~76 kDa); HEK293-EBNA1 zeigen zudem eine deutliche Expression von EBNA1 (~63 kDa). Als Ladekontrolle wurde eine Amidoblack-Färbung der Blot-Membran durchgeführt.

Zum Zeitpunkt des Plasmid-Rescue-Assays, zwei Wochen nach der Transfektion (Abbildung 3.21), zeigten die Vollsubstitutionen (20x tetO – 4x tetO) in beiden Zelllinien keine Differenzen in der Proteinexpression (Abbildung 3.21, Spur 1 und 2). Die sctetR::HMGA1a-abhängige Vollsubstitution (Abbildung 3.21, Spur 5 und 6) zeigte in beiden Zelllinien eine gute Proteinexpression. Die Teilsubstitution mit HP1 α ::sctetR-abhängigem FR jedoch zeigte einen deutlichen Unterschied im Vergleich der beiden Zelllinien (Abbildung 3.21, Spur 7 und 8). Ohne EBNA1-Bindung an DS zeigte sich eine nur schwache Expression von HP1 α ::sctetR bei 76 kDa. Dem entgegen steht eine starke Proteinexpression sobald EBNA1 an DS bindet und damit auch die Kolonienzahl auf das Wildtyp-Niveau angehoben wird. Damit korrelierte das Expressions-Niveau der Proteine mit den im Plasmid-Rescue-Assay beobachteten Plasmidkolonien und bekräftigte diese Beobachtung.

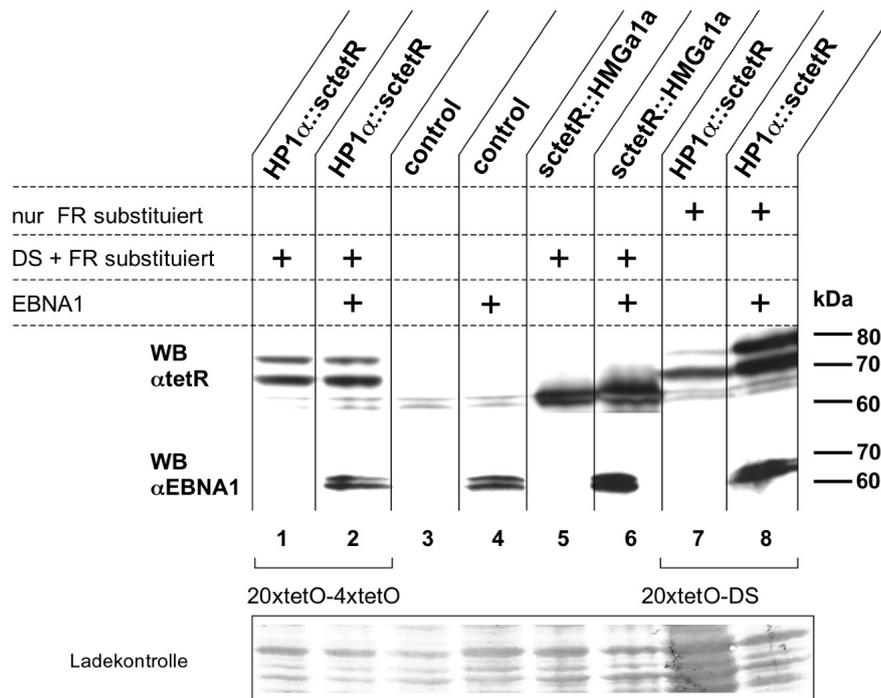


Abb.3.21: Western-Blot gegen Fusionsproteine und EBNA1 (2 Wochen nach der Transfektion)

Zwei Wochen nach der Transfektion sind in HEK293-EBNA1 (2,4,6,8) die entsprechenden Fusionsplasmide nachweisbar; sctetR::HMGA1a (~65 kDa); HP1α::sctetR (~76 kDa); HEK293-EBNA1 zeigen eine deutliche Expression von EBNA1 (~63 kDa); Transfektionen in HEK293-Zellen sind in den Spuren 1,3,5 und 7 aufgetragen. Die EBNA1-unabhängigen Vollsubstitutionen (1+2; 5+6) zeigen keine Unterschiede in der Proteinexpression, die EBNA1-abhängige Teilsubstitution (7+8) mit HP1α::sctetR abhängigem FR zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinexpression von HP1α::sctetR.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Einfluss von HP1α::sctetR auf reprimierende Effekte durch eine tetR-vermittelte Konkurrenz zurückzuführen ist, wurden Plasmide mit verändertem *oriP*, aber ohne Fusionsprotein in Zellen transfiziert, die entweder EBNA1 und EBNA1::tetR oder nur EBNA1::tetR zur Verfügung stellen (Abbildung 3.22). EBNA1::tetR ersetzt die DNA-Binde-Domäne von EBNA1 mit tetR. In beiden Zelllinien sollte die Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) die gleiche Kolonienzahl liefern. Eine Konkurrenz zwischen tetR und EBNA1 würde sich in einem Unterschied dieser beiden Kolonienzahlen zeigen.

Vergleicht man die erhaltenen Kolonienzahlen für den Wildtyp-Zustand in beiden Zelllinien, erkennt man, dass EBNA1::tetR trotzdem zu einem verringerten, aber doch

deutlichen Erhalt des Plasmids führt (Abbildung 3.22, weiße Balken). Dieses Phänomen betrifft nur den Wildtyp und wurde in unserem Labor bereits vorher beobachtet (Pich et al., 2008). Da sich dies im Fall der Teilsubstitutionen nicht zeigte, wurde es als nicht signifikant eingestuft. Im Fall der EBNA1/EBNA1::tetR-Bereitstellung zeigten die Teilsubstitutionen eine reduzierte Kolonienzahl von 3000 auf 2500 Kolonien. Dies kann auf eine Interaktion zwischen EBNA1 und EBNA1::tetR über den N-Terminus des Proteins zurückzuführen sein. EBNA1 bildet Dimere aus und da EBNA1 und EBNA1::tetR zwar dimerisieren aber nicht zusammen funktional agieren können, wirkt sich dies auf die generelle Plasmid-Erhaltung aus. Nur eine der EBNA1-Domänen kann in diesen Heterodimeren bedient werden (Abbildung 3.22, linke Seite).

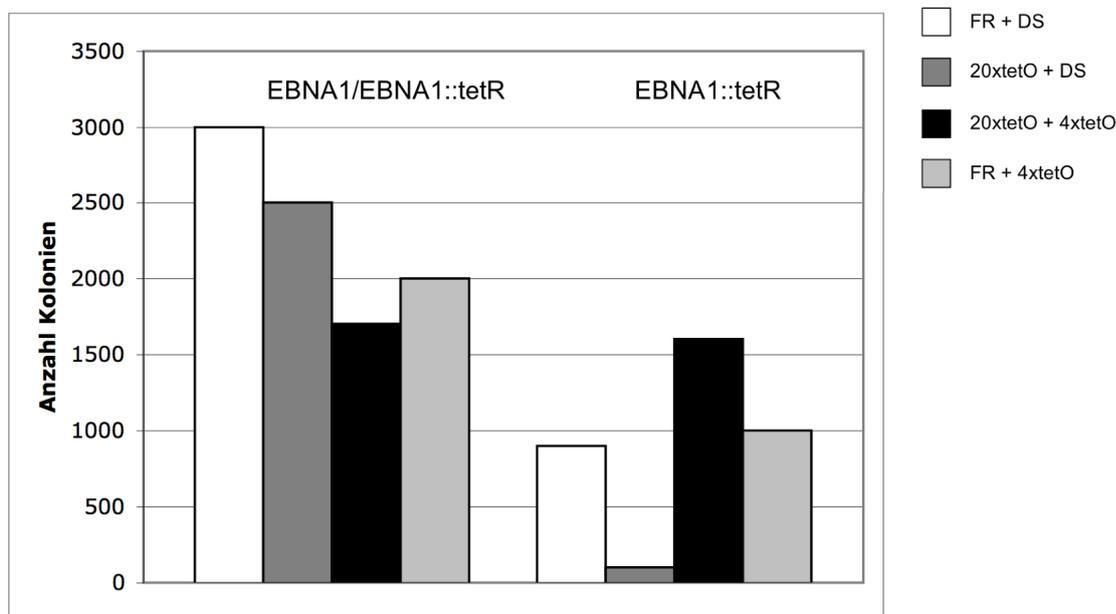


Abb.3.22: Auswertung Plasmid-Rescue-Assay EBNA1/EBNA1::tetR

Links: HEK293-Zellen die sowohl EBNA1 als auch EBNA1::tetR produzieren. Im Vergleich zum Wildtyp (weißer Balken) zeigen Voll- (schwarzer Balken) und Teilsubstitutionen (graue Balken) eine reduzierte Kolonienzahl. Rechts: HEK293-Zellen die nur EBNA1::tetR produzieren. Der Wildtyp zeigt durch residuale EBNA1-Bindung noch eine reduzierte Kolonienzahl. Die Teilsubstitutionen können nur im Fall des 20tetO – DS – Kontexts ausreichende Kolonien ausbilden. Die Vollsubstitution ist im Vergleich zur linken Hälfte unverändert. n=2

Wurde den Teilsubstitutionen nur EBNA1::tetR zur Verfügung gestellt, reduziert sich die Kolonienzahl weiter. Diese Reduktion entsprach bereits früher in unserem Labor gemachten Beobachtungen zur Funktionalität von EBNA1 an FR und DS (Pich et al., 2008). Die Vollsubstitutionen zeigten eine Zelllinien-unabhängige reduzierte Kolonienzahl von 1600 Kolonien (Abbildung 3.22, schwarze Balken). Die Kolonienzahlen unterschieden sich jedoch nicht zwischen den beiden Zelllinien, woraus sich ableiten ließ, dass die Effekte, die für HP1 α ::sctetR beobachtet wurden, nicht durch Konkurrenzeffekte hervorgerufen wurden.

Die Konditionalität des Vektorsystems wurde durch ein Plasmid-Loss-Experiment kontrolliert. Durch Zugabe von Doxycyclin in das Zellkulturmedium ändert die DNA-Binde-Domäne des sctetR ihre Konformation und kann so nicht mehr an die DNA binden (Kleinschmidt et al., 1988). Die von der sctetR-Bindung abhängigen Plasmide werden so über die folgenden Generationen verloren (Abbildung 3.23).

Da die Doxycyclin-Zugabe in Selektionsmarker-freies Medium erfolgte, war ein gewisser natürlicher Plasmidverlust zu erwarten. Die in HEK293-EBNA1 transfizierten Plasmide wurden 0, 3, 5 und 7 Tage nach Doxycyclin-Zugabe dem Plasmid-Rescue-Assay unterworfen und ausgewertet. Hierbei ließ sich der natürliche Plasmidverlust in einer Rate von 3-5 % anhand des Wildtyp-Plasmids (FR – DS) bestimmen. Diese Plasmidverlust-Rate beschreibt den Anteil der Zellen die das Plasmid pro Generation verlieren. Die untersuchten Plasmide zeigten an Tag 0 eine erwartete Anzahl an Kolonien, die mit den bisher beobachteten Größenordnungen gut vergleichbar waren. Die HP1 α ::sctetR-abhängigen Voll- und Teilsubstitutionen zeigten eine deutliche Reduktion der Kolonienzahl um 20 % nach drei Tagen und waren nach 7 Tagen unter Doxycyclin nahezu komplett aus den Zellen verloren worden. Die Plasmidverlust-Raten wurden der von Dani und Zakian verwendeten Formel zur Berechnung der Plasmidstabilität bestimmt (Dani and Zakian, 1983)

Dieses Experiment zeigte, dass die Verfügbarkeit von EBNA1 allein nicht ausreichend ist um die Plasmide über einen längeren Zeitraum zu erhalten und dass die Bindung der Fusionsproteine durch Doxycyclin-Zugabe konditional zu steuern ist.

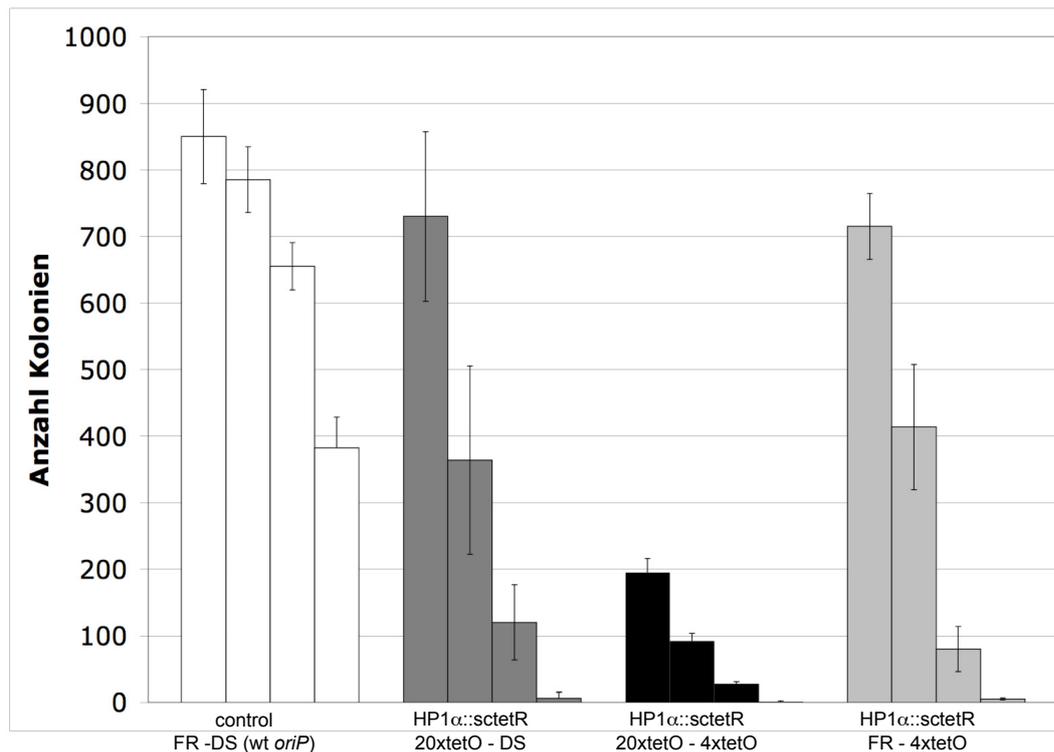


Abb.3.23: Plasmid-Loss-Assay in HEK293-EBNA1

Im Zeitverlauf Tag 0, 3, 5 und 7 nach Zugabe von Doxycyclin in das Medium zeigte das Wildtyp-Plasmid (weiße Balken) eine natürliche Plasmidverlust-Rate von 3-5 % for *oriP*-Plasmide. Die Teilsubstitutionen (graue Balken) und die Vollsubstitution (schwarze Balken) zeigten bereits nach dem ersten Tag deutliche Plasmidverlust-Raten von 20 %. Ein so starker Plasmidverlust war mit dem natürlichen Verlust innerhalb von 7 Tagen vergleichbar. Nach 7 Tagen waren die Plasmide in den Teil- und Vollsubstitution nahezu vollständig verloren worden. n=3

Nachdem sichergestellt worden war, dass die HP1 α ::sctetR-abhängige Plasmid-Retention konditional regulierbar war, wurde untersucht ob die transfizierten Plasmide sich auch in der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus befinden. Dazu wurden HEK293-EBNA1-Zellen mit dem HP1 α ::sctetR-abhängigen Teilsubstitutions-Plasmid (20xtetO – DS) transfiziert und zwei Tage nach der Transfektion dem FiSH-Verfahren im isotonen und hypertonen Zustand unterworfen. Ähnlich zu der Transfektion mit dem miniEBV-Genom p2912 sollte hier die Mehrheit der Plasmide in der perichromatischen Region vorliegen. Das sctetR::HMGA1a-abhängige Vollsubstitutions-Plasmid (20xtetO – 4x tetO) wurde zur Kontrolle ebenfalls in HEK293-EBNA1-Zellen transfiziert und durch FiSH nachgewiesen (Abbildung 3.24).

