

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

Identifizierung von BZLF1-regulierten Promotoren des Epstein-Barr Virus



von

Martin Bergbauer

Dissertation eingereicht am 21. Juli 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2011

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Identifizierung von BZLF1-regulierten Promotoren des Epstein-Barr Virus“

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

München, 21. Juli 2010

Martin Bergbauer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Epstein-Barr Virus (EBV)	1
1.1.1	Klassifizierung, Morphologie und Genomstruktur	1
1.1.2	Biologische Relevanz	4
1.1.3	Der Infektionsweg von EBV	5
1.1.3.1	Die latente Phase	6
1.1.3.2	Die lytische Phase	8
1.2	BZLF1: Der molekulare „Schalter“ zwischen latenter und lytischer Phase	9
1.2.1	Die Regulation des <i>BZLF1</i> -Gens	9
1.2.2	Das <i>BZLF1</i> -Genprodukt	12
1.2.3	BZLF1-regulierte Promotoren	14
1.2.4	BZLF1 in der lytischen Phase einer EBV-Infektion	15
1.2.5	BZLF1 während der frühen Phase einer EBV-Infektion	18
1.3	Epigenetische Regulation des biphasischen Lebenszyklus von EBV	19
1.3.1	DNA-Methylierung	19
1.3.2	Bedeutung der DNA-Methylierung für den Verlauf einer primären EBV-Infektion	23
1.4	Aufgabenstellung	25
2	Material	27
2.1	Oligonukleotide	27
2.2	Plasmide	27
2.3	Antikörper	28
2.4	Bakterienstämme	29
2.5	Eukaryotische Zelllinien	29
2.6	Zellkulturmedien und Additive	30
2.6.1	Medium für prokaryotische Zellen	30
2.6.2	Medien und Additive für eukaryotische Zellen	30
2.7	Puffer und Lösungen	31
2.8	Chemikalien und Enzyme	33
2.9	Kommerzielle Kits	34
2.10	Geräte und Verbrauchsmaterial	35
2.11	Software	36
3	Methoden	37
3.1	Bakterienkultur	37
3.1.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien	37
3.1.2	Transformation von Bakterienzellen	37
3.2	Zellkultur und Analyse von Zellen	38
3.2.1	Zellkulturbedingungen	38

3.2.2	Aufbewahren von eukaryotischen Zellen	39
3.2.3	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	39
3.2.4	Elektroporation von eukaryotischen Zellen	39
3.2.5	Etablierung stabiler Zelllinien	40
3.2.6	Durchflusszytometrie.....	40
3.3	Nukleinsäure-Arbeitstechniken	40
3.3.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	41
3.3.2	Quantitative 'real-time' PCR.....	41
3.3.3	Präparative Plasmidreinigung	43
3.3.4	<i>In vitro</i> DNA-Methylierung	44
3.3.5	Isolierung gesamtzellulärer RNA.....	44
3.3.6	Reverse Transkription von RNA in Einzelstrang-cDNA	45
3.4	Proteinbiochemische-Methoden	46
3.4.1	Präparation von Gesamtzellextrakten	46
3.4.2	Präparation von Kernextrakten	46
3.4.3	Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	47
3.4.4	Gel-Retentionsanalysen.....	48
3.4.5	Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante.....	50
3.4.6	<i>In vitro</i> DNA-Immunpräzipitation mit EBV-DNA	50
3.4.7	Native Chromatin-Immunpräzipitation (nChIP)	52
3.5	Immunfärbung und konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie	52
3.6	Luciferase-Reportergen-Studien.....	53
3.7	EBV-'Microarray'-Analysen.....	54
3.7.1	DNA-Markierung und Hybridisierung	54
3.7.2	Einlesen und Auswertung des 'Microarrays'	55
3.8	'Next-Generation-Sequencing'.....	56
3.8.1	Erstellen einer Sequenzierbibliothek.....	56
3.8.2	'Clusterformation' und DNA-Sequenzierung	57
3.8.3	Bioinformatische Auswertungen.....	59
4	Ergebnisse.....	61
4.1	Gesamtkonzept.....	61
4.2	<i>In vitro</i> DNA-Immunpräzipitation mit methylierter und unmethylierter EBV-DNA	62
4.2.1	Versuchsaufbau	63
4.2.2	Generierung und Analyse der GFP-Fusionsproteine für Immunpräzipitationen	65
4.2.3	<i>In vitro</i> CpG-Methylierung und Fragmentierung der p2089 Maxi-EBV-DNA.....	67
4.2.4	BZLF1 bindet selektiv an bekannte Promotoren <i>in vitro</i>	69
4.2.5	Genomweite EBV-'Microarray'-Analysen	70
4.2.6	Genomweite 'Next Generation Sequencing'-Analysen	75
4.2.7	Schlussfolgerungen der <i>in vitro</i> Bindungsstudien mit rekombinanter EBV-DNA	81
4.3	Intrazelluläres Bindeverhalten von BZLF1 in EBV-positiven Zellen.....	81
4.3.1	Versuchsaufbau	82

4.3.2	Zelllinien	83
4.3.3	GFP:BZLF1 bindet selektiv an ausgewählte Promotoren <i>in vivo</i>	85
4.3.4	Genomweite Analyse der GFP:BZLF1-Bindung <i>in vivo</i> durch 'Next Generation Sequencing'	86
4.3.5	Schlussfolgerungen der <i>in vivo</i> Bindungsstudien mit GFP:BZLF1	90
4.4	Identifizierung von ZRE-Konsensusmotiven nach 'Next Generation Sequencing'	90
4.4.1	Konsensusmotive nach <i>in vitro</i> DIP-seq mit den Algorithmen SISSRs und MEME	91
4.4.2	Konsensusmotive nach nChIP-seq mit den Algorithmen SISSRs, QuEST und MEME	94
4.4.3	Schlussfolgerungen zur Identifizierung der Konsensusmotive	95
4.5	Analyse ausgewählter Promotoren lytischer Gene	96
4.5.1	BZLF1 bindet bevorzugt an methylierte Promotoren lytischer Gene	97
4.5.2	BZLF1 transaktiviert bevorzugt methylierte Promotoren lytischer Gene	102
4.5.3	Expression lytischer Gene in latent infizierten Raji-Zellen nach BZLF1-Induktion	106
4.5.4	Schlussfolgerungen der Charakterisierung lytischer EBV Promotoren	110
4.6	Biochemische und funktionale Charakterisierung ausgewählter ZREs	110
4.6.1	Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von BZLF1 für ZREs und meZREs	111
4.6.2	Funktionale Charakterisierung methylierter und unmethylierter ZREs	116
4.6.3	Schlussfolgerungen zur biochemischen und funktionalen Charakterisierung einzelner ZREs	119
5	Diskussion	120
5.1	Identifizierung von BZLF1-regulierten Promotoren im EBV-Genom	121
5.1.1	Etablierung der <i>in vitro</i> DNA-Immunpräzipitation	122
5.1.2	Etablierung der nativen Chromatin-Immunpräzipitation	125
5.1.3	Identifizierung methylierungsabhängiger, BZLF1-regulierter Promotoren	126
5.1.4	Weitere Bindungseigenschaften von BZLF1	127
5.2	Epigenetische Bedeutung der BZLF1-Bindung an CpG-methyliertes Chromatin	130
5.3	BZLF1-vermittelte Transaktivierung methylierter lytischer Promotoren	131
5.4	Die Rolle von BZLF1 im Verlauf einer lytischen Infektion primärer B-Zellen	132
5.5	Offene Fragen und Ausblick	135
6	Zusammenfassung	137
7	Abkürzungsverzeichnis	139
8	Literaturverzeichnis	142
9	Anhang	158
	Lebenslauf	178

1 Einleitung

1.1 Das Epstein-Barr Virus (EBV)

In den Jahren 1958 bis 1962 beschrieb der englische Chirurg Denis Burkitt ein Lymphom, das in Ost- und Zentralafrika eines der häufigsten Tumorerkrankungen bei Kindern war und heute als Burkitt Lymphom (BL) bekannt ist (Burkitt, 1958). Aufgrund der auffälligen geographischen Verbreitung des BL in Malariagebieten von Äquatorialafrika vermutete Burkitt damals einen Zusammenhang zwischen einem, durch Arthropoden vektorieell übertragenen infektiösen Agens, das an der Pathogenese des Tumors beteiligt ist (Burkitt, 1962). Zu diesem Zeitpunkt kannte man bereits zahlreiche Viren, die bei Tieren Tumore hervorriefen, aber noch kein menschliches Tumovirus. 1964 berichteten der Virologe Anthony Epstein und seine Doktorandin Yvonne Barr sowie unabhängig von ihnen R. J. Pulvertaft von der unbegrenzten Kultivierung einer B-Zelllinie aus Burkitt Lymphomen (Epstein und Barr, 1964a; Pulvertaft, 1964). Im gleichen Jahr gelang Epstein, Anchong und Barr der elektronenmikroskopische Nachweis herpesvirusähnlicher Partikel in einer kleinen Population dieser Zellen (Epstein *et al.*, 1964b). Gertrud und Werner Henle klassifizierten den Erreger als neue Virusgattung und benannten ihn nach seinen Entdeckern als Epstein-Barr Virus (Henle und Henle, 1966).

1.1.1 Klassifizierung, Morphologie und Genomstruktur

EBV ist eines von bisher acht bekannten Herpesviren des Menschen und wird daher auch als Humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnet. EBV ist der klassische Vertreter der γ -Herpesvirinae und wird in die Gattung der Lymphokryptoviren eingeordnet. Es existieren zwei Feldstämme von EBV, Typ 1 und Typ 2 (auch als Typ A und Typ B bezeichnet), die in der menschlichen Bevölkerung zirkulieren. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der EBNA-Gene¹. (Dambaugh *et al.*, 1984; Sample und Kieff, 1990; Sample *et al.*, 1990). Die typische herpesvirale Morphologie von EBV ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die

¹ EBNA: EBV *nuclear antigen*

Virionen haben einen Durchmesser von ca. 120 nm und sind aus mehr als 30 Strukturproteinen zusammengesetzt. Die innere Strukturkomponente (*core*) der Virionen besteht aus einem DNA-Protein-Komplex, welcher von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich eine unstrukturierte Proteinmatrix, die bis zu 20 Virusproteine enthält und als Tegument bezeichnet wird. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, in der virale Glykoproteine, hauptsächlich gp350/220, eingelagert sind (zusammengefasst in Kieff und Rickinson, 2007).

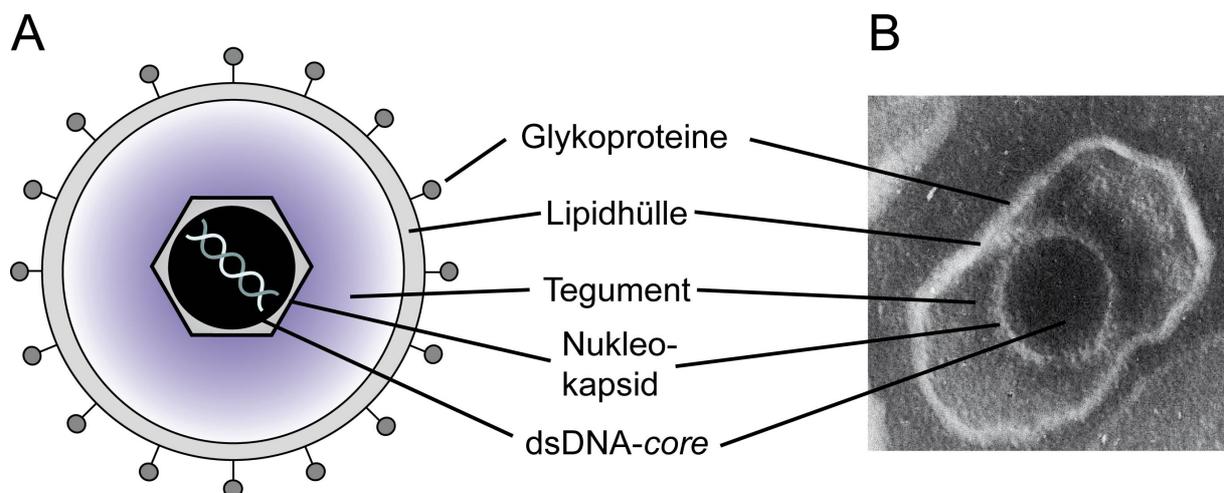


Abb. 1.1: Schematische (A) und elektronenmikroskopische (B) Darstellung eines EBV-Partikels (entnommen aus Gross, 2005). Das Virus ist von einer Lipiddoppelschicht mit eingebetteten viralen Glykoproteinen umhüllt. Darunter befindet sich das Tegument, eine amorphe Proteinmatrix zwischen Lipidhülle und Nukleokapsid. Das ikosaedrische Nukleokapsid enthält das doppelsträngige DNA-Genom (dsDNA).

Wie alle Herpesviren besitzt EBV ein doppelsträngiges DNA-Genom (dsDNA) mit einem molaren GC-Gehalt von ca. 60%, das als lineares Molekül ohne Nukleotidmodifikationen und frei von zellulären Chromatinkomponenten im viralen Kapsid verpackt ist (Dyson und Farrell, 1985; Robertson *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1979). Das 172 kbp umfassende lineare Genom des prototypischen Laborstamms B95.8 (Typ 1) wurde bereits 1984 als erstes Herpesvirus-Genom vollständig sequenziert (Baer *et al.*, 1984). Nach einer Infektion fusionieren die freien Enden der linearen DNA durch homologe Rekombination der terminalen Sequenzwiederholungen (TR, *terminal repeats*) und werden in ein zirkuläres Molekül überführt. In latent infizierten Zellen liegen diese DNA-Moleküle als separate extrachromosomale Moleküle, sogenannten Episomen, im Zellkern vor (Lindahl *et al.*, 1976). Sie sind ähnlich der chromosomalen Zell-DNA nukleosomal verpackt (Dyson und Farrell, 1985; Shaw *et al.*, 1979). Für

EBV konnte in einigen seltenen Fällen auch die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom beobachtet werden (Delecluse *et al.*, 1993).

Neben den terminalen Sequenzwiederholungen, denen auch eine funktionelle Bedeutung bei der Verpackung der DNA in die Viruspartikel zukommt (Hammerschmidt und Sugden, 1989), liegen weitere interne repetitive Sequenzwiederholungen aus 6 bis 12 Einheiten von je 3,1 kbp vor. Diese unterteilen das Genom in einen kurzen (US) und einen langen 'unique' Abschnitt (UL). Das EBV-Genom enthält weitere sogenannte cis-aktive Elemente. Der als *oriP* bezeichnete 'plasmid origin of DNA replication' dient als Replikationsursprung zur Aufrechterhaltung der viralen Latenz (Abs. 1.1.3.1) (Yates *et al.*, 1984). Während einer lytischen Replikation erfolgt eine Amplifizierung der viralen DNA alternativ an einer der beiden homologen 'origin of lytic DNA replication' *oriLyt*-Sequenzen (Hammerschmidt und Sugden, 1988).

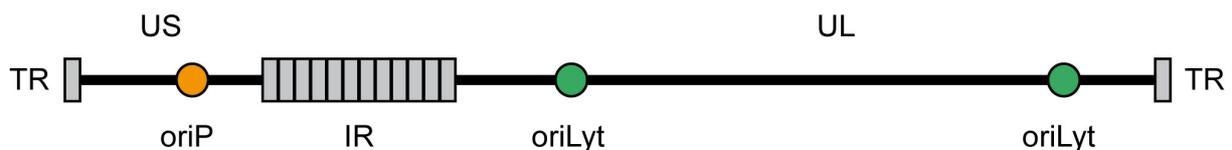


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des linearisierten EBV-Genoms. Gezeigt ist die lineare Genomstruktur von EBV. Abkürzungen: TR, Terminale-Repetitionen; US / UL, kurzer (S) und langer (L) „unique“ Abschnitt; *oriP*, latenter Replikationsursprung; *oriLyt*, lytischer Replikationsursprung; IR, Interne-Repetitionen (modifiziert nach Kieff und Rickinson, 2007).

Mehr als 100 virale Genprodukte werden von ca. 80 Genen kodiert, die teilweise unter Verwendung unterschiedlicher Leseraster überlappen. Ihre Nomenklatur richtet sich nach Lage und Orientierung im Genom und ist historisch auf eine Zerlegung des Genoms durch die Restriktionsendonuklease BamHI zurückzuführen. Die Restriktionshydrolyse resultierte in 29 Fragmenten, die entsprechend ihrer Größe beginnend mit BamHI A (B, C,...a,b bis BamHI h) absteigend sortiert wurden. Zusätzlich spielt die Orientierung des jeweiligen Leserahmens eine Rolle. Entsprechend dieser Nomenklatur befindet sich z. B. der Startpunkt des Gens *BZLF1* (*BZLF1*: BamHI-Z-fragment, Leftward Frame 1) als erster Leserahmen im BamHI-1-Fragment Z in linker Orientierung. Als Standard für diese Nomenklatur diente der Laborstamm B95.8. Im Gegensatz zu allen isolierten Feldstämmen enthält B95.8 eine Deletion von 11,8 kbp, die unter anderem einen der beiden lytischen Replikationsursprünge betrifft.

1.1.2 Biologische Relevanz

EBV ist ein Tumorstoff, das nach Kriterien der WHO (*World Health Organisation*) als Gruppe 1 Karzinogen klassifiziert ist. Ungefähr 95 % der Bevölkerung weltweit sind mit diesem äußerst erfolgreichen humanen Herpesvirus infiziert. Die Übertragung infektiöser Viruspartikel erfolgt meist im frühen Kindesalter durch den Speichel (Gerber *et al.*, 1972) und verläuft in der Regel asymptomatisch. Eine Weitergabe kann aber auch durch Blutprodukte oder Knochenmarktransplantationen erfolgen (Masucci und Ernberg, 1994; Qu und Rowe, 1992). Eine Primärinfektion bei Jugendlichen und Erwachsenen führt in 35-50 % aller Fälle zu einer lymphoproliferativen Erkrankung, die als Infektiöse Mononukleose (IM) bezeichnet wird. Seit 1968 ist bekannt, dass EBV der Erreger dieser Erkrankung ist (Diehl *et al.*, 1968; Henle *et al.*, 1968), die im allgemeinen Sprachgebrauch auch als Pfeiffersches Drüsenfieber oder *'kissing disease'* bekannt ist. Das Krankheitsbild äußert sich in grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Hals- und Kopfschmerzen sowie einer charakteristischen Lymphknotenschwellung. In der Regel verläuft bei immunkompetenten Individuen diese Primärinfektion asymptomatisch bzw. im Falle einer IM selbstlimitierend, da ein intaktes Immunsystem in der Lage ist, eine Vermehrung von EBV zu kontrollieren. In einem Zusammenspiel von humoralen und zellulären Komponenten erfolgt die Bildung von drei Antikörperklassen (IgG, IgM und IgA) gegen lytische Antigene (Thompson und Kurzrock, 2004) sowie eine zytotoxische T-Zell-Reaktion, die zu einer Abnahme der Viruslast führt (Callan *et al.*, 1996; Maini *et al.*, 2000). Der klinische Verlauf einer IM ist daher nicht auf eine Virusreplikation sondern vielmehr auf eine Immunreaktion des Infizierten zurückzuführen.

Neben einer akuten IM ist EBV auch mit einer Reihe maligner Tumore assoziiert, an denen weltweit ca. 100000 Menschen pro Jahr sterben. Hauptsächlich handelt es sich dabei um B-Zell-Lymphome wie das Burkitt-Lymphom (Kennedy *et al.*, 2003) oder das Hodgkin-Lymphom (Weiss *et al.*, 1989). Besonders in Fällen von geschwächter Immunabwehr, wie z. B. bei einer HIV-Infektion oder Immunsuppression nach Transplantationen (PTLD, Posttransplantationslymphom) (Rooney *et al.*, 1995) kann EBV an der Entstehung solcher B-Zell-Tumore eine wesentliche Rolle spielen. Weiterhin liegt eine EBV-Assoziation u. a. bei dem endemischen Nasopharynxkarzinom (NPC) (Liebowitz, 1994) und seltenen T-Zelllymphomen vor (Harabuchi *et al.*, 1990).

Für Virologen, Zellbiologen und Onkologen stellt EBV ein wertvolles Modellsystem dar. EBV bietet neben den Aspekten einer latenten herpesviralen Infektion auch die Möglichkeit wegen seiner transformierenden Eigenschaften grundlegende Mechanismen der Tumorgenese zu untersuchen. Ebenso wird EBV als Modellsystem für die chromosomale Replikation höherer Eukaryotenzellen angesehen. Die viralen Episome werden genau wie die chromosomale DNA einmal pro Zellzyklus von der zellulären Replikationsmaschinerie repliziert und während der Mitose gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt (Kieff und Rickinson, 2007). Das Genom von EBV ist in den Virionen frei von Nukleotidmodifikationen und zellulären Chromatinkomponenten, erfährt aber im Laufe einer latenten Infektion eine chromatinähnliche Konfiguration und hochgradige Methylierung (Dyson und Farrell, 1985; Kalla *et al.*, 2010; Minarovits *et al.*, 1994; Minarovits *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1979). In Kombination mit der übersichtlichen Genomgröße von ca. 180 kbp kann EBV auch als Modellsystem zum Verständnis der Etablierung epigenetischer Marker, wie z. B. der Histonbesetzung, Histonmodifikationen oder der bisher weitgehend unverstandenen Etablierung einer *de novo* DNA-Methylierung beitragen.

1.1.3 Der Infektionsweg von EBV

Die Adsorption viraler Partikel an B-Lymphozyten *in vivo* und *in vitro* findet hauptsächlich durch die Interaktion des zellulären Komplementrezeptors CD21 und dem viralen Glykoprotein gp350/220 der EBV-Hüllmembran statt (Nemerow *et al.*, 1987). Zusätzlich erfolgt eine Interaktion zwischen dem humanen Leukozytenantigen (HLA) Klasse II Molekül und dem viralen Proteinkomplex, bestehend aus den Glykoproteinen gp85, gp25 und gp42 (Borza und Hutt-Fletcher, 2002; Molesworth *et al.*, 2000). Die Viruspartikel werden endozytotisch aufgenommen, das Viruskapsid ins Zytoplasma freigesetzt (Tanner *et al.*, 1987) und vermutlich entlang des Mikrotubulnetzwerkes zum Kernporen-Komplex transferiert (Kieff und Rickinson, 2007).

Wahrscheinlich repliziert das Virus bei einer initialen Infektion im Schleimhautepithel des Rachens, wodurch es zum ersten Kontakt von B-Zellen und den freigesetzten Nachkommenviren in den lymphoiden Organen des Oropharynx kommt. Allerdings ist die Identität der primären Zielzellen bei einer Erstinfektion *in vivo* bislang nicht eindeutig geklärt. In frühen Studien wurden Epithelzellen im

Oropharynx als der Hauptort der lytischen Virusvermehrung postuliert (Allday und Crawford, 1988; Sixbey *et al.*, 1984). Gestützt wird diese Hypothese u. a. durch eine EBV-Übertragung durch den Speichel (Gerber *et al.*, 1972) sowie einem Virusnachweis in epithelialen Geweben, wie z. B. in Nasopharynxkarzinomen und bei oraler Haar-Leukoplakie (Greenspan *et al.*, 1985). Spätere Arbeiten konnten diese Beobachtungen jedoch nicht bestätigen, sondern dokumentieren eine lytische EBV-Amplifikation ausschließlich in mukosalen B-Lymphozyten (Anagnostopoulos *et al.*, 1995; Karajannis *et al.*, 1997; Niedobitek *et al.*, 1997). Zudem zeigte eine Auswahl primärer Epithelzellen eine geringe Permissivität für eine EBV-Infektion (Feederle *et al.*, 2007). Neuere Studien gehen deshalb davon aus, dass eine direkte Primärinfektion über epithelständige B-Zellen im Oropharynx verläuft (Faulkner *et al.*, 2000). Es ist bislang unklar, ob die Infektion von Epithelzellen einen obligaten Schritt im Replikationszyklus von EBV darstellt und wird deshalb weiterhin kontrovers diskutiert. *In vitro* infiziert EBV B-Lymphozyten aus allen Kompartimenten und Differenzierungsstadien, von pro-B-Zellen bis Gedächtnis-B-Zellen, mit vergleichbarer Effizienz (Ehlin-Henriksson *et al.*, 2003).

1.1.3.1 Die latente Phase

Im Gegensatz zur lytisch verlaufenden Primärinfektion ist eine latente Vermehrung von EBV dadurch gekennzeichnet, dass keine Produktion infektiöser Viruspartikel stattfindet. Vier verschiedene Stadien einer latenten Infektion werden durch ihr spezifisches virales Genexpressionsmuster definiert (Tab. 1.1). In den ersten Tagen nach einer Infektion erfolgt eine Aktivierung ruhender B-Zellen zu proliferierenden lymphoblastoiden Zellen (Pope *et al.*, 1968) durch die Expression der Latenz III-Gene. Dieser Vorgang wird als „Wachstumstransformation“ bezeichnet. In Folge einer T-Zellantwort des Immunsystems werden die proliferierenden, infizierten B-Zellen größtenteils eliminiert. Einige dieser Zellen entkommen der Immunantwort, indem sie die Expression ihrer latenten Gene reduzieren (Latenz I/II) oder nahezu vollständig unterdrücken (Latenz 0) (Young und Rickinson, 2004). Die Expression der *EBNA*-Gene erfolgt im Verlauf einer Infektion von wechselnden Promotoren, da eine zunehmende DNA-Methylierung des viralen Genoms für eine Reprimierung dieser regulatorischen Elemente sorgt (zusammengefasst in Takacs *et al.*, 2010). Auf diese Weise etabliert EBV eine äußerst erfolgreiche und lebenslange Persistenz im Gedächtnis-B-Zellkompartiment des Wirtsorganismus (Babcock *et al.*, 1998).

Gedächtnis-B-Zellen zirkulieren zwischen dem Waldeyerschen Ring und dem peripheren Blut und können durch eine fehlende EBV-Antigenpräsentation vom Immunsystem nicht mehr erkannt und eliminiert werden (Laichalk *et al.*, 2002). Ob EBV diese Zellen direkt infiziert oder einen Umweg über eine Infektion naiver B-Zellen und deren Differenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen nimmt ist unklar (Thorley-Lawson, 2001). In seropositiven gesunden Individuen ist nach einer Primärinfektion durchschnittlich eine von 10^3 bis 10^5 B-Zellen in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs²) EBV-positiv (Miyashita *et al.*, 1995; Tierney *et al.*, 1994). Werden diese Zellen kultiviert, wachsen sogenannte lymphoblastoide Zelllinien (LCLs³) aus. LCLs entstehen auch bei einer EBV-Infektion humaner primärer B-Zellen *in vitro*. EBV erzielt durch die Expression der „Latenz III-Gene“ eine Wachstumstransformation und sorgt für eine unbegrenzte Proliferation dieser Zellen. Zur Aufrechterhaltung einer latenten Infektion wird das EBV-Genom gemeinsam mit der zellulären DNA einmal pro S-Phase (Adams, 1987) repliziert und während der Mitose auf die Tochterzellen verteilt (Kirchmaier und Sugden, 1995). Dazu wird neben dem viralen cis-Element *oriP*, das als Ausgangspunkt einer latenten Replikation dient, zusätzlich das virale Protein EBNA1 benötigt (Yates *et al.*, 1984; Yates *et al.*, 1985).

Tabelle 1.1: Expressionsmuster viraler Gene in den vier verschiedenen Latenzstadien.

EBNA (EBV nukleäre Antigene); LMP (Latente Membranproteine); EBERs (EBV kodierte RNAs); LCLs (Lymphoblastoide Zelllinien); PTLD (Posttransplantationale lymphoproliferative Erkrankung).

Latenzprofil	Exprimierte Gene und Transkripte	Assoziierte Zelltypen
Latenz 0	EBV-kodierte microRNAs, EBERs	periphere Gedächtnis-B-Zellen
Latenz I	<i>EBNA1</i> , EBV-kodierte microRNAs, EBERs	Burkitt-Lymphom
Latenz II	<i>EBNA1</i> , <i>LMP1</i> , <i>2A</i> , <i>2B</i> , EBV-kodierte microRNAs, EBERs	Hodgkin-Lymphom, Keimzentrum-B-Zellen,
Latenz III	<i>EBNA1</i> , <i>2</i> , <i>3A</i> , <i>3B</i> , <i>3C</i> , <i>LP</i> , <i>LMP1</i> , <i>2A</i> , <i>2B</i> EBV-kodierte microRNAs, EBERs	Naive und Keimzentrum- B-Zellen, LCLs, PTLDs

² PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*

³ LCL: *lymphoblastoid cell line*

1.1.3.2 Die lytische Phase

Ziel der lytischen Infektion ist die Produktion und Freisetzung infektiöser Viruspartikel zur Aufrechterhaltung der EBV-Infektion in der Bevölkerung, aber auch zur Sicherstellung bzw. Erneuerung des eigenen EBV-Reservoirs im Wirtsorganismus. Der lytische Zyklus verläuft, wie bei allen Herpesviren, nach dem Schema einer dreiteiligen Genexpressionskaskade (Kief und Rickinson, 2007). In einer ersten Phase erfolgt die Expression der viralen *'immediate early'* (IE) Gene *BZLF1* und *BRLF1*, die unabhängig von einer *de novo* Synthese anderer Virusproteine aktiviert werden. Ob *BRLF1* wirklich zur IE-Genklasse zählt wird jedoch in Frage gestellt (Amon *et al.*, 2004). Für eine vollständige Induktion der lytischen Phase aber sind beide viralen Transaktivatoren unabdingbar (Feederle *et al.*, 2000). Sie leiten durch die Aktivierung der sogenannten *'early'* (E) Gene den zweiten Abschnitt der geordneten Genexpression ein. Bei den ca. 30 Genprodukten der E-Phase handelt es sich in erster Linie um virale Proteine, die für den Aufbau der viralen lytischen Replikationsmaschinerie (Fixman *et al.*, 1992; Fixman *et al.*, 1995) sowie für den Ablauf der viralen DNA-Replikation benötigt werden. Die Replikation der EBV-DNA findet in spezifischen Replikations-Kompartimenten im Zellkern statt (Tsurumi *et al.*, 2005) und wird am lytischen Replikationsursprung (*oriLyt*) initiiert (Fixman *et al.*, 1995; Hammerschmidt und Sugden, 1988). Nachdem das virale Genom 100- bis 1000-fach amplifiziert wurde, erfolgt schließlich die Expression der späten *'late'* (L) Gene, die hauptsächlich für virale Strukturproteine kodieren, welche für die Assemblierung infektiöser EBV-Partikel benötigt werden.

In vitro kann der lytische Zyklus latent infizierter Zellen durch exogene Stimuli reaktiviert werden. Dazu zählen z. B. eine Quervernetzung des B-Zellrezeptors (Takada, 1984; Tovey *et al.*, 1978) oder auch eine chemikalische Induktion durch Phorbolster wie TPA (zur Hausen *et al.*, 1978). Der Übergang in die lytische Phase basiert dabei auf der Aktivierung zellulärer Signalkaskaden, die schließlich zu einer Transaktivierung des multifaktoriell regulierten *BZLF1*-Promotors führt und damit eine *BZLF1*-Expression (Abs. 1.2.1) bewirkt. Obwohl eine lytische Replikation regelmäßig in gesunden EBV-positiven Individuen stattfindet (Golden *et al.*, 1973), ist bislang wenig über den Zelltyp und die erforderlichen Signale einer Aktivierung der lytischen Phase *in vivo* bekannt. Es wird angenommen, dass latent infizierte Gedächtnis-B-Zellen im Blut- und Lymphkreislauf zirkulieren und die lytische Phase durch eine periodische Reaktivierung in Folge einer Antigen-vermittelten Aktivierung des

B-Zellrezeptors erfolgt (Takada *et al.*, 1986; Tovey *et al.*, 1978). Laichalk und Kollegen postulieren hingegen, dass eine lytische Reaktivierung dem Prozess einer Differenzierung von Gedächtnis-B-Zellen zu Plasmazellen zugrunde liegt (Laichalk und Thorley-Lawson, 2005). Diese Arbeiten werden von Studien unterstützt, die zeigen, dass der Plasmazell-spezifische Transkriptionsfaktor XBP1⁴ allein (Sun und Thorley-Lawson, 2007) oder in Kombination mit der Proteinkinase D (Bhende *et al.*, 2007) den lytischen Zyklus in B-Zellen induzieren kann.

1.2 BZLF1: Der molekulare „Schalter“ zwischen latenter und lytischer Phase

Das virale *BZLF1*-Genprodukt wurde von mehreren Gruppen als das lytische Schlüsselprotein für einen Übergang von der latenten zur lytischen Phase identifiziert (Countryman *et al.*, 1987; Countryman und Miller, 1985; Takada *et al.*, 1986). In einigen latent infizierten Zellen ist die alleinige Expression von *BZLF1* ausreichend, um den lytischen Zyklus *in vitro* zu induzieren (Rooney *et al.*, 1989). In der Literatur wird das *BZLF1*-Genprodukt als BZLF1, Zta, ZEBRA, Z, oder EB1 bezeichnet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das *BZLF1*-Genprodukt als BZLF1 bezeichnet.

1.2.1 Die Regulation des *BZLF1*-Gens

Der *BZLF1*-Promotor

Angesichts der tragenden Rolle von *BZLF1* ist seine transkriptionelle Regulation von entscheidender Bedeutung. Während der latenten Phase muss die Expression einer strengen Reprimierung unterliegen, dennoch ist es im Zuge einer lytischen Reaktivierung erforderlich, eine transkriptionelle Aktivierung von *BZLF1* zu gewährleisten. Die Promotorregion von –221 bis +10 bp (bezogen auf den Transkriptionsstart) des *BZLF1*-Gens enthält mehrere cis-aktive Elemente (Z1-ZV), an die zelluläre Faktoren und auch BZLF1 selbst binden können, um die Regulation des Promotors positiv oder negativ zu beeinflussen. Abbildung 1.3 zeigt eine schematische Darstellung des *BZLF1*-Promotors (Zp), in dem die wichtigsten regulatorischen Elemente und ihre bindenden Faktoren vermerkt sind.

⁴ XBP1: *x-box binding protein 1*

Die Repression während der Latenz erfolgt u. a. durch das zelluläre Protein ZEB1⁵, das in der Region -17 bis +10 an die beiden ZV Elemente bindet (Kraus *et al.*, 2003). Zusätzlich befinden sich im distalen Bereich des Promotors von Position -221 bis -554 (in Abbildung 1.3 nicht gezeigt) eine Reihe weiterer negativer regulatorischer Elemente (Liu *et al.*, 1998; Montalvo *et al.*, 1991; Schwarzmann *et al.*, 1994), an die z. B. der Transkriptionsfaktor YY1 bindet dem sowohl reprimierende als auch transaktivierende Eigenschaften zugesprochen werden (Montalvo *et al.*, 1995). Eine initiale Transaktivierung des *BZLF1*-Promotors während der lytischen Phase erfolgt hauptsächlich durch zelluläre Transkriptionsfaktoren. An die vier AT-reichen Elemente ZI (ZIA-D) binden mit unterschiedlicher Affinität die Transkriptionsfaktoren Sp1, Sp3 und MEF2⁶ (Flemington und Speck, 1990d; Liu *et al.*, 1997a; Liu *et al.*, 1997b; Shimizu und Takada, 1993). Das ZII-Element (-47 bis -60), das Homologie zum CRE⁷-/AP-1⁸-Motiv besitzt, wird von den Transkriptionsfaktoren der ATF-Familie⁹, CREB und C/EBP¹⁰ gebunden (Flamand und Menezes, 1996; Huang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2004). Bei den ZIII-Elementen handelt es sich um autoregulatorische Elemente, an die BZLF1 bindet (Flemington und Speck, 1990a).

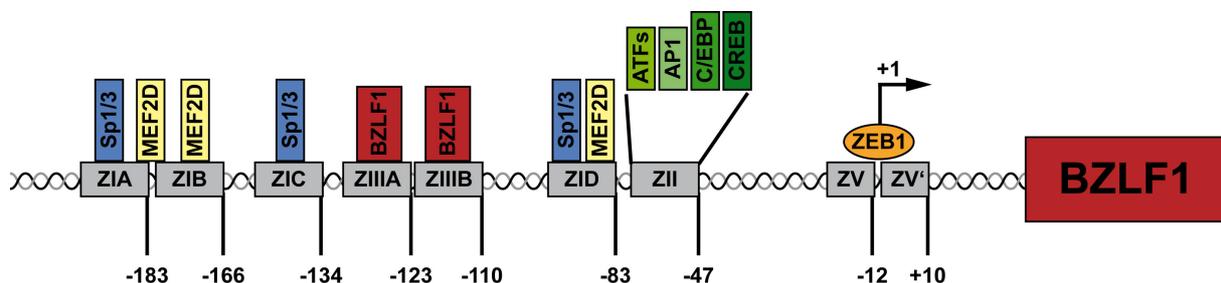


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung des *BZLF1*-Promotors (Zp). Die regulatorischen Elemente ZIA-ZV sind in Form grauer Kästchen mit ihren Nukleotidkoordinaten im Verhältnis zum Transkriptionsstart vermerkt (nicht skaliert). Die farbigen Rechtecke symbolisieren die verschiedenen zellulären Transkriptionsfaktoren und ihre Bindung an die cis-aktiven Elemente.

Ein akzeptiertes Modell postuliert, dass die Aktivierung des *BZLF1*-Promotors nach einem Zwei-Schritt-Mechanismus erfolgt (Flemington und Speck, 1990a). In der Latenz sorgen zelluläre Faktoren für ein niedriges basales Expressionsniveau von *BZLF1*, das nicht ausreicht, um die lytische Expressionskaskade in Gang zu setzen. Exogene Stimuli aktivieren ein Netzwerk zellulärer Signaltransduktionskaskaden, die

⁵ ZEB: zinc finger E-box binding factor 1

⁶ MEF2D: monocyte enhancer factor 2D

⁷ CRE: cAMP responsive element

⁸ AP-1: activator protein 1

⁹ ATF: activating transcription factor

¹⁰ C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein

wiederum für die Aktivierung und Rekrutierung der zellulären Transkriptionsfaktoren sorgen (Amon *et al.*, 2004; Campbell, 1999). Das Binden dieser Proteine an die regulatorischen Elemente ZI und ZII sorgt für eine erhöhte *BZLF1*-Expression. In einem zweiten Schritt erfolgt eine positive, autoregulative Rückkopplung (*'positive feedback loop'*) durch eine Bindung von *BZLF1* an die ZIII Elemente, um eine effiziente Induktion der lytischen Phase zu erzielen. Zusätzlich kann der *BZLF1*-Promotor auch auf epigenetischer Ebene reguliert werden. Posttranslationale Histonmodifikationen sorgen für eine Reprimierung bzw. Aktivierung (siehe Kapitel 1.3) des Promotors in den verschiedenen Infektionsphasen von EBV (Binne *et al.*, 2002; Davie, 2003; Jenkins *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2007).

Die *BZLF1*-Transkripte

Die Transaktivierung des proximalen *BZLF1*-Promotors (*Zp*) liefert ein monocistronisches Transkript, bestehend aus drei Exons mit einer Länge von 1,0 kb, von dem *BZLF1* während der IE-Phase translatiert wird (Manet *et al.*, 1989). In der späten Phase einer lytischen EBV-Infektion konnte eine zweite *BZLF1*-Spleißvariante der 1,0 kb langen mRNA detektiert werden (Lau *et al.*, 1992). Dieser Variante fehlt das zweite Exon, welches für die DNA-Bindedomäne kodiert (*BZLF1* [-DNA]). Die Funktion dieser zweiten Spleißvariante ist bisher nicht geklärt. Die Transkription des *BZLF1*-Gens kann aber nicht nur vom beschriebenen *Zp* erfolgen, sondern auch vom *BRLF1*-Promotor gestartet werden. Die Transaktivierung des distalen *BRLF1*-Promotors resultiert in einer bicistronischen 4,0 kb langen *BRLF1* & *BZLF1* prä-mRNA. Fakultative Spleißvorgänge generieren eine 3,3 kb mRNA und eine 0,8 kb mRNA. Von der gespleißten 3,3 kb mRNA können sowohl das *BRLF1*- als auch das *BZLF1*-Genprodukt translatiert werden (Manet *et al.*, 1989). Allerdings ist eine *BZLF1*-Translation von dieser bicistronischen mRNA sehr uneffizient (Chang *et al.*, 1998; Le Roux *et al.*, 1996). Die kurze 0,8 kb mRNA kodiert für das Fusionsprotein RAZ, das sich aus *BRLF1* und *BZLF1* zusammensetzt (RAZ, engl.: *BRLF1 and BZLF1*). RAZ fehlt die N-terminale Transaktivierungsdomäne von *BZLF1* und wird *in vitro* eine dominant-negative Funktion zugesprochen. *BZLF1*:RAZ Heterodimere inhibieren die transaktivierenden Eigenschaften von *BZLF1* und stellen möglicherweise einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus dar (Furnari *et al.*, 1994; Segouffin *et al.*, 1996). Eine schematische Darstellung der Transkripte ist in Abbildung 1.4 gezeigt.

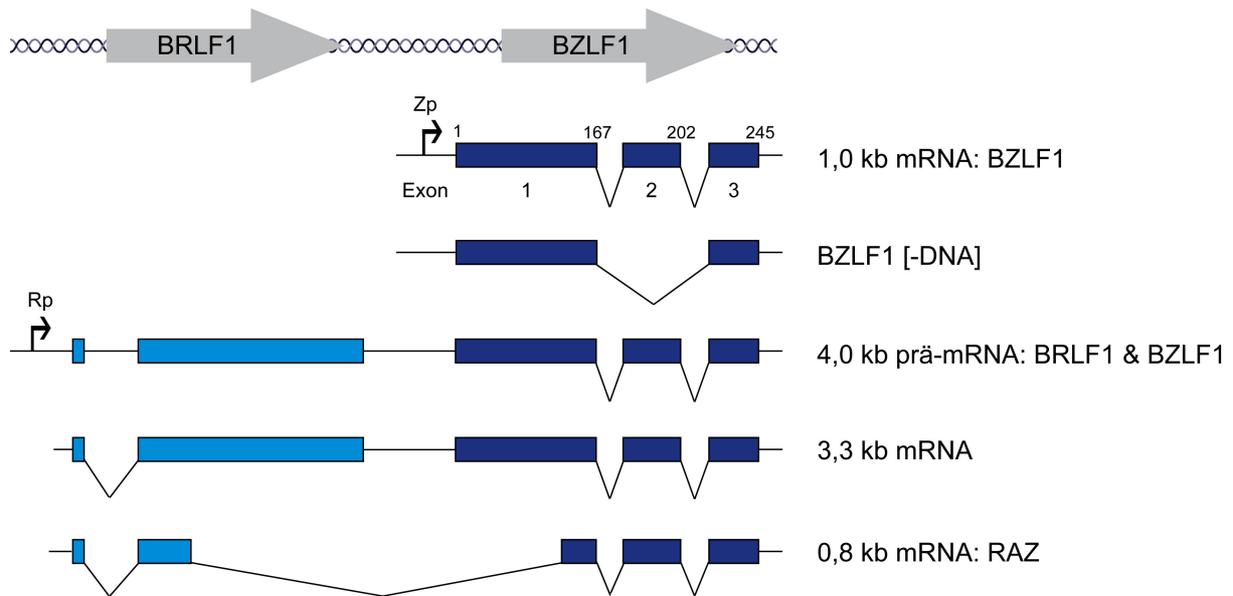


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der *BZLF1*-Transkripte. Die Transkription der monocistronischen *BZLF1*-mRNA erfolgt vom *BZLF1*-Promotor (Zp) und resultiert in einer gespleißten mRNA mit einer Länge von ca. 1,0 kb. Zusätzlich startet die Transkription einer prä-mRNA vom *BRLF1*-Promotor (Rp), welche in eine 3,3 kb mRNA und in die 0,8 kb mRNA gespleißt wird. Die 0,8 kb mRNA kodiert für das dominant-negative Fusionsprotein RAZ. Die Exonkomposition von *BZLF1* (dunkelblau) und *BRLF1* (hellblau) ist in Form von Balken dargestellt (nach Chang et al., 2001).

1.2.2 Das *BZLF1*-Genprodukt: BZLF1

BZLF1 ist ein DNA-bindendes Protein, das aufgrund seiner Homologie zur Familie der zellulären bZIP¹¹-Transkriptionsfaktoren gezählt wird. Prominente Vertreter sind unter anderem die Mitglieder der AP-1 Familie c-Jun und c-Fos sowie CREB¹² und C/EBP α (Farrell et al., 1989; Kouzarides et al., 1991). BZLF1 wird von drei Exons kodiert und hat eine Länge von 245 Aminosäuren (AS) (Biggin et al., 1987). Das modulare Protein kann in fünf funktionelle Domänen unterteilt werden (Abb. 1.5): (i) Eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD; AS 1-167), (ii) eine regulatorische Domäne (RD; AS 168-177), (iii) eine zentrale DNA-Bindedomäne (DBD; AS 178-194), (iv) eine 'coiled-coil' Dimerisierungsdomäne (DD; AS 195-227) und (v) eine zusätzliche C-terminale Aktivierungsdomäne (AD, AS 228-245), die auch an der Stabilisierung der 'coiled-coil' DNA-Bindung beteiligt ist (Chang et al., 1990a; Chi und Carey, 1993; Farrell et al., 1989; Flemington und Speck, 1990c; Kouzarides et al., 1991; McDonald et al., 2009; Miller et al., 1993; Packham et al., 1990; Petosa et al., 2006).

¹¹ bZIP: *basic leucine zipper*

¹² CREB: *CRE binding protein*



Abb. 1.5.: Schematische Darstellung des BZLF1-Proteins. Gezeigt ist das gesamte BZLF1-Protein mit seinen fünf verschiedenen Domänenstrukturen und deren Aminosäurekoordinaten: die Transaktivierungsdomäne (TAD) in weiß, die regulatorische Domäne (RD) in grün, die DNA-Binde-Domäne (DBD) in blau, die Dimerisierungsdomäne (DD) in rot und die zusätzliche Aktivierungsdomäne am C-terminalen Ende in grau.

Trotz der ausgeprägten Homologie zum Protoonkogen c-Fos fehlt BZLF1 das für bZIP-Proteine typische Wiederholungsmotiv an heptad Leuzinresten (Chang *et al.*, 1990b; Farrell *et al.*, 1989; Flemington und Speck, 1990b; Kouzarides *et al.*, 1991). Das Fehlen dieser Aminosäuren wird durch eine zusätzliche C-terminale Struktur kompensiert, welche die 'coiled-coil' Interaktion des Homodimers stabilisiert. Die etwas kürzere 'coiled-coil' Domäne von BZLF1 sowie hydrophobe Wechselwirkungen verhindern vermutlich die Ausbildung von Heterodimeren mit anderen bZIP-Proteinen (Chang *et al.*, 1990b; Kouzarides *et al.*, 1991; Petosa *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2004). BZLF1 bindet daher ausschließlich als Homodimer (Reinke *et al.*, 2010) an eine Reihe divergenter Sequenzmotive, die in der Literatur als BZLF1-gebundene Elemente (ZREs, BZLF1 *responsive elements*) bezeichnet werden. BZLF1 ist auch in der Lage, spezifisch an die sequenzähnlichen kanonischen Konsensusmotive der AP-1- oder C/EBP-Transkriptionsfaktoren zu binden (Flemington und Speck, 1990d; Kouzarides *et al.*, 1991; Lieberman *et al.*, 1990). Die genannten zellulären Transkriptionsfaktoren können nicht an die identifizierten ZREs binden (Lieberman *et al.*, 1990). Allerdings zeigt BZLF1 eine geringere DNA-Bindeaffinität als andere bZIP-Proteine (Hicks *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2001).

Bhende und Kollegen konnten erstmals zeigen, dass BZLF1 bevorzugt oder ausschließlich zwei virale ZREs im Promotor des IE-Gens *BRLF1* bindet und transaktiviert, wenn deren CpG-Dinukleotide in methylierter Form vorliegen (Bhende *et al.*, 2004). Auf molekularer Ebene liegt bislang keine eindeutige Erklärung für diese bevorzugte Interaktion mit CpG-methylierten Sequenzmotiven vor, da die Kristallstrukturanalyse der BZLF1-DNA-Interaktion an einer CpG-freien DNA-Sequenz untersucht wurde (Petosa *et al.*, 2006). BZLF1-Mutationsanalysen der DNA-Bindedomäne schlagen vor, dass den Aminosäuren Serin-186 und Cystein-189 eine entscheidende Rolle bei einer BZLF1-Interaktion mit methylierten ZREs

zukommt (Karlsson *et al.*, 2008a; Schelcher *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). In den letzten Jahren wurden weitere methylierungssensitive ZREs in einem viralen und auch in einem zellulären Promotor identifiziert (Tab. 1.2 und 1.3) (Dickerson *et al.*, 2009; Heather *et al.*, 2009). Diese einzigartige Eigenschaft konnte bisher bei keinem anderen Transkriptionsfaktor beobachtet werden und wird zusammen mit der möglichen biologischen Bedeutung in Abschnitt 1.3 ausführlich behandelt.

1.2.3 BZLF1-regulierte Promotoren

BZLF1 ist ein klassischer Transkriptionsfaktor, der nicht nur Virologen fasziniert, sondern auch als Modellsystem zur Aufklärung grundlegender Mechanismen, wie z. B. der Aktivierung prototypischer RNA-Polymerase II Promotoren dient (Carey *et al.*, 1992). Durch direkte Bindung an ZREs, die 'upstream' der TATA-Box eines BZLF1-regulierten Promotors liegen, rekrutiert und stabilisiert BZLF1 durch seine N-terminale Transaktivierungsdomäne die allgemeinen zellulären Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIA (Carey *et al.*, 1992; Lieberman und Berk, 1991). Die Bildung dieses sogenannten DA-Komplex ist eine entscheidende biochemische Schlüsselreaktion, die Voraussetzung für eine transkriptionelle Aktivierung des Promotors ist (Chi und Carey, 1996; Lee und Struhl, 1995).

BZLF1-regulierte Promotoren beinhalten in der Regel mehrere ZREs oder TREs (Abb. 1.3). Aufgrund ihrer divergenten Sequenzkomposition zeigen ZREs jeweils unterschiedliche Affinitäten für BZLF1 (Lehman *et al.*, 1998). Eine BZLF1-Bindung an mehrere ZREs sorgt für eine synergistische transkriptionelle Promotoraktivierung (Carey *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1992). Systematische Studien *in vitro* zeigen, dass eine BZLF1-vermittelte Transaktivierung (i) von der Affinität des Proteins zum jeweiligen ZRE, (ii) von der Affinität des Minimalpromotors zum generellen Transkriptionskomplex sowie (iii) von der Anzahl der ZREs abhängig ist. Ein hypothetisches Modell postuliert, dass alle drei Faktoren zu einem Schwellenwert beitragen können, der bei einer Überschreitung zu einer finalen transkriptionellen Aktivierung des Promotors führt (Lehman *et al.*, 1998). Dieses Modell korreliert mit vorangegangenen Promotorstudien des zellulären Gens *c-Jun*. Obwohl in diesem Promotor ein einzelnes TRE enthalten war, konnte eine BZLF1-vermittelte Transaktivierung nicht detektiert werden. Kotransfektionsexperimente von *c-Jun* und *BZLF1* zeigen, dass in Anwesenheit von BZLF1 der *c-Jun* regulierte Promotor

inhibiert wird. Es wurde postuliert, dass BZLF1 an das TRE im *c-Jun* Promotor bindet und somit nicht für den „eigentlichen“ Transaktivator c-Jun zugänglich ist und einer negativen Regulation unterliegt. Zum heutigen Zeitpunkt ist klar, dass dieses Modell um epigenetische Regulationsmechanismen erweitert werden muss. Es ist bekannt, dass die Interaktion von BZLF1 und dem Koaktivator CBP¹³ mit seiner intrinsischen Histonacetylaseaktivität (Ogryzko *et al.*, 1996) zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivierung BZLF1-regulierter Promotoren führt (Adamson und Kenney, 1999; Zerby *et al.*, 1999).

1.2.4 BZLF1 in der lytischen Phase einer EBV-Infektion

BZLF1 ist der molekulare Schalter, dessen alleinige Expression ausreicht, um den Übergang von der latenten zur lytischen, replikativen Phase in einigen latent infizierten Zelllinien (Rooney *et al.*, 1989) zu induzieren (Abs. 1.1.3.2). Zu diesem Zweck übt das multifunktionale Protein BZLF1 durch seine DNA-bindenden Eigenschaften zwei wesentliche Funktionen aus: (i) Als klassischer Transaktivator bindet BZLF1 an Zielsequenzen in Promotoren viraler lytischer Gene und aktiviert deren Expression. Neben der positiven Autoregulation des eigenen Promotors (Flemington und Speck, 1990a) erfolgt zunächst die Aktivierung des zweiten IE-Transkriptionsfaktors BRLF1 (Holley-Guthrie *et al.*, 1990; Ragoczy und Miller, 1999). Im Anschluss reguliert BZLF1 individuell oder synergistisch mit BRLF1 (Feederle *et al.*, 2000) die Expression früher lytischer Gene wie z. B. *BMRF1* oder *BMLF1/BSLF2*, und leitet so den kontrollierten Ablauf der lytischen Phase ein (Buisson *et al.*, 1989; Kenney *et al.*, 1992; Quinlivan *et al.*, 1993; Rooney *et al.*, 1989; Urier *et al.*, 1989). (ii) BZLF1 aktiviert durch die Bindung an vier ZRE-Motive innerhalb des lytischen Replikationsursprungs dessen Replikatorfunktion (Schepers *et al.*, 1993; Schepers *et al.*, 1996). Zusammen mit sechs weiteren viralen Proteinen (BALF5, BMRF1, BALF2, BBLF4, BSLF1 und BBLF2/3) sowie den zellulären Transkriptionsfaktoren ZBP-89 und Sp1 (Baumann *et al.*, 1999) rekrutiert BZLF1 einen Komplex, der für die Replikation der viralen DNA sorgt (Fixman *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1998; Schepers *et al.*, 1993; Schepers *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Alle bisher identifizierten ZREs viraler Zielpromotoren sind in der Übersichtstabelle 1.2 dargestellt. Bindemotive mit methylierungssensitiven ZREs und ihre CpG-Dinukleotide sind gekennzeichnet.

¹³ CBP: *CREB binding protein*

Tabelle 1.2: Identifizierte BZLF1-‘responsive’ Elemente (ZRE) in Promotoren viraler Gene.

BZLF1 ist in der Lage, durch eine direkte DNA-Bindung an ZREs, Promotoren viraler, lytischer Gene zu transaktivieren und den Ablauf der lytischen Phase einzuleiten. Die Sequenzmotive der regulierten Promotoren viraler Gene und deren Funktion im Verlauf einer lytischen Replikation sind vermerkt.

virales Gen	ZRE im Promotor	Beschreibung/Funktion	Referenz
<i>BZLF1</i>	ATTAGCAAT TGAGCCA	kodiert für einen TF, lytisches Schlüsselprotein: initiiert den Beginn der lytischen Phase in latent infizierten Zellen	Urier <i>et al.</i> , 1989 Flemington und Speck, 1990
<i>BRLF1</i>	TGAGCCA TGAGCGA TCGCGAA	kodiert für einen TF, steuert gemeinsam mit BZLF1 den Ablauf der lytischen Phase	Packham <i>et al.</i> , 1990 Bhende <i>et al.</i> , 2004
<i>BMRF1</i>	TGAGCAA TGAGTCA	kodiert für DNA-Polymerase-assoziierten Faktor, virales DNA-Replikationsprotein	Kenney <i>et al.</i> , 1992 Quinlivan <i>et al.</i> , 1993
<i>BMLF1/ BSLF2</i>	TGACTCA	kodiert für viralen mRNA-Exportfaktor, Transaktivator, essenziell für eine produktive Virussyntese	Rooney <i>et al.</i> , 1989 Farrell <i>et al.</i> , 1989 Urier <i>et al.</i> , 1989 Buisson <i>et al.</i> , 1989
<i>BALF2</i>	TGAGTAA ACGTCAGTT	kodiert für Einzelstrang-DNA Bindeprotein, virales DNA-Replikationsprotein	Hung und Liu, 1999 Nakayama <i>et al.</i> , 2009
<i>BFRF1</i>	TGAGCCA	kodiert für virales Kernmembranprotein, Reifung und Transport von Virionen	Granato <i>et al.</i> , 2006
<i>BHLF1 BHRF1 oriLyt</i>	TGTGTAA TGAGCAA TGACACA TGACACA TGAGCAA TGACACA TGTGCAA	- BHLF1: Funktion unbekannt - BHRF1: kodiert für antiapoptotisches Bcl-2 Homolog - beide Promotorregionen überlappen mit dem lytischen Replikationsursprung	Lieberman und Berk, 1990 Chavier <i>et al.</i> , 1989
<i>BRRF1</i>	TCGCCCG TGAGCGT	kodiert für viralen TF, verstärkt <i>BRLF1</i> -Expression	Dickerson <i>et al.</i> , 2009
Fp	TGACTCA	lytischer Promotor mit bisher unbekanntem Genprodukt	Zetterberg <i>et al.</i> , 2002

Aufgrund der Bindung von BZLF1 an Konsensussequenzmotive der zellulären Transkriptionsfaktoren AP-1 oder C/EBP ist es naheliegend, dass BZLF1 auch die Expression zellulärer Gene reguliert. Alle bisher beschriebenen, zellulären Promotoren und ihre ZREs sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst.

Eine Vielzahl von Studien belegt, dass BZLF1 nicht nur zelluläre Gene auf transkriptioneller Ebene reguliert, sondern durch eine physikalische Protein-Protein-Interaktionen zelluläre Signalwege beeinflussen kann. Die Manipulation der Zellzyklusphase durch virale Proteine ist eine konservierte Eigenschaft vieler Herpesviren (Flemington, 2001). In Epithelzelllinien wurde beobachtet, dass BZLF1 den Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase arretiert. Die molekulare Basis ist bisher nicht

eindeutig geklärt, es wird jedoch postuliert, dass BZLF1 durch eine Induktion und Interaktionen mit den zellulären Proteinen p53, C/EBP α sowie den cyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren p21/WAF-1/CIP-1 und p27/KIP-1 den Ablauf der Zellzyklusphasen unterbricht (Cayrol und Flemington, 1995; Cayrol und Flemington, 1996; Wu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass in primären Keratinozyten und in Raji-Zellen nach ektopischer *BZLF1*-Expression ein Übergang in die S-Phase stattfindet, der auf die Zellzyklus-assoziierten Proteine E2F1, Cdc25 und Cyclin E zurückzuführen ist (Guo *et al.*, 2010; Mauser *et al.*, 2002).

Tabelle 1.3: Identifizierte BZLF1-‘responsive’ Elemente (ZRE) in Promotoren zellulärer Gene.

BZLF1 ist in der Lage durch eine direkte DNA-Bindung an ZREs, zelluläre Promotoren zu transaktivieren, um Einfluss auf Prozesse der infizierten Wirtszelle zu nehmen. Die Sequenzmotive der regulierten Promotoren zellulärer Gene und deren Funktionen sind vermerkt.

zelluläres Gen	ZRE im Promotor	Beschreibung/Funktion	Referenz
<i>c-Fos</i>	TGTGTAA TGCGTCA TGAGTGT	TF der AP-1 Familie, Protoonkogen, Proliferation	Flemington und Speck, 1990b
<i>c-Jun</i>	TGACATC	TF, AP-1 Familie, Protoonkogen, Proliferation	Sato <i>et al.</i> , 1992
<i>IL-8</i>	GTTGCAA	Interleukin-8, Chemokin,	Hsu <i>et al.</i> , 2008
<i>IL-10</i>	TGATTGG TTGCTTA TATTGTA TGTGTAG TTTGCAA	Interleukin-10, Immunsuppressor, reduziert möglicherweise anti-virale Mechanismen	Mahot <i>et al.</i> , 2003
<i>IL-13</i>	TGAGTAA	Interleukin-13, B-Zell-Proliferation	Tsai <i>et al.</i> , 2009
<i>Egr1</i>	GGAGCGA GGAGCAA	TF, ‘early growth response gene 1’	Chang <i>et al.</i> , 2006; Hether <i>et al.</i> , 2009
<i>CIITA</i>	TGAGCCA TGTGCAA TGACATC	Kotransaktivator, Regulation MHCII-Expression	Li <i>et al.</i> , 2009

Ebenso ist BZLF1 in der Lage in immunologische Prozesse einzugreifen. Eine Bindung an ZREs in den Promotoren einiger Interleukine (Tab. 1.3) führt zur Expression dieser Immunsuppressoren (Hsu *et al.*, 2008; Mahot *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2009). Zudem inhibiert es die konstitutive Expression von MHC¹⁴-Molekülen durch die Reprimierung des MHC-Klasse II Transaktivators CIITA (Li *et al.*, 2009). Ferner wurde gezeigt, dass BZLF1 die zellulären IFN γ - und TNF α -Signalkaskaden

¹⁴ MHC: major histocompatibility complex

inhibiert (Morrison *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2001). Eine Regulation der Transkriptionsfaktoren c-Fos, c-Jun und Egr1¹⁵ (Chang *et al.*, 2006; Flemington und Speck, 1990b; Heather *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 1992), aber auch eine direkte Interaktion mit zellulären Transaktivatoren der RAR¹⁶-Familie und der p65-Untereinheit von NFκB¹⁷ (Gutsch *et al.*, 1994; Sista *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996) erweitern das Regulationsrepertoire von BZLF1.

Die gesammelten Fakten zeigen, dass BZLF1 während der lytischen Phase nicht nur an der direkten Regulation viraler Gene und der Amplifikation der viralen DNA beteiligt ist, sondern zelluläre Prozesse manipuliert, die eine erfolgreiche Generierung infektiöser Viruspartikel sicherstellen.

1.2.5 BZLF1 während der frühen Phase einer EBV-Infektion

Das Virus zeigt einen biphasischen Infektionszyklus, der aus einer latenten und einer lytischen, replikativen Phase besteht (Abs 1.1.3). Während die späte latente Phase und die lytische Reaktivierung latent infizierter Zellen *in vitro* sehr gut charakterisiert sind, ist bislang wenig über die Ereignisse in den ersten Tagen einer EBV-Infektion primärer humaner B-Lymphozyten bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass während einer frühen Infektion eine limitierte Zahl latenter Gene exprimiert wird, die für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer strikten latenten Infektion sorgen (Kieff und Rickinson, 2007). Weiterhin wurde postuliert, dass die Expression latenter Genprodukte wie LMP2A die Induktion der lytischen Phase inhibiert (Miller *et al.*, 1995). Die Reprimierung lytischer Gene in der frühen Phase einer EBV-Infektion wird als Grundvoraussetzung für die Etablierung dieser strikten Latenz angesehen, da eine Virussynthese mit dem Überleben der Wirtszellen nicht vereinbar ist. Unerwartete Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen zeigen, dass einige lytische Gene in den ersten Tagen nach einer EBV-Infektion primärer B-Zellen exprimiert werden (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Kalla *et al.*, 2010; Katsumura *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2007; Zeidler *et al.*, 1997). Auch das für die lytische Genexpression unentbehrliche IE-Gen *BZLF1* kann bereits wenige Stunden nach Infektion auf transkriptioneller Ebene detektiert werden (Wen *et al.*, 2007). Alle infizierten Zellen exprimieren *BZLF1* und unterstützen die Proliferation primärer ruhender B-Zellen.

¹⁵ Egr1: *early growth response gene 1*

¹⁶ RAR: *retinoic acid receptor*

¹⁷ NFκB: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*

Die Expression von *BZLF1* ist wenige Tage nach Infektion kaum noch nachweisbar und aus den infizierten B-Zellen entstehen latent infizierte LCLs (Abs. 1.1.3.1). Die Morphogenese infektiöser Viruspartikel findet in diesem Infektionsstadium nicht statt, da entscheidende virale Strukturkomponenten, wie z. B. das Glykoprotein gp350/220, nicht exprimiert werden (Kalla *et al.*, 2010; Sugden, 1984). Es scheint, als ob es trotz einer initialen Expression lytischer Gene einschließlich *BZLF1* zum Abbruch der lytischen Genexpressionskaskade kommt. Dieses Szenario wurde daher als abortiver lytischer Zyklus definiert (Kalla *et al.*, 2010).

1.3 Epigenetische Regulation des biphasischen Lebenszyklus von EBV

Als epigenetische Prozesse lassen sich stabile und reversible Mechanismen beschreiben, die zur Änderung der Aktivität eines Genlokus führen, ohne dass die DNA-Sequenz beeinflusst wird. Epigenetische Regulationsmöglichkeiten betreffen vor allem DNA-abhängige Mechanismen wie Genexpression, DNA-Replikation und DNA-Reparatur. Diese Prozesse können gezielt durch die DNA-Methylierung, die Nukleosomen-Positionierung, den Einbau von Histonvarianten sowie durch eine posttranslationale Modifikation von Histonen reguliert werden. Die verschiedenen Ebenen der epigenetischen Regulation sind keine isolierten Mechanismen, sondern interagieren und bilden auf diese Weise ein komplexes Netzwerk (Bernstein *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2007). Die im Kern replizierende DNA von EBV liegt in infizierten Zellen in einer chromatinähnlichen Konfiguration vor (Dyson und Farrell, 1985; Shaw *et al.*, 1979) und erfüllt somit auch die Voraussetzungen für eine epigenetische Regulation.

1.3.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist eine kovalente, chemische Kopplung von Methylgruppen an bestimmte Nukleotide der DNA. In Säugern findet eine DNA-Methylierung ausschließlich am 5-Kohlenstoffatom (5^mC) der Base Cytosin statt. 3 % bis 8 % aller Cytosinreste sind hier methyliert (Jeltsch, 2002). 5^mC ist die älteste bekannte epigenetische Modifikation und liegt nahezu ausschließlich in Cytosin-phosphatidyl-Guanosin (CpG) Dinukleotiden vor. Wenige Ausnahmen, wie z. B. 5^mC -CpT oder

5^m-CpA, wurden in stabil integrierten Adenovirussequenzen (Toth *et al.*, 1990) oder in endogenen LINE-Sequenzen¹⁸ (Woodcock *et al.*, 1997) beobachtet. Kürzlich wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu fötalen Fibroblasten (99,98%) in embryonalen Stammzellen ca. 25% aller 5^mC in einer CpG-freien Dinukleotid-Konfiguration vorliegen und möglicherweise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz dieses Zelltyps spielen (Lister *et al.*, 2009).

CpG-Dinukleotide sind im Säuger genom statistisch unterrepräsentiert, aber zu ca. 70 % methyliert (Gama-Sosa *et al.*, 1983). Eine mögliche Erklärung liegt in einer spontanen Desaminierung von Methylcytosin zu Thymin, die im Gegensatz zur Desaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil nicht von den DNA-Reparatursystemen erkannt wird. Zudem würde eine Desaminierung zu einer steten Abnahme der CpG-Methylierung führen (Suzuki und Bird, 2008). Allerdings befinden sich im Genom Bereiche mit hoher CpG-Dichte (55 %) mit einer Länge von mindestens 500 bp, die als CpG-Inseln bezeichnet werden. CpG-Inseln befinden sich vorwiegend in Promotorbereichen (60 %) und liegen häufig in unmethylierter Form vor. Eine Methylierung dieser CpG-Inseln führt zur Reprimierung der Promotoren (Bernstein *et al.*, 2007; Hoelzer *et al.*, 2008). Wie CpG-Inseln ihren unmethylierten Status aufrechterhalten ist bisher unklar.

Die Übertragung der Methylgruppen (CH₃) auf Cytosine wird durch die Proteinfamilie der DNA-Methyltransferasen (Dnmt) unter Verwendung von S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor katalysiert. Bisher sind in Säugern vier DNA-Methyltransferasen (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a und Dnmt3b) bekannt. Dnmt1 überträgt das Methylierungsmuster replizierter, hemimethylierter DNA auf den neu synthetisierten Strang und wird daher als *maintenance*-Dnmt bezeichnet. Dnmt3a und Dnmt3b sorgen als *de novo* Methyltransferasen für die Methylierung unmethylierter DNA. Dnmt2 weicht von den zuvor genannten Methyltransferasen ab, da es wie eine prokaryotische Dnmt aufgebaut ist, der die N-terminale regulatorische Domäne fehlt (Dong *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass die drei Enzyme Dnmt1 und Dnmt3a und Dnmt3b essenziell für eine embryonale Entwicklung sind, da entsprechende '*knock-out*'-Mäuse einen postnatalen, letalen Phänotyp zeigen (Li *et al.*, 1992). Die Funktion von Dnmt2 ist umstritten. *In vitro* konnte eine Methylierung von tRNAs beobachtet werden, daher ist ihre Funktion als Dnmt fraglich (Goll *et al.*, 2006). Die DNA-Methylierung führt zu einer allgemeinen

¹⁸ LINE: *long interspersed element*

Reprimierung der Genexpression (*'silencing'*) und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der embryonalen Entwicklung (Okano *et al.*, 1999), der genomischen Prägung (*'genomic imprinting'*) und der X-Chromosom-Inaktivierung (Goto und Monk, 1998). Eine verstärkte Methylierung von Tumorsuppressorgenen kann zu einer Vielzahl menschlicher Tumorarten führen (Plass und Soloway, 2002).

Molekulare Regulation der Genexpression

Eine CpG-Methylierung kann theoretisch durch zwei verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen. Die Einführung von Methylgruppen blockiert die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie c-Myc/Myn, CREB/ATF, E2F1 und NFκB (Singal und Ginder, 1999; Watt und Molloy, 1988) oder anderen regulatorischen Proteinen wie CTCF¹⁹ (Bell *et al.*, 1999). Transkriptionelle Repressorproteine, wie z. B. MeCP1/2²⁰ oder die Proteinfamilie MBD1-4²¹, binden sequenzunabhängig mithilfe spezifischer Proteindomänen an CpG-methylierte DNA. Diese Proteine rekrutieren Korepressor-Komplexe oder Histon-modifizierende Enzyme und sorgen so für eine Kompaktierung der DNA, was zu einem reprimierten Chromatinstatus führt (Laird, 2005). Abbildung 1.6 (entnommen aus Laird, 2005) zeigt eine schematische Übersicht, wie DNA-Methylierung und Chromatinstruktur ein Netzwerk bilden und zu einer epigenetischen Stilllegung der Transkription führen können. Die grundlegende, sich wiederholende Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, in dem ~ 150 Basenpaare der DNA linksgängig um ein Histonoktamer, bestehend aus jeweils zwei der *'core'*-Histone H2A, H2B, H3 und H4, gewunden sind (Arents *et al.*, 1991). Das Linker-Histon H1 ist an einer weiteren Verdichtung der DNA beteiligt. Jedes *'core'*-Histon besteht im Wesentlichen aus einer globulären Domäne und einem flexiblen Aminoterminal, dessen hochkonservierte Primärstruktur an der Oberfläche des Nukleosoms präsentiert wird (Luger *et al.*, 1997). Dieser sogenannte Histone-*'tail'* ist Gegenstand von zahlreichen posttranslationalen Modifikationen, wie z. B. einer Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung (Allfrey *et al.*, 1964). Daneben wurde die Anheftung von Ubiquitin-SUMO²²- und poly-ADP-Ribose-Einheiten als weitere Modifikationen beschrieben. Sie führen entweder zu einer dichteren Verpackung oder einer Auflockerung der Chromatinstruktur. Die von Strahl und Allis begründete „*Histon-Code-Hypothese*“

¹⁹ CTCF: *CCCTC-binding factor (zinc finger protein)*

²⁰ MeCP: *methyl cytosine binding proteins*

²¹ MBD: *methyl-CpG-binding domain*

²² SUMO: *small ubiquitin-related modifier*

beschreibt eine zusätzliche Regulation der Chromatinstruktur (Strahl und Allis, 2000). Danach führen die verschiedenen Histonmodifikationen jeweils zur spezifischen Rekrutierung regulatorischer Proteine. Histone spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Verpackung der DNA, sondern können auch Einfluss auf die Regulation biologischer Prozesse wie Transkription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur nehmen. Transkriptionell aktives Chromatin ist häufig mit Histonmodifikationen, wie z. B. einer Methylierung des Histon H3 Lysin-4 (H3K4me) oder einer generellen Histonacetylierung, assoziiert. Eine CpG-Methylierung und/oder reprimierende Histonmarker, wie z. B. eine Methylierung des Histon H3 Lysin-9 (H3K9me), sorgen für die Bindung von Repressorproteinen, die zu einer kondensierten Chromatin-konfiguration führen. Die Zugänglichkeit zellulärer Transkriptionsfaktoren und die Bindung der Transkriptionsmaschinerie ist entscheidend für die transkriptionelle Aktivierung. Das Zusammenspiel aus DNA-Methylierung, Histonmodifikation sorgt letztendlich für die physikalischen Eigenschaften des Chromatins (Laird, 2005).

