

Charakterisierung der Rolle zellulärer Proteine bei der Transkription und Replikation von Papillomviren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Manuela Rehtanz
aus Leverkusen

2004

Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Pfister
Prof. Dr. Karin Schnetz
Vorsitzender: Prof. Dr. Dietmar Schomburg
Beisitzer: Dr. Rolf Kaiser

Tag der Disputation: 14.07.2004

Den Menschen, die mich begleiten.

Das Erkennen ist nicht nur für Philosophen,
sondern für jeden Menschen die höchste Lust.

Poetik, Aristoteles (384-322 v. Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG -----	1
1.1 Die Papillomviren -----	1
1.2 Der Aufbau der menschlichen Haut und die PV-Infektion -----	2
1.3 Die Pathologie -----	3
1.4 Der Kapsid- und Genomaufbau -----	5
1.5 Die Funktion der viralen Genprodukte-----	6
1.6 Die virale Transkription -----	11
1.7 Der zelluläre Koaktivator p300 -----	14
1.8 Das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 -----	15
1.9 Das Nucleosome Assembly Protein-----	16
1.10 Das Ziel der vorliegenden Arbeit-----	17
2. MATERIAL -----	19
2.1 Bakterienstämme -----	19
2.2 Eukaryote Zellen -----	19
2.3 Nukleinsäuren-----	20
2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide-----	20
2.3.2 Expressionsvektoren -----	21
2.3.3 Reporterplasmide-----	22
2.3.4 Rekombinante Plasmide-----	23
2.3.5 DNA-Längenstandards-----	26
2.3.6 sonstige natürliche Nukleinsäuren -----	26
2.4 Proteine-----	27
2.4.1 Enzyme -----	27
2.4.2 Antiseren-----	27
2.4.3 Größenstandards-----	28
2.5 Protease Inhibitoren-----	28
2.6 Radioaktivität-----	29
2.7 Medien-----	29
2.7.1 Medien und Antibiotika für die Bakterienkultivierung-----	29
2.7.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen -----	30
2.8 Reagenzien-----	31
2.8.1 Puffer und Lösungen -----	31
2.8.2 Sonstige Chemikalien und Materialien-----	35
2.8.3 Reagenziensysteme (Kits) -----	36
3. METHODEN -----	37
3.1 Bakterienkultur-----	37
3.1.1 Kulturen zur Plasmidisolierung-----	37
3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation-----	37
3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien-----	38
3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien-----	38

3.2	Zellkulturen -----	38
3.2.1	Kultivierung eukaryoter Zellen -----	38
3.2.2	Einfrieren und Lagerung der Zellen -----	39
3.2.3	Zellzahlbestimmung -----	39
3.2.4	Transfektion von eukaryoten Zellen -----	39
3.2.4.1	Transfektion mit „FuGENE“ -----	40
3.2.4.2	Transfektion mit CaCl ₂ -----	40
3.2.5	Ernte der transfizierten Zellen -----	41
3.2.5.1	Ernte durch physikalischen Zellaufschluss -----	41
3.2.5.2	Ernte durch chemischen Zellaufschluss -----	41
3.2.6	Luciferase-Test -----	42
3.2.7	Herstellung stabil transfizierter Zelllinien -----	42
3.2.8	Behandlung von stabil transfizierten Zellen mit TSA -----	42
3.3	DNA-Methoden -----	43
3.3.1	DNA-Standardmethoden -----	43
3.3.2	Plasmidpräparationen -----	43
3.3.3	DNA-Sequenzierung -----	43
3.3.4	Isolierung gesamtzellulärer DNA aus eukaryoten Zellen -----	44
3.3.5	Transienter Replikationstest -----	44
3.3.5.1	Transfektion und Extraktion der episomalen DNA -----	44
3.3.5.2	Southern Blot -----	45
3.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -----	46
3.3.7	In vitro Mutagenese -----	46
3.4	Proteinmethoden -----	47
3.4.1	Herstellung von Zellextrakten -----	47
3.4.2	Herstellung von Zellkernextrakten -----	47
3.4.3	Quantitative Proteinbestimmung -----	48
3.4.4	Proteinaufreinigung -----	48
3.4.4.1	Reinigung von Proteinen mit Histidin-Epitop -----	48
3.4.4.2	Reinigung von GST-Fusionsproteinen -----	49
3.4.5	Aufkonzentration von gereinigten Proteinen mit Histidin-Epitop -----	50
3.4.6	Western Blot -----	50
3.4.7	<i>In vitro</i> Translation -----	51
3.4.8	Protein-Protein Interaktionsanalysen -----	51
3.4.8.1	Interaktionen mit <i>in vitro</i> translatierten, GST- und gereinigten Proteinen mit Histidin-Epitopen -----	51
3.4.8.2	Direkte Interaktionen -----	52
3.4.8.3	Koimmunpräzipitationen -----	53
3.4.8.4	Analyse von Interaktionen mittels Ultrazentrifugation -----	53
4.	ERGEBNISSE -----	54
4.1	GST-8E2 bindet hNAP-1 <i>in vitro</i> -----	54
4.2	Die Bindung von hNAP-1 an BPV1 E2 ist direkt -----	55
4.3	hNAP-1 interagiert mit E2 Proteinen <i>in vivo</i> -----	56
4.4	Überexprimiertes BPV1 E2 präzipitiert endogenes hNAP-1 -----	59

4.5	hNAP-1 und BPV1 E2 aktivieren synergistisch die Transkription des synthetischen Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc-----	61
4.6	Die AD von BPV1 E2 ist für die Kooperation mit hNAP-1 verantwortlich -----	63
4.7	hNAP-1 und BPV1 E2 kooperieren bei der Aktivierung des stabil in das zelluläre Genom integrierten Reporterkonstruktes -----	66
4.8	Analyse der Interaktion der E2 Proteine und des Histons H2B mit hNAP-1 Deletionsmutanten-----	69
4.9	Für die synergistische Aktivierung der Transkription mit E2 wird das gesamte hNAP-1 Protein benötigt -----	72
4.10	HPV8 E2, hNAP-1 und p300 aktivieren synergistisch das synthetische Reporterkonstrukt NCR8-Luc-----	77
4.11	Auch für die synergistische Aktivierung der Transkription mit p300 wird das gesamte hNAP-1 Protein benötigt-----	80
4.12	Analyse der Interaktion des p300 mit den hNAP-1 Deletionsmutanten -----	81
4.13	hNAP-1, HPV8 E2 und p300 interagieren <i>in vivo</i> miteinander -----	83
4.14	hNAP-1, BPV1 E2 und p300 bilden einen ternären Komplex <i>in vitro</i> -----	85
4.14.1	BPV1 E2, hNAP-1 und p300 sedimentieren gemeinsam im Glycerolgradienten-----	85
4.14.2	BPV1 E2 und hNAP-1 kompetieren nicht um die Bindung an p300-4-----	88
4.15	hNAP-1 stimuliert die Replikation von HPV8 NCR-CAT -----	91
4.16	p53 bindet hNAP-1 direkt <i>in vitro</i> -----	93
4.17	Endogenes p53 präzipitiert endogenes hNAP-1 -----	94
4.18	hNAP-1 und p53 aktivieren kooperativ den Promotor des synthetischen Reporterkonstruktes p53CON -----	95
4.19	hNAP-1 und p53 stimulieren die Expression von p21 -----	96
4.20	hNAP-1 interagiert nicht mit dem Aktivator TEF-1 -----	97
5.	DISKUSSION -----	99
6.	LITERATURVERZEICHNIS -----	108
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS -----	126
8.	ZUSAMMENFASSUNG-----	129
9.	ABSTRACT -----	130
10.	DANKSAGUNG -----	131
11.	ERKLÄRUNG-----	132
12.	LEBENS LAUF-----	133