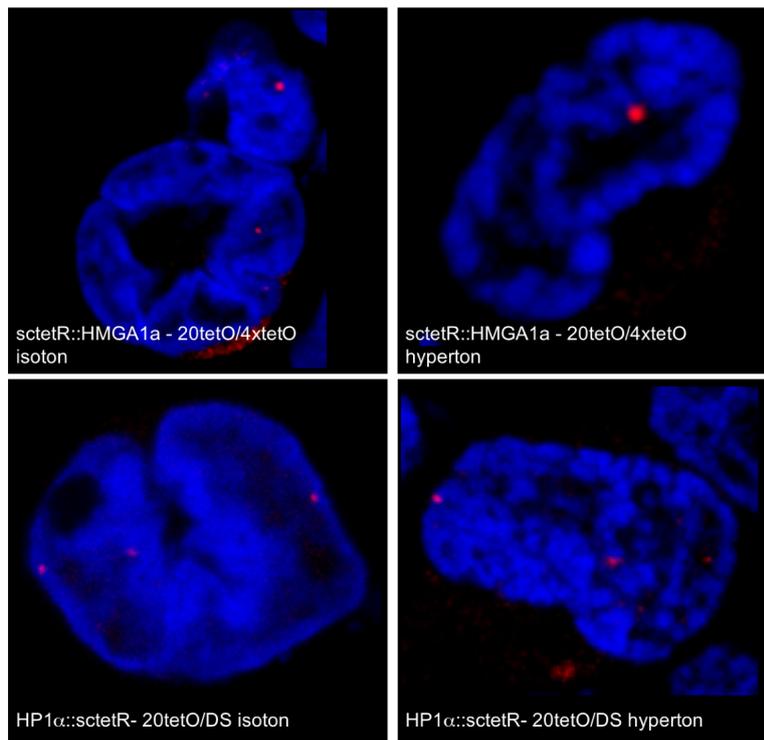


Abb.3.24: pCON-Plasmide lokalisieren in der perichromatischen Region

Einzelbilder aus den entsprechenden Bilderstapeln; DNA-Färbung mit DAPI (blau); pCON-Sonde (rot); im isotonen Zustand (links) zeigen die pCON-Plasmide keine Kolokalisation mit den intensiv gefärbten Chromatin-Domänen. Dies wird im hypertonen Zustand deutlicher und lässt dort eine Einordnung der Plasmide in die perichromatische Region des Interphase-Nukleus zu.

Aus den bisher beschriebenen Experimenten geht hervor, dass HP1 α ::sctetR eine primär retenierenden Rolle an FR besitzt und eine schwache Replikationskompetenz an DS vermittelt. Es ist bekannt, dass HP1 α durch seine Bindung an H3K9me3-Cluster in der Zelle durch Interaktion mit verschiedenen Methyltransferasen zu einer Verbreitung dieser heterochromatischen Histonmodifikation führt (Lomberk et al., 2006). Durch die Bindung von HP1 α ::sctetR an die tetO-Regionen in FR und DS könnte so auch die Histonmodifikation des Plasmids beeinflusst werden. Ob dies an *oriP* geschieht, sollte anhand eines Chromatin-immuno-Präzipitations(ChIP)-Experimentes bestimmt werden.

Zu diesem Zweck wurden Zelllinien generiert welche stabil EBNA1 und sctetR::HMGA1a oder EBNA1 und HP1 α ::sctetR produzieren. Diese Zelllinien wurden dann mit den unterschiedlichen Reporterplasmiden (FR – DS; 20xtetO – DS; 20xtetO – 4xtetO) transfiziert und nach zwei Wochen unter Selektion dem ChIP-

Protokoll unterworfen. Zum Vergleich wurden hier ebenfalls die bereits in der Assoziationscharakterisierung von EBV betrachteten Histontrimethylierungen H3K4me3, H3K9me3 und H3K27me3 analysiert (Abbildung 3.25).

Die hier zu beobachtenden Histonmodifikationen des EBNA1-abhängigen Wildtyp-Plasmids veränderten sich bei den Fusionsprotein-abhängigen Plasmiden. Die Trimethylierung von H3K9 stieg in HP1 α ::sctetR-abhängigen Plasmiden um das sechs- bis zehnfache an (Abbildung 3.25, weiße Balken). Die an Wildtyp-*oriP* vertretene H3K4-Trimethylierung war nur in der HP1 α ::sctetR-abhängigen Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) zu beobachten (Abbildung 3.25, dunkelgraue Balken). Die höchste Anreicherung von H3K9me3 war in der HP1 α ::sctetR-abhängigen Teilsubstitution (20x tetO – DS) zu beobachten. Die sctetR::HMGA1a-abhängige Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) zeigt keine dominante Histonmodifikation am *oriP*-Lokus.

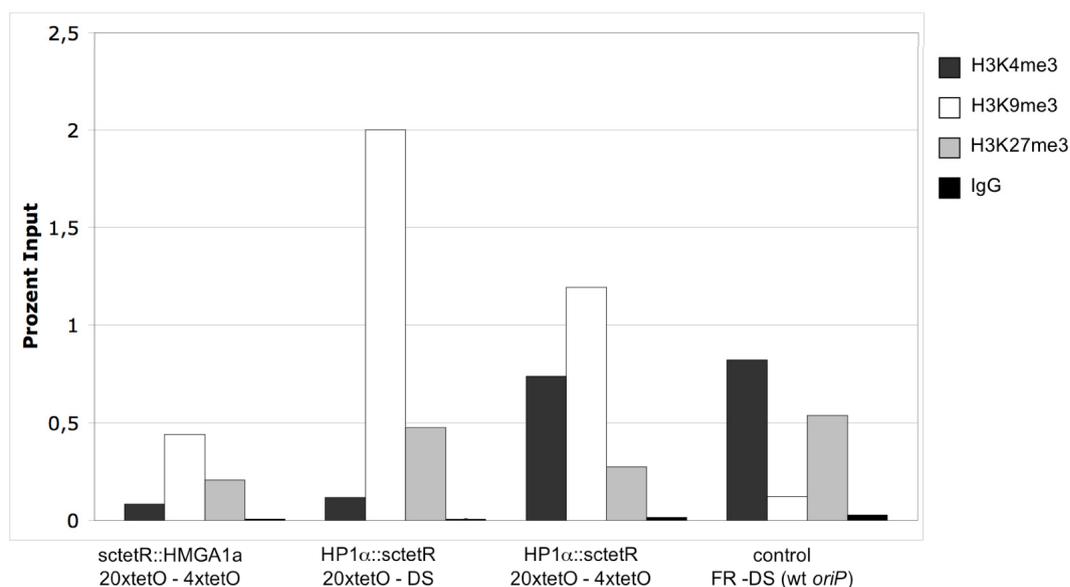


Abb. 3.25: Anreicherung von H3K9me3 an HP1 α ::sctetR-abhängigen pCON-Plasmiden
Im Vergleich zu den am Wildtyp-*oriP* vorhandenen Histonmodifikationen zeigte sich in HP1 α ::sctetR-abhängigen Plasmiden eine 6-10-fache Anreicherung von H3K9me3 (weiße Balken). Mit dem Anstieg dieses heterochromatischen Kennzeichens sinkt das euchromatische Kennzeichen H3K4me3 (dunkelgraue Balken). Plasmide in Abhängigkeit von sctetR::HMGA1a zeigen keine dominante Histonmodifikation am *oriP*-Lokus mehr. n=2

Die Bindung von HP1 α ::sctetR an FR und/oder DS führt zu einer Erhöhung der H3K9-Trimethylierung am *oriP*-Lokus. Die Ausweitung der heterochromatischen Histonmodifikation kann sich so auf die Chromatin-Struktur auswirken und die Replikation behindern. Dadurch kommt es zu einer schlechteren Etablierung der Plasmide im Vergleich mit nicht heterochromatischen Fusionsproteinen wie sctetR::HMGA1a.

Obwohl der heterochromatische Charakter in der Teilsubstitution (20xtetO – DS) stärker war, kann hier durch die Präsenz von EBNA1 eine Plasmid-Etablierung auf Wildtyp-Niveau vermittelt werden. Welcher Mechanismus dem zu Grunde liegt ist bislang unklar.

In diesem Experiment zeigte sich, dass die Wahl des Fusionsproteins sich auf die Etablierungs-Effizienz des Genvektors auswirkt. HP1 α zeigt eine schwache Replikationskompetenz in der Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO). In den folgenden Kapiteln soll untersucht werden wie diese Replikationskompetenz vermittelt wird und ob es möglich ist, ein auf HP1 α -basierendes Fusionsprotein zu generieren das nur die Retention vermittelt. So wäre eine funktionale Trennung der Replikation und der Retention auf dem Genvektor möglich.

3.2.3 *HP1 α interagiert mit Orc5 und Orc6*

Da bekannt war, dass HP1 α in *D.melanogaster* mit ORC interagiert (Pak et al., 1997), sollte dies auch in humanen Zellen überprüft werden. Zunächst sollte eine systematische Interaktionsanalyse zwischen HP1 α und ORC klären, mit welchen Untereinheiten des origin-recognition-complex (ORC) diese Interaktion stattfindet. Im weiteren Verlauf sollte dann überprüft werden ob bestimmte Domänen von HP1 α für die Interaktion mit den ermittelten Orc-Untereinheiten verantwortlich ist. Diese Fragen wurden durch Bimolekulare-Fluoreszenz-Komplementations(BiFC)-Experimente beantwortet.

Die Technik der Bimolekularen-Fluoreszenz-Komplementation(BiFC) ermöglicht die Visualisierung von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden oder fixierten Zellen. Das zuerst von Hu und Kerpolla beschriebene Verfahren basiert auf der Interaktion zweier markierter Proteine. Dazu wurde das Protein Fos mit dem C-terminalen Fragment des YFP-Proteins (YC) fusioniert. Die an Fos bindende Kinase Jun wurde mit dem N-terminalen Fragment des YFP-Proteins (YN) fusioniert. Jedes Protein wurde zusätzlich noch mit einem HA- oder FLAG-Tag versehen um auch mittels Antikörper-Detektion nachgewiesen werden zu können. Wenn die beiden Proteine nun in der lebenden Zelle interagieren, verbinden sich die beiden YFP-Fragmente und ergeben nach einer kurzen Reifezeit ein funktionsfähiges YFP-Protein, das durch Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.26). Die Aufnahmen können sowohl in lebenden Zellen als auch in fixierten Zellen gemacht werden. In fixierten Zellen besteht zudem noch die Möglichkeit, die Expression der einzelnen Proteine durch anti-HA- und anti-FLAG-Antikörper nachzuweisen (Hu et al., 2002). Die von Hu und Kerpolla verwendete Kombination Fos-YC und Jun-YN wurde in unseren Experimenten als Positivkontrolle verwendet.

Die verschiedenen Untereinheiten von ORC wurden mit dem C-terminalen Fragment des YFP-Proteins (YC) fusioniert. HP1 α wurde mit dem N-terminalen Fragment des YFP-Proteins (YN) fusioniert. Zusätzlich erhielten beide Proteine einen HA- bzw. FLAG-Tag. Die Konstrukte wurden anschließend in HepG2-Zellen transfiziert und nach 24 Stunden mit dem Konfokal-Mikroskop aufgenommen (Abbildung 3.27). Hier zeigte sich eine deutliche Interaktion von HP1 α mit Orc5 und Orc6. Eine Interaktion des Proteins mit anderen Untereinheiten des ORC konnte nicht beobachtet werden.

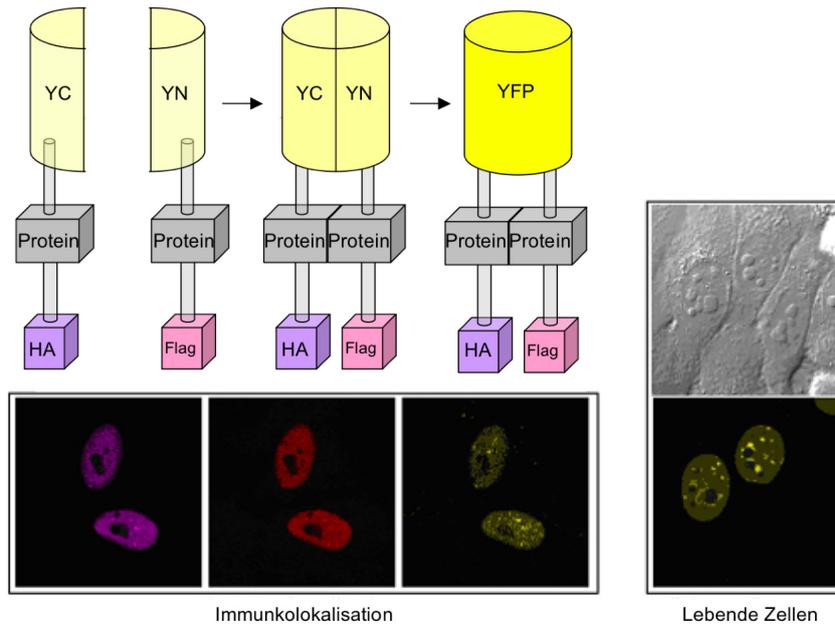


Abb. 3.26: Schematische Darstellung Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Mit YC und YN fusionierte Proteine lassen durch ihre Interaktion als Protein-Protein-Komplex die beiden Hälften des YFP-Proteins binden und nach einer kurzen Reifezeit ist ein voll funktionstüchtiges YFP gereift. Ein gelbes Fluoreszenz-Signal entsteht. Durch den HA-Tag (violett) und den FLAG-Tag (rot) können beide Proteine auch getrennt in der Immunfluoreszenz in fixierten Zellen nachgewiesen werden. Die hier gezeigten Aufnahmen sind mit der Fos-YC/Jun-YN-Kontrolle durchgeführt worden (Hu et al., 2002).

Um Aufschluss auf die Interaktions-Domäne von HP1 α mit Orc5 (Abbildung 3.28) und Orc6 (Abbildung 3.29) zu erhalten, wurden weitere BiFC-Experimente unternommen. Durch die Kenntnis der Interaktions-Domänen würde es später möglich sein auf die HP1 α -abhängige Replikation von pCON-Vektoren Einfluss zu nehmen. Die Replikation könnte z. B. durch Deletion der entsprechenden Domänen unterbunden werden um nur die Retentions-Funktion des Proteins zu nutzen. Für die BiFC-Experimente wurden die Domänen von HP1 α , die Chromo-Domäne (CD), die Hinge-Region und die Chromoshadow-Domäne (CSD), einzeln oder in Kombination mit dem YN-Fragment fusioniert. 24 Stunden nach der Transfektion in HepG2-Zellen wurden diese mit dem Konfokal-Mikroskop aufgenommen. Hier zeigte sich, dass HP1 α über die Hinge-Region mit Orc5 interagiert. Auch mit Orc6 interagiert HP1 α primär über die Hinge-Region. Diese Interaktion zeigte sich für Orc5 und Orc6 auch in HP1 α -Domän-Kombinationen welche die Hinge-Region beinhalteten.