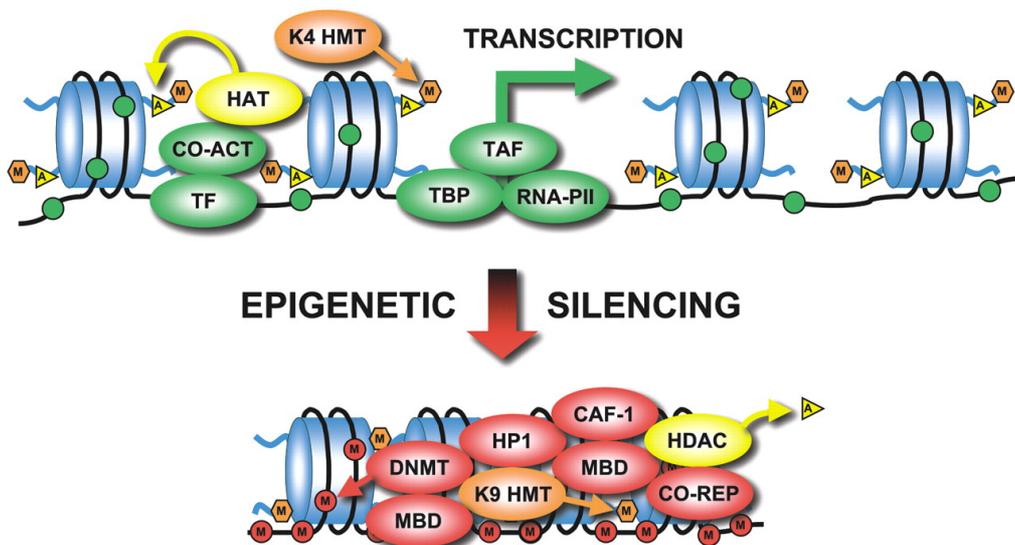


Abb. 1.6.: Schematische Darstellung der Interaktion von DNA-Methylierung und Histonmodifikation bei einer epigenetischen Regulation der Transkription. Die Abbildung (oben) zeigt eine offene Chromatinstruktur eines transkriptionell aktiven Gens, in der die DNA (schwarz) in einem gelockerten Abstand um die Histonoktamere (blaue Zylinder) gewunden ist. Dieser Chromatinzustand ermöglicht die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die u. a. mit regulatorischen Proteinen wie Koaktivatoren (Co-Act), Histonacetylasen (HAT) oder Histonmethyltransferasen (HMT) interagieren. Diese sorgen für eine weitere Auflockerung der Chromatinstruktur und ermöglichen die Bindung der zellulären Transkriptionsmaschinerie (TBP, TATA-bindender Faktor; TAF TBP-assoziierter Faktor; RNA-Pol II, RNA Polymerase II). Im Gegensatz dazu führt die Einführung einer CpG-Methylierung zur Rekrutierung regulatorischer Proteine (DNMT, MBD, CO-REP, Co-Repressor; CAF-1, Chromatin Assemly Faktor-1, HDAC, Histon Deacetylase). Die Assoziation dieser Proteine bewirkt eine Kondensierung des Chromatins, die eine transkriptionelle Aktivierung ausschließt (entnommen aus Laird, 2005).

1.3.2 Bedeutung der DNA-Methylierung für den Verlauf einer primären EBV-Infektion

Bereiche ausgedehnter CpG-Methylierung sind in Transposons und repetitiven Sequenzen zu finden, die bis zu 50 % des Humangenoms ausmachen. Eine Methylierung verhindert vermutlich die Mobilität dieser DNA-Elemente im Genom (Cordaux und Batzer, 2009). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass sich die DNA-Methylierung aus einem zellulären Abwehrmechanismus entwickelt hat, der ursprünglich zur Stilllegung von Fremd-DNA diente, die z. B. nach einer Virusinfektion vorliegt (Yoder *et al.*, 1997). Auch im Verlauf einer EBV-Infektion erfährt die virale DNA, die im Kapsid von Virionen unmodifiziert vorliegt, eine hochgradige Methylierung und Chromatinisierung (Dyson und Farrell, 1985; Kalla *et al.*, 2010; Minarovits *et al.*, 1994; Minarovits *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1979). Mithilfe dieser epigenetischen Modifikationen sorgt die Wirtszelle für eine Reprimierung der viralen Genexpression, da eine Aktivierung der lytischen Phase mit dem Überleben der Zelle nicht zu vereinbaren ist. Für eine erfolgreiche Etablierung der latenten Phase müssen jedoch einige virale Genloci dieser Reprimierung entzogen werden, da sie für die Aufrechterhaltung einer stabilen latenten Phase notwendig sind. Beispielsweise sind der Ursprung der latenten DNA-Replikation (*oriP*) oder der *EBNA1*-Promotor unmethyliert oder mit transkriptionell aktiven Histonmodifikationen assoziiert (Day *et al.*, 2007; Takacs *et al.*, 2010; Tao *et al.*, 1998). *In vivo* dient die Methylierung zusätzlich der Regulation verschiedener Latenzstadien, um in den Gedächtnis-B-Zellen, dem Reservoir der viralen Persistenz, einer Immunantwort zu entkommen.

Zur Aufrechterhaltung einer EBV-Infektion in der Bevölkerung und zur Erneuerung des EBV-Reservoirs im infizierten Wirtsorganismus muss jedoch von Zeit zu Zeit eine produktive lytische Phase eingeleitet werden, die für eine Freisetzung infektiöser Viruspartikel sorgt. EBV muss also in der Lage sein, die von der Wirtszelle übertragene epigenetische Barriere zu überwinden. Seit einiger Zeit ist bekannt, dass BZLF1 bevorzugt an den lytischen Schlüsselpromotor *BRLF1* bindet und diesen transaktiviert, wenn zwei von drei ZREs mit CpG-Dinukleotiden in methylierter Form vorliegen (Bhende *et al.*, 2004). Diese einzigartige Eigenschaft von BZLF1, sequenzspezifisch an methylierte und damit „stillgelegte“ Promotoren zu binden und diese transkriptionell zu aktivieren, widerspricht allen bisherigen Dogmen

der epigenetischen Regulation der Genexpression. Vermutlich wurde diese Eigenschaft im Verlauf einer stetigen Koevolution erworben oder von zellulären Proteinen übernommen, von denen diese Funktion bisher nicht bekannt ist. Für die Biologie von EBV ist diese Eigenschaft von besonderer Bedeutung:

1. Als molekularer Schalter, der die lytische Phase einleitet, ist BZLF1 in der Lage den zellulären epigenetischen Block der DNA-Methylierung zu umgehen und durch eine Aktivierung methylierter Promotoren die lytische Phase zu initiieren und damit die Freisetzung infektiöser Viruspartikel zu gewährleisten (Bhende *et al.*, 2004; Kalla *et al.*, 2010).
2. Obwohl *BZLF1* unerwartet während der frühen Phase einer Infektion exprimiert wird, bleibt die Produktion infektiöser Viruspartikel aus. Die virale DNA ist in der frühen Phase unmethyliert und verhindert eine BZLF1-vermittelte Aktivierung der lytischen Phase (Kalla *et al.*, 2010). Es scheint, als ob dieses „Unvermögen“, unmethylierte virale, lytische Promotoren zu aktivieren, höchstwahrscheinlich zur Infektionsstrategie von EBV gehört, um zunächst eine latente Infektion zu etablieren. Damit erreicht das Virus eine lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus. Eine vollständige Aktivierung der lytischen Genexpressionskaskade in dieser frühen Phase ist nicht mit dem Überleben der Wirtszelle zu vereinen.

Die Methylierung der viralen DNA nach Infektion humaner, primärer B-Zellen *in vitro* ist ein sehr langsamer, stetiger Prozess, der mehrere Wochen umfasst und dem Virus ermöglicht, für die Etablierung der Latenz zu sorgen (Kalla *et al.*, 2010). Höchstwahrscheinlich ist EBV selbst an der Steuerung der Methylierung beteiligt, da das latente Membranprotein LMP1 zelluläre Signalwege aktiviert und Dnmt1 induziert (Tsai *et al.*, 2006). Aus unveröffentlichten Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe wissen wir, dass auch Dnmt3a nach Infektion primärer humaner B-Zellen transkriptionell aktiviert wird. Der Mechanismus ist bisher ungeklärt (Schmeinck, persönl. Mitteilung).

Zusammengefasst scheint es, als ob die Methylierung der viralen DNA eine unabdingbare Voraussetzung für die Etablierung der Latenz ist, aber dennoch keine Restriktion für die Aktivierung der lytischen Phase darstellt. BZLF1 ist durch sein außergewöhnliches Bindeverhalten in der Lage, den epigenetischen Block zu überwinden und initiiert den lytischen Zyklus (Kalla *et al.*, 2010).

1.4 Aufgabenstellung

Das Epstein-Barr Virus ist ein außergewöhnliches Herpesvirus. Im Gegensatz zu anderen Vertretern dieser Familie bleibt nach einer Infektion permissiver Zellen eine initiale Neusynthese produktiver Nachkommenviren aus. Erst nach der Etablierung einer latenten Phase, die mit einer lebenslangen Persistenz einhergeht, findet die Produktion infektiöser Viruspartikel statt. Diese zweiteilige Infektionsstrategie macht EBV vermutlich zu einem der erfolgreichsten humanen Viren überhaupt.

Fundamentale Arbeiten meiner Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine CpG-Methylierung der viralen DNA für den biphasischen Lebenszyklus unabdingbar ist (Kalla *et al.*, 2010). Die DNA-Methylierung, die heute als eine der bedeutendsten epigenetischen Modifikationen angesehen wird, diente vermutlich ursprünglich zur „Verteidigung“ von Zellen gegen Fremd-DNA, da sie allgemein zu einer Reprimierung der viralen Genexpression führt (Yoder *et al.*, 1997). Im Laufe einer stetigen Koevolution hat EBV diese zellulären epigenetischen Mechanismen adaptiert und für die Kontrolle und Regulation seines Infektionszyklus genutzt. Eine Publikation einer anderen Arbeitsgruppe weist auf den molekularen Zusammenhang hin, der diesem biologischen Phänomen zugrunde liegt (Bhende *et al.*, 2004). BZLF1 ist das virale „Schalterprotein“, das als Transkriptionsfaktor sequenzspezifisch an lytische virale Promotoren bindet und deren Expression induziert. Verschiedene BZLF1-Bindemotive sind in mehreren viralen Promotoren lytischer Gene beschrieben. Die Bindung von BZLF1 wird als Voraussetzung für die Aktivierung dieser Gene angenommen. Der Promotor des *BRLF1*-Gens, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert der zusammen mit BZLF1 die lytische Phase koordiniert, enthält drei ZREs (Abb. 1.7). Zwei dieser ZREs werden bevorzugt (ZRE2) oder ausschließlich (ZRE3) von BZLF1 gebunden, wenn sie in methylierter Form vorliegen (Bhende *et al.*, 2004) und sorgen für eine methylierungsabhängige Transaktivierung des Promotors durch BZLF1.

Bisherige Arbeiten lassen die Hypothese zu, dass der Methylierungsstatus des *BRLF1*-Promotors die alleinige epigenetische Barriere bildet, die die Ausführung der lytischen Phase dieses Herpesvirus blockiert und die latente Infektion erlaubt (Bhende *et al.*, 2004; Karlsson *et al.*, 2008a; Karlsson *et al.*, 2008b). Diese Hypothese wurde in meiner Arbeitsgruppe mithilfe einer genetisch veränderten *BRLF1*-Promotormutante überprüft (Abb. 1.7). Die methylierungssensitiven ZREs

(ZRE2 und ZRE3) des Promotors wurden durch nicht-CpG-haltige ZREs aus anderen lytischen Promotoren ersetzt, die die CpG-Dinukleotide durch Punktmutationen umwandeln (Abb. 1.7). Der Phänotyp dieser Virusmutante zeigte keine Unterschiede zum parentalen EBV.

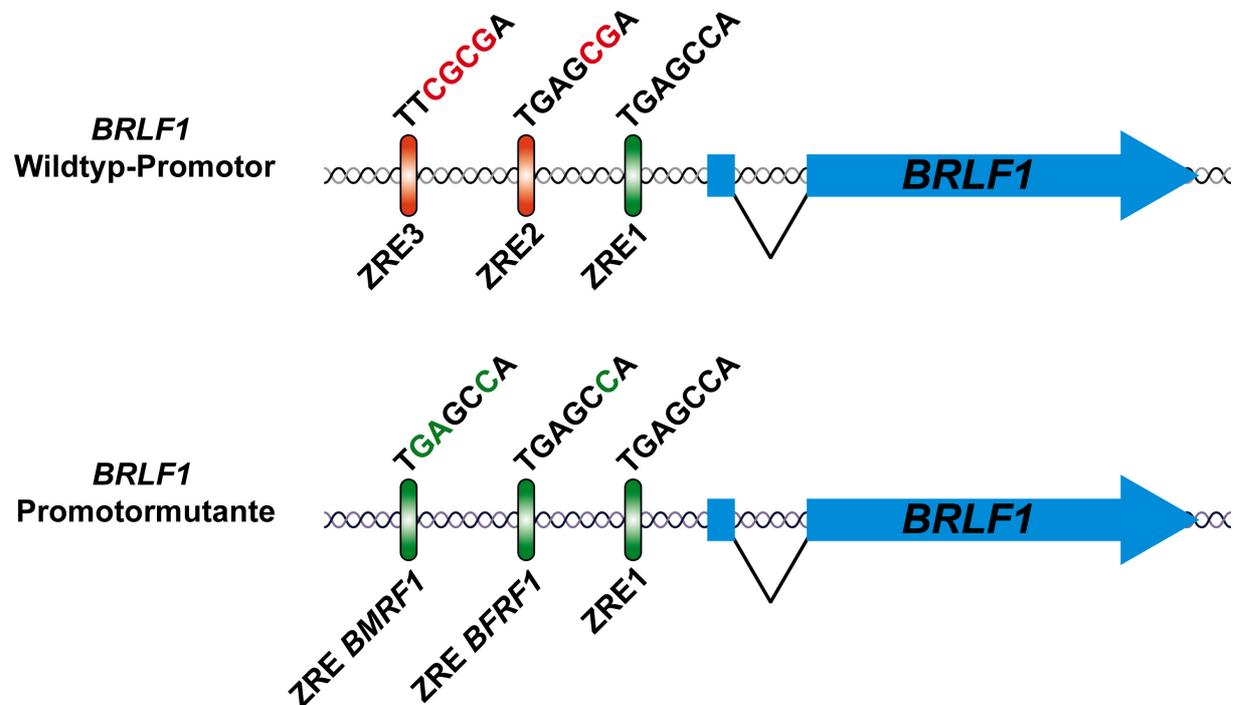


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der *BRLF1*-Promotormutante im Vergleich zum Wildtyp-Promotor. Bisher sind insgesamt drei ZREs im Promotor von *BRLF1* bekannt. Während das ZRE1 keine CpG-Dinukleotide trägt und somit methylierungsunabhängig von BZLF1 gebunden wird, befinden sich in ZRE2 und ZRE3 CpG-Dinukleotide. ZRE2 wird bevorzugt, ZRE3 ausschließlich in methylierter Form von BZLF1 gebunden (*BRLF1*-Wildtyp-Promotor). Für Infektionsexperimente wurde eine *BRLF1*-Promotormutante generiert, deren methylierungsabhängige ZREs durch ZREs aus den Promotoren von *BMRF1* und *BFRF1* ausgetauscht wurden (modifiziert nach Kalla *et al.*, 2010).

Die Arbeitshypothese meiner Promotionsarbeit geht deshalb davon aus, dass es mindestens einen, vielleicht aber mehrere Promotoren geben muss, an die BZLF1 nur dann bindet, wenn sie in methylierter Form vorliegen. Es war meine Aufgabe, in einem genomweiten Ansatz möglichst alle BZLF1-regulierten Promotoren und cis-aktiven ZREs zu identifizieren, die von BZLF1 strikt methylierungsabhängig transaktiviert werden. Von besonderem Interesse war es, Sequenzmotive innerhalb des EBV-Genoms zu identifizieren, an die BZLF1 nur dann bindet, wenn sie CpG-methyliert sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die globale Bedeutung der Methylierung des viralen Genoms für die Induktion der lytischen Phase von EBV zu verstehen.

2 Material

2.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang hinterlegt.

2.2 Plasmide

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Plasmide im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Auflistung zeigt alle verwendeten Plasmide als Auszug der Datenbank der Abteilung Genvektoren.

Plasmid	Beschreibung
pEGFP-C1	pCMV:GFP (Clontech)
p0509	pCMV:BZLF1 (Hammerschmidt und Sugden, 1988)
p2089	Wildtyp Maxi-EBV: F-Plasmid (pMBO131) mit eGFP Gen und Hygromycin-Resistenzgen in B95.8 DNA (Delecluse <i>et al.</i> , 1998)
p3925	pCMV:Strep II-FLAG (Gloeckner <i>et al.</i> , 2007)
p3695	pPGK:Renilla, Luciferaseplasmid (Promega)
p3927	pCMV:GFP:BZLF1
P3928	pCMV:Strep II-FLAG:BZLF1
p3862	pRTS-2-BZLF1-GFP (AGV)
p4247	pCMV:GFP:NLS
p4283	CpG freies Luciferase-Reporterplasmid (Klug und Rehli, 2006) Ausgangsvektor für die Einführung viraler Promotoren
p4295	BMRF1-Luciferase-Reporterplasmid
p4296	BBLF4-Luciferase-Reporterplasmid
p4303	BRLF1-Luciferase-Reporterplasmid
p4322	BBLF2/3-Luciferase-Reporterplasmid
p4323	BALF2-Luciferase-Reporterplasmid
p4344	BSLF2/BMLF1-Luciferase-Reporterplasmid

Plasmid	Beschreibung
p4345	BALF5-Luciferase-Reporterplasmid
p4346	BSLF1-Luciferase-Reporterplasmid
p4408	BHRF1-Luciferase-Reporterplasmid
p4409	BHLF1-Luciferase-Reporterplasmid
p4410	BZLF1-Luciferase-Reporterplasmid
p4358	CpG freies Luciferase-Reporterplasmid, EF1A Minimal Promotor (Klug und Rehli, 2006)
p4372	BBLF4-ZRE A pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4373	BBLF4-ZRE B pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4374	BMRF1-ZRE A pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4375	BMRF1-ZRE B pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4376	BMLF1-ZRE AP1 pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4377	BALF5-ZRE A pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4453	BHLF1-ZRE 1 pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid
p4454	BHLF1-ZRE 2 pentamerisiertes Luciferase-Reporterplasmid

2.3 Antikörper

Spezifität	Spezies	Bezugsquelle	Anwendung	Bemerkung
Anti-GFP	Maus	Roche	WB, 1:5000	/
Anti-BZLF1	Maus	E. Kremmer, HMGU	WB, 1:50 IF, 1:1	Hybridomüberstand (Drouet, Grenoble), BZ1
Anti-BRLF1	Maus	E. Kremmer, HMGU	WB, 1:50	Hybridomüberstand (Drouet, Grenoble), 8C12
Anti-Tubulin	Maus	Santa Cruz	WB, 1:5000	alpha-Tubulin
Anti-Flag	Maus	Stratagene	WB, 1:5000	2 mg/ml
Anti-Maus	Pferd	CellSignaling Technology	WB, 1:10000	Sekundärantikörper, HRP-Konjugat
Anti-Maus	Ziege	Dianova	IF, 1:200	Sekundär-Antikörper, Cy3-Konjugat
Anti-GFP	Lama	ChromoTek	25 µl Sepharose / IP	Antikörper kovalent an Sepharose gekoppelt

2.4 Bakterienstämme

Für Klonierungen und zur Präparation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm DH5-alpha verwendet. Alle CpG-freien Luciferase-Reporter-Plasmide (vgl. 2.2 p4283-p4454) wurden in *E.coli* PIR1 kloniert und amplifiziert.

Bezeichnung	Beschreibung
DH5-alpha	F-, lacI-, recA1, endA1, hsdR17, Δ (lacZYA- argF), U169, F80d lacZ Δ M15, supE44, thi-1, gyrA96, relA1 (Hanahan, 1985)
2089	DH5-alpha , stabil transfiziert mit dem Maxi-EBV-Plasmid p2089
PIR1	F- Δ lac169 rpoS(Am) robA1 creC510 hsdR514 endA recA1 uidA(Δ mlul)::pir-116

2.5 Eukaryotische Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert (*). Bei den etablierten Zelllinien ist die Nummer des Expressionsplasmids angegeben, mit dem die Zellen stabil transfiziert wurden.

Bezeichnung	Beschreibung
HEK293	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert durch Transfektion mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 Genoms (Graham <i>et al.</i> , 1977)
B95.8	Lymphoblastoide Zelllinie, entstanden durch eine <i>in vitro</i> EBV-Infektion von Krallenaffen B-Zellen (Miller <i>et al.</i> , 1972)
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-Zell-Linie (Pulvertaft, 1964)
Raji/3927*	GFP:BZLF1-Raji (Klon 3927.4)
Raji/4247*	GFP:NLS-Raji (Klon 4247.1)
Raji/3862*	RTS-2-BZLF1-Raji (Klon 3862.3)
B95.8/3927*	GFP:BZLF1-B95.8 (Klon 3927.11)

2.6 Zellkulturmedien und Additive

2.6.1 Medium für prokaryotische Zellen

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
LB-Medium	Flüssiges Bakteriennährmedium: 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt	Invitrogen GmbH
Select-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Select-Agar als Nährmedium zur Kultivierung von Bakterienklonen	Invitrogen GmbH

2.6.2 Medien und Additive für eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
RPMI-1640	Zellkulturmedium zur Kultivierung aller beschriebenen Zelllinien	Invitrogen GmbH
α -Thioglycerol und Bathocuproin-disulfonsäure	Antioxidans als Zusatz für RPMI-1640	Sigma Aldrich
Fötale Rinderserum (FBS)	Nährstoff als Zusatz für RPMI-1640	PAA Laboratories
HEPES	Stabilisierung des pH-Wertes	Invitrogen GmbH
Natriumpyruvat	Antioxidans als Zusatz für RPMI-1640	Invitrogen GmbH
Natriumselenit	Antioxidans als Zusatz für RPMI-1640	Sigma Aldrich
Opti-MEM I	Minimalkulturmedium für die Transfektion von HEK293-Zellen	Invitrogen GmbH
Penicillin/Streptomycin	Antibiotika als Zusatz für RPMI-1640	Invitrogen GmbH

2.7 Puffer und Lösungen

Standard-Lösungen

PBS			pH 7,3			TBE			pH 7,5			TE			pH 8,0		
10	mM	Na ₂ HPO ₄	89	mM	Tris	1	mM	EDTA				10	mM	Tris-HCL			
1,8	mM	KH ₂ PO ₄	89	mM	Borsäure												
140	mM	NaCl	2	mM	EDTA												
2,7	mM	KCl															

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel (12 %/15 %): 10 ml				Sammelgel (5 % Acrylamid): 50 ml			
4/5	ml	Acrylamid [30%]		6,7	ml	Acrylamid [30%]	
1,66	ml	Tris-HCl, pH 8,9 [2M]		7,5	ml	Tris-HCl, pH 6,8 [2M]	
66,7	µl	EDTA [0,5 M]		400	µl	SDS [10%]	
100	µl	SDS [10%]		50	µl	TEMED	
10	µl	TEMED		350	µl	APS	
70	µl	APS		36	ml	H ₂ O	
4,2/3,2	ml	H ₂ O					

Laufpuffer [10x]			Auftragspuffer [5x Lämmli]		
30	g	Tris	6,25	ml	Tris-HCl pH 6,8
144	g	Glyzin	5	g	SDS [10%]
100	ml	SDS [10%]	3,9	g	DTT
			0,2	%	Bromphenolblau
			12,5	ml	Glyzerin [100%]

Coomassie-Färbelösung			Coomassie-Entfärbelösung		
40	%	Ethanol	40	%	Ethanol
10	%	Essigsäure	10	%	Essigsäure
0,2	%	Coomassie Brilliant Blue R250			

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

6 %	10 %	12 %	Trenngel: 50 ml		Auftragspuffer [5x] pH 7,5		
10	16,7	20	ml	Acrylamid [30%]	20	mM	Tris-HCl
2,5	2,5	2,5	ml	10 x TBE	25	%	Glyzerin
400	400	400	µl	APS	0,2	%	Bromphenolblau
50	50	50	µl	TEMED	0,2	%	Xylencyanol
37,05	30,35	27,05	ml	H ₂ O			

Western Blot Analysen

Blotpuffer (1x): 1L			Waschpuffer (PBS-T)			Blockierungspuffer 5%		
3	g	Tris	0,1	%	Monolaurat	5	g	Magermilchpulver
14	g	Glyzin			(Tween-20)	100	ml	PBS-T
200	ml	Methanol			in PBS			

Zellyse und Kernextraktion

RIPA-Puffer			TENS-Puffer		
pH 8,0			pH 8,0		
50	mM	Tris-HCl	10	mM	Tris-HCl
150	mM	NaCl	1	mM	EDTA
0,1	%	SDS	100	mM	NaOH
0,5	%	DOC	0,5	%	SDS
1	%	NP40			
+ Protease-Inhibitor					

Niedrigsalzpuffer			Hochsalzpuffer			Dialysepuffer		
pH 7,9			pH 7,9			pH 7,9		
10	mM	Hepes	10	mM	Hepes	10	mM	Hepes
10	mM	KCl	1,2	M	NaCl	80	mM	NaCl
1,5	mM	MgCl ₂	1,5	mM	MgCl ₂	1,5	mM	MgCl ₂
0,34	M	Saccharose	1	mM	DTT	10	%	Glyzerin
10	%	Glyzerin	10	%	Glyzerin			
1	mM	DTT						
+ Protease-Inhibitor			+ Protease-Inhibitor					

EMSA, Proteinaufreinigung, Immunpräzipitationen

10x Bindepuffer EMSA/DIP			SF-WI			SF-W II		
			pH 7,9			pH 7,9		
200	mM	Hepes	20	mM	Hepes	20	mM	Hepes
750	mM	NaCl	0,5	M	NaCl	1	M	NaCl
20	mM	MgCl ₂	2	mM	EDTA	2	mM	EDTA
10	%	Glyzerin						
1	mg/ml	BSA						
+ Protease-Inhibitor								

GFP-Bindepuffer			GFP-Waschpuffer			GFP-Elutionspuffer		
pH 7,5			pH 7,5			pH 8,0		
20	mM	Tris-HCl	20	mM	Tris-HCl	10	mM	Tris-HCl
150	mM	NaCl	300	mM	NaCl	0,5	mM	EDTA
0,5	mM	EDTA	0,5	mM	EDTA	2	%	SDS
+ Protease-Inhibitor								

ChIP-WI			ChIP-WII			ChIP-WIII		
pH 8,0			pH 8,0			pH 8,0		
20	mM	Tris-HCl	20	mM	Tris-HCl	10	mM	Tris-HCl
350	mM	NaCl	500	mM	NaCl	250	mM	LiCl
2	mM	EDTA	2	mM	EDTA	1	mM	EDTA
0,1	%	SDS	0,1	%	SDS	1	%	NP-40
1	%	Triton X-100	1	%	Triton X-100	1	%	DOC

2.8 Chemikalien und Enzyme

Bezugsquelle	Bezeichnung
Applichem, Darmstadt	RNase-A, Lysozym
Biochrom AG, Berlin	PBS-Pulver
Bio-Rad, München	Bradford-Lösung
Calbiochem GmbH, Frankfurt am Main	Hygromyzin B
Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Rotiphorese Gel30 (Acrylamid), Phenol, Chloroform, Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA) Pulver
ChromoTek, Martinsried	GFP-Nano-Trap (GFP- <i>'binder'</i>)
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton
Fermentas, Leon-Rot	Größenstandards für Agarosegele und Polyacrylamidgele, T4 Polynukleotid Kinase (PNK), Restriktionsenzyme
Finnzymes, Finland	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
GE Healthcare, München	ECL-Western-Blotting-Analysis-System, Hybond™-ECL-Zellulosemembran
Hartmann Analytik, Braunschweig	[γ -P ³²] ATP
Hoechst, Frankfurt	Hoechst-Farbstoff H33342
IBA BioTAGnology, Göttingen	Strep-Tactin Sepharose, D-Desthiobiotin Elutionspuffer [10x], Strep-Tag Waschpuffer [10x]
Invitrogen, Karlsruhe	Agarose, Luria broth base, Trypsin-EDTA, Zeozin, UltraPure™ 20X SSC
Merck-Eurolab GmbH, Darmstadt	Ammoniumperoxodisulfat (APS), Borsäure (H ₃ BO ₃), Calciumchlorid (CaCl ₂), Cäsiumchlorid (CsCl), Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glucose, Glyzin, Glycerin, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaliumacetat (KAc), Kaliumchlorid (KCl), Lithiumchlorid (LiCl), Magnesiumchlorid (MgCl ₂), Magnesiumsulfat (MgSO ₄), Natriumacetat (NaAc), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid (NaOH), Natriumdodecylsulfat (SDS), Paraformaldehyd (PFA), Salzsäure (HCl), Saccharose, Tetramethylethylen-diamin (TEMED), Triton X-100, Xylencyanol
New England Biolabs, Frankfurt	Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer, DNA-Methyltransferase M.Sss.I, S-Adenosylmethionin (SAM)
PAA Laboratories GmbH, Cölbe	G418-Sulfat (Neomycin)

Bezugsquelle	Bezeichnung
Promega, Mannheim	RNasin Plus RNase-Inhibitor
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Alkalische Phosphatase, Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten, dNTPs, GFP-Antikörper, PhosStop Phosphatase Inhibitor Tabletten, Light Cycler™-Fast-Start-DNA-Master-SYBR-Green-I-Mix
Sigma-Aldrich, München	Ampicillin, β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Chloramphenicol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Doxyzyklin, Igepal CA-630 (NP40), Kalbsthymus-DNA, Monolaurat (Tween-20), Polyethylenimin (PEI), Ponceau S (Fluka ATX), Proteinase-K
Vector Laboratories, USA	VectaShield™ Mounting-Medium

2.9 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
BioPrime Total Genomic Labeling System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Illustra ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	GE Healthcare, München
Maxi-Präparationskit (Jet-Star)	Genomed, Bad Oeynhausen
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II Kit, NTB-Puffer	Macherey-Nagel, Düren
QiaAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ III First Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paired-end cluster generation kit GAll v1	Illumina, San Diego (USA)
Paired-End DNA Sample Preparation Kit	Illumina, San Diego (USA)

2.10 Geräte und Verbrauchsmaterial

Bezugsquelle	Bezeichnung
AGFA, Köln	CP1000 Entwicklermaschine
Beckman, Heidelberg	Coulter-Partikelzähler Z1, Ultrazentrifuge L8-70M und XL-70, Zentrifuge Avanti J-25, Zentrifuge Avanti-26XP
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg	FACS-Calibur, Plastikreagenzgefäße, Zellkulturflaschen, 96 – 6 Loch Platten
Berthold, Pforzheim	Orion II Luminometer
Bio-Rad, München	Gene-Pulser II Elektroporationsgerät, Mini Protean II Tetra Gelelektrophorese Einheit, Poly-Prep Säulen
Branson, Danbury (USA)	Branson Sonifier S-250D
Diagenode, Liège – (Belgien)	Bioruptor (UCD-200)
Eppendorf, Hamburg	BioPhotometer, PCR-Maschine Mastercycler Personal, Reaktionsgefäße, Tischzentrifuge 5415, Thermomixer comfort,
Hartenstein, Würzburg	Deckgläser, Objektträger, Pinzetten, Whatman-Papier
Hewlett Packard (USA)	HP Scan-Jet G4050
Henry Schein Vet GmbH, Hamburg	Bovivet Veterinärkanülen (2,1 mm)
G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd	Sonifiziernadel für Branson Sonifier 5 mm
Hofer Scientific Instruments (USA)	DyNAQuant Fluorimeter, Semidry Blottingsystem
FujiFilm, Kleve	Phosphoimager FLA 5100, Verstärkerfolie, Filmkassetten
Greiner Bio One, Solingen	Diverse Kunststoffartikel für Zellkultur und Laborarbeiten
Illumina, San Diego (USA)	Genome Analyzer II, Cluster Station (am HMGU Neuherberg, IHG, AG Strom)
Leica-Microsystems, Bensheim	Leica TCS SP2 konfokales Mikroskop
Kodak Company, New York, (USA)	Röntgenfilme XAR5
Millipore, Schwalbach	Wasserentsalzungsanlage Milli-RO 60 PLUS
Molecular Devices (USA)	Axon GenePix 4100A 'Microarray' Scanner
Montreal Biotech Inc., Montreal (Can)	Vakuumzentrifuge Univapo H150

Bezugsquelle	Bezeichnung
Nunc GmbH, Wiesbaden	Zellkulturschalen, Cryotubes 1,8 ml
Ocimum Biosolutions (NI)	EBV- <i>'Microarray'</i> und Hybridisierpuffer
Peqlab, Erlangen	Agarose-Gelelektrophorese-Kammern, Nanodrop ND-1000, 4mm-Elektroporationsküvetten, Reaktionsgefäße
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Light Cycler Instrument 2.0
Schott, Mainz	Diverse Glasartikel
Tecan, Crailsheim	HS 4000 Pro Hybridisierstation
Thermo Scientific, (USA)	Heraeus Multifuge 3L-R, Orbitalschüttler, Brutschränke, Coomassie-Brilliant Blue R250
Zeiss, Göttingen	Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M, Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40C

2.11 Software

Bezeichnung	Bezugsquelle oder Literatur
Adobe-CS3	Adobe Systems Inc., San Jose (USA)
AIDA Alias Software	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
EndNote X2	Thomson Reuters, New York (USA)
FreeHand MX 11.0	Adobe Systems Inc., San Jose (USA)
FlowJo 8.8.6	Tree Star Inc., Ashland (USA)
Genepix Pro 6.0	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html
MacVector 10.0	Accelrys, Cambridge (UK)
MAQ (v7.01)	http://maq.sourceforge.net (Li <i>et al.</i> , 2008)
MEME	http://meme.sdsc.edu/meme4_4_0/intro.html (Bailey <i>et al.</i> , 2009)
Microsoft Office 2008	Microsoft, Redmond (USA)
Prism5	Graphpad Software, La Jolla (USA)
SISSRs	http://sissrs.rajajothi.com , (Jothi <i>et al.</i> , 2008)
QuEST	http://stanford.edu/~valouev/QuEST/QuEST.html (Valouev <i>et al.</i> , 2008)

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Escherichia coli wurden als Suspensionskultur in LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm in Orbitalschüttlern kultiviert. Zur Vereinzelnung von Kolonien wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit einem Drygalski-Spatel oder einer Impföse ausplattiert und bei 37 °C über einen Zeitraum von 16-20 h inkubiert. Kulturen auf Agar-Platten wurden nicht länger als eine Woche bei 4 °C gelagert. Bei einer Selektion auf Resistenz gegen ein oder mehrere Antibiotika wurde dem LB-Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml) oder Zeozin (25 µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über einen längeren Zeitraum wurde eine über Nacht gewachsene Suspensionskultur in 25 % Glycerin bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.2 Transformation von Bakterienzellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Stämme erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan *et al.* (1985). Kompetente Bakterien wurden aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. Für einen Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit ca. 100 ng DNA eines Ligationsansatzes bzw. 0,5 - 1 ng Plasmid-DNA vermischt und 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem zweiminütigen Inkubationsschritt bei 42 °C im Wasserbad wurden die Bakterien kurz auf Eis gekühlt. Zur phänotypischen Expression der Resistenzgene wurden die Bakterien mit 900 µl LB-Medium versetzt und 60 min lang bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt bei 5000 x g wurden die Bakterien in einem Volumen von 100 µl unter entsprechender Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2 Zellkultur und Analyse von Zellen

3.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Arbeiten wurden unter Benutzung steriler Pipetten und Lösungen unter einer Umluft-Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 1200 rpm (ca. 300 x g) 10 min lang zentrifugiert. Für Waschschriffe wurde steriles PBS verwendet. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle verwendeten Zellen wurden mit RPMI-1640 kultiviert. Dem Kulturmedium wurden 10 % fötales Rinderserum, 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin, 1 mM Natriumpyruvat und 20 µM Bathocuproindisulfonsäure und α-Thioglycerol (0,0004%) zugesetzt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Partikelzählers (Coulter Counter) nach Angaben des Herstellers.

Raji-Zellen:

Raji-Zellen wurden in Suspension bei einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml kultiviert. Den Medien der Zelllinien Raji/3927 und Raji/4247 wurde zur Selektion und Kultivierung 1,5 mg/ml G418-Sulfat zugegeben. Raji/3862 wurden in Anwesenheit von 300 µg/ml Hygromycin selektioniert und zur Aufrechterhaltung des episomalen Plasmids kultiviert.

B95.8-Zellen:

Die Zelllinie B95.8 wurde als Suspensionkultur gehalten und alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 mit frischem Medium verdünnt. B95.8/3927-Zellen wurden durch die Zugabe von G418-Sulfat (1,0 mg/ml) selektioniert und kultiviert.

HEK293-Zellen:

Die adhärenenten HEK293-Zellen wurden beim Erreichen von 70-80 %iger Konfluenz 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurden die Zellen nach einem PBS-Waschschritt mit 4 ml 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst und in frisches Vollmedium überführt.

3.2.2 Aufbewahren von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen können in einem Gemisch aus 10 % DMSO und 90 % FBS in flüssigem Stickstoff eingefroren und unbegrenzt aufbewahrt werden. Um die Zellen schonend abzukühlen wurden sie in ein 2 ml CryoTube (Nunc) überführt und in einer Einfrierbox (Nunc) mit Isopropanolmantel auf eine Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut, in 50 ml Vollmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Vollmedium überführt. Sofern Selektionsmarker erforderlich waren, wurden diese zwei Tage nach dem Auftauen dem Zellmedium zugesetzt.

3.2.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden chemisch mit Polyethylenimin (PEI) in 6-Loch Platten oder in 15 cm Zellkulturschalen transifiziert. 3×10^5 Zellen pro Loch wurden in RPMI-1640 ausplattiert und am darauf folgenden Tag das Kulturmedium durch 1 ml Opti-MEM I ohne Zusätze ersetzt. Pro Loch wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Lösung A: 100 μl Opti-MEM I + 1 μg DNA

Lösung B: 100 μl Opti-MEM I + 6 μl PEI (1 mg/ml)

Beide Lösungen wurden vereint, 15 min lang bei RT inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach 4 h wurde der Transfektionsansatz durch 3 ml RPMI-1640 ersetzt. Für Transfektionen in 15 cm Zellkulturschalen wurden Volumina bzw. DNA-Menge entsprechend angepasst.

3.2.4 Elektroporation von eukaryotischen Zellen

Plasmid-DNA wurde mithilfe eines Elektroporators (Gene Pulser II) in die Zelllinien Raji und B95.8 eingebracht. Dazu wurden 5×10^6 Zellen in 250 μl Opti-MEM I resuspendiert und mit 5 μg Plasmid-DNA 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in einer 4 mm-Elektroporationsküvette bei 230 V und 975 μF . Unmittelbar nach der Elektroporation wurde dem Ansatz 400 μl FBS zugegeben und in eine kleine Zellkulturflasche mit 5 ml RPMI-1640 überführt.

3.2.5 Etablierung stabiler Zelllinien

Für ChIP-Experimente sowie zur Doxyzyklin-induzierten Expression von *BZLF1* wurden die unter Abschnitt 2.5 beschriebenen Zelllinien etabliert. Hierzu wurden 5×10^6 Zellen mit der Plasmid-DNA (Abs. 2.2) elektroporiert (Abs. 3.2.4) und für 2 Tage in RPMI-1640 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 96-Loch-Platten in Anwesenheit des Selektionszusatzes überführt und vier bis sechs Wochen lang kultiviert. Das Selektionsmedium der Zellen wurde regelmäßig erneuert. Nach dem Auswachsen der Klone wurden diese sukzessive expandiert und schließlich in Zellkulturflaschen in Anwesenheit des Selektionszusatzes weiterkultiviert. Eine stabile Expression der Proteine wurde durch Western-Blot-Analysen sowie auf Einzelzellebene im Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer GFP-Fluoreszenz analysiert.

3.2.6 Durchflusszytometrie

Zur Detektion der endogenen GFP-Expression einer Zellpopulation wurden Raji- und B95.8-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und im FACS Calibur (Beckton Dickinson) analysiert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen erfolgte mit dem Programm FlowJo.

3.3 Nukleinsäure-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemeiner Nukleinsäure-Methoden, wie z. B. Phenolextraktion, Fällung von DNA mit Ethanol und Isopropanol, Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolysen, Präparation von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Ligation freier DNA-Enden und die radioaktive Markierung von DNA erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook und Russell, 2001).

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde zur exponentiellen Vermehrung von definierten Nukleinsäurefragmenten verwendet (Mullis *et al.*, 1992). Ein 50 µl-Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt und in einer PCR-Maschine (Mastercycler Personal, Eppendorf) mit dem angegebenen Temperaturprofil inkubiert:

PCR-Ansatz	PCR-Programm		
50 ng p2089 EBV-DNA	Temperatur	Zeit (sek)	Zyklen
1 µl dNTPs [10 µM]	98°C	120	1
10 µl 5 x Phusion-Puffer	98°C	30 } 30 60 }	35
1 U Phusion High-Fidelity Polymerase	62°C		
0,5 µl Vorwärts-Primer [10 µM]	72°C		
0,5 µl Rückwärts-Primer [10 µM]	72 °C	600	1
auf 50 µl mit H ₂ O	4 °C	∞	1

Die PCR-Reaktionen wurden mit allen verwendeten Oligonukleotiden bei einer Hybridisierungstemperatur von 62 °C durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde in einem 1 %igen TBE-Ethidiumbromid-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und ihre Größe überprüft. Die DNA wurde mithilfe des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert, in 20 µl Elutionspuffer eluiert und für Klonierungen verwendet oder radioaktiv markiert.

3.3.2 Quantitative 'real-time' PCR

Immunpräzipitierte DNA sowie virale und zelluläre Transkripte (cDNA) wurden mithilfe der 'real-time' PCR im Light-Cycler 2.0 (Roche) quantifiziert. Die Detektion von akkumulierenden PCR-Produkten basiert dabei auf der Messung der Fluoreszenz des in Doppelstrang-DNA eingebauten Farbstoffes SYBR-Green I. Die emittierte Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase gemessen (Higuchi *et al.*, 1993). Ein 10 µl-Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

Komponente	Menge/Volumen
DNA	1 µl cDNA oder immunpräzipitierte DNA
MgCl ₂	0,8 µl [25mM]
Vorwärts-Primer	0,5 µl [10 µM]
Rückwärts-Primer	0,5 µl [10 µM]
Polymerase-Mix	1 µl (enthält dNTPs, DNA-Polymerase, SYBR-Green I)
H ₂ O	6,2 µl

Der Ablauf einer quantitativen *'real-time'* PCR-Reaktion setzt sich aus den Segmenten A–G zusammen, deren Temperaturprofil wie folgt programmiert wurde:

Segment	Temperatur	Zeit (s)	Zyklen	Detektion
A	95 °C	600		-
B	95 °C	5	5	-
	65 °C	10		-
	72 °C	10		-
C	95 °C	1	3	-
	64 °C	10		-
	72 °C	12		-
D	95 °C	1	2	-
	63 °C	10		-
	72 °C	12		-
E	95 °C	1	35	-
	62 °C	10		-
	72 °C	12		-
	75	3		einmalig
F	67 bis 95 °C	300 0,1°C/s		kontinuierlich
G	30 °C	∞	1	-

Quantifizierung der Transkriptmengen:

Entscheidend für eine quantitative *'real-time'* PCR-Analyse ist die Bestimmung der PCR-Effizienz der Oligonukleotide (E). Sie gilt als Maß des Amplifikationsfaktors für jeden Zyklus einer PCR-Reaktion. Die Effizienzen (E) der verwendeten Oligonukleotide wurden anhand einer DNA-Konzentrationsreihe mithilfe folgender Formel (Pfaffl, 2001) ermittelt:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\Delta CP / \Delta(\log[DNA])} \right)}$$

CP: *crossing point value*, PCR-Zyklusanzahl zu Beginn der exponentiellen Amplifikationsphase.

[DNA]: eingesetzte DNA-Menge

Die Analyse der relativen Transkriptmengen der zu untersuchenden Zielgene vor bzw. nach einer Doxyzyklin-Stimulation wurde mithilfe der konstanten Transkriptmenge des zellulären Referenzgens (Cytochrom C) nach der angeführten Formel (Pfaffl, 2001) berechnet:

$$T_{-dox} = \frac{E_{CP:Referenzgen (-dox)}}{E_{CP:Zielgen (-dox)}} \quad T_{+dox} = \frac{E_{CP:Referenzgen (+dox)}}{E_{CP:Zielgen (+dox)}}$$

T: relative Transkriptmenge

Zielgen: zu analysierende Transkripte

± dox: induziert/nicht-induziert

Referenzgen: Cytochrom C

Quantifizierung immunpräzipitierter DNA-Fragmente

Die Quantifizierung der angereicherten DNA-Fragmente einer *in vitro* DNA-Immunpräzipitation (DIP) oder einer nativen Chromatin-Immunpräzipitation (nChIP) erfolgte anhand einer 'real-time' PCR-Reaktion in einer logarithmischen Verdünnungsreihe nicht-immunselektierter p2089-DNA (DIP: 0,1 ng – 100ng) bzw. unselektiertem Chromatin (nChIP: 0,1% - 10% des „input“ Chromatins). Mithilfe einer Standardkurve, die aus den CP-Werten der definierten DNA-Mengen ermittelt wurde, konnte anhand des CP-Wertes der zu analysierenden Probe die Menge der immunpräzipitierten p2089-DNA [ng] bzw. die Menge des angereicherten Chromatins [% input] quantifiziert werden.

3.3.3 Präparative Plasmidreinigung

TENS-Lyse: Reinigung von Plasmiden < 20kb

Diese Methode wurde zur schnellen Analyse plasmidaler DNA nach Klonierungen verwendet. Dazu wurden 2 ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur zentrifugiert (1500 x g) und das Pellet in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit 150 µl NaAc [3M] neutralisiert, Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 16000 x g pelletiert und der plasmidhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 900 µl Ethanol [96-100 %] gefällt und in Ethanol [70-80 %] gewaschen. Überschüssiges Ethanol wurde in einer Vakuum-zentrifuge für ca. 5 min evaporiert. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE/RNase-A (10µg/ml) gelöst.

Reinigung von Plasmiden < 20 kb

Eine präparative Plasmidreinigung, die quantitativ und qualitativ für Transfektionen und Klonierungen geeignet ist, erfolgte ausgehend von einer stationär gewachsenen 400 ml Kultur. Die DNA wurde mithilfe des JetStar Maxi-Prep-Kits (Genomed) nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die von den Adsorptionssäulen eluierte DNA wurde mit 0,7 Vol% Isopropanol gefällt, in Ethanol [70%] gewaschen und final in TE-Puffer gelöst.

Reinigung von Plasmiden > 20 kb (Maxi-EBV-DNA)

Maxi-EBV-Plasmid-DNA für DNA-Immünpräzipitationen (Abs. 3.4.5) wurde mit dem Nucleobond PC 500 Kit (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers präpariert. Hierzu wurde von einer stationär gewachsenen 400 ml Kultur des Bakterienklons 2089 in ausgegangen.

3.3.4 *In vitro* DNA-Methylierung

Die *in vitro* CpG-Methylierung der Luciferase-Reporterplasmide, der PCR-Fragmente und der p2089 Maxi-EBV-DNA erfolgte mit der kommerziell erhältlichen *de novo* Methyltransferase M.SssI. S-Adenosylmethionin (SAM) diente als Methylgruppen-donor. Für einen Reaktionsansatz wurden 15 µg Plasmid-DNA bzw. 5 µg PCR-amplifizierte DNA mit 40 Einheiten (U, *units*) M.SssI und 1 µl SAM [32 mM] in 150 µl NEB2 gepuffertem Wasser über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dem Ansatz 1 µl SAM zugegeben und die Reaktion weitere 2 h bei 37 °C fortgesetzt. Die methylierte DNA wurde phenolextrahiert und der Status der CpG-Methylierung nach einer enzymatischen Restriktionshydrolyse mit den methylierungssensitiven Enzymen AgeI oder HpaII auf einem Agarose-Gel überprüft.

3.3.5 Isolierung gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Raji-Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. 10^7 Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und das Zellpellet in 700 µl RLT-Puffer resuspendiert. Das Lysat wurde anschließend mithilfe einer 2 ml Einmalspritze und einer 0,9 mm (20G) Kanüle durch zehnmaliges Auf- und Abziehen homogenisiert. Nach Zugabe von 700 µl Ethanol

[70 %] wurde das Lysat in zwei aufeinanderfolgenden Schritten auf eine RNeasy Säule überführt und bei 10000 x g für 2 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und anschließend 2 min lang zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation von der Säule eluiert.

3.3.6 Reverse Transkription von RNA in Einzelstrang-cDNA

Kontaminationen genomischer DNA wurden enzymatisch mit Dnase I (Invitrogen) aus der gesamt zellulären RNA-Präparation eliminiert. Dazu wurde die isolierte RNA in Anwesenheit von RNase-Inhibitor (Promega) 90 min lang bei 37° C mit Dnase I inkubiert und anschließend für 10 min bei 65° C hitzeinaktiviert.

Reaktionsansatz Dnase I Verdau	
2 µg	Extrahierte RNA
2 µl	10 x DNase Puffer
2 µl	Dnase I [1 U/µl]
1 µl	RNase Inhibitor [40U/µl]
auf 20 µl	RNase freies H ₂ O (Invitrogen)

Die reverse Transkription der RNA erfolgte mit dem Superscript III First-Strand cDNA Kit von Invitrogen und wurde nach den Angaben des Herstellers wie angegeben durchgeführt:

Komponente	Reaktion
500-750 ng RNA	Denaturierung der RNA (5 min, 65 °C)
1 µl Oligo(dT)-Primer	Binden der Oligo(dT)-Primer (1 min, auf Eis)
1 µl dNTPs	
2 µl 10 x RT-Puffer	
4 µl MgCl ₂ [25 mM]	cDNA-Synthese (50 min, 55 °C)
2 µl DTT [0,1 mM]	Termination (5 min, 85 °C)
1 µl SuperScript III reverse Transkriptase	
1 µl RNase-Inhibitor [40 U/µl]	
1 µl RNase-H	Beseitigung der RNA (37 °C, 20 min)

3.4 Proteinbiochemische-Methoden

Die Durchführung allgemeiner Proteinbiochemischer-Methoden, wie z. B. die Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976), Elektrophorese von Proteinen in SDS-PAA-Gelen (Laemmli, 1970), Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen (Bramhall *et al.*, 1969), Semi-Dry Immunblot (Towbin *et al.*, 1979) und Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern mittels Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Harlow und Lane, 1988), erfolgten in Anlehnung an die zitierte Literatur und werden daher nicht näher beschrieben. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer sowie die Zugabe von Proteinase-Inhibitor-Tabletten (Roche) ist in Abschnitt 2.7 vermerkt.

3.4.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten für Western-Blot-Analysen aus HEK293-, Raji- oder B95.8-Zellen wurden 2×10^7 Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 500 μ l RIPA-Puffer aufgenommen und 15 min lang auf Eis inkubiert. Zur Solubilisierung der Proteine wurde das Zelllysats für 3 min auf Eiswasser (30 s an/aus) im Bioruptor (Diagenode) sonifiziert und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

3.4.2 Präparation von Kernextrakten

Zur Herstellung von Kernextrakten wurden HEK293-, Raji- oder B95.8-Zellen in 50 ml PBS gewaschen, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen zentrifugiert (8 min, 500 x g, 4 °C) und das Volumen des Sedimentes (PV, *packed volume*) bestimmt. Die Zellen wurden in 5 PV Niedrigsalzpuffer aufgenommen und ca. 15 min lang auf Eis inkubiert. Die Lyse der Zellmembran erfolgte durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration: 0,1 %). Die Zellkerne wurden durch einen Zentrifugationschritt pelletiert (2000 x g, 4 °C, 5 min) und in 2 PV Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Die Proteine im Zellkern wurden durch Zugabe von 1 PV Hochsalzpuffer für 60 min bei 4 °C im Drehrad extrahiert. Die Kernextrakte wurden 30 min lang bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert um unlösliche Bestandteile abzutrennen und anschließend für 4 h in 800 ml

Dialysepuffer bei konstanter Rotation bei 4 °C dialysiert (Spectra/Por6 Dialysemembran, MWCO 3,5 kDa, 11,5 cm Durchmesser). Zur späteren Weiterverwendung wurden die Kernextrakte aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Gel-Retentionsanalysen wurden mit Strep-Tactin-Affinitätschromatographie-gereinigtem BZLF1 (SF:BZLF1) durchgeführt. Das Zellmaterial von ca. 10^8 transient transfizierten HEK293-Zellen wurde 48 h nach Transfektion zweimal in PBS gewaschen und das Zellpellet in 10 ml RIPA-Puffer resuspendiert und 15 min lang auf Eis lysiert. Zur Solubilisierung der Proteine wurde das Lysat sonifiziert (Branson Sonifier 250-D, 30 % Amplitude, 10 x 10 s an, 50 s aus) und anschließend 30 min lang bei 30000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde einer Strep-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Hierfür wurde eine 10 ml Poly-Prep-Säule mit 300 µl Strep-Tactin-Sepharose beladen. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 10 ml IBA-Waschpuffer [1x] (IBA-BioTAGnology) wurde die Säule dreimal mit dem Proteinlysat beladen. Unspezifische Proteininteraktionen mit dem Säulenmaterial wurden durch dreimaliges Waschen mit SF-WI, SF-WII und IBA-Waschpuffer [1x] reduziert. Das Strep-Tactin-gebundene SF:BZLF1 wurde zweimal mit jeweils 500 µl Desthiobiotinpuffer [1x] (IBA-BioTAGnology) vom Säulenmaterial eluiert. 1 µg der Elutionsfraktionen wurde zusammen mit jeweils 10 µl der während der Affinitätschromatographie gesammelten Durchflussfraktionen auf ein SDS-PAA Gel geladen und im Western-Blot-Verfahren mit einem spezifischen FLAG-Antikörper oder nach Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung analysiert. Für Gel-Retentionsanalysen wurde das Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und zur späteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Für eine Bestimmung der Dissoziations-Gleichgewichtskonstanten wurde das Protein durch Zugabe von 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl und 1mM EDTA zum Elutionspuffer stabilisiert und maximal fünf Tage bei 4 °C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration für die Verdünnungsreihe wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

3.4.4 Gel-Retentionsanalysen

Protein-DNA-Interaktionen können in Gel-Retentionsanalysen, auch als EMSAs (*Electro Mobility Shift Assays*) bezeichnet, analysiert werden. Der Versuchsansatz basiert auf einem veränderten Migrationsverhalten der Protein-DNA-Komplexe während einer Elektrophorese in nativen PAA-Gelen im Vergleich zur freien, ungebundenen DNA (Fried und Crothers, 1981). Nachweisreaktionen zur Interaktion von BZLF1 mit bestimmten Promotorregionen wurden mit PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten einer Länge von 200-1100 bp durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einer T4-Polynukleotid-Kinasereaktion (T4-PNK) mit [γ - 32 P] ATP als Phosphatgruppendonator radioaktiv markiert. Zur Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten wurden zwei einzelsträngige, komplementäre Oligonukleotide mit einer Länge von 25 bp in einem Reaktionsansatz markiert. Die radioaktive Markierung der DNA-Moleküle wurde wie folgt angesetzt:

Komponente	PCR-Produkte: Volumen/Menge	Oligonukleotide: Volumen/Menge
DNA	200 ng PCR-Produkt	jeweils 50 pmol
10 x PNK-Puffer	2 μ l	1 μ l
T4-PNK	30 U	30 U
[γ - 32 P] ATP	50 μ Ci	50 μ Ci
mit H ₂ O	auf 20 μ l	auf 10 μ l

Die Ansätze wurden 60 min lang bei 37 °C inkubiert. Die PCR-Fragmente wurden mithilfe einer G50-Sephadex-Säule (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers gereinigt und die radioaktive Emission bestimmt. Für jede Gel-Retentionsanalyse wurden 5000 cpm (*'counts per minute'*) eingesetzt.

Die komplementären Oligonukleotide wurden nach der γ - 32 P-Markierung zu doppelsträngiger (dsDNA) hybridisiert. Dazu wurde das Volumen des 10 μ l Reaktionsansatzes durch Zugabe von NEB2-Puffer auf ein Volumen von 50 μ l erhöht und 10 min lang bei 95 °C im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Nach Abschalten des Thermomixers wurden die Reaktionsansätze für inkubiert, bis das Gerät auf RT abgekühlt war. Zur Entfernung nicht hybridisierter einzelsträngiger Oligonukleotide wurde die radioaktiv-markierte dsDNA nach einer Elektrophorese aus einem nativen

12 %igen PAA-Gel extrahiert. Die Position der dsDNA im Gel wurde durch eine kurze Exposition eines Röntgenfilms visualisiert. Das Gelstück wurde in 100 µl NEB2-gepuffertem Wasser aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur im Thermomixer bei 500 rpm inkubiert. Die aus dem Gel diffundierte DNA wurde 1:100 in H₂O verdünnt und davon 1 µl für Gel-Retentionsanalysen verwendet. Zum Nachweis der BZLF1-Interaktion mit den Promotorfragmenten wurde ein - 80 °C Aliquot von SF:BZLF1 auf Eis aufgetaut und 1:10 verdünnt. Die Reaktionsansätze zur Gel-Retention (*'Shift'*) wurden wie angegeben präpariert und für 20 min bei RT inkubiert. SF:BZLF1-DNA-Komplexe wurden durch Zugabe eines spezifischen FLAG-Antikörpers und einer zusätzlichen 10 minütigen Inkubation in *'Supershift'*-Reaktionen bestätigt.

Komponente	<i>'Shift'</i>	<i>'Supershift'</i>
γ- ³² P-markierte DNA	5000 cpm	5000 cpm
SF-BZLF1 (1:10)	1 µl	1 µl
Poly-dI-dC (1µg/µl)	1 µl	1 µl
Kalbthymus-DNA (100ng/µl)	1 µl	1 µl
EMSA-Bindepuffer [10x]	2 µl	2 µl
FLAG-Antikörper (1µg/µl)	/	1 µl
mit H ₂ O	auf 20 µl	auf 20 µl

Die verschiedenen DNA-Proben wurden je nach Länge der Promotorfragmente in nativen PAA-Gelen unterschiedlicher Konzentration bei 4 °C elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 15 min fixiert (10 % Methanol, 20 % Eisessig) und im Vakuum-Geltrockner auf einem Whatman-Papier getrocknet. Die Gele wurden mithilfe eines Röntgenfilmes autoradiographiert oder zur densitometrischen Quantifizierung der Protein-DNA-Komplexe mit einer Verstärkerfolie exponiert. Die Folie wurde im Phosphoimager (FujiFilm) ausgelesen und die radioaktive Emission mithilfe des Programms AIDA Alias (Raytest) quantifiziert. Der prozentuale Anteil der gebundenen DNA wurde, wie unter Abschnitt 3.4.5 beschrieben, berechnet.

3.4.5 Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, auch als K_d -Wert bezeichnet, kann als Maß für die Stärke einer Protein-DNA-Interaktion herangezogen werden. Experimentell wurden die K_d -Werte in Gel-Retentionsanalysen ermittelt (Abs. 3.4.4). Dazu wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Oligonukleotid (ca. 0,5 fmol) mit einer seriellen Proteinkonzentrationsreihe inkubiert (ca. 500 ng - 50 pg). Die molare Proteinkonzentration der 10 μ l Ansätze wurde anhand des Molekulargewichts von SF:BZLF1 (15,8 kDa, MacVector) und den eingesetzten Proteinmengen pro Reaktion berechnet (http://molbiol.ru/eng/scripts/01_04.html). Die Ansätze wurden gelelektrophoretisch in einer Bio-Rad Protean II Gelkammer bei 4 °C aufgetrennt und wie unter Abschnitt 3.4.4 beschrieben visualisiert. Die radioaktive Emission der freien und gebundenen DNA wurde nach der Exposition einer Verstärkerfolie (FujiFilm) erfasst und densitometrisch mithilfe der Software AIDA Alias (RayTest) quantifiziert. Der prozentuale Anteil der gebundenen DNA (gebundene Fraktion) wurde aus dem Quotienten von gebundener DNA (im Zähler) und der Summe der freien und gebundenen DNA (im Nenner) berechnet. Die Bestimmung der K_d -Werte erfolgte mithilfe der Software Prism5 (GraphPad). Dazu wurden die berechneten Werte der gebundenen Fraktion gegen die molaren Proteinkonzentrationen auf einer logarithmisch skalierten Achse aufgetragen. Die K_d -Werte wurden anhand einer Hill-Regressionsgeraden (Prism5 Analyse Einstellung: '*Non linear fit: One site - Specific binding with Hill slope*') ermittelt. Der K_d -Wert wird als die molare Proteinkonzentration [M] definiert, bei der eine halbmaximale Bindung erreicht wird (Ryder *et al.*, 2008). Der K_d -Wert wurde von der Software automatisch berechnet.

3.4.6 *In vitro* DNA-Immunpräzipitation mit EBV-DNA

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine *in vitro* DNA-Immunpräzipitation (DIP) etabliert, die es ermöglicht alle BZLF1-gebundenen Elemente (ZREs) des EBV-Genoms zu erfassen. Hierfür wurden fünf 15 cm Schalen HEK293-Zellen mit dem GFP:BZLF1-Expressionsplasmid (p3927) transient transfiziert und nach 48 h Kernextrakte präpariert (Abs. 3.4.2). 30 μ g Kernextrakt wurde mit 10 μ g sonifizierter Kalbsthymus-DNA und 5 μ g poly-dI-dC in einem Volumen von 50 μ l in DIP-Bindepuffer [1x] für 60 min auf Eis inkubiert, um unspezifische DNA-Protein-

Interaktionen zu saturieren. Genomische EBV-DNA wurde aus *E.coli* extrahiert (Abs. 3.3.3) und *in vitro* vollständig CpG-methyliert (Abs. 3.3.4). CpG-methylierte und unmethylierte EBV-DNA wurde sonifiziert (Branson Sonifier 250-D, 25 % Amplitude, 2 x 15 s, 1 s an, 1 s aus), um DNA-Fragmente mit einer Länge von 200 bis 500 bp zu generieren. Je 500 ng der beiden DNA-Präparationen wurden in zwei unabhängigen Ansätzen mit den vorinkubierten Kernextrakten 60 min lang auf Eis inkubiert. Für die Immunselektion wurden die Ansätze mit GFP-Bindepuffer auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Die GFP:BZLF1-gebundene DNA wurde im Anschluss einer Immunpräzipitation mit 25 µl eines kovalent an Sepharosekügelchen gekoppelten GFP-Antikörpers (GFP-*'binder'*, ChromoTek) über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad unterzogen. Um unspezifische Wechselwirkungen der Sepharosekügelchen mit DNA oder Proteinen zu reduzieren wurde der GFP-*'binder'* zuvor für 60 min bei Raumtemperatur mit 100 µg BSA und 500 µg unspezifischer Kalbsthymus-DNA in 1ml PBS auf einem Drehrad inkubiert und im Anschluss dreimal mit GFP-Bindepuffer gewaschen. Die Sepharosekügelchen wurden bei jedem Waschschrift bei 500 x g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Die präzipitierten Immunkomplexe wurden zweimal mit GFP-Bindepuffer und GFP-Waschpuffer gewaschen, in 100 µl GFP-Elutionspuffer resuspendiert und für 15 min bei 65 °C und 1000 rpm im Thermomixer inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4000 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und der Elutionsschritt ein zweites Mal wiederholt. Beide Eluate wurden vereint und die SDS-Konzentration durch Zugabe von 200 µl TE-Puffer auf 1 % reduziert. Das Eluat wurde anschließend in Anwesenheit von 20 µg Proteinase-K 2 h lang bei 65 °C inkubiert und die proteinfreie DNA mithilfe des NucleoSpin Extract II Kit und NTB-Puffers (Macherey und Nagel) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer eluiert und davon 1 µl für eine quantitative *'real-time'* PCR-Reaktion eingesetzt. Für weitere Analyse-Verfahren wurden mehrere parallele Ansätze vereint, damit eine DNA-Menge von ca. 2,5 µg DNA (*'Microarray'*) bzw. 500 ng DNA (Next Generation Sequencing) erzielt werden konnte. Die DNA-Menge wurde im NanoDrop ND-1000 quantifiziert.

3.4.7 Native Chromatin-Immunpräzipitation (nChIP)

Die Analyse der DNA-Assoziation von BZLF1 in Raji- und B95.8-Zellen erfolgte mittels nChIP, bei der Protein-DNA-Komplexe ohne eine Formaldehydvernetzung immunselektiert werden. Dazu wurden Zellkerne aus 5×10^7 Zellen präpariert (Abs. 3.4.2), anschließend in 1 ml RIPA-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden die Proben sonifiziert (Branson Sonifier 250-D, 35 % Amplitude, 4 x 15 s, 1 s Intervalle), um DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 200-400 bp zu generieren. Das mechanisch-fragmentierte Chromatin wurde 15 min lang bei $16000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und 50 μl des Überstandes nach Phenolextraktion und Proteinase-K Verdau für 2 h bei $56 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem 1 %igen TBE-Agarosegel aufgetrennt, um die Größe der DNA-Fragmente zu kontrollieren. 80 μl des Überstandes wurden als nicht-selektiertes „input“ Chromatin bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Die IP des GFP:BZLF1-gebundenen Chromatins aus 800 μl des Gesamtzellextrakts erfolgte mit 25 μl des GFP-*'binders'* auf einem Drehrad bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach 12-16 h wurden die Sepharosekügelchen sedimentiert ($500 \times g$, 2 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und in vier aufeinanderfolgenden Waschschritten mit jeweils 1 ml ChIP-WI, ChIP-WII, ChIP-WIII und TE-Puffer gewaschen. Das immunpräzipitierte Chromatin wurde zweimal in 150 μl GFP-Elutionspuffer bei 1000 rpm und $65 \text{ }^\circ\text{C}$ für 15 min im Thermomixer eluiert, vereint und die SDS-Konzentration auf 1 % mit 300 μl TE reduziert. Nach einem anschließenden Proteinase-K-Verdau (2h, $56 \text{ }^\circ\text{C}$) wurde die proteinfreie DNA mithilfe des NucleoSpin Extract II Kit und NTB Puffer (Machery und Nagel) nach Angaben des Herstellers gereinigt, in 50 μl eluiert und davon 1 μl in eine quantitative *'real-time'* PCR-Reaktion eingesetzt. Für *'Next Generation Sequencing'*-Analysen waren in der Regel zwei Präparationsansätze ausreichend. Die DNA-Menge wurde im NanoDrop ND-1000 quantifiziert.

3.5 Immunfärbung und konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Die intrazelluläre Lokalisation der GFP-Fusionsproteine, zusammen mit der BZLF1-Wildtypproteinkontrolle wurde fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Hierfür wurden 2×10^5 HEK293-Zellen in einer 6-Loch Platte auf einem sterilen Deckglas ausgebracht und am nächsten Tag mit den jeweiligen Plasmiden transient

transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in PBS gewaschen und 15 min lang mit 2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Deckgläser mit PBS/0,15 % TritonX-100 und PBS/1 % BSA gewaschen. Für eine Lokalisierung von Wildtyp-BZLF1 mussten die Zellen im Anschluss an die Permeabilisierung einer Immunfärbung unterzogen werden. Dazu wurde das Deckglas mit einer BZLF1-Antikörperverdünnung beschichtet (150 µl 1:1 in PBS/BSA verdünnt, 45 min) und nach drei PBS-Waschschritten der Sekundärantikörper auf das Deckglas gegeben (150 µl, Anti-Maus-Cy5, 1:200 in PBS/BSA verdünnt, 45 min, lichtgeschützt). Zur intrazellulären Lokalisation der fluoreszierenden Fusionsproteine war keine Immunfärbung nötig. Die Deckgläser der verschiedenen präparierten Ansätze wurden nach einer 90-sekündigen Gegenfärbung der DNA mit einer DAPI-Lösung (1:10000 in PBS, Hoechst) mit 8 µl Mounting-Medium (VectShield) auf einem Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden mit Nagellack versiegelt und bis zur Betrachtung unter dem Mikroskop bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Leica TCS SP2 Konfokal-System mit 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, DAPI), 488 nm (Argon-Laser, GFP), und 633 nm (Helium-Neon-Laser, Cy5) verwendet. Zur intrazellulären Lokalisierung wurden die Kanäle der einzelnen Aufnahmen mithilfe des Programms ImageJ überlagert.

3.6 Luciferase-Reporter-Gen-Studien

Zur Untersuchung regulatorischer Ereignisse auf transkriptioneller Ebene wurden die zu analysierenden Promotoren oder pentamerisierten Bindemotive in Luciferase-Reporter-Gen-Vektoren eingebracht. Dabei handelt es sich um synthetische Plasmide, welche die Expression der *'Firefly'*-Luciferase kontrollieren. Die Messung der Aktivität des Reporterproteins erlaubt eine indirekte Bestimmung der transkriptionellen Aktivierung des Promotors unter verschiedenen Bedingungen. Hierfür wurden jeweils $3,5 \times 10^5$ HEK293-Zellen in 6-Loch-Platten ausgebracht und einen Tag später wie beschrieben transfiziert (Abs. 3.2.3). Ein Reaktionsansatz bestand aus 1 µg Reporterplasmid-DNA, die zusammen mit 0,5 µg der Transaktivatorplasmid-DNA p509 (pCMV:BZLF1) transfiziert wurde. In einem Kontrollansatz wurde 1 µg der Reporterplasmid-DNA zusammen mit 0,5 µg unspezifischer Kalbsthymus-DNA

kotransfiziert. Zur internen Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden in jedem Reaktionsansatz 0,05 µg des Renilla-Luciferasekonstrukts mitgeführt (p3695). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen in 2 ml PBS von den 6-Loch-Platten gespült und mit dem dualen Luciferase-Reporter-System (Promega) nach Angaben des Herstellers analysiert. Die Luciferase-Aktivitäten wurden in einem 96-Loch Mikroplatten Luminometer (Orion II, Berthold) gemessen. Nach einer Normalisierung der Luciferase-Aktivitäten wurden alle Ergebnisse als x-fache Zunahme der Luciferase-Aktivität auf den jeweiligen CpG-freien Leervektor dargestellt. Die verwendeten Luciferase-Reporterplasmide sind unter Abschnitt 2.2 vermerkt.

3.7 EBV-‘*Microarray*’-Analysen

Zur genomweiten Identifizierung BZLF1-gebundener Elemente des EBV-Genoms, wurde ein spezifischer ‘*Microarray*’ verwendet, der in Zusammenarbeit mit der Firma Ocimum Biosolutions synthetisiert wurde. Der ‘*Microarray*’ besteht aus 285 EBV-Fragmenten mit Längen von 500-700 bp, die das gesamte EBV-B95.8-Wildtyp-Genom dachziegelartig abdecken. Diese Fragmente wurden durch PCR-Amplifikation generiert und in vier Replikaten in einem definierten Raster auf einem Epoxid beschichteten Objektträger immobilisiert (Kalla, 2007).