1. EINLEITUNG

1.1 Die Papillomviren

Die Papillomviren (PV) bilden die einzigen Vertreter der Familie Papillomaviridae. Die Durchseuchung der menschlichen Bevölkerung mit den DNA-Tumorviren ist weltweit hoch. Von Geburt an findet eine Übertragung durch direkten Kontakt mit infizierten Hautregionen oder über kontaminierte Gegenstände im familiären Bereich statt. Auch durch die allgemeine Nutzung von Freizeitanlagen kommt es zu einer gehäuften Übertragung. Überdies können genitale PV sowohl während des Geburtsvorganges auf das Neugeborene als auch ab dem jungen Erwachsenenalter durch Geschlechtsverkehr übertragen werden (MODROW, 2003). PV sind die häufigsten sexuell übertragenen, viralen Infektionserreger (GARLAND, 2002) und Infektionen mit bestimmten humanen PV (HPV) bergen ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung. Hierbei ist die Assoziation bestimmter Typen mit dem Gebärmutterhalskrebs von besonderer klinischer Bedeutung (Kapitel 1.3). Bisher wurden über 90 HPV Typen vollständig sequenziert und zurzeit sind über 120 partielle DNA-Sequenzen bekannt (HOU *et al.*, 2002; ZUR HAUSEN, 2002 und 2000), welche vermutlich neue Typen darstellen. Neben humanen wurden auch animale PV aus Säugern, wie nicht-menschlichen Primaten und Rindern („Bovine“, BPV), aber auch aus Vögeln (DE VILLIERS, 2001), Kaninchen (erstes PV-Isolat 1932), Hunden, Schafen, Elchen und Hirschen isoliert (MODROW, 2003). Die Definition eines PV-Typs beruht auf dem Vergleich der Nukleotidsequenzen des konservierten Hauptstrukturproteingens L1, wobei bei unter 90% Sequenzhomologie ein neuer Typ definiert wird.

PV infizieren die Basalzellen der Haut und induzieren dort eine verstärkte Proliferation des Epithels, wobei sie eine hohe Wirts- und Gewebespezifität aufweisen (ZUR HAUSEN und DE VILLIERS, 1994). Aufgrund ihres Tropismus werden sie in haut- und schleimhautinfizierende Typen unterteilt. Die bekanntesten schleimhautinfizierenden Vertreter sind HPV16, 18, 45 und 56, während einige der wichtigsten kutanen Typen aus Läsionen von Patienten mit der seltenen Krankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (Ev) isoliert wurden (Kapitel 1.3). Hier sind die bedeutendsten Typen HPV5 und 8.

1.2 Der Aufbau der menschlichen Haut und die PV-Infektion

Die komplexe Struktur der menschlichen Haut wird von innen nach außen in Subcutis (Unterhaut), Dermis (Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut) gegliedert, wobei die Epidermis in mehrere Schichten unterteilt wird (Abb.1).

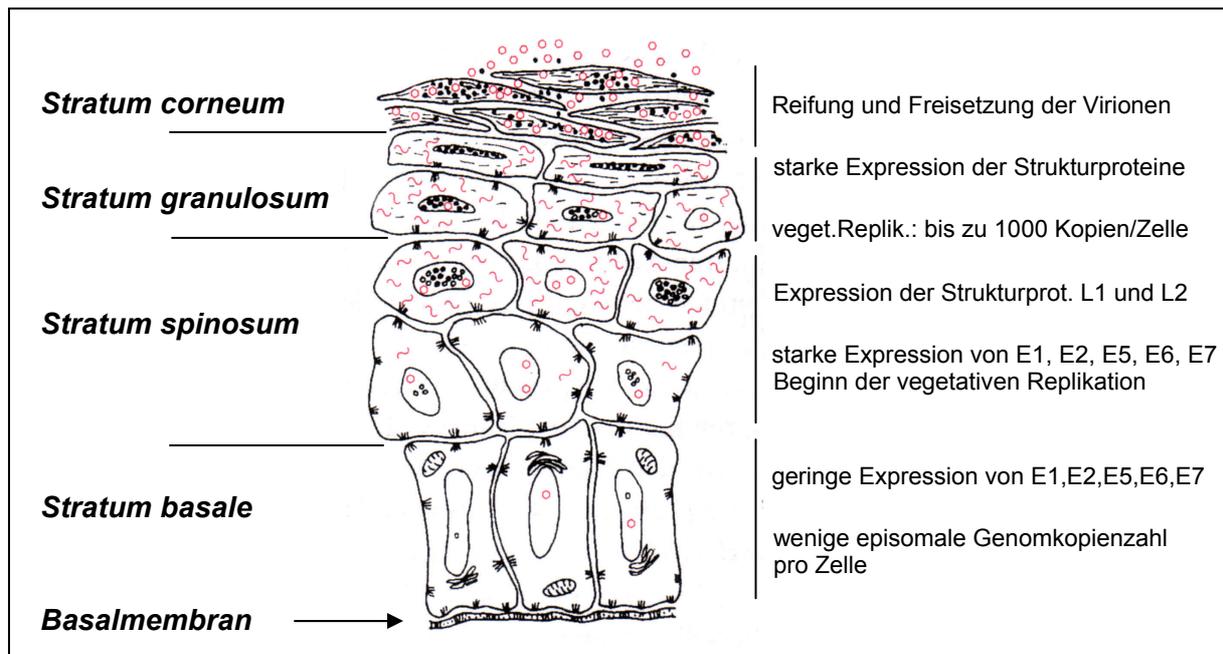


Abb. 1 Querschnitt der Epidermis und Lebenszyklus der PV

Der Querschnitt der Epidermis zeigt ihre einzelnen Schichten und den damit eng verknüpften Lebenszyklus der PV.

Die PV gelangen vermutlich nach Mikrotraumata der Haut bzw. Schleimhaut zu den Zellen der Basalschicht des Epithels und infizieren diese. Der Virus-Zell-Kontakt erfolgt über Bindung an das $\alpha 6\beta 4$ -Integrin, das als Rezeptor fungiert (EVANDER *et al.*, 1997), jedoch nach jüngsten Erkenntnissen nicht von allen PV gebunden zu werden scheint. Weiterhin kann der Kontakt durch eine Bindung des L1-Hauptkapsidproteins an das auf der Wirtszelle exponierte Heparin stattfinden (JOYCE *et al.*, 1999; GIROGLOU *et al.*, 2001). Anschließend wird das Virus endosomal internalisiert (SELINKA *et al.*, 2002) und das virale Genom über einen unbekanntem Mechanismus in den Zellkern transportiert. Wundheilung sowie die Aktivität der frühen viralen Proteine helfen dem Virus wahrscheinlich, sich in den normalerweise ruhenden Zellen zu etablieren. Nach der Replikation der viralen DNA im Zellkern liegen die Genome in geringer Kopienzahl als Episom vor und nur die frühen Gene werden exprimiert. Mit fortschreitender Differenzierung der Zellen beginnen die

vegetative Replikation der viralen DNA und die Expression der Strukturproteingene (Abb. 1). Die zeitlich versetzte Induktion der viralen Promotoren ist wahrscheinlich auf in den spezifischen Differenzierungsstadien unterschiedlich exprimierte Transkriptionsfaktoren zurückzuführen (TUREK, 1994). Die Virionen werden schließlich in den differenzierten Zellen der oberen Hautschicht zusammengefügt und beim Absterben der Zellen des *Stratum corneum* freigesetzt.