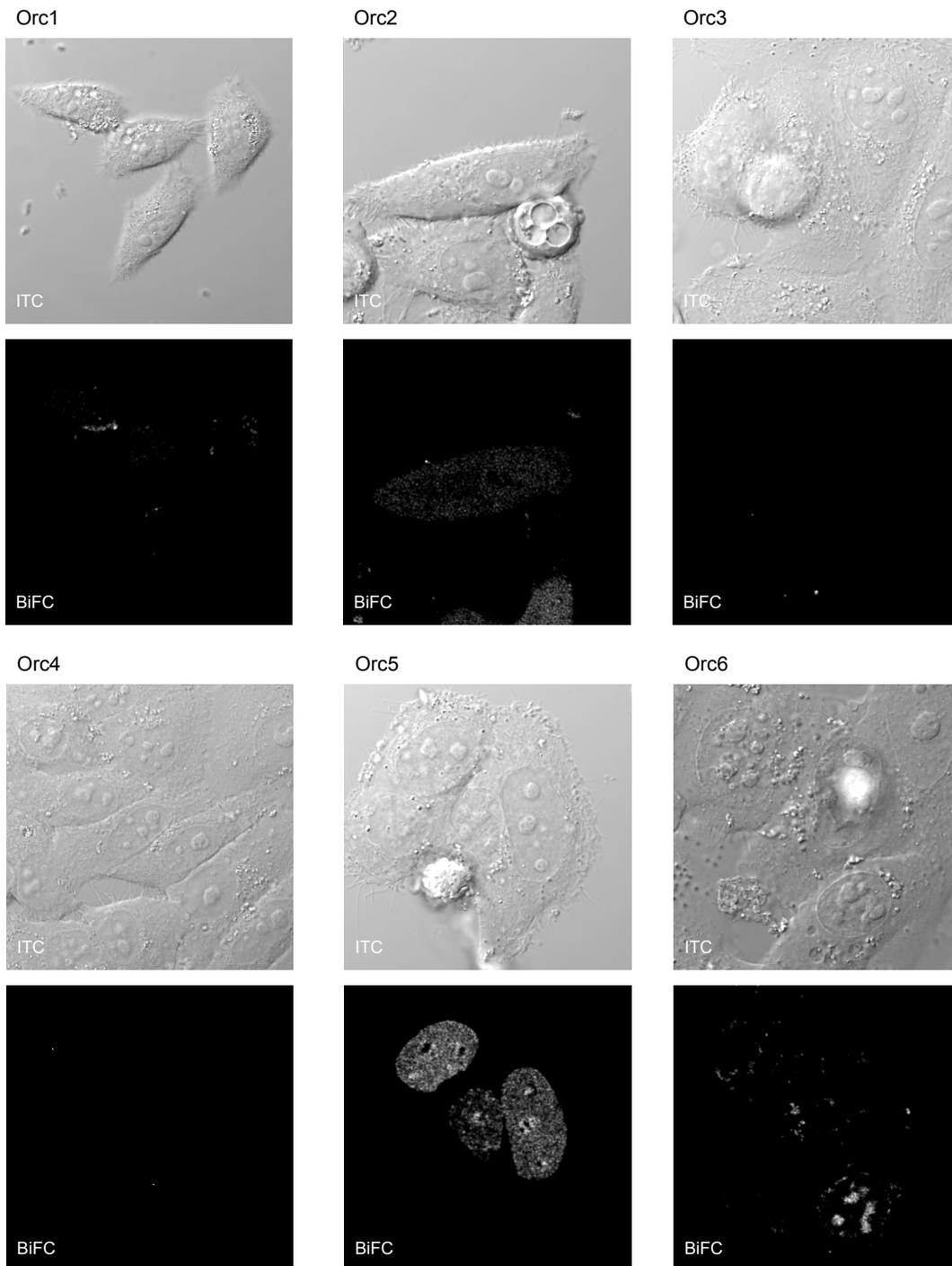


Abb.3.27: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen den ORC-Untereinheiten und HP1 α

BiFC-Aufnahmen der einzelnen Untereinheiten von ORC zusammen mit HP1 α in HepG2-Zellen; die Interferenzkontrast-Aufnahmen (ITC) dienen dazu, darzustellen, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Aufnahme lebendig waren und eine normale Zellmorphologie besaßen. Ein positives BiFC-Signal gibt es nur für die Interaktion von HP1 α und Orc5 bzw. HP1 α und Orc6.

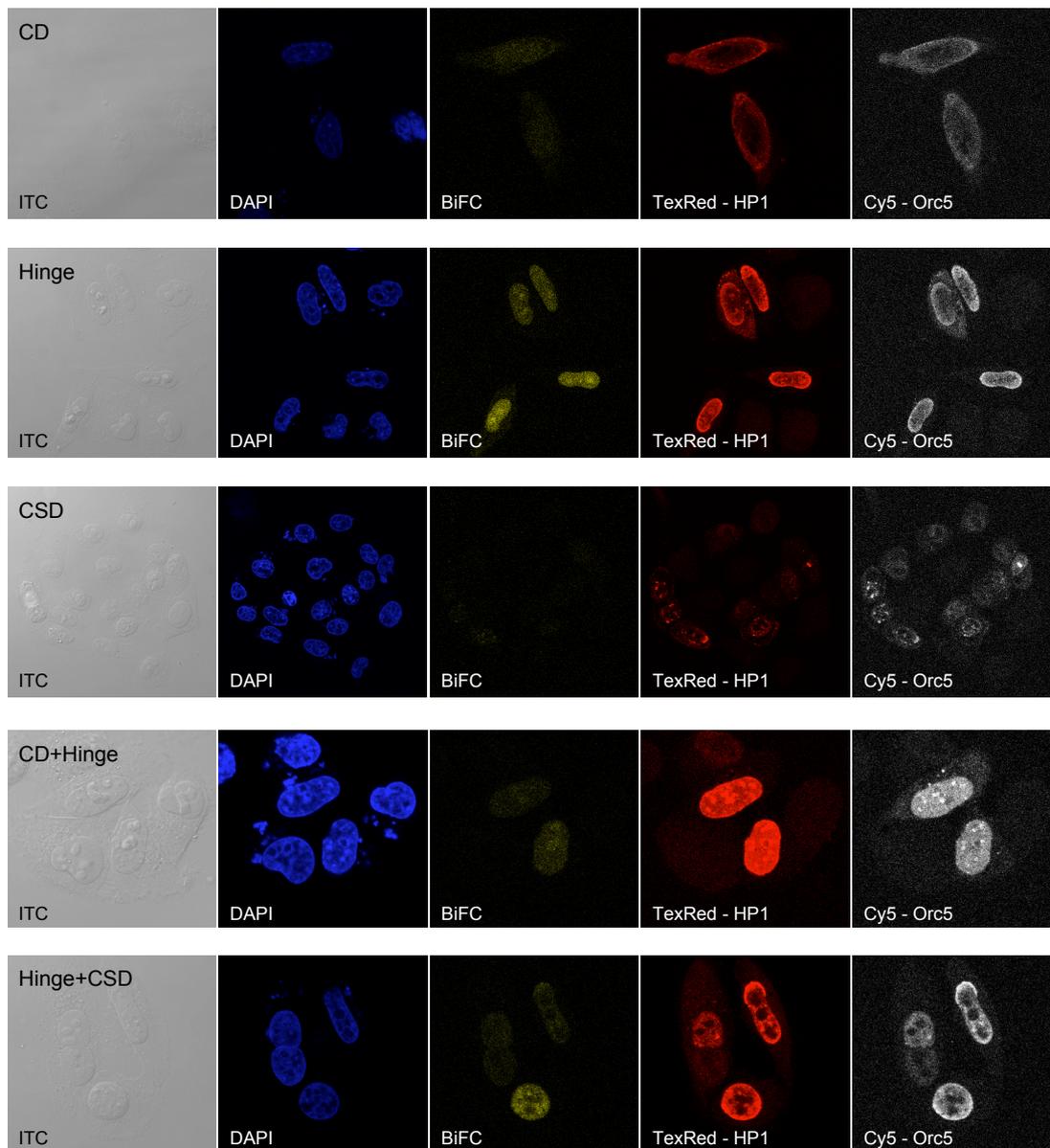


Abb.3.28: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen Orc5 und den HP1 α -Domänen

BiFC-Aufnahmen der einzelnen Domänen von HP1 α zusammen mit ORC5 in HepG2-Zellen; neben der ITC-Aufnahme wurde noch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die einzelnen HP1 α -Domänen (rot) und Orc5 (weiß) durchgeführt um ihre Expression nachzuweisen. Ein BiFC-Signal (gelb) für Interaktion zeigte sich für Hinge, CD+Hinge und CSD+Hinge. Ein schwaches BiFC-Signal ist für die Interaktion mit CD zu erkennen.

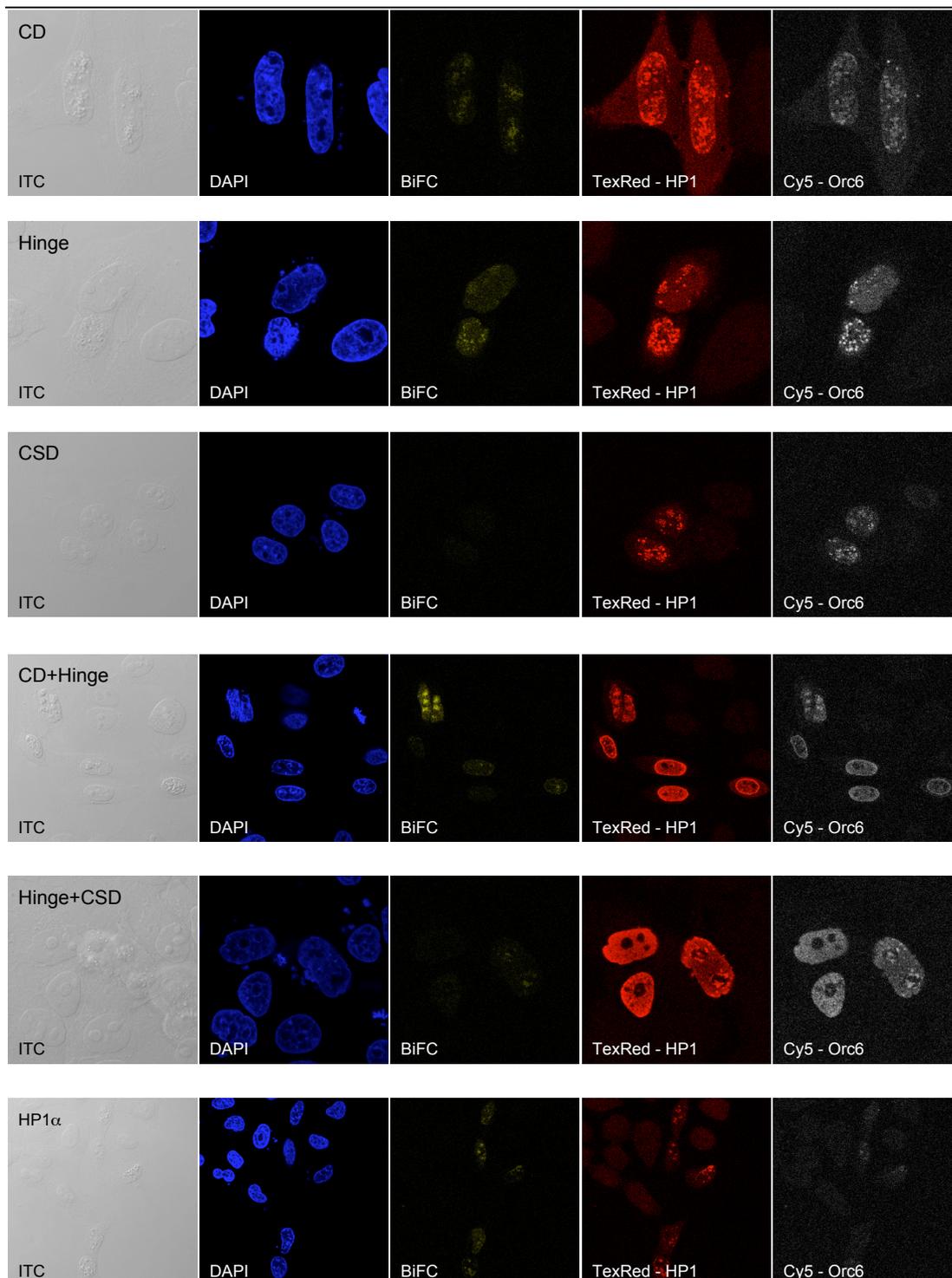


Abb.3.29: Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation zwischen Orc6 und den HP1 α -Domänen

BiFC-Aufnahmen der einzelnen Domänen von HP1 α und dem Gesamt-Protein HP1 α zusammen mit ORC5 in HepG2-Zellen; neben der ITC-Aufnahme wurde noch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen die einzelnen HP1 α -Domänen (rot) und Orc6 (weiß) durchgeführt um ihre Expression nachzuweisen. Ein BiFC-Signal (gelb) für Interaktion zeigte sich für Hinge, CD+Hinge, CSD+Hinge und das Gesamt-Protein. Ein schwaches BiFC-Signal ist für die Interaktion mit CD zu erkennen.

Aus den BiFC-Experimenten geht hervor, dass die maßgebliche Interaktions-Domäne für die Interaktion mit ORC die Hinge-Region ist. Die Chromo-Domäne (CD), welche H3K9me3-Cluster in der Zelle erkennt und bindet, zeigt nur ein schwaches BiFC-Signal wenn sie als Einzeldomäne mit Orc5 oder Orc6 interagiert. Die Chromoshadow-Domäne (CSD), welche für die Interaktion von HP1 α mit anderen Proteinen des Heterochromatins zuständig ist, zeigt als Einzeldomäne kein BiFC-Signal mit Orc5 und Orc6. Die Hinge-Region allein zeigt ein deutliches Interaktionssignal und vermag auch in Kombination mit den anderen Domänen eine Interaktion mit Orc5 und Orc6 zu vermitteln.

Eine Deletion dieser Domäne könnte einen Verlust der HP1 α -vermittelten Replikationskompetenz auslösen und so die funktionale Trennung von Retention und Replikation in pCON ermöglichen. Wie wichtig die Hinge-Region für andere Funktionen von HP1 α , wie z. B. der Chromatin-Assoziation, ist, wurde bisher nicht untersucht.

3.2.4 Die HP1 α -abhängige Replikation wird von der funktionsfähigen Chromoshadow-Domäne negativ beeinflusst

Nachdem die Hinge-Region als die wesentliche Interaktions-Domäne von HP1 α und ORC bestimmt wurde, sollte untersucht werden ob die Verwendung einer einzelnen Domäne oder einer Kombination dieser Domänen die Replikationskompetenz vermittelt. Dazu wurde eine funktionelle Analyse mittels des Plasmid-Rescue-Assays durchgeführt. Unterschiedliche Kombinationen aus den einzelnen Domänen von HP1 α wurden für das pCON-System kloniert (Abbildung 3.30). Die so erhaltenen Fusionsproteine bestehen entweder nur aus den einzelnen Domänen oder besitzen im Fall von Δ CD::sctetR und Δ CSD::tetR noch die nicht für die Bildung der Domänen verwendeten Residualbasen des Proteins (AS 1-20; AS 179-191).

Die Fusionsproteine wurden, analog zu den mit dem vollständigen Protein durchgeführten Experimenten, im Kontext der Vollsubstitution (20xtetO – 4xtetO) und der FR-abhängigen Teilsubstitution (20xtetO – DS) eingesetzt. Die so erhaltenen Plasmide wurden gemäß des Plasmid-Rescue-Assays in HEK293-EBNA1-Zellen transfiziert und für zwei Wochen unter Selektion gehalten. Danach wurde wie in den

vorangegangenen Experimenten die extrachromosomale Plasmid-DNA aufgereinigt und in elektrokompente Bakterien transformiert.