3.7.1 DNA-Markierung und Hybridisierung

Für eine Hybridisierung wurden 2,5 µg immunselektierte DNA einer *in vitro* DIP eingesetzt. Für diese DNA-Menge wurden drei bis vier DIP-Ansätze vereint und das Volumen der DNA in einer Vakuumzentrifuge auf 5-10 µl reduziert. Für die DNA-Markierung wurde anschließend mit H₂O ein Volumen von 22 µl eingestellt. Als Referenz wurde ein Gemisch aus 100 ng fragmentierter, nichtselektierter EBV-DNA und 2,4 µg Kalbsthymus-DNA verwendet. Beide Ansätze wurden mit dem BioPrime Total Genomic Labeling System (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers mit den Farbstoffen Alexa Fluor5 (Wellenlänge: Anregung 650nm/Emission 670 nm) bzw. Alexa Fluor3 (Wellenlänge: Anregung 555nm/Emission 565 nm) wie folgt angesetzt:

Komponente/Reaktion	immunselektierte EBV-DNA	nicht selektierte 'input' EBV-DNA
DNA	22 µl	22 µl
Alexa Fluor3-Mix (grün)	/	25 µl
Alexa Fluor5-Mix (rot)	25 µl	/
Denaturierung der DNA	5 min bei 95 °C → auf Eis	
Exo-Klenow-Fragment	3 µl	3 µl
Einbau der Fluorochrome	2 h bei 37°C	

Nach dem Einbau der Fluorochrome wurden die markierten Nukleinsäuren nach Angaben des Herstellers gereinigt und die Effizienz der DNA-Markierung im NanoDrop-ND1000 spektrophotometrisch überprüft. Für eine Hybridisierung wurde die maximal mögliche äquimolare Menge der beiden Farbstoffe vereint, evaporiert und in einem Volumen von 130 µl Hybridisierungspuffer (Ocimum Biosolutions) aufgenommen. Die Hybridisierung erfolgte an einer Tecan HS 4000 Pro Hybridisierstation. Vor jeder 'Microarray'-Hybridisierung wurden Hybridisierstation, Hybridisierungskammern und die zuführenden Schläuche der Waschlösungen mit destilliertem Wasser nach Angaben des Herstellers gespült (Programm: 'Rinse'). Unmittelbar vor jeder Hybridisierung wurden die DNA-Moleküle auf dem Glasträger und die fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Hybridisierungsparameter (60 °C, 16 h) wurden nach den empfohlenen Angaben von Ocimum Biosolutions eingestellt. Während der Hybridisierung binden die einzelsträngigen, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente (Zielstrukturen) an die, auf dem 'Array' immobilisierten, komplementären Proben. Der 'Microarray' wurde im Anschluss dreimal für 1 min bei 30 °C gewaschen (2 x SSC, 0,1 % SDS; 1 x SSC und 0,5 x SSC) und der Glasträger mit Stickstoff getrocknet. Nach jeder Hybridisierung wurde die Station mit destilliertem Wasser gereinigt ('Rinse').

3.7.2 Einlesen und Auswertung des 'Microarrays'

Der 'Microarray' wurde mit einem GenePix Personal 4100A (Axon, Molecular Devices) bei einer Auflösung von 10 µm eingelesen. Die Analyse der Fluoreszenzsignale erfolgte mithilfe des Scanner-Programms GenePix Pro 6.0. Mithilfe der Programmfunktion Auto PMT wurde die Verstärkung beider Farbkanäle

(rot = 635 nm, grün = 532nm) während eines dreimaligen Einlesevorgangs (*'lines to average'* = 3) aufeinander abgestimmt. Für eine Auswertung der *'Microarrays'* wurde der Medianwert des Verhältnisses (*'Median of Ratios'*) jedes einzelnen Bildpunktes der beiden Farbkanäle ermittelt. In einer abschließenden automatisierten Normalisierung durch die Software wurde dieser Wert auf 1 festgelegt. Die 285 PCR-Fragmente wurden in vier Replikaten auf dem Glasträger hinterlegt. Für jede Hybridisierung lagen vier Verhältniswerte von immunselektierter DNA zu nicht-selektierter 2089 (input) DNA vor. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung berechnet.

3.8. 'Next-Generation-Sequencing'

Die experimentelle Durchführung und die bioinformatische Auswertungen der *'Next-Generation-Sequencing'*-Analysen wurden am Institut für Humangenetik (IHG) in der Arbeitsgruppe Strom unter Verwendung der genannten Gerätschaften und Reagenzien wie in den Abschnitten 3.8.1-3.8.3 beschrieben durchgeführt.

3.8.1 Erstellen einer Sequenzierbibliothek

Jeweils 500 ng der angereicherten DNA-Fragmente einer nativen Chromatin-Immunpräzipitation oder einer *in vitro* DNA-Immunpräzipitation wurden mithilfe des Paired-End DNA Sample Preparation Kit (Illumina) nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Bei der mechanischen Fragmentierung der DNA entstandene Nukleotidüberhänge wurden mit Klenow-Enzym und T4-DNA Polymerase repariert. Die 3'-5' Exonuklease-Aktivität der beiden Enzyme entfernt 3'-Nukleotidüberhänge und die Polymeraseaktivität synthetisiert 5'-Nukleotidüberhänge zu dsDNA. Im Anschluss wurden die 5'-Enden der DNA mit T4-PNK in Anwesenheit von ATP als Phosphatgruppdonor phosphoryliert und die DNA-Fragmente am 3'-Ende adenyliert. Zwei unterschiedliche sequenzspezifische doppelsträngige Adapterfragmente mit einem Thymidin-Überhang wurden in einem zehnfachen molaren Überschuss 10:1 (Adapteroligonukleotid:DNA-Fragment) an beide Enden der DNA-Fragmente ligiert. Die adaptermodifizierte DNA wurde in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch analysiert und DNA-Fragmente mit einer Länge von 300 bp (± 25 bp) aus dem Gel extrahiert (QIAamp DNA Mini Kit). Mit adapterspezifischen

Oligonukleotiden (PE 1.0 und PE 2.0; Illumina) wurden nur jene DNA-Fragmente in einer PCR-Reaktion mit 12 Zyklen amplifiziert, denen zwei unterschiedliche Adapternukleotide angefügt worden waren. Die generierte DNA-Bibliothek wurde abschließend gereinigt (QIAamp DNA Mini Kit). Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung der Reaktionsschritte, in denen eine Sequenzierbibliothek erstellt wird.

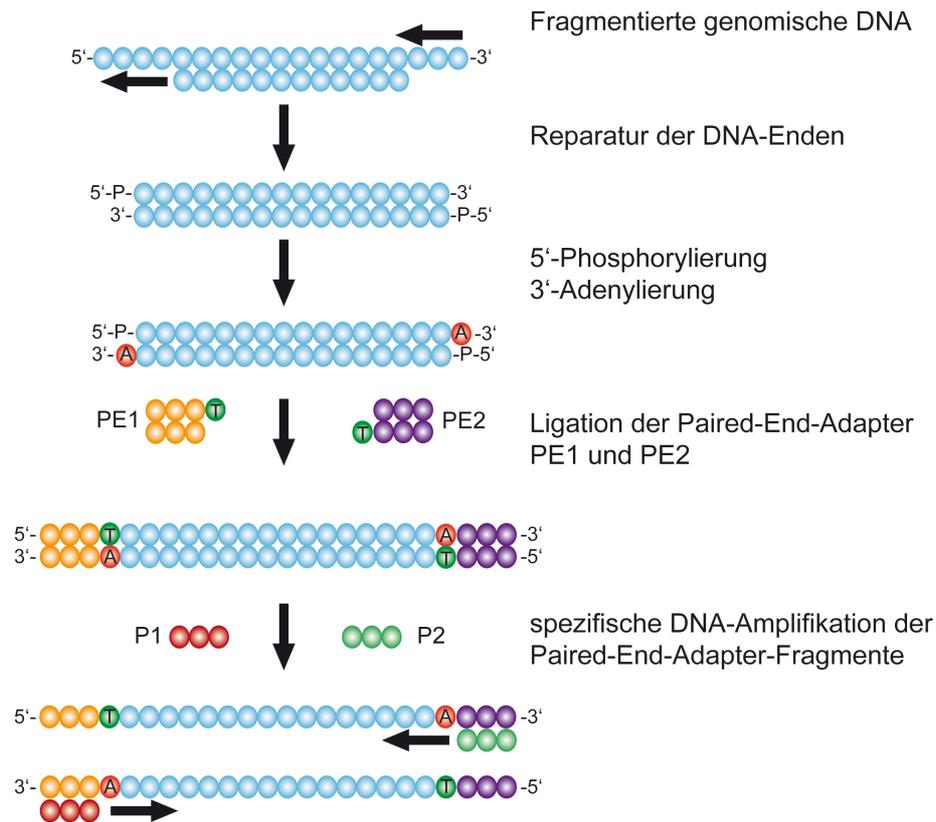


Abb. 3.1: Schematische Darstellung zum Erstellen einer Sequenzierbibliothek. Die 3'- und 5'-Enden der fragmentierten DNA-Fragmente wurden in einem initialen Reparaturschritt mithilfe von Klenow und T4-Polymerase zu dsDNA konvertiert. Die 5'-Enden der DNA-Fragmente wurden phosphoryliert, die 3'-Enden adenyliert. Im Anschluss konnten die sequenzdivergenten Adaptern ligiert werden. DNA-Fragmente der Größe 300 ± 25 bp wurden geextrahiert, gereinigt und anschließend in einer PCR amplifiziert.

3.8.2 'Clusterformation' und DNA-Sequenzierung

Die Sequenziermethode von Illumina basiert auf der parallelen Sequenzierung millionenfach generierter gebündelter DNA-Fragmente ('Cluster'), die nach dem Syntheseprinzip sequenziert werden. Hierfür wurden die DNA-Fragmente der Sequenzier-Bibliothek (Abs. 3.8.1) als Einzelstrangmoleküle an immobilisierte komplementäre Adapter-Oligonukleotide ('Capture Oligo') auf einer optischen Oberfläche ('Flow Cell') hybridisiert. Anschließend wurde ein antiparalleler Strang der

zu sequenzierenden DNA-Moleküle synthetisiert, wobei das *'Capture Oligo'* als Starteroligonukleotid diente. Nach einem Denaturierungsschritt bleibt diese Kopie auf der *'Flow Cell'* verankert und kann erneut an ein komplementäres Oligonukleotid binden, welches wiederum als Primer für die nächste Syntheserunde diente (Abb. 3.2). Nach diesem Prinzip, der isothermalen Brückenamplifikation, wurden klonale Cluster nach Angaben des Herstellers generiert (Illumina paired-end cluster generation kit GAII v1, 36-cycle sequencing kit v1). Jedes der generierten *'Cluster'* besteht aus ein- bis zweitausend klonalen DNA-Fragmenten. Vor der ersten Sequenzierreaktion (*'single-end reads'*) wurden alle DNA-Fragmente, die über Adapter 2 (PE2) immobilisiert waren, mithilfe einer spezifischen PE2-Restriktion entfernt. Die 3'-Enden der Adapter 1 gebundenen einzelsträngigen DNA-Moleküle wurden geschützt, um Interferenzen während der Sequenzierung zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung des komplementären Sequenzierprimers am Ende des freien Adapters. Die Sequenzierung der *'Cluster'* wurde auf einem Illumina Genome Analyzer II durchgeführt. Die Sequenzierreaktion basiert auf dem Syntheseprinzip. Mithilfe einer DNA-Polymerase wurden die vier unterschiedlich markierten Nukleotide in den zu synthetisierenden DNA-Strang eingebaut. Dabei fungieren die vier gebundenen Farbstoffe der Nukleotide gleichzeitig als 3'-Terminatoren, so dass pro Zyklus nur ein Nukleotid von der DNA-Polymerase eingebaut werden kann. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurde in jedem Syntheseschritt die eingebaute Base jedes *'Clusters'* detektiert. Der Farbstoff wurde entfernt und die Base so für den nächsten Synthesesyklus wieder zugänglich gemacht. Die Leselänge der Sequenzierreaktion beträgt 36 bp. Die Bibliotheken der nChIPs wurden nach der sogenannten *Paired-End* Methode analysiert. Dazu wurde der während der Sequenzierung generierte Strang nach einem Denaturierungsschritt entfernt und die verankerten Einzelstrang-DNA-Moleküle einer erneuten isothermalen Brückenamplifikation unterzogen. Vor der zweiten Sequenzierreaktion (*paired-end reads*) wurden alle DNA-Fragmente, die über den Adapter 1 (PE1) immobilisiert waren, durch eine spezifische Restriktion entfernt. In einer zweiten Synthesesequenzierung werden alle Adapter 2 (PE2) gebundenen DNA-Fragmente sequenziert. Abbildung 3.2 zeigt den schematischen Ablauf einer *'Clusterformation'* und einer anschließenden Sequenzierung.

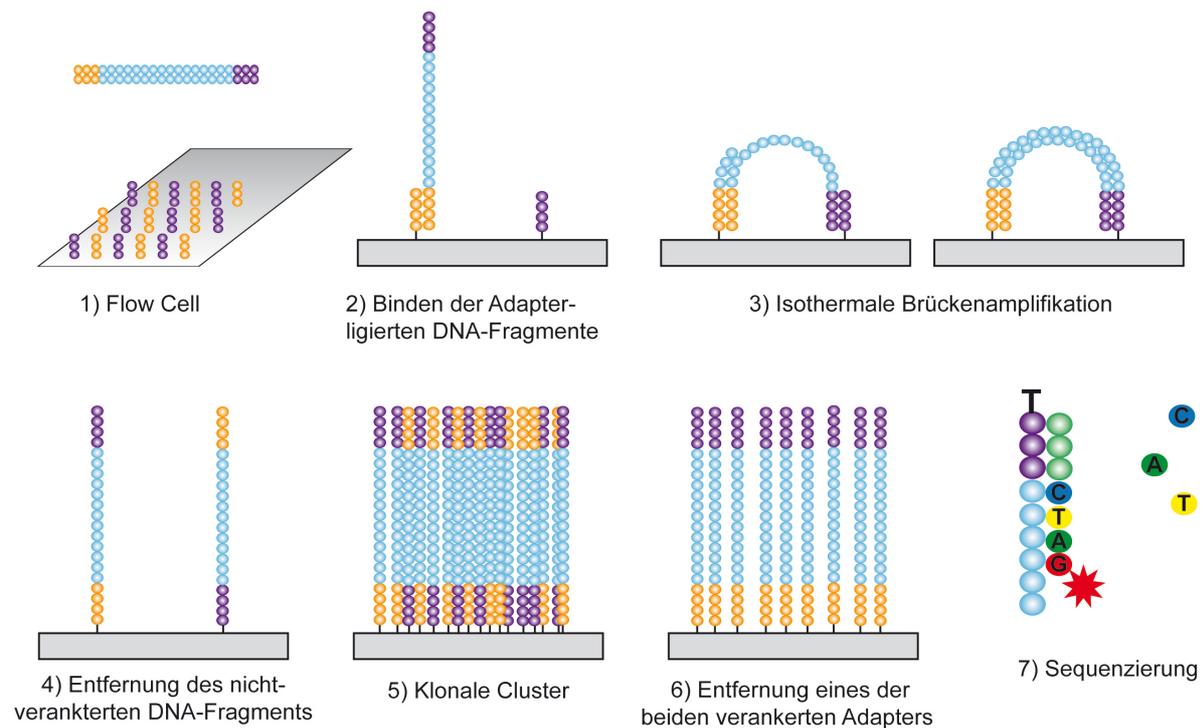


Abb. 3.2: Schematische Darstellung einer Clusterentstehung und DNA-Sequenzierung. Adapterligierte DNA-Fragmente einer Sequenzierbibliothek binden als Einzelstrangmoleküle an komplementäre Oligonukleotide, die auf einer Trägeroberfläche (*Flow cell*) verankert sind (1+2). In einer Festphasen-PCR wird ein antiparalleler Strang nach dem Prinzip der Brückenamplifikation synthetisiert (3). Ein Denaturierungsschritt hinterlässt nur die einzelsträngigen DNA-Fragmente, die über ein verankertes Oligonukleotid an die *Flow Cell* gebunden sind (4). Nach wiederholter Brückenamplifikation entstehen millionenfache *Cluster*, die aus bis zu zweitausend klonalen DNA-Fragmenten bestehen (5). Vor der ersten Sequenzierung werden alle DNA-Fragmente, die über das Adaptermolekül 2 (lila) gebunden sind, durch eine spezifische Restriktion entfernt (6). Das freie 3'-Ende der verbleibenden DNA-Fragmente wird geschützt, um Interferenzen während der Sequenzierreaktion zu verhindern. Nach der Hybridisierung des komplementären Sequenzieroligonukletids am Ende des freien Adapters, wird nach dem Syntheseprinzip sequenziert und der Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide nach jedem Schritt detektiert (7).

3.8.3 Bioinformatische Auswertungen

Zuordnung der gelesenen Sequenzen

Zur Auswertung wurden alle gelesenen Sequenzen (*'reads'*) mithilfe des Programms MAQ (Version 0.7.1) (Li *et al.*, 2008) den entsprechenden Referenzgenomen zugeordnet. Bei der *in vitro* DIP wurden als Referenzgenome die Sequenzen der rekombinanten p2089 EBV-DNA (Delecluse *et al.*, 1998) und das Rindergenom (bosTau4) verwendet, da in den Ansätzen noch unspezifische Kalbsthymus-DNA enthalten war. Die *'reads'* der nChIP-Analysen in Raji-Zellen wurden dem p2089 EBV-Genom und dem humanen Genom (Hg18) zugeordnet da auch zelluläre DNA-Fragmente angereichert wurden. Die *'reads'* der nChIPs in B95.8 wurden dem p2089 EBV-Genom und dem Krallenaffengenom (calJac3) zugeordnet.

Identifizierung von BZLF1-Bindestellen im viralen Genom

Die Identifizierung der BZLF1-Bindestellen erfolgte mit den Suchalgorithmen SISRrs (Site Identification from Short Sequences Reads) (Jothi *et al.*, 2008) oder QuEST (Quantitative Enrichment of Sequences Tags) (Valouev *et al.*, 2008). Bei den Algorithmen handelt es sich um frei zugängliche Programme, mit denen die gelesenen Sequenzen analysiert wurden. SISRrs wurde für die Auswertung der *in vitro* DIPs und der nChIP-Analysen in B95.8-Zellen unter Verwendung der Standardparameter (Jothi *et al.*, 2008) benutzt. QuEST diente zur Identifizierung der BZLF1-Bindestellen nach nChIP-Analysen in Raji-Zellen, die mit den Parametern *'kernel density estimate of 60, threshold value of 2'* untersucht wurden. Das Prinzip beider Algorithmen ist in Abschnitt 4.4 detailliert beschrieben und erklärt.

Identifizierung von BZLF1-Konsensusmotiven im viralen Genom

Zur Analyse von BZLF1-Konsensusmotiven wurden die von SISRrs und QuEST generierten Sequenzinformationen mit dem Algorithmus MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) unter Verwendung der Standardeinstellungen analysiert (Bailey *et al.*, 2009). Die Ergebnisse dieser Auswertungen sind als positionsspezifische Wahrscheinlichkeitsmatrizen dargestellt. Die Nukleotide werden mit der Frequenz ihrer Wahrscheinlichkeit an einer bestimmten Position in der Einheit bit in Form sogenannter Sequenz-Logos dargestellt (Abs. 4.4).

4 Ergebnisse

4.1 Gesamtkonzept

EBV infiziert *in vitro* sehr effizient humane, primäre B-Zellen, die durch die Expression latenter EBV-Gene transformiert werden und in der Folge unbegrenzt proliferieren. In den ersten Wochen nach Infektion permissiver B-Zellen unterbleibt die Synthese von Nachkommenviren, obwohl einige lytische Gene, wie z. B. *BZLF1*, *BHRF1*, *BALF1* und *BCRF1*, in den ersten Tagen nach Infektion exprimiert werden (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Kalla *et al.*, 2010; Zeidler *et al.*, 1997). Wesentliche virale Strukturproteine hingegen fehlen in der frühen Phase, eine Virusmorphogenese bleibt aus. Sehr wahrscheinlich ist der Block essenzieller lytischer Gene eine unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche latente Infektion, da die Virusneusynthese mit dem Überleben der infizierten Zellen nicht vereinbar ist. Erst ungefähr vier Wochen nach Infektion unterstützt ein kleiner Teil der Zellpopulation spontan die lytische Phase und es kommt zur Synthese von Nachkommenviren. Das virale *BZLF1*-Genprodukt ist der essenzielle molekulare „Schalter“, der zusammen mit *BRLF1* lytische Schlüsselgene aktiviert und die lytische Phase von EBV einleitet. *BZLF1* zählt zur AP-1-Familie der bZip-Transkriptionsfaktoren und bindet sequenzspezifisch an sogenannte *BZLF1*-‘responsive elements’ (ZREs). Bisher sind wenige dieser divergenten ZREs in Promotoren lytischer Gene beschrieben. Zwei dieser Zielsequenzen befinden sich im *BRLF1*-Promotor und werden bevorzugt oder nur dann von *BZLF1* gebunden, wenn das Bindemotiv eine CpG-Methylierung aufweist (Bhende *et al.*, 2004). Bisherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das Virus zwischen einer unmethylierten Form der viralen genomischen DNA in Virionen und einer methylierten Form in latent infizierten Zellen wechselt, in der die EBV-DNA in Chromatin verpackt vorliegt. Diese CpG-methylierte, chromatinisierte Form ist die Voraussetzung für eine Virusneusynthese (Kalla *et al.*, 2010). Meine Arbeitshypothese geht davon aus, dass es Sequenzmotive in Promotoren anderer, essenzieller lytischer EBV-Gene gibt, an die der virale Transkriptionsfaktor *BZLF1* nur dann bindet, wenn diese Zielsequenzen eine CpG-Methylierung aufweisen.

Aufgabe und Ziel dieser Promotionsarbeit war es, diese Arbeitshypothese zu überprüfen und alle Sequenzmotive innerhalb des EBV-Genoms zu identifizieren, an die BZLF1 bevorzugt oder nur dann bindet, wenn sie in methylierter Form vorliegen.

Zu diesem Zweck habe ich einen Ansatz, der *in vitro* DNA-Immunpräzipitation (*in vitro* DIP) entwickelt und etabliert, der es erlaubt, eine selektive, d. h. Sequenzmotiv-spezifische Bindung von BZLF1 an vollständig CpG-methylierte oder nicht-CpG-methylierte (unmethylierte) EBV-DNA zu analysieren. Anschließende 'Microarray'- und 'Next Generation Sequencing'-Analysen gaben einen globalen Überblick dieser sequenzspezifischen DNA-Bindung von BZLF1 im EBV-Genom. Sequenzierungen nach Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-seq) in EBV-positiven Raji- und B95.8-Zellen bestätigten das intrazelluläre Bindevverhalten von BZLF1 *in vivo*. Anschließende bioinformatische Analysen der Sequenzierdatensätze identifizierten zwei verschiedene Klassen von Bindemotiven, an die BZLF1 jeweils im unmethylierten oder methylierten Zustand der DNA bindet. Abschließend wurde eine detaillierte Analyse und Charakterisierung der identifizierten Promotoren und Bindemotive vorgenommen. Nachweisreaktionen, wie z. B. Gel-Retentionsanalysen und Luciferase-Reportergen-Studien, verifizierten eine bevorzugte methylierungsabhängige BZLF1-Bindung und Transaktivierung der identifizierten Zielpromotoren sowie beispielhaft gewählter Bindemotive.

4.2 *In vitro* DNA-Immunpräzipitation mit methylierter und unmethylierter EBV-DNA

Bislang sind drei ZREs im EBV-Genom bekannt, die bevorzugt oder ausschließlich von BZLF1 gebunden werden, wenn deren CpG-Dinukleotide methyliert sind (Bhende *et al.*, 2004; Dickerson *et al.*, 2009). Zwei dieser Elemente liegen im Promotor von *BRLF1*, einem Gen, das den viralen Transkriptionsfaktor BRLF1, auch Rta genannt, kodiert und zusammen mit BZLF1 den charakteristischen, herpesviralen Verlauf einer lytischen Infektion einleitet (Feederle *et al.*, 2000). Unmethylierte ZREs könnten folglich der limitierende Faktor für eine unzureichende Transaktivierung des *BRLF1*-Promotors darstellen. Damit wäre eine logische Erklärung für das Ausbleiben einer erfolgreichen lytischen Virusproduktion zum frühen Zeitpunkt einer primären EBV-Infektion gegeben, da die virale DNA hier noch

in unmethylierter Form vorliegt. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit einer methylierungsunabhängigen *BRLF1*-Promotormutante haben jedoch gezeigt, dass die Methylierung, die eine unabdingbare Voraussetzung für die Induktion der lytischen Phase von EBV ist, weitere Promotoren betreffen muss, die zu einer erfolgreichen Virusproduktion beitragen (Kalla *et al.*, 2010). Mithilfe eines genomweiten Versuchsansatzes sollten alle weiteren Bindestellen des viralen Transkriptionsfaktors im EBV-Genom identifiziert werden, an die BZLF1 bevorzugt oder ausschließlich bindet, wenn deren CpG-Dinukleotide in methylierter Form vorliegen. Eine gängige Methode zur Analyse von DNA-Protein-Interaktionen *in vitro* sind Gel-Retentionsanalysen. Dabei werden kurze DNA-Fragmente mit potenziellen Bindestellen mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert und der Protein-DNA-Komplex detektiert. Die Kombination dieser DNA-Protein-Interaktion *in vitro* und einer anschließenden Immunpräzipitation der Protein-DNA-Komplexe mithilfe eines spezifischen Antikörpers diente als Grundlage für die Etablierung der *in vitro* DNA-Immunpräzipitation (*in vitro* DIP), die in diesem Abschnitt beschrieben wird.

4.2.1 Versuchsaufbau

Das Fließschema in Abbildung 4.1 zeigt den Versuchsablauf einer *in vitro* DIP. Ein Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP, 'green fluorescent protein') und der DNA-Bindedomäne und Dimerisierungsdomäne von BZLF1 (GFP:BZLF1, Abs. 4.2.2) wurde transient in die humane Epithelzelllinie HEK293 transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden Hochsalz-Proteinextrakte aus dem Zellkern präpariert. In zwei Ansätzen erfolgte die Bindung von GFP:BZLF1 an mechanisch fragmentierte, rekombinante EBV-DNA aus *E.coli*, die entweder in unmethylierter oder CpG-methylierter DNA-Konfiguration vorlag (Abs. 4.2.3). GFP:BZLF1 gebundene EBV-DNA wurde anschließend mit einem kovalent an Sepharosekügelchen immobilisierten GFP-Antikörper immunpräzipitiert und unspezifische DNA-Bindungen durch mehrere Waschschrte reduziert. Vergleichende Nachweisreaktionen der immunselektierten EBV-DNA in Form quantitativer 'real-time' PCR, genomweiter EBV-'Microarray'- und 'Next Generation Sequencing'-Analysen sollten methylierungsabhängige und -unabhängige BZLF1-Bindestellen im EBV-Genom identifizieren.

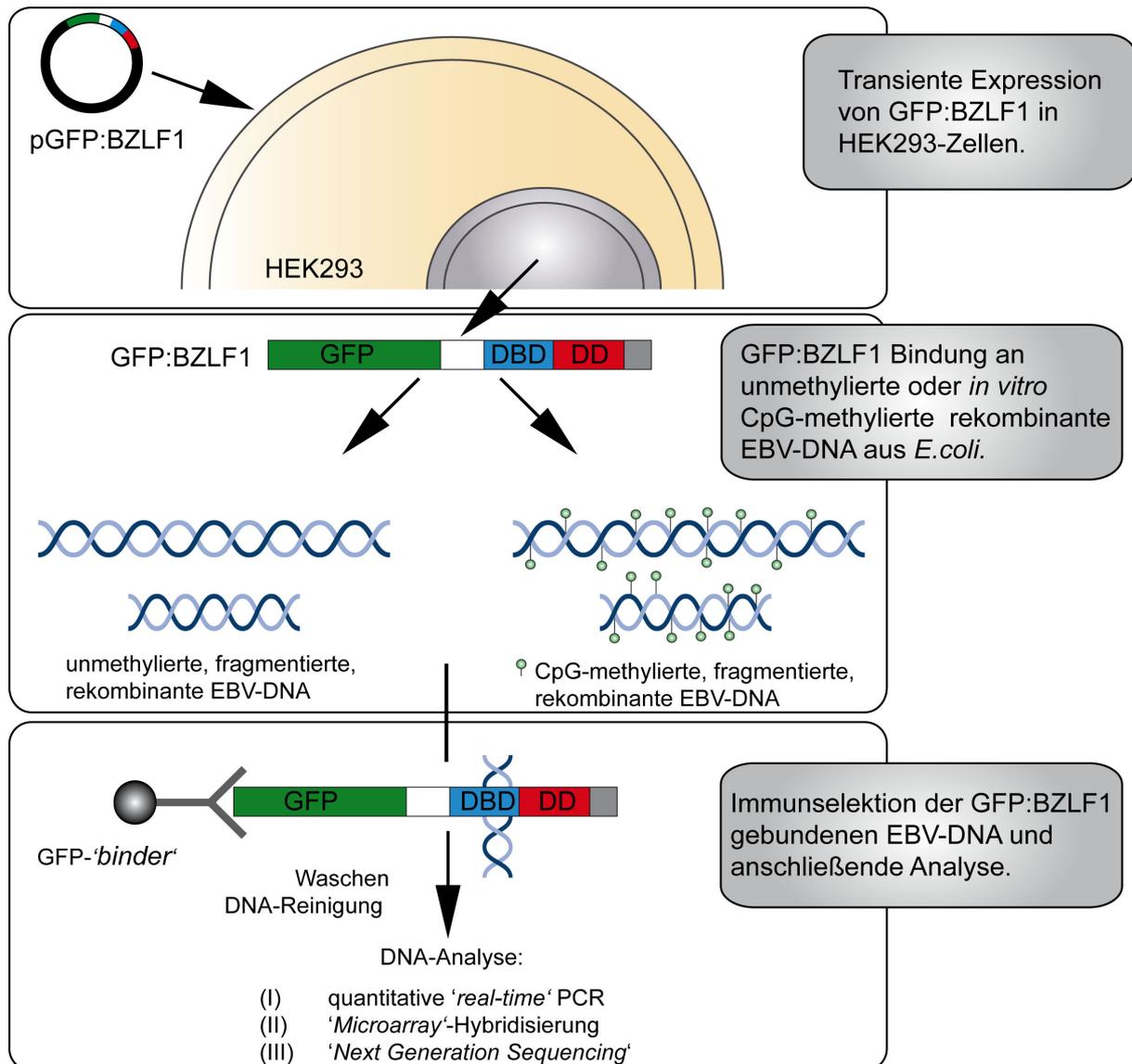


Abb. 4.1: Schematische Darstellung einer *in vitro* DNA-Immunpräzipitation zur Untersuchung der BZLF1-Bindung an unmethylierte und CpG-methylierte EBV-DNA. GFP:BZLF1 wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert und Hochsalz-Kernextrakte präpariert. Dialysierte Kernextrakte wurden mit rekombinanter, unmethylierter EBV-DNA aus *E.coli* oder vollständig *in vitro* CpG-methylierter EBV-DNA inkubiert. GFP:BZLF1 gebundene EBV-DNA wurde mit einem kovalent an Sepharosekügelchen gebundenen GFP-Antikörper (GFP-'binder') immunpräzipitiert. Unspezifische DNA-Bindungen wurden durch mehrmaliges Waschen der Sepharosekügelchen reduziert. Die angereicherte EBV-DNA wurde durch (I) quantitative '*real-time*' PCR, (II) '*Microarray*'-Hybridisierung oder (III) '*Next Generation sequencing*' analysiert.

4.2.2 Generierung und Analyse der GFP-Fusionsproteine für Immunpräzipitationen

Die Qualität des verwendeten Antikörpers entscheidet über das Gelingen einer konventionellen Protein-IP oder einer Chromatin-IP (ChIP). Rothbauer und Kollegen entwickelten einen GFP-*'binder'*, welcher nachweislich bestens für IPs und ChIPs geeignet ist. Der verwendete GFP-*'binder'* basiert auf einem 13 kDa Fragment der antigenbindenden Domäne eines einzelkettigen Lama-Antikörpers, das mit hoher Spezifität und Affinität an GFP bindet (Rothbauer *et al.*, 2008). Um die GFP-*'binder'*-Technologie nutzen zu können, wurden die Aminosäuren (AS) 149-245 von BZLF1 mit dem C-terminalen Ende von GFP im Expressionsvektor pEGFP-C1 fusioniert. Das generierte chimäre Fusionsprotein GFP:BZLF1 enthält die DNA-Bindedomäne (AS: 175-194) und die Dimerisierungsdomäne (AS: 194-227) von BZLF1. Ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und der Kernlokalisierungs-Signalsequenz (NLS, *'nuclear localization signal'*) des SV40 *'large'* T-Antigens diente für Kontrollexperimente (Abb. 4.2, A). Die ektopische Expression von GFP:BZLF1 und GFP:NLS in HEK293-Zellen zeigten ähnliche Proteinmengen nach einer Analyse im Western-Blot-Verfahren mit einem GFP-Antikörper (Abb. 4.2, B). Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen zur intrazellulären Verteilung der Fusionsproteine in HEK293-Zellen ergab eine ausschließliche Lokalisation von GFP:BZLF1 und GFP:NLS im Zellkern. Wildtyp BZLF1, das ausschließlich im Zellkern lokalisierte, diente als Positivkontrolle, GFP zeigte eine zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 4.2, C). Gel-Retentionsanalysen mit Kernextrakten von GFP:BZLF1 transfizierten HEK293-Zellen belegten die Funktionalität des chimären Fusionsproteins. GFP:BZLF1 zeigte eine sequenzspezifische Bindung an ein BZLF1-gebundenes Element (ZRE) aus dem Promotor von *BMRF1*. *'Supershift'*-Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen BZLF1 und GFP bestätigten die GFP:BZLF1-DNA-Komplexe (Abb. 4.2, D). Die angeführten Experimente validierten, dass GFP:BZLF1 für eine Anwendung in den folgenden *in vitro* DNA-Immunpräzipitationen geeignet ist.

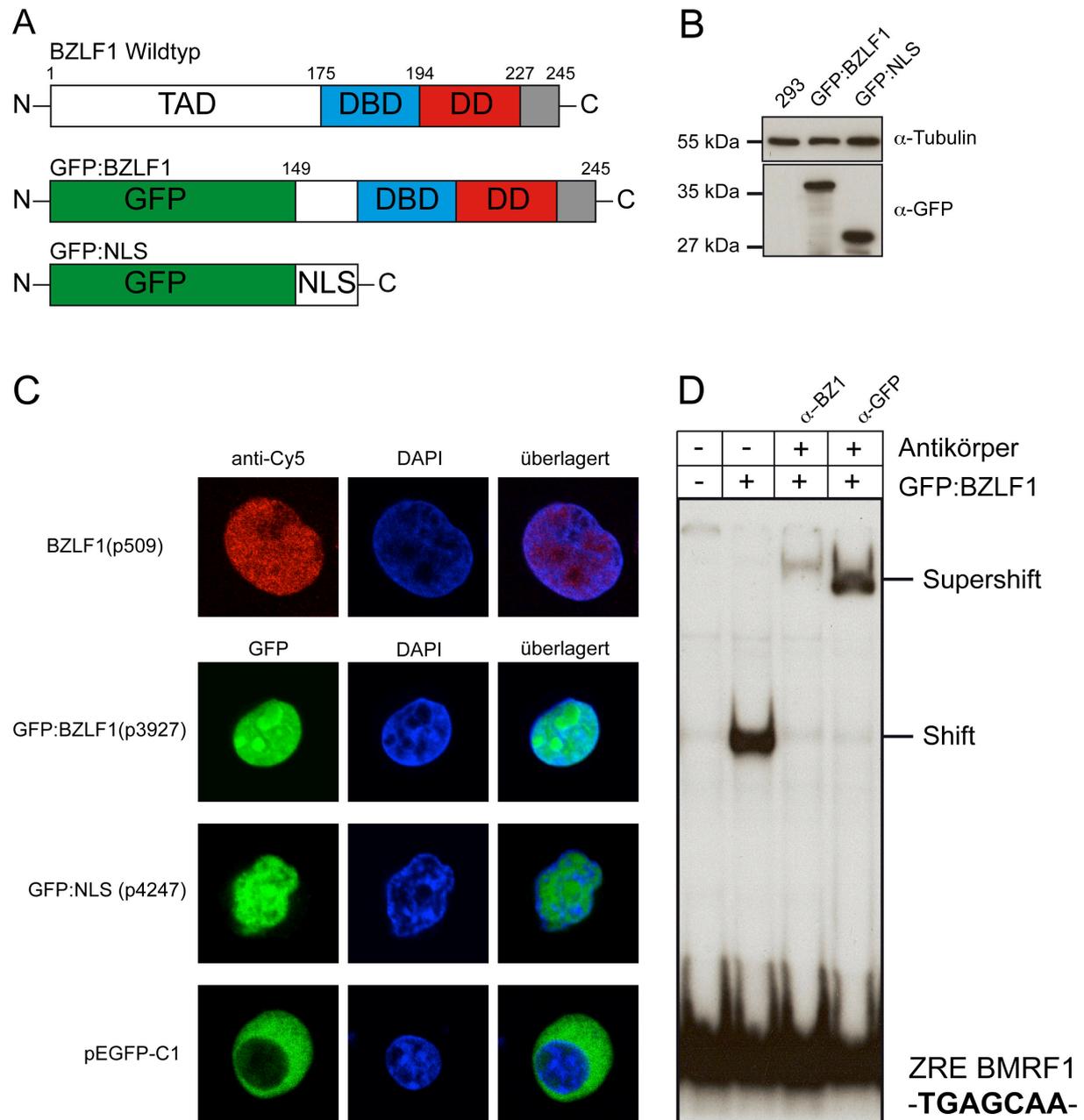


Abb. 4.2: Übersicht und Analyse der GFP-Fusionsproteine für *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen. (A) Gezeigt ist eine schematische Zusammenfassung der Protein-Funktionsdomänen von BZLF1 sowie der beiden GFP-Fusionsproteine GFP:BZLF1 und GFP:NLS. Das chimäre GFP:BZLF1 besteht aus den Aminosäuren 149-245 von BZLF1, die C-terminal im Expressionsvektor pEGFP-C1 mit GFP fusioniert wurden. Für Kontrollexperimente wurde GFP mit dem Kernlokalisierungssignal (NLS) des SV40 T-Antigens im Expressionsvektor pEGFP-C1 fusioniert (GFP:NLS). (B) HEK293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für GFP:BZLF1 und GFP:NLS transient transfiziert. Anschließende Western-Blot-Analysen mit einem GFP-Antikörper zeigten ähnliche Expressionsniveaus der beiden Fusionsproteine. Tubulin diente als Ladekontrolle, nicht transfizierte HEK293-Zellen als Negativkontrolle. (C) Zur intrazellulären Lokalisation der Fusionsproteine wurden Expressionsplasmide für BZLF1, GFP:BZLF1, GFP:NLS und GFP transient in HEK293-Zellen exprimiert. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass GFP:BZLF1 und GFP:NLS wie Wildtyp-BZLF1 ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind. Das vom Leervektor pEGFP-C1 exprimierte GFP lokalisierte im Zytoplasma. (D) Gel-Retentionsexperimente mit Kernextrakten aus GFP:BZLF1 transfizierten HEK293-Zellen zeigten eine sequenzspezifische Bindung des GFP:BZLF1-Fusionsproteins an ein BZLF1-'responsive element' (ZRE) aus dem *BMRF1*-Promotor. *Supershifts* mit einem BZLF1- und einem GFP-Antikörper bestätigen die Bindung des Fusionsproteins.

4.2.3 *In vitro* CpG-Methylierung und Fragmentierung der p2089 Maxi-EBV-DNA

Das Maxi-EBV-Plasmid p2089 mit einer Größe von 180 kbp umfasst das Genom des EBV-Prototypvirus B95.8. Der Einbau des F-Faktors und des Chloramphenicol Resistenzgens stellt die DNA-Replikation und Selektion in *E.coli* sicher (Delecluse *et al.*, 1998). Präparierte EBV-DNA aus *E.coli* ist frei von methylierten CpG-Dinukleotiden, da der verwendete Bakterienstamm DH10B keine Methyltransferase besitzt, der diesen Methylgruppentransfer katalysiert. Mithilfe der *de novo* Methyltransferase M.SssI ist es möglich, gezielte CpG-Methylierungen in die rekombinante EBV-DNA *in vitro* einzuführen. Dabei überträgt das Enzym eine Methylgruppe (CH₃) vom Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin (SAM) auf das C⁵-Kohlenstoffatom des Cytosins eines CpG-Dinukleotids doppelsträngiger DNA. Es entstehen 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystein (SAH) (Abb. 4.3, A). Eine vollständige Methylierung der p2089-EBV-DNA kann durch eine Restriktionshydrolyse mit einem CpG-methylierungssensitiven Enzym, wie z. B. Agel kontrolliert werden. Eine Methylierung der CpG-Dinukleotide der Agel-Zielsequenz blockiert eine Restriktionshydrolyse mit Agel (Abb. 4.3, B).

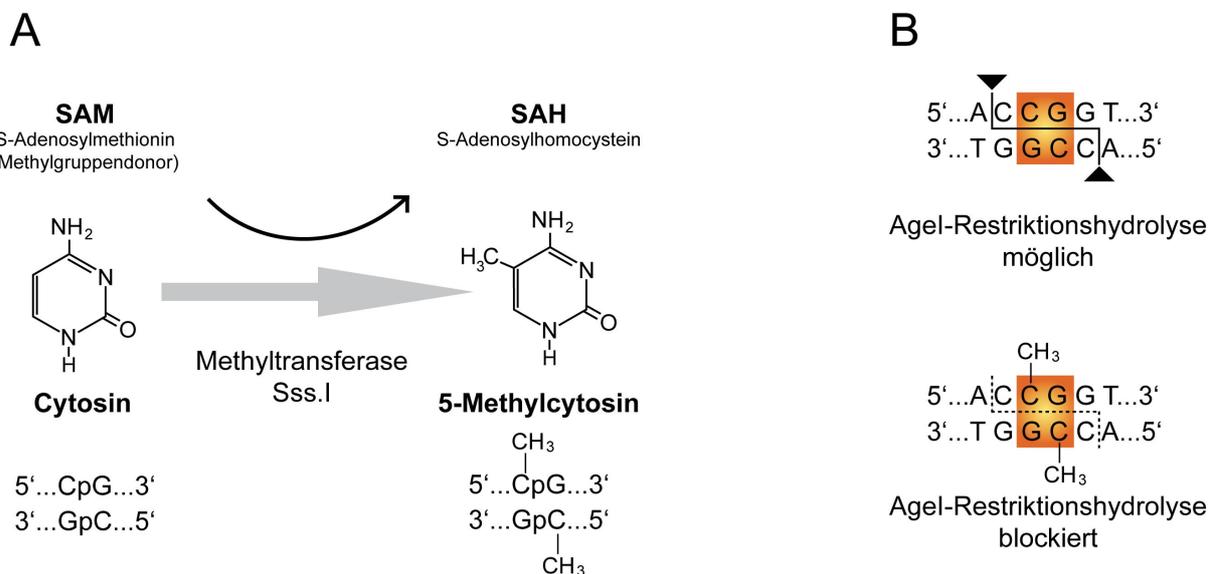


Abb 4.3: *In vitro* DNA-Methylierung mit der *de novo* Methyltransferase M.SssI. (A) Die *de novo* DNA-Methyltransferase M.SssI katalysiert den Transfer einer Methylgruppe (CH₃) auf das C⁵-Kohlenstoffatom der Cytosinbase eines CpG-Dinukleotids doppelsträngiger DNA. S-Adenosinmethionin dient als Kofaktor bzw. Methylgruppendonor. Es entstehen 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystein (SAH). (B) Eine vollständige CpG-Methylierung kann mithilfe methylierungssensitiver Restriktionshydrolasen, wie Agel überprüft werden. Enthält die Schnittstelle von Agel ein methyliertes CpG-Dinukleotid, ist das Enzym nicht mehr in der Lage, die DNA an dieser Position zu schneiden.

Abbildung 4.4 A zeigt ein exemplarisches Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer Analyse von unbehandelter (-) und M.SssI *de novo* CpG-methylierter EBV-DNA nach einem Agel-Verdau (+). Bedingt durch die vollständige CpG-Methylierung konnten im Vergleich zur unmethylierten EBV-DNA keine niedermolekularen DNA-Fragmente generiert werden. Zur weiteren Verwendung der beiden EBV-DNA-Präparationen für *in vitro*-DIPs wurden diese durch Ultraschallbehandlung mechanisch auf eine durchschnittliche Länge von 200-400 bp fragmentiert (Abb. 4.4, B). Die Länge der DNA spielt eine entscheidende Rolle für die nachfolgenden Analysen, da sie mit der spezifischen Anreicherung von DNA-Fragmenten mit potenziellen Bindestellen korreliert.

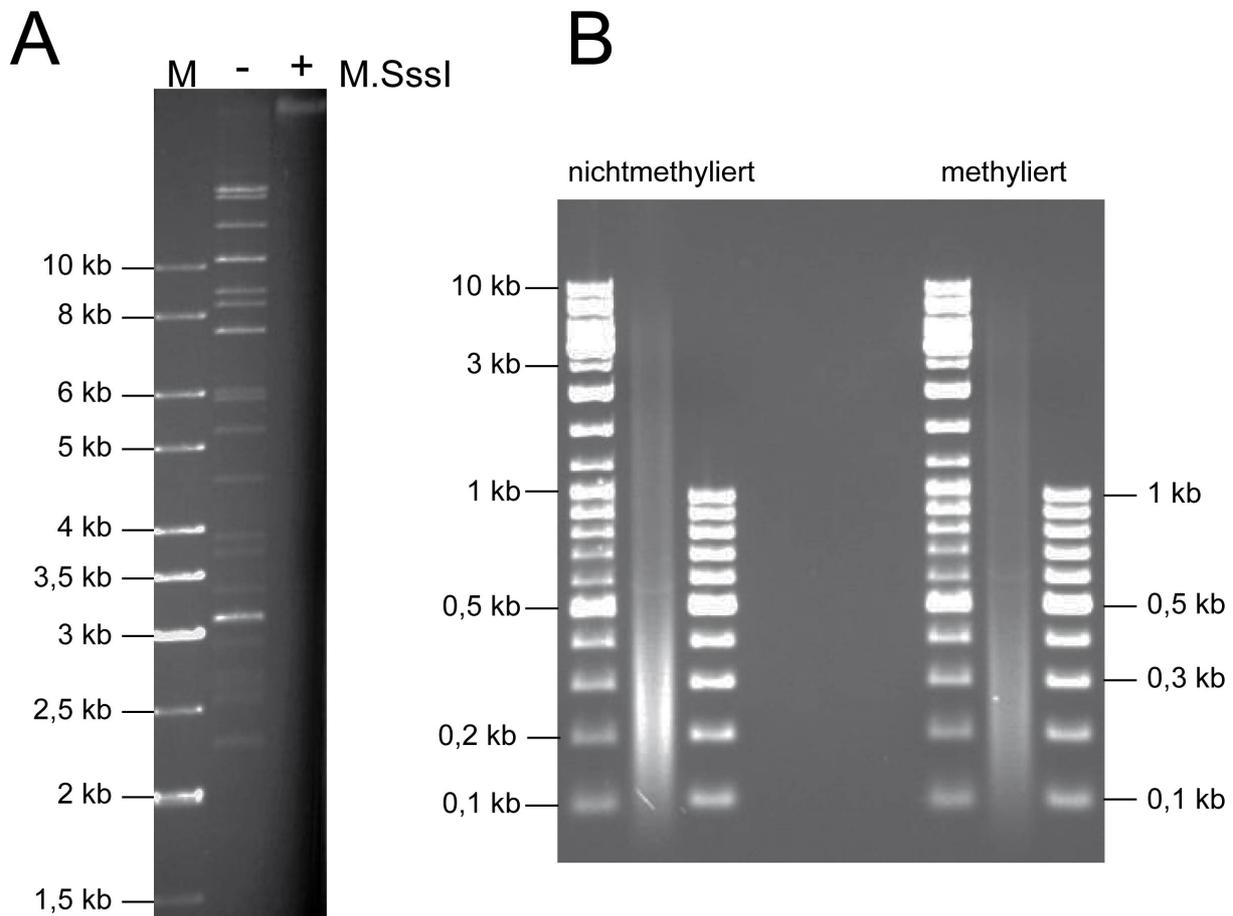


Abb 4.4 Kontrolle der *in vitro* DNA-Methylierung und mechanische Fragmentierung der EBV-DNA für *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen. (A) Gezeigt ist ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel eines Agel-Restriktionsverdau mit unmethylierter (-) bzw. vollständig *in vitro* CpG-methylierter EBV-DNA (+). Im Gegensatz zur unmethylierten EBV-DNA, die das spezifische Restriktionsmuster eines Agel-Verdau zeigt, ist eine Agel-Restriktionshydrolyse der *in vitro* methylierten EBV-DNA vollständig blockiert. (B) Die DNA-Präparationen wurden für *in vitro* DIPs mechanisch-akustisch fragmentiert. Ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zeigt p2089 EBV-DNA und CpG-methylierte p2089 EBV-DNA, mit einer durchschnittlichen Länge von 200-400 bp.

4.2.4 BZLF1 bindet selektiv an bekannte Promotoren *in vitro*

Zur Validierung der *in vitro* DIP-Experimente mit unmethylierter und methylierter EBV-DNA wurde eine BZLF1-Bindung zunächst an ausgewählten Promotoren überprüft (Abb. 4.5). Bekannte ZREs befinden sich u. a. in Promotoren der lytischen Gene *BRLF1*, *BMRF1* und im lytischen Replikationsursprung (*oriLyt*) (Bhende *et al.*, 2004; Lieberman *et al.*, 1990; Packham *et al.*, 1990; Quinlivan *et al.*, 1993). Die *in vitro* DNA-IPs wurden wie beschrieben (Abs. 4.2.1) durchgeführt und die Anreicherung der DNA-Fragmente der methylierten und unmethylierten IP mithilfe der quantitativen 'real-time' PCR analysiert. Die Promotorfragmente von *BRLF1*, *BMRF1* und das ZRE5 von *oriLyt* konnten im Vergleich zu einem EBV-Referenzlokus (*BCRF2*) bis zu 100-fach angereichert werden. Eine vollständige CpG-Methylierung (meCpG) der EBV-DNA steigerte die Bindung von BZLF1 an die Promotoren der Gene *BRLF1* und *BMRF1*. Die BZLF1-Bindungsaffinität an das ZRE5 von *oriLyt* war bei einer DNA-Methylierung leicht reduziert. Kontrollexperimente mit dem Fusionsprotein GFP:NLS lieferten keine spezifische Anreicherung an diesen Loci und bestätigten die Selektivität der BZLF1-Bindung (Abb. 4.5).

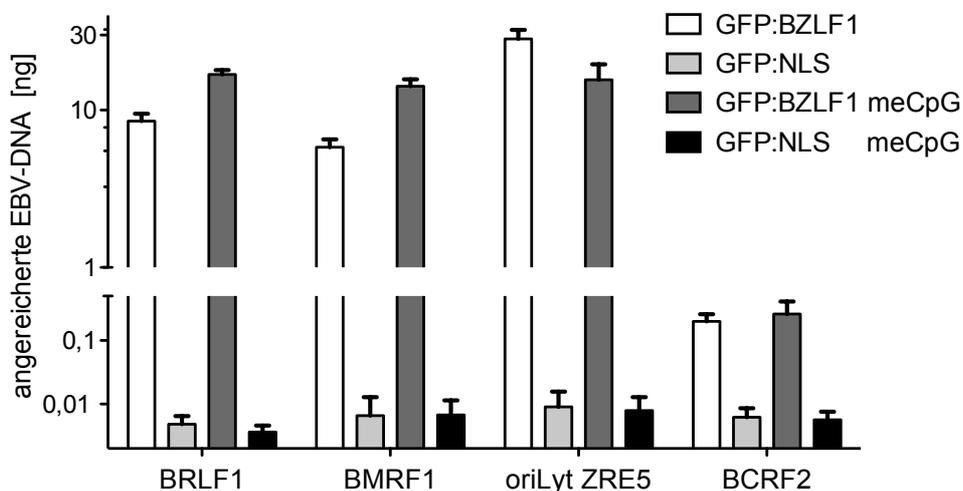


Abb. 4.5: Quantifizierung der *in vitro* BZLF1-Bindung an unmethylierte und methylierte EBV-DNA. Für *in vitro* DIPs wurden HEK293-Zellen transient mit GFP:BZLF1 bzw. GFP:NLS Expressionsplasmiden transfiziert. Kernextrakte wurden mit unmethylierter, oder *in vitro* CpG-methylierter (meCpG) rekombinanter EBV-DNA aus *E.coli* inkubiert. Dargestellt ist die Menge GFP:BZLF1- bzw. GFP:NLS-gebundener DNA, die mit einem GFP-Antikörper immunpräzipitiert wurde. Die angereicherte DNA wurde mithilfe der 'real-time' PCR an vier ausgewählten EBV-Loci quantifiziert. GFP:BZLF1 band im Vergleich zum Referenzlokus *BCRF2* spezifisch an ZREs in den Promotoren von *BRLF1* und *BMRF1* sowie im lytischen Replikationsursprung (*oriLyt* ZRE5). GFP:BZLF1 zeigte eine höhere Affinität an DNA-Fragmente in den Promotoren von *BRLF1* und *BMRF1*, wenn diese methyliert waren (GFP:BZLF1 meCpG). Im ZRE5 von *oriLyt* war keine erhöhte Affinität von GFP:BZLF1 an methylierte EBV-DNA zu beobachten. Kernextrakte, in denen das Kontrollfusionsprotein GFP:NLS exprimiert wurde, zeigten keine spezifische Bindung an diese DNA-Abschnitte im EBV-Genom. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.5 Genomweite EBV-*'Microarray'*-Analysen

Nachdem die *in vitro* DIP-Experimente eine selektive Bindung von BZLF1 an ausgewählte EBV-Promotoren bestätigten, sollten *'Microarray'*-Analysen die Gesamtheit aller BZLF1-Bindestellen im EBV-Genom erfassen. Die einzelnen Schritte einer *'Microarray'*-Hybridisierung nach einer *in vitro* DIP sind in Abbildung 4.6 schematisch dargestellt. Die immunpräzipitierte EBV-DNA und eine nicht selektierte *'input'* EBV-DNA wurden jeweils mit einem der Fluorochrome Alexa3 (grün) bzw. Alexa5 (rot) markiert. Äquimolare fluoreszenzmarkierte DNA-Mengen, auch als Zielstrukturen (*'targets'*) bezeichnet, hybridisierten an Sondenmoleküle (*'probe'*), die auf dem EBV-*'Microarray'* als sogenannte *'spots'* abgelegt wurden. Um eine Hybridisierung der Zielstrukturen auf dem *'Microarray'* zu gewährleisten, wurden *'probe'* und *'target'* bei 95 °C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte in einer Tecan HS 4000 Pro-Hybridisierstation bei 60°C. Der verwendete EBV-*'Microarray'* stand in der Arbeitsgruppe zur Verfügung und wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Ocimum Biosolutions synthetisiert (Kalla, 2008). 285 PCR-Fragmente, die das gesamte B95.8-EBV-Genom dachziegelartig überlappend abdecken, wurden kovalent auf der Oberfläche eines Glaträgers immobilisiert. Abbildung 4.7 A zeigt das Auftragsschema der PCR-Produkte auf dem EBV-*'Microarray'*. Die Fluoreszenzmessung nach der Hybridisierung erfolgte mit einem GenePix Personal 4100A Fluoreszenzscanner. Die Fluoreszenzintensität der beiden Farbstoffe in jedem *'spot'* war abhängig von der gebundenen DNA-Menge. Abbildung 4.7, B zeigt einen exemplarischen Auszug einer eingelesenen Aufnahme im 16-bit TIFF Format einer *'Microarray'*-Analyse nach einer GFP:BZLF1 *in vitro* DIP mit unmethylierter EBV-DNA (links) und methylierter EBV-DNA (rechts). Dargestellt sind die *'spots'* der PCR-Fragmente DH-GF (Reihe A1-J1, Spalte 10-18). Die immunpräzipitierte EBV-DNA wurde mit dem Farbstoff Alexa3, die Referenz-DNA mit dem Farbstoff Alexa5 fluoreszenzmarkiert. Der *'spot'* auf dem *'Microarray'* erschien z. B. orange bzw. rot, wenn die GFP:BZLF1 immunpräzipitierte DNA im Vergleich zur Referenz-DNA überrepräsentiert war. Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte EN-ET (Nukleotidkoordinaten 83499-86848 des B95.8-EBV-Genoms) zeigte, dass eine Anreicherung der methylierten EBV-DNA durch BZLF1 in Form von roten und orangen *'spots'* optisch erkennbar ist. Die gezeigten Aufnahmen wurden mithilfe des Scannerprogramms GenePix 6.0 erstellt und analysiert. Das Programm wandelt die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe in Zahlenwerte um und berechnet das

Verhältnis (*'ratio'*) aus den Medianwerten der Bildpunktintensitäten (*'pixel-by-pixel intensity'*) jedes einzelnen *'spots'* (= median of ratios). In einer abschließenden Normalisierung wurden die Medianwerte der Ratios auf den Wert 1 gesetzt (*'median of ratios set as 1'*).

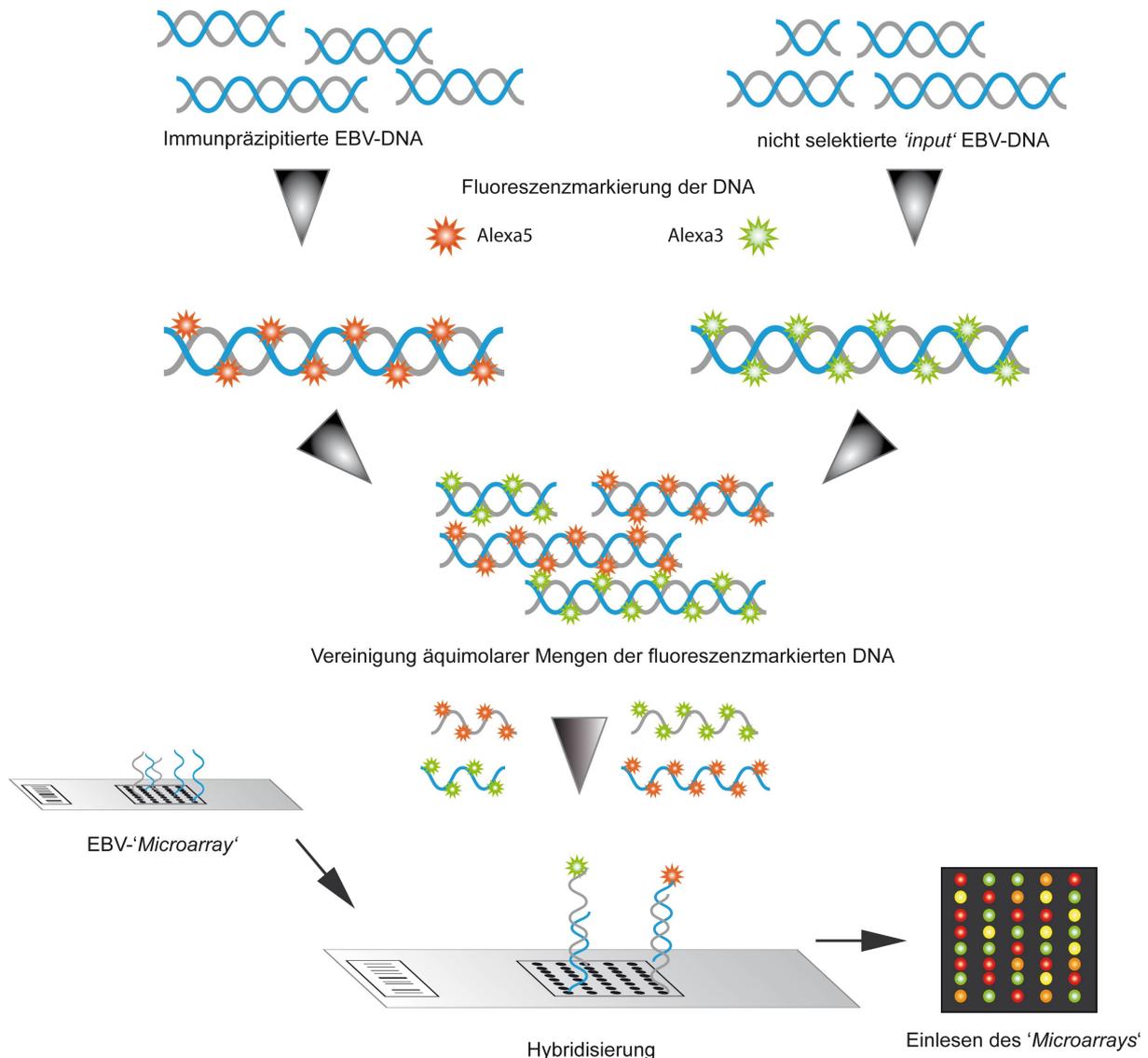
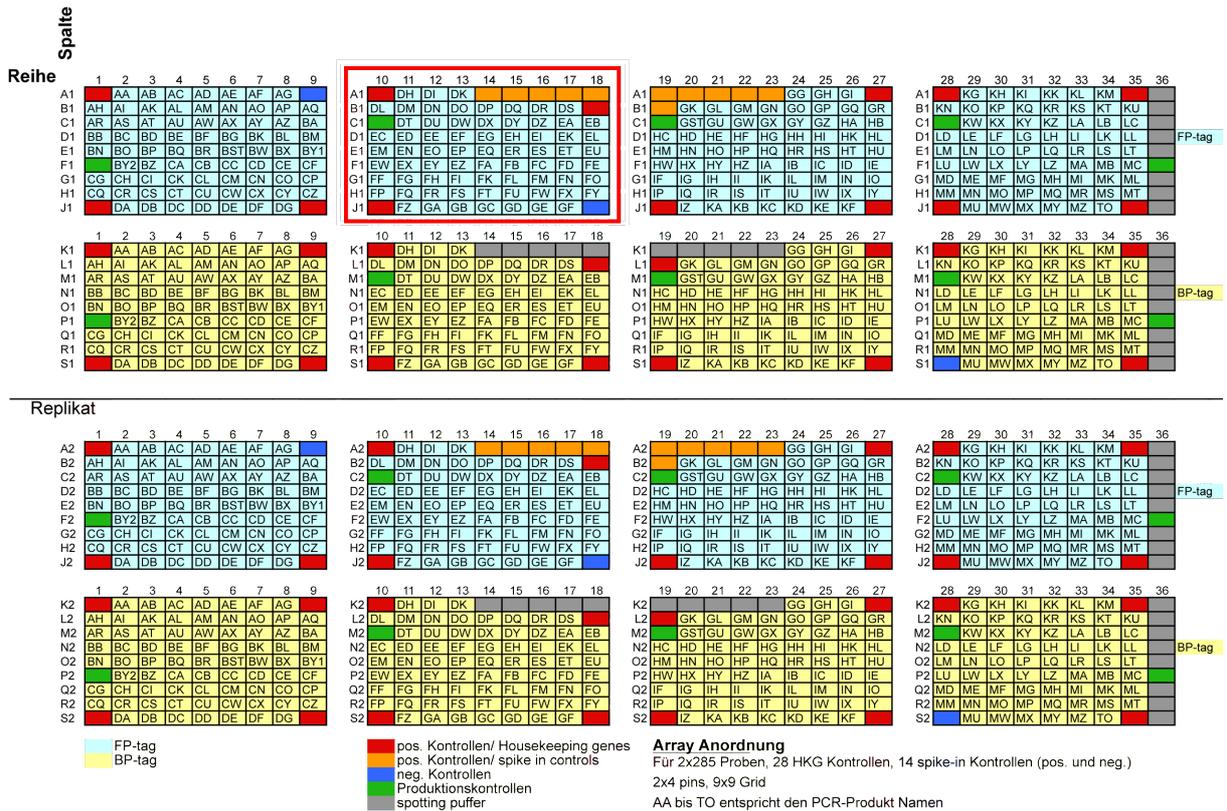


Abb. 4.6: Schematischer Versuchsablauf einer *'Microarray'*-Hybridisierung zur Detektion angereicherter EBV-DNA Fragmente. Die DNA-Fragmente einer *in vitro* DIP und eine unselektierte Referenz EBV-DNA (*'input'*) wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen (Alexa3 = grün; Alexa5 = rot) fluoreszenzmarkiert. Nach dem Einbau der Fluorochrome wurden äquimolare Mengen der markierten DNA für eine Hybridisierung eingesetzt. Vor jeder Hybridisierung mussten sowohl die kovalent gebundenen PCR-Produkte auf dem *'Microarray'*, als auch die markierten DNA-Fragmente (Zielstrukturen) der DIPs zu Einzelstrangmolekülen denaturiert werden. Dadurch konnten die Zielstruktur-DNA-Moleküle an die komplementären Proben auf dem *'Microarray'* hybridisieren, die in einem definierten Raster auf der Glasoberfläche immobilisiert worden waren. Mithilfe eines Scanners wurde die Fluoreszenzintensität der gebundenen DNA-Moleküle detektiert und quantitativ bestimmt. Die Fluoreszenzintensität einer *'Microarray'*-Hybridisierung ist abhängig von der Menge der hybridisierten DNA. Ist z. B. ein immunpräzipitiertes DNA-Fragment im Vergleich zur unselektierten Referenz-DNA überrepräsentiert erscheint der Spot orange bzw. rot.

A



B

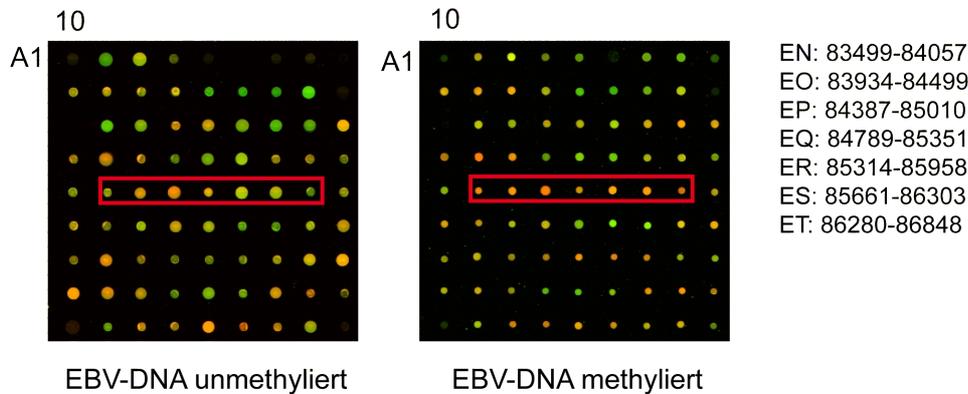


Abb. 4.7: Anordnung der PCR-Fragmente auf dem EBV-‘Microarray’ und die exemplarische Darstellung einer ‘Microarray’-Hybridisierung. (A) Tabellarische Darstellung aller immobilisierten PCR-Fragmente (AA-TO) des EBV-‘Microarrays’ (Ocimum Biosolutions). Die PCR-Produkte der Spalten A1-J1 sind blau unterlegt und tragen einen spezifischen DNA-‘Sequenz-Tag’ am 5’-Ende des ‘Forward-Primers’. PCR-Produkte der Reihen K1-S1 sind gelb unterlegt und tragen einen spezifischen DNA-‘Sequenz-Tag’ am 5’-Ende des ‘Backward-Primers’. Beide Reihen wurden ein zweites Mal als Replikat auf dem Glasträger hinterlegt. Aufgrund der gewählten Epoxid-Immobilisierung der PCR-Produkte spielen die unterschiedlichen Markierungen an den Enden der DNA-Fragmente keine Rolle. Die hinterlegten Kontrollspots sind farblich gekennzeichnet und dienen zur Transkriptomanalyse, zu deren Zweck der ‘Microarray’ ursprünglich konzipiert wurde. (B) Gezeigt ist der eingelezene Ausschnitt einer Hybridisierung der GFP:BZLF1 *in vitro* DIP mit unmethylierter (links) bzw. methylierter (rechts) EBV-DNA. Die ‘spots’ entsprechen den PCR-Fragmenten der Spalten A1-J1/ Reihe 10-18 (siehe A, rote Box). Das rote Rechteck markiert die PCR-Produkte EN-ET, welche die Nukleotide 83499-86848 des B95.8-EBV-Genoms umfassen. Wurde ein bestimmtes DNA-Fragment bevorzugt von GFP:BZLF1 in CpG-methylierter Form gebunden, zeigte sich dies in der roten Fluoreszenz des jeweiligen ‘spots’, an den das DNA-Fragment hybridisierte.

Abbildung 4.8 zeigt die genomweiten Ergebnisse der 'Microarray'-Analysen der *in vitro* DIP mit GFP:BZLF1. Die Verhältnisse ('ratios') von immunpräzipitierter EBV-DNA (IP) und nicht-selektierter EBV-DNA ('input') sind graphisch in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Jeder Balken entspricht einem PCR-Fragment des 'Microarrays'. Die Ergebnisse mit unmethylierter (blau) und methylierter (rot) EBV-DNA sind farblich gekennzeichnet und auf der linken Y-Achse aufgetragen. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Hybridisierungen und zeigt die Differenz der 'ratios' von unmethylierter und methylierter EBV-DNA, um Unterschiede im Bindungsverhalten zu verdeutlichen. Die Koordinaten des B95.8-EBV-Genoms sind auf der X-Achse vermerkt. DNA-Fragmente mit bekannten und neu identifizierten BZLF1-Bindestellen, die bestimmten Promotorregionen zugeordnet werden konnten, sind vermerkt. Die Qualität der 'Microarray'-Analysen wurde zunächst anhand der sequenzspezifischen Bindung von GFP:BZLF1 an DNA-Fragmente mit bekannten BZLF1-gebundenen Elementen überprüft. ZREs befinden sich u. a. in den lytischen Promotoren der Gene *BMRF1*, *BFRF1*, *BMLF1/BSLF2*, *BRLF1*, *BALF2* sowie im lytischen Replikationsursprung *oriLyt*, der mit den Promotoren von *BHRF1* und *BHLF1* überlappt. Die 'ratios' an diesen Spots erzielten relative Werte von bis zu 5, womit eine spezifische BZLF1-Bindung an diese Fragmente bestätigt werden konnte. Zusätzliche bisher unbekannte Bindestellen wurden in DNA-Fragmenten identifiziert, die mit den Promotoren der Gene *BBLF4*, *BILF2*, *BCRF1* und *BALF2* korrelieren. Weitere putative Bindestellen konnten keinen distinkten Promotorbereichen zugeordnet werden. Dies lag zum einen an der limitierten Auflösung des 'Microarrays' von 500-700 Nukleotiden, zum anderen an der Kolokalisation oder der Überlappung von transkribierten Regionen und Promotorbereichen des oberen und unteren DNA-Strangs von EBV. Bhende und Kollegen identifizierten zwei ZREs im *BRLF1*-Promotor, die bevorzugt (ZRE2) oder ausschließlich (ZRE3) von BZLF1 in methylierter Form gebunden werden (Bhende *et al.*, 2004; Bhende *et al.*, 2005). Der vergleichende Versuchsansatz mit unmethylierter und methylierter EBV-DNA sollte weitere BZLF1-Bindestellen aufdecken, die diese Kriterien erfüllen. Die Differenz der beiden Verhältnisse verdeutlichte, dass BZLF1 auch an die Promotoren von *BBLF4*, *BMRF1*, *BMLF1/BSLF2*, *BALF2* und *BALF5* bevorzugt im methylierten Zustand bindet. Die Promotoren mit bekannten ZREs, wie *BMRF1*, *BMLF1/BSLF2* und *BALF2*, müssten demnach weitere ZREs enthalten, die bevorzugt oder ausschließlich in methylierter Form von BZLF1 gebunden werden.

Die identifizierten Promotoren regulieren Gene, die für die virale DNA-Helikase (*BBLF4*), den Prozessivitätsfaktor der viralen DNA-Polymerase (*BMRF1*), den RNA Exportfaktor SM (*BMLF1/BSLF2*), das Einzelstrang-DNA-Bindeprotein (*BALF2*) sowie die virale DNA-Polymerase (*BALF5*) von EBV kodieren. Eine Steigerung der Bindeaffinität von BZLF1 durch die Einführung methylierter CpG-Dinukleotide konnte an den Promotoren von *BCRF1*, *BILF2*, *BHRF1*, *BHLF1* und dem lytischen Replikationsursprung *oriLyt* nicht detektiert werden. *BCRF1* und *BHRF1* kodieren die viralen Homologe von IL-10 und Bcl-2 und werden wie *BZLF1* in der frühen Phase einer EBV-Infektion exprimiert (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Kalla *et al.*, 2010; Zeidler *et al.*, 1997). Kontrollexperimente mit dem Fusionsprotein GFP:NLS zeigten genomweit keine spezifische Anreicherung mit unmethylierter und methylierter EBV-DNA. Das GFP:NLS 'Microarray'-Profil ist im Anhang hinterlegt.