1.3 Die Pathologie

Während des Infektionszyklus induziert die Aktivität viraler Proteine eine verstärkte Proliferation (Hyperproliferation) der suprabasalen Zellen und so z.B. die Bildung von Warzen (CHOW und BROKER, 1994; ZUR HAUSEN und DEVILLIERS, 1994; HOWLEY und LOWY, 2001). Diese primär gutartigen Tumoren (Warzen, Kondylome, Papillome), bilden sich häufig – wahrscheinlich infolge einer zellvermittelten Immunreaktion – spontan zurück. Oft bleiben die Infektionen subklinisch. Die benignen Tumoren weisen eine intakte basale Epithelschicht auf. Dabei verursachen genetisch verwandte HPV-Typen häufig ähnliche klinische Bilder und zeigen eine ähnliche Gewebespezifität.

Manche HPV-Typen tragen zur malignen Progression der epithelialen Tumoren im Bereich des Anogenitaltraktes, des Respirationstraktes sowie der Haut bei. Für die maligne Progression prädisponiert sind Hautwarzen von *Ev*-Patienten, Larynxpapillome von Erwachsenen und Dysplasien der Gebärmutterhalsschleimhaut. Die Ausbildung von intraepithelialen Neoplasien (CIN I bis CIN III) der Schleimhaut der Zervix uteri (Gebärmutterhals) ist von großer klinischer Bedeutung. Dabei repräsentieren die steigenden Zahlen der CIN den Schweregrad der Neoplasien von milden (CIN I) über moderate (CIN II) zu schweren Neoplasien (CIN III), welche Vorläufer des invasiven Karzinoms darstellen. Diese Vorläufer können sich in 10-30% der Fälle zum invasiven Zervixkarzinom weiterentwickeln, der zweithäufigsten Krebsform der Frau weltweit (WALBOOMERS *et al.*, 1999; EINSTEIN und GOLDBERG, 2002). Neuere Studien belegen, dass über 99% der invasiven Zervixkarzinome HPV-DNA enthalten. Dabei wurde in den meisten Fällen HPV16 (53%) gefolgt von HPV18 (15%) isoliert (MUNOZ, 2000). Diese und andere HPV-Typen, die augenscheinlich ein höheres onkogenes Potential besitzen, werden als Hochrisiko-Typen bezeichnet

(high risk) im Gegensatz zu denjenigen Typen, die offensichtlich ein sehr geringes onkogenes Potential bergen (low risk) wie HPV6 und 11.

Eine weitere große Untergruppe der PV umfasst HPV-Typen, die mit *Ev* assoziiert sind (MYERS *et al.*, 1997). *Ev* ist eine äußerst seltene, genetisch bedingte Hauterkrankung (JABLONSKA und MAJEWSKI, 1994) und zeichnet sich durch eine ausgeprägte Prädisposition für HPV-Infektionen aus, die zu lebenslang persistierenden, gutartigen Hautläsionen – wie flachen Warzen und makulären Läsionen – führen. Die genetische Prädisposition für diese Hautkrankheit wird autosomal rezessiv vererbt und konnte kürzlich einem DNA-Lokus auf Chromosom 17 zugeordnet werden (RAMOZ *et al.*, 2002). Mutationen in den Genen *EVER1* und *EVER2* können mit der Erkrankung assoziiert werden. Die Gene kodieren für Membranproteine unbekannter Funktion. In einem Zeitraum von 10-30 Jahren entwickeln sich am ganzen Körper Läsionen, die bei 30-60% der *Ev*-Patienten maligne entarten und zu Plattenepithelkarzinomen führen können (FUCHS und PFISTER, 1996). Obwohl sich in den benignen *Ev*-Läsionen etwa 20 verschiedene *Ev*-assoziierte Virustypen nachweisen lassen, treten in *Ev*-Karzinomen vorwiegend HPV5 oder 8 auf, was möglicherweise auf ein besonderes onkogenes Potential dieser Typen hinweist (PFISTER, 1992). Neuere Studien zeigen, dass *Ev*-assoziierte HPV nicht nur in Plattenepithelkarzinomen von *Ev*-Patienten, sondern auch in malignen, nicht-melanozytären Hauttumoren (NMSC) – zu denen Basaliome (BCCs) und Plattenepithelkarzinome (SCCs) gezählt werden – von Organtransplantatempfängern und immunkompetenten Patienten sowie in normaler Haut vorkommen (PFISTER und TER SCHEGGET, 1997; BOXMANN *et al.*, 1999; BERKHOUT *et al.*, 2000; HARWOOD *et al.*, 2000). Der nicht-melanozytäre Hautkrebs ist der häufigste maligne Tumor des Menschen (CORONA, 1996). Zu den Risikofaktoren beim NMSC zählen ein geschwächter Immunstatus, extensive Sonnenexposition, ein sensibler (heller) Hauttyp, ionisierende Strahlung, verschiedene chemische Karzinogene und das Alter der gefährdeten Person (BOUWES BAVINCK und BERKHOUT, 1997). Als wichtigster Risikofaktor gilt der Grad der natürlichen UV-Bestrahlung, da BCCs, SCCs und *Ev*-Tumore zumeist an lichtexponierten Körperstellen lokalisiert sind (JABLONSKA und MAJEWSKI, 1994).

Während humane PV eine rein epitheliale Proliferation verursachen, induziert u.a. BPV1 fibroepitheliale Tumoren. Im Gegensatz zu epithelialen Warzen entwickeln sich Fibropapillome schnell nach der PV Infektion (PFISTER, 1987). Da die Transformation von Fibroblasten schon früh *in vitro* reproduziert werden konnte und somit ein Zellkultursystem zur Verfügung stand, wurde BPV1 vor allem als Modellvirus für viele molekularbiologische Studien herangezogen.