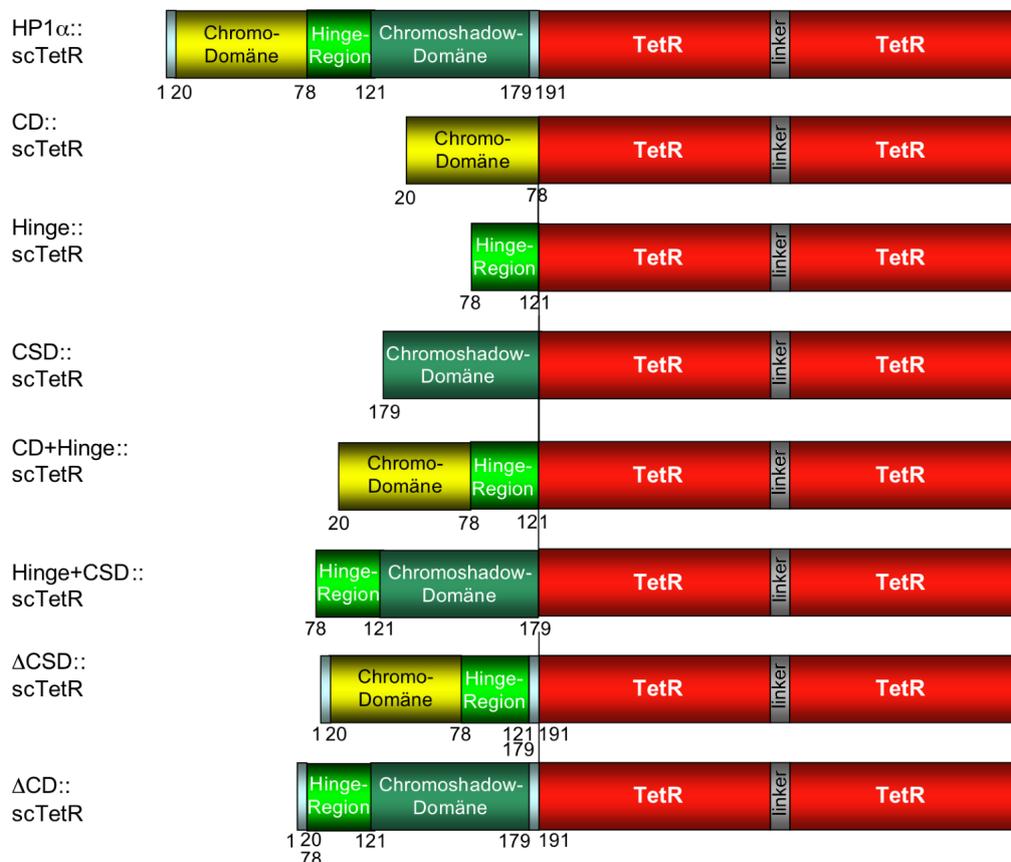


Abb. 3.30: Schematische Darstellung der HP1 α -Domän-Mutanten

Um die Vermittlung der Replikationskompetenz durch HP1 α einer bestimmten Domäne zuordnen zu können, wurden für das pCON-System verschiedene Domänenkombinationen mit *scTetR* fusioniert. Dazu wurden die Chromo-Domäne (CD, gelb, AS 20 - 78), die Hinge-Region (grün, AS 78 - 121), die Chromoshadow-Domäne (CSD, dunkelgrün, AS 121 - 179) sowie die nicht an der Domänenbildung beteiligten Reste (hellblau, AS 1-20, AS 179-191) in unterschiedlichen Kombinationen verwendet.

Die Auswertung der Plasmid-Rescue-Assays der Vollsubstitution (20x tetO - 4xtetO, Abbildung 3.31) zeigte, dass durch die Deletion der Chromoshadow-Domäne (Δ CSD::*scTetR*) aus dem Gesamt-Protein die Kolonienzahl wieder auf das Wildtyp-Niveau angehoben wird. Auch eine Deletion der Chromo-Domäne (Δ CD::*scTetR*) und die Verwendung von H+CSD::*scTetR* führen zu einer starken Erhöhung der Kolonienzahl. Dies kann zu einem Funktionsverlust der CSD durch das Fehlen der

CD führen. Beide Domänen beeinflussen ihre Funktionalität und da H::sctetR eine vergleichbare Kolonienzahl wie CD+H::sctetR und h+CSD::tetR liefert, ist davon auszugehen, dass die Hauptinteraktion weiterhin von der Hinge-Region abhängt. Die Chromo-Domäne (CD::sctetR) allein zeigt keine Replikationskompetenz. Die Chromoshadow-Domäne allein zeigt eine deutlich reduzierte Replikationskompetenz. Bei der Verwendung von Domänen-Kombinationen aus der Hinge-Region und der Chromo-Domäne oder der Chromoshadow-Domäne zeigte sich ein additiver Effekt in der Replikationskompetenz.

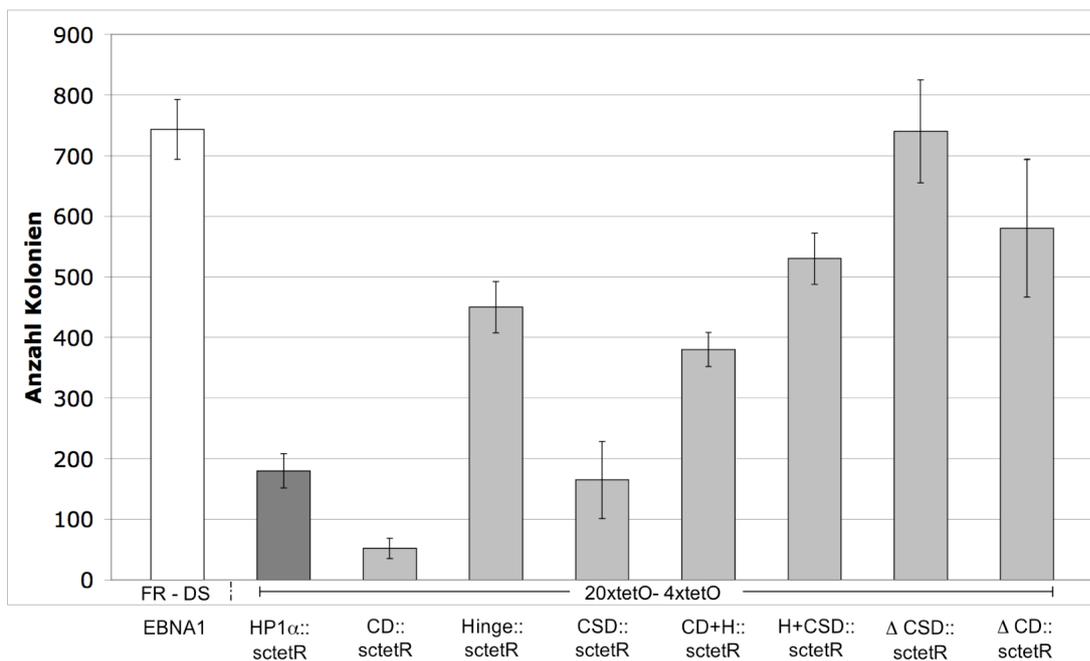


Abb.3.31: Auswertung Plasmid-Rescue-Assay HP1 α -Domän-Mutanten in der Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO)

Im Kontext der Vollsubstitution zeigt CSD::tetR keine Replikationskompetenz-Steigerung; H::sctetR, CD+H::sctetR und H+CSD::tetR zeigten eine Verbesserung der Replikationskompetenz mit einem additiven Effekt in den Domän-Kombinationen; Δ CSD::tetR und Δ CD::tetR zeigten Replikation auf Wildtyp-Niveau. CD::sctetR vermittelt keine Replikationskompetenz mehr. n=3

Die Auswertungen der Plasmid-Rescue-Assays für die Teilsubstitution (20x tetO – 4x tetO) zeigten in den meisten Fällen die durch EBNA1-Bindung an DS zu erwartende Steigerung der Kolonienzahl (Abbildung 3.32). Die Chromo-Domäne (CD::sctetR) vermittelt allein eine gute Retention, die Hinge-Region (H::sctetR) und die Chromoshadow-Domäne (CSD::sctetR) hingegen vermitteln allein keine

Retention auf Wildtyp-Niveau. Dies wird durch ihre im Vergleich zur Chromo-Domäne schwächere Assoziationsfähigkeit mit Chromatin begründet (Lomberk et al., 2006). Durch das EBNA1-vermittelte Erreichen des Wildtyp-Etablierungsniveaus für CD::sctetR zeigt sich, im Vergleich zu den Daten der Vollsubstitution, dass hier erstmals eine klare Trennung der Replikationskompetenz von der Retention erzielt wurde.

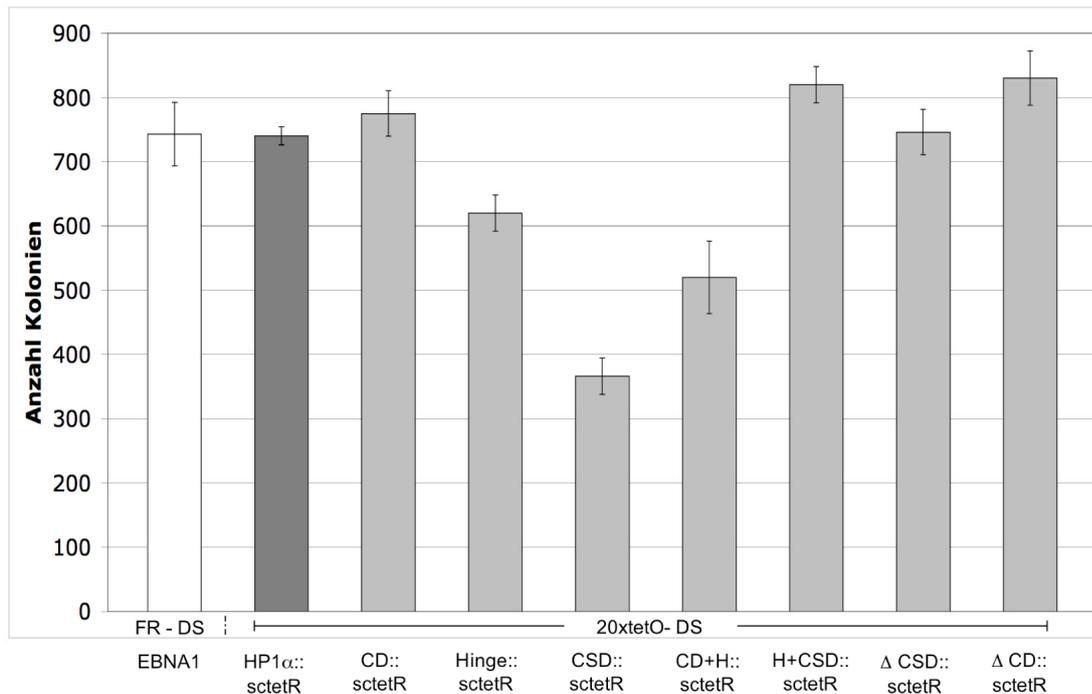


Abb.3.32: Auswertung Plasmid-Rescue-Assay HP1 α -Domän-Mutanten in der Teilsubstitution (20x tetO – DS)

Im Kontext der Teilsubstitution zeigten HP1 α ::tetR, CD::tetR, H+CSD::tetR, Δ CSD::tetR und Δ CD::tetR Kolonienanzahl auf Wildtyp-Niveau. H::tetR, CSD::tetR und CD+H::tetR zeigten eine niedrigere Kolonienanzahl. Dies ist in einer schlechteren Retentionseffizienz der beiden Domänen begründet. Es zeigte sich, im Vergleich zu den Daten der Vollsubstitution, dass CD::sctetR keine Replikationskompetenz mehr vermittelt, aber eine gute Retention vermittelt. n=3

4. Diskussion

In der Entwicklung gentherapeutisch nutzbarer extrachromosomaler Vektoren liegt das Hauptaugenmerk auf der Fähigkeit des Vektors zuverlässig in der Wirtszelle repliziert zu werden (Replikation) und in der stabilen Kernständigkeit des Vektors in der Wirtszelle (Retention). Weitere Aspekte sind die zuverlässige Weitergabe des Vektors an die Tochterzellen (Segregation) und eine kontrollierte, konditionale Transgenexpression des Vektors.

Eines der vielversprechendsten Modellsysteme für die Entwicklung eines Genvektors der die genannten Kriterien erfüllt ist das Epstein-Barr Virus (EBV). EBV bietet eine ideale Ausgangsposition, da es sich als extrachromosomales Replikon etabliert und einmal pro Zellzyklus ausschließlich durch zelluläre Proteine zusammen mit der Wirtszell-DNA repliziert wird. Durch die Assoziation der Virus-Genome an die Wirtszell-Chromosomen werden diese in der Mitose in „Huckepack“-Manier an die Tochterzellen weitergegeben.

Ziel dieser Arbeit war es, die Kern-Lokalisation von EBV-Genomen und abgeleiteter extrachromosomaler Replikons zu untersuchen. Durch die Immunfluoreszenz-Kolokalisations-Studien sollten epigenetische Parameter, die an der erfolgreichen Etablierung extrachromosomaler Replikons beteiligt sind, identifiziert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss der latente Replikationsursprung von EBV, *oriP*, auf diese Lokalisation hat und die Rolle der einzelnen *oriP*-Elemente sollte ermittelt werden. Die viralen Komponenten dieses Systems sollten durch zelluläre Proteine ersetzt werden, um eine funktionale Trennung zwischen Replikation und Retention zu erreichen. Durch die Verwendung verschiedener Proteine für die Retentionsvermittlung konnten unterschiedliche Lokalisationsmöglichkeiten im Nukleus untersucht werden. Die Konditionalität des verwendeten Vektorsystems pCON wurde in Plamid-Loss-Experimenten gezeigt. Die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse zu der vorgestellten Zielsetzung werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.1 EBV lokalisiert in euchromatischen Bereichen der perichromatischen Region in Interphase-Nuklei

Das 172 kbp große EBV-Genom bindet durch seinen viralen *trans*-Faktor EBNA1 an die DNA der Wirtszelle (Mackey and Sugden, 1997). Diese Bindung vermittelt die stabile Retention der Virus-Genome im Zellkern der Wirtszelle und ist notwendig für die zuverlässige Segregation der Virusgenome auf die Tochterzellen (Nanbo et al., 2007; Sears et al., 2003). Einige Studien befassen sich mit der Verteilung von EBV in der Mitose (Kanda et al., 2001a; Kanda et al., 2001b), aber die Lokalisation von EBV in der Interphase wurde bisher nur unzureichend beschrieben. Eine Kolo­kalisierung der Virus-Genome mit ihrem *trans*-Faktor EBNA1 wurde erstmals 2007 in Interphase-Nuklei beschrieben (Kanda et al., 2007).

Die genaue Lokalisation von EBV im Interphase-Nukleus wurde in dieser Arbeit durch ein Kombinationsverfahren aus Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Neben der Assoziation von EBV mit Zentren nukleärer Aktivität, wie z. B. Transkriptionsfoci oder Replikationsfoci, wurde auch die Assoziation von EBV mit epigenetischen Faktoren, wie z. B. Histonmodifikationen, untersucht. Es wurde gezeigt, dass EBV in euchromatischen Bereichen perichromatischer Regionen lokalisiert, wo es mit seinem *trans*-Faktor EBNA1 kolokalisiert (siehe Kapitel 3.1.2-3.1.4). Diese Kernregion zeichnet sich durch ihren dekondensierten Chromatin-Zustand aus, der es den in der Interchromatin-Domäne vorhandenen Proteinen ermöglicht, mit dem Chromatin zu interagieren (Cremer et al., 2004; Visser et al., 2000). Durch die Lokalisation des Virus in dieser Region erhält es leichten Zugang zu den zellulären Faktoren, die es für seine Replikation und Transkription benötigt. Eine Assoziation mit Bereichen des fakultativen Heterochromatins (H3K9me3) ist nur in wenigen Fällen zu beobachten und daher vernachlässigbar. Interessanterweise zeigt EBV durch seine hohe Assoziation mit H3K4me3-Regionen eine Lokalisation, die sich durch ihren positiven Einfluss auf die Expression von integrierten Transgenen auszeichnet (Yan and Boyd, 2006). Dieser Umstand könnte für die erfolgreiche Etablierung der EBV-Genome wichtig sein und unterstreicht die Notwendigkeit einer epigenetischen Charakterisierung möglicher Genvektoren. Da EBV durch seine Pathogenität nicht selbst als Genvektor verwendet werden kann, nutzen EBV-basierte Genvektoren den latenten Replikationsursprung

oriP als *cis*-Element (Conese et al., 2004). Daher wurde untersucht, ob die für EBV beobachtete Lokalisation durch den latenten Replikationsursprung vermittelt werden kann und welche Rolle die beiden Komponenten von *oriP*, DS und FR, dabei spielen.

4.2 Der Einfluss von *oriP* auf die Lokalisation EBV-basierender Genome

Der Einfluss von *oriP* und seiner Elemente wurde in miniEBV-Genomen untersucht. In miniEBV-Genomen findet, im Gegensatz zu Gesamt-EBV-Genomen, die Replikation primär von *oriP* aus statt. Dies erlaubt es, den Einfluss von *oriP* besser zu untersuchen. Die nur 82 kbp großen Genome tragen nur die latenten Gene von EBV. Durch Plasmid-Rescue-Experimente mit Deletions-Mutanten für DS, FR oder *oriP* konnte gezeigt werden, dass FR für die Funktionalität und Lokalisation EBV-basierender Genome eine zentrale Rolle spielt (Kapitel 3.1.5). Die Deletion dieses Elements hatte zur Folge, dass die perichromatische Lokalisation dieser miniEBV-Genome im Vergleich zu Wildtyp-miniEBV-Genomen um 50 % reduziert war. miniEBV-Genome, die kein FR-Element oder kein *oriP* besaßen, waren nicht in der Lage primäre B-Zellen zu transformieren. Die Bedeutung von FR für die Etablierung zeigte sich auch in Studien zur Segregation EBV-basierender Genome an mitotischen Chromosomen (Kanda et al., 2001b). Hier wurde gezeigt, dass die Bindung von EBNA1 an FR und nicht an DS notwendig für die Segregation ist.