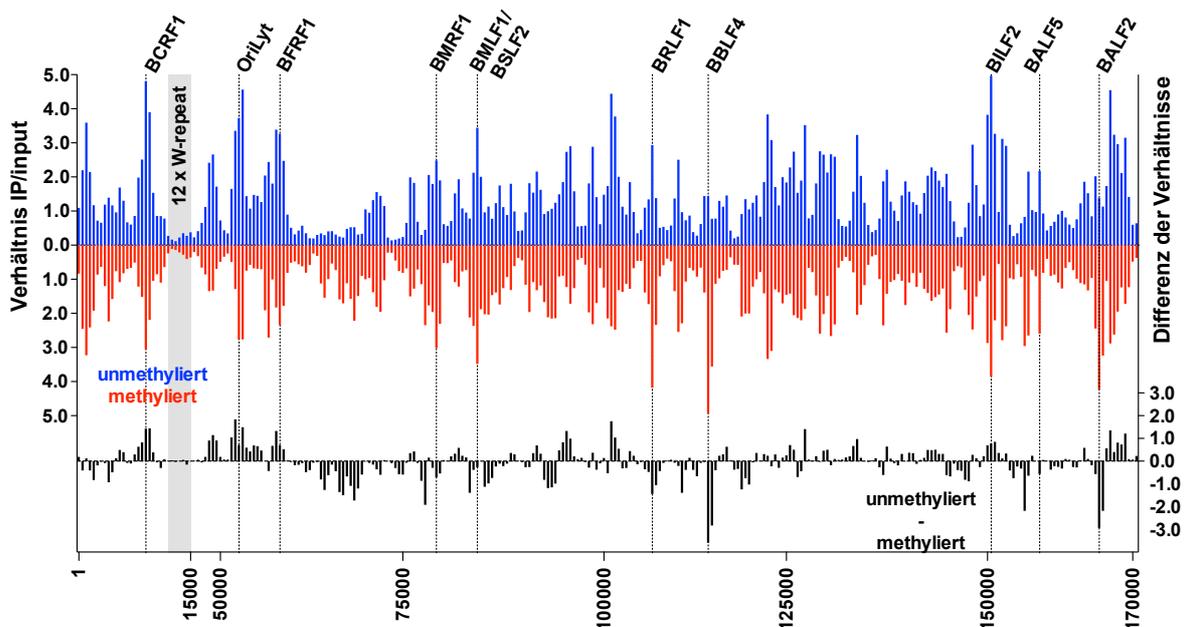


Abb. 4.8: Genomweite 'Microarray'-Analysen nach *in vitro* DNA Immunpräzipitationen mit unmethylierter bzw. methylierter EBV-DNA. *In vitro* DIPs wurden mit unmethylierter EBV-DNA aus *E. coli* bzw. mit vollständig *de novo* CpG-methylierter EBV-DNA durchgeführt. Die angereicherten DNA-Fragmente wurden mit Alexa5, die nicht selektierte 'input' Referenz-DNA mit Alexa3 fluoreszenzmarkiert. Äquimolare Mengen der DNAs wurden vereint, auf einem EBV-'Microarray' hybridisiert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten der gebundenen DNA-Moleküle detektiert. Gezeigt sind die Ergebnisse der genomweiten 'Microarray'-Analysen mit GFP:BZLF1 in Form eines Balkendiagramms. Auf der linken Y-Achse ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der immunpräzipitierten DNA (IP) zur 'input' DNA (input) gegen die 285 PCR-Fragmente ('spots') des 'Microarrays' mit einer Länge von 500-700 bp aufgetragen. Die Koordinaten des B95.8-EBV-Genoms (1-172281) sind vermerkt. In blau sind die Ergebnisse der *in vitro* DIP mit unmethylierter EBV-DNA, in rot die Resultate mit methylierter EBV-DNA dargestellt. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Hybridisierungen als Differenz der Verhältnisse von unmethylierter zu methylierter EBV-DNA. GFP:BZLF1 band mit höherer Affinität an methylierte DNA-Fragmente, die z. B. den Promotorregionen der Gene *BMLF1/BSLF2*, *BMRF1*, *BRLF1*, *BALF2* oder *BBLF4* zugeordnet werden konnten. Regionen, wie z. B. der lytische Replikationsursprung *oriLyt*, wurden mit höherer Affinität gebunden, wenn die EBV-DNA frei von methylierten CpG-Dinukleotiden ist.

4.2.6 Genomweite 'Next Generation Sequencing'-Analysen

Die genomweiten 'Microarray'-Analysen haben gezeigt, dass es neben *BRLF1* offensichtlich weitere EBV-Promotoren gibt, die bevorzugt in methylierter Form von BZLF1 gebunden werden. Die Komplexität des EBV-Genoms und die limitierte Auflösung des EBV-'Microarrays' von 500-700 Nukleotiden ließen jedoch nur eingeschränkte Aussagen über die Lokalisation neuer, möglicher Bindestellen von BZLF1 zu. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Strom (Institut für Humangenetik, HMGU) war es mir möglich, die angereicherten DNA-Fragmente der *in vitro* DIPs mithilfe von 'Next Generation Sequencing' (NGS) zu analysieren. Die Technologie dieses Verfahrens basiert auf einer parallelen Hochdurchsatz-Sequenzierung von Nukleinsäuren.

Zu diesem Zweck wurde aus den immunpräzipitierten DNA-Fragmenten eine Sequenzierbibliotheken erstellt (Paired-End DNA Sample Preparation Kit, Illumina), bei der kurze DNA-Adapter-Moleküle an die Enden der DNA-Fragmente ligiert wurden. Die DNA-Fragmente wurden mithilfe der Adaptoren auf einem optischen Trägermaterial ('Flow Cell') gebunden und nach einer isothermalen Brückenamplifikation klonale Sequenzier-'Cluster' generiert (Paired-End Cluster Generation Kit GAII v1, Illumina). Die millionenfach vorliegenden 'Cluster' wurden im Genome Analyzer II (Illumina, 36-cycle sequencing kit v1) nach dem Syntheseprinzip mit einer „Leselänge“ von 36 Basenpaaren sequenziert ('36bp single-end reads'). Die Sequenzierungen der unmethylierten und methylierten EBV-DNA ergaben jeweils 6,13 Millionen bzw. 3,78 Millionen '36bp single-end reads'. Die gelesenen Sequenzen konnten mithilfe der Computersoftware MAQ (Li *et al.*, 2008) dem EBV Referenz-genom p2089 und dem bovinen Genom *bosTau4* (Bos Taurus, Rind) zugewiesen werden. Kalbsthymus-DNA diente als unspezifische Kompetitor-DNA während der Immunpräzipitationen (siehe Kapitel 3.4.4). Die Sequenziertiefe ('depth'), definiert als die Zahl, mit der ein einzelnes Nukleotid sequenziert bzw. identifiziert wurde, erreichte im methylierten Ansatz einen Maximalwert von 9313, im unmethylierten Ansatz betrug dieser Wert 3174. Die Minimalwerte in beiden Ansätzen lagen bei 0-10 gelesenen Nukleotiden, wodurch ein dynamischer Bereich von nahezu $1:10^3$ erzielt wurde. Die beiden Sequenzierdatensätze wurden anhand ihrer Maximalwerte normalisiert (Normalisierungsfaktor: 2,93).

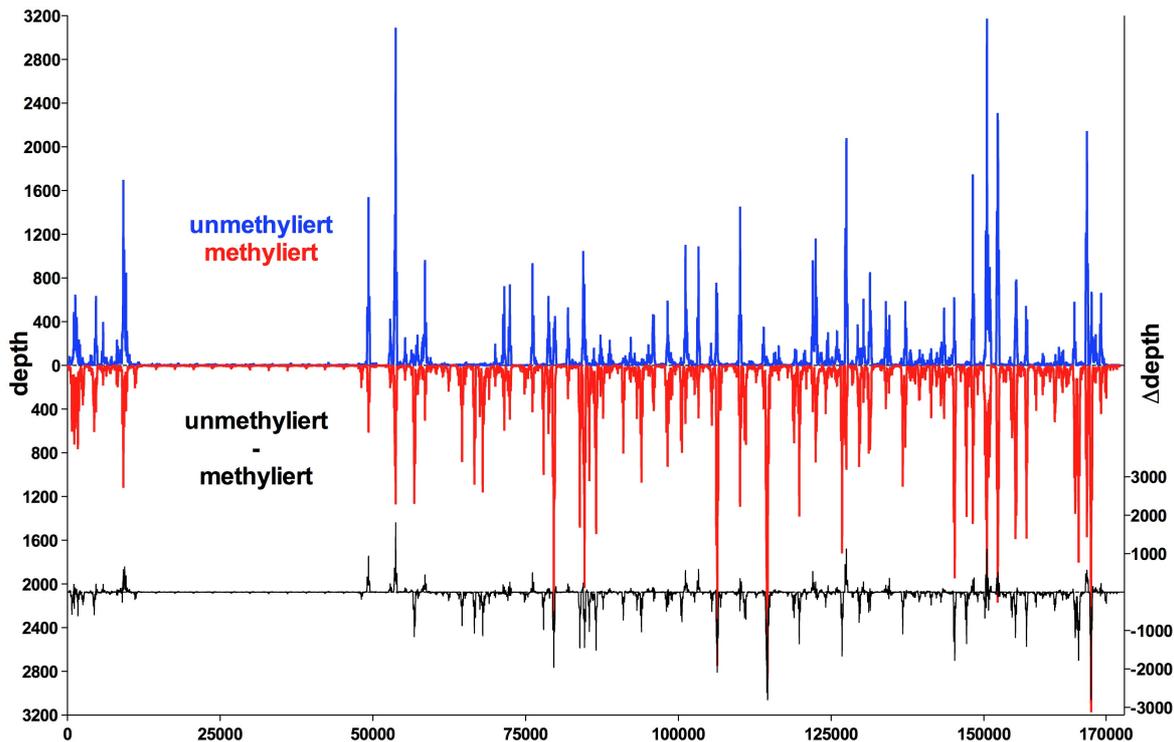


Abb. 4.9: Genomweite 'Next Generation Sequencing'-Analysen nach *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen mit GFP:BZLF1 von unmethylierter bzw. methylierter EBV-DNA. GFP:BZLF1 *in vitro* DIPs von wurden mit unmethylierter EBV-DNA bzw. mit vollständig *de novo* CpG-methylierter EBV-DNA aus *E.coli* durchgeführt und anschließend mithilfe der 'Next Generation Sequencing'-Technologie analysiert. Auf der Y-Achse ist die Sequenziertiefe ('depth') jedes Nukleotids graphisch gegen die Position im Wildtyp B95.8-EBV-Genom aufgetragen. Der blaue Linienverlauf zeigt die Sequenziertiefen der angereicherten, unmethylierten DNA-Fragmente, in rot sind die Sequenziertiefen mit methylierter EBV-DNA dargestellt. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Sequenzierungen als Differenz der Sequenziertiefen (Δ 'depth') von unmethylierter zu methylierter EBV-DNA. Die Übersicht zeigt, dass GFP:BZLF1 selektiv und bevorzugt an methylierte EBV-DNA bindet.

Abbildung 4.9 zeigt die graphische Übersichtsdarstellung der normalisierten Datensätze mit unmethylierter (blau) und methylierter (rot) EBV-DNA. Die Sequenziertiefe, als 'depth' bezeichnet, wurde auf der linken Y-Achse gegen die Nukleotidkoordinaten des B95.8-EBV-Genoms auf der X-Achse aufgetragen. Die Resultate der berechneten Differenzen der Sequenziertiefen (Δ 'depth') zeigten, dass BZLF1 bevorzugt an methylierte EBV-DNA bindet. Zur weiteren Analyse individueller Gene und Promotorregionen wurde die skalierbare X-Achse an ausgewählte Sequenz-abschnitte des Wildtyp B95.8-EBV-Genoms angepasst.

Abbildung 4.10 zeigt eine graphische Darstellung vier beispielhaft gewählter Gene (*BHRF1*, *BHLF1*, *BRLF1* und *BZLF1*) und deren Promotor-regionen mit bereits identifizierten ZREs. Die jeweilige Exonstruktur der Gene ist in Form von Rechtecken dargestellt. Die Pfeilrichtung zeigt die 5'-3'-Orientierung der Leserahmen dieser

Gene. Die in der Literatur beschriebenen Bindestellen sind mit einem Kreis gekennzeichnet und die Sequenzen der zugehörigen Bindemotive vermerkt. Die NGS-Analysen bestätigten die ZREs in den Promotoren der divergent orientierten Gene *BHLF1* und *BHRF1* (Chavrier *et al.*, 1989; Lieberman und Berk, 1990), die mit dem lytischen Replikationsursprung *oriLyt* überlappen (Hammerschmidt und Sugden, 1988). Die ZREs 1-4 lokalisieren innerhalb von 100 bp und konnten nicht einzeln aufgelöst werden. Mit großer Präzision wurden die ZREs 5-7 identifiziert (oben). Die beiden autoregulatorischen ZREs des *BZLF1*-Promotors (Flemington und Speck, 1990a; Urier *et al.*, 1989) wurden identifiziert, jedoch nur als eine Bindestelle aufgelöst (Abb. 4.10, unten), da ihr Abstand nur 5 bp beträgt (Flemington und Speck, 1990a). Eine bevorzugte Bindung an methylierte EBV-DNA konnte in den Promotoren von *BHRF1*, *BHLF1* und *BZLF1* nicht detektiert werden. Zwei von drei publizierten Bindestellen (Bhende *et al.*, 2004; Packham *et al.*, 1990) im *BRLF1*-Promotor (ZRE1 und ZRE2) konnten exakt bestätigt werden. ZRE2 von *BRLF1* zeigte die beschriebene, bevorzugte BZLF1-Bindung an methylierte DNA (Bhende *et al.*, 2004). Obwohl ein CpG-Dinukleotid in ZRE1 fehlt, zeigte dieses Motiv eine leicht erhöhte DNA-Bindung im methylierter Form. Möglicherweise wird ZRE1 durch eine nahegelegene unerkannte Bindestelle oder mittelbar durch ZRE2 beeinflusst. ZRE3, welche als ausschließlich methylierungsabhängige Bindestelle deklariert wurde (Bhende *et al.*, 2004), konnte nicht identifiziert bzw. aufgelöst werden. Stattdessen wurde eine weitere, mögliche Bindestelle im *BRLF1*-Promotor mit ZRE3-ähnlichen Eigenschaften identifiziert. Die kürzlich publizierten Bindestellen im Promotor von *BRRF1* (Exonstruktur nicht vermerkt) konnten nicht bestätigt werden (Dickerson *et al.*, 2009).

Weiterhin wurden alle bisher charakterisierten ZREs von *BFRF1* (Granato *et al.*, 2006), *BMRF1* (Kenney *et al.*, 1992; Quinlivan *et al.*, 1993), *BMLF1/BSLF2* (Farrell *et al.*, 1989; Rooney *et al.*, 1989; Urier *et al.*, 1989) und *BALF2* (Hung und Liu, 1999; Nakayama *et al.*, 2009) bestätigt. Bis auf *BFRF1*, dessen Genprodukt eine Rolle bei der Reifung von Virionen spielt (Farina *et al.*, 2005), wurden in allen genannten Promotoren zusätzliche methylierungsabhängige Bindestellen identifiziert. Die Differenz der Sequenziertiefen verdeutlichte die verstärkte BZLF1-Bindung an methylierte EBV-DNA. Mögliche Bindemotive mit enthaltenden CpG-Dinukleotiden sind vermerkt. Die graphische Darstellung der beschriebenen Genregionen und Promotoren sind im Anhang dieser Arbeit hinterlegt.

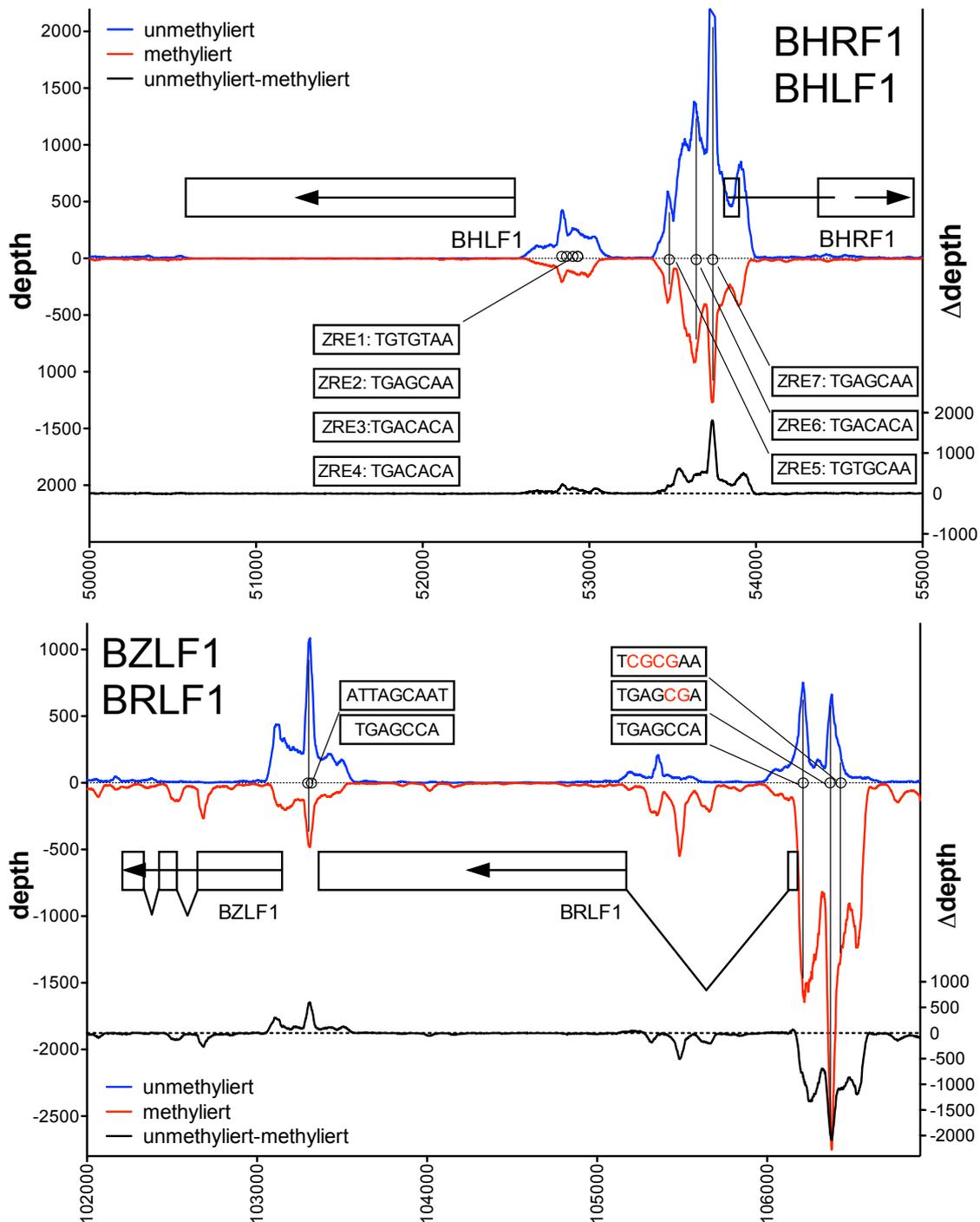


Abb. 4.10: 'Next Generation Sequencing'-Analysen ausgewählter Promotoren nach GFP:BZLF1 *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen mit unmethylierter bzw. methylierter EBV-DNA. GFP:BZLF1 *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen wurden mit unmethylierter EBV-DNA bzw. mit vollständig *de novo* CpG-methylierter EBV-DNA aus *E.coli* durchgeführt und anschließend mithilfe der NGS-Technologie analysiert. Die Sequenzertiefen ('depth') der Nukleotide wurden gegen die Position im B95.8-EBV-Genom aufgetragen und die Skalierung der X-Achse an die jeweilige Exonkomposition der Gene und ihrer Promotorregionen angepasst. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Sequenzierungen als Differenz der Sequenzierhäufigkeiten (Δ 'depth'). Gezeigt sind Promotoren mit bereits bekannten ZREs, deren Position durch einen Kreis markiert wurde. Das zugehörige Bindemotiv ist vermerkt. Im Gegensatz zum BRLF1-Promotor zeigten die Promotoren der Gene BHRF1, BHLF1, BZLF1 keine präferenzielle Bindung von GFP:BZLF1 an ihre beschriebenen ZREs wenn die DNA CpG-methyliert vorlag. Im BRLF1-Promotor konnte die bekannte methylierungsabhängige ZRE2-Bindestelle identifiziert werden, nicht aber das ausschließlich methylierungsabhängige ZRE3. Stattdessen wurde eine bisher unbekannte exklusiv methylierungsabhängige Bindestelle identifiziert.

Wie sich bereits in den 'Microarray'-Analysen angedeutet hatte, konnten weitere bisher unbekannte Promotoren mit potenziellen ZREs anhand der hochauflösenden Sequenzierung identifiziert werden. Dies ist beispielhaft an den Genen *BBLF4*, *BKRF4* und *BBLF2/3* gezeigt (Abb. 4.11). Diese Promotoren wurden ausschließlich von BZLF1 gebunden, wenn die EBV-DNA in einer vollständig CpG-methylierten Konfiguration vorlag. Mit dem Gen *BBLF2/3*, das für den viralen Primase assoziierten Faktor kodiert, konnte ein weiterer methylierungsabhängig gebundener Promotor identifiziert werden, dessen Genprodukt essenziell für die lytische virale DNA-Replikation ist (Fixman *et al.*, 1992). Weitere bisher unbekannte ZREs ließen sich in den Promotoren der Gene *BALF5*, *ECRF4*, *BSRF1*, *BNLF2a/b* und *BCRF1* nachweisen. Dabei erhöhte die Methylierung der CpG-Dinukleotide die Bindeaffinität von BZLF1 an die Promotoren von *BALF5* und *BNLF2a/b*. *BNLF2a* wird früh im Zuge einer lytischen EBV-Infektion exprimiert und inhibiert die Funktionen des zellulären Peptid-Transporters TAP, der die Antigenpräsentation von T-Zell-Epitopen vermittelt (Horst *et al.*, 2009). Ähnlich wie das unbekannte EBV-Gen *ECRF4* sowie *BSRF1* das für ein virales Tegumentprotein kodiert, wurde auch der Promotor von *BNLF2a* bevorzugt in methylierter Form gebunden. Der Promotor von *BCRF1* bestätigte die in den 'Microarray'-Analysen angedeutete methylierungsunabhängige DNA-Bindung, was möglicherweise auf eine Regulation von *BCRF1* durch BZLF1 kurz nach einer Infektion hindeutet.

Wie die Übersichtsdarstellung (Abb. 4.8) zeigt, wurden in weiteren Promotoren mögliche Bindestellen für BZLF1 identifiziert. Diese wurden, wie den Differenzen der Sequenziertiefen zu entnehmen ist, größtenteils bevorzugt oder ausschließlich in methylierter Form gebunden. Obwohl eine präzise Lokalisierung der Bindestellen durch die NGS-Technologie möglich war, konnten diesen Regionen oftmals keine Promotoren oder nur unzureichend charakterisierte Genabschnitte zugeordnet werden. Die bereits erwähnte Komplexität des EBV-Genoms erschwerte diese Zuordnung zusätzlich. Nicht selten konnten zusätzliche methylierungssensitive Bindestellen am 5'-Ende der kodierenden Region eines Gens identifiziert werden, wie dies beispielhaft am Promotor von *BBLF2/3* gezeigt ist (Abb. 4.11). Die Funktion dieser methylierungsabhängigen BZLF1-Bindung ist bisher unbekannt und könnte möglicherweise einen zusätzlichen Regulationsmechanismus durch BZLF1 darstellen.

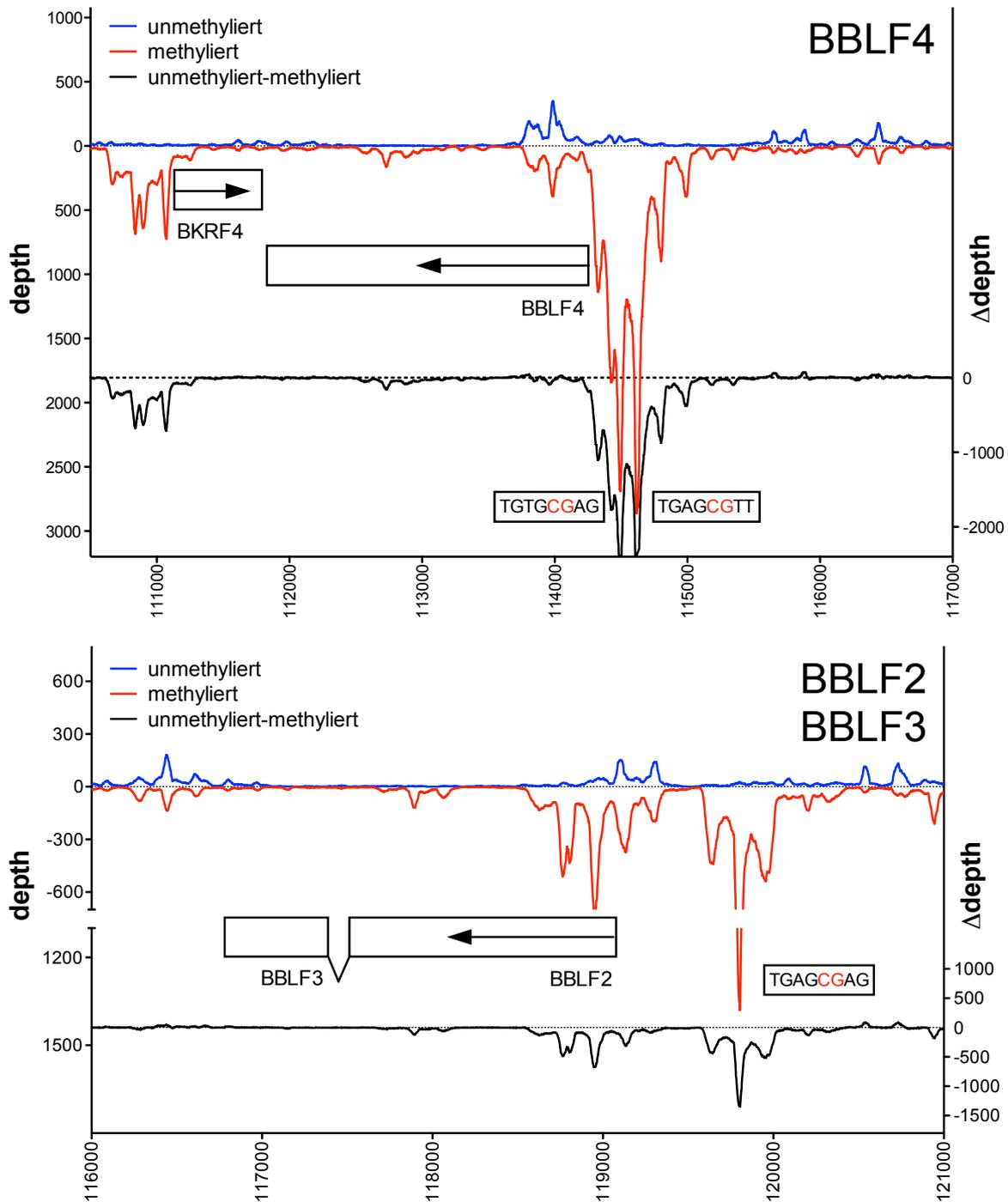


Abb. 4.11: 'Next Generation Sequencing'-Analysen ausgewählter Promotoren nach *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen mit GFP:BZLF1 von unmethylierter bzw. methylierter EBV-DNA. GFP:BZLF1 *in vitro* DNA-Immünpräzipitationen wurden mit unmethylierter EBV-DNA bzw. mit vollständig *de novo* CpG-methylierter rekombinanter EBV-DNA aus *E.coli* durchgeführt und anschließend mithilfe der NGS-Technologie analysiert. Die Sequenzieretiefen ('*depth*') der Nukleotide wurden gegen die Position im B95.8-EBV-Genom aufgetragen und die Skalierung der X-Achse an die jeweilige Exonkomposition der Gene und ihrer Promotorregionen angepasst. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Sequenzierungen als Differenz der Sequenzieretiefen (Δ '*depth*') von unmethylierter zu methylierter EBV-DNA. Gezeigt sind Promotoren von *BBLF4*, *BKR4* und *BBLF2/3* in denen bisher unbekannte ZREs identifiziert werden konnten. GFP:BZLF1 konnte nur dann an diese Promotoren binden, wenn deren CpG-Dinukleotide methyliert waren. *BBLF4* und *BBLF2/BBLF3* kodieren für Enzyme der viralen Transkriptionsmaschinerie, *BKR4* kodiert für ein virales Tegumentprotein.

4.2.7 Schlussfolgerungen der *in vitro* Bindungsstudien mit rekombinanter EBV-DNA

Zusammengefasst lassen meine Ergebnisse folgende Aussagen zu:

1. Der konzipierte *in vitro* Versuchsansatz mit dem chimären Fusionsprotein GFP:BZLF1 und der anschließenden Analyse mithilfe verschiedener Nachweismethoden ist dazu geeignet, ZREs verlässlich zu identifizieren. Bekannte Bindemotive aus verschiedenen viralen Promotoren, wie z. B. *BHRF1*, *BHLF1* oder *BMRF1* konnten mit hoher Präzision bestätigt werden.
2. Neben den beiden methylierungssensitiven ZREs im Promotor von *BRLF1* bindet BZLF1 *in vitro* bevorzugt oder ausschließlich an eine Vielzahl weiterer ZREs in methylierter Form. Ein Musterexemplar einer ausschließlich methylierungsabhängigen BZLF1-Bindung statuiert der Promotor von *BBLF4*.
3. Methylierungssensitive Bindestellen finden sich bevorzugt in Promotoren von Genen, die essenziell für die lytische DNA-Replikation und einer erfolgreichen Virusneusynthese assoziiert sind.

4.3 Intrazelluläres Bindeverhalten von BZLF1 in EBV-positiven Zellen

In vitro konnte in den vorangegangenen genomweiten Analysen demonstriert werden, dass BZLF1 bevorzugt an methylierte EBV-DNA bindet. In latent infizierten Raji-Zellen oder der spontan lytischen Zelllinie B95.8 ist das episomale, zirkularisierte EBV-Genom ähnlich der zellulären DNA mit Nukleosomen assoziiert (Dyson und Farrell, 1985; Shaw *et al.*, 1979). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass in diesen latent infizierten Raji-Zellen die EBV-DNA bis auf wenige Ausnahmen, wie z. B. den EBER-Lokus, hochgradig methyliert ist (Schmeinck, persönliche Mitteilung). Ebenso ist bekannt, dass in Folge einer primären EBV-Infektion humaner B-Zellen die virale DNA in einem langsamen Prozess über mehrere Wochen und Monate eine zunehmende CpG-Methylierung erfährt (Kalla *et al.*, 2010). In den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, ob eine solche Chromatinisierung des viralen Genoms die BZLF1-Bindung beeinflusst und welche identifizierten Promotoren für BZLF1 zugänglich sind.

4.3.1 Versuchsaufbau

Ein experimentelles Standardverfahren zur Untersuchung von Protein-Interaktionen mit chromatinisierter DNA *in vivo* ist die Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP). Das Grundprinzip dieser Methode beruht darauf, bestehende Protein-DNA-Interaktion durch eine kovalente aber reversible Formaldehyd-Fixierung zu stabilisieren (Orlando, 2000). Die Formaldehyd-Fixierung führt aber auch durch eine mögliche Beschädigung der Proteinepitope zu einer Einschränkung der Antikörperbindung und damit zu einer geringeren Chromatinausbeute. Zusätzlich können unspezifische Protein-DNA-Interaktionen fälschlicherweise fixiert werden. Experimente ohne eine Formaldehydvernetzung bezeichnet man als native ChIP (nChIP). Diese kann bei ausreichend starker Interaktion zwischen Protein und DNA zur Identifizierung von Protein-DNA-Interaktionen verwendet werden. Das Verfahren der nChIP konnte auch für die *in vivo* Identifizierung von ZREs genutzt werden. Abbildung 4.12 zeigt den Versuchsablauf der nChIP in stabil transfizierten, EBV-positiven Raji-Zellen.

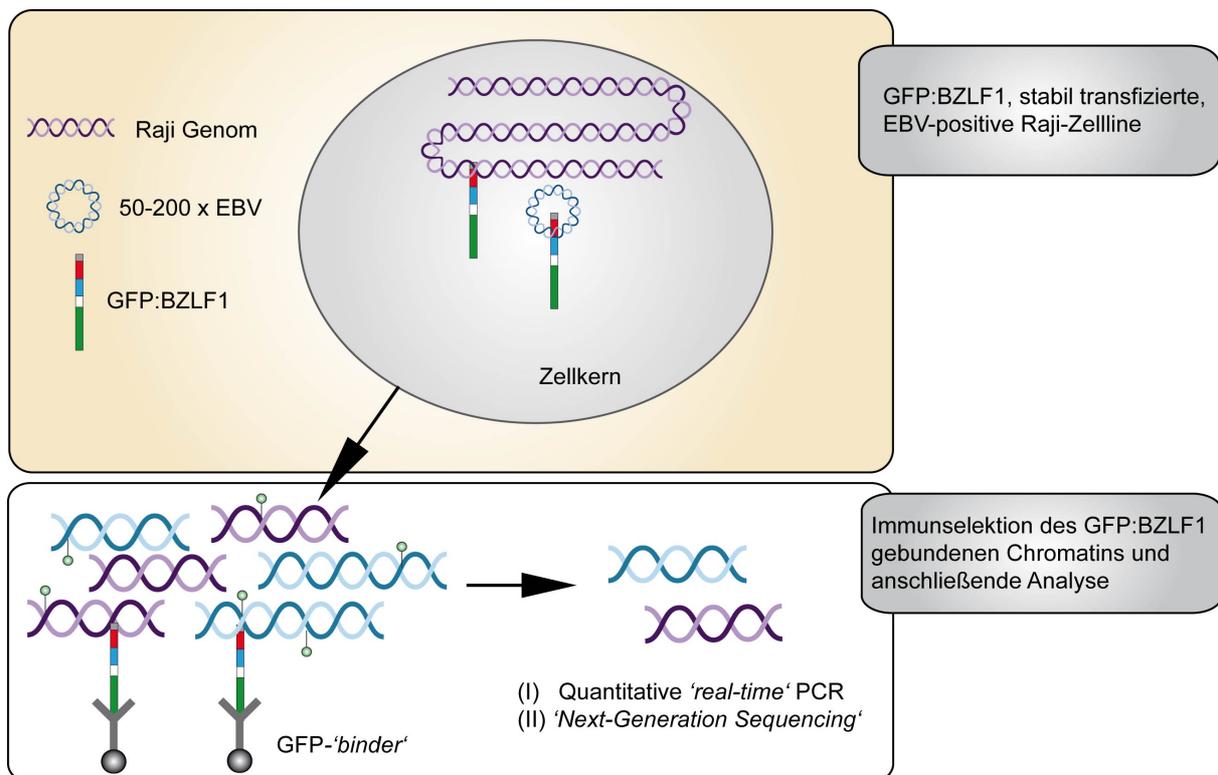


Abb. 4.12: Schematische Darstellung einer nativen Chromatin-Immünpräzipitation in EBV-positiven Raji-Zellen. Die strikt latente Raji-Zelllinie enthält ca. 50-200 episomale EBV-Kopien und wurde zur Analyse der intrazellulären BZLF1-Bindung stabil mit dem GFP:BZLF1 Expressionsplasmid transfiziert. Präpariertes Chromatin aus RIPA-Kernlysaten wurde einer Immunpräzipitation mit einem kovalent an Sepharosekügelchen gebundenen Lama-GFP-Antikörperfragment (GFP-*'binder'*) unterzogen. Mehrere stringente Waschschritte reduzierten unspezifische DNA-Wechselwirkungen mit dem Protein und den Sepharosekügelchen. Die GFP:BZLF1 angereicherte DNA wurde in einer quantitativen *'real-time'* PCR oder durch *'Next Generation Sequencing'* analysiert.

Für eine Immunpräzipitation des Chromatins wurden Kernlysate präpariert und das Chromatin mechanisch mittels Ultraschall auf eine durchschnittliche Länge von ca. 200-500 Basenpaare fragmentiert. Chromatin-Fragmente, die vom chimären Fusionsprotein GFP:BZLF1 gebunden wurden, konnten einer IP mit dem GFP-*'binder'* unterzogen werden. Das angereicherte Chromatin wurde gereinigt und daraus DNA präpariert. Die spezifische Anreicherung von DNA-Fragmenten mit bekannten Bindestellen im Genom wurde im quantitativen *'real-time'* PCR-Verfahren überprüft. Zur Erfassung der Gesamtheit aller Bindestellen im Genom wurde die *'Next Generation Sequencing'*-Technologie genutzt (ChIP-seq).

4.3.2 Zelllinien

Die Analysen der *in vivo* Bindung von BZLF1 erfolgte in zwei unterschiedlichen EBV-positiven Zelllinien. Native Chromatin-Immunpräzipitationen wurden in der humanen BL Raji-Zelllinie (Pulvertaft, 1964) etabliert. Raji-Zellen enthalten ca. 50-200 episomale EBV-Kopien (Hammerschmidt und Sugden, persönl. Mitteilung) welche zwei Deletionen an unterschiedlichen Stellen im Genom enthalten (Polack *et al.*, 1984). Eine dieser Deletionen betrifft einen Abschnitt des für die lytische Replikation essenziellen Gens *BALF2* (Decaussin *et al.*, 1995; Fixman *et al.*, 1992). Zur Analyse der BZLF1-Chromatinbindung wurden Raji-Zellen stabil mit GFP:BZLF1 transfiziert. Die Expression des integrierten GFP:BZLF1-Gens erfolgt konstitutiv unter der Kontrolle eines CMV-Promotors.

Als zweite Modell-Zelllinie diente B95.8, die auf Krallenaffen-B-Zellen basiert und durch EBV-Infektion in eine lymphoblastoide Zelllinie transformiert wurde (Miller *et al.*, 1972). Der Großteil der B95.8-Zellen ist latent mit EBV infiziert, während 5-10 % der B95.8-Zellen spontan die lytische Phase unterstützen und Nachkommen-viren synthetisieren (zur Hausen *et al.*, 1978). B95.8-Zellen wurden ebenfalls stabil mit dem GFP:BZLF1 Expressionsplasmid transfiziert und wie Raji-Zellen, durch Zugabe von G418 selektioniert. Abbildung 4.13 zeigt die Analyse der stabil transfizierten Zellderivate Raji-GFP:BZLF1 und B95.8-GFP:BZLF1. Das stabil transfizierte Raji-Zellderivat GFP:NLS diente für Kontrollexperimente. Gesamtzell-extrakte der stabil transfizierten Zelllinien wurden im Western-Blot-Verfahren mit einem spezifischen GFP-Antikörper analysiert. Die Expression der drei Fusionsproteine konnte verifiziert werden. Beide Raji-Zellderivate GFP:BZLF1 und GFP:NLS

zeigten ähnliche Proteinmengen (Abb. 4.13 A). Durchflusszytometrische Analysen zeigten die Homogenität der jeweiligen Zellpopulationen bezüglich ihrer endogenen GFP:BZLF1- oder GFP:NLS-Expression (Abb. 4.13 B).

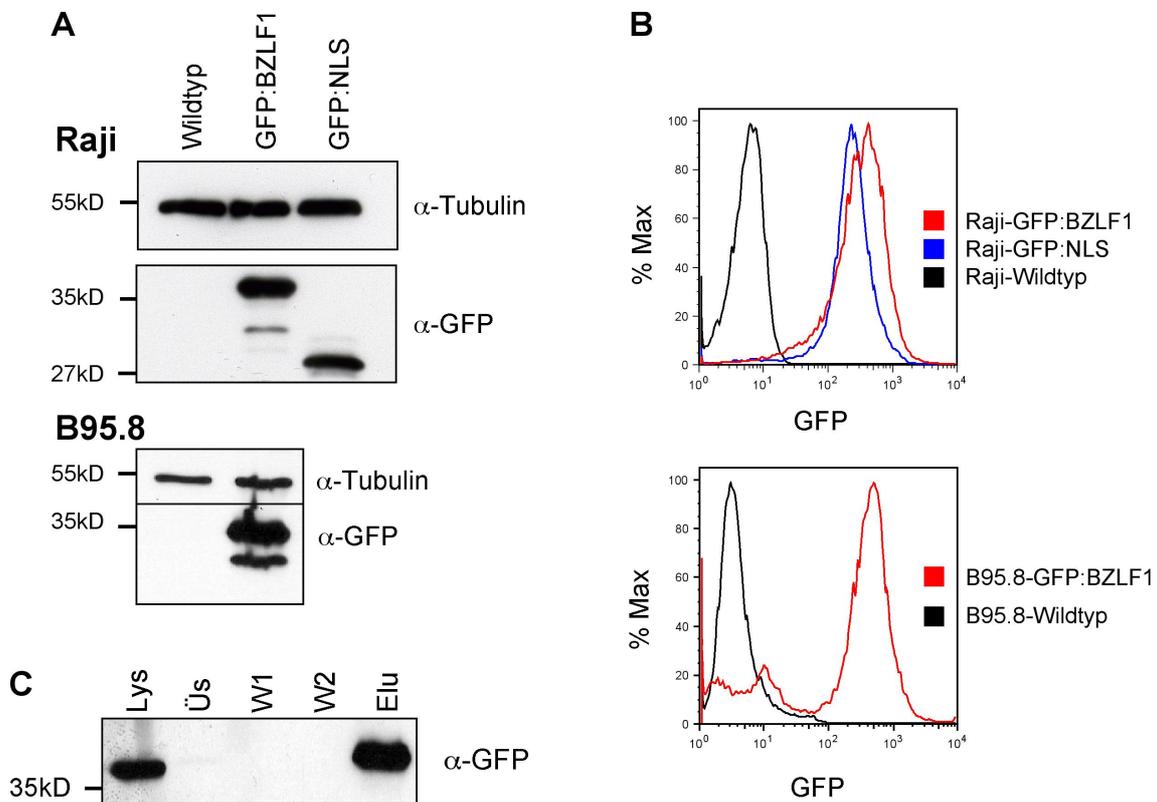


Abb 4.13: Analyse der GFP-Fusionproteine in Raji- und B95.8-Zellderivaten nach stabiler Transfektion. Raji- und B95.8-Zellen wurden mit GFP:BZLF1 bzw. GFP:NLS Fusionsproteinen stabil transfiziert. (A) Western-Blot-Analysen von Gesamtzellextrakten mit einem GFP-Antikörper zeigten ähnliche Expressionsniveaus der beiden Fusionsproteine in den Zellderivaten Raji-GFP:BZLF1 und Raji-GFP:NLS. Tubulin diente als Ladekontrolle, nicht-stabil transfizierte Raji-Zellen oder B95.8 Zellen (Wildtyp) wurden als Negativkontrolle verwendet. (B) Gezeigt ist die Darstellung typischer Histogramme der durchflusszytometrischen Einzelzellanalysen der stabil transfizierten Zelllinien. Die Zellen zeigten eine homogene Zellpopulation hinsichtlich ihrer GFP-Expression. Die GFP-negativen Raji- und B95.8-Wildtyp-Zelllinien dienen als Negativkontrollen. (C) 2×10^7 GFP:BZLF1 Raji-Zellen wurden lysiert und anschließend mit einem an Sepharosekügelchen gebundenen GFP-Antikörper (*GFP-binder*) immunpräzipitiert. Jeweils 2 Vol% des Gesamtzellextrakts (Lys), des Überstandes nach der IP (Üs), sowie der beiden Waschschriffe (W1, W2) wurden zusammen mit 10 Vol% der eluierten Proteine im Western Blot Verfahren analysiert. Die einzelnen Fraktionen zeigten, dass GFP:BZLF1 vollständig aus dem Ausgangslysat depletiert wurde und während den stringenten Waschschriffen vom *GFP-binder* gebunden wurde. Gebundenes GFP:BZLF1 wurde mit 2 % SDS eluiert.

Kontrollversuche mit dem *GFP-binder* sollten die Qualität der Immunpräzipitation zunächst auf Proteinebene validieren. Zu diesem Zweck wurden Kerne aus den Raji-Zellderivaten GFP:BZLF1 präpariert, anschließend in RIPA-Puffer lysiert, sonifiziert und einer IP mit dem *GFP-binder* unterzogen. Die gebundenen Immunkomplexe wurden sedimentiert und nach zweimaligem Waschen mit 2 % SDS eluiert. 2 Vol%

des Kernlysates (Lys), der Überstände von IP (Üs) und den beiden Waschsritten (W1, W2) wurden zusammen mit 10 Vol% des Eluats im Western-Blot-Verfahren mit einem GFP-Antikörper analysiert (Abb 4.13, C). Der Vergleich von Lysat und Überstand lies auf eine nahezu komplette Bindung des Proteins durch den GFP-*'binder'* schließen. Ohne weitere Verluste während der beiden Waschsritte konnte GFP:BZLF1 wieder von den Sepharosekügelchen eluiert werden.

4.3.3 GFP:BZLF1 bindet selektiv an ausgewählte Promotoren *in vivo*

Die GFP:BZLF1 Bindung an chromatinisierte EBV-DNA wurde durch nChIPs *in vivo* analysiert. Hierzu wurde Chromatin des Raji-Zellderivats GFP:BZLF1 präpariert, mechanisch fragmentiert und einer Immunpräzipitation mit dem GFP-*'binder'* unterzogen. In einer anschließenden quantitativen *'real-time'* PCR wurde die relative DNA-Menge ausgewählter Promotorregionen und eines Referenzklokus bestimmt (Abb. 4.14). Die ChIP-Experimente zeigten eine 30- bis 50-fache sequenzspezifische Anreicherung der Promotoren im Vergleich zur Referenzregion in der terminalen Repeat Region (TR) von EBV.

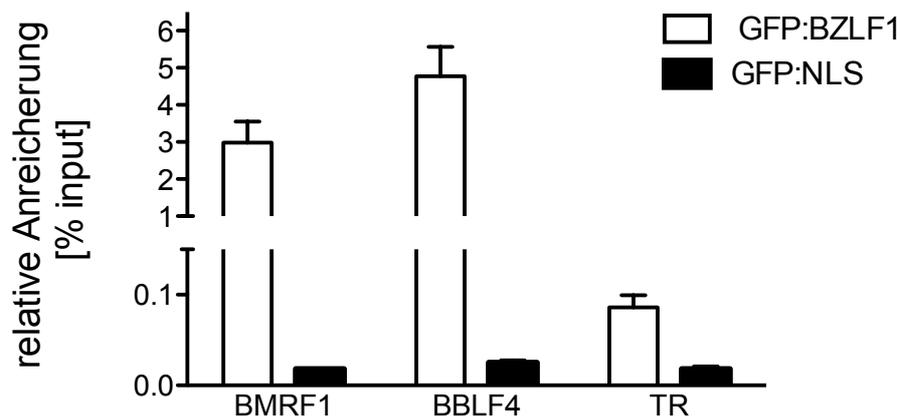


Abb. 4.14: Native Chromatin-Immunpräzipitationen mit GFP:BZLF1 an ausgewählten Promotoren in Raji-Zellen. Die Raji-Zellderivate GFP:BZLF1 und GFP:NLS wurden lysiert und Chromatin nach mechanischer Fragmentierung mithilfe des GFP-*'binders'* immunpräzipitiert. Die Menge der angereicherten DNA von drei ausgewählten EBV-Loci wurde in *'real-time'* PCR-Analysen quantifiziert und prozentual anhand der eingesetzten DNA-Menge (*'input'*) bestimmt. GFP:BZLF1 band im Vergleich zum Referenzlokus in der *'Terminal Repeat'* (TR) Region selektiv an die Promotoren von *BMRF1* und *BBLF4*. Native-ChIPs mit dem Kontroll-Zellderivat GFP:NLS zeigten keine spezifische Anreicherung von DNA-Fragmenten der Promotoren *BMRF1* und *BBLF4*. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen nChIP-Experimenten.

Die selektive Anreicherung der Promotoren von *BMRF1* und *BBLF4* belegte die Qualität des nativen ChIP-Verfahrens und die selektive Bindung von GFP:BZLF1 auch *in vivo* (Abb 4.14). Diese Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die exemplarisch untersuchten ZREs in den Promotoren von *BMRF1* und *BBLF4* im Chromatin von EBV-infizierten B-Zellen zugänglich sind. Kontrollexperimente mit Chromatin aus GFP:NLS exprimierenden Raji-Zellen erzielten im Vergleich zu GFP:BZLF1 keinerlei spezifische DNA-Anreicherung

4.3.4 Genomweite Analyse der GFP:BZLF1-Bindung *in vivo* durch 'Next Generation Sequencing'

Im vorangegangenen Abschnitt konnte ich zeigen, dass BZLF1 auch *in vivo* selektiv an Promotoren wie *BMRF1* und *BBLF4* bindet. Mithilfe der 'Next-Generation-Sequencing'-Technologie sollten genomweit alle endogenen BZLF1-Bindestellen im Chromatin zweier B-Zelllinien erfasst werden. Wie zuvor beschrieben (Abs. 4.3.3), wurde GFP:BZLF1 gebundenes Chromatin aus stabil transfizierten Raji- und B95.8-Zellen immunpräzipitiert und gereinigt. Aus den angereicherten DNA-Fragmenten wurden nach erfolgreicher Adapterligation millionenfache 'Cluster' generiert und diese direkt sequenziert. Die Sequenzierung der immunpräzipitierten DNA aus Raji-GFP:BZLF1 ergab 6,13 Millionen 36 bp 'paired-end reads'. Die gelesenen Sequenzen konnten dem viralen Referenzgenom p2089-EBV und dem humanen Genom hg18 zugewiesen werden. Die Sequenzierung der immunpräzipitierten DNA aus B95.8-GFP:BZLF1 ergab 21 Millionen 36bp 'paired-end reads' und wurden dem viralen Referenzgenom 2089 (Delecluse, 1998) und dem Krallenaffengenom (calJac3) zugeordnet. Zum Vergleich wurden beide *in vivo* Sequenzierdatensätze zusammen mit den Ergebnissen der *in vitro* DIPs in einem Diagramm dargestellt und wie beschrieben normalisiert (Abs. 4.2.6). Wie in Abschnitt 4.2 wurden zunächst ausgewählte Promotoren mit bekannten ZREs dargestellt (Abb. 4.15). Die Sequenziertiefen ('depth') für die *in vitro* DIPs sind in blau (unmethyliert) und rot (methyliert) auf der unteren Hälfte der Nulllinie aufgetragen, die Ergebnisse der nativen ChIPs aus Raji- (schwarz) und B95.8-Zellen (grün) sind über der Nulllinie aufgetragen. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Sequenzierungen an den Promotorregionen und den offenen Leserahmen der Gene *BRLF1*, *BZLF1* und *BSLF2/BMLF1* gezeigt.

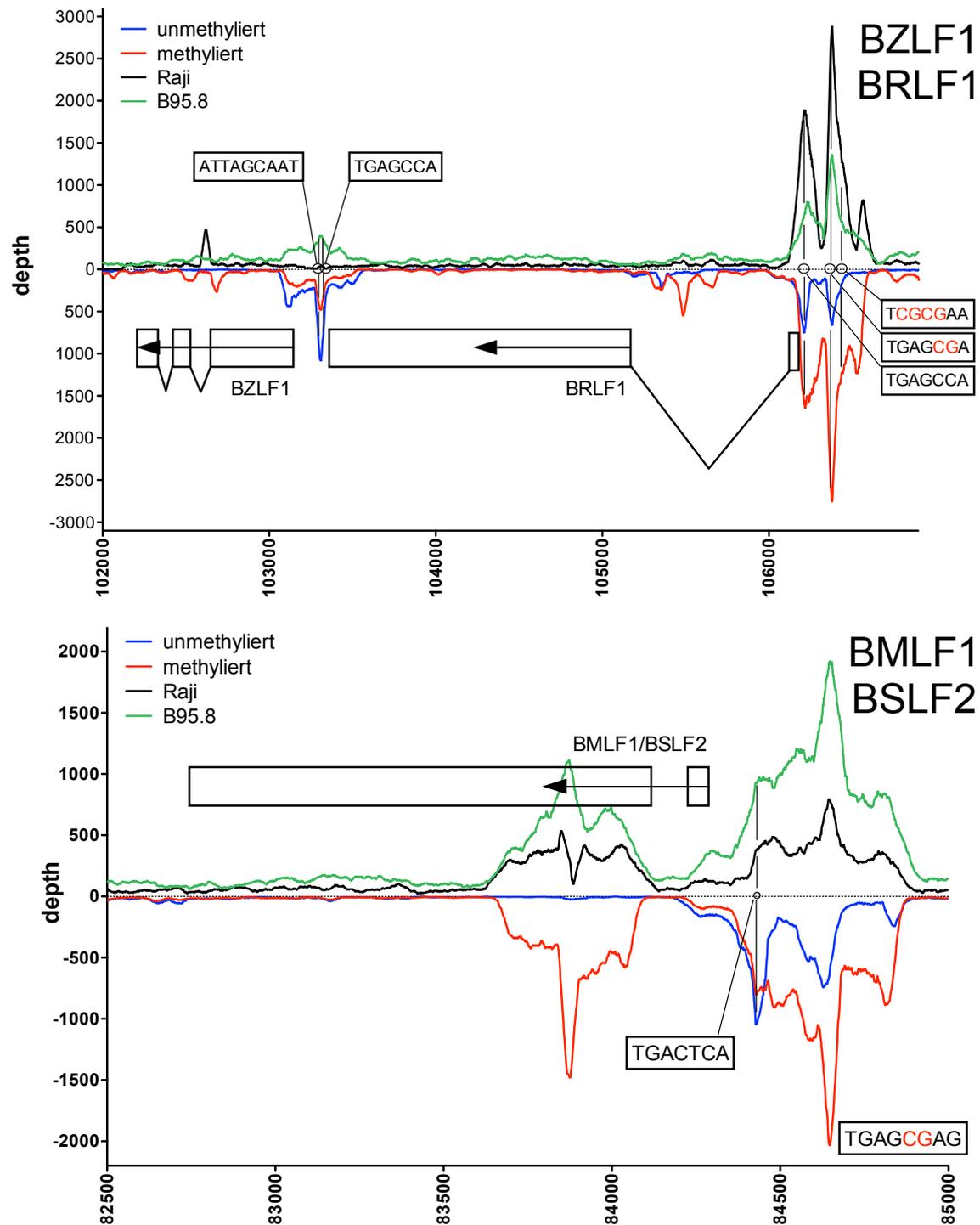


Abb 4.15: 'Next Generation Sequencing'-Analysen ausgewählter Promotoren nach *in vitro*-DIP und nChIP mit GFP:BZLF1. Gezeigt sind die normalisierten Sequenzierdaten der GFP:BZLF1 *in vitro* DIPs mit unmethylierter (blau) und methylierter (rot) EBV-DNA zusammen mit den 'Next Generation Sequencing'-Resultaten der nChIPs in den Zellerivaten Raji- (schwarz) und B95.8-GFP:BZLF1 (grün) an den Promotoren von *BZLF1*, *BRLF1* und *BSLF2/BMLF1*. Die Sequenziertiefen der Nukleotide ('depth') auf der Y-Achse sind gegen die Nukleotidkoordinaten des B95.8-EBV-Genoms auf der X-Achse aufgetragen. Die Skalierung der X-Achse wurde an die Exonkomposition und die Promotorregionen der Gene angepasst. Diese Auftragung erlaubt einen direkten Vergleich der GFP:BZLF1-Bindung *in vitro* mit der Bindung in beiden B95.8- und Raji-Zellerivaten. GFP:BZLF1 zeigte eine nahezu identische intrazelluläre DNA-Bindung wie an vollständig CpG-methylierter EBV-DNA *in vitro* (*BMLF1/BSLF2* und *BRLF1*). Einen Sonderfall zeigte der Promotor von *BZLF1*. *In vitro* und in der lytischen Zelllinie B95.8 bindet GFP:BZLF1 an ZREs im *BZLF1*-Promotor. Diese Bindung ist in den strikt latenten Raji-Zellen nicht zu detektieren.

Folgende Aussagen waren nach den Analysen der untersuchten Promotoren möglich. GFP:BZLF1 war in der Lage auch in Raji- und B95.8-Zellen an alle bisher identifizierten ZREs zu binden. Die chromatinähnliche Konfiguration und der hohe Methylierungsgrad der EBV-DNA, der in diesen Zellen vorliegt, stellte *in vivo* offensichtlich keine Barriere für GFP:BZLF1 dar um die Promotoren einiger lytischer Gene zu binden. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass das endogene BZLF1-Bindevverhalten in Raji- und B95.8-Zellen mit der Bindung an vollständig CpG-methylierte EBV-DNA *in vitro* korrelierte. Eine interessante Ausnahme konnte am Promotor von *BZLF1* getroffen werden (Abb.4.15). In der strikt latenten Raji-Zelllinie war dieser Promotor offensichtlich nicht für GFP:BZLF1 zugänglich. Die spontan lytische lymphoblastoide Zelllinie B95.8 zeigte aber, wie die Experimente mit rekombinanter EBV-DNA, eine eindeutige BZLF1-Bindung an die autoregulatorischen Elemente im Promotor von *BZLF1*. Die Besetzung der Promotoren mit Histonen *per se*, Histonmodifikationen oder andere Chromatin-bindende Proteine könnten eine wesentliche Rolle für diese unterschiedliche BZLF1-Zugänglichkeit des *BZLF1*-Promotors in den beiden Zelllinien spielen. Die graphischen Darstellungen der weiteren analysierten Promotoren sind im Anhang dieser Arbeit hinterlegt.

Die bisherigen *in vivo* Beobachtungen trafen auch auf alle untersuchten Promotoren mit bisher unbekanntem ZREs zu. Die *in vitro* neu identifizierten Bindemotive wurden auch in den latent infizierten Raji- und B95.8-Zellen präzise bestätigt. Das BZLF1-Bindungsmuster korreliert *in vivo* mit dem von methylierter EBV-DNA *in vitro*. Besonders deutlich ist dies an den Promotoren von *BBLF4* und *BBLF2/3* (Abb. 4.16) zu erkennen. In einer unmethylierten DNA-Konfiguration blieben beide Promotoren *in vitro* ungebunden, erst die Einführung methylierter CpG-Dinukleotide ermöglichte eine BZLF1-Bindung wie sie auch in Raji- und B95.8-Zellen vorliegt. Von Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass das Raji-Genom bis auf wenige Ausnahmen hochgradig CpG-methyliert ist. Sequenzierungen des *BBLF4*-Promotors nach Bisulfitmodifikation der DNA in Raji-Zellen zeigte, dass jene CpG-Dinukleotide der möglichen Bindemotive CpG-methyliert waren (Schmeinck, persönl. Mitteilung). Diese Erkenntnisse bestätigten, dass eine methylierungsabhängige BZLF1-Bindung an chromatinisierte EBV-DNA *in vivo* gegeben ist und diese auch *in vivo* das Kriterium einer bevorzugten DNA-Bindung darstellt.

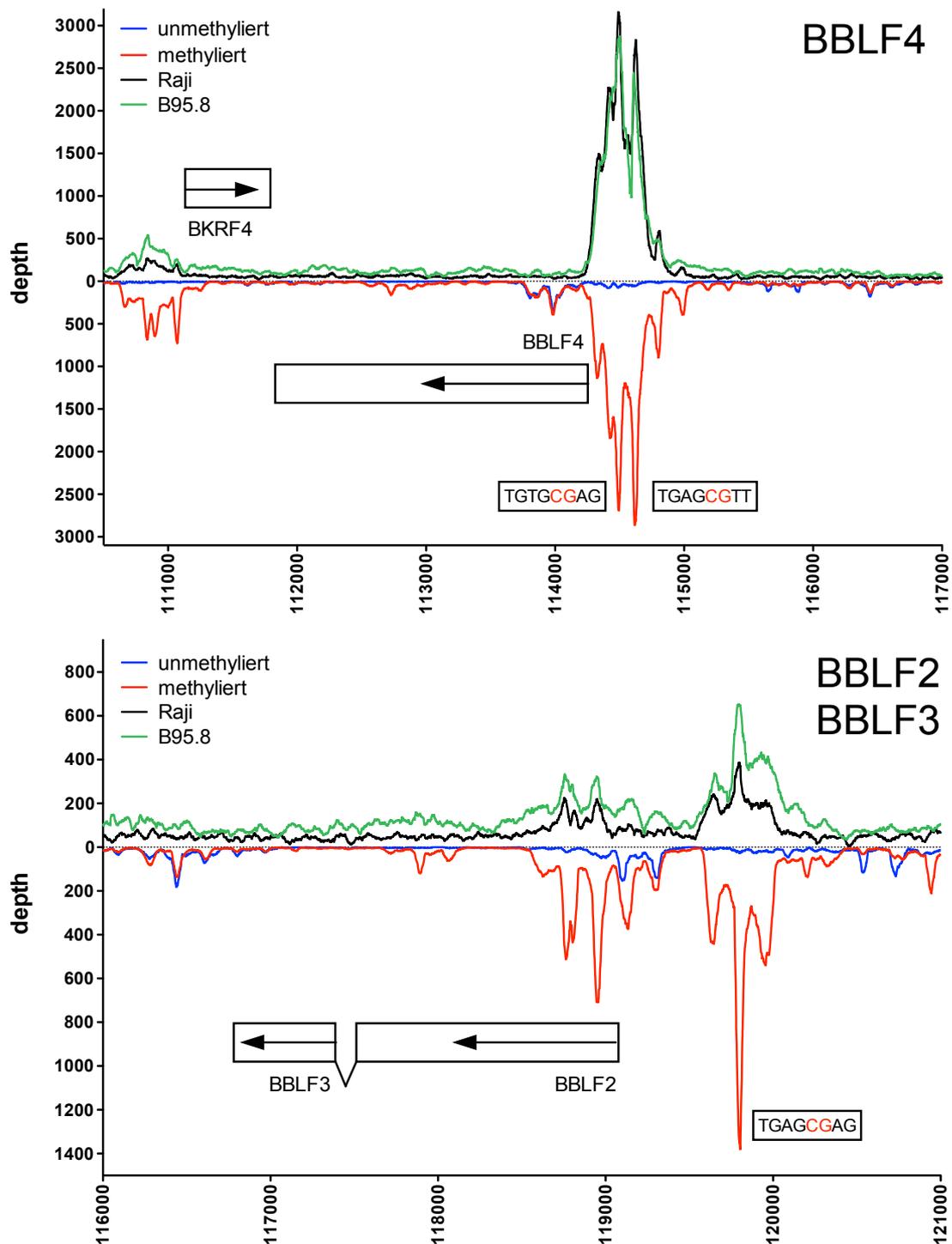


Abb 4.16: 'Next Generation Sequencing'-Analysen ausgewählter Promotoren nach *in vitro* DIP und nChIP mit GFP:BZLF1. Gezeigt sind exemplarisch die normalisierten Sequenzierdaten der GFP:BZLF1 *in vitro* DIPs mit unmethylierter (blau) und methylierter (rot) EBV-DNA, zusammen mit den 'Next Generation Sequencing'-Resultaten der nChIPs in den Zellerivaten Raji- (schwarz) und B95.8-GFP:BZLF1 (grün) an den Promotoren der Gene *BBLF4*, *BKRf4* und *BBLF2/3*. Die Sequenziertiefen der Nukleotide ('depth') auf der Y-Achse sind gegen die Nukleotidkoordinaten des B95.8-EBV-Genoms auf der X-Achse aufgetragen. Die Skalierung der X-Achse wurde an die Exonkomposition und die Promotorregionen der Gene angepasst. Diese Auftragung erlaubt einen direkten Vergleich der GFP:BZLF1-Bindung *in vitro* mit den beiden B95.8- und Raji-Zellerivaten. GFP:BZLF1 zeigte intrazellulär ein nahezu identisches Bindungsverhalten wie an die *in vitro* methylierte EBV-DNA. Die Promotoren von *BBLF4*, *BKRf4* und *BBLF2/3* wurden von GFP:BZLF1 intrazellulär und *in vitro* methyliert gebunden, nicht aber wenn die DNA frei von methylierten CpG-Dinukleotiden war.

4.3.5 Schlussfolgerungen der *in vivo* Bindungsstudien mit GFP:BZLF1

Die gezeigten nativen ChIP-seq-Analysen mit GFP:BZLF1 in Raji- und B95.8-Zellen ließen folgende Aussagen zu:

1. Native ChIP-seq mit stabil GFP:BZLF1 transfizierten Raji- und B95.8-Zellen sind dazu geeignet, ZREs verlässlich auch *in vivo* zu identifizieren.
2. Chromatinisierte und methylierte EBV-Promotoren sind auch *in vivo* für BZLF1 zugänglich.
3. Die endogene BZLF1-Bindung an den gezeigten Promotoren ist identisch mit der *in vitro* BZLF1-Bindung an methylierte EBV-DNA.
4. Offensichtlich spielt die methylierungsabhängige BZLF1-Bindung an Promotoren essenzieller Gene, wie z. B. *BBLF4* oder *BBLF2/3*, für eine erfolgreiche lytische DNA-Replikation eine Rolle *in vivo*, da diese Promotoren von BZLF1 sehr effizient gebunden wurden.

4.4 Identifizierung von ZRE-Konsensusmotiven nach ‘Next Generation Sequencing’

Bekannte BZLF1-gebundene Motive sind, wie in den Abschnitten 4.2 und 4.3 gezeigt, in einigen Promotoren beschrieben. Die vermerkten Sequenzen der jeweiligen ZREs sind allerdings sehr divergent. Zusätzlich bindet BZLF1 an das kanonische AP-1-Sequenzmotiv T-G-A-G/C-T-C-A (TRE, TPA-responisve element) sowie an das Oktamere Motiv T-T-G-C-G-C-A-A von C/EBP α (Farrell *et al.*, 1989; Kouzarides *et al.*, 1991). Ein BZLF1-Konsensmotiv, wie das für AP-1 der Fall ist (Lee *et al.*, 1987), ist aber bisher nicht bekannt. Auch die wenigen ZREs, die bevorzugt in methylierter Form gebunden werden, lassen keine Aussagen über eine gemeinsame Konsensussequenz zu (Bhende *et al.*, 2004; Dickerson *et al.*, 2009; Heather *et al.*, 2009; Karlsson *et al.*, 2008b). Die zugeordneten Sequenzierertiefen nach DIP-seq und ChIP-seq sind ideale Indikatoren für Protein-DNA-Interaktionen. Angewandte bioinformatische Algorithmen können anhand der Häufigkeit der sequenzierten Nukleotide potenzielle ZREs identifizieren und daraus mögliche Konsensusmotive bestimmen.

4.4.1 Konsensusmotive nach *in vitro* DIP-seq mit den Algorithmen SISSRs und MEME

Ziel der bioinformatischen Analysen war es, erstmals ein BZLF1-Konsensusmotiv für unmethylierte und CpG-methylierte EBV-DNA zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden zunächst die „Rohdaten“ der beiden unabhängigen ‘36bp single-end reads’ Sequenzierdatensätze der *in vitro* DIPs mit methylierter und unmethylierter EBV-DNA analysiert. Der Algorithmus SISSRs (Site Identification from Short Sequences Reads), zur genomweiten Identifizierung von Protein-DNA-Interaktionen, wurde mit den Standardparametern angewandt (Jothi *et al.*, 2008).

Der Algorithmus nutzt die Information der zugeordneten Sequenzen (‘reads’) des oberen (‘Sense-Tags’) und unteren (‘Antisense-Tags’) DNA-Stranges. Zur Identifizierung potenzieller Bindestellen von DNA-bindenden Proteinen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, wird das Referenz-Genom in Fenster mit einer Länge von 20 bp und einer Überlappung von 10 bp unterteilt. Für jedes Fenster berechnet SISSRs die Differenz der ‘Tags’ des oberen und unteren Stranges (‘Net-Tag Count’ = ‘Sense-Tag’ – ‘Antisense-Tag’). Der Übergang vom positiven zum negativen Wert des ‘Net-Tag count’ wird vom Algorithmus als potenzielle BZLF1-Bindestelle definiert (Abb. 4.17, links). Das Programm liefert eine Liste (Anhang) mit potenziellen Bindestellen, die als sogenannte ‘training sets’ für die Identifizierung von statistisch überrepräsentierten Konsensusmotiven in diesen Sequenzen mit weiteren Algorithmen analysiert werden können.

Zur Identifizierung von BZLF1-Konsensusbindemotiven wurden die SISSRs ‘training sets’ mit dem Algorithmus MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) nach Standardparametern analysiert (Bailey *et al.*, 2009). Dieser Algorithmus vergleicht die identifizierten Bindestellen und sucht nach signifikanten Sequenzähnlichkeiten in der Nukleotidabfolge. Die von MEME identifizierten Konsensusmotive werden als positionsspezifische Wahrscheinlichkeitsmatritzen in Form sogenannter Sequenz-Logos dargestellt (Abb 4.18). Die Höhe des Buchstaben der vier Nukleotidbasen A, G, T oder C entspricht der Frequenz mit der das Nukleotid an dieser Position identifiziert wird. Die Frequenz ist in der Einheit bit mit einem möglichen Maximalwert von 2 definiert und wird auf der Y-Achse der Sequenzmotive angegeben.

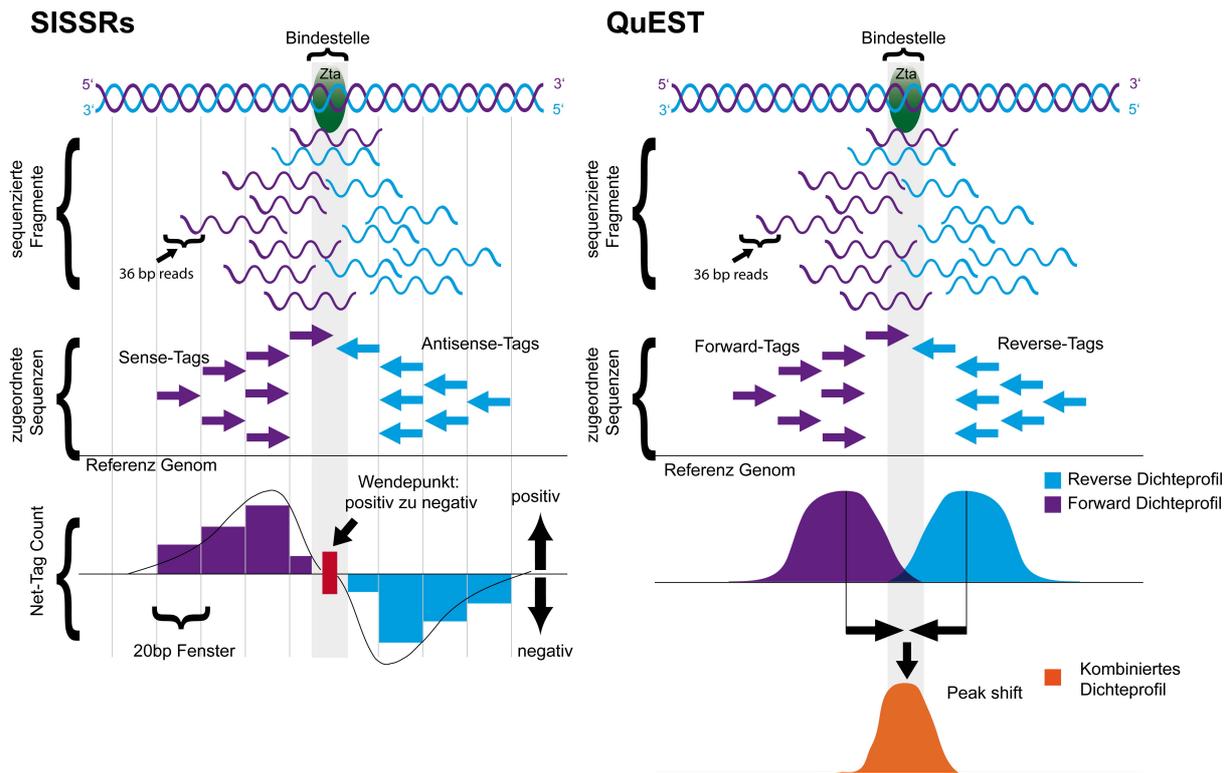


Abb 4.17.: Schematische Darstellung zur Identifizierung von BZLF1-Bindestellen mithilfe der Algorithmen SISSRs und QuEST nach GFP:BZLF1 *in vitro* DIP-seq und ChIP-seq. Sequenzierte DNA-Fragmente nach einer Immunpräzipitation liefern kurze, 36 bp-lange Sequenzinformationen ('reads'), die einem Referenzgenom zugeordnet werden ('Tags'). Diese 'Tags' werden entweder dem oberen oder dem unteren DNA-Strang zugeordnet ('Sense-' bzw. 'Antisense-Tags'). SISSRs (links) unterteilt das Referenzgenom in 20 bp lange Fenster mit einer Überlappung von 10 bp und berechnet in jedem Fenster die Differenz der positiv-gewerteten 'Sense-Tags' und der negativ-gewerteten 'Antisense-Tags' ('Net-Tag Count'). Der Übergang vom positiven zum negativen 'Net-Tag Count' definiert eine mögliche Bindestelle in jedem Fenster. QuEST (rechts) nutzt eine ähnliche Strategie, um Bindemotive zu identifizieren. Aus den zugeordneten 'reads' des oberen ('Forward-Tag') und unteren ('Reverse-Tag') DNA-Strangs werden zwei Dichteprofile generiert. Durch die Berechnung der halbmaximalen Entfernung der beiden Profilmaxima ('Peak shift') entsteht ein neues kombiniertes Dichteprofil, dessen Maximalwert die potenzielle Bindestelle definiert (Abbildungen modifiziert nach Valouev *et al.*, 2008 und Jothi *et al.*, 2008).