1.4 Der Kapsid- und Genomaufbau

PV sind kleine, nicht-umhüllte, ikosaedrische DNA Viren mit einem Durchmesser von ca. 55nm und einem aus 72 Kapsomeren zusammengesetzten Kapsid. Sie besitzen ein kovalent geschlossenes, zirkuläres, doppelsträngiges

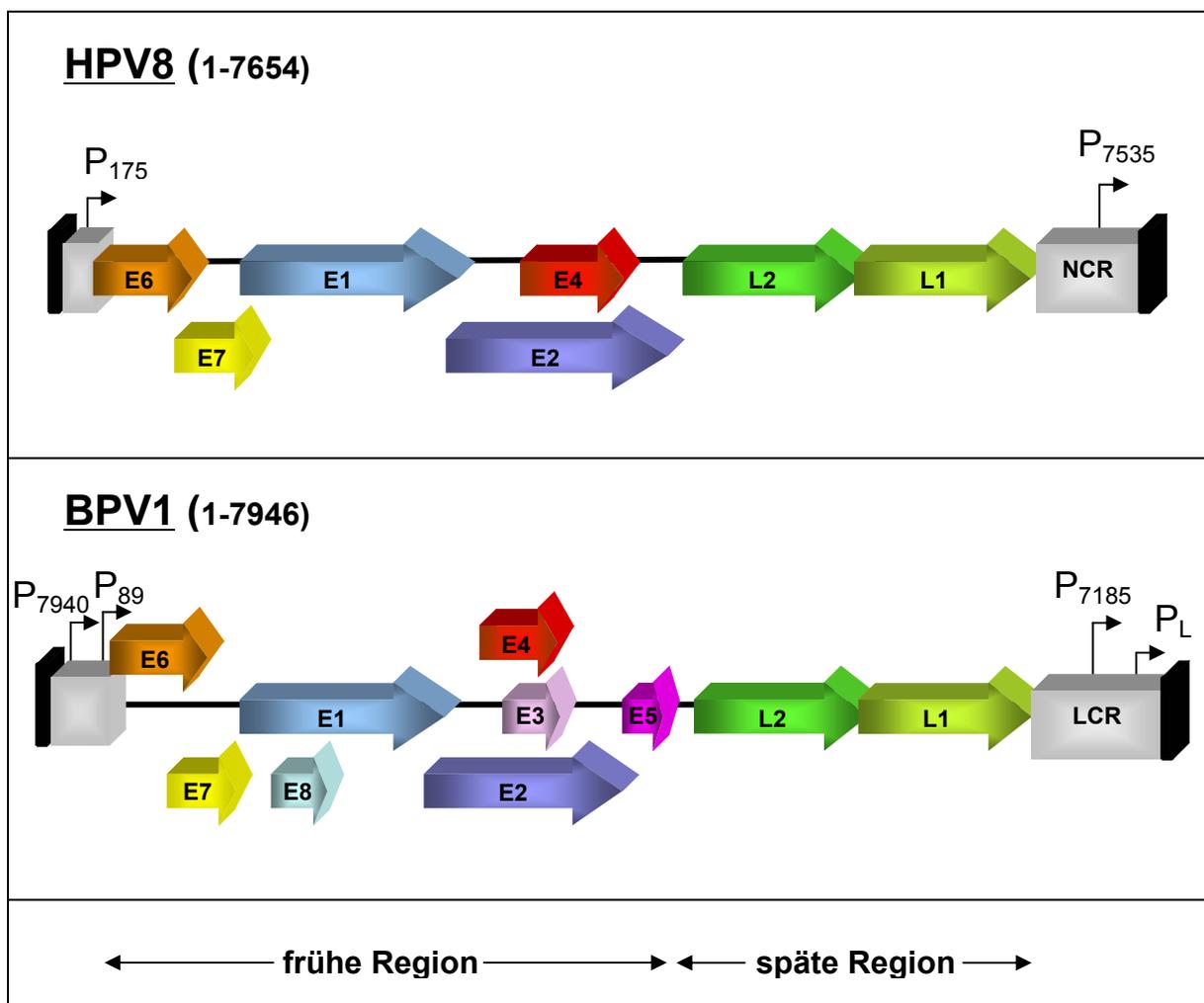


Abb. 2 Die Genomorganisation von HPV8 und BPV1
 Das Genom der PV wird zusätzlich zur NCR oder LCR in die frühe und späte Region unterteilt und wurde für die Darstellung innerhalb der NCR/LCR geöffnet. Die einzelnen ORF, deren Lage zueinander und die Promotoren sind dargestellt (modifiziert nach PFISTER und FUCHS, 1987).

Genom, welches etwa 7,000 - 8,000 Basenpaare (bp) umfasst (PFISTER, 1984) und in einer nukleosomenähnlichen Struktur mit zellulären Histonen assoziiert vorliegt (FAVRE *et al.*, 1977). Das Genom wird in einen kodierenden und einen nicht-kodierenden Bereich („non coding region“, NCR oder „long control region“, LCR) unterteilt. Der kodierende Bereich umfasst mindestens sieben offene Leserahmen (ORF), deren Produkte entsprechend ihrer Expression im viralen Lebenszyklus als frühe („early“, E) und späte („late“, L) Proteine bezeichnet werden (Abb.2). Während Produkte der späten Gene, L1 und L2, die Strukturproteine des Kapsids darstellen, erfüllen die Produkte der frühen Gene regulatorische Funktionen bei der Replikation, Transkription und Zelltransformation. Zwischen den offenen Leserahmen L1 und E6 befindet sich die NCR oder LCR, die bei allen bisher untersuchten PV die wichtigsten *cis*-Kontrollelemente für die Regulation der Transkription und Replikation des viralen Genoms enthält. Die Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Genomorganisation von HPV8 und BPV1. Alle ORFs liegen auf demselben DNA-Strang und sind trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen PV-Typen in ihrer Größe und Funktion innerhalb der PV gut konserviert (PFISTER und FUCHS, 1987). Die Transkription der polycistronischen mRNA erfolgt über mindestens zwei Promotoren, wobei durch alternatives Spleißen eine Vielzahl von Transkripten entsteht, die neben den vollständigen Proteinen auch für Fusionsproteine und verkürzte Formen kodieren können (BAKER, 1993). In der Regel erzeugt der frühe Promotor Transkripte für E5, E6, E7, E1 und E2, während der späte Promotor die Expression für L1 und L2 sowie für E1, E2 und E4 steuert (STUBENRAUCH und LAIMINS, 1999).

1.5 Die Funktion der viralen Genprodukte

L1, L2: Die Leserahmen für die L Proteine codieren für das Hauptstrukturprotein L1 mit etwa 57 kDa und für ein weiteres Strukturprotein L2 mit etwa 75 kDa. In den infektiösen Viren liegen die beiden Proteine in einem Verhältnis von etwa 30:1 vor. Durch intermolekulare Disulfidbrücken bilden die L1 Proteine Pentamere und sind so in der Lage, ikosaedrische Partikel zu bilden. Dabei erhöht die Inkorporation von L2 augenscheinlich die Infektiosität der Viren (MODROW, 2003).

E4: Die Funktion dieses Proteins ist wenig verstanden. Der E4 Leserahmen besitzt kein eigenes Startcodon. Durch alternatives Spleißen wird hauptsächlich ein

E1^{E4}-Transkript gebildet, welches nur wenige Nukleotide des E1-Leserahmens enthält und bei HPV1 für ein 17 kDa großes Zinkfingerprotein (ROBERTS *et al.*, 1994), bei HPV11 für ein 11 kDa großes Protein (MODROW, 2003) kodiert. Obwohl E4 im Bereich der frühen Gene kodiert ist, wird es erst spät im viralen Lebenszyklus exprimiert. Das Phosphoprotein lokalisiert zytoplasmatisch und ist mit Zytokeratin assoziiert. Es scheint so in der Lage zu sein, den Zusammenbruch der Zytokeratinmatrix zu induzieren und damit die Freisetzung der reifen Virionen zu begünstigen (DOORBAR *et al.*, 1991).

E5, E6, E7: Diese drei Onkoproteine vermitteln ihre Funktionen über Protein-Protein-Wechselwirkungen u.a. mit Tumorsuppressorproteinen der Wirtszelle. Um die Replikation zu ermöglichen, heben die Genprodukte dieser drei ORFs den G₁-Zellzyklusblock auf und induzieren den Eintritt von differenzierenden Zellen in die S-Phase. (SMOLA-HESS und PFISTER, 2002).