Die Deletion von DS zeigte keinen Effekt auf die perichromatische Lokalisation der miniEBV-Genome, wirkte sich aber auf die Assoziation der miniEBV-Genome mit heterochromatischen Histonmodifikationen aus. miniEBV-Genome zeigten eine generell höhere Assoziation mit der heterochromatischen Histonmodifikation H3K27me3 als EBV-Gesamtgenome. Die bevorzugte Assoziation mit H3K4me3-Regionen blieb aber erhalten. Die hohe Assoziation mit H3K4me3-Regionen zeigt sich auch in CHIP-Experimenten an *oriP* in verschiedenen EBV-tragenden Zelllinien (Day et al., 2007). Dort treten H3K4me3-modifizierte Histone verstärkt an *oriP* auf. In diesen Experimenten zeigte sich auch, dass das Ausmaß der H3K27- und H3K9-Trimethylierung von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich ist. Von diesem Standpunkt

ausgehend ist eine unterschiedliche Assoziation von miniEBV-Genomen im Wildtyp-Zustand mit H3K9me3- oder H3K27me3-Regionen nicht unerwartet.

Die Deletion von DS zeigte eine im Vergleich zum Wildtyp um 13 % erhöhte Assoziation mit H3K27me3-Bereichen in der perichromatischen Region. Da sich die Bereiche für H3K4-Trimethylierung und H3K27-Trimethylierung im Interphase-Nukleus überlappen (Zinner et al., 2006), wirkt sich die höhere H3K29me3-Assoziation nicht auf die H3K4me3-Assoziation aus. Durch welchen Mechanismus diese Lokalisationsveränderung vermittelt wird, ist bislang unbekannt.

Die strukturelle Integrität von *oriP* hat keinen Einfluss auf die Lokalisation von miniEBV-Genomen. Das räumliche Trennen der beiden *oriP*-Elemente durch 30 kbp führte zu keiner Veränderung in der durch sie vermittelten Transformation von primären B-Zellen und wirkte sich nicht auf die perichromatische Lokalisation der miniEBV-Genome aus. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der von Reisman 1985 gemachten Beobachtung an *oriP*-Plasmiden. Hier verursachte die Insertion von 4,6 kbp eine Inaktivierung der Plasmide und führte dazu, dass die Zellen nicht erfolgreich mit den Plasmiden transfiziert werden konnten (Reisman et al., 1985). Ein derartiges Phänomen trat in den mit miniEBV-Genomen durchgeführten Experimenten nicht auf. Allerdings zeigte sich, dass eine Veränderung der Integrität von *oriP* in einer reduzierten Kopienzahl des Plasmids in den etablierten Zelllinien führt (Deutsch et al., 2009).

Es ist möglich, dass im Kontext des 82 kbp großen Vektors die ektopische Verschiebung der *oriP*-Komponenten ausgeglichen wird. Dies könnte durch Remodelling-Aktivitäten erreicht werden, welche die ektopisch getrennten Elemente von *oriP* wieder näher zueinander positioniert. In einem kleineren, plasmidalen Vektorhintergrund könnte dies nicht möglich sein.

4.3 Die Bedeutung der EBV-Lokalisation für die Entwicklung gentherapeutischer Vektoren

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zur Lokalisation deuten darauf hin, dass das epigenetische Umfeld einen entscheidenden Einfluss auf die Etablierung extrachromosomaler Replikons hat. Gentherapeutische Vektoren sind, so wie alle extrachromosomalen Systeme, diesem Einfluss ebenso unterworfen wie die viralen Systeme auf denen sie basieren. Derzeit gibt es verschiedene Vektorsysteme, die Viren als Grundlage verwenden, wie z. B. EBV-basierende Systeme, Adeno-associated-Virus-basierende Systeme oder Adenovirus-basierende Systeme (Ehrhardt et al., 2008). Eine epigenetische Charakterisierung dieser Vektorsysteme könnte entscheidende Anhaltspunkte für deren Weiterentwicklung liefern.

Die bevorzugte Lokalisation in H3K4me₃-Bereichen der perichromatischen Region des Interphase-Nukleus zeigen sowohl EBV-Gesamtgenome als auch miniEBV-Genome. Beide zeigen auch, dass eine Assoziation mit H3K9me₃-Bereichen entweder gemieden wird (EBV-Gesamtgenome) oder nicht bevorzugt stattfindet (miniEBV-Genome). Dieses Verhalten wurde auch für ein anderes episomales Genvektorsystem, pEPI, beobachtet (Stehle et al., 2007) und lässt vermuten, dass die für EBV gemachten Lokalisationsbeobachtungen für die generelle Entwicklung und Etablierung extrachromosomaler Vektoren von Bedeutung sind.

Die in dieser Arbeit beschriebene Assoziation mit den Histonmodifikationen an H3K4me₃ und H3K9ac spiegelt sich auch in den vorherrschenden Histonmodifikationen an *oriP* in verschiedenen EBV-tragenden Zelllinien wider (Day et al., 2007). Hier wurde durch ChIP-Experimente gezeigt, dass *oriP* in allen untersuchten Zelllinien eine deutliche Anreicherung an H3K4me₃ und H3K9ac besaß. Dies zeigt einen Zusammenhang zwischen dem in der Assoziationsregion vorhandenen Chromatin-Zustand und dem Chromatin-Zustand des EBV-Genoms und verdeutlicht den Einfluss der gezielten Applikation von Genvektoren in bestimmte Kernregionen.

4.4 Das pCON-Vektorsystem in der Genvektorentwicklung

Bei allen EBV-basierten gentherapeutische Vektoren ist *oriP* das Schlüsselement. Die erfolgreiche Etablierung *oriP*-tragender Vektoren im Zellkern ist, so wird vermutet, abhängig von epigenetischen Faktoren (Leight and Sugden, 2001). Die Verwendung von *oriP* und seinem *trans*-Faktor EBNA1 in einem Vektorsystem ist jedoch in einem am Patienten applizierten Vektor umstritten. Die potentielle Tumorigenität von EBNA1 wird kontrovers diskutiert. Obwohl es in transgenen Mäusen zur Bildung von Tumoren beiträgt (Tsimbouri et al., 2002), konnte dies nicht in humanen Zellen beobachtet werden (Humme et al., 2003). EBNA1 fungiert vielleicht nicht selbst als Onkogen, löst aber in Zellen oxidativen Stress aus, der durch induzierte DNA-Schäden zur Bildung von Tumoren führt (Gruhne et al., 2009). Diese Gefährdung der Genomintegrität schließt das Protein für die Gentherapie aus. Daher ist es notwendig die Mechanismen und Funktionen, die der EBNA1-*oriP*-Interaktion zu Grunde liegen, zu verstehen und durch nicht-pathogene, zelluläre Proteine am Vektor zu vermitteln. Ein weiterer Aspekt in der Substitution von EBNA1 durch zelluläre Proteine ist die funktionale Trennung der Replikation und Retention an *oriP*. So können beiden Funktionen gezielt und unabhängig voneinander gesteuert werden.

Das in unserem Labor entwickelte pCON-System ermöglicht es, die viralen Komponenten von *oriP* durch zelluläre Proteine zu ersetzen und die Bindung der zellulären Proteine an *oriP* konditional zu steuern. Dies wird durch die Substitution von FR durch 20 tet-Operatoren (20x tetO) und/oder die Substitution von DS durch 4 tet-Operatoren (4x tetO) ermöglicht. An die tetO-Bindestellen bindet ein mit dem tet-Repressor fusioniertes zelluläres Protein. Dadurch ist es möglich, den Einfluss verschiedener Proteine auf die Replikation, Retention und den Chromatin-Zustand des Vektors zu untersuchen. Die Interaktion zwischen tetO und tetR wird durch die Gabe von Doxzyklin unterbunden, und das System wird damit konditional reguliert (Krueger et al., 2003). Durch die mit pCON in Plasmid-Rescue-Assays und ChIP-Experimenten angestellten Untersuchungen kann später EBNA1 funktional ersetzt werden (Ehrhardt et al., 2008). Hierbei ist es dann möglich, die Funktionen von *oriP* getrennt voneinander zu aktivieren. Eine maßgeschneiderte Lösung gentherapeutischer extrachromosomaler Vektoren könnte dann aus verschiedenen

starken Replikatoren und Retentionsfaktoren bestehen und so das Etablierungsniveau des Vektors steuern. Die Möglichkeit, das pCON-System konditional zu regulieren erlaubt es, die Therapie durch Doxyzyklin-Gabe und den damit ausgelösten Plasmidverlust zu beenden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten ChIP-Ergebnisse haben gezeigt, dass *oriP*-abhängige pCON-Vektoren, ähnlich dem etablierten EBV-Gesamtgenom in Zelllinien (Day et al., 2007), eine Anreicherung an der Histonmodifikation H3K4me3 aufweisen. Die natürliche Lokalisation des Virus-Modellsystems ist durch die Reduktion des Systems auf den latenten Replikationsursprung nicht beeinträchtigt. Im weiteren Verlauf wurde analysiert ob eine durch zelluläre Proteine vermittelte, funktionale Trennung der Funktionen von *oriP* möglich ist, und wie sich derartige Substitutionen auf die Histonmodifikationen an *oriP* auswirken.

4.5 sctetR::HMGA1a vermittelt eine gute Replikation und Retention, zeigt aber keine dominanten Histonmodifikationen an *oriP*

Durch Substitutionen von FR und/oder DS war es möglich, Einblick in die Funktionen der beiden Proteine HMGA1a und HP1 α an *oriP* zu gewinnen (Kapitel 3.2). Hierzu wurden pCON-Vektoren im Kontext einer Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) oder einer Teilsubstitution (20x tetO – DS) verwendet. Der Einfluss der Fusionsproteine sctetR::HMGA1a und HP1 α ::sctetR auf die Funktionen von *oriP* wurde durch ChIP-Experimente und Plasmid-Rescue-Assays untersucht. Die sctetR::HMGA1a-Fusionsproteine dienten in den Experimenten als Positivkontrolle (Pich et al., 2008; Thomae et al., 2007).

In unserem Labor gezeigt, dass HMGA1a mit dem origin-recognition-complex (ORC) interagiert und durch die Rekrutierung von ORC die Replikation an der HMGA1a-Bindestelle induziert (Thomae et al., 2007). Die Möglichkeit über HMGA1a und dessen AT-hook-Motive die nukleäre Retention und Segregation von *oriP*-Vektoren zu vermitteln, wurde durch Mutationanalysen und Fusionsprotein-Experimente gezeigt (Norseen et al., 2008; Sears et al., 2003; Sears et al., 2004). Im pCON-System zeigten sctetR::HMGA1a-Fusionsproteine wie erwartet eine sehr gute Vermittlung der Replikationskompetenz an *oriP*, sowie eine gute Retention und

Segregation der Vektoren. Es konnte auch gezeigt werden, dass die *sctetR::HMGA1a*-abhängigen Vektoren in der perichromatischen Region lokalisieren (Kapitel 3.2.2). Bei Betrachtung der durch *sctetR::HMGA1a*-vermittelten Histonmodifikationen an *oriP* zeigte sich, dass keine der untersuchten Modifikationen (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3) dort angereichert war. Diese Beobachtung zeigt, dass HMGA1a EBNA1 in seiner Funktion an *oriP* ersetzen kann, aber nicht den gleichen Chromatin-Zustand wie EBNA1 vermittelt. HMGA1a selbst ist sowohl in eu- als auch heterochromatischen Regionen zu finden. Es ist möglich, dass sich keine spezifischen Histonmodifikationen auf dem Vektor ausbilden können, da das Protein selbst keine bevorzugten Histonmodifikations-Bereiche besitzt. Obwohl HMGA1a keine spezifischen Kernregionen ansteuert, vermittelt es durch seine AT-hook-Motive eine gute Retention und durch die Interaktion mit ORC Replikationskompetenz. Dies zeigt, dass eine Lokalisation in H3K4me3-Regionen der perichromatischen Region zwar vorteilhaft ist, aber auch durch entsprechend starke Interaktionsmöglichkeiten und Aktivitäten des Fusionsproteins ausgeglichen werden kann. Dies zeigte sich auch in den Plasmid-Rescue-Assays mit dem Fusionsprotein für $HP1\alpha::sctetR$.

4.6 $HP1\alpha$ interagiert über seine Hinge-Region mit Orc5 und Orc6

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Hauptaugenmerk auf die Funktion des zellulären Proteins $HP1\alpha$ an *oriP* gelegt. Das aus drei Domänen aufgebaute $HP1\alpha$ ist für die Bildung des fakultativen Heterochromatins notwendig. Es besteht aus einer Chromo-Domäne, der regulatorischen Hinge-Region und der Chromoshadow-Domäne, die für die Protein-Protein-Interaktion benötigt wird. $HP1\alpha$ bindet durch Interaktion zwischen seiner Chromo-Domäne und H3K3me3 an das Chromatin (Bannister et al., 2001). Dies führt zu einer Rekrutierung der Histonmethyltransferase Su(var)3-9 (Eskeland et al., 2007), die weitere Bindestellen für $HP1\alpha$ bildet (Lachner et al., 2001). Durch diesen Vorgang kommt es zu einer Ausweitung von H3K9me3 am entsprechenden Locus. Diese Ausweitung wird durch sogenannte Insulator-Elemente gestoppt (Bannister et al., 2001). Es ist schon länger bekannt, dass das heterochromatische Protein $HP1\alpha$ in *D.melanogaster* und *M.musculus* mit Proteinen des ORC interagiert (Auth et al., 2006; Pak et al., 1997). Die Bindung von ORC und $HP1\alpha$ zeigt in diesen

Organismen eine Funktion von ORC in der Bildung von Chromatinstrukturen des Heterochromatins (Shareef et al., 2003). In *D.melanogaster* wird diese Interaktion durch ein zwischen ORC und HP1 α vermittelndes Protein namens HOAP (HP1/ORC-associated-protein) erreicht (Shareef et al., 2001). Die Bindedomänen für die Assoziation von HP1 α und HOAP sind hier die Hinge-Regionen und die Chromoshadow-Domänen von HP1 α (Badugu et al., 2003). Eine Funktion von HP1 α in der Replikation heterochromatischer Bereiche wurde 2009 für *S.pombe* beschrieben (Hayashi et al., 2009). Hier wurde gezeigt, dass das HP1 α -Homolog Swi6 in Verbindung mit ORC zu Rekrutierung von zellzyklusregulierten Kinasen führt, welche zur Aktivierung des Replikationsursprungs benötigt werden. Swi6/HP1 α spielt so eine entscheidende Rolle in der Steuerung heterochromatischer Replikation. Die Interaktion zwischen HP1 α und ORC wurde in menschlichen Zellen noch nicht im Detail bestätigt.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten BiFC-Experimente wurde gezeigt, dass humanes HP1 α mit zwei Komponenten des ORC-Kernkomplexes, Orc5 und Orc6, interagiert (Kapitel 3.2.3). Diese Interaktion wird primär durch die Hinge-Region von HP1 α vermittelt (Kapitel 3.2.4) und im Zusammenhang mit dieser Region können auch die Chromo-Domäne und die Chromoshadow-Domäne an Orc5 oder Orc6 binden. Experimente mit Deletions-Mutanten identifizieren die Hinge-Region als primäre Interaktionsdomäne von HP1 α mit ORC und bestätigen die für die Interaktion in *D.melanogaster* gemachten Aussagen. Theoretisch könnte auch in menschlichen Zellen ein trimerer Komplex zwischen ORC, HP1 α und humanem HOAP, sofern dieses Protein existiert, vorliegen. Im Rahmen der hier durchgeführten BiFC-Experimente war es nicht möglich, die Existenz dieser dritten Komponente, die analog zu HOAP in *D.melanogaster* ist, zu bestätigen oder auszuschließen.