Vom unmethylierten Datensatz generierte SISSRs 126 mögliche Bindestellen. Aus 101 dieser Sequenzen konnte MEME ein gemeinsames Konsensusmotiv mit der Nukleotidabfolge T-G-A/T-G-C/T-A/C-A ermitteln (Abb. 4.18, A). Dieses Motiv enthielt kein CpG-Dinukleotid und liegt in einigen der bereits identifizierten ZREs, wie z. B. im ZRE2 des *BHLF1*-Promotors (Abb. 4.10, oben), vor. SISSRs identifizierte 200 mögliche Bindestellen aus dem Datensatz der methylierten DIPs. 167 dieser Sequenzen lieferten ein gemeinsames MEME-Konsensusmotiv (Abb. 4.18, B). Die resultierende Konsensussequenz T-G-A-G-C/T-G-A trägt ein potenzielles, aber niederfrequentes CpG-Dinukleotid an den Positionen 6 und 7. Da die *in vitro* DIPs mit methylierter EBV-DNA auch DNA-Fragmente mit Bindestellen enthielten, die kein CpG-Dinukleotid trugen, wurden die SISSRs Sequenzen nach dem Kriterium eines

CpG-Dinukleotids in zwei Klassen unterteilt und erneut einer Analyse mit dem MEME-Algorithmus unterzogen. Aus 82 Sequenzmotiven (44%) ohne CpG-Dinukleotid (Abb. 4.18, C) konnte das Konsensusmotiv T-G-A-G-C/T-A/C-A definiert werden. Es ist identisch zu dem, das aus dem Datensatz mit unmethylierter EBV-DNA ermittelt wurde (Abb. 4.18, A). Der Algorithmus extrahierte aus den verbleibenden 85 CpG-enthaltenden Sequenzen (56%) das Konsensusmotiv T-G-A-G-C-G-A-G/T (Abb. 4.18, D). Im Gegensatz zu bisherigen Analysen konnte ein höher-frequenztes, dominantes CpG-Dinukleotid an den Positionen 6 und 7 des Konsensusmotives identifiziert werden. Ein weiteres, weniger häufiges CpG-Motiv befindet sich an den Positionen 2 und 3. Das identifizierte Konsensusmotiv entspricht dem ZRE2 aus dem *BRLF1*-Promotor. Alle weiteren bisher beschriebenen methylierungsabhängigen ZREs aus den Promotoren von *BRLF1* (ZRE3: T-C-G-C-G-A-A, Bhende *et al.*, 2004), *BRRF1* (T-G-A-G-C-G-T-G und T-C-G-C-C-G-T, Dickerson *et al.*, 2009) und dem zellulären *Egr1*-Promotor (T-C-G-C-T-C-C, Heather *et al.*, 2009) wurden von den Algorithmen nicht als methylierungsabhängig gebundene ZREs identifiziert.

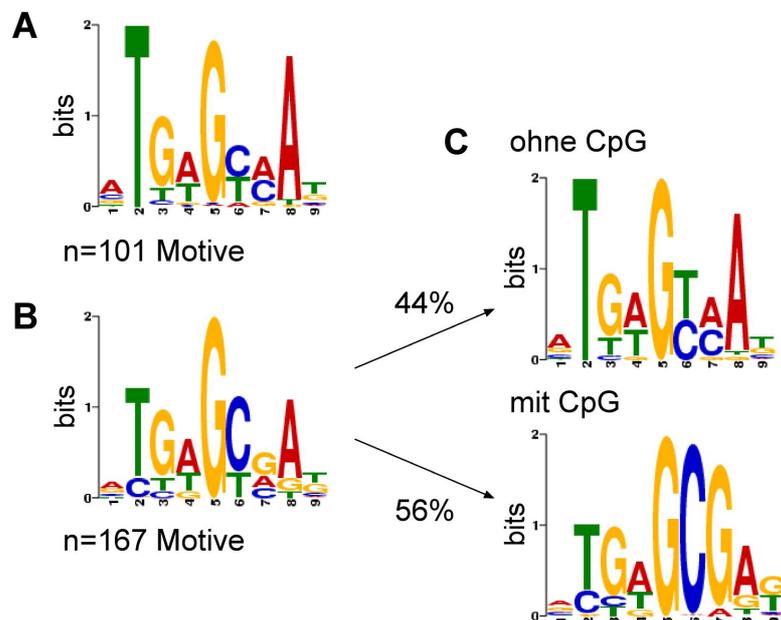


Abb. 4.18: Identifizierung von BZLF1-Konsensusbindemotiven der *in vitro* DIP-seq mithilfe der Algorithmen SISSRs- und MEME. Gezeigt sind die identifizierten Konsensusmotive der GFP:BZLF1 *in vitro* DIPs mit unmethylierter und CpG-methylierter EBV-DNA. (A) Aus dem unmethylierten Datensatz konnten 126 SISSRs-Bindestellen identifiziert werden. Aus 101 dieser Sequenzen wurde das MEME-Konsensusmotiv T-G-A-G-C/T-A/C-A bestimmt. Es beinhaltet kein CpG-Dinukleotid und liegt in einigen Promotoren mit bekannten ZREs in dieser Form vor. (B) Aus den *in vitro* IPs mit methylierter EBV-DNA wurden 200 BZLF1-Bindestellen von SISSRs identifiziert. Aus 167 dieser Sequenzen wurde mit MEME ein gemeinsames Konsensusmotiv generiert. (C) Von den 167 Motiven enthielten 44% kein CpG-Dinukleotid (oben). Das Konsensusmotiv (T-G-A-G-C/T-A/C-A) entspricht dem aus den *in vitro*-DIPs mit nicht unmethylierter DNA. 56% der 167 Sequenzmotive enthielten ein CpG-Dinukleotid, wodurch ein neues Bindemotiv (T-G-A-G-C-G-A-G/T) identifiziert werden konnte.

4.4.2 Konsensusmotive nach nChIP-seq mit den Algorithmen SISSRs, QuEST und MEME

Die Sequenzierdaten der nChIPs mit GFP:BZLF1 in B95.8-Zellen wurden, wie beschrieben, mit dem Algorithmus SISSRs analysiert. Eine SISSRs-Auswertung der zugeordneten 'reads' der nChIP in Raji-GFP:BZLF1-Zellen lieferte aus unbekanntem Gründen kein Konsensusmotiv. Daher wurden die Sequenzierdaten der Raji-Zellen alternativ mit dem Algorithmus QuEST (Quantitative Enrichment of Sequences Tags) analysiert. Ähnlich wie SISSRs berücksichtigt das Programm die Häufigkeit der gelesenen Sequenzen des oberen und unteren DNA-Stranges. Die Identifizierung der Bindemotive beruht auf dem Prinzip der Kerndichteabschätzung (KDE, 'kernel density estimation') des oberen und unteren DNA-Stranges an potenziellen Bindestellen. Da jeweils nur die ersten 36 Nukleotide eines DNA-Fragments gelesen werden, akkumulieren die zugeordneten reads vom oberen ('Forward-Tags') und unteren Strang ('Reverse-Tags') in einem Dichteprofil um die eigentliche Protein-Bindestelle, die selbst unterrepräsentiert ist. QuEST nutzt diese Eigenschaft und berechnet einen sogenannten 'Peak shift', dessen Länge der halbmaximalen Entfernung der beiden Dichteprofile und somit der potenziellen DNA-Bindestelle des Proteins entspricht. Beide Dichteprofile werden um diesen Wert verschoben und ein neues, sogenanntes kombiniertes Dichteprofil, generiert. (Abb. 4.17, rechts). Bindestellen werden anhand dieses kombinierten Dichteprofil identifiziert. Eine zusätzliche Einstellung zur Definition des Hintergrundes wurde in die Analysen mit einbezogen (*KDE of 60, threshold value of 2*). ChIP-seq und anschließende SISSRs und QuEST-Analysen identifizierten in beiden Zelllinien weniger Bindestellen im Vergleich zu den *in vitro* DIPs. Vermutlich lag dies an einer verminderten Zugänglichkeit von BZLF1 an die chromatinisierte EBV-DNA, wie sie bereits am Beispiel des *BZLF1*-Promotors in den Raji-Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 4.15). Die Algorithmen QuEST und MEME extrahierten aus den ChIP-seq Daten der Raji-Zellen aus 46 möglichen Bindestellen ein Konsensusmotiv. In B95.8-Zellen wurden 39 möglichen Bindestellen identifiziert und daraus ein Konsensusmotiv generiert (Abb. 4.19, A/C). Beide unabhängigen Ergebnisse sind nahezu identisch und lassen ein Motiv mit einem CpG-Dinukleotid erkennen (T-G-A-G-C-G/A-A). Die 'training sets' der MEME-Analysen wurden erneut in zwei Klassen, CpG-haltige und CpG-freie Sequenzmotive, unterteilt und unabhängig voneinander untersucht (Abb.

4.19, B/D). Konsensusmotive aus Raji- und B95.8-Zellen ohne ein CpG-Dinuklotid zeigten die Sequenz T-G-A-G-C/T-A/C-A, Konsensusmotive mit CpG-Dinukleotiden die Sequenz T-G-A-G-C-G-A-G/T. Die Sequenzen sind nahezu identisch mit denen der *in vitro* DIPs und bekräftigen in zwei unabhängigen Ansätzen die Authentizität dieser Motive.

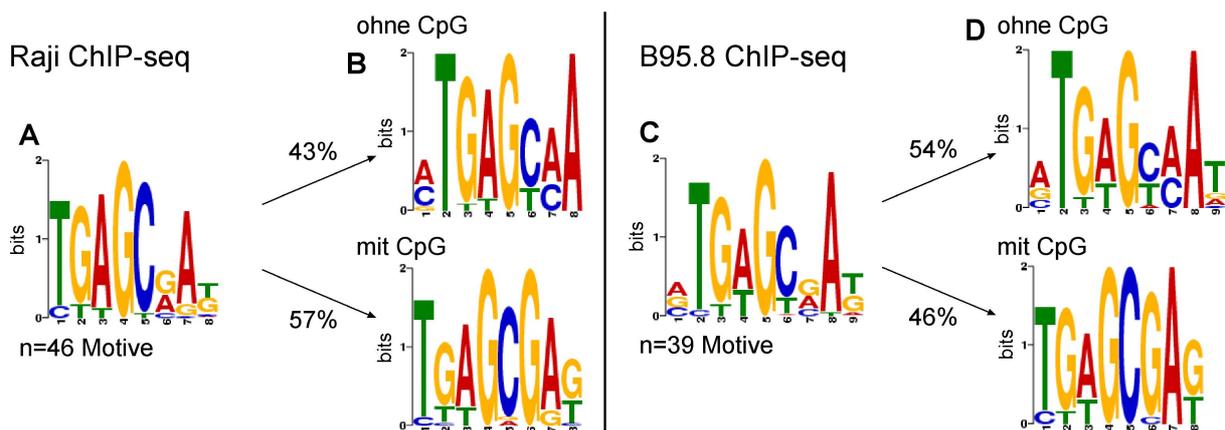


Abb. 4.19: Identifizierung von BZLF1-Konsensusbindemotiven nach nChIP-seq in Raji- und B95.8-Zellen mithilfe der Algorithmen SISSRs, QuEST und MEME. Zur Identifizierung der Konsensusmotive wurden die QuEST- und SISSRs-Daten mit dem Algorithmus MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) analysiert. (A) Aus den nChIPs in Raji-GFP:BZLF1 Zellen wurden 46 mögliche Bindestellen durch QuEST identifiziert. Aus diesen Sequenzen konnte durch MEME ein gemeinsames Konsensusmotiv identifiziert werden, welches sich in Bindemotive ohne (43%: T-G-A-G-C/T-A/C-A) bzw. mit (57%: T-G-A-G-C-G-A-G/T) CpG-Dinukleotide unterteilen lässt. Aus nativen ChIPs von B95.8-Zellen mit GFP:BZLF1 wurden mithilfe von SISSRs und MEME 39 Bindemotive identifiziert. 54 % davon zeigten kein CpG-Dinukleotid (T-G-A-G-C/T-A/C-A), 46 % enthielten ein CpG-Dinukleotid (T-G-A-G-C-G-A-G/T).

4.4.3 Schlussfolgerungen zur Identifizierung der Konsensusmotive

Konsensusmotive für andere Mitglieder der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie, zu denen auch BZLF1 zählt, sind seit längerem bekannt. (Lee *et al.*, 1987; Lin und Green, 1988). Meine Arbeit identifiziert zum ersten Mal kanonische BZLF1-Bindemotive. Offensichtlich existieren zwei verschiedene Klassen von BZLF1-Bindemotiven. Das Sequenzmotiv T-G-A-G-C/T-A/C-A enthält kein CpG-Dinukleotid und wird folglich unabhängig von einer CpG-Methylierung gebunden. Die zweite Klasse von Konsensusmotiven T-G-A-G-C-G-A-G/T trägt ein zentrales CpG-Dinukleotid im Bindemotiv, welches bevorzugt und in einigen Fällen ausschließlich in methylierter Form gebunden wird. Bisher ist kein weiterer Transkriptionsfaktor bekannt, der wie BZLF1 sequenzspezifisch zwischen methylierten und unmethylierten Konsensusmotiven unterscheiden kann. BZLF1 liegt ausschließlich

als Homodimer vor (Kouzarides *et al.*, 1991; Reinke *et al.*, 2010). Wie die Bindung des Homodimers an die nicht-palindromischen und methylierungsabhängigen ZREs auf struktureller Ebene vorliegt, ist bisher unklar. Die bislang durchgeführten Strukturanalysen von Petosa und Kollegen können zur Beantwortung dieser Fragen nicht herangezogen werden (Petosa *et al.*, 2006). Die Kristallstrukturanalyse wurde einerseits am palindromischen AP-1-Motiv T-G-A-C/G-T-C-A des BMLF1/BSLF2 Promotors durchgeführt, das kein CpG-Dinukleotid enthält, andererseits wurde mit einer BZLF1-Mutante gearbeitet, in der ein zweifacher Aminosäureaustausch in der DNA-Bindedomäne für Ser186 und Cys189 vorlag (Morand *et al.*, 2006; Petosa *et al.*, 2006). Genau diese beiden Aminosäuren wurden in einer jüngeren Veröffentlichung mit der methylierungsabhängigen Bindung von BZLF1 an DNA in Verbindung gebracht (Karlsson *et al.*, 2008a)

4.5 Analyse ausgewählter Promotoren lytischer Gene

Ein gemeinsames Merkmal aller produktiven Herpesvirus-Infektionen ist die kaskadenartig verlaufende Expression von viralen Genen und die Amplifikation des viralen DNA-Genoms im Zellkern der infizierten Zelle. Auch bei EBV kann der Ablauf der lytischen Replikation in drei Phasen unterteilt werden. Die ersten Gene, sogenannte *'immediate early'* (IE) Gene, welche unmittelbar nach Induktion des lytischen Zyklus exprimiert werden, sind *BZLF1* und *BRLF1*. Deren regulatorischen IE-Genprodukte leiten daraufhin die zweite Kaskade ein, die frühe (*'early'*, E) Phase. In diesem Stadium werden die E-Transkripte exprimiert, die das EBV-Genom in einer geordneten Abfolge von Prozessen 100- bis 1000-fach amplifizieren. Virale Gene, welche während der späten lytischen Phase exprimiert werden, sogenannte *'late'* (L) Gene, kodieren hauptsächlich für Strukturkomponenten des Viruspartikels (zusammengefasst in Kieff und Rickinson, 2007). Die bisherigen Ergebnisse (Abs. 4.2-4.4) zeigten, dass BZLF1 an viele der identifizierten Promotoren bevorzugt oder ausschließlich bindet, wenn deren CpG-Dinukleotide in methylierter Form vorliegen. Dabei handelt es sich überwiegend um Promotoren von E-Genen, die mit der viralen Replikationsmaschinerie assoziiert bzw. für eine erfolgreiche lytische Virusproduktion essenziell sind. In den folgenden Nachweisreaktionen sollten diese lytischen Promotoren hinsichtlich ihrer methylierungsabhängigen Bindung und einer BZLF1-vermittelten Transaktivierung evaluiert werden.

4.5.1 BZLF1 bindet bevorzugt an methylierte Promotoren lytischer Gene

Protein-DNA-Interaktionen können in Gel-Retentionsanalysen, auch als EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*) bezeichnet, untersucht werden. Das Prinzip basiert auf einem unterschiedlichen Migrationsverhalten von Protein-DNA-Komplexen während einer nativen PAA-Gelelektrophorese im Vergleich zur ungebundenen DNA (Fried und Crothers, 1981). Für Gel-Retentionen wurde Strep II-FLAG-markiertes BZLF1 (SF:BZLF1) aus transient transfizierten HEK293-Zellen präpariert. Dazu wurde die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von Wildtyp-BZLF1 (AS 149-245, Abb. 4.2) mit zwei verschiedenen, kurzen aminoterminalen AS-Markierungen fusioniert. Die Strep II-Markierung besteht aus einer Abfolge von acht Aminosäuren (Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), die eine einstufige Reinigung über Strep-Tactin-Sepharose aus transient transfizierten HEK293-Zellen erlaubt. Die zweite FLAG-Markierung (FLAG-Tag: Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) wurde für die Detektion des Fusionsproteins mithilfe eines spezifischen FLAG-Antikörpers verwendet. Für eine Proteinpräparation wurden ca. 10^8 HEK293-Zellen transient mit dem Expressionsplasmid für SF:BZLF1 transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden RIPA-Gesamtzellextrakte mittels Ultraschall solubilisiert und zentrifugiert (Pellet). Das proteinhaltige lösliche Lysat (Lys) wurde dreimal auf eine mit 300 μ l Strep-Tactin-Sepharose beladene Poly-Prep-Säule überführt und die Durchflussfraktion (DF) aufbewahrt. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit drei Puffern unterschiedlicher NaCl-Konzentration (W1-W3) gewaschen, um unspezifische Protein-Interaktionen zu reduzieren. Nach Zugabe von 2 x 500 μ l Desthiobiotin-Elutionspuffer wurde gebundenes SF:BZLF1 vom Säulenmaterial eluiert. Gleiche Volumina der gesammelten Fraktionen wurden zusammen mit 1 μ g SF:BZLF1 der beiden Eluate auf einem coomassiegefärbten-SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Das lösliche SF:BZLF1 konnte durch Binden an die Strep-Tactin-Sepharose im Vergleich zur Durchflussfraktion nahezu vollständig aus dem Ausgangslysat abgereichert werden. SF:BZLF1 wurde ohne Verluste in den Waschschriffen vom Säulenmaterial eluiert. Das eluierte Hauptprodukt stimmte in etwa mit der berechneten Größe von ~16 kDa überein. Eine Titrationsreihe der vereinten Eluate wurde in ansteigenden Konzentrationen im Western-Blot-Verfahren mit einem spezifischen FLAG-Antikörper analysiert. Eine längere Trennstrecke zeigte, dass SF:BZLF1 offensichtlich in zwei

Konfigurationen detektierbar ist. Diese sind vermutlich auf eine Proteolyse oder eine posttranslationale Modifikation von SF:BZLF1 zurückzuführen. Welche Aminosäuren davon betroffen sind und ob die DNA-Bindung möglicherweise davon beeinflusst ist, wurde nicht näher untersucht, da die folgenden Experimente gezeigt haben (Abb. 4.21), dass das Protein funktional an bekannte ZREs bindet. Das Protein war bezüglich Reinheit und Ausbeute nach der Step-Tactin-Affinitätschromatographie für die nachfolgenden Experimente geeignet.

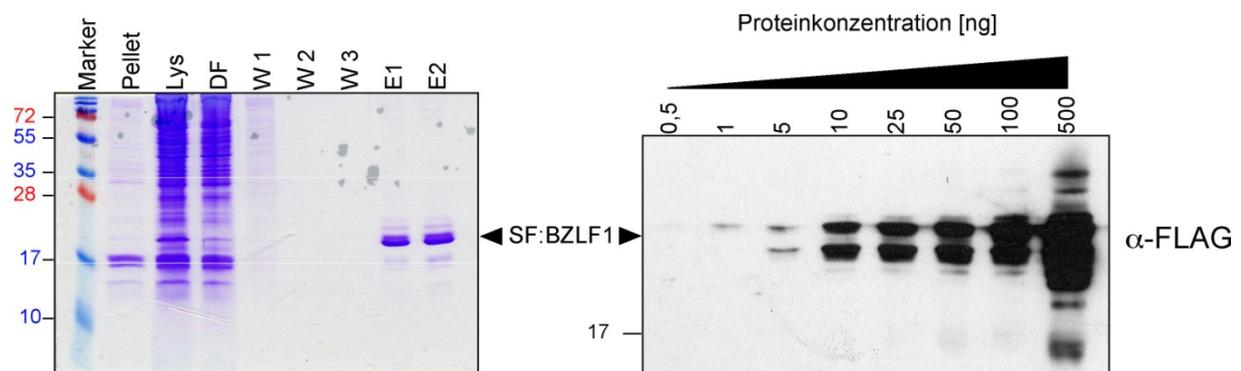


Abb. 4.20: Reinigung von Strep II-FLAG-markiertem BZLF1 (SF:BZLF1) aus transient transfizierten HEK293-Zellen. Ca. 10^8 HEK293-Zellen wurden transient mit dem SF:BZLF1 Expressionsplasmid transfiziert und nach 48 h in RIPA-Puffer lysiert. Die Proteine wurden durch Ultraschallbehandlung solubilisiert und unlösliche Bestandteile pelletiert (Pellet). Das Lysat (Lys) wurde einer Strep-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen und das Säulenmaterial dreimal gewaschen (W1-3). Gebundenes SF:BZLF1 wurde zweimal mit Desthiobiotin von der Säule eluiert (E1, E2) und mit den gesammelten Fraktionen auf einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das lösliche SF:BZLF1 konnte während der Chromatographie aus dem Lysat abgereichert und nach 3 Waschschritten von der Säule eluiert werden. Western-Blot-Analysen einer SF:BZLF1-Proteinverdünnungsreihe mit einem FLAG-Antikörper zeigten, dass SF:BZLF1 offensichtlich posttranslational modifiziert oder proteolytisch abgebaut wurde, worauf zwei Banden mit unterschiedlichem Migrationsverhalten hinweisen.

Für Gel-Retentionen wurde gereinigtes SF:BZLF1 mit radioaktiv markierten, PCR-amplifizierten DNA-Fragmenten der Promotorregionen inkubiert, die zur Analyse ausgewählt worden waren. Für eine methylierungsabhängige Bindung wurden die PCR-Produkte zuvor mit der *de novo* Methyltransferase M.SssI *in vitro* vollständig CpG-methyliert oder unmethyliert eingesetzt. Eine Bestätigung der SF:BZLF1-DNA-Komplexe erfolgte durch Zugabe eines FLAG-Antikörpers. Dieser interagiert spezifisch mit der N-terminalen FLAG-Markierung von SF:BZLF1 und bewirkte eine weitere Gel-Retention (*'Supershift'*) des Protein-DNA-Komplexes. Zur Analyse der SF:BZLF1-DNA-Komplexe wurden die jeweiligen Reaktionsansätze, in einem nativen PAA-Gel aufgetrennt und die Gele mit einem Film autoradiographisch visualisiert (Abb. 4.21). Für eine quantitative Bestimmung der SF:BZLF1-DNA-Interaktion wurden die Gele mit einer Verstärkerfolie exponiert und anschließend die radioaktive

Emission densitometrisch quantifiziert. Der prozentuale Anteil der SF:BZLF1 gebundenen DNA und die fachen Unterschiede in methylierter und unmethylierter Form sind in den Säulendiagrammen vermerkt (Abb. 4.22). Einige der Promotoren, wie z. B. *BRLF1*, *BSLF1* und *BBLF2/3*, konnten nur in 'Supershift'-Gel-Retentionen analysiert werden, da keine ausreichende Auftrennung aufgrund des Migrationsverhaltens der sehr langen DNA-Fragmente (>1000 bp) erfolgte.

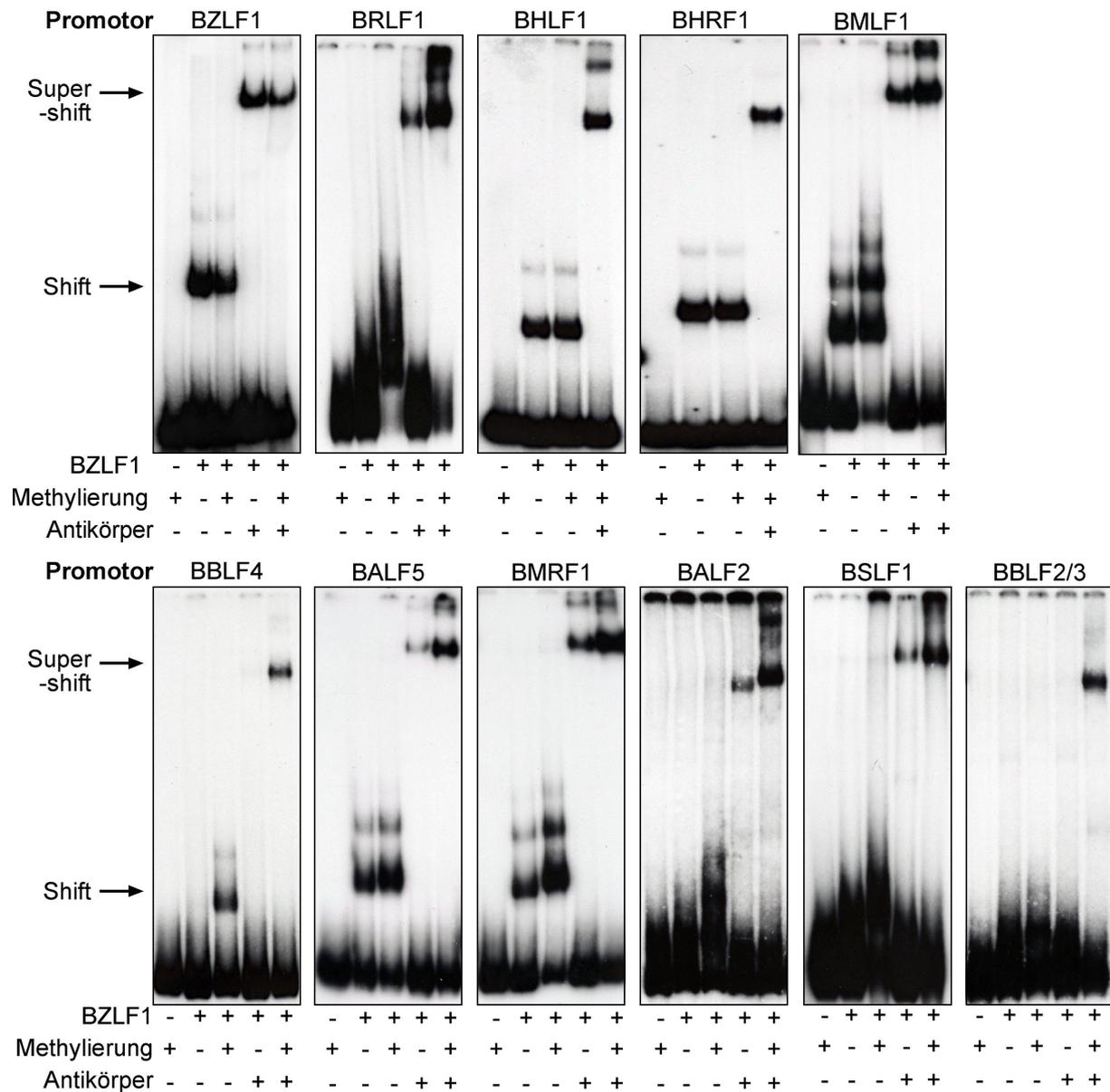


Abb. 4.21: Bestätigung der BZLF1-Bindung an ausgewählten Promotoren durch Gel-Retentionsanalysen. Die Bindung von Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigtem SF:BZLF1 aus transient transfizierten HEK293-Zellen an elf ausgewählten Promotoren, wurde in Gel-Retentionsexperimenten analysiert. Die radioaktiv markierten, PCR-amplifizierten Promotorfragmente wurden unmethyliert bzw. vollständig CpG-methyliert für die BZLF1-Bindungsreaktion verwendet. Zur Bestätigung der SF:BZLF1-DNA-Komplexe wurden 'Supershift'-Experimente mit einem spezifischen FLAG-Antikörper durchgeführt. Die autoradiographierten Filme visualisieren ungebundene DNA, Protein-DNA-Komplexe (*Shift*) und Protein-DNA-Immunkomplexe (*Supershift*).

Zur Kontrolle einer methylierungsunabhängigen SF:BZLF1-Bindung wurden zunächst die Promotoren von *BZLF1*, *BHLF1* und *BHRF1* analysiert. Wie erwartet, führte eine vollständige CpG-Methylierung in diesen Promotorfragmenten zu keiner gesteigerten (0,8- bis 1,1-fach) BZLF1-Bindung, da diese Promotorregionen keine methylierungs-sensitiven ZREs enthalten. Alle weiteren untersuchten Promotoren wurden nach der *in vitro* Methylierung der CpG-Dinukleotide bevorzugt von BZLF1 gebunden. Die CpG-Methylierung führte zu einer 3- bis 7-fach verstärkten BZLF1-Bindung der Promotoren von *BRLF1*, *BALF5*, *BMRF1*, *BALF2* und *BMLF1/BMLF2*. Obwohl die Sequenzierdaten (Anhang) nicht eindeutig darauf hindeuteten, wurde der Promotor von *BSLF1* ebenfalls bevorzugt in methylierter Form gebunden. *BBLF4* und *BBLF2/3* wurden exklusiv in methylierter Form gebunden, was zu einer bis zu 20-fach höheren Bindungsaffinität führte.

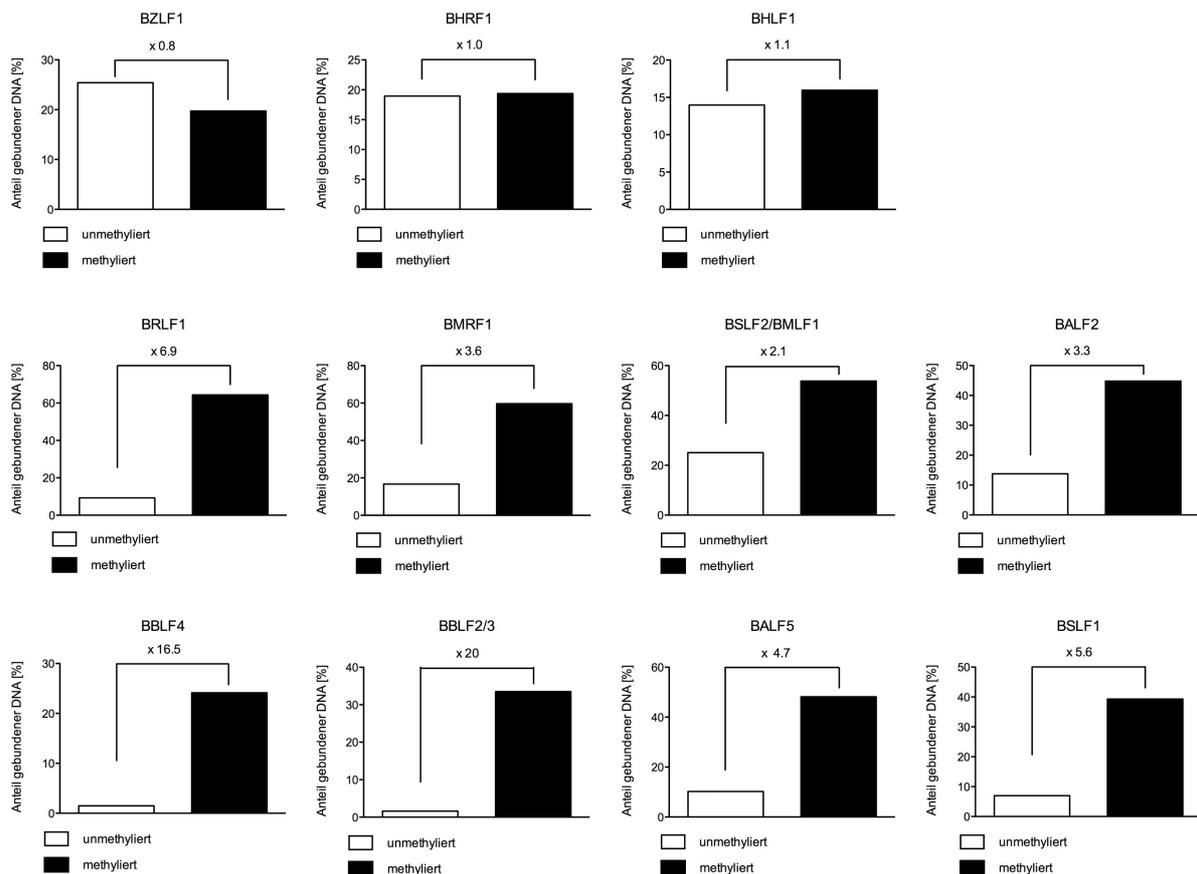


Abb. 4.22.: Quantifizierung der BZLF1-Bindung an ausgewählten Promotoren nach Gel-Retentionsanalysen und densitometrischen Analysen der radioaktiven Emission. Die Bindung von Strep-Tactin-Affinitätschromatographie gereinigtem SF:BZLF1 aus transient transfizierten HEK293-Zellen, wurde an elf ausgewählten Promotoren in Gel-Retentionsexperimenten analysiert. Zur Quantifizierung der DNA-Bindung wurden die Gele nach Exposition einer Verstärkerfolie im Phosphoimager (Fuji) eingelesen und der prozentuale Anteil der SF:BZLF1-gebundenen DNA bestimmt. Die methylierungsunabhängigen Promotoren von *BHLF1*, *BHRF1* und *BRFL1* zeigten wie erwartet keine bevorzugte BZLF1-Bindung bei methylierter DNA. Alle weiteren untersuchten Promotoren wurden bevorzugt in CpG-methylierter Form von BZLF1 gebunden.

4.5.2 BZLF1 transaktiviert bevorzugt methylierte Promotoren lytischer Gene

In den vorangegangenen Abschnitten konnte ausführlich gezeigt werden, dass BZLF1 bevorzugt an methylierte Promotoren lytischer Gene bindet. In den folgenden Experimenten sollte nun untersucht werden, ob diese verstärkte oder exklusive Bindung an methylierte EBV-DNA auch mit einer BZLF1-vermittelten Transaktivierung der Promotoren korreliert. Ein Standardverfahren zur Analyse funktionaler Promotorelemente sind Reporter-gen-Studien. Zur Messung des Aktivierungspotenzials von Transkriptionsfaktoren verbindet man Reportergene mit den zu untersuchenden Promotorfragmenten. Der verwendete „experimentelle“ Reporter ist in diesem Fall die Firefly Luciferase. Das Enzym katalysiert eine ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Freisetzung von Lichtenergie, die bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Ist der Transkriptionsfaktor in der Lage, den Promotor zu aktivieren, wird dadurch die Transkriptionsrate des Reportergens beeinflusst. Die Enzymaktivität, die von der gebildeten Enzymmenge abhängt, lässt auf die transkriptionelle Aktivierbarkeit des zu untersuchenden Promotors schließen und kann daher mit anderen Promotorelementen verglichen werden. Zum Nachweis einer transkriptionellen Aktivierung durch BZLF1 wurden die elf authentischen Promotorregionen der Gene *BZLF1*, *BHLF1*, *BHRF1*, *BRLF1*, *BMRF1*, *BMLF1/BSLF2*, *BALF5*, *BALF2*, *BBLF2/3*, *BBLF4* und *BSLF1* in einen speziellen Luciferase-Reporter-gen-Vektor eingebracht. Dieses synthetische Plasmid enthält keine CpG-Dinukleotide (Klug und Rehli, 2006) und ist daher besonders für die Analyse methylierter DNA-Fragmente geeignet. Eine CpG-Methylierung betrifft nur die klonierten Promotor-Fragmente, beeinflusst aber nicht die Luciferase-Aktivität oder das Rückgrat des Vektors. Die aus *E.coli* extrahierte Vektor-DNA ist frei von methylierten CpG-Dinukleotiden und wurde zur Untersuchung einer methylierungsabhängigen BZLF1-Transaktivierung mit der *de novo* Methyltransferase in Anwesenheit von SAM als Methylgruppendonor vollständig CpG-methyliert. Die Methylierung wurde mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym HpaII überprüft. Ist das CpG-Dinukleotid der Erkennungssequenz 5'-**CCGG**-3' methyliert, ist eine HpaII-Restriktion blockiert. Abbildung 4.24 zeigt ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel einer HpaII-Kontrollrestriktion der unmethylierten und CpG-methylierten Luciferase-Reporter-gen-Vektoren.

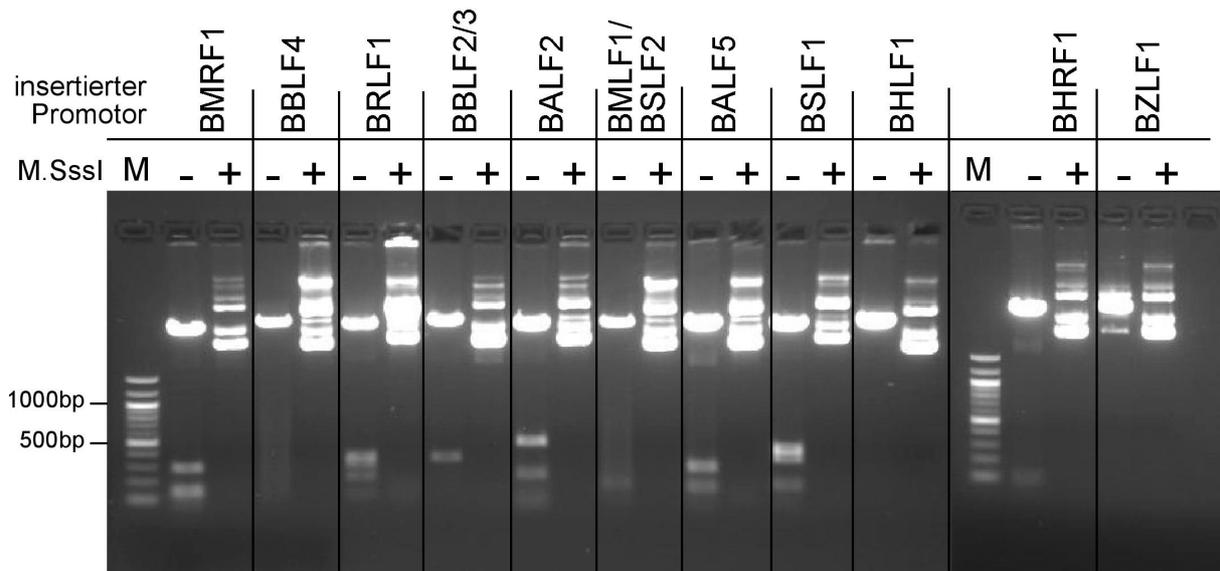


Abb. 4.24: Methylierung der Luciferase-Reportergen-Vektoren: Die Promotoren von elf lytischen Genen wurden in einen synthetischen CpG-freien Luciferase-Reportergen-Vektor eingeführt. Zur Analyse einer methylierungsabhängigen BZLF1-vermittelten Transaktivierung wurden die eingebrachten Promotorfragmente mithilfe der *de novo* Methyltransferase M.SssI *in vitro* vollständig CpG-methyliert. Gezeigt ist ein Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel nach einer HpaII-Restriktionshydrolyse der nicht-CpG-methylierten (-) bzw. der *in vitro* CpG-methylierten (+) Reporterplasmide (M: DNA-Marker). Ist das CpG-Dinukleotid in der Schnittstelle CCGG von HpaII methyliert, ist eine Restriktionshydrolyse durch das Enzym blockiert. Im Gegensatz zu den unmethylierten Vektoren, die das zu erwartende Restriktionsmuster oder eine linearisierte Vektorkonfiguration zeigten (z. B. BHLF1), konnte bei den methylierten Plasmiden lediglich eine verdrehte (*'supercoiled'*), genickte (*'open-circle'*) konkatemerisierte Plasmid-konfiguration festgestellt werden, da eine methylierungsbedingte Blockierung der Restriktion die Linearisierung der Plasmide verhinderte.

Alle unmethylierten Plasmide zeigten nach einer HpaII-Restriktionshydrolyse die erwarteten niedermolekularen DNA-Fragmente. Plasmide mit nur einer HpaII-Schnittstelle (z. B. BHLF1) zeigten eine linearisierte Plasmidkonfiguration. Eine methylierungsbedingte Blockierung der HpaII-Restriktion konnte in allen *de novo* CpG-methylierten Plasmiden anhand der verschiedenen ungeschnittenen Plasmidkonfigurationen festgestellt werden.

Die methylierten und unmethylierten Reportergen-Vektoren wurden jeweils in zwei unabhängigen Ansätzen in An- bzw. Abwesenheit eines BZLF1-Expressionsplasmid (p509) transfiziert. Zum Abgleich der Transfektionseffizienz erfolgte die Kotransfektion eines konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferasegens. 48 h nach Transfektion wurden die enzymatischen Aktivitäten von Renilla- und Firefly-Luciferase gemessen und normalisiert. Jeder Transfektionsansatz wurde als vielfache Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Hintergrundsignal des unmethylierten bzw. methylierten CpG-Leervektors dargestellt. Die Transaktivierungszunahme vom unmethylierten zum methylierten Datensatz ist durch den Pfeilwert gekennzeichnet (Abb. 4.25).

Eine Methylierung der Promotoren von *BHRF1*, *BHLF1* und *BZLF1* bewirkte keine Zunahme der Luciferase-Aktivität im Vergleich zum unmethylierten Reporterplasmid, sondern führte zu einer verminderten *BZLF1*-vermittelten Transaktivierung. Die Promotoren von *BHRF1* und *BZLF1* wurden bereits in Abwesenheit von *BZLF1* um das 10-fache transaktiviert. Endogene zelluläre Transkriptionsfaktoren dürften für die basale Transaktivierung dieser Promotoren verantwortlich sein. Beispielsweise befinden sich im *BZLF1*-Promotor neben den beiden autoregulatorischen ZREs weitere proximale regulatorische Elemente, um eine niedrige basale Expression in der latenten Phase und eine starke Induktion in der lytischen Phase zu erzielen (Daibata *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den bisher publizierten Berichten (Bhende *et al.*, 2004) erfuhr der Promotor von *BRLF1* in den gezeigten Studien nur eine geringfügige transkriptionelle Aktivierung nach vollständiger CpG-Methylierung der Luciferase-Reporter-Gen-Vektoren (1,7-fach). Bhende und Kollegen berichten von einer ca. 20-fachen Transaktivierung. Eine Kontrolle der methylierten und unmethylierten Vektoren in Abwesenheit von *BZLF1* wurde allerdings unterlassen (Bhende *et al.*, 2004). Eine bis zu 28-fache Zunahme der Luciferase-Aktivität bei CpG-methylierter Vektor-DNA konnte für die Promotoren von *BMLF1*, *BALF2* und *BALF5* detektiert werden.

Einen Sonderfall stellte der Promotor von *BMLF1/BSLF2* dar, dessen *BZLF1*-vermittelte Transaktivierung von mehreren Gruppen beschrieben wurde (Buisson *et al.*, 1989; Rooney *et al.*, 1989; Urier *et al.*, 1989). Das unmethylierte Reporter-Konstrukt zeigte bereits in Abwesenheit von *BZLF1* eine ca. 50-fache Luciferase-Aktivität. In Anwesenheit von *BZLF1* erfuhr der Promotor eine ca. 10-fache Reprimierung. Die Methylierung der CpG-Dinukleotide hob diese Repression auf und resultierte in einer 60-fach gesteigerten Transaktivierung des Promotors. Der Promotor enthält ein zusätzliches, negatives regulatorisches Element, das eine Homologie zu bisher beschriebenen ZREs aufweist (Liu und Summers, 1992). Die Repression des *BMLF1/BSLF2*-Promotors in den gezeigten Analysen durch *BZLF1* ist offensichtlich, die Bedeutung selbst, unklar. Eine eindeutige *BZLF1*-vermittelte Transaktivierung hingegen zeigten die Promotoren von *BBLF4* und *BALF5*. In unmethylierter Form wurden sie nicht durch *BZLF1* transaktiviert, erst eine CpG-Methylierung bewirkte eine um das 28-fache gesteigerte Transaktivierung.

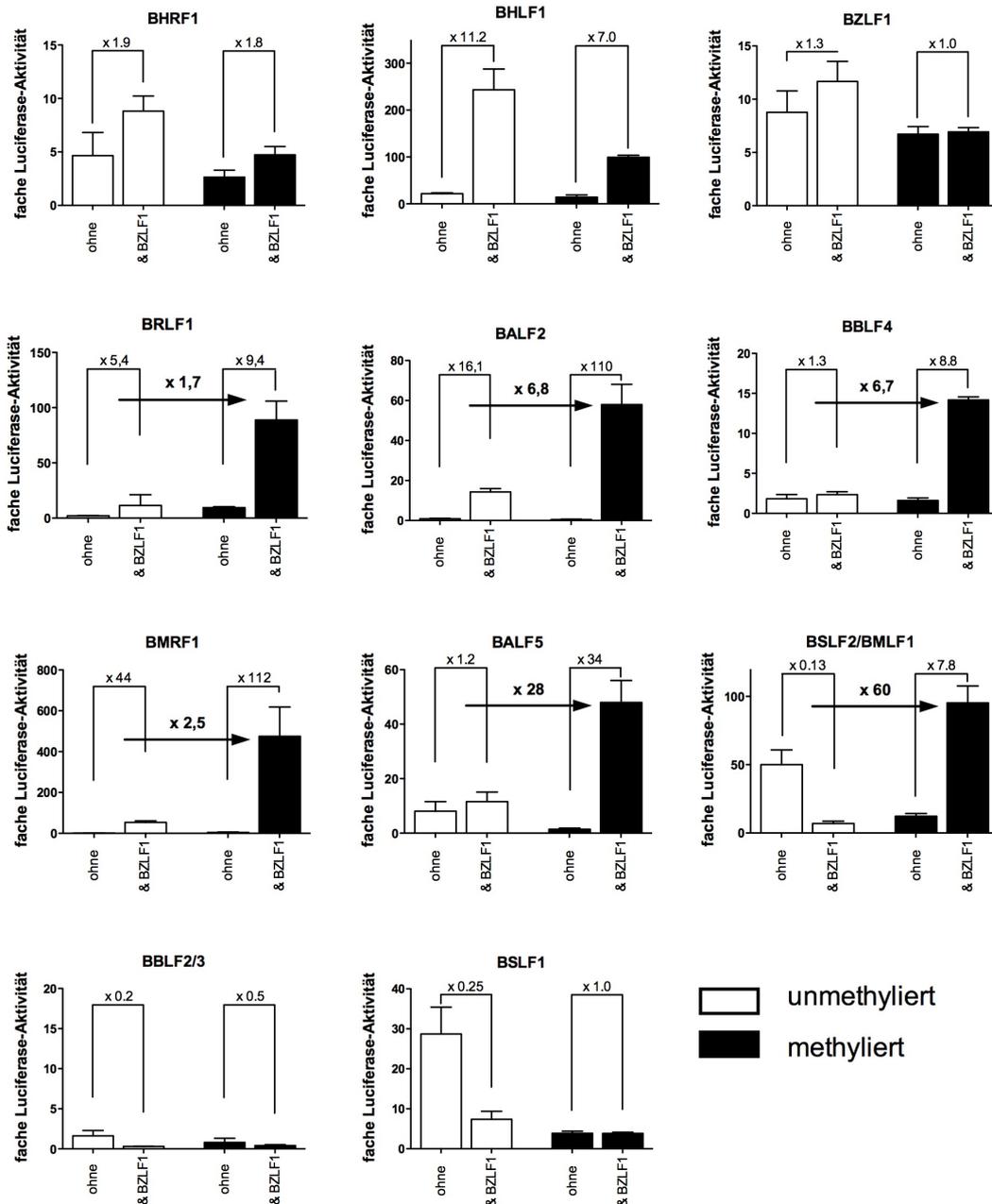


Abb. 4.25: Methylierungsabhängige Luciferase-Reporter-gen-Studien ausgewählter Promotoren. Promotoren von elf lytischen Genen wurden in einen CpG-Dinukleotid-freien, synthetischen Luciferase-Reporter-gen-Vektor eingebracht. Die Plasmid-DNA wurde direkt nach der Extraktion aus *E. coli* verwendet (unmethyliert, weiß) oder *in vitro* mithilfe der *de novo* Methyltransferase M.SssI vollständig CpG-methyliert (methyliert, schwarz). Die Reporterkonstrukte wurden in An- (& BZLF1) bzw. Abwesenheit (ohne) eines BZLF1-Expressionsplasmids in HEK293-Zellen transfiziert und 48 h nach Transfektion analysiert. Zur internen Normalisierung der Daten wurde ein konstitutiv aktives Renilla-Luciferasegen in jedem Ansatz kotransfiziert. Jeder Transfektionsansatz wurde auf den Wert des methylierten bzw. unmethylierten CpG-Leervektors als vielfache Luciferase-Aktivität dargestellt. Die vielfachen Unterschiede in An- bzw. Abwesenheit von BZLF1 sind vermerkt. Die Transaktivierungszunahme vom unmethylierten zum methylierten Datensatz ist durch den Pfeilwert gekennzeichnet. Die Methylierung der Promotoren *BRLF1*, *BALF2*, *BMRF1* und *BSLF2/BMLF1* bewirkte eine verstärkte Luciferase-Aktivität (1,7- bis 60-fach). *BBLF4* und *BALF5* wurden ausschließlich im CpG-methylierten Zustand durch BZLF1 transaktiviert. Die Kontrollpromotoren der Gene *BHRF1*, *BHLF1* und *BZLF1* zeigten wie zu erwarten keine methylierungsabhängige Transaktivierung. *BSLF1* und *BBLF2/3* wurden weder im unmethylierten noch im methylierten Zustand in HEK293-Zellen von BZLF1 reguliert. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Obwohl am Beispiel von *BBLF2/3* eine exklusive methylierungsbedingte (Abs. 4.3 und 4.4) BZLF1-Bindung festgestellt wurde, zeigte dieser Promotor wie auch der von *BSLF1* weder im methylierten noch im unmethylierten Zustand eine transkriptionelle Aktivierung durch BZLF1. Möglicherweise sind für die Regulation dieser Promotoren weitere virale Faktoren wie z. B. BRLF1 erforderlich. Der Promotor von *BBLF2/3* zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine starke methylierungsabhängige Bindung am 5'-Ende des offenen Leserahmens (Abb. 4.10, 4.15). Diese Sequenzen waren in den Luciferase-Reporter-Gen-Vektoren nicht enthalten. Es ist auch denkbar, dass eine BZLF1-Bindung an diese DNA-Abschnitte für eine Regulation dieses Promotors notwendig ist.

4.5.3 Expression lytischer Gene in latent infizierten Raji-Zellen nach *BZLF1*-Induktion

Abschließende Experimente in diesem Kapitel sollten zeigen, dass BZLF1 auch in der Lage ist, die zuvor analysierten lytischen Gene in latent infizierten Zellen transkriptionell zu aktivieren. Für Untersuchungen wurde erneut auf das strikt latente Raji-Zellsystem zurückgegriffen. Die ca. 50-200 EBV-Kopien pro Zelle weisen u. a. eine Deletion im *BALF2*-Genlokus auf, was zu einem Block in der lytischen Phase von EBV führt, da die Amplifikation der viralen DNA ausbleibt. Dennoch kann in diesen Raji-Zellen der lytische Zyklus, trotz der fehlenden Virusmorphogenese, durch chemische Substanzen initiiert werden. Chemikalien, wie beispielsweise Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA), bewirken die lytische Induktion durch die Aktivierung des Proteinkinase C abhängigen Signaltransduktionswegs (Nishizuka, 1984; zur Hausen *et al.*, 1978). Dies führt zu einer Transaktivierung des *BZLF1*-Promotors durch zwei TREs (*TPA-responsive elements*) (Flemington und Speck, 1990d). Allerdings sind diese Ansätze problematisch, da die *BZLF1*-Expression indirekt über einen zellulären Signalweg erfolgt und mögliche Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden können.

Zur gezielten Analyse wurde deshalb eine Raji-Zelllinie generiert, die eine konditionale *BZLF1*-Expression ermöglicht. Als Basis diente der episomal replizierende Vektor pRTS-2, welcher via Tet-Regulation (*tet on*'-System) die gleichzeitige konditionale Expression von zwei Genen ermöglicht (Bornkamm *et al.*, 2005). Dieses Plasmid exprimiert auch einen Tet-regulierten Transkriptionsfaktor und dessen Gegenspieler, einen Tet-Repressor. In Abwesenheit von Tetrazyklin oder

eines Derivats, wie Doxyzyklin, bindet der Repressor an den bidirektionalen Promotor P_{tet} bi-1 und reprimiert ihn. Die Zugabe von Doxyzyklin resultiert in der Dissoziation des Tet-Repressors sowie der Bindung des Tet-regulierten Transkriptionsfaktors und führt zur Aktivierung des P_{tet} bi-1-Promotors. Dieser bidirektionale Promotor exprimiert die Gene *BZLF1* und *GFP*, letzteres dient als phänotypischer Marker zur Tetrazyklin vermittelten Aktivierung beider Gene.

Raji-Zellen wurden mit dem Konstrukt stabil transfiziert (Raji/3862) und bei einer Doxyzyklinkonzentration von 100 ng/ml induziert. Durchflusszytometrische Analysen zeigten ein einheitliches GFP-Expressionsniveau und belegten die Induzierbarkeit des Vektorsystems in nahezu allen stabil transfizierten Raji-Zellderivaten (Raji/3862 + dox) (Abb. 4.26, A). Als Negativkontrolle diente das nicht-induzierte Raji-Zellderivat (Raji/3862 - dox) sowie Doxyzyklin-induzierte Wildtyp Raji-Zellen (Raji + dox), die bedingt durch Zugabe von Doxyzyklin eine leichte Autofluoreszenz zeigten. Die *BZLF1*-Expression der Doxyzyklin-induzierten Zellen wurde im Western-Blot-Verfahren überprüft (Abb. 4.26, B). Gesamtzellextrakte von Raji- und Raji/3862-Zellen wurden 12 h nach Zugabe von 100 ng/ml Doxyzyklin (+ dox) zum Kulturmedium zusammen mit Gesamtzellextrakten aus unstimulierten Raji/3862-Zellen (- dox) elektrophoretisch aufgetrennt.

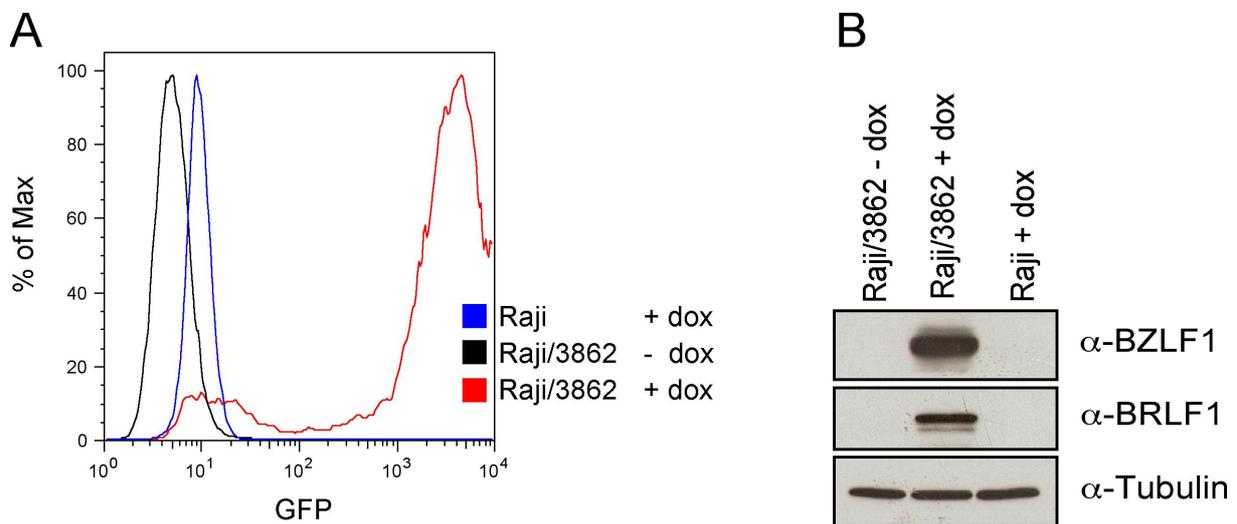


Abb. 4.26 Konditionale *BZLF1*-Expression in Raji-Zellen. Raji-Zellen wurden mit einem Vektor zur konditionalen Expression von *BZLF1* und *GFP* stabil transfiziert. Die Zugabe von Doxyzyklin resultierte in einer Aktivierung des Promotors und der Expression von *BZLF1* und *GFP*. (A) 12 h nach Induktion zeigten durchflusszytometrische Analysen eine deutliche Expression von GFP in nahezu allen Zellen. Nicht induzierte, stabil transfizierte Raji-Zellderivate dienten als Negativkontrolle, Doxyzyklin-induzierte Raji-Wildtyp-Zellen zeigten eine leichte Doxyzyklin-bedingte Autofluoreszenz. (B) Zusätzlich wurde eine Expression von *BZLF1* und *BRLF1* in den induzierten Raji-Zellen im Western-Blot-Verfahren überprüft. *BZLF1* konnte auf Protein-Ebene im Western-Blot-Verfahren detektiert werden. Der Nachweis von *BRLF1* zeigte, dass dieses Zellsystem für weitere Analysen geeignet ist. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der Genprodukte BZLF1, BRLF1 und Tubulin (Ladekontrolle). Im Gegensatz zu den Negativkontrollen (Raji/3862 - dox, Raji + dox) konnte BZLF1 in den induzierten Raji/3862-Zellen detektiert werden. Der erbrachte Nachweis von BRLF1 im Western-Blot-Verfahren als Folge einer BZLF1-vermittelten Transaktivierung des *BRLF1*-Promotors bestätigte die Funktionalität des Raji-Zellsystems.

Eine Aktivierung der lytischen Promotoren *BRLF1*, *BMLF1/BSLF2*, *BMRF1*, *BBLF4*, *BBLF2/3*, *BALF5* und *BSLF1* in den induzierten Raji-Zellderivaten wurde durch den Nachweis der Transkripte erbracht, da für eine Detektion der Proteine keine Antikörper zur Verfügung standen. Zu diesem Zweck wurden Raji/3862-Zellen mit Doxyzyklin induziert und Gesamt-RNA 12 h nach Induktion isoliert (+ dox). Gesamt-RNA aus nicht induzierten Raji/3862-Zellen diente als Referenzprobe (- dox). DNA-Kontaminationen wurden durch einen Dnase I-Verdau entfernt und die RNA-Präparation anschließend in einer PCR-Reaktion mit 38 Zyklen überprüft (Abb. 4.27). Es konnten keine PCR-Produkte für *BZLF1* und das konstitutiv exprimierte zelluläre Haushaltsgen Cytochrom C detektiert werden. Zur Kontrolle wurde die PCR-Reaktion mit RNA-Proben durchgeführt, die nicht mit Dnase I behandelt waren.

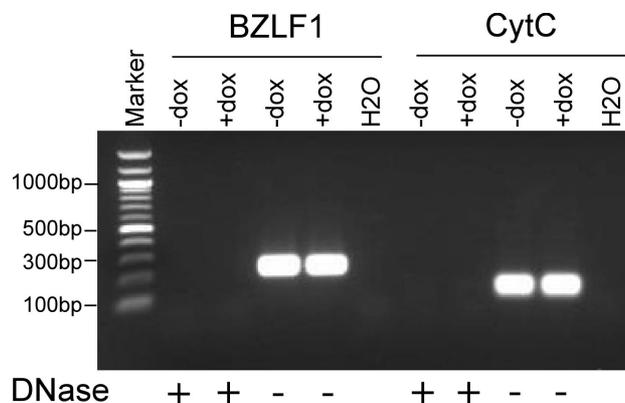


Abb. 4.27: Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der PCR-Amplifikate zur Kontrolle von Kontaminationen der RNA-Proben mit genomischer DNA. Raji-Zellen wurden mit einem Tetrazyklin-regulierten *BZLF1*-Expressionsplasmid stabil transfiziert. 12 h nach Doxyzyklinzugabe wurde aus den induzierten (+dox) sowie nichtinduzierten Raji-Zellderivaten (-dox) gesamtzelluläre RNA isoliert. 2 µg RNA wurde für 90 min mit Dnase I bei 37 °C inkubiert. Der Dnase I-Verdau wurde in einer PCR-Reaktion mit 38 Zyklen und zwei Primerpaaren für BZLF1 und Cytochrom C überprüft. Die genomische DNA konnte nach DNaseI-Verdau nicht amplifiziert werden (DNase +). Als Positivkontrollen dienten unbehandelte RNA-Präparationen (DNase -).

Gleiche Mengen RNA aus induzierten bzw. nichtinduzierten Raji/3862-Zellen wurden anschließend mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase dienten oligo-dT-Nukleotide, um ausschließlich mRNA in

cDNA zu übersetzen. In einer 'real-time' PCR wurden die relativen Transkriptmengen der Gene *BZLF1*, *BRLF1*, *BMRF1*, *BMLF1/BSLF2*, *BBLF2*, *BBLF4*, *BALF5* und *BSLF1* quantifiziert. Zelluläres Cytochrom C, dessen Transkriptmengen nach einer doxyzyklinabhängigen-*BZLF1*-Induktion nicht beeinflusst wurden, diente als Referenzgen zur Normalisierung der Expressionsunterschiede. Abbildung 4.28 zeigt die relativen Transkriptmengen der ausgewählten lytischen Gene nach Induktion von *BZLF1* (+ dox) in Raji-Zellen im Vergleich zu den uninduzierten Raji-Zellen (- dox).

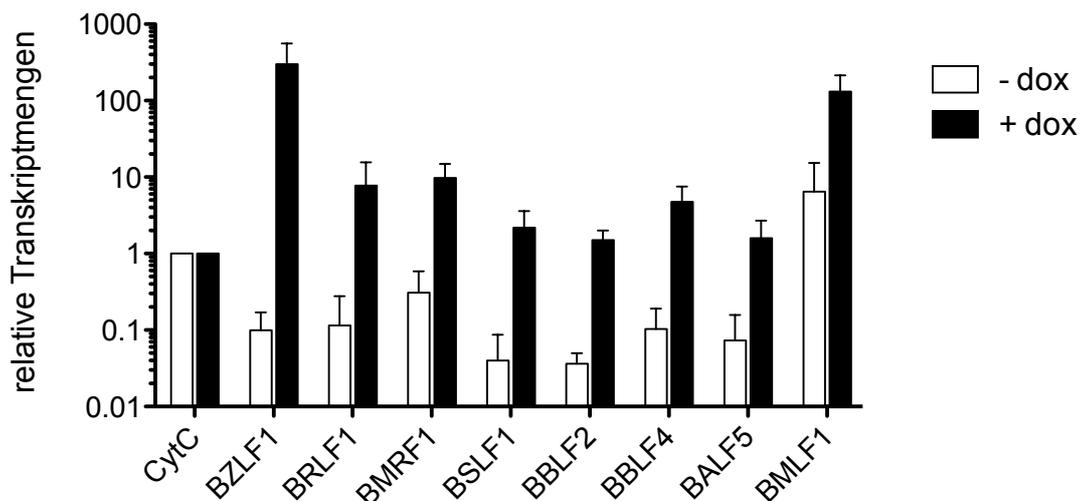


Abb. 4.28: Quantitative 'real-time' RT-PCR-Analysen ausgewählter Transkripte nach konditionaler *BZLF1*-Expression. Raji-Zellen wurden mit einem Tetrazyklin-regulierten *BZLF1*-Expressionsplasmid stabil transfiziert. 12 h nach Doxyzyklinzugabe wurde aus induzierten (+ dox) und nicht-induzierten Raji-Zellen (- dox) gesamtzelluläre RNA isoliert. Nach einem 90 minütigen Dnase I-Verdau wurden gleiche RNA-Mengen revers transkribiert. Anschließend wurden die Transkripte der Gene *BZLF1*, *BRLF1*, *BMRF1*, *BSLF1*, *BBLF2*, *BBLF4*, *BALF5* und *BMLF1* im 'real-time' PCR-Verfahren quantifiziert. Die Transkriptmengen wurden anhand des des stabilen Referenzgens Cytochrom C normalisiert (CytC). Es konnte eine transkriptionelle Aktivierung aller analysierten Gene nach einer *BZLF1*-Induktion detektiert werden. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Transkriptmengen in einer logarithmischen Auftragung von drei unabhängigen Experimenten.

Die Doxyzyklin-vermittelte *BZLF1*-Expression vom bidirektionalen Tet-Promotor resultierte in einem ca. 3000-fachen Anstieg der *BZLF1*-Transkriptmengen. Die Analysen der weiteren Transkriptmengen zeigten, dass die induzierte Expression von *BZLF1* zu einer ca. 20- bis 70-fach gesteigerten Genexpression der analysierten lytischen Gene führte. Obwohl in den Luciferase-Reporter-Gen-Studien die Promotoren von *BSLF1* und *BBLF2/3* nicht von *BZLF1* reguliert wurden, erfolgte eine eindeutige transkriptionelle Aktivierung dieser Gene nach *BZLF1*-Expression in Raji-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür ist eine synergistische Aktivierung dieser beiden Promotoren durch die Transaktivatoren *BZLF1* und *BRLF1*, die für eine vollständige Induktion des lytischen Zyklus essenziell sind (Feederle *et al.*, 2000).

4.5.4 Schlussfolgerungen der Charakterisierung lytischer EBV Promotoren

Die umfangreichen Analysen lytischer Promotoren bestätigten die 'Next Generation Sequencing'-Ergebnisse größtenteils. In Gel-Retentionsanalysen konnte eine bevorzugte oder exklusive BZLF1-Bindung an methylierte Promotorfragmente bei allen untersuchten lytischen Genen beobachtet werden. Auf funktionaler Ebene zeigten vor allem die Gene der viralen Replikationsmaschinerie *BALF5* und *BBLF4* eine strikte methylierungsabhängige BZLF1-vermittelte Transaktivierung. Obwohl die methylierten Promotoren der Gene *BSLF1* und *BBLF2/3* ebenfalls bevorzugt von BZLF1 gebunden wurden, sind für ihre transkriptionelle Aktivierung offensichtlich weitere Faktoren notwendig. Dennoch war eine alleinige *BZLF1*-Expression in latent infizierten Raji-Zellen, die viele Kopien von hochgradig methylierten und chromatinisierten EBV-Genomen tragen, ausreichend, um alle untersuchten Promotoren auf transkriptioneller Ebene zu aktivieren. Zusammengefasst stützen diese Ergebnisse die aufgestellte Arbeitshypothese: Die fehlende Methylierung der Promotoren von essenziellen lytischen Genen verhindert die BZLF1-vermittelte Induktion des lytischen Zyklus in frisch infizierten humanen B-Zellen und ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche latente EBV-Infektion.

4.6 Biochemische und funktionale Charakterisierung ausgewählter ZREs

Bislang konnten detaillierte Analysen ausgewählter Promotoren die initialen Beobachtungen der genomweiten BZLF1-Bindungsstudien im EBV-Genom bestätigen: BZLF1 bindet und transaktiviert bevorzugt methylierte Promotoren lytischer Gene. Mithilfe der Sequenzierdatensätze und den Analysen der bioinformatischen Suchalgorithmen konnten putative methylierungssensitive ZREs in diesen Promotoren identifiziert werden. Das abschließende Kapitel meiner Arbeit beschäftigt sich mit einer Auswahl identifizierter einzelner ZREs. Systematisch wurden „klassische“ ZREs in bekannten Promotoren, die von einer Methylierung nicht beeinflusst werden, mit neidentifizierten ZREs in methylierter bzw. unmethylierter Form verglichen.

4.6.1 Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von BZLF1 für ZREs und meZREs

Die Interaktion zwischen BZLF1 und einem ZRE kann durch die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, auch als K_d -Wert bezeichnet, näher definiert und quantifiziert werden. Der K_d -Wert stellt ein Maß für die Affinität des Proteins zur DNA dar. In einer Dissoziationsreaktion stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem Protein (P), freier DNA (D) und dem vorliegenden Protein-DNA-Komplex (DP) ein (Abb. 4.29, Gleichung (1)). Die Dissoziationskonstante gibt an, „auf welcher Seite“ der Reaktion das Gleichgewicht liegt und wird durch Gleichung (2) definiert. [P], [D] und [DP] entsprechen den jeweiligen molaren Konzentrationen von Protein, DNA und dem Protein-DNA Komplex (Ryder *et al.*, 2008). Liegt zwischen Protein und DNA eine starke Wechselwirkung vor, verlagert sich das Gleichgewicht auf die Seite des undissoziierten Protein-DNA-Komplexes. Nach Gleichung (2) entspricht also ein hoher K_d -Wert einer schwächeren, ein niedriger K_d -Wert einer stärkeren DNA-Protein-Interaktion.



$$(2) K_d = \frac{[\text{D}][\text{P}]}{[\text{DP}]}$$

$$(3) f = \frac{[\text{DP}]}{[\text{D}] + [\text{DP}]} = \frac{[\text{P}_t]}{[\text{P}_t] + K_d} = \frac{1}{1 + (K_d / [\text{P}_t])}$$

D: DNA
 P: Protein
 K_d : Gleichgewichts-
 Dissoziationskonstante
 [P_t]: Gesamtprotein Konzentration

Abb. 4.29: Mathematische Grundlage zur Berechnung der K_d -Werte: Die Affinität einer Protein-DNA-Interaktion kann durch die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_d -Wert) quantifiziert werden. In einer Bindungsreaktion liegt ein Gleichgewicht zwischen freiem Protein (P), freier DNA (D) und dem vorliegenden Protein-DNA-Komplex (DP) vor (1). Die Dissoziationskonstante definiert den Wert dieses Gleichgewichts (2). In Gel-Retentionsanalysen kann der Anteil der gebundenen Fraktion [DP] quantifiziert und als Funktion (f) abhängig vom K_d -Wert dargestellt werden (3). Aus dieser Gleichung lässt sich mithilfe bekannter Protein- und DNA-Konzentrationen die Gleichgewichtskonstante berechnen.

Gel-Retentionsanalysen sind eine weitverbreitete Methode zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen *in vitro* (Abs. 4.5.1). In der Regel werden Gel-Retentionen nur mit einer Proteinkonzentration durchgeführt, da diese ausreicht, um eine Interaktion zwischen dem Protein und einem bestimmten DNA-Fragment nachzuweisen. In Experimenten mit einer definierten Proteinkonzentrationsreihe können Gel-Retentionsanalysen aber auch zur Bestimmung der K_d -Werte eingesetzt werden, da eine Änderung der Proteinkonzentration in einem dynamischen Bereich

mit dem Anteil der gebundenen DNA korreliert. Allerdings kann in Gel-Retentionsanalysen die Menge der gebundenen DNA-Fraktion besser als die freie Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Fraktion gebundener DNA kann als Funktion (f) abhängig vom K_d -Wert dargestellt werden (Gleichung (3)). $[P_f]$ entspricht dabei der Gesamtproteinkonzentration, die aus der Summe von $[P] + [DP]$ im Gleichgewicht resultiert. Die Gleichung setzt voraus, dass die DNA-Konzentration sehr gering ist, wodurch $[DP]$ vernachlässigt werden kann und dadurch die freie Proteinmenge $[P_f]$ im Gleichgewicht gesättigt ist. Die Fraktion der gebundenen DNA kann also für verschiedene Proteinkonzentrationen berechnet und somit eine abgeschätzter K_d -Wert mithilfe der angegebenen Gleichung aus einer nicht linearen Regressionsgerade ermittelt werden (Ryder *et al.*, 2008).