Das **E5** Protein ist innerhalb der PV-Familie nur wenig konserviert, bei HPV8 fehlt es sogar (FUCHS *et al.*, 1986). Der Leserahmen kodiert für 40-99 Aminosäuren (AS) große, hydrophobe Polypeptide, die hauptsächlich im Golgi-Apparat und der Plasmamembran lokalisiert sind (BURKHARDT *et al.*, 1989; CONRAD *et al.*, 1993). E5 bildet Homodimere, die mit dem ebenfalls in der Zytoplasmamembran verankerten PDGF- β (*platelet-derived growth factor* β)-Rezeptor und EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptor interagieren und diese in ligandenunabhängiger Weise aktivieren. Somit können durch E5 entsprechende Signaltransduktionswege stimuliert werden (PIM *et al.*, 1992; LEECHANACHAI *et al.*, 1992).

E6 und **E7** sind in der Lage unabhängig voneinander immortalisierte Zellen zu transformieren (HALBERT *et al.*, 1991; SEDMAN *et al.*, 1991; PHELPS *et al.*, 1988). Während die E6 und E7 Proteine von genitalen Hochrisiko-HPV notwendig und ausreichend für die Immortalisierung primärer epithelialer Zellen sind (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1989), weist bei den *Ev*-assoziierten HPV lediglich das E6 Protein ein effizient transformierendes Potential auf (IFTNER *et al.*, 1988; SCHMITT *et al.*, 1994). E6 Proteine der *Ev*-assoziierten Typen 5, 8 und 47 sind zwar in der Lage, Rattenfibroblasten zu transformieren, können jedoch keine humanen Keratinozyten immortalisieren (IFTNER *et al.*, 1988; KIYONO *et al.*, 1989, 1992; PFISTER, 1992; SCHMITT *et al.*, 1994). Mittels *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass mRNA, welche E6 und E7 Proteine kodiert, in HPV-Tumoren im Vergleich zu gutartigen Proliferationen verstärkt vorliegt (HIGGINS *et al.*, 1992; IFTNER *et al.*, 1992;

STOLER *et al.*, 1992; HALLER *et al.*, 1995). Diese erhöhte Expression beider Gene wird als eine der Ursachen für die Entartung der Tumoren bei einer HPV-Infektion gesehen (CHOW und BROKER, 1997).

Der **E6** Leserahmen kodiert für ein 16-18 kDa großes Phosphoprotein, das im Nukleus und in nicht-nukleären Membranen zu finden ist (GROSSMAN *et al.*, 1989; GAO *et al.*, 2000). Das E6 Protein der high-risk anogenitalen HPV interagiert mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 (WERNESSE *et al.*, 1990) (s. a. Kapitel 1.9) und führt es dem Ubiquitin-abhängigen Abbau zu. Nach Bindung des E6 Proteins an die Ubiquitinligase E6-AP (*E6 associated protein*) fungiert dieser Komplex als Ubiquitin-Protein-Ligase bei der Degradation des p53 durch das Proteasom (SCHEFFNER *et al.*, 1990, 1993). Dergestalt können p53-abhängige Regulationswege, wie z.B. die Einleitung der Apoptose, inhibiert werden und somit zu genetischer Instabilität mit erhöhtem Risiko einer Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen (THOMAS und LAIMINS, 1998, SOMASUNDARAM, 2000). Die E6 Proteine der kutanen HPV-Typen interagieren weder mit p53 oder E6-AP noch degradieren sie p53 (STEGER und PFISTER, 1992; ELBEL *et al.*, 1997). Somit könnte sich das onkogene Potential der E6 Proteine der kutanen HPV-Typen auf einem anderen, bisher noch wenig bekannten Weg darstellen.

Das **E7** Protein ist ein etwa 11 kDa großes Zinkfingerprotein und hauptsächlich im Zellkern der infizierten Zellen lokalisiert. Es befindet sich jedoch auch in geringen Mengen im Zytoplasma (ZWERSCHKE *et al.*, 1996; SATO *et al.*, 1989; SMOTKIN und WETTSTEIN, 1987). E7 interagiert mit dem Retinoblastom Protein pRb (DYSON *et al.*, 1989) und führt über den Ubiquitin-abhängigen Abbau zu dessen Degradation, worauf das transformierende Potential von E7 maßgeblich zurückgeführt wird (GONZALES *et al.*, 2001; JONES und MÜNGER, 1997). Die E7-Proteine der low-risk genitalen und der *Ev*-assoziierten PV binden mit deutlich geringerer Affinität an pRb (IFTNER *et al.*, 1988; KIYONO *et al.*, 1989; SCHMITT *et al.*, 1994). Das nach der Mitose dephosphorylierte pRb bindet den zellulären Transaktivator E2F, wodurch dieser inaktiviert und der Eintritt der Zelle in die S-Phase verhindert wird. Interagiert E7 jedoch mit dem dephosphorylierten pRb, kann dieses nicht mehr mit E2F wechselwirken und die Transkription der Gene, die von E2F-abhängigen Promotoren kontrolliert werden, wird induziert (ARMSTRONG und ROMAN, 1997), was eine unkontrollierte Zellteilung zur Folge hat (JONES *et al.*, 1997). Darüber hinaus bindet E7 die zyklinabhängigen-Kinase(CDK)-Inhibitoren p21^{CIP1} und

p27^{KIP1}, welche die Replikation verhindern, und inhibiert deren Funktion (TUREK *et al.*, 1994; SCHULZE *et al.*, 1995; OHTANI *et al.*, 1995; zusammengefasst in MÜNGER *et al.*, 2001).

E1: Abhängig vom Virustyp kodiert der Leserahmen E1 für ein 68 – 85 kDa großes, hochkonserviertes, kernlokalisiertes Protein, welches in seiner aktiven Form phosphoryliert ist (SUN *et al.*, 1990). Durch die Interaktion mit E2 und dessen Bindung an benachbarte E2-Erkennungssequenzen wird die sequenzspezifische, jedoch schwach affine Bindung von E1 an den Replikationsursprung des PV-Genoms stabilisiert (HOLT *et al.*, 1994; FRATTINI und LAIMINS, 1994; SEDMAN und STENLUND, 1995). Daraufhin können sich weitere E1 Proteine zu einem hexameren Komplex zusammenlagern, währenddessen E2 aus diesem entlassen wird. Das E1-Hexamer besitzt Helikase- und ATPase-Aktivität und rekrutiert die für die DNA-Synthese wichtigen zellulären Replikationsfaktoren (YANG *et al.*, 1993; KUO *et al.*, 1994; SANDERS und STENLUND, 1998; STUBENRAUCH und LAIMINS, 1999; WILSON *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass zur Einleitung der Replikation die Phosphorylierung von E1 durch CyclinE-Cdk2 – ein Zellzyklusregulatorprotein – notwendig ist (CUEILLE *et al.*, 1998). Die DNA-Replikation der HPV in differenzierendem Epithelgewebe wird in drei Stadien eingeteilt. Unmittelbar nach der Infektion wird das virale Genom bis zum Erreichen einer bestimmten Kopienanzahl in den Basalzellen des Epithels repliziert (Amplifikations-Phase). Darauf folgend werden die Plasmide während der S-Phase des Zellzyklus einmal dupliziert („maintenance“-Phase). Auf diese Weise werden die Persistenz und die latente Infektion der Zellen gesichert. Schließlich wird in den differenzierten Epithelzellen eine große Anzahl an Virusgenomen produziert („vegetative“ Replikations-Phase) und in Viruskapside verpackt (HOWLEY und LOWY, 2001). Dabei sind die Mechanismen, die diesen Phasenwechsel steuern, nicht geklärt.