4.7 HP1 α ::sctetR-Fusionsproteine zeigen primär eine Retentionsvermittlung an *oriP*

Um den Einfluss von HP1 α ::sctetR an *oriP* zu untersuchen wurden Plasmid-Rescue-Assays mit pCON-Vektoren sowohl im Kontext der Teilsubstitution (20x tetO – DS) als auch im Kontext der Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) durchgeführt. Die Histonmodifikationen an *oriP* wurden durch ChIP-Experimente bestimmt und mit den durch EBNA1 vermittelten Histonmodifikationen verglichen.

Bei der Verwendung von HP1 α ::sctetR an *oriP* kommt es in den ChIP-Experimenten sowohl im Kontext der Teilsubstitution (20x tetO – DS) als auch im Kontext der Vollsubstitution (20x tetO – 4x tetO) zu einer starken Erhöhung von H3K9me3 an *oriP*. Das Ausmaß der Erhöhung von H3K9me3 ist indirekt proportional zum Verlust von H3K4me3. Da HP1 α als heterochromatisches Protein in seiner Funktion an FR die von ihm abhängigen Vektoren in heterochromatische Regionen des Zellkerns leitet, bestätigt diese Beobachtung die Annahme, dass sich die Kernregion, in der sich Genvektoren aufhalten, auf deren Chromatin-Zustand auswirkt. Dies zeigt sich auch im Vergleich der in den FiSH-Experimenten bestimmten H3K4me3-Assoziation der EBV-Gesamtgenome mit der H3K4me3-Anreicherung für diese an *oriP* (Day et al., 2007). Die EBNA1-abhängigen Wildtyp-Vektoren des pCON-Systems zeigen auch ein hohes Ausmaß an H3K4me3, was auf eine Lokalisation in H3K4me3-Regionen im Nukleus hinweist.

Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle oder zur Positivkontrolle mit sctetR::HMGA1a sinkt die Effizienz der Vektor-Etablierung in den Zellen auf 20 % wenn HP1 α ::sctetR an DS die Replikationskompetenz vermittelt. Eine Ursache für die schlechtere Replikation in Abhängigkeit von HP1 α ::sctetR liegt in der durch HP1 α ::sctetR vermittelten Ausweitung von H3K9me3. Das Chromatin nimmt einen stärker kondensierten, für Proteinkomplexe schwerer zugänglichen Zustand ein. Durch die tetO-sctetR-vermittelte Verankerung von HP1 α ::sctetR an DS und FR besitzt das Protein eine längere Verweildauer am Vektor und propagiert dessen heterochromatischen Zustand. Obwohl HP1 α mit ORC interagiert, reicht diese Interaktion nicht aus um in diesem Kontext ein hohes Ausmaß an Replikation zu vermitteln. Es ist möglich, dass HMGA1a und EBNA1 im Gegensatz zu HP1 α zusätzliche Funktionen besitzen, die auch in heterochromatischen Regionen eine

gute Replikation vermitteln. Wenn die Replikationseffizienz von DS in der Teilsubstitution (20x tetO – DS) durch EBNA1 vermittelt wird, steigt die Effizienz der Vektor-Replikation und -Retention auf Wildtyp-Niveau an. Dies zeigt, dass HP1 α ::sctetR durch seine Bindung an H3K9me3-Regionen zwar eine gute Retention, aber nur eine schwache Replikationskompetenz vermittelt. Dies eröffnet im pCON-System die Möglichkeit zu untersuchen, ob eine funktionale Trennung von FR und DS anhand von HP1 α ::sctetR noch besser verwirklicht werden kann. Um dies zu erreichen wurde zuerst die Interaktionsdomäne zwischen HP1 α und ORC ermittelt. Ziel war es, auf diese Interaktion dahingehend Einfluss zu nehmen, dass die entsprechende HP1 α ::sctetR-Domänenmutante keine Replikationskompetenz mehr vermittelt.

4.8 Die Deletion einzelner Domänen von HP1 α ::sctetR führt zu Verlust oder Steigerung der Replikationskompetenz

Nach der Identifikation der Hinge-Region als die maßgebliche Interaktionsdomäne von HP1 α mit ORC wurde untersucht, ob diese Domäne zur Replikationskompetenz beiträgt. Dazu wurden verschiedene Kombinationen aus Chromo-Domäne, Hinge-Region und Chromoshadow-Domäne in Plasmid-Rescue-Assays auf ihren Einfluss auf die Vektor-Replikation und -Retention hin überprüft (Kapitel 3.2.5).

Hierbei zeigte sich, dass die Chromo-Domäne allein keine Replikationskompetenz vermittelt, wohl aber die Retention und Segregation der pCON-Vektoren unterstützt. Eine alleinige Verwendung der Chromoshadow-Domäne resultierte hingegen in keiner deutlichen Reduktion der Replikationskompetenz. Die schwache Chromatin-Bindfähigkeit der Chromoshadow-Domäne resultierte in einem geringeren Etablierungsniveau der pCON-Vektoren in den Zellen. Da in Abhängigkeit der Chromoshadow-Domäne auch Replikation zu beobachten war, ist es möglich, dass in menschlichen Zellen, ähnlich wie in *D.melanogaster* (Badugu et al., 2003), eine Interaktion mit ORC über die Chromoshadow-Domäne vermittelt wird. Diese Interaktion konnte zwar nicht in den von uns durchgeführten BiFC-Experimenten bestätigt werden, ist aber nicht auszuschließen.

Die Deletion der Chromoshadow-Domäne aus HP1 α ::sctetR führt zu einer Steigerung der Replikationskompetenz. Durch die Deletion dieser Protein-Protein-Interaktionsdomäne interagiert HP1 α nicht mehr mit Su(var)3-9 und es kommt zu keiner Ausweitung von H3K9me3 an *oriP* (Lomberk et al., 2006). Ohne den heterochromatischen Chromatin-Zustand ist die Zugänglichkeit des Vektors für Replikationsproteine erhöht. Ein weiterer Grund für die erhöhte Replikationskompetenz könnte eine veränderte Lokalisation der entsprechenden Vektoren sein. Durch die Deletion der Chromoshadow-Domäne erhöht sich die Assoziationsrate von HP1 α mit dem Euchromatin (Cheutin et al., 2003), da die Chromo-Domäne die Chromatin-Assoziation vermittelt, aber die Verweildauer dort durch die Chromoshadow-Domäne gesteuert wird. Dies könnte im Fall der pCON-Vektoren eine Lokalisation in euchromatischen Bereichen der perichromatischen Region zur Folge haben und sich durch die dort vorherrschenden Histonmodifikationen positiv auf die Replikationskompetenz auswirken. Es wäre auch möglich, dass durch den Verlust der Chromoshadow-Domäne sich die Lokalisation ähnlich dynamisch wie die von HMGA1a verhält. In diesem Fall würde man keine dominanten Histonmodifikationen an *oriP* erwarten. Um diese Hypothese zu überprüfen, werden in einem Folgeprojekt dieser Arbeit ChIP-Experimente mit den entsprechenden pCON-Vektoren angestrebt.

In Kombination mit der Hinge-Region zeigten sowohl die Chromo-Domäne als auch die Chromoshadow-Domäne einen additiven Effekt in der Replikationseffizienz der pCON-Vektoren in den Zellen. Die im Vergleich zur Effizienz der Wildtyp-Vektoren auftretenden Schwankungen bei der Verwendung einzelner Domänen von HP1 α erklären sich durch die Abhängigkeit der Domänen untereinander in Bezug auf ihre Funktionalität (Cheutin et al., 2003). Da Kombinationen der Hinge-Region mit der Chromoshadow-Domäne ebenfalls eine gute Replikationseffizienz zeigen, ist es möglich, dass der Replikations-hemmende Einfluss dieser Domäne nur bei einer voll-funktionsfähigen Chromoshadow-Domäne auftritt. Durch das Fehlen der Chromo-Domäne entfaltet die Chromoshadow-Domäne folglich nicht ihre volle Aktivität, was in Einklang mit den von Cheutin gemachten Beobachtungen steht.

Mit diesen Experimenten war es uns erstmals gelungen, eine Trennung der Retentions- und Segregationsfunktion von der Vermittlung der Replikationskompetenz im pCON-System zu erreichen. In weiterführenden

Experimenten des Folgeprojektes wird untersucht, ob eine Möglichkeit geschaffen werden kann, nur die Replikationskompetenz zu vermitteln.

4.9 Ausblicke in der Genvektorentwicklung

Aus der Entwicklung verschiedener auf Viren basierter extrachromosomaler Vektorsysteme für die Applikation gentherapeutischer Vektoren geht hervor, dass die epigenetischen Hintergründe der entsprechenden Ausgangssysteme von entscheidender Bedeutung sind. Durch ein grundlegendes molekulares Verständnis der Mechanismen, die das Ausgangssystem (*EBNA1/oriP*) effizient machen, ist es dann möglich die daraus entwickelten nicht-viralen Vektorsysteme (pCON) entsprechend zu gestalten. In zwei voneinander unabhängigen Vektorsystemen, pEPI (Stehle et al., 2007) und pCON, konnte gezeigt werden, dass eine Lokalisation in transkriptionell aktiven perichromatischen Regionen für die Etablierung extrachromosomaler Replikons im Wirtszell-Nukleus notwendig ist. Eine Lokalisation in heterochromatische Bereiche äußert sich in einer niedrigeren Replikationseffizienz der Vektoren wenn diese nicht mit einem starken Replikationselement versehen sind. Diese Beobachtungen sollten beim Konzipieren gentherapeutischer extrachromosomaler Vektoren berücksichtigt werden.

Das Etablierungsniveau solcher Vektoren könnte dann durch die Verwendung unterschiedlich starker Replikationsursprünge und Kernregionsspezifischer Retentionsproteine auf die gewünschten Parameter zugeschnitten werden. Durch eine im Vektorsystem enthaltene Konditionalität könnte die Therapie nach Bedarf abgebrochen werden.

5. Zusammenfassung

EBV stellt eine zukunftsweisende Grundlage für die Entwicklung gentherapeutischer Vektoren dar. Da das Virus selbst tumorigen ist, kann es nicht direkt als Vektor verwendet werden. Die EBV zueigene Replikationskompetenz und stabile Segregation auf die Tochterzellen kann in extrachromosomalen Vektorsystemen jedoch von großem Nutzen sein. Bisher ist nicht bekannt wo und wie sich EBV-Genome im Nukleus etablieren. Aus der nukleären Lokalisation des Wildtyp-Virus können Rückschlüsse darauf gezogen werden, welche Faktoren für eine erfolgreiche Etablierung extrachromosomaler Genome notwendig sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation von EBV in Interphase-Nuklei zu untersuchen und zu bestimmen, welchen Einfluss die einzelnen Elemente des latenten Replikationsursprungs *oriP* auf die Etablierung extrachromosomaler Genome haben. Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde die epigenetische Lokalisation von EBV und der Einfluss der *oriP*-Integrität auf diese untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das konditionale Vektorsystem pCON dahingehend weiterentwickelt, dass eine Trennung der Replikations- und Retentionsfunktion von *oriP* vorgenommen wurde. Dies sollte durch die Substitution des viralen *trans*-Faktors EBNA1 in seiner Funktion an *oriP* geschehen um ein Vektorsystem zu schaffen das frei von viralen Komponenten ist.

In meiner Arbeit habe ich gezeigt, dass EBV in seinem natürlichen Kontext in euchromatischen Bereichen der perichromatischen Region der Interphase-Nuklei lokalisiert und diese Lokalisation primär durch das FR-Element von *oriP* hervorgerufen wird. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte ich zeigen, dass durch die Verwendung einzelner Domän-Mutanten des zellulären Proteins HP1 α eine Trennung der Replikations- und Retentionsfunktion von *oriP* möglich ist. Die Etablierungseffizienz der pCON-Vektoren war hier mit der des EBNA1-abhängigen Wildtyp-Vektors vergleichbar.

6. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
BiFC	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CMV	Cytomegalovirus
CMV→	vom CMV-Promotor abhängiges Gen
Cp	C-Promotor
Cy3	Indocarbocyanin
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dox.	Doxyzyklin
DS	Dyad-Symmetry-Element
DTT	Dithioerithiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA1	Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen 1
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
etc.	et cetera
FA	Formamid
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FiSH	Fluoreszenz- <i>in-Situ</i> -Hybridisierung
FR	Family of Repeats

HEK	humane embryonale Nierenzelle (‘ <u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney cells’)
H ₂ O	Wasser
H3K4me3	Trimethyliertes Lysin 4 an Histon 3
H3K9ac	Acetyliertes Lysin 9 an Histon 3
H3K9me3	Trimethyliertes Lysin 9 an Histon 3
H3K27me3	Trimethyliertes Lysin 27 an Histon 3
HMG	„high mobility group“
HP1	Heterochromatische Protein 1
hrPOX	gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (‘horseradish peroxidase’)
Hyg	Hygromycin
IF	Immunfluoreszenz
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KE	Kernextrakt
LB	Luria Bertani
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (‘lymphoblastoid <u>c</u> ell <u>l</u> ine’)
M	molar
m	milli
max.	maximal
MCM	„mini chromosome maintenance“-Proteine
min	Minute
<i>M.musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
n	nano
nm	Nanometer
ORC	„origin-recognition-complex“
<i>oriLyt</i>	lytischer Replikationsursprung
<i>oriP</i>	plasmidaler Replikationsursprung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
preIC	Prä-Initiationskomplex
preRC	Prä-Replikationskomplex
RT-PCR	<i>real time</i> -PCR

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen („rounds“) pro Minute
RT	Raumtemperatur
sctetR	„single chain“-tetR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Std.	Stunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tetO	tet-Operator
tetR	Tetrazyklin-Repressor (tet-Repressor)
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-Hydromethyl-Aminomehtan
u.a.	unter anderem
wt	Wildtyp
YC	carboxyterminales Fragment von YFP (Aminosäuren 155-238)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein („yellow fluorescent protein“)
YN	aminoterninales Fragment von YFP (Aminosäuren 1-154)
z. B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- Abdurashidova, G., Danailov, M.B., Ochem, A., Triolo, G., Djeliova, V., Radulescu, S., Vindigni, A., Riva, S. and Falaschi, A. (2003) Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. *The EMBO Journal*, **22**, 4294-4303.
- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *The EMBO Journal*, **17**, 6394-6403.
- Albiez, H., Cremer, M., Tiberi, C., Vecchio, L., Schermelleh, L., Dittrich, S., Kupper, K., Joffe, B., Thormeyer, T., von Hase, J., Yang, S., Rohr, K., Leonhardt, H., Solovei, I., Cremer, C., Fakan, S. and Cremer, T. (2006) Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res*, **14**, 707-733.
- Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B. and Hammerschmidt, W. (2006) Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14188-14193.
- Aravind, L. and Landsman, D. (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research*, **26**, 4413-4421.
- Auth, T., Kunkel, E. and Grummt, F. (2006) Interaction between HP1alpha and replication proteins in mammalian cells. *Exp Cell Res*, **312**, 3349-3359.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B. and Kellum, R. (2005) Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma*, **113**, 370-384.
- Badugu, R., Shareef, M.M. and Kellum, R. (2003) Novel Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations. *J Biol Chem*, **278**, 34491-34498.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. and et al. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, **310**, 207-211.
- Balasov, M., Huijbregts, R.P. and Chesnokov, I. (2007) Role of the Orc6 protein in origin recognition complex-dependent DNA binding and replication in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 3143-3153.

- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, **410**, 120-124.
- Bashaw, J.M. and Yates, J.L. (2001) Replication from oriP of Epstein-Barr Virus Requires Exact Spacing of Two Bound Dimers of EBNA1 Which Bend DNA. *J Virol*, **75**, 10603-10611.
- Bell, S.P. (2002) The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes and Development*, **16**, 659-672.
- Bell, S.P. and Stillman, B. (1992) Nucleotide dependent recognition of chromosomal origins of DNA replication by a multi-protein complex. *Nature*, **357**, 128-134.
- Bianchi, M.E. and Agresti, A. (2005) HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 496-506.
- Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, **100**, 243-255.
- Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Bochkareva, E., Frappier, L. and Edwards, A.M. (1996) Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA. *Cell*, **84**, 791-800.
- Bonaldi, T., Langst, G., Strohner, R., Becker, P.B. and Bianchi, M.E. (2002) The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *Embo J*, **21**, 6865-6873.
- Bonnefoy, E., Bandu, M.T. and Doly, J. (1999) Specific binding of high-mobility-group I (HMGI) protein and histone H1 to the upstream AT-rich region of the murine beta interferon promoter: HMGI protein acts as a potential antirepressor of the promoter. *Mol Cell Biol*, **19**, 2803-2816.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Branco, M.R. and Pombo, A. (2006) Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol*, **4**, e138.
- Brocher, J. and Hock, R. (2007) Dynamic cooperation with HMGA proteins modulates HP1 residence in heterochromatin. *submitted for publication*.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B. and Misteli, T. (2003) Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science*, **299**, 721-725.