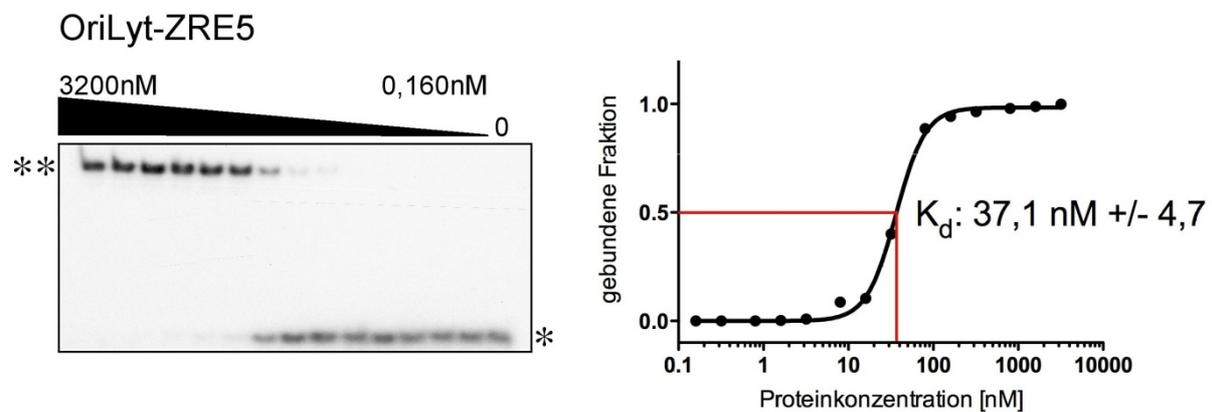


Abb. 4.30: Bestimmung der BZLF1-Dissoziationskonstante für das ZRE5 von *oriLyt* nach Gel-Retentionsanalysen. Ein radioaktiv markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid mit dem ZRE5 von *oriLyt* wurde in einer linearen Proteinverdünnungsreihe [3200nM-0,160nM] mit gereinigtem SF:BZLF1 inkubiert und im Gel-Retentionsverfahren analysiert (links). Der K_d -Wert kann abhängig von der gebundenen Fraktion und der Proteinkonzentration bestimmt werden. Die gebundene Fraktion berechnet sich aus den densitometrisch ermittelten Signalintensitäten der freien DNA(*) und der SF:BZLF1 gebundenen DNA (**). Die Werte der gebundenen Fraktion wurden gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen (rechts). In einer logarithmisch skalierten Achse konnte mithilfe einer Hill-Regressionsgerade die Bindungskonstante (K_d -Wert) ermittelt werden. Der K_d -Wert entspricht dabei der Proteinkonzentration [M] der halbmaximalen gebundenen Fraktion.

Am Beispiel des ZRE5 im lytischen Replikationsursprungs (*oriLyt*) wird eine K_d -Wert Analyse detailliert erklärt. Jeweils 50 pmol der komplementären Oligonukleotide (25 bp) mit einem zentralen BZLF1-Bindemotiv wurden radioaktiv markiert und zu dsDNA hybridisiert. In einem 10 μ l-Reaktionsansatz wurden die Oligonukleotide (0,5 nM) mit Affinitätschromatographie-gereinigtem SF:BZLF1 in einer linearen Proteinkonzentrationsreihe (3200 nM - 0,160 nM) inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend im Gel-Retentionsverfahren analysiert. Das auf einem autoradiographischen Film exponierte Gel ist gezeigt (Abb. 4.30, links). Die

untere Bande entspricht der freien ungebundenen DNA (*), die obere Bande der SF:BZLF1 gebundenen DNA (**). Nach einer Exposition des Gels mit einer Verstärkerfolie konnte die radioaktive Emission der freien und gebundenen DNA densitometrisch im Phosphoimager quantifiziert werden. Die gebundene Fraktion jedes Ansatzes der Verdünnungsreihe berechnet sich aus dem Quotienten der gebundenen DNA und der Summe aus freier und gebundener DNA (Gleichung (2), $[DP] / [DP] + [D]$). Wie das Gel verdeutlichte, lag bei einer hohen gesättigten Proteinkonzentration das Gleichgewicht auf Seiten des Protein-DNA-Komplexes. Mit abnehmender Proteinkonzentration bei konstanter DNA-Menge nahm die gebundene Fraktion erwartungsgemäß ab.

Die Ermittlung des K_d -Wertes erfolgte mithilfe der Software Prism5 (GraphPad). Die gebundene Fraktion wurde gegen die Proteinkonzentration auf einer logarithmisch skalierten Achse aufgetragen und eine nicht-lineare Hill-Regressionsgerade erstellt (*Non linear fit: One site - Specific binding with Hill slope*). Der K_d -Wert definiert sich als die Proteinkonzentration ($[M]$; mol/L) bei der eine halbmaximale Bindung erreicht wird (Ryder *et al.*, 2008). Dieser Wert wurde nach Anwendung der Hill-Regressionsgeraden automatisch von der Software Prism5 berechnet. Für das ZRE5 von *oriLyt* ergab sich ein K_d -Wert von $37,1 \text{ nM} \pm 4,7$ (Abb. 4.30, rechts). Die K_d -Wert-Analysen wurden für alle untersuchten ZREs bestimmt und mehrmals wiederholt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der K_d -Werte sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Abbildungen 4.31 und 4.32 zeigen die experimentellen Grundlagen der ermittelten K_d -Werte.

Tabelle 4.1: K_d -Werte von BZLF1 für CpG-methylierten und nicht methylierten ZREs.

Für ZREs mit einem CpG-Dinukleotid im Bindemotiv (hervorgehoben) wurden die K_d -Werte in An- und Abwesenheit einer CpG-Methylierung bestimmt. Es ergab sich anhand der K_d -Werte folgende Reihenfolge der BZLF1-Affinität: meZREs methyliert > ZREs > meZREs unmethyliert.

ZRE	Bindesequenz	K_d [nM] methyliert	K_d [nM] unmethyliert
BBLF4-ZRE A	TGTG <u>CG</u> AG	$16,3 \pm 2,6$	219 ± 41
BBLF4-ZRE B	TGAG <u>CG</u> TT	$18,0 \pm 4,2$	484 ± 244
BMRF1-ZRE A	TGTG <u>CG</u> AG	$20,2 \pm 12,5$	328 ± 166
BRLF1-ZRE2	TGAG <u>CG</u> A	$12,7 \pm 8,2$	$113 \pm 11,9$
BRLF1-ZRE3	TT <u>CGCG</u> A	135 ± 45	1189 ± 227
OriLyt-ZRE5	TTGCACA	ohne CpG	$37,7 \pm 4,3$
BMLF1-TRE (AP-1)	TGACTCA	ohne CpG	$40,8 \pm 23,0$
BHLF1-ZRE2	TTGCTCA	ohne CpG	$91,6 \pm 38,5$

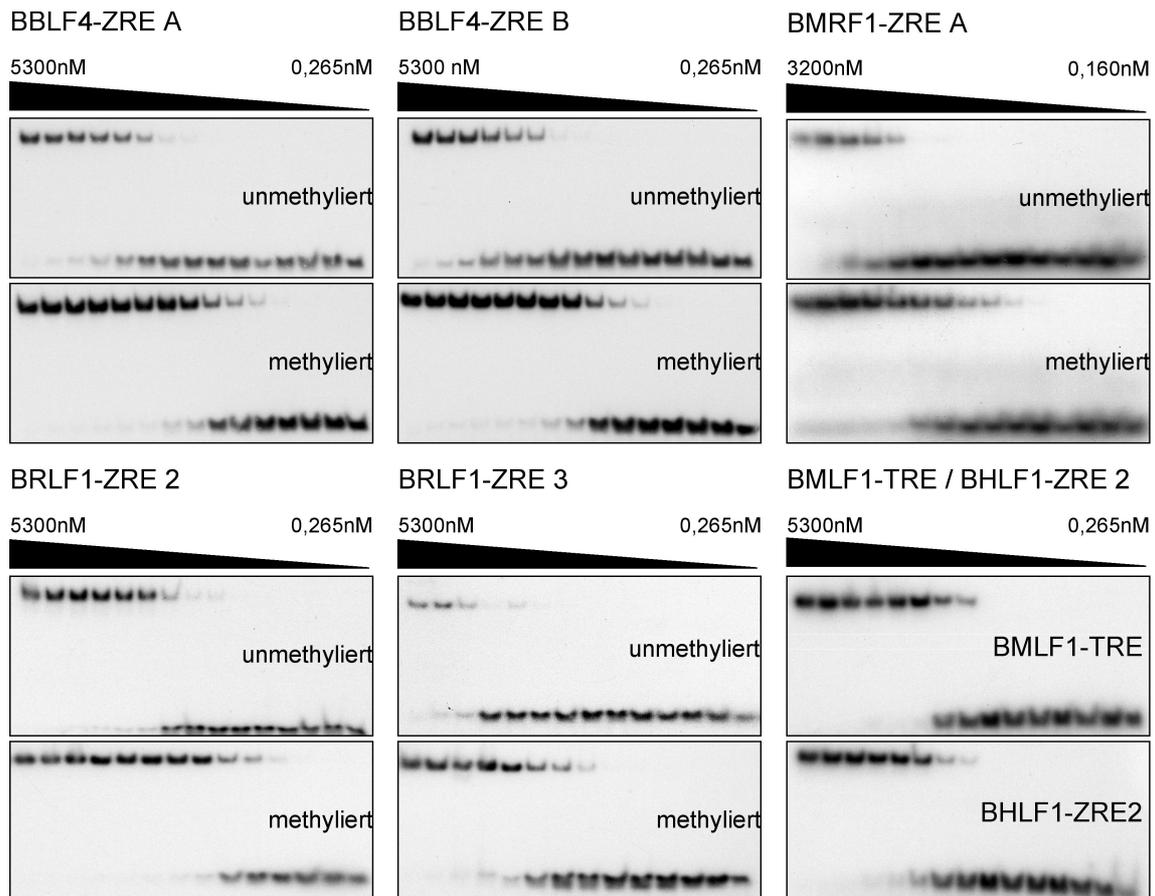


Abb. 4.31: Bestimmung der BZLF1-gebundenen DNA-Fractionen einer Proteinkonzentrationsreihe an methylierten und unmethylierten ZREs nach Gel-Retentionsanalysen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide mit Bindemotiven aus den den Promotoren *BBLF4*, *BRLF1*, *BMRF1*, *BMLF1* und *BHLF1* wurden mit einer SF:BZLF1-Verdünnungsreihe inkubiert und in Gel-Retentionen analysiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden durch Auflegen eines autoradiographischen Filmes visualisiert und zur Quantifizierung mit einer Verstärkerfolie exponiert und im Phosphoimager (Fuji) eingelesen. Aus den densitometrisch ermittelten Signalintensitäten der freien DNA (untere Bande im Gel) und der SF:BZLF1 gebundenen DNA (obere Bande im Gel) konnte der Anteil der gebundenen Fraktion ermittelt werden und daraus die K_d -Werte abhängig von der Proteinkonzentration berechnet werden (Abb. 4.32).

Die K_d -Werte bei vorhandener CpG-Methylierung für die meZREs lagen im Bereich von $12,7 \pm 8,2$ nM und $20,2 \pm 12,5$. Unmethylierte meZREs wurden mit einer deutlich schwächeren Affinität von SF:BZLF1 gebunden (bis zu 27-fach geringer). Die ermittelten K_d -Werte lagen hier im Bereich von $113 \pm 11,9$ nM und 484 ± 244 nM. Eine Ausnahme stellte das als methylierungssensitiv postulierte ZRE3 des *BRLF1*-Promotors dar (Bhende *et al.*, 2004). Die K_d -Werte für die Sequenz TTCGCGGA (135 ± 45 nM) lagen trotz einer vorliegenden Methylierung in beiden CpG-Dinukleotiden um ca. das zehnfache über denen der restlichen methylierten ZREs dieser Klasse. Bereits in den genomweiten *in vitro* und *in vivo* Bindungsanalysen konnte keine klare BZLF1-Bindung an ZRE3 von BRLF1 nachgewiesen werden. Eine funktionale Bedeutung dieses Bindemotivs ist daher fragwürdig. Die K_d -Werte der CpG-freien

„konventionellen“ ZREs von *BMLF1*-TRE (AP1-Motiv), *BHLF1*-ZRE2 und des *oriLyt*-ZRE5 sollten eine Einordnung bezüglich ihrer Bindeaffinität im Vergleich zu den methylierten und unmethylierten meZREs erlauben. Die K_d -Werte für diese methylierungs-unabhängigen ZREs (*oriLyt*, *BMLF1* und *BHLF1*) lagen im Bereich von $37,7 \pm 4,3$ nM und $91,6 \pm 38,5$ nM. Die Bindeaffinität dieser Sequenzmotive lag zwischen den stark gebundenen methylierten meZREs und den schwach bzw. ungebundenen unmethylierten meZREs. *In vivo* ist diese definierte Abfolge der Bindungsaffinitäten möglicherweise ausschlaggebend für eine erfolgreiche BZLF1-vermittelte Trans-aktivierung des Promotors.

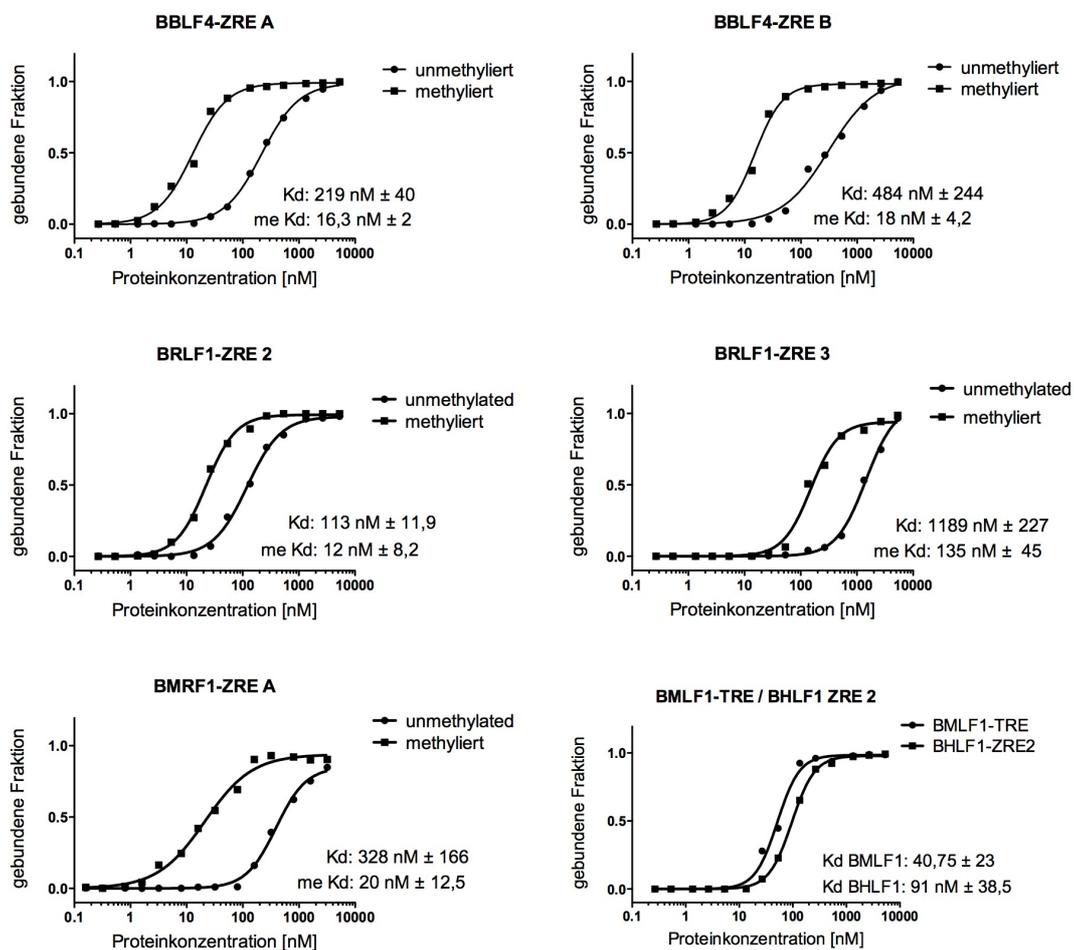


Abb. 4.32: Berechnung der BZLF1-Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten für methylierte und unmethylierte ZREs. Die in Abbildung 4.31 gezeigten Gel-Retentionsanalysen dienen als Basis für die Berechnung der K_d -Werte. Der Anteil der BZLF1-gebundenen DNA-Fraktion wurde in einer definierten Proteinkonzentrationsreihe bestimmt und gegen die molaren Proteinkonzentrationen der Verdünnungsreihe aufgetragen. In einer logarithmisch skalierten Achse konnte mithilfe einer Hill-Regressionsgerade die Bindungskonstante (K_d -Wert) ermittelt werden. Sie entspricht der Proteinkonzentration der halbmaximal gebundenen Fraktion. SF:BZLF1 zeigte eine stärkere Bindungsaffinität an methylierte meZREs (K_d 12-16 nM) als an unmethylierte meZREs (K_d >200 nM). „Klassische“ ZREs ohne ein CpG-Dinukleotid (BMLF1-TRE, BHLF1-ZRE2) zeigten eine mittlere BZLF1-Bindungsaffinität (K_d 40-160nM).

4.6.2 Funktionale Charakterisierung methylierter und unmethylierter ZREs

In einer abschließenden Analyse sollte überprüft werden, ob die verstärkte methylierungsabhängige Bindung an einzelne ZREs mit einer transkriptionellen Aktivierung korreliert. Als experimentelles Nachweisverfahren wurden erneut Luciferase-Reportergen-Studien herangezogen (Abs. 4.5.2). Die Funktionalität einzelner ZREs wurde mithilfe eines speziellen CpG-freien Luciferasevektors überprüft. Die Sequenzierdatensätze zeigten, dass in Promotoren BZLF1-regulierter Gene oftmals mehrere ZREs vorliegen, die offensichtlich für eine BZLF1-vermittelte Promotortransaktivierung erforderlich sind (Carey *et al.*, 1992; Lehman *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wurden ZRE-enthaltende Oligonukleotide als pentamere Wiederholungsmotive hinter einen *EF1a*-Minimalpromotor eingebracht, der eine TATA-Box enthält und das Luciferasegen des CpG-freien Reporterplasmids transaktiviert (Abb. 4.33). Dieses System erlaubt die gezielte Analyse einer BZLF1-vermittelten Transaktivierung einzelner ZREs, da eine gesteigerte Luciferase-Aktivität direkt auf die eingeführten, pentamerisierten ZREs zurückzuführen ist. Neben den neu identifizierten methylierungsabhängigen ZREs der Promotoren *BBLF4* (ZRE A, ZRE B), *BMRF1* (ZRE A, ZRE B), *BALF5* und *BMLF1/BSLF2* wurden zur Kontrolle drei „klassische“, d. h. methylierungsunabhängige ZREs aus den Promotoren *BHLF1* und *BMRF1* untersucht.

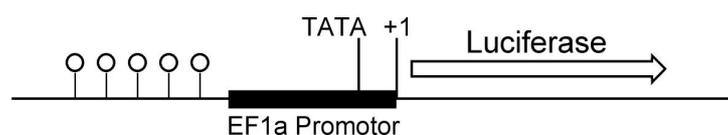


Abb. 4.33: Schematische Darstellung des CpG-freien Luciferase-Reportergen-Vektors. Zur Analyse der BZLF1-vermittelten Transaktivierung von einzelnen Bindemotiven wurden pentamerisierte ZREs in einen synthetischen Luciferase-Reportergen-Vektor eingebracht. Das Reporterkonstrukt enthält den *EF1a*-Minimalpromotor um eine Transaktivierung durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie zu gewährleisten.

Die klonierten Luciferase-Reporterplasmide wurden nach Amplifikation in *E.coli* wie beschrieben (Abs. 4.5.2) einer *in vitro de novo* CpG-Methylierung durch M.SssI unterzogen. Die Methylierung konnte nicht direkt überprüft werden, da in den pentamerisierten Oligonukleotiden keine geeigneten Schnittstellen für methylierungssensitive Restriktionsenzyme vorhanden waren. Die ZRE-Luciferase-Konstrukte wurden in zwei verschiedenen Ansätzen mit einem *BZLF1*-Expressionsplasmid (& BZLF1) oder mit einer funktionslosen Kalbsthymus-DNA als Kontrolle

kotransfiziert (ohne BZLF1). In einem dualen Reportersystem erfolgte zum Abgleich der Transfektionseffizienz eine Kotransfektion eines konstitutiv exprimierten Renillagens. Die Aktivitäten von Firefly- und Renilla-Luciferase wurden gemessen und normalisiert. Die Ergebnisse der Luciferase-Reporter-Gen-Studien sind in Abbildung 4.34 zusammenfassend dargestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind vermerkt und die ZREs mit ihren möglichen CpG-Dinukleotiden gekennzeichnet. Jeder Transfektionsansatz wurde als x-fache Luciferase-Aktivität im Vergleich zum Hintergrundsignal des methylierten bzw. unmethylierten CpG-freien *EF1a*-Minimalpromotors dargestellt. Die x-fache Zunahme in Anwesenheit von BZLF1 wurde für die methylierten und unmethylierten Datensätze berechnet.

Eine CpG-Methylierung der pentamerisierten ZREs von *BBLF4* (ZRE A und ZRE B), *BMFL1/BSLF2*, *BALF5* und *BMRF1* (ZRE A) resultierte in einer 9- bis 13-fachen Zunahme der Luciferase-Aktivität. Die in Abschnitt 4.5.2 gezeigten Reporter-Gen-Studien belegten bereits eine bevorzugte BZLF1-vermittelte Transaktivierung im gesamten Promotorkontext. Die detaillierten Analysen einzelner ZREs zeigten, dass vermutlich die in meiner Arbeit identifizierten ZREs für diese methylierungsabhängige Promotorregulation verantwortlich sind. Einige methylierte ZRE-Luciferase-Reporterkonstrukte, wie z. B. *BBLF4* ZRE A und *BALF5* erfuhren bereits eine Transaktivierung in Abwesenheit von BZLF1. Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass möglicherweise auch einige Mitglieder der zellulären AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie, wie BZLF1 auch, methylierungsabhängig an Promotoren binden und diese transaktivieren können. Eine vergleichende Transaktivierungszunahme zwischen den unmethylierten und methylierten Luciferasevektoren wurde daher nur in Anwesenheit von BZLF1 dargestellt (Pfeil). Eine Methylierung zweier Bindemotive im *BHLF1*-Promotor führte wie zu erwarten zu keiner gesteigerten Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den unmethylierten Reporterkonstrukten, da in beiden ZREs keine CpG-Dinukleotide enthalten sind. Eine Ausnahme stellte das ZRE B des *BMRF1*-Promotors dar. Dieses Oligonukleotid enthält kein CpG-Dinukleotid in seinem zentralen ZRE und sollte wie die beiden ZREs im *BHLF1*-Promotor keine gesteigerte Luciferase-Aktivität nach Einführung einer CpG-Methylierung zeigen. Dennoch konnte eine ca. 3-fache Luciferase-Aktivität im Vergleich zum unmethylierten Reporterkonstrukt detektiert werden. Allerdings befindet sich außerhalb des zentralen ZREs ein CpG-Dinukleotid, wodurch in Folge der Pentamerisierung die Oligonukleotid-übergreifende Sequenzabfolge

TTCCGAA geniert wird. Möglicherweise zeigt diese Sequenzabfolge eine schwache BZLF1-Bindeaffinität in methylierter Form und könnte für eine leichte Zunahme der Luciferase-Aktivität nach einer CpG-Methylierung verantwortlich sein.

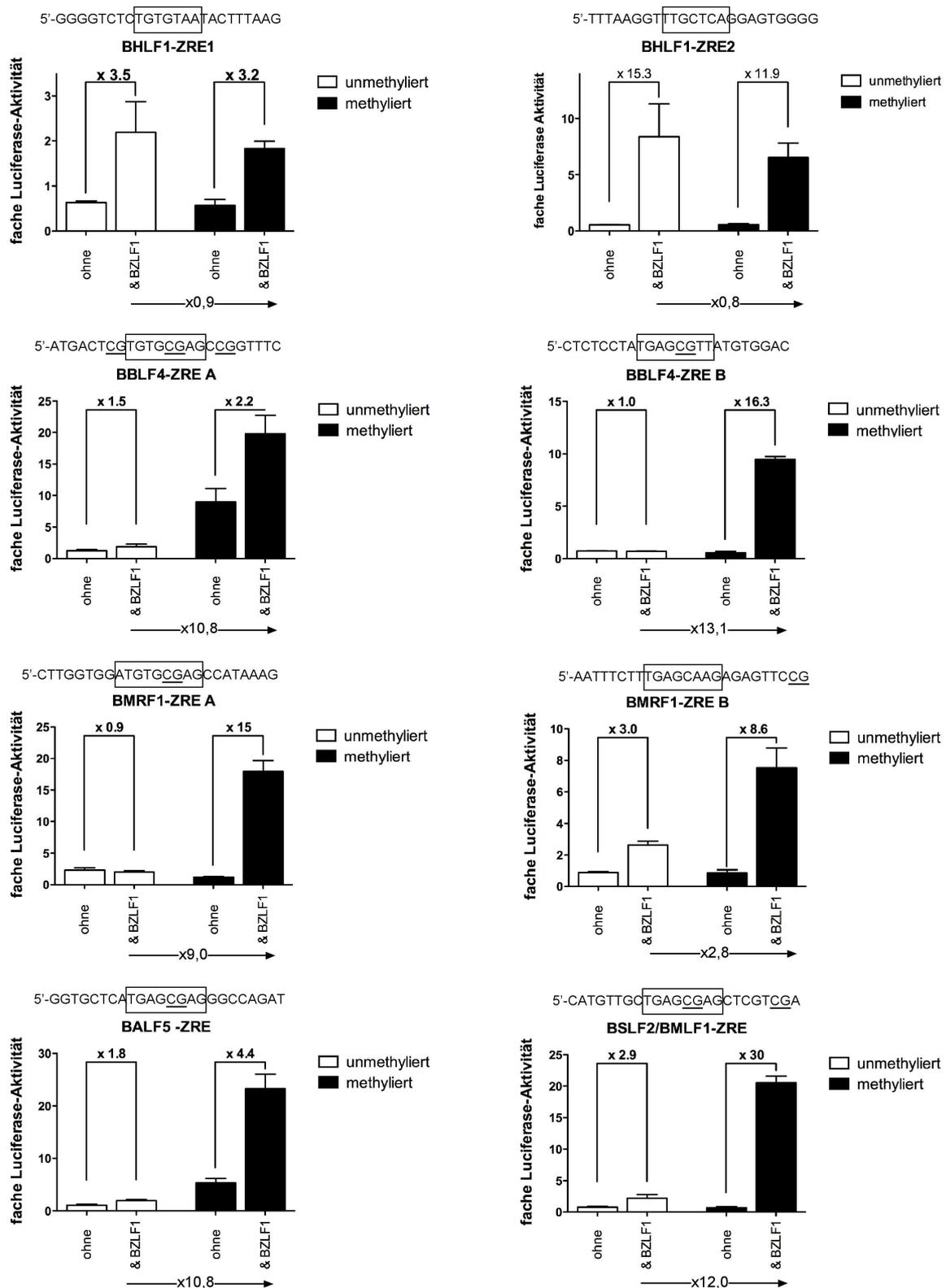


Abb. 4.34: Methylierungsabhängige Luciferase-Reportergen-Studien mit pentamerisierten ZREs. (Erklärung auf Seite 119).

Abb. 4.34: Methylierungsabhängige Luciferase-Reporterstudien mit pentamerisierten ZREs. Pentamerisierte ZREs der Promotoren *BHLF1*, *BBLF4*, *BMRF1*, *BALF5* und *BSLF2/BMLF1* wurden in einen CpG-freien Luciferase-Reporter-vektor hinter den *EF1a*-Minimalpromotor eingebracht (Abb. 4.33). Die Plasmid-DNA wurde direkt nach Extraktion aus *E.coli* verwendet (unmethyliert, weiß) oder mit der *de novo* Methyltransferase M.SssI vollständig CpG-methyliert (methyliert, schwarz). Die Luciferase-Reporter-vektoren wurden zusammen mit einem *BZLF1*-Expressionsplasmid (& *BZLF1*) oder einer unspezifischen Referenz-DNA (ohne) in HEK293-Zellen transfiziert und 48 h nach Transfektion analysiert. Zur internen Normalisierung der Daten wurde ein konstitutiv aktives Renilla-Expressionsplasmid in jedem Ansatz kotransfiziert. Dargestellt ist die vielfache Luciferase-Aktivität jedes Ansatzes bezogen auf den promotorfreien CpG-Leervektor. Die vielfachen Unterschiede der Luciferase-Aktivitäten in An- bzw. Abwesenheit von *BZLF1* sind vermerkt. Der Pfeil zeigt die vielfache Transaktivierungszunahme des unmethylierten zum methylierten Luciferase-Reportervektors in Anwesenheit von *BZLF1*. Die CpG-freien Bindemotive im *BHLF1*-Promotor wurden methylierungs-unabhängig von *BZLF1* transaktiviert. Die pentamerisierten Oligonukleotide der Promotoren *BBLF4A*, *BMLF1/BSLF2*, *BALF5* und *BMRF1* (ZRE A) zeigten eine 9- bis 13-fache Transaktivierungszunahme bei vorhandener CpG-Methylierung. Obwohl kein CpG-Dinukleotid im zentralen Bindemotiv von *BMRF1* ZRE B enthalten ist, konnte hier eine 2,8-fache Zunahme der Luciferase-Aktivität im methylierten Zustand detektiert werden.

4.6.3 Schlussfolgerungen zur biochemischen und funktionalen Charakterisierung einzelner ZREs

Unter Anwendung des Gel-Retentionsverfahrens konnten die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der methylierungsabhängigen *BZLF1*-ZRE-Interaktionen bestimmt werden. Diese Werte stellen ein Maß für die Affinität zwischen *BZLF1* und seinen Bindemotiven dar. Anhand dieser Werte konnten einzelne ZREs im methylierten oder unmethylierten Zustand ihrer CpG-Dinukleotide miteinander verglichen werden. Ebenso war ein Vergleich mit den Bindekonstanten von anderen Transkriptionsfaktoren möglich. Die homologen Vertreter der AP-1 Transkriptionsfaktorfamilie Fos-Jun und CREB weisen K_d -Werte zwischen 5 nM und 10,8 nM für ihre kanonischen Bindemotive auf (Chytil *et al.*, 1998; Williams und Andrisani, 1995), die mit denen einer *BZLF1*-Bindung an methylierten ZREs (12,7 - 20,2 nM) vergleichbar sind. Die funktionalen Analysen einzelner ZREs ausgewählter lytischer Promotoren haben gezeigt, dass die zuvor beobachtete *BZLF1*-vermittelte methylierungsabhängige Transaktivierung des ganzen Promotors auf diese einzelnen ZREs zurückzuführen ist.

5 Diskussion

EBV infiziert *in vitro* sehr effizient humane, primäre B-Lymphozyten und etabliert in diesen Zellen zunächst immer eine latente Infektion. In Folge dieser latenten Infektion kommt es zur Wachstumstransformation der B-Zellen und zur Etablierung von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs). Frühe Arbeiten konnten bereits zeigen, dass diese Zellen initial nach einer Infektion keine Nachkommenviren synthetisieren (Kalla *et al.*, 2010; Sugden, 1984). Diese Zellen sind innerhalb der ersten Wochen nach Infektion strikt latent mit EBV infiziert, jedoch werden einige Stunden nach Infektion bestimmte lytische EBV-Gene, wie z. B. das virale IL-10 (*BCRF1*), *BZLF1* sowie die beiden viralen Bcl-2 Homologe *BHRF1* und *BALF1*, exprimiert (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Kalla *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2007; Zeidler *et al.*, 1997). Die Mehrzahl der ungefähr 80 lytischen Gene wird aber kurz nach Infektion nie exprimiert. Dazu gehören Gene, die für virale Strukturproteine kodieren. Eine Virusmorphogenese findet deshalb nicht statt. Diese frühe Blockade der Expression vieler essenzieller lytischer Gene, die auch als abortiv-lytische Phase bezeichnet wird (Kalla *et al.*, 2010), ist wahrscheinlich eine unabdingbare Voraussetzung für die Etablierung der latenten EBV-Infektion. *In vivo* erzielt diese Strategie eine lebenslange Persistenz in bestimmten B-Zellkompartimenten des Wirtsorganismus, und sie macht EBV damit zu einem der erfolgreichsten humanen Viren überhaupt.

Die Etablierung der latenten Phase in infizierten B-Zellen korreliert zeitlich mit der CpG-Methylierung der viralen DNA (Kalla *et al.*, 2010). Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals experimentell zeigen, dass eine CpG-Methylierung die unabdingbare Voraussetzung für die vollständige Induktion aller lytischen Gene ist, die ab einem gewissen Methylierungsgrad zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel führt (Kalla *et al.*, 2010). Den molekularen Zusammenhang liefert das virale Schalterprotein BZLF1, das sequenzspezifisch an lytische, virale Promotoren bindet und deren Expression induziert. Als bislang einziger bekannter Transkriptionsfaktor bindet und transaktiviert BZLF1 bevorzugt oder exklusiv methylierte Promotoren (Bhende *et al.*, 2004; Dickerson *et al.*, 2009). Da die virale DNA erst im Laufe eines langsam fortschreitenden Prozesses hochgradig methyliert wird, verhindert diese besondere Eigenschaft von BZLF1 die Virussynthese der lytischen Phase, die mit dem Überleben der Zellen nicht vereinbar ist (Kalla *et al.*, 2010). Die in der frühen

lytischen Phase exprimierten viralen Genprodukte tragen zur erfolgreichen latenten Infektion direkt bei. So verhindern die Genprodukte der viralen Bcl-2 Homologe BHRF1 und BALF1 die Apoptose der infizierten B-Zellen (Altmann und Hammerschmidt, 2005), BZLF1 aktiviert ruhende B-Zellen und induziert den Eintritt in den Zellzyklus (Kalla *et al.*, 2010).

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit gingen alle Veröffentlichungen davon aus, dass eine Aktivierung der lytischen Phase auf eine alleinige methylierungsabhängige Transaktivierung des *BRLF1*-Promotors zurückzuführen ist (Bhende *et al.*, 2004; Karlsson *et al.*, 2008a; Karlsson *et al.*, 2008b). Diese Hypothese wurde durch Experimente mit einer methylierungsunabhängig gebundenen *BRLF1*-Promotor-Mutante widerlegt (siehe Abs. 1.4) (Kalla *et al.*, 2010). Zudem wurde kürzlich ein weiterer methylierungsabhängiger Promotor eines lytischen EBV-Gens identifiziert (Dickerson *et al.*, 2009). Diese Hinweise deuten darauf hin, dass es eine Reihe weiterer Bindemotive in viralen Promotoren essenzieller lytischer Gene geben muss, an die BZLF1 nur dann bindet, wenn sie in methylierter Form vorliegen. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, alle methylierungssensitiven ZREs im viralen Genom zu identifizieren, um die molekularen Grundlagen für die frühe Blockade der lytischen Genexpression aufzuklären. Die Ergebnisse meiner Arbeit bestätigten die Arbeitshypothese. Mithilfe der 'Next Generation Sequencing'-Technologie gelang erstmals eine globale und hochauflösende Kartierung der BZLF1-Bindung an virale Promotoren im EBV-Genom.

5.1 Identifizierung von BZLF1-regulierten Promotoren im EBV-Genom

Das Gelingen meiner Promotionsarbeit war im Wesentlichen von der Entwicklung und Etablierung zuverlässiger und aussagekräftiger Versuchsansätze zur spezifischen Identifizierung bisher unbekannter, methylierungssensitiver ZREs im EBV-Genom abhängig. Da sie einen bedeutenden Teil dieser Arbeit umfassen, werden die essenziellen Parameter der Versuche zunächst erörtert und anschließend die Resultate und offenen Fragen zur BZLF1-Bindung im viralen Genom diskutiert.

5.1.1 Etablierung der *in vitro* DNA-Immünpräzipitation

Die Entwicklung des Versuchsansatzes basierte auf der *in vitro* Bindung von BZLF1 an zufällig fragmentierte EBV-DNA. Die Protein-gebundene DNA wurde in einer konventionellen Immunpräzipitation mithilfe eines spezifischen Antikörpers angereichert und die immunselektierte DNA im Anschluss genomweiten Analysen unterzogen. Da die einzelnen Komponenten und Parameter, wie z. B. die Konfiguration der EBV-DNA, in dieser *in vitro* Reaktion veränderbar sind, konnte in zwei differenzierten Ansätzen die Bindung von BZLF1 an vollständig CpG-methylierte und unmethylierte EBV-DNA getrennt analysiert werden.

CpG-Methylierung der viralen DNA:

Als sogenanntes Maxi-EBV-Plasmid (p2089) mit einer Größe von 180 kbp ist die DNA von EBV „einfach“ aus *E. coli* zu extrahieren. Die isolierte EBV-DNA ist nicht CpG-methyliert, da Methyltransferasen, die einen Methylgruppentransfer auf den Cytosinrest eines CpG-Dinukleotids katalysieren, im verwendeten Bakterienstamm nicht vorhanden sind. Allerdings ist davon auszugehen, dass die plasmidale EBV-DNA durch endogene bakterielle Methyltransferasen an anderen Sequenzmotiven methyliert ist. *E. coli* Laborstämme enthaltenen in der Regel verschiedene Methyltransferasen, wie z. B. die *dcm* Methylase oder die *dam* Methylase. Letztere katalysiert den Transfer einer Methylgruppe auf die N⁶-Position des Adeninrestes in der Sequenzabfolge 5'-GATC-3'. Die *dcm* Methylase dagegen methyliert die internen Cytosine am C⁵-Atom der Sequenzabfolge 5'-CCAGG-3' oder 5'-CCTGG-3' (Geier und Modrich, 1979; Marinus und Morris, 1973). In Prokaryoten existiert eine Vielzahl weiterer DNA-Methyltransferasen. Von den bisher über 700 identifizierten Methyltransferasen, sind die meisten mit dem Restriktions-/Modifikationssystem (R/M-System) assoziiert (Dryden *et al.*, 1999; Jeltsch, 2002). Mithilfe dieses Systems ist es Bakterien möglich, sich effizient gegen die Etablierung fremder DNA, wie z. B. Phagen-DNA, zu schützen (Wilson und Murray, 1991). Die bakterielle Wirts-DNA ist durch die Aktivität einer (oder mehrerer) Methyltransferasen in Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen methyliert und wird so durch den „Angriff von Restriktionsenzymen geschützt“. Das R/M-System kann somit als bakterielles Fremd-DNA gerichtetes Immunsystem betrachtet werden.

Auch bei der Reparatur von Fehlern in der DNA (*mismatch repair*) und bei der Initiation der bakteriellen Replikation spielt z. B. die Methylierung von Adenin im

GATC-Sequenzmotiv bei Prokaryoten eine maßgebende Rolle (Adams *et al.*, 1990). Da BZLF1 als Transkriptionsfaktor sequenzspezifisch an ZREs bindet (Farrell *et al.*, 1989; Kouzarides *et al.*, 1991) und die DNA-Methylierung in Säugerzellen nahezu ausschließlich am 5'-Kohlenstoffatom von Cytosin in CpG-Dinukleotiden vorliegt, sollten DNA-Methylierungen in nicht-CpG-Sequenzmotiven die BZLF1-Bindung nicht beeinflussen. Ob eine sequenzunabhängige Methylierung *per se* eine Bedeutung für die Bindung von BZLF1 hat, ist bisher nicht bekannt. Es ist aber eher unwahrscheinlich, dass die Methylierung rekombinanter DNA in *E.coli* eine wesentliche funktionelle Konsequenz in metazoen Zellen hat. Der Einfluss einer möglichen bakteriellen DNA-Methylierung wurde daher in den Auswertungen nicht detailliert untersucht. Es wurde davon ausgegangen, dass die rekombinante EBV-DNA aus *E.coli* weitestgehend der EBV-DNA in den Kapsiden infektiöser Viruspartikel entspricht.

Mithilfe von kommerziell erhältlichen Methyltransferasen ist es möglich, jede doppelsträngige DNA *in vitro* zu modifizieren. Eine einfache Reaktion mit der Methyltransferase M.SssI (NEB) führt in Anwesenheit von S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor zur Methylierung der Base Cytosin in CpG-Dinukleotiden. Die Methylierungsreaktion ist durch die Enzymmenge und die Konzentration an SAM quantitativ steuerbar. Für die DNA-IP wurde die virale DNA vollständig methyliert (Abb.4.3), da sie ähnlich in eukaryotischen Zellen vorliegt (Kalla *et al.*, 2010; Minarovits *et al.*, 1994; Minarovits *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1996). Damit konnten zwei unterschiedliche EBV-DNA-Präparationen eingesetzt werden, die sich nur bezüglich ihres Methylierungsstatus unterschieden und den Zustand der viralen DNA in den verschiedenen Phasen der Infektion widerspiegeln. Es war mit diesem experimentellen Vorgehen möglich, differenziell solche Sequenzen zu bestimmen, an die BZLF1 im methylierten oder unmethylierten Zustand bindet.

DNA-Fragmentierung

Beide EBV-DNA-Präparationen wurden einer mechanisch-akustischen Scherung unterzogen, um eine zufällige Fragmentierung bei einer bestimmten Fragmentlänge zu erreichen. Die Länge der DNA-Fragmente spielte eine entscheidende Rolle bei der nachfolgenden Anreicherung. Grundsätzlich gilt dabei: Je kürzer die DNA-Fragmente, desto spezifischer können potenzielle Bindemotive im Vergleich zu unspezifischen Hintergrundregionen angereichert werden. Kürzere Fragmente sind

aber technisch schwerer für die Sequenzanalyse zugänglich. Für die DIPs wurden die rekombinanten EBV-DNA- Präparationen auf eine durchschnittliche Länge von ca. 100-300 bp fragmentiert, sie waren damit für nachfolgende Analysen, wie z. B. 'Microarray'-Hybridisierungen oder 'Next-Generation Sequencing', geeignet.

Antikörper für die Immunpräzipitation

Der Erfolg einer IP ist entscheidend von der Qualität des verwendeten Antikörpers abhängig. In der Arbeitsgruppe stand zu Beginn dieser Promotionsarbeit ein monoklonaler BZLF1-Antikörper (BZ1) zur Verfügung, der für Western-Blot-Analysen (Abb. 4.24) oder Immunfluoreszenzuntersuchungen (Kalla *et al.*, 2010) sehr gut geeignet ist. Initiale ChIP-Experimente mit diesem Antikörper in EBV-positiven, lytisch induzierten Zelllinien erzielten jedoch keine spezifische Anreicherung bekannter ZREs (Daten nicht gezeigt). Das Epitop des BZ1-Antikörpers liegt in der Dimerisierungsdomäne von BZLF1 (AS 214-230). In einer Publikation wurde dieser Antikörper erfolgreich in 'Supershift'-Gel-Retentionsanalysen eingesetzt (Young *et al.*, 1991). Eigene Versuche mit dem BZ1-Antikörper deuteten jedoch darauf hin, dass eine Bindung von BZ1 an die Dimerisierungsdomäne von BZLF1 mit einer DNA-Bindung interferiert (Abb. 4.2 D). Da zu diesem Zeitpunkt kein weiterer BZLF1-Antikörper zur Verfügung stand, musste dieses Problem durch die Einführung einer N-terminalen BZLF1-Proteinmarkierung behoben werden. Rothbauer und Kollegen berichteten von einem einzelkettigen hochaffinen GFP-Antikörper (GFP-'*binder*'), der für konventionelle IPs, aber auch für ChIPs geeignet ist und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde (Rothbauer *et al.*, 2008). Hierfür wurde die N-terminale Transaktivierungsdomäne (AS 1-149) von BZLF1 durch GFP ersetzt (Abb. 4.2, A). Die Transaktivierungsdomäne wird für eine spezifische BZLF1-DNA Interaktion nicht benötigt. Das chimäre Fusionsprotein ist kleiner als BZLF1 selbst und konnte stabil in EBV-positiven, latent infizierten Zellen exprimiert werden, ohne dass eine Aktivierung der lytischen Phase erfolgte. Obwohl gezeigt werden konnte, dass sowohl für eine methylierungunabhängige als auch für eine methylierungsabhängige DNA-Bindung *in vivo* diese Domäne nicht erforderlich ist (Abs. 4.3), kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass die TAD *in vivo* trotzdem für die BZLF1-Bindung eine Rolle spielt.

5.1.2 Etablierung der nativen Chromatin-Immunpräzipitation

In latent infizierten Zellen liegt die virale DNA in einer chromatinähnlichen Konfiguration vorliegt (Dyson und Farrell, 1985; Robertson *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1979). In einem zweiten experimentellen Versuchsansatz sollte deshalb untersucht werden, ob die *in vitro* identifizierten ZREs auch in latent infizierten Zellen zugänglich für BZLF1 sind. Die endogene BZLF1-Bindung wurde mithilfe einer epigenetischen Standardmethode, der ChIP-Analyse, in zwei unterschiedlichen EBV-positiven Zelllinien untersucht. In den strikt latenten Raji-Zellen ist eine Expression von *BZLF1* vollständig reprimiert, in B95.8-Zellen unterstützt nur eine kleine Zellfraktion von 5-10% spontan die lytische Phase (zur Hausen *et al.*, 1978). Um eine *BZLF1*-Expression in nahezu allen Zellen zu erzielen, wurden die beiden Zelllinien stabil mit *GFP:BZLF1* transfiziert (Abb. 4.2). Für die Wahl des GFP:BZLF1-Fusionsproteins sprachen zwei wesentliche Argumente:

1. Der GFP-Antikörper hatte sich bereits in den *in vitro* DIPs bewährt und ist für ChIP-Analysen geeignet (Rothbauer *et al.*, 2008).
2. Das Fehlen der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) erlaubt eine stabile und konstitutive Expression von GFP:BZLF1 in latent infizierten EBV-positiven B-Zellen. Die TAD-vermittelte Aktivierung der lytischen Phase (Flemington *et al.*, 1992) ist nicht mit dem Überleben dieser Zellen zu vereinbaren.

Obwohl native Chromatin-Immunpräzipitationen (nChIPs) in der Regel nur bei der Analyse von Histonproteinen zum Einsatz kommen, gelang es mir auch ohne die Einführung einer Formaldehyd-Vernetzung eine spezifische Anreicherung bekannter BZLF1-gebundener ZREs zu erzielen (Abb. 4.14). Der Vorteil der nChIPs liegt in der spezifischeren Bindung des Antikörpers an das Protein, da eine Formaldehydbehandlung das Epitop des Proteins beeinträchtigt. Ebenso werden transiente oder unspezifische Protein-DNA-Interaktionen nicht fixiert.

5.1.3 Identifizierung methylierungsabhängiger, BZLF1-regulierter Promotoren

Der Fokus meiner Promotionsarbeit lag auf der Identifizierung weiterer viraler Promotoren, die neben *BRLF1* und *BRRF1* (Bhende *et al.*, 2004; Dickerson *et al.*, 2009) methylierungsabhängig von BZLF1 gebunden werden, um global die Restriktion bzw. Regulation der lytischen Phase auf molekularer Ebene zu verstehen. In Kontrollexperimenten zur *in vitro* Bindung von BZLF1 konnte eine spezifische Bindung an bereits identifizierte ZREs bestätigt werden (Abb. 4.4). Diese selektive Anreicherung von DNA-Fragmenten mit bekannten BZLF1-Bindestellen war die Grundvoraussetzung für alle weiteren Experimente. In genomweiten 'Microarray'-Analysen der *in vitro* DIP-Experimente (Abb. 4.7) wurde eine bevorzugte methylierungsabhängige BZLF1-Bindung beobachtet. Aufgrund der geringen Auflösung des EBV-Chips war keine präzise Aussage zur Lokalisierung methylierungssensitiver Bindestellen möglich. Dieses Problem wurde mithilfe der 'Next Generation Sequencing'-Technologie gelöst und die Bindung von BZLF1 *in vitro* an methylierte und unmethylierte EBV-DNA auf Nukleotidsequenzebene miteinander verglichen. Eine Übersichtsdarstellung dieser Ergebnisse zeigte zunächst, dass BZLF1 in der Lage ist, an eine Vielzahl methylierter und unmethylierter ZREs zu binden (Abb. 4.8). Viele der identifizierten Bindemotive wurden bevorzugt, einige davon exklusiv, in methylierter Form gebunden, wie dies für zwei von drei ZREs im *BRLF1*-Promotor beschrieben ist (Bhende *et al.*, 2004). Die vollständige *in vitro* CpG-Methylierung der EBV-DNA entspricht vermutlich weitestgehend der viralen DNA-Methylierung latent infizierter Zellen (Minarovits *et al.*, 1994; Minarovits *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1996). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigen, dass die virale DNA in Raji-Zellen hochgradig methyliert ist (Schmeinck, persönl. Mitteilung). Dennoch könnten die *in vitro* identifizierten Bindestellen möglicherweise *in vivo* bedeutungslos sein, da die DNA in einer chromatinähnlichen Konfiguration vorliegt (Dyson und Farrell, 1985; Robertson *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1979). Dieser Einwand wurde von mir ebenfalls experimentell untersucht. Mithilfe der nChIPs konnte gezeigt werden, dass das *in vivo* Bindungsmuster mit dem der *in vitro* methylierten DNA an einigen lytischen Promotoren nahezu vollständig korreliert. Alle eindeutig *in vitro* und *in vivo* identifizierten BZLF1-gebundenen Promotoren regulieren Gene der frühen lytischen

Phase. Auffällig war eine methylierungsabhängige Bindung an virale Promotoren, deren Gene für Enzyme kodieren, die essenziell für den Ablauf der viralen lytischen DNA-Replikation sind (Fixman *et al.*, 1992). Besonders deutlich wurde dies am Beispiel von *BBLF4*, das für die virale DNA-Helikase kodiert. Eine BZLF1-Bindung an diesen Promotor erfolgte *in vivo* und *in vitro* ausschließlich, wenn die ZREs in methylierter Form vorlagen. Weitere methylierungsabhängige Bindeelemente konnten in den Promotoren der Gene mit bereits bekannten ZREs, wie z. B. *BMRF1*, *BMLF1/BSLF2* und *BALF2*, identifiziert werden (Abb. 4.14 und 4.15). Es ist also davon auszugehen, dass die Blockade der frühen lytischen Phase darauf zurückzuführen ist, dass die Mehrzahl der Gene der viralen DNA-Replikation ohne CpG-Methylierung nicht oder unzureichend exprimiert werden. BZLF1 bindet nicht an unmethylierte Promotoren essenzieller viraler, lytischer Replikationsgene, wodurch der Ablauf der lytischen Genexpressionskaskade vorzeitig zum Erliegen kommt.

5.1.4 Weitere Bindungseigenschaften von BZLF1

Multiple ZREs in BZLF1-regulierten Promotoren

Die Analysen der Sequenzierdaten haben gezeigt (Abb. 4.14 und 4.15), dass BZLF1-regulierte Promotoren in der Regel mehrere ZREs beinhalten. Diese Beobachtung wurde bereits in einigen Studien gemacht (Carey *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1992). Lehmann und Kollegen stellten ein hypothetisches Modell vor, indem BZLF1 durch eine Bindung an mehrere ZREs in den Promotoren lytischer Gene eine synergistische transkriptionelle Aktivierung bewirkt (Lehman *et al.*, 1998). Die Autoren postulieren, dass diese synergistische Transaktivierung u. a. von der Anzahl der ZREs und deren Bindungsaffinitäten zu BZLF1 abhängig ist. Diese einzelnen Faktoren tragen zu einem Schwellenwert bei, der nach Überschreitung zur BZLF1-vermittelten Transaktivierung des Promotors führt (Lehman *et al.*, 1998). Eine bevorzugte methylierungsabhängige BZLF1-Bindung war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Daher kann dieses Modell durch die Ergebnisse meiner Arbeit erweitert werden. Aus den Sequenzierdaten der *in vitro* Bindungsstudien und den Gel-Retentionsanalysen geht hervor (Abs. 4.2 bis 4.4), dass die Einführung methylierter CpG-Dinukleotide in manchen Promotoren, wie z. B. von *BBLF4*, eine Grundvoraussetzung für eine *de novo* Bindung von BZLF1 ist. Es findet keine Bindung an die unmethylierte „inaktive“ Sequenzabfolge statt. Die Methylierung

nimmt damit Einfluss auf die Anzahl der gebundenen ZREs im Promotor. In einigen Promotoren führt die CpG-Methylierung von ZREs zu einer gesteigerten BZLF1-Bindung (*BRLF1-ZRE2*). Die Zunahme dieser Bindeaffinität konnte in den Gel-Retentionsanalysen und durch die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (Kapitel 4.6, Tab. 4.1) experimentell nachgewiesen werden. Die CpG-Methylierung bestimmter ZREs führte zu einer ca. 10- bis 20-fachen Zunahme der BZLF1-Bindungsaffinität. Eine Methylierung kann also beide Parameter des beschriebenen Modells beeinflussen und die synergistische Transaktivierung entscheidend regulieren.

BZLF1 bindet in kodierenden Genregionen

Neben diesen grundlegenden Beobachtungen konnten weitere BZLF1-Bindestellen im viralen Genom identifiziert werden, deren funktionale Bedeutung bisher unbekannt ist. Unter anderem wurde bei einigen Genen, wie z.B. *BBLF2/3* (Abb. 4.15), eine BZLF1-Bindung in den promotornahen Regionen, aber innerhalb der kodierenden offenen Leserahmen beobachtet. Diese Eigenschaft von BZLF1 ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Da eine solche Bindung auch in Raji- und B95.8-Zellen beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um eine artifizielle Bindung an chromatinfreie DNA *in vitro* handelt. Diese Bindung war, wie die in den Promotorbereichen, bevorzugt oder strikt methylierungsabhängig. Es ist denkbar, dass BZLF1 durch eine Bindung an diese Elemente ebenso wie an den Promotor selbst, als Transaktivator fungiert oder für eine Auflockerung der Chromatinstruktur sorgt. Dadurch könnte eine Assemblierung der zellulären Transkriptionsmaschinerie am Promotor erleichtert werden. Diese Bindung von BZLF1 innerhalb kodierender Genregionen muss in der Zukunft noch weiter funktionell untersucht werden.

BZLF1-Bindung an den *BZLF1*-Promotor in Raji- und B95.8-Zellen

Eine interessante Beobachtung konnte am *BZLF1*-Promotor (Zp) gemacht werden. Die beiden bekannten Bindemotive in diesem Promotor, die zu einer positiv-rückgekoppelten Autoregulation (*'positive feedback loop'*) dieses Gens beitragen (Flemington und Speck, 1990a), sind frei von CpG-Dinukleotiden. *In vitro* wurde die BZLF1-Bindung, wie erwartet, nicht von der DNA-Methylierung beeinflusst (Abb 4.10 und 4.21). Der Vergleich der beiden Zelllinien zeigte, dass Zp in der spontan lytischen Zelllinie B95.8 für eine BZLF1-Bindung zugänglich war, in der strikt latenten Raji-Zelllinie jedoch nicht. Die sterische Zugänglichkeit des Zp in Kombination mit der

genomweiten DNA-Methylierung sind vermutlich die beiden epigenetischen Schlüsselmechanismen in latent infizierten Zellen, die zwischen Latenz und lytischer Phase entscheiden. Experimente zur vergleichenden Analyse der Chromatinstruktur von Zp in Raji- und B95.8-Zellen könnten klären, welche Parameter für diese Zugänglichkeit sorgen. Diese Analysen könnten auch aufdecken, warum Raji-Zellen im Gegensatz zu B95.8-Zellen eine strikt latente Infektion aufrecht erhalten.

BZLF1-Bindung an methylierungsunabhängige Promotoren

Eine Reihe bekannter viraler Promotoren wird ausschließlich in unmethylierter Form von BZLF1 gebunden. Zu ihnen zählen die Promotoren von *BZLF1* und der beiden divergenten Gene *BHLF1* bzw. *BHRF1*, die mit dem lytischen Replikationsursprung überlappen (Chevallier-Greco *et al.*, 1989; Flemington und Speck, 1990d; Lieberman und Berk, 1990). Das antiapoptotische virale Bcl-2 Homolog *BHRF1* wird wie *BZLF1* in den ersten Tagen einer Infektion exprimiert (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Kalla *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2007). In meiner Arbeit konnte ich im Promotor von *BCRF1*, das für das virale IL-10 Homolog kodiert, mehrere methylierungsunabhängige ZREs identifizieren. Obwohl *BCRF1* als frühes lytisches Gen klassifiziert wird (Hudson *et al.*, 1985), erfolgt eine Expression sofort nach Infektion für wenige Tage und sorgt in primären B-Zellen für eine negative Regulation des Antigentransports via TAP1 zum endoplasmatischen Retikulum (Zeidler *et al.*, 1997). Vieles deutet darauf hin, dass Gene, die ausschließlich in einer methylierungsunabhängigen Form von BZLF1 gebunden und transaktiviert werden, in der frühen Phase einer primären Infektion als *'immediate early'* Gene von BZLF1 reguliert werden. Die virale DNA liegt zu diesem Zeitpunkt, wie in den Virionen, frei von methylierten CpG-Dinukleotiden vor. Während die CpG-Methylierung der viralen DNA ein langsamer, gradueller Vorgang ist (Kalla *et al.*, 2010), dürfte die Platzierung von Histonen und die Ausbildung von Nukleosomen rasch vonstatten gehen. So wurde kürzlich berichtet, dass die Etablierung latenter Histonmodifikationen bereits fünf Tage nach einer primären KSHV-Infektion abgeschlossen ist (Gunther und Grundhoff, 2010). KSHV ist ein „naher Verwandter“ von EBV, daher könnte bei EBV dieselbe rasche Chromatinisierung bzw. Histonmodifikation die Expression früher lytischer Gene reprimieren. Diese Vermutung korreliert mit der Beobachtung, dass BZLF1 auf Proteinebene in den ersten fünf bis sieben Tagen einer Infektion exprimiert wird, das Expressionsniveau aber in der Folge wieder stark abnimmt (Kalla *et al.*, 2010). Sehr wahrscheinlich nutzt BZLF1 die ersten Tage einer Infektion,

um zelluläre Prozesse zu beeinflussen, die zum Überleben der Zelle beitragen (Altmann und Hammerschmidt, 2005), um anti-virale Immunantworten zu reprimieren (Zeidler *et al.*, 1997) oder die Etablierung einer latenten Infektion sicherzustellen (Kalla *et al.*, 2010). Ein Nukleosomen-freies und unmethyliertes EBV-Genom ist die molekulare Voraussetzung für die frühen Ereignisse nach Infektion primärer B-Zellen.

5.2 Epigenetische Bedeutung der BZLF1-Bindung an CpG-methyliertes Chromatin

In vivo können zelluläre Proteine, wie MeCP1, MeCP2 oder die Vertreter der MBD-Familie, sequenzspezifisch an methylierte CpG-Dinukleotide binden. Diese zellulären Proteine rekrutieren weitere Repressorproteinkomplexe (zusammengefasst in Li und Bird, 2007), die sehr wahrscheinlich für eine Kompaktierung und Kondensierung der episomalen EBV-DNA sorgen. Es kann zudem davon ausgegangen werden, dass die Histonbesetzung *per se* oder spezifische Histonmodifikationen eine tragende Rolle bei der Chromatinisierung der viralen DNA spielen. Day und Kollegen konnten aktivierte Histonmarker, wie z. B. H3K4me nur an Promotoren oder Genloci nachweisen, die zur Aufrechterhaltung der latenten Infektion beitragen (Day *et al.*, 2007). Die Methylierung ist also nicht als isolierter Einzelmechanismus zu betrachten, sondern gehört zu einem epigenetischen Netzwerk, das auf vielen Ebenen interagiert (Goldberg *et al.*, 2007).

Meine Ergebnisse der Bindungsstudien von BZLF1 *in vivo* haben entgegen der gängigen Lehrbuchmeinung gezeigt, dass BZLF1 trotz einer CpG-Methylierung und reprimiertem Chromatins in B95.8-Zellen und in der strikt latenten Raji-Zelllinie in der Lage ist, an eine Reihe viraler Promotoren zu binden (Abb 4.14, 4.15). Die Bindungsstudien wurden mit dem chimären Fusionsprotein GFP:BZLF1 durchgeführt, dem die N-terminale TAD fehlt. Diese Domäne dient u. a. zur Rekrutierung und Stabilisierung der zellulären Transkriptionsmaschinerie (Carey *et al.*, 1992; Lieberman und Berk, 1991). Sie interagiert aber auch mit dem zellulären Koaktivator CBP, der mit seiner intrinsischen Histonacetyltransferase für die Auflockerung der Chromatinstruktur sorgt (Adamson und Kenney, 1999; Zerby *et al.*, 1999). Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass BZLF1 an reprimierte virale DNA

unmittelbar bindet, ohne die Hilfe von weiteren Chromatin-modulierenden oder Histon-modifizierenden Faktoren. Die BZLF1-vermittelte Histonacetylierung durch CBP erfolgt daher erst nach der Bindung an die virale DNA. Welche Mechanismen neben einer DNA-Methylierung zur Reprimierung des viralen Chromatins beitragen, ist bisher nicht bekannt. Die Eigenschaft von BZLF1, reprimierte Chromatin-konfigurationen zu überwinden, erinnert an die Eigenschaften einer bivalenten Chromatin-Konfiguration, wie sie in Promotorbereichen von embryonalen Stammzellen vorliegt (Bernstein *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2006). Die Koexistenz des Reprimierungsmarkers H3K27me3 und des Aktivierungsmarkers H3K4me3 führt zu einer Reprimierung der Genexpression, die aber einer aktiv-gehaltenen Chromatinkonfiguration entspricht. Vor wenigen Wochen konnten bivalente Chromatinmodifikationen im Kaposi Sarcoma-assoziierten Herpesvirus (KSHV) identifiziert werden, das als humanes γ -Herpesvirus sehr viele Gemeinsamkeiten mit EBV hat. Es wird postuliert, dass das bivalente Chromatin in KSHV eine metastabile latente Infektion garantiert, die aber für die Aktivierung der lytischen Phase kein Hindernis darstellt (Gunther und Grundhoff, 2010). Möglicherweise liegen auch in EBV bivalente Histonmodifikationen vor, die zusammen mit der DNA-Methylierung an einem effizienten Übergang von der latenten zur lytischen Phase beteiligt sind.

5.3 BZLF1-vermittelte Transaktivierung methylierter lytischer Promotoren

Die einzigartige Eigenschaft von BZLF1, methylierte Promotoren zu binden, wurde zusätzlich auf funktionaler Ebene überprüft um sicherzustellen, dass sie auch relevant für die Regulation lytischer Gene ist. Als experimentelles Nachweisverfahren dienten Luciferase-Reportergen-Studien in transient transfizierten, epithelialen HEK293-Zellen. Die Regulation der sechs essenziellen Gene der viralen Replikationsmaschinerie (Fixman *et al.*, 1992) und der lytischen Gene *BRLF1* und *BMLF1/BSLF2* wurde zusammen mit drei methylierungsunabhängigen BZLF1-regulierten Kontrollpromotoren analysiert. Bis auf *BSLF1* (kodiert für die virale Primase) und *BBFL2/3* (kodiert für den Primase assoziierten Faktor) wurden alle Promotoren methylierungsabhängig durch BZLF1 transaktiviert (Abb 4.23). Obwohl *BSLF1* und *BBLF2/3* eine klare methylierungsabhängige Bindung gezeigt hatten

(Abb. 4.16, Anhang), wurden beide Promotoren weder methyliert noch unmethyliert durch BZLF1 transaktiviert. Im Gegensatz dazu konnte die Expression beider Gene nach einer konditionalen *BZLF1*-Induktion in latent infizierten Raji-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.26). Dieser Befund deutet darauf hin, dass trotz einer methylierungsbedingten, verstärkten BZLF1-Bindung weitere, möglicherweise B-Zell-spezifische und/oder virale Transaktivatoren benötigt werden. Für die Induktion der lytischen Phase ist neben BZLF1 auch der zweite, essenzielle Transkriptionsfaktor BRLF1 erforderlich (Feederle *et al.*, 2000). Beide Transkriptionsfaktoren agieren alleine, gemeinsam oder sogar synergistisch und sorgen für die Transaktivierung lytischer Gene. BRLF1-gebundene Elemente (RREs, BRLF1-*responsive elements*) wurden u. a. in den Promotoren von *BMLF1* oder *BHRF1* identifiziert (Buisson *et al.*, 1989; Chevallier-Greco *et al.*, 1989). Es ist also anzunehmen, dass für eine transkriptionelle Aktivierung der Promotoren von *BBLF2/3* und *BSLF1* möglicherweise beide Transkriptionsfaktoren von EBV benötigt werden. Da die Induktion von *BZLF1* in Raji-Zellen auch zur Expression von *BRLF1* führt (Abb. 4.26), können beide Transkriptionsfaktoren zusammen weitere Gene aktivieren, darunter auch *BBLF2/3* und *BSLF1*. Dennoch dürfte die methylierungsabhängige Bindung von BZLF1 erforderlich sein, um die reprimierte Chromatinstruktur zu überwinden und diese durch die Rekrutierung Histon-modifizierender Enzyme wie CBP (Adamson und Kenney, 1999; Zerby *et al.*, 1999) zugänglich für andere Transaktivatoren machen. BRLF1 könnte anschließend über eine direkte Promotorbindung oder über eine physikalische Interaktion mit dem rekrutierten CBP die Transaktivierung verstärken (Swenson *et al.*, 2001).

5.4 Die Rolle von *BZLF1* im Verlauf einer lytischen Infektion primärer B-Zellen: Ein Modell

In einem Modell habe ich alle bisher bekannten Informationen zur Regulation des biphasischen EBV-Lebenszyklus erfasst und mit den Ergebnissen meiner Arbeit ergänzt (Abb.5.1). EBV infiziert *in vitro* durch die Interaktion des zellulären Komplementrezeptors CD21 mit dem viralen Glykoprotein gp350/220 der EBV-Hülloberfläche (Nemerow *et al.*, 1987) sehr effizient humane primäre B-Zellen. Das lineare DNA-Genom der Virionen ist frei von Nukleotidmodifikationen und zellulären Chromatinkomponenten (Abb.5.1, (1)) (Dyson und Farrell, 1985; Robertson *et al.*,

1996; Shaw *et al.*, 1979). Nach einer Infektion liegen diese DNA-Moleküle als separate extrachromosomale, ringförmig-geschlossene Moleküle, sogenannte Episomen, im Zellkern vor (Abb.5.1, (2)) (Kaschka-Dierich *et al.*, 1976). In den ersten Stunden und Tagen nach einer Infektion werden einige lytische Gene, wie z. B. *BZLF1*, die beiden viralen Bcl-2 Homologe *BALF1* und *BHRF1* sowie das virale IL-10 (*BCRF1*) exprimiert (Abb.5.1, (3)) (Altmann und Hammerschmidt, 2005; Kalla *et al.*, 2010; Wen *et al.*, 2007; Zeidler *et al.*, 1997). Als antiapoptotische Genprodukte sind *BHRF1* und *BALF1* essenziell für die initiale Transformation der Zellen (Altmann und Hammerschmidt, 2005). *BZLF1* unterstützt die Proliferation ruhender B-Zellen (Kalla *et al.*, 2010) und das vIL-10 sorgt für eine Reprimierung der TAP1-vermittelten Antigenpräsentation. Obwohl eine Reihe lytischer Gene exprimiert ist, bleibt die Synthese von infektiösen Nachkommenviren in den ersten Wochen einer EBV-Infektion aus, späte virale Genprodukte, wie z. B. gp350/220, werden nicht exprimiert (Kalla *et al.*, 2010). Vielmehr leiten die exprimierten lytischen Gene die Etablierung der latenten Phase ein und stabilisieren die infizierte Zelle. Auf funktionaler Ebene ist die DNA-Methylierung in der latenten Phase eine unabdingbare Voraussetzung für die Aktivierung der lytischen, replikativen Phase (Kalla *et al.*, 2010). Der Mechanismus dieses Blocks kann anhand der Ergebnisse dieser Doktorarbeit auf molekularer Ebene erklärt werden. *BZLF1* bindet und transaktiviert als Transkriptionsfaktor bevorzugt oder ausschließlich bestimmte Promotoren viraler lytischer Gene. Dazu zählen unter anderem *BRLF1*, *BBLF4*, *BALF2*, *BALF5*, *BMLF1/BSLF2* und *BMRF1*, die neben essenziellen lytischen Genprodukten, hauptsächlich für Enzyme der viralen Replikationsmaschinerie kodieren. Die unmethylierte EBV-DNA in der frühen Phase verhindert, dass *BZLF1* diese Gene aktivieren kann (Abb. 5.1. (4)). Die Expression latenter Gene (Latenz III, Tab. 1.1) führt zur B-Zell-Transformation und *in vitro* zur Etablierung lymphoblastoider Zelllinien (Abb. 5.1, (5)), in denen das EBV-Genom langsamen, aber stetig fortschreitenden epigenetischen Modifikationen unterliegt. Nach einigen Wochen ist das virale Genom in primär infizierten B-Zellen hypermethyliert und mit zellulärem Chromatin assoziiert (Abb. 5.1, (6)) (Dyson und Farrell, 1985; Kalla *et al.*, 2010; Robertson *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 1979). Während dieser Zeit kann es auf niedrigem Niveau zu einer spontanen Virusneusynthese kommen, die eine Induktion des lytischen Zyklus voraussetzt (Kalla *et al.*, 2010). Der Mechanismus dieser spontanen Induktion ist bisher unklar, verläuft aber sehr wahrscheinlich über eine

spontane, stochastische Quervernetzung des B-Zellrezeptors, der zu einer Aktivierung zellulärer Signaltransduktionskaskaden und damit zu einer Expression von *BZLF1* führt (Abb.5.1, (7)) (Campbell, 1999). Entgegen der epigenetischen Lehrbuchmeinung kann BZLF1 an die methylierte und chromatinisierte virale DNA binden und alle essenziellen lytischen Gene aktivieren. Die lytische Phase führt zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel, die für die Infektion weiterer primärer B-Zellen sorgen, um das endogene Virusreservoir bzw. die Infektionskette in der Bevölkerung aufrecht zu erhalten.