E2: Der E2 Leserahmen kodiert für ein nukleäres, multifunktionales, DNA-bindendes Phosphoprotein mit einer Größe von 43 – 56 kDa. Das E2 Protein besitzt einen für die meisten Transkriptionsfaktoren typischen modularen Aufbau mit zwei funktionell trennbaren Domänen. Im N-terminalen Bereich liegt die Transaktivierungsdomäne (AD), während der C-Terminus eine DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne (DBD) enthält. Die N- und C-terminalen Regionen sind unter PV gut konserviert (35% Homologie; McBRIDE und MYERS, 1996) und werden von einer wenig konservierten und in ihrer Größe stark variierenden, flexiblen Region

(„hinge“ – H) verbunden (MCBRIDE *et al.*, 1991), die Kernlokalisierungssignale enthalten kann (GIRI und YANIV, 1988; ANDROPHY *et al.*, 1987b; ZOU *et al.*, 2000; HADASCHIK, 2002). Die E2 H-Domäne der *Ev*-assoziierten HPV ist vergleichsweise groß und erfüllt Funktionen bei der Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren sowie vermutlich beim Spleißprozess (STEGGER *et al.*, 2002; LAI *et al.*, 1999). Das E2 Protein bindet mit seiner DBD als Dimer an die palindromische Konsensussequenz 5'-ACC(N)₆GGT-3' (ANDROPHY *et al.*, 1987), die mehrfach im viralen Genom vorhanden ist (STEGGER *et al.*, 1996). Die E2 Bindestelle (E2 BS) ist unter den einzelnen PV-Typen hochkonserviert, wobei deren Anzahl in der NCR/LCR innerhalb der PV stark variiert. Das Protein kann die virale Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren (Kapitel 1.6). Neben den regulatorischen Aktivitäten bei der Transkription ist E2 auch in der Lage, das Zellwachstum in der G₁-Phase zu blockieren sowie Zellalterung und Apoptose über p53 und Caspase 8 auszulösen. Somit könnte E2 die durch E6 und E7 gestörte Zellzykluskontrolle in den oberen Epithelschichten wiederherstellen. Der hierfür zu Grunde liegende Mechanismus ist noch unklar (DESAINTEs *et al.*, 1997, 1999; DOWHANICK *et al.*, 1995; WELLS *et al.*, 2000; WEBSTER *et al.*, 2000; DEMERET *et al.*, 2003). Weiterhin spielt das E2 Protein auch eine Rolle bei der Verpackung von Virus-DNA in Kapside (DAY *et al.*, 1998) und – wie bereits erwähnt – bei der effizienten Aktivierung der Replikation des viralen Genoms im Zusammenspiel mit E1 (MOHR *et al.*, 1990).

Im Gegensatz zu E2 Proteinen von genitalen Hochrisiko-HPV wurde für HPV8 E2 zelltransformierendes Potential gezeigt (IFTNER *et al.*, 1989). Der Mechanismus hierfür ist ebenfalls noch nicht geklärt. Die transformierenden Eigenschaften des E2 Proteins sind von einer intakten AD abhängig, so dass der transformierende Effekt möglicherweise auf einer transkriptionellen Fehlregulierung wichtiger Wachstumskontrollgene beruht (FUCHS *et al.*, 1993).

Überdies ist BPV1 E2 in der Lage, über seine AD an mitotisches Chromatin zu binden und damit die Segregation der an der DBD gebundenen viralen DNA bei der Zellteilung zu gewährleisten (SKIADOPOULOS und MCBRIDE, 1998).

1.6 Die virale Transkription

Die LCR/NCR enthält verschiedene *cis*-regulatorische Kontrollelemente, die die Genexpression und Replikation des Virusgenoms steuern (Abb. 3). Die nicht-kodierenden Bereiche eng verwandter PV ähneln sich sehr, während sich große Unterschiede zwischen Vertretern mit unterschiedlicher Gewebespezifität zeigen. Die NCR von HPV8 ist mit nur 400 bp etwa halb so groß wie die LCR der genitalen HPV und des BPV1 (FUCHS *et al.*, 1986; KRUBKE *et al.*, 1987; FUCHS *et al.*, 1993). Der frühe Promotor von HPV8 (P₁₇₅) befindet sich – wie auch bei anderen PV – am 3'-Ende der NCR unmittelbar vor dem E6-ORF. Die Lage des späten Promotors ist dagegen nicht konserviert und liegt bei HPV8 innerhalb der NCR (P₇₅₃₅). Von diesem werden neben den Transkripten, welche für die beiden Kapsidproteine L1 und L2 kodieren, auch die für E2 initiiert (STUBENRAUCH *et al.*, 1992). Innerhalb der Kontrollregionen befinden sich neben den BS für das virale E2 Protein zahlreiche