- Chesnokov, I., Gossen, M., Remus, D. and Botchan, M. (1999) Assembly of functionally active Drosophila origin recognition complex from recombinant proteins. *Genes Dev*, **13**, 1289-1296.
- Conese, M., Auriche, C. and Ascenzioni, F. (2004) Gene therapy progress and prospects: episomally maintained self-replicating systems. *Gene Ther*, **11**, 1735-1741.
- Cowieson, N.P., Partridge, J.F., Allshire, R.C. and McLaughlin, P.J. (2000) Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol*, **10**, 517-525.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Muller, S., Solovei, I. and Fakan, S. (2006) Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 307-316.
- Cremer, T., Kupper, K., Dietzel, S. and Fakan, S. (2004) Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biol Cell*, **96**, 555-567.
- Czura, C.J., Wang, H. and Tracey, K.J. (2001) Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine. *J Endotoxin Res*, **7**, 315-321.
- Dani, G.M. and Zakian, V.A. (1983) Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3406-3410.
- Day, L., Chau, C.M., Nebozhyn, M., Rennekamp, A.J., Showe, M. and Lieberman, P.M. (2007) Chromatin profiling of Epstein-Barr virus latency control region. *J Virol*, **81**, 6389-6401.
- Deutsch, M.J., Ott, E., Papior, P. and Schepers, A. (2009) The plasmid origin of replication of Epstein-Barr virus directs viral genomes to transcriptionally active regions of the nucleus. *in preparation*.
- Deng, Z., Atanasiu, C., Burg, J.S., Broccoli, D. and Lieberman, P.M. (2003) Telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and hRAP1 modulate replication of Epstein-Barr virus OriP. *Journal of Virology*, **77**, 11992-12001.
- Deng, Z., Lezina, L., Chen, C.J., Shtivelband, S., So, W. and Lieberman, P.M. (2002) Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Molecular Cell*, **9**, 493-503.
- Dhar, S.K., Delmolino, L. and Dutta, A. (2001) Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*, **276**, 29067-29071.
- Diffley, J.F.X. (1995) The initiation of DNA replication in the budding yeast cell division cycle. *Yeast*, **11**, 1651-1670.

-
- Ehrhardt, A., Haase, R., Schepers, A., Deutsch, M.J., Lipps, H.J. and Baiker, A. (2008) Episomal vectors for gene therapy. *Curr Gene Ther*, **8**, 147-161.
- Ermakova, O.V., Frappier, L. and Schildkraut, C.L. (1996) Role of the EBNA-1 protein in pausing of replication forks in the Epstein-Barr virus genome. *J Biol Chem*, **271**, 33009-33017.
- Eskeland, R., Eberharter, A. and Imhof, A. (2007) HP1 Binding to Chromatin Methylated at H3K9 Is Enhanced by Auxiliary Factors. *Molecular and Cellular Biology*, **27**, 453-465.
- Evans, A.S., Niederman, J.C. and McCollum, R.W. (1968) Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EB virus. *N Engl J Med*, **279**, 1121-1127.
- Fischer, N., Kremmer, E., Lautscham, G., Mueller-Lantzsch, N. and Grasser, F.A. (1997) Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin alpha2. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 3999-4005.
- Frappier, L. and O'Donnell, M. (1991) Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 7819-7826.
- Fraser, P. and Bickmore, W. (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*, **447**, 413-417.
- Gahn, T.A. and Schildkraut, C.L. (1989) The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell*, **58**, 527-535.
- Gahn, T.A. and Sugden, B. (1995) An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *Journal of Virology*, **69**, 2633-2636.
- Gerhardt, J., Jafar, S., Spindler, M.P., Ott, E. and Schepers, A. (2006) Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 7731-7746.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S. and et al. (1994) Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7119-7123.
- Gilbert, D.M. (2004) In search of the holy replicator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 848-855.
- Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S.A., Gastaldello, S. and Masucci, M.G. (2009) The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2313-2318.
-

- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harrison, S., Fisenne, K. and Hearing, J. (1994) Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *Journal of Virology*, **68**, 1913-1925.
- Hayashi, M.T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Nakayama, J. and Masukata, H. (2009) The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nat Cell Biol*, **11**, 357-362.
- Heintzmann, R. and Sheppard, C.J. (2007) The sampling limit in fluorescence microscopy. *Micron*, **38**, 145-149.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hirt, B. (1966) Evidence for semiconservative replication of circular polyoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**, 997-1004.
- Hsieh, D.J., Camiolo, S.M. and Yates, J.L. (1993) Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection. *The EMBO Journal*, **12**, 4933-4944.
- Hu, C.D., Chinenov, Y. and Kerppola, T.K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, **9**, 789-798.
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.J., Bousset, K., Hammerschmidt, W. and Schepers, A. (2003) The EBV Nuclear Antigen 1 (EBNA1) enhances B-cell immortalization several thousand-fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 10989-10994.
- Hung, S.C., Kang, M.S. and Kieff, E. (2001) Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, **98**, 1865-1870.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jones, D.O., Cowell, I.G. and Singh, P.B. (2000) Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays*, **22**, 124-137.

-
- Julien, M.D., Polonskaya, Z. and Hearing, J. (2004) Protein and sequence requirements for the recruitment of the human origin recognition complex to the latent cycle origin of DNA replication of Epstein-Barr virus oriP. *Virology*, **326**, 317-328.
- Kanda, T., Kamiya, M., Maruo, S., Iwakiri, D. and Takada, K. (2007) Symmetrical localization of extrachromosomally replicating viral genomes on sister chromatids. *J Cell Sci*, **120**, 1529-1539.
- Kanda, T., Otter, M. and Wahl, G.M. (2001a) Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in Epstein-Barr virus-based plasmids. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 3576-3588.
- Kanda, T., Otter, M. and Wahl, G.M. (2001b) Mitotic segregation of viral and cellular acentric extrachromosomal molecules by chromosome tethering. *Journal of Cell Science*, **114**, 49-58.
- Kapoor, P. and Frappier, L. (2003) EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *Journal of Virology*, **77**, 6946-6956.
- Kapoor, P., Shire, K. and Frappier, L. (2001) Reconstitution of Epstein-Barr virus-based plasmid partitioning in budding yeast. *Embo J*, **20**, 222-230.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W. (1995a) immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, **92**, 5875-5879.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B. and Hammerschmidt, W. (1995b) immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of Virology*, **69**, 231-238.
- Kennedy, G., Komano, J. and Sugden, B. (2003) Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **early online edition**.
- Kennedy, G. and Sugden, B. (2003) EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 6901-6908.
- Kieff, E.D. and Rickinson, A.B. Epstein-Barr Virus and its replication. In Fields (ed.), *Virology*.
- Kim, A.L., Maher, M., Hayman, J.B., Ozer, J., Zerby, D., Yates, J.L. and Lieberman, P.M. (1997) An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/importin alpha. *Virology*, **239**, 340-351.
- Kirchmaier, A.L. and Sugden, B. (1995) Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, **69**, 1280-1283.
-

- Kirchmaier, A.L. and Sugden, B. (1998) Rep*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, **72**, 4657-4666.
- Kleinschmidt, C., Tovar, K., Hillen, W. and Porschke, D. (1988) Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control. *Biochemistry*, **27**, 1094-1104.
- Koike, N., Maita, H., Taira, T., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S.M. (2000) Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett*, **467**, 17-21.
- Kourmouli, N., Theodoropoulos, P.A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A.S., Cowell, I.G., Singh, P.B. and Georgatos, S.D. (2000) Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *Embo J*, **19**, 6558-6568.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Krueger, C., Berens, C., Schmidt, A., Schnappinger, D. and Hillen, W. (2003) Single-chain Tet transregulators. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3050-3056.
- Krysan, P.J., Haase, S.B. and Calos, M.P. (1989) Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Molecular Biology of the Cell*, **9**, 1026-1033.
- Kunkel, T.A. and Burgers, P.M. (2008) Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends Cell Biol*, **18**, 521-527.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, **410**, 116-120.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langle-Rouault, F., Patzel, V., Benavente, A., Taillez, M., Silvestre, N., Bompard, A., Sczakiel, G., Jacobs, E. and Rittner, K. (1998) Up to 100-fold increase of apparent gene expression in the presence of Epstein-Barr virus oriP sequences and EBNA1: implications of the nuclear import of plasmids. *J Virol*, **72**, 6181-6185.
- Lei, M. and Tye, B.K. (2001) Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*, **114**, 1447-1454.
- Leight, E.R. and Sugden, B. (2001) Establishment of an oriP replicon is dependent upon an infrequent, epigenetic event. *Molecular and Cellular Biology*, **21**, 4149-4161.

- Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D. and Cardoso, M.C. (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol*, **149**, 271-280.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G. and Masucci, M.G. (1995) Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, **375**, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. and Masucci, M.G. (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 12616-12621.
- Li, C.J. and DePamphilis, M.L. (2002) Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, 105-1016.
- Little, R.D. and Schildkraut, C.L. (1995) Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin. *Molecular and Cellular Biology*, **15**, 2893-2903.
- Lomberk, G., Wallrath, L. and Urrutia, R. (2006) The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol*, **7**, 228.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Lupton, S. and Levine, A.J. (1985) Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 2533-2542.
- Mackey, D. and Sugden, B. (1997) Studies on the mechanism of DNA linking by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 29873-29879.
- Mackey, D. and Sugden, B. (1999) The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 3349-3359.
- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G. and Jenuwein, T. (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol*, **20**, 3728-3741.

- Middleton, T. and Sugden, B. (1992) EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plasmid origin of DNA replication. *Journal of Virology*, **66**, 489-495.
- Minc, E., Courvalin, J.C. and Buendia, B. (2000) HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, **90**, 279-284.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Murzina, N., Verreault, A., Laue, E. and Stillman, B. (1999) Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell*, **4**, 529-540.
- Nanbo, A., Sugden, A. and Sugden, B. (2007) The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *Embo J*, **26**, 4252-4262.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L. and Koonin, E.V. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*, **9**, 27-43.
- Niller, H.H., Glaser, G., Knuchel, R. and Wolf, H. (1995) Nucleoprotein complexes and DNA 5'-ends at oriP of Epstein-Barr virus. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 12864-12868.
- Norio, P., Schildkraut, C.L. and Yates, J.L. (2000) Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J Virol*, **74**, 8563-8574.
- Norseen, J., Thomae, A., Sridharan, V., Aiyar, A., Schepers, A. and Lieberman, P.M. (2008) RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex. *Embo J*, **27**, 3024-3035.
- Norwood, L.E., Grade, S.K., Cryderman, D.E., Hines, K.A., Furiasse, N., Toro, R., Li, Y., Dhasarathy, A., Kladde, M.P., Hendrix, M.J., Kirschmann, D.A. and Wallrath, L.L. (2004) Conserved properties of HP1(Hsalpha). *Gene*, **336**, 37-46.
- Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T. and Obuse, C. (2003) The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J Biol Chem*, **278**, 41535-41540.

-
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D.R., Kelly, T.J. and Nevins, J.R. (1996) Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, **16**, 6977-6984.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. and Botchan, M.R. (1997a) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*, **91**, 311-323.
- Peng, J.C. and Karpen, G.H. (2007) H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat Cell Biol*, **9**, 25-35.
- Pich, D., Humme, S., Spindler, M.P., Schepers, A. and Hammerschmidt, W. (2008) Conditional gene vectors regulated in cis. *Nucleic Acids Res*, **36**, e83.
- Polack, A., Hartl, G., Zimmer, U., Freese, U.K., Laux, G., Takaki, K., Hohn, B., Gissmann, L. and Bornkamm, G.W. (1984) A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene*, **27**, 279-288.
- Platero, J.S., Hartnett, T. and Eisenberg, J.C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. *Embo J*, **14**, 3977-3986.
- Polonskaya, Z., Benham, C.J. and Hearing, J. (2004) Role for a region of helically unstable DNA within the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication oriP in origin function. *Virology*, **328**, 282-291.
- Ranjan, A. and Gossen, M. (2006) A structural role for ATP in the formation and stability of the human origin recognition complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 4864-4869.
- Reeves, R. and Nissen, M.S. (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 8573-8582.
- Reisman, D., Yates, J. and Sugden, B. (1985) A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 1822-1832.
- Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 263-273.
- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B.M. and Zink, D. (1999) Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol*, **146**, 1211-1226.
-

-
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Clod Spring Harbor, New York.
- Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I.M., Lipps, H.J. and Knippers, R. (2004) An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *The EMBO Journal*, **23**, 191-201.
- Schepers, A. and Diffley, J.F.X. (2001) Mutational Analysis of Conserved Sequence Motifs of the Budding Yeast Cdc6 protein. *Journal of Molecular Biology*, **308**, 597-608.
- Sears, J., Kolman, J., Wahl, G.M. and Aiyar, A. (2003) Metaphase chromosome tethering is necessary for the DNA synthesis and maintenance of oriP plasmids but is insufficient for transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Journal of Virology*, **77**, 11767-11780.
- Sears, J., Ujihara, M., Wong, S., Ott, C., Middeldorp, J. and Aiyar, A. (2004) The amino terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 contains AT hooks that facilitate the replication and partitioning of latent EBV genomes by tethering them to cellular chromosomes. *Journal of Virology*, **78**, 11487-11505.
- Semple, J.W., Da-Silva, L.F., Jervis, E.J., Ah-Kee, J., Al-Attar, H., Kummer, L., Heikkila, J.J., Pasero, P. and Duncker, B.P. (2006) An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *Embo J*, **25**, 5150-5158.
- Shareef, M.M., Badugu, R. and Kellum, R. (2003) HP1/ORC complex and heterochromatin assembly. *Genetica*, **117**, 127-134.
- Shareef, M.M., King, C., Damaj, M., Badagu, R., Huang, D.W. and Kellum, R. (2001) Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 1671-1685.
- Shire, K., Ceccarelli, D.F., Avolio-Hunter, T.M. and Frappier, L. (1999) EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *Journal of Virology*, **73**, 2587-2595.
- Singh, P.B. and Georgatos, S.D. (2002) HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol*, **140**, 10-16.
- Spector, D.L. (2001) Nuclear domains. *J Cell Sci*, **114**, 2891-2893.
- Stehle, I.M., Postberg, J., Rupprecht, S., Cremer, T., Jackson, D.A. and Lipps, H.J. (2007) Establishment and mitotic stability of an extra-chromosomal mammalian replicon. *BMC Cell Biol*, **8**, 33.
-

-
- Sternas, L., Middleton, T. and Sugden, B. (1990) The average number of molecules of Epstein-Barr nuclear antigen 1 per cell does not correlate with the average number of Epstein-Barr virus (EBV) DNA molecules per cell among different clones of EBV-immortalized cells. *Journal of Virology*, **64**, 2407-2410.
- Stewart, M.D., Li, J. and Wong, J. (2005) Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol*, **25**, 2525-2538.
- Stoll, S.M. and Calos, M.P. (2002) Extrachromosomal plasmid vectors for gene therapy. *Curr Opin Mol Ther*, **4**, 299-305.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T. and Obuse, C. (2003) The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem*, **278**, 41528-41534.
- Thomae, A., Pich, D., Spindler, M.P., Berens, C., Hammerschmidt, W. and Schepers, A. (2007) Interaction between HMGA1a and ORC creates site-specific origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, revised version re-submitted.
- Thomas, J.O. and Travers, A.A. (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 167-174.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tsimbouri, P., Drotar, M.E., Coy, J.L. and Wilson, J.B. (2002) bcl-xL and RAG genes are induced and the response to IL-2 enhanced in EmuEBNA-1 transgenic mouse lymphocytes. *Oncogene*, **21**, 5182-5187.
- Turner, B.M. (1993) Decoding the nucleosome. *Cell*, **75**, 5-8.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J. and Walter, J.C. (2003) Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes and Development*, **17**, 1894-1908.
- Visser, A.E., Jaunin, F., Fakan, S. and Aten, J.A. (2000) High resolution analysis of interphase chromosome domains. *J Cell Sci*, **113 (Pt 14)**, 2585-2593.
- Wang, J., Lindner, S.E., Leight, E.R. and Sugden, B. (2006) Essential elements of a licensed, mammalian plasmid origin of DNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology*, **26**, 1124-1134.