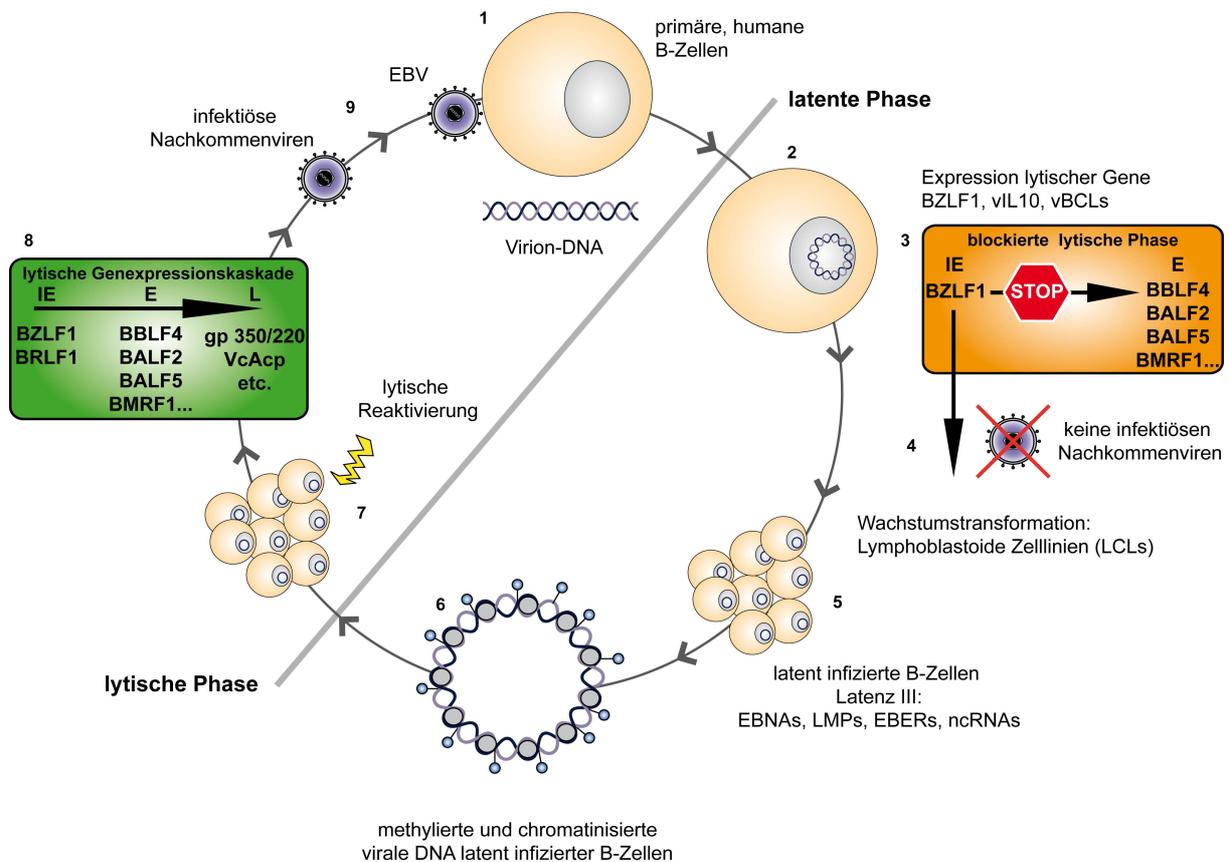


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des biphasischen Lebenszyklus einer EBV-Infektion in humanen primären B-Zellen *in vitro*. In infektiösen EBV-Partikeln ist die virale, lineare DNA nicht-modifiziert und frei von Histonen. Nach einer Infektion primärer humaner B-Lymphozyten (1) liegt das EBV-Genom als unmodifiziertes Episom im Zellkern vor (2). Trotz der Expression des lytischen Schaltergens *BZLF1* (3), das zur Klasse der 'immediate early'-Gene (IE) gehört, findet keine Virusneusynthese statt. Die Blockade der Expression lytischer Gene der 'early'-Klasse ist auf eine fehlende Methylierung der viralen DNA zurückzuführen, da die Promotoren dieser Gene nur in methylierter Form transaktiviert werden können (4). In diesen Zellen etabliert sich eine latente Infektion, eine lymphoblastoide Zelllinie (LCL) entsteht (5). Während der Wachstumstransformation wird die virale DNA langsam aber stetig methyliert (6). Etwa drei bis vier Wochen nach Infektion kann auf niedrigem Niveau eine Virusneusynthese detektiert werden. Die Induktion des lytischen Zyklus erfolgt spontan oder kann durch äußere Einflüsse initialisiert werden (z. B. durch Quervernetzung des BZR). Die Induktion von *BZLF1* führt zur Aktivierung der kaskadenartig verlaufenden viralen Genexpression (IE, E und L), die zur Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel führt um weitere B-Zellen zu infizieren (7-9).

5.5 Offene Fragen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen genomweiten Überblick über die viralen Bindestellen von BZLF1. In Raji-Zellen bindet BZLF1 nicht nur an virale DNA sondern auch an zelluläres Chromatin. Mithilfe von 'Next Generation Sequencing'-Analysen konnten auch zelluläre Zielgene von BZLF1 identifiziert werden. Die vorliegenden Daten wurden bisher nicht funktional untersucht, dienen aber als Grundlage für zukünftige Experimente um zwei wesentliche Fragen zu beantworten:

1. Welche zellulären Gene werden von BZLF1 gebunden und transkriptionell aktiviert?
2. Welche Rolle spielt eine methylierungsabhängige BZLF1-Bindung im zellulären Genom?

Analysen des zellulären Transkriptom nach konditionaler *BZLF1*-Expression in etablierten Raji-Zellen (Abs. 4.5.2) könnten in Kombination mit den 'Next Generation Sequencing' Daten zeigen, welche zellulären Gene durch BZLF1 direkt reguliert werden. Es ist aber fraglich, ob dieser Versuchsansatz in latent infizierten Raji-Zellen zum Verständnis regulierter zellulärer Gene während der frühen initialen Phase einer EBV-Infektion beitragen wird. Raji ist eine Tumorzelllinie, deren aktivierte Zellen unabhängig von BZLF1 den Zellzyklus durchlaufen. In primären EBV-infizierten B-Zellen ist es aber sehr wahrscheinlich, dass BZLF1 an der initialen Aktivierung zellulärer Gene beteiligt ist, deren Genprodukte für eine Regulation der Zellzyklusphasen verantwortlich sind (Kalla *et al.*, 2010). Analysen des zellulären Transkriptom oder BZLF1-ChIP-seq-Analysen in der frühen Phase einer EBV-Infektion könnten diese Gene identifizieren.

BZLF1 gehört zur Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren und bindet sequenzspezifisch an divergente Sequenzmotive (Farrell *et al.*, 1989; Kouzarides *et al.*, 1991). Die Eigenschaft, bevorzugt an methylierte ZREs in Promotoren zu binden und diese zu transaktivieren, ist bisher von keinem weiteren Transkriptionsfaktor bekannt. Die strukturelle Basis für diese besondere DNA-Bindung ist unklar. Obwohl Kristallstrukturanalysen von BZLF1 in der Literatur beschrieben sind, wurde das Phänomen der methylierungsabhängigen BZLF1-Bindung nur unzureichend gelöst (Petosa *et al.*, 2006). Das verwendete Oligonukleotid, mit dem die Struktur der Bindedomäne von BZLF1 in Kokristallen bestimmt wurde, enthält die Sequenz T-G-A-C/G-T-C-A des kanonischen AP-1 Bindemotivs, das in dieser Form im

Promotor von *BMLF1/BSLF2* vorliegt. Diesem Motiv fehlt das CpG-Dinukleotid. Ein weiterer Kritikpunkt dieser Studie ist die Verwendung zweier Punktmutationen S186A and C189S, die möglicherweise für die Kristallisierung des Proteins notwendig waren. Diese beiden Aminosäuren liegen inmitten der DNA-Bindedomäne von BZLF1. In einer nachträglichen Computersimulation wurden diese Aminosäuren wieder ausgetauscht und die Interaktionen modelliert. Es wird postuliert, dass CpG-Dinukleotide die hydrogene Bindung von Asn182 an die DNA aufheben. Die Einführung einer Methylgruppe resultiert in einer Stabilisierung durch Ser186 (Petosa *et al.*, 2006). Diese Strukturanalysen beantworten zwar grundlegende Fragen zur Bindung von BZLF1, sind aber meines Erachtens nicht für spezifische Aussagen zu einer methylierungsabhängigen BZLF1-DNA Bindung geeignet. Die von mir identifizierten Konsensusmotive (Abs. 4.3) könnten daher als Grundlage für eine experimentelle Bestimmung der molekularen Strukturanalyse einer BZLF1-DNA-Interaktion verwendet werden. Damit lässt sich vermutlich klären, wie BZLF1 als Homodimer an nicht-palindromische unmethylierte bzw. methylierte DNA-Sequenzmotive bindet.

Herpesviren im Allgemeinen haben in ihrer Evolution eine Vielzahl von zellulären Proteinen „übernommen“ und für ihre Zwecke optimiert bzw. angepasst. Es gibt mehrere EBV-Proteine, die eine offensichtliche Homologie zu zellulären Proteinen zeigen. Die größte Homologie zeigt BZLF1, v. a. wegen seiner DNA-Bindedomäne, zum zellulären Protoonkogen c-Fos (Farrell *et al.*, 1989). Ob das Virus bzw. BZLF1 diese Eigenschaft der methylierungsabhängigen DNA-Bindung im Verlauf einer stetigen Koevolution zwischen Wirtszelle und EBV erworben oder von seinem zellulären Homolog c-Fos übernommen hat ist bisher unklar. Aktuelle Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe favorisieren letztgenannte Hypothese, da Experimente darauf hindeuten, dass der zelluläre Transkriptionsfaktor AP-1 (c-Jun/c-Fos) auch bevorzugt an bestimmte CpG-methylierte DNA-Motive bindet. Diese Eigenschaft zellulärer Proteine wäre spektakulär, da sie einen bisher unbekanntem direkten Zugang zur Regulation von CpG-methylierten, epigenetisch reprimierten, zellulären Genen eröffnen würde.

6 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus (EBV) gilt als eines der erfolgreichsten Viren des Menschen und dient als *in vitro* Modell humaner Tumoviren und latenter Virusinfektionen. Die virale DNA liegt in latent infizierten Zellen in einer chromatinähnlichen Konfiguration vor und ist hochgradig methyliert. Die Methylierung am 5'-Kohlenstoffatom der Base Cytosin in CpG-Dinukleotiden ist in metazoen Organismen mit einer Reprimierung der Genexpression assoziiert und gilt als einer der bedeutendsten epigenetischen Regulationsmechanismen. Im Laufe einer stetigen Koevolution hat EBV diese zellulären, epigenetischen Mechanismen adaptiert und für die Kontrolle und Regulation seines biphasischen Infektionszyklus genutzt. Die virale Infektionsstrategie basiert auf der CpG-methylierungsabhängigen Aktivierung der lytischen Phase, die Voraussetzung für die Synthese infektiöser Nachkommenviren ist. Auf molekularer Ebene ist dieses paradoxe Phänomen auf die bisher einzigartige Eigenschaft des viralen Transkriptionsfaktors BZLF1 zurückzuführen, der bevorzugt oder exklusiv an CpG-methylierte Erkennungsmotive in viralen lytischen Promotoren bindet und dadurch die lytische Phase einleitet.

Es war das Ziel meiner Arbeit, möglichst alle Promotoren und cis-aktiven Elemente zu identifizieren, die von BZLF1 methylierungsabhängig (und -unabhängig) gebunden und transaktiviert werden, um die globale Bedeutung der Methylierung des viralen Genoms für die Induktion der lytischen Phase von EBV zu verstehen. In verschiedenen Nachweisverfahren konnte mithilfe der '*Next Generation Sequencing*'-Technologie erstmals eine genomweite, hochauflösende Kartierung der methylierungsabhängigen BZLF1-Bindung *in vitro* und *in vivo* vorgenommen werden. Reporter-gen-Studien ausgewählter Promotoren bestätigten die BZLF1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung dieser Gene. Die identifizierten Promotoren regulieren frühe (*'early'*) Gene der lytischen Phase von EBV, die überwiegend für Proteine der viralen DNA-Replikationsmaschinerie kodieren. Bioinformatische Sequenzanalysen dieser Promotoren konnten erstmals zwei verschiedene Klassen von Konsensusbindemotiven von BZLF1 identifizieren. Konventionelle Bindemotive (ZREs) tragen kein CpG-Dinukleotid und werden dadurch unabhängig vom Methylierungsstatus der viralen DNA gebunden. Die von mir als meZREs definierten Konsensusmotive enthalten ein zentrales CpG-Dinukleotid, an das BZLF1 nahezu ausschließlich in

CpG-methylierter Form bindet. In biochemischen und funktionellen Analysen wurden ausgewählte Konsensusmotive beider Klassen miteinander verglichen.

Zusammenfassend erklären die Ergebnisse meiner Arbeit die ungewöhnliche Infektionsstrategie von EBV auf molekularer Ebene. Als lytisches Schalterprotein findet BZLF1 Zugang zu epigenetisch reprimiertem Chromatin, ermöglicht die Induktion essenzieller lytischer Gene und initiiert die Virusneusynthese in latent EBV-infizierten B-Zellen. Diese Nachkommenviren enthalten ein unmethyliertes Genom, das in neuinfizierten B-Zellen nur eine latente Infektion erlaubt. Obwohl BZLF1 auch in frischinfizierten B-Zellen exprimiert wird, bleibt die lytische Phase aus, da die Mehrzahl der lytischen viralen Gene ohne CpG-Methylierung nicht oder nur unzureichend exprimiert wird. Das Fehlen der CpG-Methylierung blockiert die vollständige Genexpression aller viralen Gene, erlaubt damit das Überleben der infizierten Zellen und ermöglicht dem Virus die initiale Etablierung einer stabilen, latenten Infektion. Erst die langsame, aber stetige Zunahme der CpG-Methylierung des viralen Genoms schafft die Voraussetzung, der Latenz zu entkommen und Nachkommenviren zu synthetisieren. Diese ungewöhnliche Strategie ermöglicht den biphasischen Modus der viralen Infektion zwischen latenter und lytisch produktiver Infektion und macht EBV zu einem der erfolgreichsten Viren überhaupt: es persistiert ein Leben lang im infizierten Wirt und nutzt ihn für seine Weiterverbreitung in der menschlichen Bevölkerung.

7 Abkürzungsverzeichnis

α	anti (bei Antikörperbeschreibungen in Abbildungen)
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
AP-1	Aktivatorprotein 1 (engl.: <i>activator protein 1</i>)
APS	Ammonium Persulfat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor (engl.: <i>activating transcription factor</i>)
bp	Basenpaare
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	Rinder Serumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bw	rückwärts (engl.: <i>backward</i>)
BZR	B-Zellrezeptor
bZIP	Proteindomäne (engl.: <i>basic leucine zipper</i>)
c.a.	zirka
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
ChIP-seq	genomweite Sequenzierungen nach Chromatin-Immunpräzipitation
C/EBP	engl.: CCAAT/ <i>enhancer binding protein</i>
CBP	CRE bindendes Protein (engl.: <i>CRE binding protein</i>)
CMV	Cytomegalovirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CytC	Cytochrom C (Haushaltsgen)
Cys	Cystein
CRE	cAMP responsives Element (engl.: <i>cAMP responsive element</i>)
DBD	DNA-Binde-Domäne
DD	DNA-Dimerisierungs-Domäne
DIP	DNA-Immunpräzipitation
Dnmt	DNA-Methyltransferase
dsDNA	Doppelstang-DNA/doppelsträngige DNA
Egr1	Transkriptionsfaktor (engl.: <i>early growth response gene 1</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (engl.: <i>enhanced chemiluminescence</i>)
E	früh (engl.: <i>early</i>)
EBNA	EBV nukleäre Antigene (engl.: <i>EBV nuclear antigen</i>)
EBV	Epstein-Barr Virus
EBERs	EBV kodierte RNAs (EBV <i>encoded RNAs</i>)
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EMSA	engl.: <i>elektrophoretic mobility shift assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FBS	Fötales Rinderserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
fw	vorwärts (<i>forward</i>)

GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
gp	Glykoprotein
h	hour (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HAT	Histonacetyltransferase
HEK293	humane embryonale Nierenepithelzelllinie (engl.: <i>human embryonic kidney 293</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMGU	Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
HP1	Heterochromatin Protein 1
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
IE	sehr früh (engl.: <i>immediate early</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
IP	Immunpräzipitation
kbp	Kilobasenpaare
kDa	kilo Dalton
KSHV	Kaposi Sarcoma-assoziiertes Herpesvirus
L	spät (engl.: <i>late</i>)
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (engl.: <i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP	latentes Membran Protein (engl.: <i>latent membrane protein</i>)
min	Minute
MBD	engl.: <i>methyl-CpG-binding domain</i>
MeCP	engl.: <i>methyl cytosine binding proteins</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Boten RNA (engl.: messenger RNA)
nChIP	native Chromatin-Immunpräzipitation
NLS	Kernlokalisierungssignal (engl.: <i>nuclear localisation signal</i>)
NGS	'Next Generation Sequencing'
NFκB	Transkriptionsfaktor (engl.: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)
oriLyt	lytischer Replikationsursprung (engl.: <i>origin of lytic DNA replication</i>)
oriP	plasmidaler Replikationsursprung (engl.: <i>plasmid origin of DNA replication</i>)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
PV	Volumen des Pellets (engl.: <i>packed volume</i>)
RD	Regulatorische-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRE	BRLF1-gebundenes Element (engl.: <i>BRLF1-responsives element</i>)

RT	Raumtemperatur
Rta	BRLF1-Genprodukt
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SF:BZLF1	Strep II-FLAG-markiertes BZLF1
Ser	Serin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAP	Antigen Peptidtransporter (engl.: <i>Transporter associated with antigen processing</i>)
TEMED	Tetramethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
TR	terminale Wiederholungssequenzen (engl.: <i>terminal repeats</i>)
TRE	TPA-responsives Element (engl.: <i>TPA responsive element</i>)
Tris	Tris-Hydromethyl-Aminomethan
U	Einheiten (engl.: <i>units</i>)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
WHO	Welt Gesundheits Organisation (engl.: <i>world health organisation</i>)
Zp	BZLF1-Promotor
Zta	BZLF1-Genprodukt
ZRE	BZLF1-gebundenes Element (engl.: <i>BZLF1-responsive element</i>)
Vol%	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsvolumenprozent (engl.: <i>weight per volume</i>)

8 Literaturverzeichnis

- Adams, A.** (1987). "Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells." J Virol 61(5): 1743-6.
- Adams, R. L., A. Hanley und A. Rinaldi** (1990). "DNA demethylation in erythroleukaemia cells." FEBS Lett 269(1): 29-31.
- Adamson, A. L. und S. Kenney** (1999). "The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein." J Virol 73(8): 6551-8.
- Allday, M. J. und D. H. Crawford** (1988). "Role of epithelium in EBV persistence and pathogenesis of B-cell tumours." Lancet 1(8590): 855-7.
- Allfrey, V. G., R. Faulkner und A. E. Mirsky** (1964). "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A 51: 786-94.
- Altmann, M. und W. Hammerschmidt** (2005). "Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis." PLoS Biol 3(12): e404.
- Amon, W., U. K. Binne, H. Bryant, P. J. Jenkins, C. E. Karstegl und P. J. Farrell** (2004). "Lytic cycle gene regulation of Epstein-Barr virus." J Virol 78(24): 13460-9.
- Anagnostopoulos, I., M. Hummel, C. Kreschel und H. Stein** (1995). "Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus." Blood 85(3): 744-50.
- Arents, G., R. W. Burlingame, B. C. Wang, W. E. Love und E. N. Moudrianakis** (1991). "The nucleosomal core histone octamer at 3.1 A resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix." Proc Natl Acad Sci U S A 88(22): 10148-52.
- Babcock, G. J., L. L. Decker, M. Volk und D. A. Thorley-Lawson** (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." Immunity 9(3): 395-404.
- Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin und et al.** (1984). "DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome." Nature 310(5974): 207-11.
- Bailey, T. L., M. Boden, F. A. Buske, M. Frith, C. E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W. W. Li und W. S. Noble** (2009). "MEME SUITE: tools for motif discovery and searching." Nucleic Acids Res 37(Web Server issue): W202-8.
- Baumann, M., R. Feederle, E. Kremmer und W. Hammerschmidt** (1999). "Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, oriLyt." EMBO J 18(21): 6095-105.
- Bell, A. C., A. G. West und G. Felsenfeld** (1999). "The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators." Cell 98(3): 387-96.
- Bernstein, B. E., A. Meissner und E. S. Lander** (2007). "The mammalian epigenome." Cell 128(4): 669-81.
- Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber und E. S. Lander** (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." Cell 125(2): 315-26.

- Bhende, P. M., S. J. Dickerson, X. Sun, W. H. Feng und S. C. Kenney** (2007). "X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D." J Virol 81(14): 7363-70.
- Bhende, P. M., W. T. Seaman, H. J. Delecluse und S. C. Kenney** (2004). "The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome." Nat Genet 36(10): 1099-104.
- Bhende, P. M., W. T. Seaman, H. J. Delecluse und S. C. Kenney** (2005). "BZLF1 activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186." J Virol 79(12): 7338-48.
- Biggin, M., M. Bodescot, M. Perricaudet und P. Farrell** (1987). "Epstein-Barr virus gene expression in P3HR1-superinfected Raji cells." J Virol 61(10): 3120-32.
- Binne, U. K., W. Amon und P. J. Farrell** (2002). "Promoter sequences required for reactivation of Epstein-Barr virus from latency." J Virol 76(20): 10282-9.
- Bornkamm, G. W., C. Berens, C. Kuklik-Roos, J. M. Bechet, G. Laux, J. Bachi, M. Korndoerfer, M. Schlee, M. Holzel, A. Malamoussi, R. D. Chapman, F. Nimmerjahn, J. Mautner, W. Hillen, H. Bujard und J. Feuillard** (2005). "Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system." Nucleic Acids Res 33(16): e137.
- Borza, C. M. und L. M. Hutt-Fletcher** (2002). "Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus." Nat Med 8(6): 594-9.
- 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: 248-54.
- Bramhall, S., N. Noack, M. Wu und J. R. Loewenberg** (1969). "A simple colorimetric method for determination of protein." Anal Biochem 31(1): 146-8.
- Buisson, M., E. Manet, M. C. Trescol-Biemont, H. Gruffat, B. Durand und A. Sergeant** (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R." J Virol 63(12): 5276-84.
- Burkitt, D.** (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." Br J Surg 46(197): 218-23.
- Burkitt, D.** (1962). "A children's cancer dependent on climatic factors." Nature 194: 232-4.
- Callan, M. F., N. Steven, P. Krausa, J. D. Wilson, P. A. Moss, G. M. Gillespie, J. I. Bell, A. B. Rickinson und A. J. McMichael** (1996). "Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis." Nat Med 2(8): 906-11.
- Campbell, K. S.** (1999). "Signal transduction from the B cell antigen-receptor." Curr Opin Immunol 11(3): 256-64.
- Carey, M., J. Kolman, D. A. Katz, L. Gradoville, L. Barberis und G. Miller** (1992). "Transcriptional synergy by the Epstein-Barr virus transactivator ZEBRA." J Virol 66(8): 4803-13.
- Cayrol, C. und E. K. Flemington** (1995). "Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1." J Virol 69(7): 4206-12.
- Cayrol, C. und E. K. Flemington** (1996). "The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors." EMBO J 15(11): 2748-59.

- Chang, P. J., Y. S. Chang und S. T. Liu** (1998). "Role of Rta in the translation of bicistronic BZLF1 of Epstein-Barr virus." J Virol 72(6): 5128-36.
- Chang, Y., H. H. Lee, Y. T. Chen, J. Lu, S. Y. Wu, C. W. Chen, K. Takada und C. H. Tsai** (2006). "Induction of the early growth response 1 gene by Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta." J Virol 80(15): 7748-55.
- Chang, Y. N., S. Crawford, J. Stall, D. R. Rawlins, K. T. Jeang und G. S. Hayward** (1990a). "The palindromic series I repeats in the simian cytomegalovirus major immediate-early promoter behave as both strong basal enhancers and cyclic AMP response elements." J Virol 64(1): 264-77.
- Chang, Y. N., D. L. Dong, G. S. Hayward und S. D. Hayward** (1990b). "The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif." J Virol 64(7): 3358-69.
- Chavrier, P., H. Gruffat, A. Chevallier-Greco, M. Buisson und A. Sergeant** (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter DR contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities." J Virol 63(2): 607-14.
- Chevallier-Greco, A., H. Gruffat, E. Manet, A. Calender und A. Sergeant** (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R." J Virol 63(2): 615-23.
- Chi, T. und M. Carey** (1993). "The ZEBRA activation domain: modular organization and mechanism of action." Mol Cell Biol 13(11): 7045-55.
- Chi, T. und M. Carey** (1996). "Assembly of the isomerized TFIIA--TFIID--TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation." Genes Dev 10(20): 2540-50.
- Chytil, M., B. R. Peterson, D. A. Erlanson und G. L. Verdine** (1998). "The orientation of the AP-1 heterodimer on DNA strongly affects transcriptional potency." Proc Natl Acad Sci U S A 95(24): 14076-81.
- Cordaux, R. und M. A. Batzer** (2009). "The impact of retrotransposons on human genome evolution." Nat Rev Genet 10(10): 691-703.
- Countryman, J., H. Jenson, R. Seibl, H. Wolf und G. Miller** (1987). "Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency." J Virol 61(12): 3672-9.
- Countryman, J. und G. Miller** (1985). "Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A 82(12): 4085-9.
- Daibata, M., S. H. Speck, C. Mulder und T. Sairenji** (1994). "Regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus by second messengers in anti-immunoglobulin-treated B cells." Virology 198(2): 446-54.
- Dambaugh, T., K. Hennessy, L. Chamnankit und E. Kieff** (1984). "U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2." Proc Natl Acad Sci U S A 81(23): 7632-6.
- Davie, J. R.** (2003). "Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate." J Nutr 133(7 Suppl): 2485S-2493S.

- Day, L., C. M. Chau, M. Nebozhyn, A. J. Rennekamp, M. Showe und P. M. Lieberman** (2007). "Chromatin profiling of Epstein-Barr virus latency control region." *J Virol* 81(12): 6389-401.
- Decaussin, G., V. Leclerc und T. Ooka** (1995). "The lytic cycle of Epstein-Barr virus in the nonproducer Raji line can be rescued by the expression of a 135-kilodalton protein encoded by the BALF2 open reading frame." *J Virol* 69(11): 7309-14.
- Delecluse, H. J., S. Bartnizke, W. Hammerschmidt, J. Bullerdiek und G. W. Bornkamm** (1993). "Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines." *J Virol* 67(3): 1292-9.
- Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler und W. Hammerschmidt** (1998). "Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8245-50.
- Dickerson, S. J., Y. Xing, A. R. Robinson, W. T. Seaman, H. Gruffat und S. C. Kenney** (2009). "Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters." *PLoS Pathog* 5(3): e1000356.
- Diehl, V., G. Henle, W. Henle und G. Kohn** (1968). "Demonstration of a herpes group virus in cultures of peripheral leukocytes from patients with infectious mononucleosis." *J Virol* 2(7): 663-9.
- Dong, A., J. A. Yoder, X. Zhang, L. Zhou, T. H. Bestor und X. Cheng** (2001). "Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA." *Nucleic Acids Res* 29(2): 439-48.
- Dryden, D. T., G. D. Davies, I. Martin, L. M. Powell, N. E. Murray, D. J. Ellis, T. Berge, J. M. Edwardson und R. M. Henderson** (1999). "The assembly of the EcoKI type I DNA restriction/modification enzyme and its interaction with DNA." *Biochem Soc Trans* 27(4): 691-6.
- Dyson, P. J. und P. J. Farrell** (1985). "Chromatin structure of Epstein-Barr virus." *J Gen Virol* 66 (Pt 9): 1931-40.
- Ehlin-Henriksson, B., J. Gordon und G. Klein** (2003). "B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression." *Immunology* 108(4): 427-30.
- Epstein, M. A., B. G. Achong und Y. M. Barr** (1964b). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." *Lancet* 1(7335): 702-3.
- Epstein, M. A. und Y. M. Barr** (1964a). "Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma." *Lancet* 1(7327): 252-3.
- Farina, A., R. Feederle, S. Raffa, R. Gonnella, R. Santarelli, L. Frati, A. Angeloni, M. R. Torrisi, A. Faggioni und H. J. Delecluse** (2005). "BFRF1 of Epstein-Barr virus is essential for efficient primary viral envelopment and egress." *J Virol* 79(6): 3703-12.
- Farrell, P. J., D. T. Rowe, C. M. Rooney und T. Kouzarides** (1989). "Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos." *EMBO J* 8(1): 127-32.
- Faulkner, G. C., A. S. Krajewski und D. H. Crawford** (2000). "The ins and outs of EBV infection." *Trends Microbiol* 8(4): 185-9.
- Feederle, R., M. Kost, M. Baumann, A. Janz, E. Drouet, W. Hammerschmidt und H. J. Delecluse** (2000). "The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators." *EMBO J* 19(12): 3080-9.

- Feederle, R., B. Neuhierl, H. Bannert, K. Geletneky, C. Shannon-Lowe und H. J. Delecluse** (2007). "Epstein-Barr virus B95.8 produced in 293 cells shows marked tropism for differentiated primary epithelial cells and reveals interindividual variation in susceptibility to viral infection." *Int J Cancer* 121(3): 588-94.
- Fixman, E. D., G. S. Hayward und S. D. Hayward** (1992). "trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt." *J Virol* 66(8): 5030-9.
- Fixman, E. D., G. S. Hayward und S. D. Hayward** (1995). "Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays." *J Virol* 69(5): 2998-3006.
- Flamand, L. und J. Menezes** (1996). "Cyclic AMP-responsive element-dependent activation of Epstein-Barr virus zebra promoter by human herpesvirus 6." *J Virol* 70(3): 1784-91.
- Flemington, E. und S. H. Speck** (1990a). "Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1." *J Virol* 64(3): 1227-32.
- Flemington, E. und S. H. Speck** (1990b). "Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos." *J Virol* 64(9): 4549-52.
- Flemington, E. und S. H. Speck** (1990c). "Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(23): 9459-63.
- Flemington, E. und S. H. Speck** (1990d). "Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1." *J Virol* 64(3): 1217-26
- Flemington, E. K.** (2001). "Herpesvirus lytic replication and the cell cycle: arresting new developments." *J Virol* 75(10): 4475-81.
- Flemington, E. K., A. M. Borrás, J. P. Lytle und S. H. Speck** (1992). "Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain." *J Virol* 66(2): 922-9.
- Fried, M. und D. M. Crothers** (1981). "Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis." *Nucleic Acids Res* 9(23): 6505-25.
- Furnari, F. B., V. Zacny, E. B. Quinlivan, S. Kenney und J. S. Pagano** (1994). "RAZ, an Epstein-Barr virus transdominant repressor that modulates the viral reactivation mechanism." *J Virol* 68(3): 1827-36.
- Gama-Sosa, M. A., R. M. Midgett, V. A. Slagel, S. Githens, K. C. Kuo, C. W. Gehrke und M. Ehrlich** (1983). "Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals." *Biochim Biophys Acta* 740(2): 212-9.
- Gao, Z., A. Krithivas, J. E. Finan, O. J. Semmes, S. Zhou, Y. Wang und S. D. Hayward** (1998). "The Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins." *J Virol* 72(11): 8559-67.
- Geier, G. E. und P. Modrich** (1979). "Recognition sequence of the dam methylase of Escherichia coli K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease." *J Biol Chem* 254(4): 1408-13.
- Gerber, P., S. Lucas, M. Nonoyama, E. Perlin und L. I. Goldstein** (1972). "Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis." *Lancet* 2(7785): 988-9.
- Gloeckner, C. J., K. Boldt, A. Schumacher, R. Roepman und M. Ueffing** (2007). "A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes." *Proteomics* 7(23): 4228-34.

- Goldberg, A. D., C. D. Allis und E. Bernstein** (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." Cell 128(4): 635-8.
- Golden, H. D., R. S. Chang, W. Prescott, E. Simpson und T. Y. Cooper** (1973). "Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals." J Infect Dis 127(4): 471-3.
- Goll, M. G., F. Kirpekar, K. A. Maggert, J. A. Yoder, C. L. Hsieh, X. Zhang, K. G. Golic, S. E. Jacobsen und T. H. Bestor** (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." Science 311(5759): 395-8.
- Goto, T. und M. Monk** (1998). "Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans." Microbiol Mol Biol Rev 62(2): 362-78.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell und R. Nairn** (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol 36(1): 59-74.
- Granato, M., A. Farina, R. Gonnella, R. Santarelli, L. Frati, A. Faggioni und A. Angeloni** (2006). "Regulation of the expression of the Epstein-Barr virus early gene BFRF1." Virology 347(1): 109-16.
- Greenspan, J. S., D. Greenspan, E. T. Lennette, D. I. Abrams, M. A. Conant, V. Petersen und U. K. Freese** (1985). "Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion." N Engl J Med 313(25): 1564-71.
- Gross, L** (2005). "Virus Proteins Prevent Cell Suicide Long Enough to Establish Latent Infection." PLoS Biol 3(12): e430 (doi:10.1371/journal.pbio.0030430).
- Gunther, T. und A. Grundhoff** (2010). "The epigenetic landscape of latent Kaposi sarcoma-associated herpesvirus genomes." PLoS Pathog 6(6): e1000935.
- Guo, Q., L. Qian, L. Guo, M. Shi, C. Chen, X. Lv, M. Yu, M. Hu, G. Jiang und N. Guo** (2010). "Transactivators Zta and Rta of Epstein-Barr virus promote G0/G1 to S transition in Raji cells: a novel relationship between lytic virus and cell cycle." Mol Immunol 47(9): 1783-92.
- Gutsch, D. E., E. A. Holley-Guthrie, Q. Zhang, B. Stein, M. A. Blonar, A. S. Baldwin und S. C. Kenney** (1994). "The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B." Mol Cell Biol 14(3): 1939-48.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, ed (Oxford).
- Hammerschmidt, W. und B. Sugden** (1988). "Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus." Cell 55(3): 427-33.
- Hammerschmidt, W. und B. Sugden** (1989). "Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes." Nature 340(6232): 393-7.
- Harabuchi, Y., N. Yamanaka, A. Kataura, S. Imai, T. Kinoshita, F. Mizuno und T. Osato** (1990). "Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal midline granuloma." Lancet 335(8682): 128-30.
- Harlow, E. und Lane, D.** (1988). Antibodies: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Heather, J., K. Flower, S. Isaac und A. J. Sinclair** (2009). "The Epstein-Barr virus lytic cycle activator Zta interacts with methylated ZRE in the promoter of host target gene *egr1*." J Gen Virol 90(Pt 6): 1450-4.
- Henle, G. und W. Henle** (1966). "Studies on cell lines derived from Burkitt's lymphoma." Trans N Y Acad Sci 29(1): 71-9.

- Henle, G., W. Henle und V. Diehl** (1968). "Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis." Proc Natl Acad Sci U S A 59(1): 94-101.
- Hicks, M. R., S. S. Al-Mehairi und A. J. Sinclair** (2003). "The zipper region of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta is necessary but not sufficient to direct DNA binding." J Virol 77(14): 8173-7.
- Hicks, M. R., S. Balesaria, C. Medina-Palazon, M. J. Pandya, D. N. Woolfson und A. J. Sinclair** (2001). "Biophysical analysis of natural variants of the multimerization region of Epstein-Barr virus lytic-switch protein BZLF1." J Virol 75(11): 5381-4.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger und R. Watson** (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) 11(9): 1026-30.
- Hoelzer, K., L. A. Shackelton und C. R. Parrish** (2008). "Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals." Nucleic Acids Res 36(9): 2825-37.
- Holley-Guthrie, E. A., E. B. Quinlivan, E. C. Mar und S. Kenney** (1990). "The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner." J Virol 64(8): 3753-9.
- Horst, D., D. van Leeuwen, N. P. Croft, M. A. Garstka, A. D. Hislop, E. Kremmer, A. B. Rickinson, E. J. Wiertz und M. E. Rensing** (2009). "Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted antigen presentation." J Immunol 182(4): 2313-24.
- Hsu, M., S. Y. Wu, S. S. Chang, I. J. Su, C. H. Tsai, S. J. Lai, A. L. Shiau, K. Takada und Y. Chang** (2008). "Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells." J Virol 82(7): 3679-88.
- Huang, J., G. Liao, H. Chen, F. Y. Wu, L. Hutt-Fletcher, G. S. Hayward und S. D. Hayward** (2006). "Contribution of C/EBP proteins to Epstein-Barr virus lytic gene expression and replication in epithelial cells." J Virol 80(3): 1098-109.
- Hudson, G. S., A. T. Bankier, S. C. Satchwell und B. G. Barrell** (1985). "The short unique region of the B95-8 Epstein-Barr virus genome." Virology 147(1): 81-98.
- Hung, C. H. und S. T. Liu** (1999). "Characterization of the Epstein-Barr virus BALF2 promoter." J Gen Virol 80 (Pt 10): 2747-50.
- Jeltsch, A.** (2002). "Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases." ChemBiochem 3(4): 274-93.
- Jenkins, P. J., U. K. Binne und P. J. Farrell** (2000). "Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency." J Virol 74(2): 710-20.
- Jothi, R., S. Cuddapah, A. Barski, K. Cui und K. Zhao** (2008). "Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data." Nucleic Acids Res 36(16): 5221-31.
- Kalla, M.** (2008). "Epigenetik von Epstein-Barr Virus: Regulation viraler Gene in der frühen Phase der Infektion." Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie
- Kalla, M., A. Schmeinck, M. Bergbauer, D. Pich und W. Hammerschmidt** (2010). "AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome." Proc Natl Acad Sci U S A 107(2): 850-5.
- Karajannis, M. A., M. Hummel, I. Anagnostopoulos und H. Stein** (1997). "Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals." Blood 89(8): 2856-62.

- Karlsson, Q. H., C. Schelcher, E. Verrall, C. Petosa und A. J. Sinclair** (2008a). "Methylated DNA recognition during the reversal of epigenetic silencing is regulated by cysteine and serine residues in the Epstein-Barr virus lytic switch protein." *PLoS Pathog* 4(3): e1000005.
- Karlsson, Q. H., C. Schelcher, E. Verrall, C. Petosa und A. J. Sinclair** (2008b). "The reversal of epigenetic silencing of the EBV genome is regulated by viral bZIP protein." *Biochem Soc Trans* 36(Pt 4): 637-9.
- Kaschka-Dierich, C., A. Adams, T. Lindahl, G. W. Bornkamm, G. Bjursell, G. Klein, B. C. Giovanella und S. Singh** (1976). "Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumour cells in vivo." *Nature* 260(5549): 302-6.
- Katsumura, K. R., S. Maruo, Y. Wu, T. Kanda und K. Takada** (2009). "Quantitative evaluation of the role of Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 in B-cell transformation." *J Gen Virol* 90(Pt 10): 2331-41.
- Kennedy, G., J. Komano und B. Sugden** (2003). "Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24): 14269-74.
- Kenney, S. C., E. Holley-Guthrie, E. B. Quinlivan, D. Gutsch, Q. Zhang, T. Bender, J. F. Giot und A. Sergeant** (1992). "The cellular oncogene c-myc can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells." *Mol Cell Biol* 12(1): 136-46.
- Kieff, E. and Rickinson, A.** (2007) Epstein-Barr virus and its replication. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott - Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2603-2654.
- Kirchmaier, A. L. und B. Sugden** (1995). "Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus." *J Virol* 69(2): 1280-3.
- Klug, M. und M. Rehli** (2006). "Functional analysis of promoter CpG methylation using a CpG-free luciferase reporter vector." *Epigenetics* 1(3): 127-30.
- Kouzarides, T., G. Packham, A. Cook und P. J. Farrell** (1991). "The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper." *Oncogene* 6(2): 195-204.
- Kraus, R. J., J. G. Perrigoue und J. E. Mertz** (2003). "ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus." *J Virol* 77(1): 199-207.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.
- Laichalk, L. L., D. Hochberg, G. J. Babcock, R. B. Freeman und D. A. Thorley-Lawson** (2002). "The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection." *Immunity* 16(5): 745-54.
- Laichalk, L. L. und D. A. Thorley-Lawson** (2005). "Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo." *J Virol* 79(2): 1296-307.
- Laird, P. W.** (2005). "Cancer epigenetics." *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R65-76.
- Lau, R., G. Packham und P. J. Farrell** (1992). "Differential splicing of Epstein-Barr virus immediate-early RNA." *J Virol* 66(10): 6233-6.
- Le Roux, F., A. Sergeant und L. Corbo** (1996). "Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome." *J Gen Virol* 77 (Pt 3): 501-9.

- Lee, M. und K. Struhl** (1995). "Mutations on the DNA-binding surface of TATA-binding protein can specifically impair the response to acidic activators in vivo." Mol Cell Biol 15(10): 5461-9.
- Lee, W., P. Mitchell und R. Tjian** (1987). "Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements." Cell 49(6): 741-52.
- Lehman, A. M., K. B. Ellwood, B. E. Middleton und M. Carey** (1998). "Compensatory energetic relationships between upstream activators and the RNA polymerase II general transcription machinery." J Biol Chem 273(2): 932-9.
- Li, D., L. Qian, C. Chen, M. Shi, M. Yu, M. Hu, L. Song, B. Shen und N. Guo** (2009). "Down-regulation of MHC class II expression through inhibition of CIITA transcription by lytic transactivator Zta during Epstein-Barr virus reactivation." J Immunol 182(4): 1799-809.
- Li, E. und Bird, A.** (2007) DNA Methylation in Mammals. In Allis C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D. Caparros M-L. (eds.), Epigenetics. Cold Spring Harbor Press, New York, pp. 341-356
- Li, E., T. H. Bestor und R. Jaenisch** (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell 69(6): 915-26.
- Li, H., J. Ruan und R. Durbin** (2008). "Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores." Genome Res 18(11): 1851-8.
- Lieberman, P. M. und A. J. Berk** (1990). "In vitro transcriptional activation, dimerization, and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein." J Virol 64(6): 2560-8.
- Lieberman, P. M. und A. J. Berk** (1991). "The Zta trans-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction." Genes Dev 5(12B): 2441-54.
- Lieberman, P. M., J. M. Hardwick, J. Sample, G. S. Hayward und S. D. Hayward** (1990). "The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions." J Virol 64(3): 1143-55.
- Liebowitz, D.** (1994). "Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein-Barr virus association." Semin Oncol 21(3): 376-81.
- Lin, Y. S. und M. R. Green** (1988). "Interaction of a common cellular transcription factor, ATF, with regulatory elements in both E1a- and cyclic AMP-inducible promoters." Proc Natl Acad Sci U S A 85(10): 3396-400.
- Lindahl, T., A. Adams, G. Bjursell, G. W. Bornkamm, C. Kaschka-Dierich und U. Jehn** (1976). "Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line." J Mol Biol 102(3): 511-30.
- Lister, R., M. Pelizzola, R. H. Downen, R. D. Hawkins, G. Hon, J. Tonti-Filippini, J. R. Nery, L. Lee, Z. Ye, Q. M. Ngo, L. Edsall, J. Antosiewicz-Bourget, R. Stewart, V. Ruotti, A. H. Millar, J. A. Thomson, B. Ren und J. R. Ecker** (2009). "Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences." Nature 462(7271): 315-22.
- Liu, P., S. Liu und S. H. Speck** (1998). "Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter." J Virol 72(10): 8230-9.
- Liu, Q. und W. C. Summers** (1992). "Identification of the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive enhancer of the MS gene of the Epstein-Barr virus." J Biol Chem 267(17): 12049-54.

- Liu, S., A. M. Borrás, P. Liu, G. Suske und S. H. Speck** (1997a). "Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the Z1 domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter." *Virology* 228(1): 11-8.
- Liu, S., P. Liu, A. Borrás, T. Chatila und S. H. Speck** (1997b). "Cyclosporin A-sensitive induction of the Epstein-Barr virus lytic switch is mediated via a novel pathway involving a MEF2 family member." *EMBO J* 16(1): 143-53.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent und T. J. Richmond** (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-60.
- Mahot, S., A. Sergeant, E. Drouet und H. Gruffat** (2003). "A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene." *J Gen Virol* 84(Pt 4): 965-74.
- Maini, M. K., N. Gudgeon, L. R. Wedderburn, A. B. Rickinson und P. C. Beverley** (2000). "Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype." *J Immunol* 165(10): 5729-37.
- Manet, E., H. Gruffat, M. C. Trescol-Biemont, N. Moreno, P. Chambard, J. F. Giot und A. Sergeant** (1989). "Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators." *EMBO J* 8(6): 1819-26.
- Marinus, M. G. und N. R. Morris** (1973). "Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of Escherichia coli K-12." *J Bacteriol* 114(3): 1143-50.
- Masucci, M. G. und I. Ernberg** (1994). "Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system." *Trends Microbiol* 2(4): 125-30.
- Mauser, A., E. Holley-Guthrie, A. Zanation, W. Yarborough, W. Kaufmann, A. Klingelutz, W. T. Seaman und S. Kenney** (2002). "The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces expression of E2F-1 and other proteins involved in cell cycle progression in primary keratinocytes and gastric carcinoma cells." *J Virol* 76(24): 12543-52.
- McDonald, C. M., C. Petosa und P. J. Farrell** (2009). "Interaction of Epstein-Barr virus BZLF1 C-terminal tail structure and core zipper is required for DNA replication but not for promoter transactivation." *J Virol* 83(7): 3397-401.
- Miller, C. L., A. L. Burkhardt, J. H. Lee, B. Stealey, R. Longnecker, J. B. Bolen und E. Kieff** (1995). "Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases." *Immunity* 2(2): 155-66.
- Miller, G., A. El-Guindy, J. Countryman, J. Ye und L. Gradoville** (2007). "Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses." *Adv Cancer Res* 97: 81-109.
- Miller, G., H. Himmelfarb, L. Heston, J. Countryman, L. Gradoville, R. Baumann, T. Chi und M. Carey** (1993). "Comparing regions of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein which function as transcriptional activating sequences in Saccharomyces cerevisiae and in B cells." *J Virol* 67(12): 7472-81.
- Miller, G., T. Shope, H. Lisco, D. Stitt und M. Lipman** (1972). "Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 69(2): 383-7.
- Minarovits, J., L. F. Hu, S. Minarovits-Kormuta, G. Klein und I. Ernberg** (1994). "Sequence-specific methylation inhibits the activity of the Epstein-Barr virus LMP 1 and BCR2 enhancer-promoter regions." *Virology* 200(2): 661-7.

- Minarovits, J., S. Minarovits-Kormuta, B. Ehlin-Henriksson, K. Falk, G. Klein und I. Ernberg** (1991). "Host cell phenotype-dependent methylation patterns of Epstein-Barr virus DNA." J Gen Virol 72 (Pt 7): 1591-9.
- Miyashita, E. M., B. Yang, K. M. Lam, D. H. Crawford und D. A. Thorley-Lawson** (1995). "A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo." Cell 80(4): 593-601.
- Molesworth, S. J., C. M. Lake, C. M. Borza, S. M. Turk und L. M. Hutt-Fletcher** (2000). "Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells." J Virol 74(14): 6324-32.
- Montalvo, E. A., M. Cottam, S. Hill und Y. J. Wang** (1995). "YY1 binds and regulates cis-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter." J Virol 69(7): 4158-65.
- Montalvo, E. A., Y. Shi, T. E. Shenk und A. J. Levine** (1991). "Negative regulation of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus." J Virol 65(7): 3647-55.
- Morand, P., M. Budayova-Spano, M. Perrissin, C. W. Muller und C. Petosa** (2006). "Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of a C-terminal fragment of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 62(Pt 3): 210-4.
- Morrison, T. E., A. Mauser, A. Klingelutz und S. C. Kenney** (2004). "Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1." J Virol 78(1): 544-9.
- Morrison, T. E., A. Mauser, A. Wong, J. P. Ting und S. C. Kenney** (2001). "Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein." Immunity 15(5): 787-99.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich** (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." Biotechnology 24: 17-27.
- Nakayama, S., T. Murata, K. Murayama, Y. Yasui, Y. Sato, A. Kudoh, S. Iwahori, H. Isomura, T. Kanda und T. Tsurumi** (2009). "Epstein-Barr virus polymerase processivity factor enhances BALF2 promoter transcription as a coactivator for the BZLF1 immediate-early protein." J Biol Chem 284(32): 21557-68.
- Nemerow, G. R., C. Mold, V. K. Schwend, V. Tollefson und N. R. Cooper** (1987). "Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d." J Virol 61(5): 1416-20.
- Niedobitek, G., A. Agathangelou, H. Herbst, L. Whitehead, D. H. Wright und L. S. Young** (1997). "Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells." J Pathol 182(2): 151-9.
- Nishizuka, Y.** (1984). "The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion." Nature 308(5961): 693-8.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard und Y. Nakatani** (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." Cell 87(5): 953-9.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber und E. Li** (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell 99(3): 247-57.
- Orlando, V.** (2000). "Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation." Trends Biochem Sci 25(3): 99-104.

- Packham, G., A. Economou, C. M. Rooney, D. T. Rowe und P. J. Farrell** (1990). "Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein." J Virol 64(5): 2110-6.
- Petosa, C., P. Morand, F. Baudin, M. Moulin, J. B. Artero und C. W. Muller** (2006). "Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein." Mol Cell 21(4): 565-72.
- Pfaffl, M. W.** (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res 29(9): e45.
- Plass, C. und P. D. Soloway** (2002). "DNA methylation, imprinting and cancer." Eur J Hum Genet 10(1): 6-16.
- Polack, A., H. Delius, U. Zimmer und G. W. Bornkamm** (1984). "Two deletions in the Epstein-Barr virus genome of the Burkitt lymphoma nonproducer line Raji." Virology 133(1): 146-57.
- Pope, J. H., M. K. Horne und W. Scott** (1968). "Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus." Int J Cancer 3(6): 857-66.
- Pulvertaft, J. V.** (1964). "Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)." Lancet 1(7327): 238-40.
- Qu, L. und D. T. Rowe** (1992). "Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes." J Virol 66(6): 3715-24.
- Quinlivan, E. B., E. A. Holley-Guthrie, M. Norris, D. Gutsch, S. L. Bachenheimer und S. C. Kenney** (1993). "Direct BRLF1 binding is required for cooperative BZLF1/BRLF1 activation of the Epstein-Barr virus early promoter, BMRF1." Nucleic Acids Res 21(14): 1999-2007.
- Ragoczy, T. und G. Miller** (1999). "Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes." J Virol 73(12): 9858-66.
- Reinke, A. W., G. Grigoryan und A. E. Keating** (2010). "Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays." Biochemistry 49(9): 1985-97.
- Robertson, K. D., A. Manns, L. J. Swinnen, J. C. Zong, M. L. Gulley und R. F. Ambinder** (1996). "CpG methylation of the major Epstein-Barr virus latency promoter in Burkitt's lymphoma and Hodgkin's disease." Blood 88(8): 3129-36.
- Rooney, C. M., S. K. Loftin, M. S. Holladay, M. K. Brenner, R. A. Krance und H. E. Heslop** (1995). "Early identification of Epstein-Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease." Br J Haematol 89(1): 98-103.
- Rooney, C. M., D. T. Rowe, T. Ragot und P. J. Farrell** (1989). "The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle." J Virol 63(7): 3109-16.
- Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Muyldermans, A. Schepers, M. C. Cardoso und H. Leonhardt** (2008). "A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins." Mol Cell Proteomics 7(2): 282-9.
- Ryder, S. P., M. I. Recht und J. R. Williamson** (2008). "Quantitative analysis of protein-RNA interactions by gel mobility shift." Methods Mol Biol 488: 99-115.
- Sambrook, J. und Russell, D.** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Edition.
- Sample, J. und E. Kieff** (1990). "Transcription of the Epstein-Barr virus genome during latency in growth-transformed lymphocytes." J Virol 64(4): 1667-74.

- Sample, J., L. Young, B. Martin, T. Chatman, E. Kieff und A. Rickinson** (1990). "Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes." J Virol 64(9): 4084-92.
- Sato, H., H. Takeshita, M. Furukawa und M. Seiki** (1992). "Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator is a negative regulator of Jun." J Virol 66(8): 4732-6.
- Schelcher, C., S. Valencia, H. J. Delecluse, M. Hicks und A. J. Sinclair** (2005). "Mutation of a single amino acid residue in the basic region of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle switch protein Zta prevents reactivation of EBV from latency." J Virol 79(21):13822-8.
- Schepers, A., D. Pich und W. Hammerschmidt** (1993). "A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus." EMBO J 12(10): 3921-3929.
- Schepers, A., D. Pich und W. Hammerschmidt** (1996). "Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1." Virology 220(2): 367-76.
- Schwarzmann, F., N. Prang, B. Reichelt, B. Rinkes, S. Haist, M. Marschall und H. Wolf** (1994). "Negatively cis-acting elements in the distal part of the promoter of Epstein-Barr virus trans-activator gene BZLF1." J Gen Virol 75 (Pt 8): 1999-2006.
- Segouffin, C., H. Gruffat und A. Sergeant** (1996). "Repression by RAZ of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor EB1 is dimerization independent." J Gen Virol 77 (Pt 7): 1529
- Shaw, J. E., L. F. Levinger und C. W. Carter, Jr.** (1979). "Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines." J Virol 29(2): 657-665.
- Shimizu, N. und K. Takada** (1993). "Analysis of the BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus: identification of an anti-immunoglobulin response sequence." J Virol 67(6): 3240-5.
- Singal, R. und G. D. Ginder** (1999). "DNA methylation." Blood 93(12): 4059-70.
- Sista, N. D., C. Barry, K. Sampson und J. Pagano** (1995). "Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha." Nucleic Acids Res 23(10): 1729-36.
- Sixbey, J. W., J. G. Nedrud, N. Raab-Traub, R. A. Hanes und J. S. Pagano** (1984). "Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells." N Engl J Med 310(19): 25-30
- Strahl, B. D. und C. D. Allis** (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature 403(6765): 41-5.
- Sugden, B.** (1984). "Expression of virus-associated functions in cells transformed in vitro by Epstein-Barr virus: Epstein-Barr virus cell surface antigen and virus- release from transformed cells." Immune Deficiency and Cancer: 165-117.
- Sun, C. C. und D. A. Thorley-Lawson** (2007). "Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter." J Virol 81(24): 13566-77.
- Suzuki, M. M. und A. Bird** (2008). "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." Nat Rev Genet 9(6): 465-76.
- Swenson, J. J., E. Holley-Guthrie und S. C. Kenney** (2001). "Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 interacts with CBP, promoting enhanced BRLF1 transactivation." J Virol 75(13): 6228-34.
- Takacs, M., F. Banati, A. Koroknai, J. Segesdi, D. Salamon, H. Wolf, H. H. Niller und J. Minarovits** (2010). "Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters." Biochim Biophys Acta 1799(3-4): 228-35.

- Takada, K.** (1984). "Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines." Int J Cancer 33(1): 27-32.
- Takada, K., N. Shimizu, S. Sakuma und Y. Ono** (1986). "trans activation of the latent Epstein-Barr virus (EBV) genome after transfection of the EBV DNA fragment." J Virol 57(3): 1016-22.
- Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang und E. Kieff** (1987). "Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis." Cell 50(2): 203-13.
- Tao, Q., K. D. Robertson, A. Manns, A. Hildesheim und R. F. Ambinder** (1998). "The Epstein-Barr virus major latent promoter Qp is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive." J Virol 72(9): 7075-83.
- Thompson, M. P. und R. Kurzrock** (2004). "Epstein-Barr virus and cancer." Clin Cancer Res 10(3): 803-21.
- Thorley-Lawson, D. A.** (2001). "Epstein-Barr virus: exploiting the immune system." Nat Rev Immunol 1(1): 75-82.
- Tierney, R. J., N. Steven, L. S. Young und A. B. Rickinson** (1994). "Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state." J Virol 68(11): 7374-85.
- Toth, M., U. Muller und W. Doerfler** (1990). "Establishment of de novo DNA methylation patterns. Transcription factor binding and deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus promoter." J Mol Biol 214(3): 673-83.
- Tovey, M. G., G. Lenoir und J. Begon-Lours** (1978). "Activation of latent Epstein-Barr virus by antibody to human IgM." Nature 276(5685): 270-2.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon** (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4.
- Tsai, C. L., H. P. Li, Y. J. Lu, C. Hsueh, Y. Liang, C. L. Chen, S. W. Tsao, K. P. Tse, J. S. Yu und Y. S. Chang** (2006). "Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling." Cancer Res 66(24): 11668-76.
- Tsai, S. C., S. J. Lin, P. W. Chen, W. Y. Luo, T. H. Yeh, H. W. Wang, C. J. Chen und C. H. Tsai** (2009). "EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines." Blood 114(1): 109-18.
- Tsurumi, T., M. Fujita und A. Kudoh** (2005). "Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies." Rev Med Virol 15(1): 3-15.
- Urier, G., M. Buisson, P. Chambard und A. Sergeant** (1989). "The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites." EMBO J 8(5): 1447-53.
- Valouev, A., D. S. Johnson, A. Sundquist, C. Medina, E. Anton, S. Batzoglou, R. M. Myers und A. Sidow** (2008). "Genome-wide analysis of transcription factor binding sites based on ChIP-Seq data." Nat Methods 5(9): 829-34.
- Wang, P., L. Day, J. Dheekollu und P. M. Lieberman** (2005). "A redox-sensitive cysteine in Zta is required for Epstein-Barr virus lytic cycle DNA replication." J Virol 79(21): 13298-309.
- Wang, Y. C., J. M. Huang und E. A. Montalvo** (1997). "Characterization of proteins binding to the ZII element in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter: transactivation by ATF1." Virology 227(2): 323-30.

- Watt, F. und P. L. Molloy** (1988). "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter." Genes Dev 2(9): 1136-43.
- Weiss, L. M., L. A. Movahed, R. A. Warnke und J. Sklar** (1989). "Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease." N Engl J Med 320(8): 502-6.
- Wen, W., D. Iwakiri, K. Yamamoto, S. Maruo, T. Kanda und K. Takada** (2007). "Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes." J Virol 81(2): 1037-42.
- Williams, J. S. und O. M. Andrisani** (1995). "The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB." Proc Natl Acad Sci U S A 92(9): 3819-23.
- Wilson, G. G. und N. E. Murray** (1991). "Restriction and modification systems." Annu Rev Genet 25: 585-627.
- Woodcock, D. M., C. B. Lawler, M. E. Linsenmeyer, J. P. Doherty und W. D. Warren** (1997). "Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon." J Biol Chem 272(12): 7810-6.
- Wu, F. Y., H. Chen, S. E. Wang, C. M. ApRhys, G. Liao, M. Fujimuro, C. J. Farrell, J. Huang, S. D. Hayward und G. S. Hayward** (2003). "CCAAT/enhancer binding protein alpha interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle." J Virol 77(2): 1481-500.
- Wu, F. Y., S. E. Wang, H. Chen, L. Wang, S. D. Hayward und G. S. Hayward** (2004). "CCAAT/enhancer binding protein alpha binds to the Epstein-Barr virus (EBV) ZTA protein through oligomeric interactions and contributes to cooperative transcriptional activation of the ZTA promoter through direct binding to the ZII and ZIIIB motifs during induction of the EBV lytic cycle." J Virol 78(9): 4847-65.
- Yates, J., N. Warren, D. Reisman und B. Sugden** (1984). "A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells." Proc Natl Acad Sci U S A 81(12): 3806-10.
- Yates, J. L., N. Warren und B. Sugden** (1985). "Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells." Nature 313(6005): 812-5.
- Yoder, J. A., C. P. Walsh und T. H. Bestor** (1997). "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." Trends Genet 13(8): 335-40.
- Young, L. S. und A. B. Rickinson** (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer 4(10): 757-68.
- Zeidler, R., G. Eissner, P. Meissner, S. Uebel, R. Tampe, S. Lazis und W. Hammerschmidt** (1997). "Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10." Blood 90(6): 2390-7.
- Zerby, D., C. J. Chen, E. Poon, D. Lee, R. Shiekhattar und P. M. Lieberman** (1999). "The amino-terminal C/H1 domain of CREB binding protein mediates zta transcriptional activation of latent Epstein-Barr virus." Mol Cell Biol 19(3): 1617-26.
- Zhang, Q., Y. Hong, D. Dorsky, E. Holley-Guthrie, S. Zalani, N. A. Elshiekh, A. Kiehl, T. Le und S. Kenney** (1996). "Functional and physical interactions between the Epstein-Barr virus (EBV) proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV transcription and lytic replication." J Virol 70(8): 5131-42.
- zur Hausen, H., F. J. O'Neill, U. K. Freese und E. Hecker** (1978). "Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA." Nature 272(5651): 373-5.

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

**Identifizierung von BZLF1-regulierten Promotoren
des Epstein-Barr Virus**

Anhang

von

Martin Bergbauer

9 Anhang

9.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifikation der PCR-Promotorfragmente für Gel-Retentionsanalysen (Abs. 4.5.1) und zur Klonierung der CpG-freien Luciferase-Reportergen-Vektoren (Abs. 4.5.3). Die Nukleotidkoordinaten des B95.8 EBV-Genoms und die Produktgröße der PCR-Produkte sind vermerkt.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	B95.8 Koordinaten Produktgröße
BBLF4-BglII	GGGGAGATCTCTCCAGCGTGCGGTAGCACA	114260-115010
BBLF4-HindIII	GGGGAAGCTTTCTGTTACCCACGCCGG	751 bp
BMRF1-BglII	GGGGAGATCTCTGCTGATTGAAGGCATCTT	79350-79898
BMRF1-HindIII	GGGGAAGCTTGATCACAAGCAGCAGCAGAA	549 bp
BALF5-HindIII	GGGAAGCTTCTCCCAAGCAGTGCGGC	156766-157266
BALF5-BglII	GGGAGATCTGAAATCAATTCGTGGACGG	501 bp
BSLF1-AfIII	GGGCTTAAGCCCAACGGCGGGCTAAACA	86900-87900
BSLF1-SpeI	GGGACTAGTACGTCAGCCTGACCAACTT	1002
BMLF1-HindIII	GGGAAGCTTCTACGACGGGCTAGCTGGG	84300-84900
BMLF1-BglII	GGGAGATCTCGGAAGAGGAAGACAAGCA	601 bp
BRLF1-SpeI	GGGACTAGTCCCAACACCATGGGTGATA	106145-107249
BRLF1-BglII	GGGGAGATCTGAGGTGTTGTGTCCTGTATG	1105 bp
BBLF2/3-HindIII	GGGAAGCTTTCAACTGAGACCATCGCAATC	119116-120085
BBLF2/3-BglII	GGGAGATCTCCACCGAGCACAGGATAGG	970 bp
BALF2-HindIII	GGGAAGCTTGCATGATGCCCAAGGTATC	164767-165773
BALF2-BglII	GGGAGATCTTACTAAAAAGAAGGTGTTGGCA	1007 bp
BZLF1-BglII	GGGAGATCTTTAGACACTTCTGAAAAGTACC	103159-103369
BZLF1-HindIII	GGGAAGCTTCAGCAAAGATAGCAAAGGTGG	211 bp
BHRF1-BglII	GGGAGATCTTCGCCTTGCCTGCCTCAC	53610-53850
BHRF1-HindIII	GGGAAGCTTACACACAGACGAAACCTTGACC	241 bp
BHLF1-BglII	CCCAGATCTGGATAATGGAACCCTATGGATAC	52760-53128
BHLF1-HindIII	CCCAAGCTTGCACCCCCCGAGCGTCTGG	369 bp

Oligonukleotide zur Klonierung der Fusionsproteine SF:BZLF1, GFP:BZLF1 und GFP:NLS (Abs. 4.2.2 und 4.5.1).

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Fusionsprotein
509 FW-SpeI-3925	GGGACTAGTCCTGCACCAAGTGGCTGCC C	SF:BZLF1
509 BW-XhoI-3925	GGGTCTAGATGGTTTTCAATAACGGGAGTTAG	
509 FW-BglII-eGFP	GGGAGATCTCCTGCACCAAGTGGCTGCC	GFP:BZLF1
509 BW-MunI-eGFP	GGGCAATTGTGGTTTTCAATAACGGGAGTTAG	
NLS-BglII	GATCTCCTCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAGGC	GFP:NLS
NLS-ApaI	TACCTTTCTCTTCTTTTTTGGAGGA	

Oligonukleotide zur Quantifizierung der Transkriptmengen in *'real-time'* RT-PCR-Analysen (Abs. 4.5.3). Die zur Berechnung der relativen Transkriptmengen herangezogenen PCR-Effizienzen der Oligonukleotide sind vermerkt.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	PCR-Effizienz
BZLF1 fw	GGTTCCGTGTGCGTCGTG	2,0
BZLF1 bw	AGCCTGCTCCTGAGAATGCTT	
BRLF1 fw	TCGGGCTCGGGAGACTTTC	1,95
BRLF1 bw	ATGGGGAATGATGGGGGTG	
BMRF1 fw	TTGAGGTTTTACAGGTCTGGCATC	1,97
BMRF1 bw	GGTGGCGGAGGTGAAGGAG	
BALF5 fw	GGTGAGGCATCTGGGTGCTC	1,96
BALF5 bw	CCAAGAGTCATTTACACAAGGGCTAC	
BSLF1 fw	GCGGGTCCTCTGGATTAGAT	1,92
BSLF1 bw	CAGGGCGGTGGTCTTAGC	
BMFL1 fw	CTGGGCAAGGTGACAAATGTAATC	1,99
BMLF1 bw	GAAGCAGGCGAGGCAAGAAC	
BBLF4 fw	GTCCTCCGTGGCTAAAAGCG	1,96
BBLF4 bw	CAAGACCAAAAAGTCCATCTG	
BBLF2 fw	GTCGGGAGTCTCGGTGGAATAG	1,98
BBLF2 bw	AGCACAGGTGGTCTGCCAAAG	
CytC fw	CAATGCTCCGTTGTTGGCAG	2,0
CytC bw	CCTGGTGGGCGTGTGCTAC	

Oligonukleotide zur Quantifizierung der immunpräzipitierten DNAs in *'real-time'* PCR-Analysen (Abs. 4.2.4 und 4.3.3). Die PCR-Effizienzen der Oligonukleotide sind vermerkt

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	PCR-Effizienz
BZLF1 fw	GGTGCAATGTTTAGTGAGTTACCTGTC	1,97
BZLF1 bw	TGACACCAGCTTATTTTAGACACTTCT	
BRLF1 ZRE2/3 fw	GTCTACCAGATGTTGGGAGGGC	1,98
BRLF1 ZRE2/3 bw	GGTCTCTGTGTAATACTTTAAGGTTTGCTC	
Orilyt ZRE5 fw	TGACTTGTCACCTTTGCACATTTG	1,92
Orilyt ZRE5 bw	GCAGGCAAGGCGAGCAAC	
BMRF1 ZRE fw	CACACCACCCCAAGGA	1,96
BMRF1 ZRE bw	GCAGCAGCAGAAGCCAAC	
BCRF2 fw	TCCCCCTTCGCTCCTGTT	2,0
BCRF2 bw	CCCCTGGACTGGTCTCTCAAT	
BBLF4 fw	GTGCGTGACCTGCTGACCAC	1,95
BBLF4 bw	TCCGTCCCGATACTCCTGATG	
TR fw	TACCGTTGTGACCGCCACC	1,98
TR bw	AAAGCAGAGGAAGTGAAGTGTAGAGAC	

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
BMRF1 A fw	CTAGCCTTGGTGGATGTGCGAGCCATAAAGCTTGGTGGATGTGCGAG CCATAAAGCTTGGTGGATGTGCGAGCCATAAAGCTTGGTGGATGTGCG AGCCATAAAGCTTGGTGGATGTGCGAGCCATAAAGA
BMRF1 A bw	CTAGTCTTTATGGCTCGCACATCCACCAAGCTTTATGGCTCGCACATCC ACCAAGCTTTATGGCTCGCACATCCACCAAGCTTTATGGCTCGCACATC CACCAAGCTTTATGGCTCGCACATCCACCAAGG
BMRF1 B fw	CTAGCAATTTCTTTGAGCAAGAGAGTTCCGAATTTCTTTGAGCAAGAGA GTTCCGAATTTCTTTGAGCAAGAGAGTTCCGAATTTCTTTGAGCAAGAG AGTTCCGAATTTCTTTGAGCAAGAGAGTTCCGA
BMRF1 B bw	CTAGTCGGAACTCTCTTGCTCAAAGAAATTCGGAACTCTCTTGCTCAA GAAATTCGGAACTCTCTTGCTCAAAGAAATTCGGAACTCTCTTGCTCAA AGAAATTCGGAACTCTCTTGCTCAAAGAAATTG
BMLF1/BSLF2 fw	CTAGCGGTGCTCATGAGCGAGGGCCAGATGGTGCTCATGAGCGAGGG CCAGATGGTGCTCATGAGCGAGGGCCAGATGGTGCTCATGAGCGAGG GCCAGATGGTGCTCATGAGCGAGGGCCAGATA
BMFL1/BSLF2 bw	CTAGTATCTGGCCCTCGCTCATGAGCACCATCTGGCCCTCGCTCATGA GCACCATCTGGCCCTCGCTCATGAGCACCATCTGGCCCTCGCTCATGA GCACCATCTGGCCCTCGCTCATGAGCACCG
BALF5 fw	CTAGCCATGTTGCTGAGCGAGCTCGTCGACATGTTGCTGAGCGAGCTC GTCGACATGTTGCTGAGCGAGCTCGTCGACATGTTGCTGAGCGAGCTC GTCGACATGTTGCTGAGCGAGCTCGTCGAA
BALF5 bw	CTAGTTCGACGAGCTCGCTCAGCAACATGTCGACGAGCTCGCTCAGCA ACATGTCGACGAGCTCGCTCAGCAACATGTCGACGAGCTCGCTCAGCA ACATGTCGACGAGCTCGCTCAGCAACATGG
BHLF1 ZRE 1 fw	CTAGCGGGGTCTCTGTGTAATACTTTAAGGGGGTCTCTGTGTAATACTT TAAGGGGGTCTCTGTGTAATACTTTAAGGGGGTCTCTGTGTAATACTTT AAGGGGGTCTCTGTGTAATACTTTAAGA
BHLF1 ZRE 1 bw	CTAGTCTTAAAGTATTACACAGAGACCCCTTAAAGTATTACACAGAGA CCCCCTTAAAGTATTACACAGAGACCCCTTAAAGTATTACACAGAGAC CCCCCTTAAAGTATTACACAGAGACCCCG
BHLF1 ZRE 2 fw	CTAGCTTTAAGGTTTGCTCAGGAGTGGGGTTTAAAGTTTGCTCAGGAG TGGGGTTTAAAGTTTGCTCAGGAGTGGGGTTTAAAGTTTGCTCAGGAG TGGGGTTTAAAGTTTGCTCAGGAGTGGGGA
BHLF1 ZRE 2 bw	CTAGTCCCCTCCTGAGCAAACCTTAAACCCCACTCCTGAGCAAACC TTAAACCCCACTCCTGAGCAAACCTTAAACCCCACTCCTGAGCAAACCT TAAACCCCACTCCTGAGCAAACCTTAAAG

9.2 Genomweite EBV-‘Microarray’-Analysen der *in vitro* DIPs

Gezeigt ist das Hybridisierungsprofil des GFP:NLS Kontrollfusionsproteins nach einer *in vitro* DNA-Immünpräzipitation mit CpG-methylierter und unmethylierter EBV-DNA (Kontrollversuch zu Abs. 4.2.5).