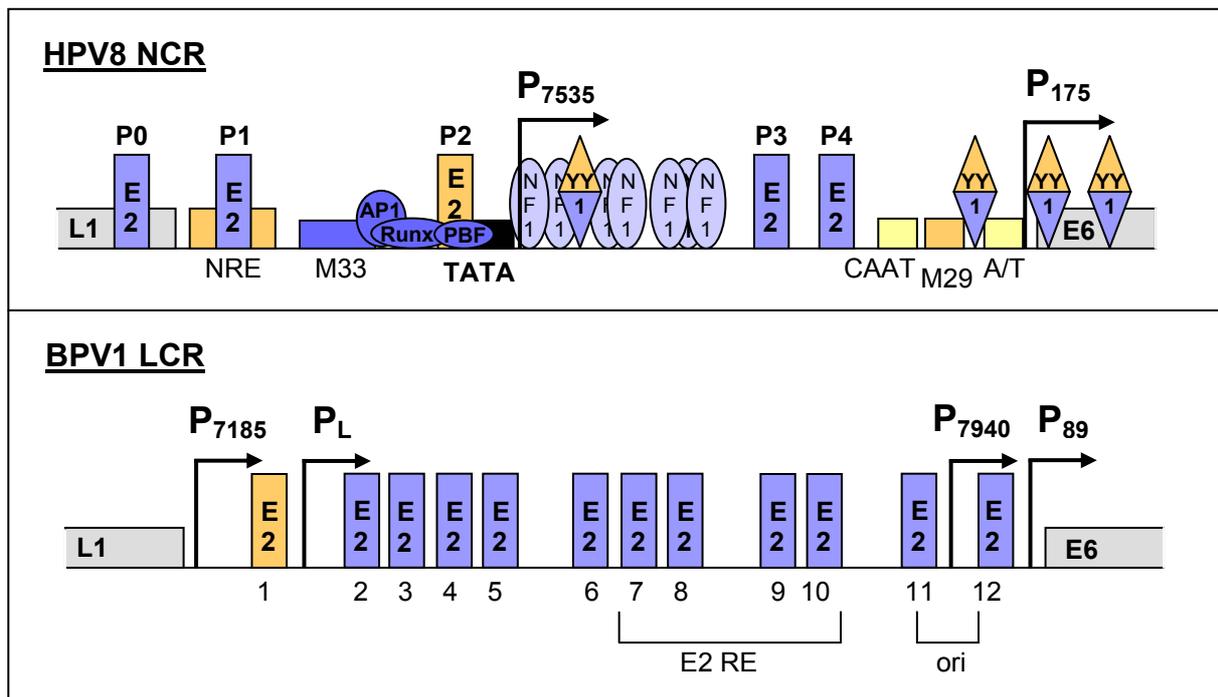


Abb. 3 Schematische Darstellung der NCR von HPV8 und der LCR von BPV1

Konservierte E2 BS sind bei HPV8 mit P0 bis P4, bei BPV1 mit 1 bis 12 gekennzeichnet. Weiterhin wurden Sequenzmotive wie M33, die CAAT-Box, M29 und die A/T-reiche Region, das negativ regulierende Element (NRE) sowie Bindestellen einiger zellulärer Transkriptionsfaktoren dargestellt, dabei steht die Farbe blau für aktivierende, die Farbe orange für reprimierende Elemente. Pfeile stehen für Promotoren, wobei der Index der Promotorkennung der Nukleotidposition entspricht (nach FUCHS und PFISTER, 1996).

Aufgrund der großen Anzahl an E2 BS in der BPV1 LCR wurde hier auf die Darstellung von BS für zelluläre Transkriptionsfaktoren verzichtet. Das E2 Enhancer Element (E2 RE = E2 „responsive element“) beinhaltet die E2 BS 7 bis 10.

Erkennungssequenzen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, die unter anderem ein gewebespezifisches Verstärkerelement (Enhancer) bilden, welches nur in epithelialen Zellen aktiv ist. Hier üben Faktoren wie AP-1, NF-1, Sp1 und Oct-1 einen transaktivierenden Einfluss aus, während z.B. YY1 reprimierend wirkt. Die meisten Studien zu diesen Faktoren wurden in mukösen HPV durchgeführt (DESAINTEs und DEMERET, 1996; O'CONNOR 1996; FUCHS und PFISTER, 1994 und 1996). Die HPV8 NCR enthält fünf E2 BS (P0 – P4) sowie die innerhalb der mit *Ev*-assoziierten HPV hochkonservierten Sequenzmotive M29 und M33 (bestehend aus 29 bzw. 33 Nukleotiden), eine CAAT-Box und eine 50 bp lange A/T-reiche Region (FUCHS und PFISTER, 1996). Stromaufwärts des späten Promotors befindet sich ein 38 bp umfassendes negativ regulierendes Element (NRE), welches mit der E2 BS 1 überlappt und den späten Promotor reprimiert (MAY *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass das M33-Motiv in Verbindung mit der proximalen AP1-Bindestelle einen konstitutiven Enhancer des späten Promotors darstellt (HORN *et al.*, 1993). Weiterhin wirken M29 und nach Bindung von E2 auch das P2-Palindrom negativ auf den späten Promotor (STUBENRAUCH und PFISTER, 1994).

E2 moduliert die virale Genexpression, wobei es bei Bindung an seine Erkennungssequenz sowohl aktivieren als auch reprimieren kann. Die Position der E2 BS innerhalb der NCR/LCR relativ zu Erkennungssequenzen für positiv wirkende zelluläre Transkriptionsfaktoren ist hierbei für den jeweiligen Effekt verantwortlich (STEGER *et al.*, 1993; THIERRY, 1993; GARRIDO-GUERRO *et al.*, 1996). Unterschiedliche Affinitäten zu seinen BS bedingt durch variable Nukleotide im Zentrum erlauben dem E2 Protein eine dosisabhängige Regulation der Genexpression (STUBENRAUCH *et al.*, 1994; BOUVARD *et al.*, 1994; STEGER und CORBACH, 1997). Z.B. aktiviert HPV8 E2 den späten Promotor über die Bindung an die hochaffinen BS P0, P1, P3 und P4. Die niedrigaffine promotorproximale BS P2 überlappt mit Erkennungssequenzen für die zellulären Faktoren RUNX1 und PBF, welche beide die Basalaktivität des späten Promotors positiv regulieren (SCHMIDT *et al.*, 1997; BOECKLE *et al.*, 2002). Die Bindung von E2 an P2 führt dabei zur Verdrängung der zellulären Faktoren und damit zur Repression. Darüber hinaus resultiert dies in einer negativen Rückkopplung, da der späte Promotor auch die Expression des E2-Proteins reguliert (STUBENRAUCH *et al.*, 1996). Innerhalb der LCR von BPV1 befinden sich 12 E2 BS (Abb.3) unter welchen einige ein E2-abhängiges Verstärker-Element bilden (E2 RE).

Durch das vollständige E2 Protein werden mehrere Promotoren aktiviert (P_{7940} , P_{89} , P_{2443} , P_{3080}) (SPALHOLZ *et al.*, 1985, 1987 und 1991; VANDE POL und HOWLEY, 1990; BARKSDALE und BAKER, 1993), während die Bindung von E2 an die niedrigaffine BS 1 den P_{7185} reprimiert (LI *et al.*, 1989; STENLUND und BOTCHAN 1990; VANDE POL und HOWLEY, 1990). Die umgebenden Sequenzen der Repression vermittelnden BS 1 aus BPV1 und P2 aus HPV8 sind hoch konserviert und es konnte gezeigt werden, dass RUNX1 und PBF auch an die BPV1 BS 1 binden (SCHMIDT *et al.*, 1997; BOECKLE *et al.*, 2002).

E2 benötigt zur Aktivierung der Transkription seine N-terminale AD. Deren Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren wie TBP, TFIIB, Sp1, AMF-1/Gps2 und p300/CBP könnte hierfür essentiell sein (LI *et al.*, 1991; HAM *et al.*, 1991; USHIKAI *et al.*, 1994; RANK und LAMBERT *et al.*, 1995; STEGER *et al.*, 1995; BENSON *et al.*, 1997; BREIDING *et al.*, 1997; YAO *et al.*, 1998a; MÜLLER 2003; LEE *et al.*, 2000; PENG *et al.*, 2000). So ist z.B. BPV1 E2 in der Lage, die Transkription in Kooperation mit zellulären Faktoren wie AP-1, Oct-1 und TEF-1 zu stimulieren (USHIKAI *et al.*, 1994). LI *et al.* konnten überdies früh zeigen, dass eine kooperative Aktivierung der Transkription durch E2 und SP1 für die effiziente Aktivierung der BPV1 Genexpression essentiell ist (LI *et al.*, 1991).

Zusätzlich zur sequenzspezifischen DNA-Bindung kann das E2 Protein über Wechselwirkungen mit zellulären Transkriptionsfaktoren an zelluläre Promotoren gebracht werden und Promotoren, die keine E2 BS aufweisen, aktivieren. Die AD von BPV1 E2 ist hierfür ausreichend (HAUGEN *et al.*, 1988; HEIKE *et al.*, 1989). Sp1 ist z.B. in der Lage, das E2 Protein von HPV8 an den p21-Promotor zu rekrutieren, welcher daraufhin aktiviert wird (STEGER *et al.*, 2002).