- West, K.L. (2004) HMGN proteins play roles in DNA repair and gene expression in mammalian cells. *Biochem Soc Trans*, **32**, 918-919.
- Wu, H., Kapoor, P. and Frappier, L. (2002) Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *Journal of Virology*, **76**, 2480-2490.
- Wysokenski, D.A. and Yates, J.L. (1989) Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, **63**, 2657-2666.
- Yamamoto, K., Sonoda, M., Inokuchi, J., Shirasawa, S. and Sasazuki, T. (2004) Polycomb group suppressor of zeste 12 links heterochromatin protein 1alpha and enhancer of zeste 2. *J Biol Chem*, **279**, 401-406.
- Yan, C. and Boyd, D.D. (2006) Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Mol Cell Biol*, **26**, 6357-6371.
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, **81**, 3806-3810.
- Yates, J.L., Camiolo, S.M. and Bashaw, J.M. (2000) The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol*, **74**, 4512-4522.
- Yie, J., Merika, M., Munshi, N., Chen, G. and Thanos, D. (1999) The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *The EMBO Journal*, **18**, 3074-3089.
- Zhao, T., Heyduk, T. and Eisenberg, J.C. (2001) Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem*, **276**, 9512-9518.
- Zinner, R., Albiez, H., Walter, J., Peters, A.H., Cremer, T. and Cremer, M. (2006) Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol*, **125**, 3-19.

8. Anhang

8.1. zusätzliche Abbildungen

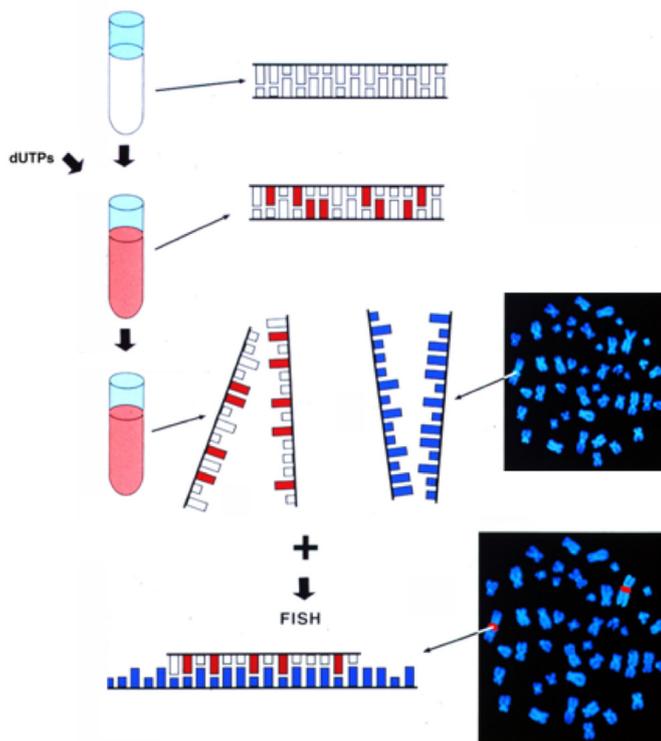


Abb. S1: Schematische Darstellung des FiSH-Verfahrens

Die Sonden-DNA wird durch den Einbau Hapten-gekoppelter dNTPs markiert. Nach dem Markieren wird die Sonden-DNA zusammen mit der Ziel-DNA denaturiert und durch langsames Abkühlen mit der Ziel-DNA hybridisiert. Die Sonden-DNA wird durch Hapten-spezifische Antikörper gefärbt und mit einem (konfokalen) Fluoreszenz-Mikroskop ausgenommen.

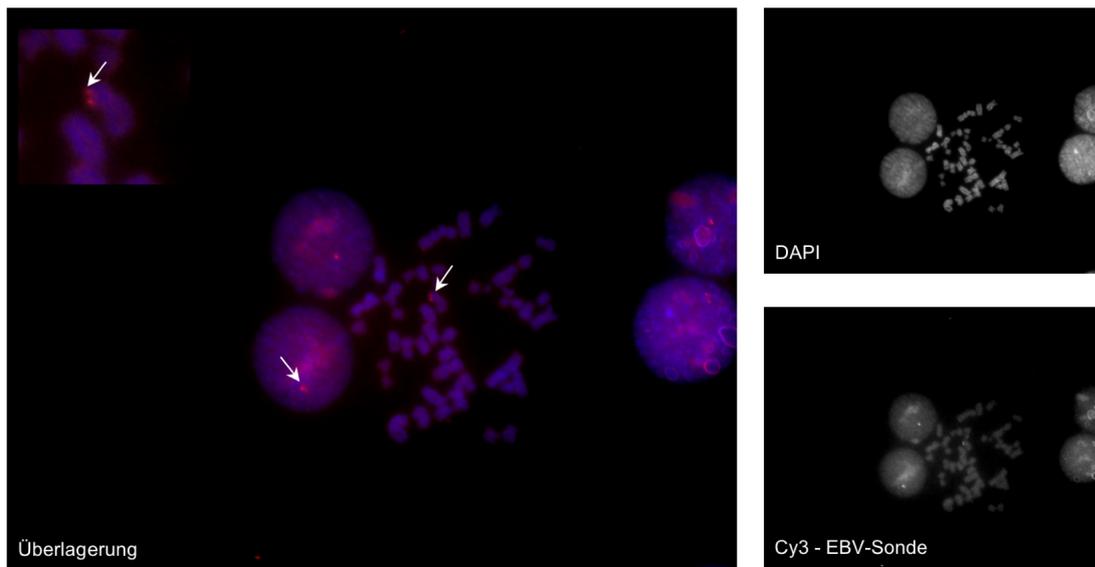


Abb. S2: Spezifische Erkennung von EBV durch die DNA-Sonden

Einzelbild aus dem aufgenommenen Bilderstapel. 2D-Metaphase-Spreitungen von Namalwa-Zellen wurden mit der DNA-Sonde cMABA-SalA (rot) hybridisiert. Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt (blau). Die DNA-Sonde zeigte deutliche Signale in den Nuklei und zeigte für das integrierte EBV typische Dubletten auf Metaphasechromosomen (siehe Pfeil).

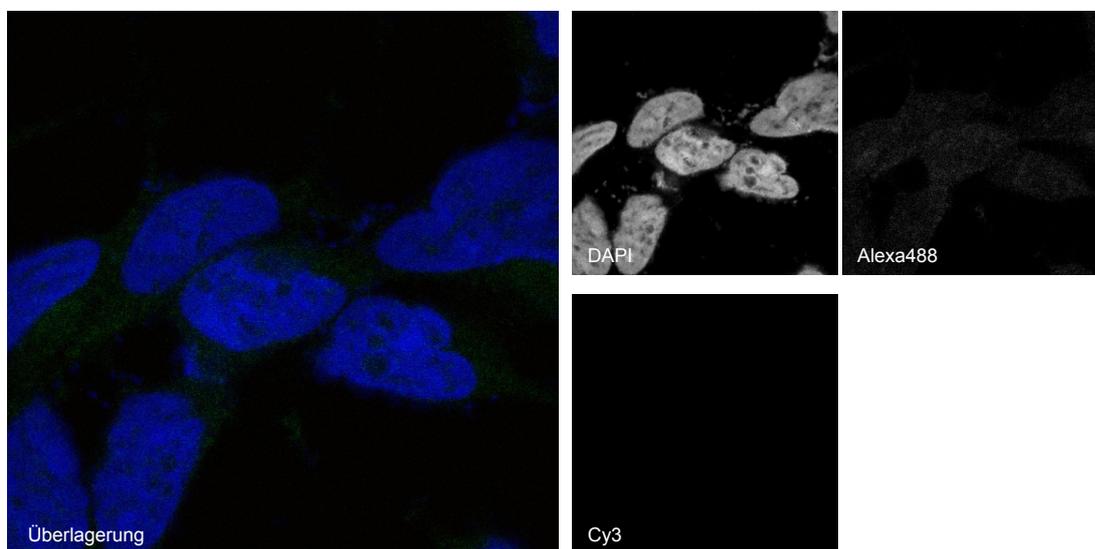


Abb. S3: Keine unspezifische Hybridisierungssignale der DNA-Sonden

Einzelbild aus dem aufgenommenen Bilderstapel. 3D-fixierte HEK293-Zellen wurden mit der DNA-Sonde cMABA-SalA (rot) und der DNA-Sonde cMABA-B14 (grün) hybridisiert. Die DNA wurde mit DAPI gegengefärbt (blau). Die DNA-Sonden zeigten in den EBV-negativen HEK293-Zellen keine unspezifischen Hybridisierungssignale.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Manuel Joso Deutsch
geboren am	22.06.1980 in Kulmbach
Familienstand	ledig

Hochschulbildung

12/05	Erlangung des Hochschulabschlusses Diplom-Biologe Ludwig-Maximilians-Universität München
03/05 – 12/05	Diplomarbeit bei Fr. Dr. Anna Friedl; Thema: „Zellzyklusabhängige Expression von Reparatur-proteinen an strahleninduzierten DNA- Doppelstrangbrüchen“
11/04 – 02/05	mündliche Diplom-Hauptprüfung Biologie
11/02 – 03/05	Hauptstudium Diplom-Biologie Hauptfach Humangenetik (Schwerpunkt Tumorbilogie/ Tumorimmunologie); Nebenfächer: Zoologie (zellbiologische, molekularbiologische Richtung), Neurobiologie, Pharmako-logie/Toxikologie
11/02	Diplom-Vorprüfung Biologie Ludwig-Maximilians-Universität München
10/00 – 11/02	Grundstudium Diplom-Biologie Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufliche Tätigkeiten

01/06 – 03/09	Doktorand in der Abteilung Genvektoren HelmholtzZentrum München Thema: „Molekulare Studien zur Effizienz und Stabilität EBV-basierender extrachromosomaler Genvektoren“
03/06 – 12/08	Administrator für Konfokale Laserscanning Mikroskope HelmholtzZentrum München
07/05 – 12/05	Laborant in der Abteilung Qualitätssicherung Coca-Cola-Erfrischungsgetränke AG
08/04 – 06/05	Studentische Hilfskraft (Werksstudent) Strahlenbiologisches Institut der LMU (AG Dr. Anna Friedl)
11/03 – 04/04	Studentische Hilfskraft (Tutor) Zoologisches Institut der LMU
06/03 – 09/03	Laborant in der Abteilung Qualitätssicherung Coca-Cola-Erfrischungsgetränke AG
05/03 – 07/03	Studentische Hilfskraft (Werksstudent) Zellbiologisches Institut der LMU (AG Prof. Dr. Schliwa)
11/02 – 02/03	Studentische Hilfskraft (Tutor) Zoologisches Institut der LMU
09/01 – 10/01	Laborant in der Abteilung Qualitätssicherung Coca-Cola-Erfrischungsgetränke AG

Wehrdienst

06/00	Entlassung
04/00	Verlängerung des Wehrdienstes um 2 Monate
09/99 – 04/00	Grundwehrdienst in Veitshöchheim
07/99 – 09/99	Grundausbildung in Ellwangen

Schulbildung

06/99	Allgemeine Hochschulreife
04/96 – 06/99	Graf – Münster-Gymnasium Bayreuth
09/93 – 04/96	Staatliches Gymnasium Kaufbeuren
09/90 – 07/93	Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium Kulmbach
09/86 – 07/90	Max-Hundt-Grundschule Kulmbach

Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse	Englisch fließend; etwas Japanisch
EDV-Kenntnisse	MS-DOS, Windows, MacOSX, Microsoft Office, ImageJ, Photoshop, Huygens Essential Deconvolution Software,
Interessen	Fernöstliche Kulturen und deren Philosophie, Sportklettern, Fechten

8.3 Publikationen

Deutsch, M.J., Ott, E., Papior, P. and Schepers, A. (2009) The plasmid origin of replication of Epstein-Barr virus directs viral genomes to transcriptionally active regions of the nucleus. *in preparation*.

Ehrhardt, A., Haase, R., Schepers, A., **Deutsch, M.J.**, Lipps, H.J. and Baiker, A. (2008) Episomal vectors for gene therapy. *Curr Gene Ther*, **8**, 147-161.

Schneider, M., Förster, H., Boersma, a., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., Neumüller, C., **Deutsch, M.J.**, Walch, A., Hrabé de Angelis, M., Wurst, W., Ursini, F., Roveri, A., Maleszewski, M., Maiorino M. and Conrad M. (2009) Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility, *submitted for publication*.

Hauptner, A., Krücken, R., Greubel, C., Hable, V., Dollinger, G., Drexler, G.A., **Deutsch, M.J.**, Löwe, R., Friedl, A.A., Dietzel, S., Strickfaden, H. and Cremer, T., (2006) DNA-repair protein distribution along the tracks of energetic ions. *Radiat Prot Dosimetry*. 2006;122(1-4):147-9.

Hauptner, A., Cremer, T., **Deutsch, M.J.**, Dietzel, S., Drexler, G. A., Greubel, C., Hable, V., Krücken, R., Löwe, R., Strickfaden, H., Dollinger, G., and Friedl, A. A. (2006). Irradiation of Living Cells with Single Ions at the Ion Microprobe SNAKE. *Acta Physica Polonica A* **109**, 273-278.

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. **Aloys Schepers**, der es mir ermöglichte dieses überaus interessante Thema zu bearbeiten. Darüber hinaus möchte ich ihm für seine großzügige Hilfe danken, durch die ich meine wissenschaftlichen Ideen weiterentwickeln und zu einem erfolgreichen Abschluss bringen konnte.

Meinem Doktorvater Professor Dr. **Thomas Cremer** danke ich für seine Bereitschaft meine offizielle Betreuung zu übernehmen und für die angeregten Diskussionen.

Ich danke Professor Dr. **Wolfgang Hammerschmidt** für die freundliche Aufnahme in seinem Institut, seine Unterstützung und seine stete Diskussionsbereitschaft. Für ihre außerordentliche Hilfe bei allen Zellkulturfragen möchte ich **Dagmar Pich** an dieser Stelle danken.

Ich möchte Prof. Dr. **Ruth Brack-Werner** für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Dr. **Steffen Dietzel** danke ich für seine exzellente Hilfe bei der Etablierung der mikroskopischen Verfahren.

Ein Dankeschön gilt unserem ehemaligen Post-Doc Dr. **Andreas Thomae** für die vielen inspirierenden Diskussionen und seine Hilfe bei den BiFC-Experimenten. **Peer Papior** danke ich für die vielen Gespräche und die Zusammenarbeit in den ChIP-Experimenten. Meinen Laborkollegen Dr. **Jens Baltin** und **Máté Ravasz** möchte ich für das gute Arbeitsklima und die vielen Diskussionen in unseren Seminaren danken. **Krisztina Zeller** danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung bei den vielen Experimenten und die angenehmen Gespräche.

Außerdem danke ich **Rosi** und **Angie** dafür, dass sie uns Doktoranden bei allen Verwaltungsangelegenheiten zur Seite gestanden haben.

Meiner **Familie** danke ich für den Rückhalt und die Motivation die sie mir über die vielen Jahre gegeben haben.

Mein größter Dank gilt meiner Freundin **Daniela** für ihr Verständnis, ihre Liebe und das Probelesen meiner Arbeit. Ohne sie wäre mein Leben ärmer und diese Arbeit um einige Fehler reicher.

8.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Molekulare Studien zur Effizienz und Stabilität EBV-basierender extrachromosomaler Genvektoren“

von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, im März 2009

Manuel J. Deutsch