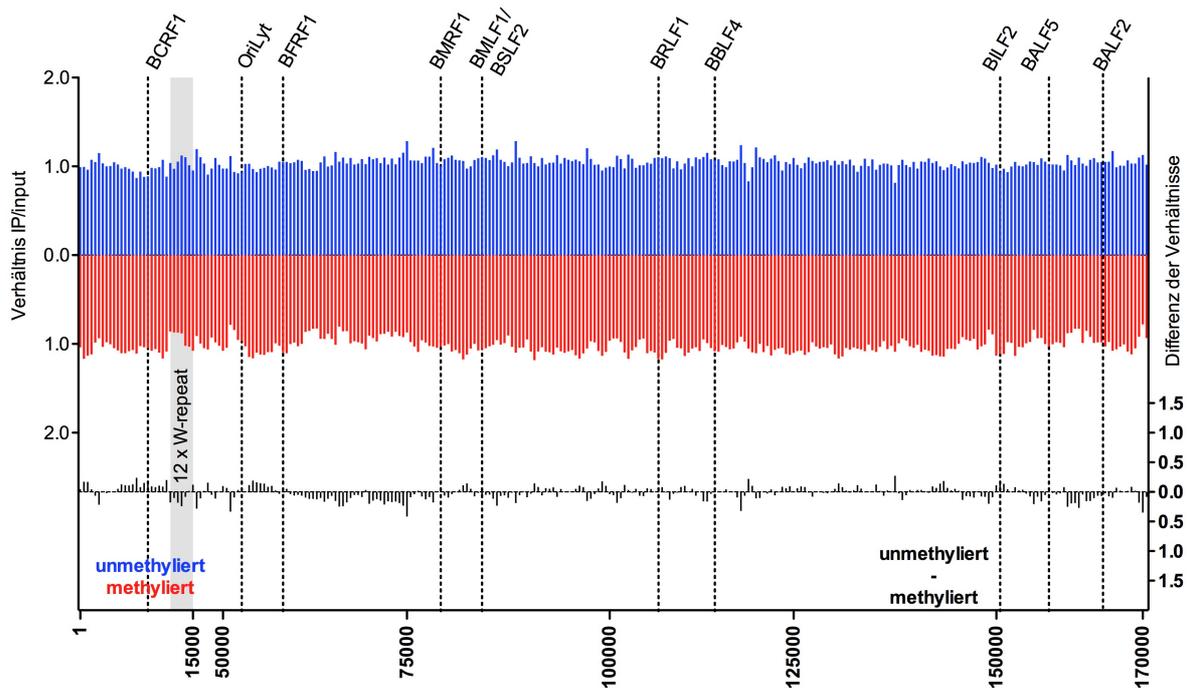
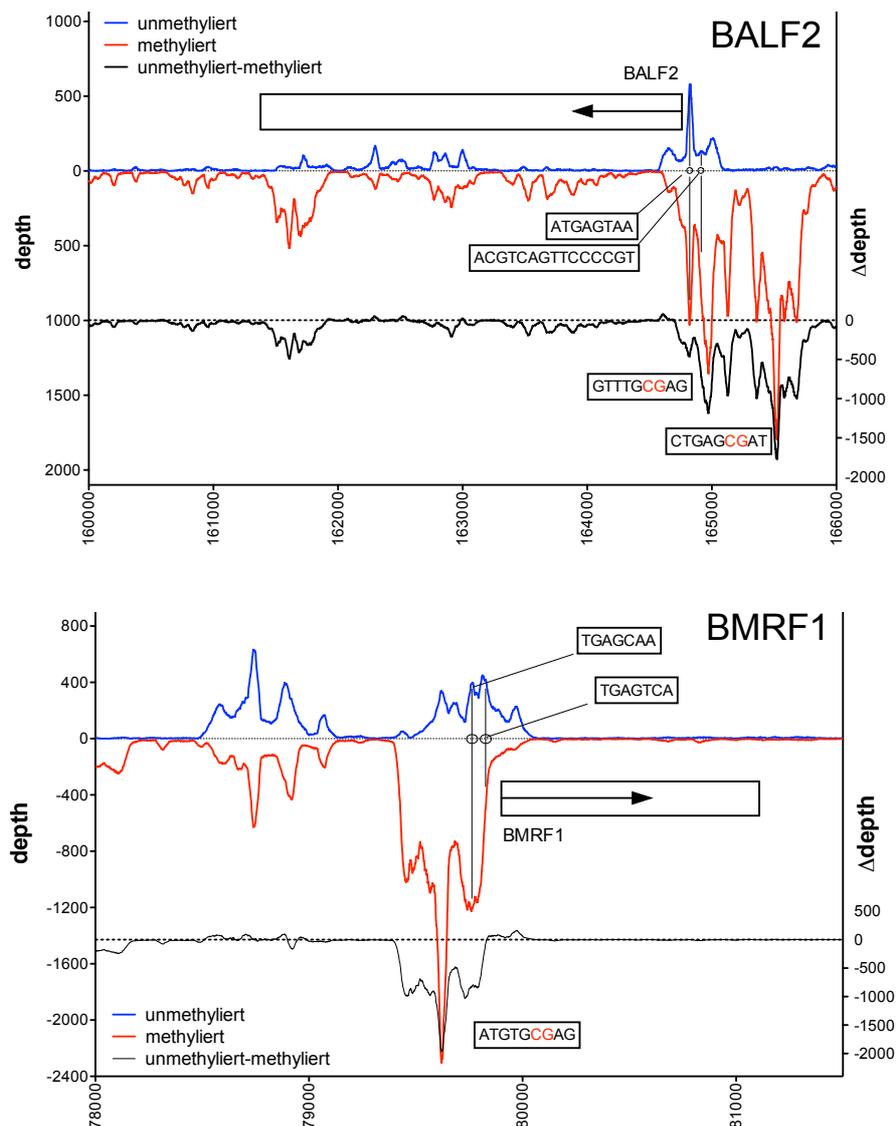
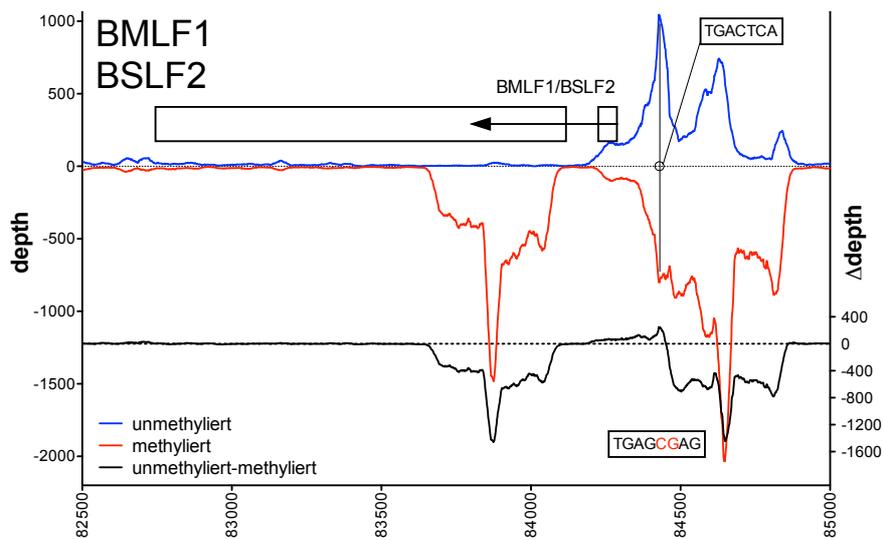
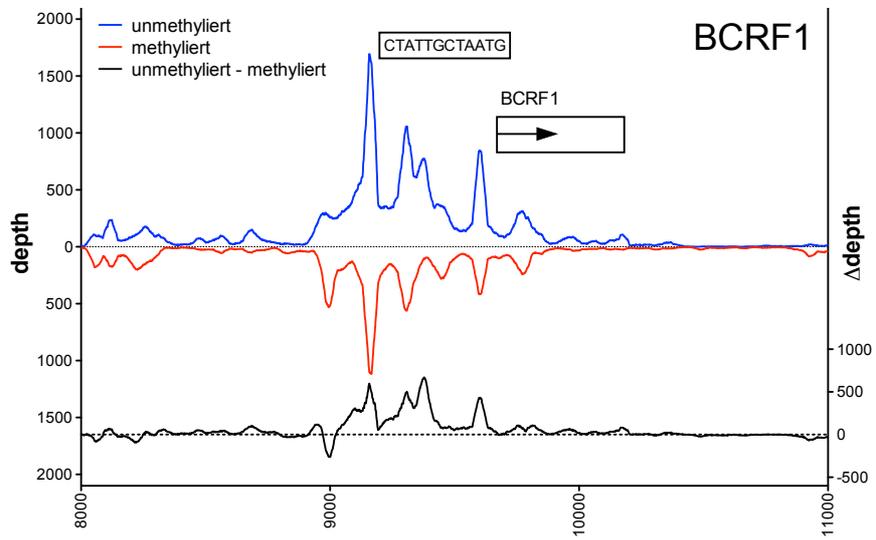
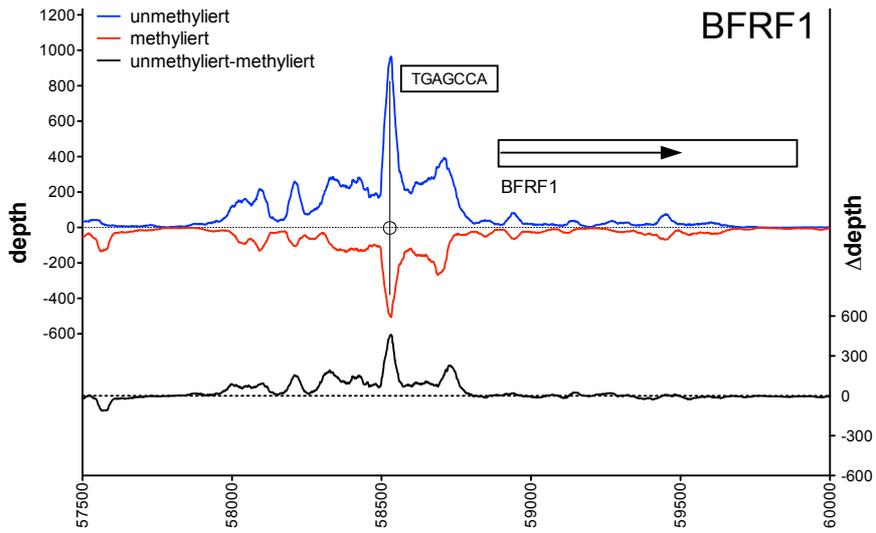


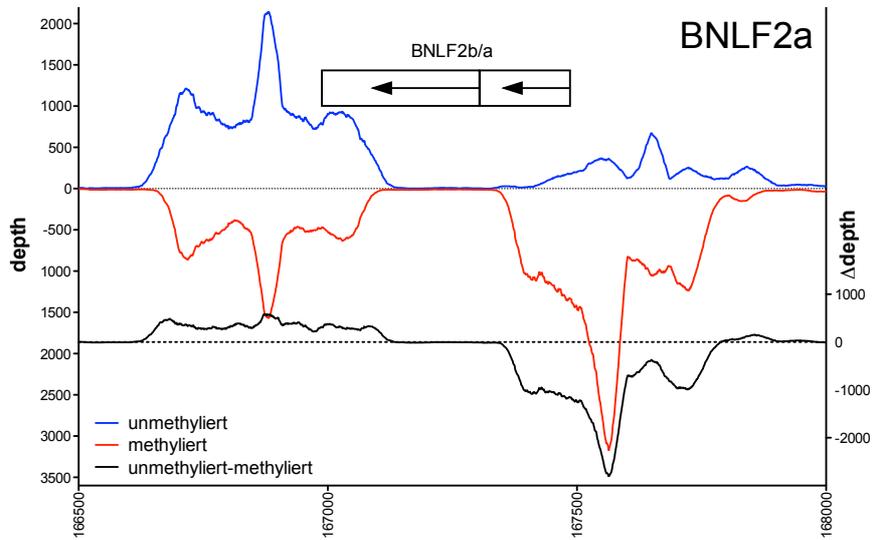
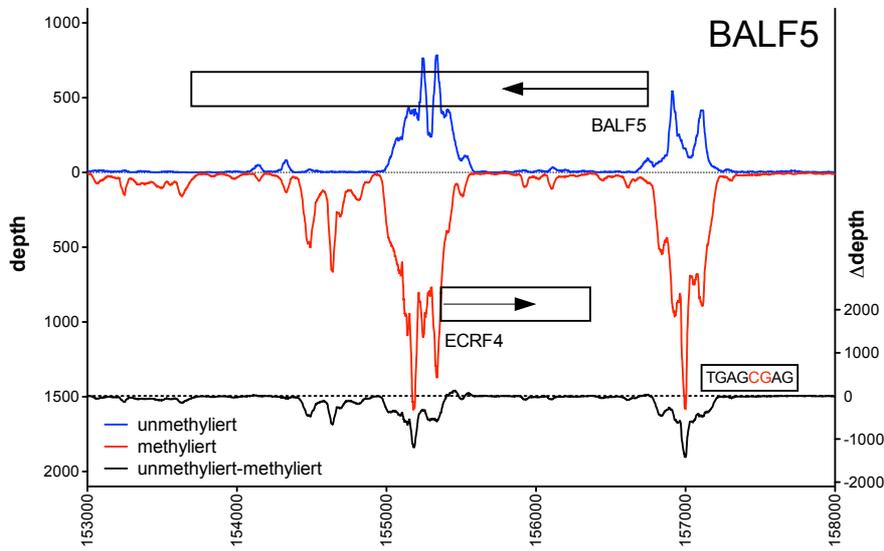
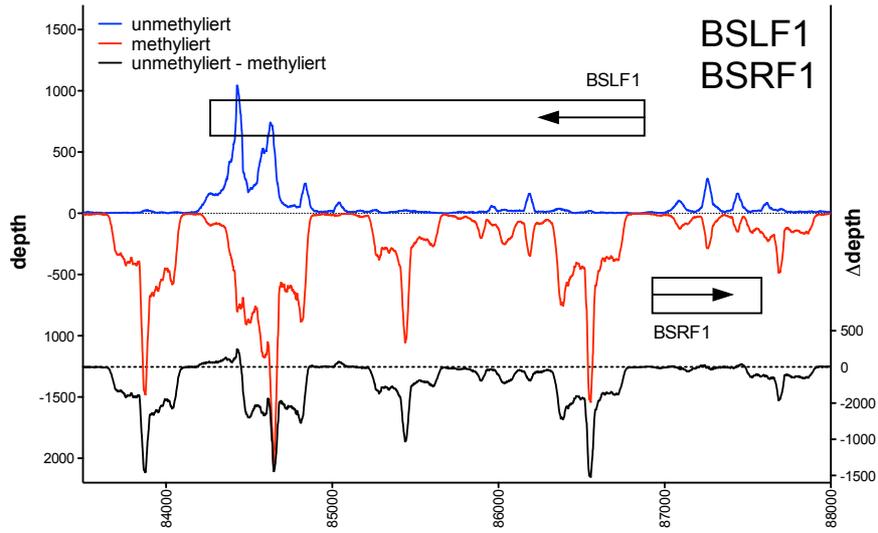
Abb. 9.1: Genomweite ‘Microarray’-Analysen nach *in vitro* DNA Immunpräzipitationen mit unmethylierter bzw. methylierter EBV-DNA. *In vitro* DIPs wurden mit unmethylierter EBV-DNA bzw. mit vollständig *de novo* CpG-methylierter EBV-DNA aus *E.coli* durchgeführt. Die angereicherten DNA-Fragmente wurden mit Alexa5, die nicht-selektierte ‘input’ Referenz-DNA mit Alexa3 fluoreszenzmarkiert. Äquimolare DNA-Mengen wurden vereint, auf dem EBV-‘Microarray’ hybridisiert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten der DNA-Moleküle detektiert. Gezeigt sind die Ergebnisse der genomweiten ‘Microarray’-Analysen mit dem Kontrollfusionsprotein GFP:NLS in Form eines Balkendiagramms. Auf der linken Y-Achse ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der immunpräzipitierten DNA (IP) zur nicht-selektierten DNA (input) gegen die 285 Bildpunkte des ‘Microarrays’ mit einer Länge von 500-700 bp aufgetragen. Die Koordinaten des B95.8-EBV-Genoms (1-172281) sind vermerkt. In blau sind die Ergebnisse der *in vitro* DIP mit unmethylierter EBV-DNA, in rot sind die Resultate mit methylierter EBV-DNA dargestellt. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Hybridisierungen als Differenz der Verhältnisse von unmethylierter zu methylierter EBV-DNA. Im Gegensatz zum Fusionsprotein GFP:BZLF1 (Abb. 4.8) konnte keine spezifische Anreicherung von DNA-Fragmenten im EBV-Genom erzielt werden.

9.3 Genomweite 'Next Generation Sequencing'-Analysen der *in vitro* DIPs mit methylierter und unmethylierter EBV-DNA

In den nachfolgenden Abbildungen sind alle weiteren graphischen Darstellungen der 'Next Generation Sequencing'-Analysen der Promotoren *BALF2*, *BMRF1*, *BFRF1*, *BCRF1*, *BMLF1/BSLF2*, *BSRF1/BSLF1*, *BALF5* und *BNLF2a/b* (Abs. 4.2.6) nach einer GFP:BZLF1 *in vitro* DIP mit unmethylierter (blau) bzw. methylierter EBV-DNA (rot) gezeigt. Die Sequenziertiefe ('*depth*') jedes Nukleotids wurde gegen die B95.8-EBV-Koordinaten aufgetragen, die Skalierung der X-Achse an die jeweilige Exonkomposition der Gene und ihrer Promotorregion angepasst. Die rechte Y-Achse kombiniert die Ergebnisse aus beiden Sequenzierungen als Differenz der Sequenziertiefen (Δ '*depth*') von unmethylierter zu methylierter EBV-DNA.

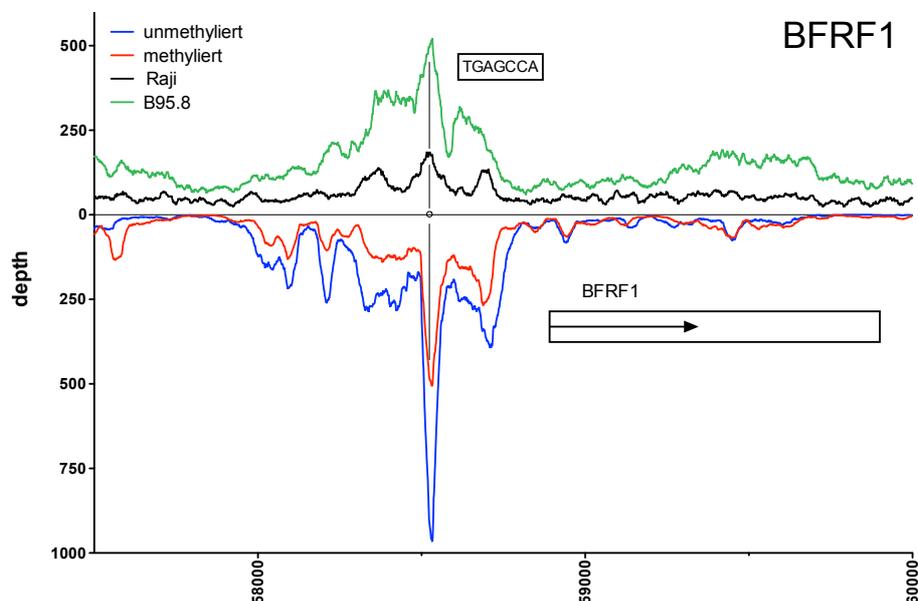
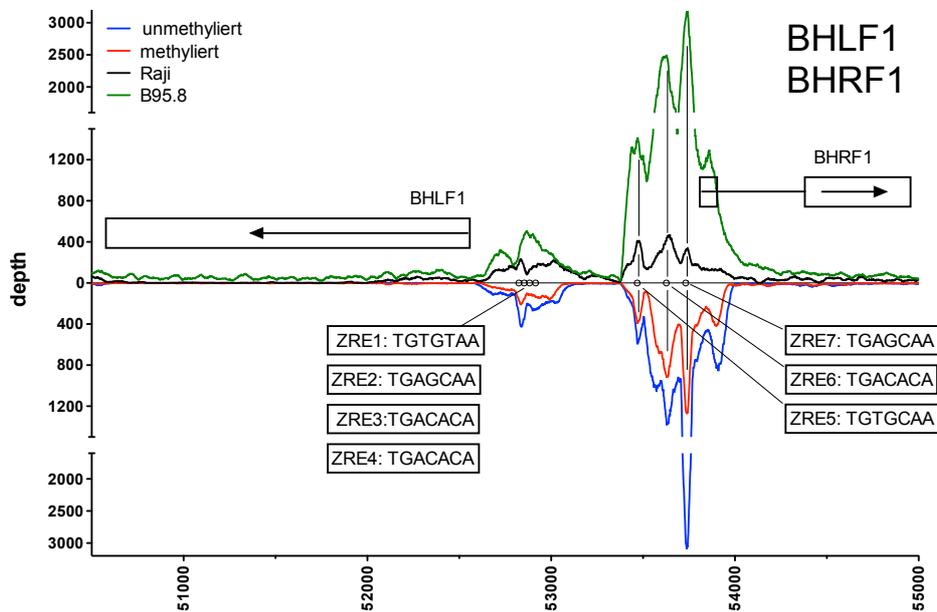


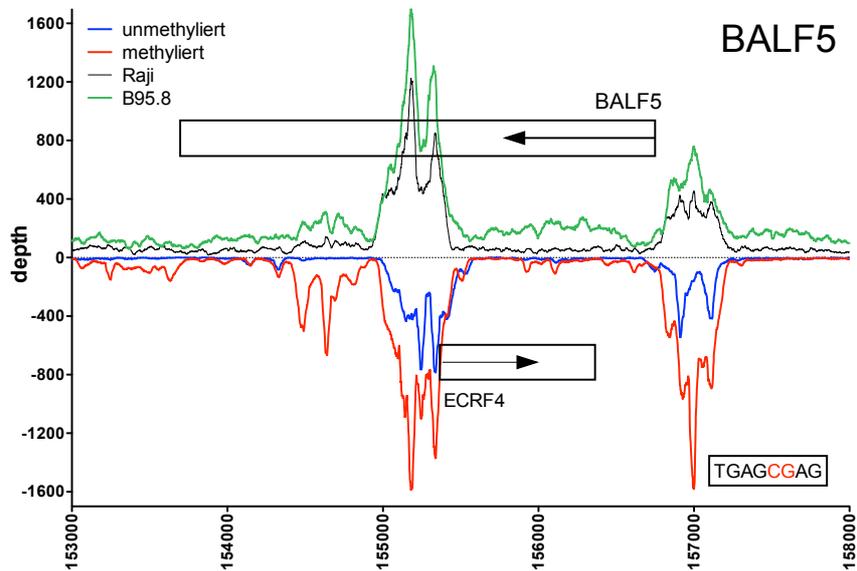
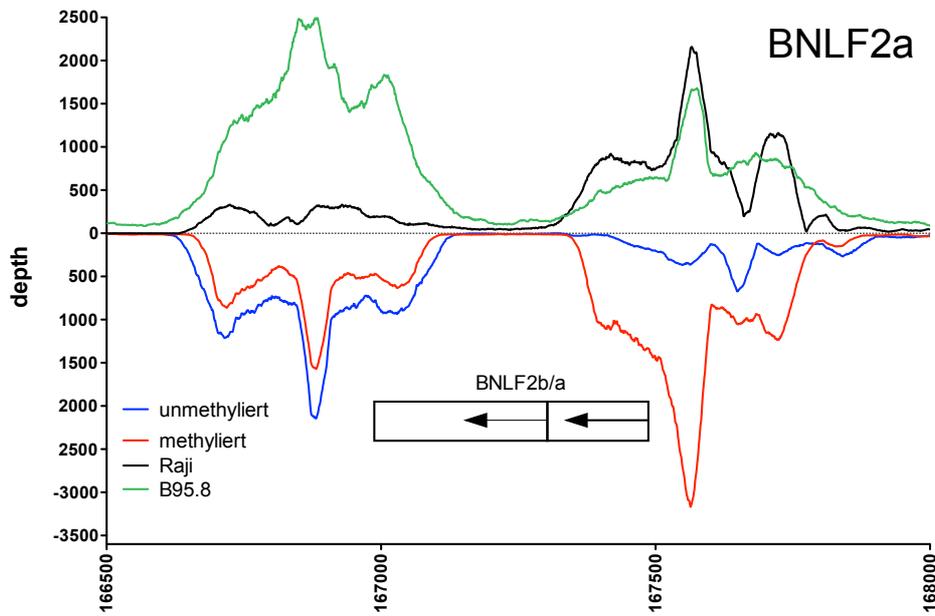
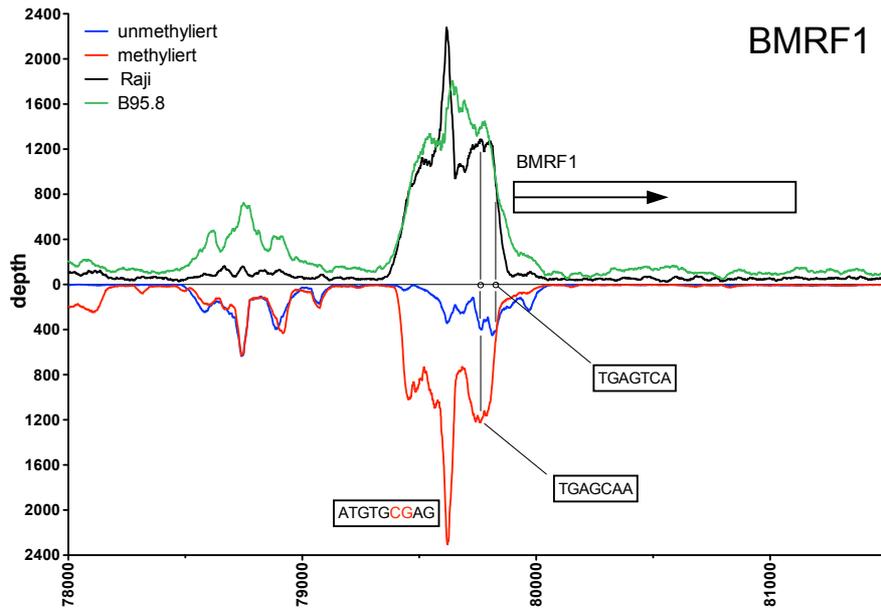


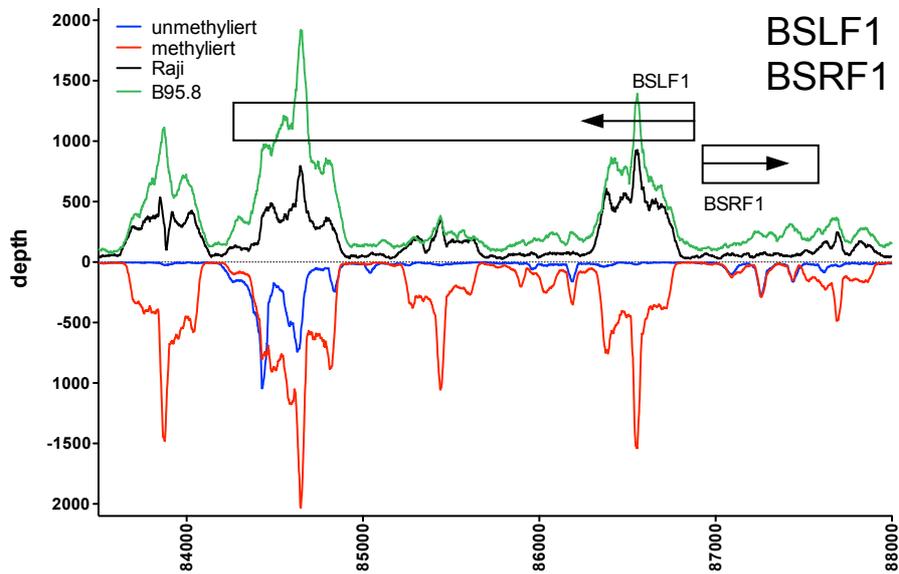
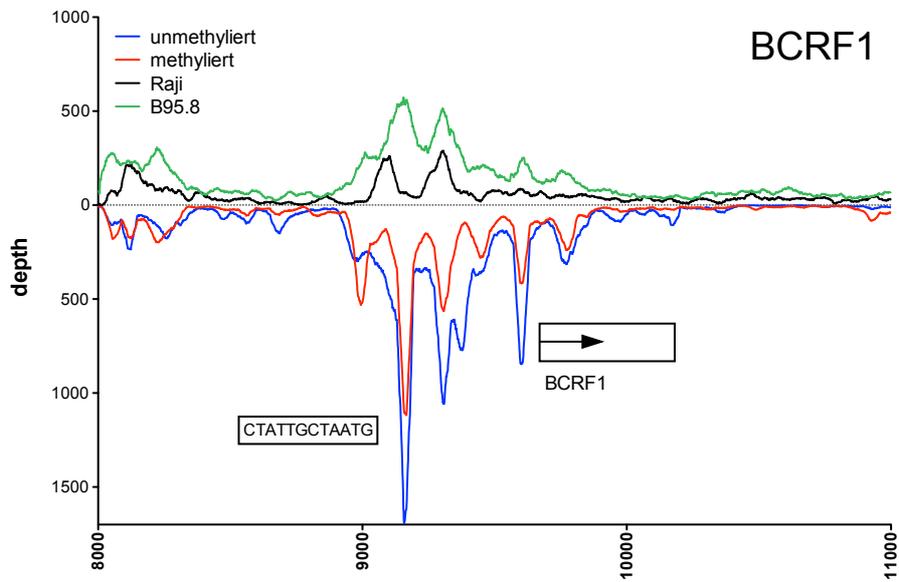
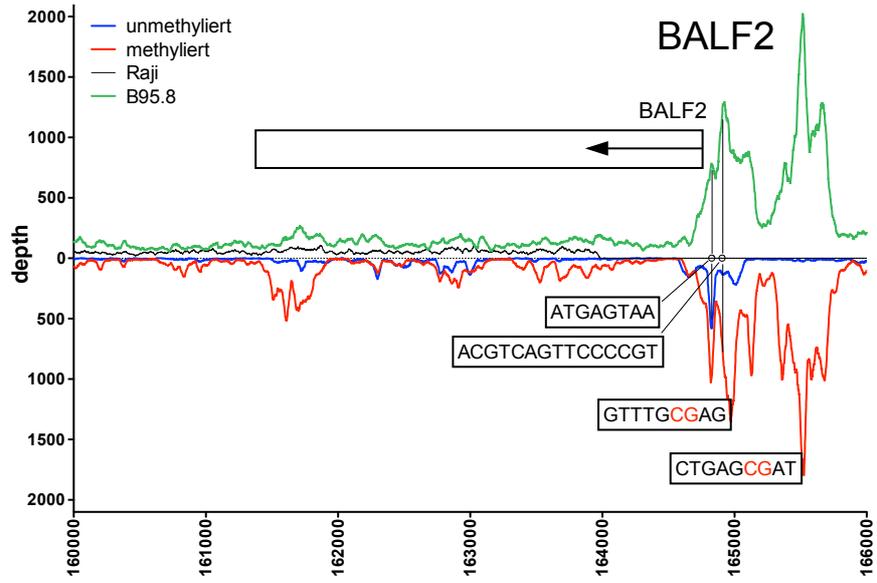


9.4 Genomweite 'Next Generation Sequencing'-Analysen in EBV-positiven Raji- und B95.8-Zellen

In den nachfolgenden Abbildungen sind alle weiteren graphischen Darstellungen der 'Next Generation Sequencing'-Analysen der Promotoren *BHLF1/BHRF1*, *BFRF1*, *BMRF1*, *BNLF2a/b*, *BALF5*, *BALF2*, *BCRF1* und *BSLF1/BSRF1* nach einer nChIP in Raji- (schwarz) und B95.8-Zellen (grüne) aufgetragen (Abs.4.3.3). Die Sequenziertiefe ('depth') jedes Nukleotids wurde gegen die Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom aufgetragen und die Skalierung der X-Achse an die jeweilige Exonkomposition der Gene und ihrer Promotorregionen angepasst.







9.5 Identifizierung von Konsensusmotiven mithilfe der Algorithmen SISSRs, QuEST und MEME

In den angeführten Tabellen sind alle Bindestellen die mit den Algorithmen SISSRs und QuEST identifiziert wurden aufgelistet, aus denen der Algorithmus MEME ein Konsensusmotiv extrahieren konnte (Abs. 4.3). Angegeben sind für alle Analysen die Nukleotidkoordinaten der identifizierten Bindestelle im B95.8 EBV-Genom, die Lokalisierung des Bindemotives auf dem oberen (+) bzw. unteren (-) Strang der DNA sowie die identifizierte Sequenz der Bindestelle und des Konsensusmotivs.

9.5.1 SISSRs und MEME Analysen nach nChIP-seq in GFP:BZLF1-B95.8-Zellen

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte <u>Konsensusmotive</u>		
ebv:106351-106391	+	AACTAAGCTT	<u>ATGAGCGAT</u>	TTTATCACAG
ebv:127491-127531	+	GGCTAAAAAT	<u>ATGAGCAAT</u>	TCCCCTGACC
ebv:83851-83891	+	CTGCACAGGG	<u>GTGAGCGAT</u>	GCAATGTGAC
ebv:165011-165051	+	GAT	<u>GTGAGCGAT</u>	CTTGGCAATC
ebv:84631-84671	+	CAGGGTGCTC	<u>ATGAGCGAG</u>	GGCCAGATGC
ebv:177391-177431	+	GTGGAAAG	<u>ATGAGCGAG</u>	GACAGGTGTG
ebv:137151-137191	+	CCC	<u>GTGAGCAAT</u>	GGTGGGGACG
ebv:110091-110131	+	CATTTACCTG	<u>GTGAGCAAT</u>	CAGACATGCG
ebv:78731-78771	+	GTTGACATC	<u>ATGAGCAAG</u>	GGCCCAGGGG
ebv:53711-53751	+	GGGTGGAAAT	<u>ATGAGCAAG</u>	AATAAGGAC
ebv:175331-175371	-	ACAGGAGGAG	<u>CTGAGCGAT</u>	GAACCTGGCC
ebv:126791-126831	-	CCTCTGGGTG	<u>CTGAGCGAT</u>	GCCT
ebv:86531-86571	+	CACGAGGGGC	<u>GTGAGCGAG</u>	CGCAGGGCCC
ebv:66611-66651	-	GACGGCCATC	<u>GTGAGCGAG</u>	TACGT
ebv:58491-58531	+	TCGTGACTTT	<u>GTGAGCCAT</u>	GACACA
ebv:56771-56811	+	AGCT	<u>CTGAGCGAG</u>	ATTTTCCACA
ebv:166811-166851	+	AGGCATGTTG	<u>CTGAGCGAG</u>	CTCGTCGATC
ebv:119791-119831	-	CAGGAACACG	<u>CTGAGCGAG</u>	AAGA
ebv:162131-162171	+	ACGAGAGACT	<u>CTGTGCAAT</u>	CAAACCC
ebv:148191-148231	-	GGCGTGAAT	<u>CTGTGCAAT</u>	ATCGC
ebv:76111-76151	-	ATGATGGATG	<u>GTGAGTAAT</u>	AAATTCTTAA
ebv:114491-114531	+	TC	<u>GTGTGCCGAG</u>	CCGGTTTCGT
ebv:9151-9191	-	TCAAGAGGGC	<u>ATTAGCAAT</u>	AGTGTT
ebv:176691-176731	-	ATGTGTTGAG	<u>ATGAGTCAT</u>	CCCGTGGAGA
ebv:150951-150991	-	CCCAGGGCAC	<u>ATTAGCAAT</u>	GTTCTAGGCA
ebv:150511-150551	+	ACTAA	<u>ATGAGTCAT</u>	TCCTAAACTG
ebv:49251-49291	+	CTGTCTTGC	<u>ATGTGCCAG</u>	ACCAATCAAT
ebv:72411-72451	+	AGGCGGGCGA	<u>ATGTGTAAT</u>	CCCGGAACCG
ebv:52831-52871	-	GCCCCACTC	<u>CTGAGCAA</u>	CCTTAAAGTA
ebv:67951-67991	+	TCGACCCTGC	<u>ATTTGCGAT</u>	GTAC
ebv:53611-53651	-	CAGGGGCTTA	<u>GTGTGTCAT</u>	GGTGAGGCAG
ebv:174751-174791	-	ACTCTG	<u>GTTTGCGAG</u>	GCTGGGCGGC
ebv:122471-122511	-	GGCGGAGCAT	<u>ATGAGTCAA</u>	TTC
ebv:131351-131391	-	CACTGCCACT	<u>ATGAGACAT</u>	ATTATGTCTT
ebv:145211-145251	+	AGTTGTGTGA	<u>CTGTGCCAA</u>	TTTTCTTCGC
ebv:71511-71551	-	ACCGCCGAAG	<u>ATGAGTAAC</u>	GGCGACT
ebv:64591-64631	+	GAAGACCCG	<u>GCGTGCGAG</u>	GAGCAGCATG
ebv:110831-110871	-	GCCAATGTCT	<u>GCGTGCGAG</u>	
ebv:129591-129631	+	CTGAGCCGCA	<u>CTGTGCCGTG</u>	ACGAT

9.5.2 QuEST und MEME Analysen nach nChIP-seq in GFP:BZLF1- Raji-Zellen

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte <u>Konsensusmotive</u>		
ebv:137062-137258	-	CGTCCCCACC	<u>ATTGCTCA</u>	CGGGGACGGA
ebv:150724-150976	+	GCTATAAGGA	<u>ATTGCTCA</u>	GGCCAAAGTT
ebv:127346-127560	-	GGTCAGGGGA	<u>ATTGCTCA</u>	TATTTTTAGC
ebv:109902-110308	-	CGCATGTCTG	<u>ATTGCTCA</u>	CCAGGTAAAT
ebv:83676-84041	-	GTCACATTGC	<u>ATCGCTCA</u>	CCCCTGTGCA
ebv:164807-165214	-	GATTGCCAAG	<u>ATCGCTCA</u>	CATCCCCTGC
ebv:126570-126986	+	GCGTAGAGGC	<u>ATCGCTCA</u>	GCACCCAGAG
ebv:106126-106579	-	CTGTGATAAA	<u>ATCGCTCA</u>	TAAGCTTAGT
ebv:78693-78782	-	CCCCTGGGCC	<u>CTTGCTCA</u>	TGATGTCAAC
ebv:122344-122869	+	AGATGTAGCA	<u>CTTGCTCA</u>	AAAGCGAGAG
ebv:53437-53839	-	CGTCCTTATT	<u>CTTGCTCA</u>	TATTTCCACC
ebv:79396-79867	-	TCGGAActCT	<u>CTTGCTCA</u>	AAGAAATTAG
ebv:87610-87796	+	CCTCGAGCGC	<u>CTCGCTCA</u>	GCCCACTATC
ebv:85292-85589	+	CAAAGAGCTG	<u>CTCGCTCA</u>	GGCTGTTCTG
ebv:119625-119934	+	CGCTGGTCTT	<u>CTCGCTCA</u>	GCGTGTTCCT
ebv:56613-56899	-	TGTGGAAAAT	<u>CTCGCTCA</u>	GAGCTGGGAA
ebv:66442-66774	+	GATCCACGTA	<u>CTCGCTCA</u>	CGATGGCCGT
ebv:166640-166967	-	GATCGACGAG	<u>CTCGCTCA</u>	GCAACATGCC
ebv:84350-84802	-	GCATCTGGCC	<u>CTCGCTCA</u>	TGAGCACCTT
ebv:177171-177615	-	CACACCTGTC	<u>CTCGCTCA</u>	TCTTTCCACA
ebv:86005-86756	-	GGGCCCTGCG	<u>CTCGCTCA</u>	CGCCCCTCGT
ebv:9107-9270	+	TATAAACT	<u>ATTGCTAA</u>	TGCCCTCTTG
ebv:110629-111123	+	CCACTTTGTC	<u>CTCGCTAA</u>	CAACTTTTTG
ebv:147487-147715	+	GGGTGAC	<u>CTGGCTCA</u>	GGTCCGGCCG
ebv:129518-129739	-	TCAGGCTACC	<u>CTGGCTCA</u>	GCGAGGAGGT
ebv:147010-147325	-	GTGCGAGGAA	<u>CTGGCTCA</u>	GCTTGGGGCC
ebv:147967-148363	+	CGATTGCGAT	<u>ATTGCACA</u>	GAGTCAGCGC
ebv:161935-162298	-	CTGGGGTTTG	<u>ATTGCACA</u>	GAGTCTCTCG
ebv:114242-114900	-	ACGAAACCGG	<u>CTCGCACA</u>	CGAGTCATCG
ebv:90892-91091	+	CAAATGTCCG	<u>ATTGCTCG</u>	CAAATGCACC
ebv:52737-53008	+	TACTTTAAGG	<u>TTTGCTCA</u>	GGAGTGGGGG
ebv:77811-77973	+	GACCCTCCCT	<u>CTCGCTCG</u>	TTAAACAAGG
ebv:145053-145344	-	GGTTGGCCGT	<u>GTTGCTCA</u>	TGGCCGTCTT
ebv:61370-61478	-	AC	<u>ACCGCTCA</u>	CCAGGTGGCA
ebv:172693-172866	-	CAGCTGTTTT	<u>ACCGCTCA</u>	CTGCTGACCA
ebv:2440-2626	+	GGACACACGA	<u>ACCGCTCA</u>	TAGTTTGGAG
ebv:49077-49424	+	AATGCACCCT	<u>CTTACTCA</u>	TCAAAGCACC
ebv:118717-118899	+	TCCCGCTCCC	<u>ATCGCAAA</u>	AAGTTGAGTT
ebv:67792-68122	-	AGAAAAGTAC	<u>ATCGCAAA</u>	TGCAGGGTGC
ebv:150337-150695	+	AGACCGACTC	<u>ATTGCTAG</u>	GAACGCTGCA
ebv:97959-98189	+	GTGCGGAGGA	<u>ACTGCTAA</u>	ACAGGAAAGG
ebv:4263-4402	-	TCGTGGCCAC	<u>GTCGCTAA</u>	AGAGCTGCTC
ebv:136661-136793	-	CCGGGGAGAG	<u>CGTGCTCA</u>	AGGGGGTCAG
ebv:176541-176815	+	TCTCCACGGG	<u>ATGACTCA</u>	TCTCAACACA
ebv:64473-64710	-	CATGCTGCTC	<u>CTCGCAGC</u>	CCGGTGCTTC
ebv:58438-58517	+	GTCAGGGGGT	<u>TTGGCTCG</u>	TTTGCCTCG

9.5.3 SISSRs und MEME Analysen nach GFP:BZLF1 *in vitro* DIP mit methylierter EBV-DNA

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte Konsensusmotive		
ebv:106351-106391	+	AACTAAGCTT	<u>ATGAGCGAT</u>	TTTATCACAG
ebv:84631-84671	+	CAGGGTGCTC	<u>ATGAGCGAG</u>	GGCCAGATGC
ebv:177391-177431	+	GTGGAAG	<u>ATGAGCGAG</u>	GACAGGTGTG
ebv:127491-127531	+	GGCTAAAAAT	<u>ATGAGCAAT</u>	TCCCCTGACC
ebv:83851-83891	+	CTGCACAGGG	<u>GTGAGCGAT</u>	GCAATGTGAC
ebv:165011-165051	+	GAT	<u>GTGAGCGAT</u>	CTTGGCAATC
ebv:130291-130331	-	TTGCGAGAAA	<u>ATGAGCCAT</u>	GACTAG
ebv:98231-98271	+	ATCGAACG	<u>ATGAGTGAT</u>	TTCGCCCATG
ebv:78731-78771	+	GTTGACATC	<u>ATGAGCAAG</u>	GGCCCAGGGG
ebv:53711-53751	+	GGGTGGAAT	<u>ATGAGCAAG</u>	AATAAGGAC
ebv:79611-79651	+	TGGTGG	<u>ATGTGCGAG</u>	CCATAAAGCA
ebv:175331-175371	-	ACAGGAGGAG	<u>CTGAGCGAT</u>	GAACCTGGCC
ebv:126771-126811	-	CTGGGTG	<u>CTGAGCGAT</u>	GCCTCTACGC
ebv:86531-86571	+	CACGAGGGGC	<u>GTGAGCGAG</u>	CGCAGGGCCC
ebv:66611-66651	-	GACGGCCATC	<u>GTGAGCGAG</u>	TACGT
ebv:137131-137171	+	TTCCGTCCCC	<u>GTGAGCAAT</u>	GGTGGGA
ebv:137971-138011	-	CTGATTCAG	<u>ATGAGCCAG</u>	CATCTTTGCA
ebv:57271-57311	-	GG	<u>ATGTGCCAT</u>	GCCCCAGGCT
ebv:87671-87711	-	TGATAGTGGG	<u>CTGAGCGAG</u>	GCGCTCGAGG
ebv:85431-85471	-	ACAGAACAGC	<u>CTGAGCGAG</u>	CAGCTCT
ebv:58511-58551	+	ACTTT	<u>GTGAGCCAT</u>	GACACATCTG
ebv:56751-56791	+	CTTCCCAGCT	<u>CTGAGCGAG</u>	ATTTTCC
ebv:166811-166851	+	AGGCATGTTG	<u>CTGAGCGAG</u>	CTCGTCGATC
ebv:119771-119811	-	GAACACG	<u>CTGAGCGAG</u>	AAGACCAGCG
ebv:176691-176731	-	ATGTGTTGAG	<u>ATGAGTCAT</u>	CCCGTGAGGA
ebv:150491-150531	+	GAAGCACTAA	<u>ATGAGTCAT</u>	TCCTAA
ebv:114471-114511	+	GCGATGACTC	<u>GTGTGCGAG</u>	CCGGTTTCG
ebv:9131-9171	-	AGGGC	<u>ATTAGCAAT</u>	AGTGTTTATA
ebv:49271-49311	-	GGGTGCTTTG	<u>ATGAGTAAG</u>	AGGGTGCATT
ebv:179031-179071	-	ACTCCTACTG	<u>ATGAGTAAG</u>	TATT
ebv:150951-150991	-	CCCAGGGCAC	<u>ATTAGCAAT</u>	GTTCTAGGCA
ebv:72411-72451	+	AGGCGGGCGA	<u>ATGTGTAAT</u>	CCCGGAACCG
ebv:67971-68011	+	ACCCTGC	<u>ATTTGCGAT</u>	GTACTTTTCT
ebv:58171-58211	+	ACGGGGGCAT	<u>CTGAGTGAT</u>	TG
ebv:9591-9631	+	GCCCCA	<u>CTGTGCAAT</u>	GCAGCTTTTA
ebv:76111-76151	-	ATGATGGATG	<u>GTGAGTAAT</u>	AAATTCTTAA
ebv:57211-57251	-	GCGACCCCT	<u>GTGTGCCAT</u>	CAACCAC
ebv:179851-179891	+	AGGGTGTGGG	<u>CTGTGCGAG</u>	T
ebv:162131-162171	+	ACGAGAGACT	<u>CTGTGCAAT</u>	CAAACCC
ebv:148171-148211	-	CTGACT	<u>CTGTGCAAT</u>	ATCGCAATCG
ebv:77911-77951	-	TA	<u>ACGAGCGAG</u>	AGGGAGGGTC
ebv:68271-68311	-	CCTTAGTGAT	<u>ATGAGCGGT</u>	ATCCCCTGGC
ebv:2511-2551	-	GCTCCAAACT	<u>ATGAGCGGT</u>	TCGTGTGTCC
ebv:143471-143511	-	AGGAAAC	<u>ATGAGTCAG</u>	GACTGGATGC
ebv:131151-131191	+	TATGCAGGGA	<u>ATGAGCGGT</u>	CCGTGAGCCG
ebv:115331-115371	+	GATCAGATAA	<u>ACGAGCAAT</u>	TTGACCAGAT
ebv:81911-81951	+	GCATCATTGC	<u>ATGTGTCAT</u>	GGCCACCCTC
ebv:59431-59471	+	TGGATATG	<u>ATTAGTGAT</u>	ATGTCTCAGC
ebv:129571-129611	+	CACCTCTCG	<u>CTGAGCCAG</u>	GGTAGCCTGA
ebv:125971-126011	+	CCTCTTTCCC	<u>ATTAGCAAG</u>	AACCCCTGC
ebv:90991-91031	-	TTTCTGGTGC	<u>ATTTGCGAG</u>	CAATCGGA
ebv:134451-134491	+	GATTTGCC	<u>ATGGGCGAG</u>	CGGTGCCACT
ebv:100471-100511	-	GGGGCCATG	<u>ATGGGCGAG</u>	CGTT
ebv:92671-92711	+	CATCGACAC	<u>ACGAGCCAT</u>	AGACCAGTTT
ebv:67491-67531	+	CTTCCCTGGG	<u>ATGAGCGTT</u>	TGGGAGAGCT
ebv:122791-122831	-	CCTCTGCCTT	<u>TTGAGCAAG</u>	TGCTACATCT
ebv:114591-114631	+	GTGCTCTCCT	<u>ATGAGCGTT</u>	ATGTGGA
ebv:98391-98431	+	TCACCCGACA	<u>ATGAGCGGG</u>	GAGATA
ebv:8111-8151	+	GT	<u>GTGTGTAAT</u>	TTGTCTCCA
ebv:71071-71111	+	CAACTGCCGA	<u>GTTTGCAGT</u>	CTGGGACGGG
ebv:168391-168431	-	AACCTTCC	<u>ATGAGCGGG</u>	CAGACTCCTT

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte Konsensusmotive
ebv:141371-141411	+	TGTCACATTG <u>ATGAGCGGG</u> ATAATCATC
ebv:118931-118971	-	CAGGGCGGTG <u>GTGGGCGAT</u> TTGGGTCGTG
ebv:150171-150211	-	AGGTTACTAC <u>ACGTGCAAT</u> GTGACA
ebv:101451-101491	-	AACCATGTTT <u>ATGTGTCAG</u> TCAAAGATCA
ebv:1531-1571	-	CATGTAAGTC <u>ATGTGTCAG</u> AACGGTG
ebv:93211-93251	+	T <u>GTCAGCGAT</u> GCCCTGGGCA
ebv:61451-61491,	+	TTGCCACCTG <u>GTGAGCGGT</u> GTGCGGGCTG
ebv:55271-55311,	+	CACACACGTA <u>ATTTGCAAG</u> CCGTGCTTCA
ebv:5831-5871	+	AATAAACCCA <u>ATGTGCAAA</u> TGTGGTTTGT
ebv:172731-172771	+	TGGTCAGCA <u>GTGAGCGGT</u> AAAACAGCTG
ebv:147591-147631	+	GAGACC <u>GTGAGCGGT</u> TACCGGGGCG
ebv:53611-53651	-	CAGGGGCTTA <u>GTGTGTCAT</u> GGTGAGGCAG
ebv:52831-52871	+	T <u>CTGTGTAAT</u> ACTTTAAGGT
ebv:71491-71531	-	GAAG <u>ATGAGTAAC</u> GGCGACTGGG
ebv:69011-69051	+	CTGATAGCAT <u>GTTTGCGAG</u> GTTTTGGATG
ebv:174771-174811	-	GCAGACTCTG <u>GTTTGCGAG</u> GCTGG
ebv:170651-170691	-	CTGGCGCTGT <u>GTGGGCGAG</u> CTGATGGTTC
ebv:133951-133991	+	CTCCATTAAC <u>ATTAGTCAT</u> ACCTGCCAGG
ebv:110071-110111	+	GTTGGAAAAC <u>ATTAGCGAC</u> ATTTACCTGG
ebv:48111-48151	+	GATTA <u>ACGTGCAAG</u> ACGCTAAACT
ebv:166431-166471	-	GGGGTGGTGG <u>ATGTGCGGG</u> GGCCTCAGCC
ebv:126231-126271	-	ATAACGGGGA <u>ATGTGTGAC</u> ATGCTAT
ebv:125671-125711	-	CTG <u>GTGAGCCAC</u> GTAGCCTATT
ebv:1711-1751	+	GTGTAAC TTG <u>ACGTGCAAG</u> GATGGAAGAG
ebv:93951-93991	+	ACAGTGGCAC <u>TTGAGCGAC</u> CAGTTTACCC
ebv:171491-171531	+	GTCGTCCCTA <u>GTCAGCGAG</u> GCGCATG
ebv:147151-147191	-	ACCC <u>CCGTGCGAT</u> GAGTTTATTT
ebv:139951-139991	-	TC <u>CTGTGTCAT</u> GCCCACCGTC
ebv:128591-128631	-	TCCGGG <u>GTCAGCGAG</u> GCCCTCTTTG
ebv:102531-102571	+	T <u>GCGAGCAAG</u> GGAATGCGTT
ebv:98791-98831	+	CCATTAAT <u>TTTAGCAAT</u> CGCACCTGCA
ebv:64591-64631	+	GAAGACCG <u>CCGTGCGAG</u> GAGCAGCATG
ebv:110811-110851	-	GCCAATGTCT <u>CCGTGCGAG</u> CCGGGCTTGC
ebv:101151-101191	-	GCTGTACCTG <u>ATGAGTCAC</u> ACCCCACGGC
ebv:11091-11131	-	GGCCACTATA <u>CTTTGCGAG</u> CCCTGCGTC
ebv:98031-98071	+	CCGTCTAA <u>ACGAGCGAA</u> GATCGAGGCC
ebv:86171-86211	+	GCAGTTTCTC <u>GTGTGCAAA</u> GTGGGCAAAA
ebv:6971-7011	-	AGCACCGCA <u>CTGAGCGTT</u> GCGGGTGTGT
ebv:124111-124151	+	TTTATA <u>CTGAGCGTT</u> TAGGTTTTGT
ebv:123931-123971	-	ACTTATGAAG <u>ATGAGTAGT</u> TCTAAGCG
ebv:122471-122511	-	GGCGGAGCAT <u>ATGAGTCAA</u> TTC
ebv:118791-118831	-	GAACTCAACT <u>TTTTGCGAT</u> GGGAGCGGGA
ebv:9271-9311	-	CTTT <u>ATGTGTAAC</u> TCTTGGCTGA
ebv:169511-169551	+	CGTCACAGCA <u>GCGAGCCAG</u> GGCC
ebv:144291-144331	+	TCACAGTCAG <u>ATTTGTCAT</u> CGAGCCCA
ebv:142951-142991	-	GGCTGCCAGC <u>CTCAGCGAG</u> GTTAAGCTGC
ebv:72071-72111	+	TGGACCCGGG <u>CCGTGCGAG</u> CAAAG
ebv:177991-178031	+	G <u>GTTAGTCAT</u> AGTAGCTTAG
ebv:74971-75011	-	ACCCTC <u>ATGAGCGGC</u> CACGCTTACC
ebv:4371-4411	+	AGGGCATGAC <u>ATCAGCGAC</u> GGGGGCCTGG
ebv:128451-128491	+	CTTTT <u>GTGAGTAAA</u> TAGAGATGAT
ebv:100571-100611	-	GGGTTGTTCT <u>TCGTGCGAT</u> ATCGGCTGTG
ebv:1111-1151	-	AAATACTGCC <u>ACCAGCGAT</u> TAGCGCGGAG
ebv:175671-175711	+	GCAGGAACAC <u>CTGAGCGTG</u> GTGAAGCCTC
ebv:173351-173391	+	GCAAGAAGG <u>TTGGGCGAG</u> AAGGAGGCCG
ebv:140391-140431	-	TGTGGGAGCG <u>GTTGCGGAT</u> GAGCACGTTG
ebv:125091-125131	-	GCTCGAAGCA <u>TTGGGCAAT</u> ATAAATTACT
ebv:92191-92231	+	TGCGGTGTTG <u>GTGAGTCAC</u> ACTTTTG
ebv:145211-145251	-	G <u>ACGTGCGAA</u> GAAAATTGGC
ebv:136711-136751	-	TTTTCTCAGT <u>ACGTGCGAA</u> GCCGTCCTC
ebv:78851-78891	-	ACGTTT <u>ATTGGCAAG</u> ATTCACAGGC
ebv:64131-64171	+	CTGCAGAAAA <u>TTGAGCGAG</u> ATGGTCTC
ebv:4671-4711	+	CCTGGTCATC <u>CTTTGCCAG</u> CGAGCAGTAC
ebv:163311-163351	+	T <u>CTTTGCCAG</u> CCTTCATACT
ebv:94271-94311	-	CCCGGACCAC <u>ATCAGCAAC</u> CTGGCT

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte <u>Konsensusmotive</u>		
ebv:112711-112751	+	GCCTCCGTAG	<u>ATGAGTCGG</u>	GCCAGGAAGC
ebv:76531-76571	-	CGGCTACTGT	<u>GTGTGTAAC</u>	TGACTCG
ebv:173491-173531	+	TCCCCAGGCC	<u>GTGGGTCAT</u>	GTAGAAACTG
ebv:85891-85931	+	ACGCACATG	<u>CTCAGCCAG</u>	GTAAGTCTCC
ebv:11211-11251	-	TTCAAGTC	<u>GTGGGCGAA</u>	TTAACTGAGC
ebv:86031-86071	+	CGTTGAAGCA	<u>CTGTGCGTG</u>	GGC
ebv:70051-70091	+	GACTGA	<u>AGGAGCGAT</u>	AGTTGAGACT
ebv:64091-64131	-	TCCGAGTCTT	<u>TCGAGCCAG</u>	AGATGTCCAT
ebv:163051-163091	+	CATTGTTGCA	<u>AGGAGCGAT</u>	TTGGAGA
ebv:119091-119131	-	ATGGTCTCAG	<u>TTGAGCATT</u>	CACCTTTTAA
ebv:87131-87171	-	GGCTTGAACA	<u>GCGAGCAAA</u>	T
ebv:169131-169171,	-	ACCTCCAA	<u>ATGAGAGAT</u>	GACTCGGCGT
ebv:165911-165951	-	CAACAGT	<u>GTGTGTCAC</u>	GTGGCCACGT
ebv:146211-146251	-	TGGCCTTGAG	<u>GTGGGCGAT</u>	GATTTTCTCT
ebv:971-1011	+	TTACTTGTTT	<u>TTTTGTAAT</u>	CGCAGCTCTA
ebv:87251-87291	+	G	<u>CTCAGTCAT</u>	CTGGAATACC
ebv:129431-129471	+	AGC	<u>ATCGGCAAG</u>	ATTTTGACAT
ebv:95951-95991	-	TTGAGGTTAT	<u>GCGTGCGGT</u>	AACCCATACG
ebv:4091-4131	-	TTGGAGGCGG	<u>ACGAGCCGG</u>	TCTCGGGGCA
ebv:164451-164491	+	GCGTCACCGT	<u>CTCGGCGAT</u>	GGAGAGGCAG
ebv:142331-142371	-	GTTACAACCT	<u>TTGTGCATT</u>	AT
ebv:105471-105511	-	GGTCAAGAAC	<u>CTCGGCGAT</u>	GTCACGCTGT
ebv:90071-90111	+	AGCGGAG	<u>GTTAGTAAA</u>	GGCATATGTG
ebv:57351-57391	+	TTGTTGCCGA	<u>ACGAGTCAA</u>	GAATCAG
ebv:124471-124511	+	AGGTTTGGGA	<u>GTGGGCCAA</u>	TATTTGC
ebv:120911-120951	-	CCGACG	<u>ACGAGTCAA</u>	CTCCATAGGC
ebv:117871-117911	+	CCGCCTTCCC	<u>GCGTGCAAA</u>	CGTGGCGAGG
ebv:95871-95911	-	ATGGCCTGAC	<u>ATCTGTGAC</u>	G
ebv:113951-113991	+	TT	<u>CTGTGCGGC</u>	CACGGTTGTG
ebv:109551-109591	+	CCA	<u>TTGAGTCGT</u>	CTCCCCTTTG
ebv:102651-102691	+	TGTGGTTTCC	<u>GTGTGCGTC</u>	GTGCC
ebv:1991-2031	+	CTAGGAAACG	<u>GCGAGCAGG</u>	GTGAACA
ebv:173691-173731	+	GCC	<u>ACGAGTCGT</u>	AGTTGAGGCT
ebv:98931-98971	+	GGCGGTGTGG	<u>GTTGGCGAC</u>	ATTGGCTTCT
ebv:62431-62471	+	CTACCGGATG	<u>GCGGGTAAT</u>	ACATGCTA
ebv:4051-4091	+	CGCGCGTGCC	<u>CTGGGCGTG</u>	AAGCTGACCT
ebv:138631-138671	-	GAAGCTGGAA	<u>TCGAGCGGG</u>	GGTGGAGGGG
ebv:137911-137951	+	GAGCGCTGCT	<u>TCGAGCAGT</u>	TCTGCCGCGT
ebv:110891-110931	+	GCGGTTAAAA	<u>GCGTGCGTG</u>	TTTATGCTGT
ebv:168311-168351	-	AAGGCGAACG	<u>CCGAGCCTT</u>	CCTGGACAAG
ebv:139451-139491	-	TTACCACCAG	<u>CTTTGTCAC</u>	GTTCCGCCAA

9.5.4 SISSRs und MEME Analysen nach GFP:BZLF1 *in vitro* DIP mit unmethylierter EBV-DNA

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte Konsensusmotive		
ebv:127491-127531	+	GGCTAAAAAT	<u>ATGAGCAAT</u>	TCCCCTGACC
ebv:130271-130311	-	AGAAA	<u>ATGAGCCAT</u>	GACTAGCGCA
ebv:176691-176731	-	ATGTGTTGAG	<u>ATGAGTCAT</u>	CCCGTGGAGA
ebv:150491-150531	+	GAAGCACTAA	<u>ATGAGTCAT</u>	TCCTAA
ebv:78731-78771	+	GTTGACATC	<u>ATGAGCAAG</u>	GGCCCAGGGG
ebv:53711-53751	+	GGGTGAAAT	<u>ATGAGCAAG</u>	AATAAGGAC
ebv:72411-72451	+	AGGCGGGCGA	<u>ATGTGTAAT</u>	CCCGGAACCG
ebv:49271-49311	-	GGGTGCTTTG	<u>ATGAGTAAG</u>	AGGGTGCATT
ebv:179031-179071	-	ACTCCTACTG	<u>ATGAGTAAG</u>	TATT
ebv:57271-57311	-	GG	<u>ATGTGCCAT</u>	GCCCCAGGCT
ebv:137991-138031	-	CCTGATTCAG	<u>ATGAGCCAG</u>	CA
ebv:81911-81951	+	GCATCATTGC	<u>ATGTGTCAT</u>	GGCCACCCTC
ebv:58511-58551	-	TGCCACCCAG	<u>ATGTGTCAT</u>	GGCTCACAAA
ebv:143471-143511	-	AGGAAAC	<u>ATGAGTCAG</u>	GACTGGATGC
ebv:137131-137171	+	TTCCGTCCCC	<u>GTGAGCAAT</u>	GGTGGGGA
ebv:110091-110131	+	CATTTACCTG	<u>GTGAGCAAT</u>	CAGACATGCG
ebv:76111-76151	-	ATGATGGATG	<u>GTGAGTAAT</u>	AAATTCTTAA
ebv:95091-95131	+	TGTTGTTTAC	<u>ATGTGTCAG</u>	GATGACGAGT
ebv:162091-162131	+	AGTATA	<u>ATGAGCAAC</u>	AGGGCCAAAC
ebv:145131-145171	+	TAAGACGGCC	<u>ATGAGCAAC</u>	ACGGCCAAC
ebv:101451-101491	-	AACCATGTTT	<u>ATGTGTCAG</u>	TCAAAGATCA
ebv:71491-71531	-	GAAG	<u>ATGAGTAAC</u>	GGCGACTGGG
ebv:9571-9611	+	AACTGCCCCA	<u>CTGTGCAAT</u>	GCAGC
ebv:9151-9191	-	TCAAGAGGGC	<u>ATTAGCAAT</u>	AGTGTT
ebv:162131-162171	+	ACGAGAGACT	<u>CTGTGCAAT</u>	CAAACCC
ebv:150951-150991	-	CCCAGGGCAC	<u>ATTAGCAAT</u>	GTTCTAGGCA
ebv:148171-148211	-	CTGACT	<u>CTGTGCAAT</u>	ATCGCAATCG
ebv:143051-143091	-	TGGGCTGGT	<u>CTGAGCAAG</u>	GTGATCTCTG
ebv:103291-103331	-	ACTATGC	<u>ATGAGCCAC</u>	AGGCATTGCT
ebv:1051-1091	+	TTCATGTCCA	<u>CTGAGCAAG</u>	ATCCTTCTGG
ebv:52831-52871	+	T	<u>CTGTGTAAT</u>	ACTTTAAGGT
ebv:3951-3991	-	TAGATGCAGG	<u>GTGAGCAAG</u>	ACGTCTTCCG
ebv:101151-101191	-	GCTGTACCTG	<u>ATGAGTCAC</u>	ACCCCACGGC
ebv:98231-98271	+	ATCGAACG	<u>ATGAGTGAT</u>	TTCGCCCATG
ebv:8091-8131	+	AGGCGCAAGT	<u>GTGTGTAAT</u>	TTGTCTCC
ebv:174631-174671	-	GTTGCGTG	<u>ATGAGTAAA</u>	GTGTAACATT
ebv:57211-57251	-	GCGACCCCT	<u>GTGTGCCAT</u>	CAACCC
ebv:139971-140011	-	TGCCGTTGTC	<u>CTGTGTCAT</u>	GCCCACCGT
ebv:133951-133991	+	CTCCATTAAC	<u>ATTAGTCAT</u>	ACCTGCCAGG
ebv:131031-131071	+	TGTCTCTGGC	<u>GTGTGCCAT</u>	CGCGT
ebv:131351-131391	-	CACTGCCACT	<u>ATGAGACAT</u>	ATTATGTCTT
ebv:122471-122511	-	GGCGGAGCAT	<u>ATGAGTCAA</u>	TTC
ebv:125971-126011	+	CCTCTTTCCC	<u>ATTAGCAAG</u>	AACCCCCTGC
ebv:5831-5871	+	AATAAACCCA	<u>ATGTGCAAA</u>	TGTGGTTTGT
ebv:79751-79791	+	AATTTCT	<u>TTGAGCAAG</u>	AGAGTCCGA
ebv:144291-144331	+	TCACAGTCAG	<u>ATTTGTCAT</u>	CGAGCCCA
ebv:122791-122831	-	CCTCTGCCTT	<u>TTGAGCAAG</u>	TGCTACATCT
ebv:2491-2531	-	AACACCTTCC	<u>ATGTGTCAA</u>	GGGT
ebv:179291-179331	+	CCTCAGGGCA	<u>GTGTGTCAG</u>	GAGC
ebv:177471-177511	+	TGCGCAAAGA	<u>ATGTGTCAA</u>	CAACAGGTGT
ebv:141371-141411	-	CCGCTCATCA	<u>ATGTGACAT</u>	TCATAATCTC
ebv:55271-55311	+	CACACACGTA	<u>ATTTGCAAG</u>	CGGTGCTTCA
ebv:1271-1311	-	AGCGACA	<u>ATCAGTAAT</u>	AACATGCAGA
ebv:144691-144731	+	TCACCTGCC	<u>CTGAGTCAC</u>	TACCGGTTGG
ebv:92191-92231	+	TGCGGTGTTG	<u>GTGAGTCAC</u>	ACTTTTG
ebv:58191-58231	+	CGGGGGCAT	<u>CTGAGTGAT</u>	TGACCAGGTT
ebv:129751-129791	-	CCGCCCTGTC	<u>GTGAGTCAC</u>	GGCGGCGATT
ebv:88751-88791	+	TGACGCTTGT	<u>CTTAGTCAT</u>	TATAGC
ebv:84811-84851	+	CCCACGTGCA	<u>GTGAGTGAT</u>	GTAAGAGGTT
ebv:56591-56631	+	ACGGCCT	<u>CTGAGACAT</u>	GTATGGGGTT
ebv:177991-178031	+	G	<u>GTTAGTCAT</u>	AGTAGCTTAG

Nukleotidkoordinaten im B95.8-EBV-Genom	Strang	Identifizierte <u>Konsensusmotive</u>	
ebv:171551-171591	-	GTTTGATGTG	<u>GTGTGCAAC</u> CT
ebv:134531-134571	-	CACCTTTGTT	<u>ATGCGCAAT</u> CCTCAGCAGC
ebv:88571-88611	+	TTGCAAAGG	<u>CTGTGCCAC</u> TGCTCTTCCT
ebv:76531-76571	-	CGGCTACTGT	<u>GTGTGTAAC</u> TGACTCG
ebv:331-371	+	TCTCCTCAGT	<u>CTTTGCAAT</u> TT
ebv:56751-56791	+	CTTCCCAGCT	<u>CTGAGCGAG</u> ATTTTCC
ebv:166811-166851	+	AGGCATGTTG	<u>CTGAGCGAG</u> CTCGTCGATC
ebv:86171-86211	+	GCAGTTTCTC	<u>GTGTGCAAA</u> GTGGGC AAAA
ebv:59411-59451	+	CATGGATATG	<u>ATTAGTGAT</u> ATG
ebv:122931-122971	+	CAGTCCCATA	<u>ATCAGTCAG</u> GACCA
ebv:98791-98831	+	CCATTAAT	<u>TTTAGCAAT</u> CGCACCTGCA
ebv:150171-150211	+	AGTAACCTGC	<u>ATGCGCAAG</u> GGTC
ebv:142431-142471	-	GAG	<u>ATGAGCATG</u> TGTTGAGCCT
ebv:1891-1931	-	GCAGCAGGTT	<u>CTCAGCAAT</u> CAGGGGCCCC
ebv:87411-87451	-	GGTCACCG	<u>ATGAGACAA</u> CGGCCGAGAT
ebv:8551-8591	-	ATTTATGGCT	<u>ATGGGCAAC</u> ACATAATCC
ebv:137891-137931	-	CAAATTGGTG	<u>ATGAGACAA</u> GTAGC
ebv:126231-126271	-	AACGGGGAAT	<u>GTGTGACAT</u> GCTAT
ebv:9431-9471	-	CCTGTTCCAC	<u>ATGTGACAC</u> GGGGGGGGAC
ebv:87251-87291	+	G	<u>CTCAGTCAT</u> CTGGAATACC
ebv:4671-4711	+	CCTGGTCATC	<u>CTTTGCCAG</u> CGAGCAGTAC
ebv:114471-114511	+	GCGATGACTC	<u>GTGTGCCAG</u> CCGGTTTTCG
ebv:95271-95311	+	TTCATATTCC	<u>ATGAGAGAG</u> ACCTCGCATA
ebv:95851-95891	+	TATGG	<u>ATGTGCATG</u> ACCGTGCGTC
ebv:8651-8691	-	ACCCC	<u>TTGGGCAAT</u> AAATACTAGT
ebv:125111-125151	-	GCTCGAAGCA	<u>TTGGGCAAT</u> A
ebv:90991-91031	-	TTTCTGGTGC	<u>ATTTGCGAG</u> CAATCGGA
ebv:172691-172731	-	GCCCATCTGT	<u>ATGTGCTAT</u> GA
ebv:98291-98331	+	GGGGGCAGTG	<u>ATAAGTCAT</u> GACAATT
ebv:125151-125191	+	GTAGCTTCTG	<u>ATGAATCAT</u> TACCCAT
ebv:91311-91351	-	GTCACGATTT	<u>CTTGGCAAT</u> AACAGTATCC
ebv:133231-133271	+	TCTGTTGCAT	<u>CTTGGCAAT</u> CTCATCGGTA
ebv:119091-119131	-	ATGGTCTCAG	<u>TTGAGCATT</u> CACCTTTTAA
ebv:6371-6411	+	ATGTGTGCGAA	<u>ATGACCAAG</u> CGTCCCCGCA
ebv:169611-169651	+	TACAGGCT	<u>GTGCGTCAG</u> CGCGTGCAGG
ebv:84451-84491	+	GGCCTGTG	<u>ATGTGTAGT</u> AGAGTACCAG
ebv:115651-115691	-	TTTCCCAAAG	<u>TTCAGTCAG</u> ATCC
ebv:124471-124511	+	AGGTTTGGGA	<u>GTGGGCCAA</u> TATTTGC
ebv:142331-142371	-	GTTACAACCT	<u>TTGTGCATT</u> AT
ebv:142951-142991	-	GGCTGCCAGC	<u>CTCAGCGAG</u> GTTAAGCTGC

9.6 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kalla, M., Schmeinck, A., **Bergbauer, M.**, Pich, D. & Hammerschmidt, W. (2010). "AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome." Proc Natl Acad Sci U S A 107(2): 850-5.

Bergbauer, M., Kalla, M., Schmeinck, A., Göbel, C., Rothbauer, U., Eck, S., Benet-Pagès, A., Strom, T., and Hammerschmidt, W. (2010). "CpG-Methylation Regulates a Class of Epstein-Barr Virus' Promoters. ", PloS Pathogens 6(9)

9.7 Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt**, der mir ermöglichte an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Darüber hinaus für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und sein offenes Ohr zu jeder Tages- und Nachtzeit. Merci, Wolfgang !!!

Prof. Dr. Dirk Eick danke ich recht herzlich für die Übernahme der offiziellen Betreuung und für sein stetiges Interesse am Thema dieser Arbeit.

Sebastian Eck, Dr. Anna Benet-Pages und Dr. Tim Strom für die gute Zusammenarbeit bei den NGS-Analysen.

Dr. Ulrich Rothbauer für seine großzügigen GFP-Antikörper-Spenden.

Bei der Schepers-Gruppe: Aloys und Peer für die hilfreichen ChIP Ratschläge. Manuel für seine Hilfe am konfokalen Mikroskop.

Ein besonderer Dank geht an Christine, die mich mit ihren hervorragenden Luciferase- und EMSA-Arbeiten unterstützt hat.

Dem EBV-Epigenetik-Team Anne und Markus Kalla für die vielen hilfreichen Diskussionen und experimentellen Ratschläge. DANKE !!!

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Rosi und Angie, die für jedes noch so bürokratische Problem eine Lösung finden und uns „Nerds“ den Rücken frei halten.

Allen (ehemaligen) Kollegen der AGV und des zweiten Stocks für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die sich nicht nur auf die tägliche „Laborwelt“ beschränkte. Insbesondere den Hammerschmidt-Kinders: Anne, Christine, Daggi, Eri, Gilbert, Lisa, Markus Kalla, Markus Prägert, Montse, Romana und Steffi.

Meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Rückhalt über viele Jahre hinweg diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Ellen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Bergbauer
Geburtsdatum: 17.07.1981
Geburtsort: Bad Kötzing
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

09/1987 – 07/1991 Grundschule Viechtach
09/1991 – 06/2000 Dominicus-von-Linprun-Gymnasium Viechtach
Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst

07/2000 – 04/2001 Luftwaffe-Regen / Großer Arber

Studium

10/2001 – 12/2005 **Studium der Biologie an der Universität Regensburg**
Akademischer Grad: Diplom-Biologe Univ.
Schwerpunkt: Zellbiologie
01/2006 – 10/2006 **Diplomarbeit am Universitätsklinikum Regensburg**
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene,
Prof. Dr. H. Wolf; AG Nevels/Paulus
Molekulare Untersuchungen zur Histon-Modifikation in
Zytomegalievirus infizierten humanen Fibroblasten

Promotion:

03/2007 – 07/2010 **Promotion am Helmholtz-Zentrum München**
Abteilung Genvektoren, Prof. Dr. W. Hammerschmidt
Identifizierung von BZLF1-regulierten Promotoren des
Epstein-Barr Virus