Neben der Kooperation um DNA-Bindung mit positiv regulierenden zellulären Faktoren durch das vollständige E2 Protein, kann E2 die PV Genexpression auch durch N-terminal verkürzte Formen hemmen. Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht geklärt. MCBRIDE *et al.* konnten zeigen, dass N-terminal verkürzte BPV1 E2 Proteine Homodimere bilden und so mit dem Wildtyp(wt)-E2 um die DNA-Bindung kompetieren. Weiterhin ist ebenso die Entstehung von inaktiven Heterodimeren bestehend aus vollständigen E2 Proteinen möglich (MCBRIDE *et al.*, 1991). Das

molare Verhältnis der wt-Form zu der deletierten Variante wird zellzyklusspezifisch reguliert (YANG *et al.*, 1991) und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Modulation der viralen Genexpression. Andere Studien belegen, dass durch alternatives Spleißen E2 Proteine entstehen können, welche N-terminal einen aus 11 AS bestehenden Anteil des E8 Proteins anstelle der E2 AD tragen (E8^ΔE2-TR) und so ebenfalls nach Bindung an promotordistale BS als Transrepressor fungieren können. Der Mechanismus hierfür ist bisher nicht bekannt (STUBENRAUCH *et al.*, 2001).

Die Regulation der Transkription durch E2 ist vermutlich auch auf chromatinmodulierende Eigenschaften zurückzuführen. So konnte einerseits gezeigt werden, dass die Aktivierung der Transkription durch E2 mit einer Auflockerung des Chromatins stromaufwärts der E2 BS einhergeht (LEFEBVRE *et al.*, 1997) und dass weiterhin die AD für eine effiziente Bindung der promotorproximalen BS in der chromatinverpackten HPV16 LCR notwendig ist (NISHIMURA *et al.*, 2000). Zusätzlich hat auch der Zustand des Chromatins selbst einen Einfluss auf die Aktivität des E2 Proteins. Liegt das HPV-Genom im Wirtsgenom integriert vor, kann HPV16 E2 den P₉₇-Promotor reprimieren, was nicht möglich ist, wenn die virale DNA episomal in dichterem Chromatin-Verpackung vorliegt (BECHTOLD *et al.*, 2003). Diese Studien weisen auf direkte oder indirekte Interaktionen der AD mit chromatinmodulierenden Faktoren wie z.B. den Histon-Acetyl-Transferasen p300/CBP oder p/CAF (LEE *et al.*, 2000a; 2002) hin, durch die E2 dem inhibitorischen Effekt der in Nukleosomen verpackten DNA entgegenwirken könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass HPV8 E2 und p300 bei der Aktivierung der HPV8 Genexpression kooperieren (Müller, 2003). Da auch in der vorliegenden Arbeit die Kooperativität zwischen HPV8 E2 und p300 eine Rolle spielt, wird der Koaktivator hier detaillierter vorgestellt.

1.7 Der zelluläre Koaktivator p300

Das Phosphoprotein p300 und das homologe CBP (*CREB Binding Protein*) sind etwa 270 kDa groß und ubiquitär exprimiert. Sie dienen bei der Transkription als Koaktivatoren und sind als solche an physiologischen Prozessen wie Proliferation,

Differenzierung und Apoptose beteiligt (GOODMAN und SMOLIK, 2000). p300 besitzt drei cystein- und histidinreiche Regionen (C/H1, C/H2 und C/H3) sowie eine KIX-Domäne, an welche eine Vielzahl von zellulären und viralen Faktoren binden. Eine wichtige enzymatische Funktion stellt die Histon-Acetyl-Transferase-(HAT)-Aktivität dar (CHAN und LA THANGUE, 2001; OGRYZKO *et al.*, 1996). Mit Hilfe seiner HAT-Domäne, die im mittleren Bereich des Proteins liegt, vermag p300 sowohl Histone als auch nicht-Histon Proteine zu acetylieren. Neben dieser intrinsischen besitzt p300 durch Bindung an p/CAF, SRC1 und ACTR auch assoziierte HAT-Aktivität (YAO *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1997). Die Acetylierung der N-terminalen Lysin-Reste von in Nukleosomen organisierten Histonen kann internukleosomale Interaktionen schwächen und somit geordnete Chromatin-Strukturen destabilisieren (TSE *et al.*, 1998). Da die positive Ladung der Histone durch die Acetylierung neutralisiert wird, was mit einem Verlust ihrer Affinität zur DNA einhergeht (VETTESE-DADEY *et al.*, 1996), erhalten Transkriptionsfaktoren so möglicherweise einen besseren Zugang zu ihren Erkennungssequenzen. Weiterhin könnte die Acetylierung die Prozessivität der RNA-Polymerase durch die mit Nukleosomen assoziierte DNA erhöhen (NIGHTINGALE *et al.*, 1998).

Die Einleitung der Transkription benötigt neben der basalen Transkriptions-Maschinerie in der Regel sequenzspezifisch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren. Es wird angenommen, dass p300 als Brückenprotein Effekte zwischen beiden vermittelt, indem es einerseits mit DNA-bindenden Transaktivatoren und andererseits mit Faktoren des Präinitiationskomplexes (PIC) wie TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIIF und RHA interagiert (CHAN und THANGUE, 2001; NAKAJIMA *et al.*, 1997). Diese Faktoren könnten dann über p300 effizienter an den Zielpromotor rekrutiert und innerhalb des PIC stabilisiert werden.

1.8 Das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53

Neben dem E2 Protein wurde innerhalb dieser Arbeit noch ein weiterer Aktivator der Transkription – das zelluläre p53 – untersucht. Das humane p53 Gen kodiert für ein multifunktionales, nukleäres Phosphoprotein, das u.a. an der Steuerung der Apoptose und des Zellzyklusblocks beteiligt ist. In ca. 50 bis 60% aller menschlichen Tumoren liegt p53 genetisch verändert vor, weshalb das Protein unter allen bisher bekannten Tumorsuppressoren eine besondere Rolle einnimmt. Die

Mutationen, die in menschlichen Tumoren gefunden werden, betreffen hauptsächlich innerhalb der DBD Proteindomäne vier hochkonservierte Regionen (GREENBLATT *et al.*, 1994; WALKER *et al.*, 1999). Die Mutationen können hier die Konformation und Stabilität des p53 Proteins offenbar entscheidend verändern.

Zellen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus können von p53 in seiner aktivierten Form arretiert werden, um eine Reparatur von DNA-Schäden vor der DNA-Replikation zu gewährleisten (LANE, 1992). Dabei stimuliert p53 die Synthese von p21, das die Funktion Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) inhibiert, durch welche über Phosphorylierung der Übergang zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen gesteuert wird (EL-DEIRY *et al.*, 1993; DULIC *et al.*, 1994; KO und PRIVES, 1996). In vielen Tumoren ist eine Veränderung des p53-Gens die Ursache für die unkontrollierte Proliferation der Zellen (HOLLSTEIN *et al.*, 1994). Alternativ führt bei einem irreparablen DNA-Schaden die Apoptose zur Elimination der geschädigten Zelle (CANMAN und KASTAN, 1996). p53 unterdrückt die Synthese des Bcl-2 Proteins, welches Apoptose-inhibierende Funktionen ausübt, und stimuliert die Synthese des Apoptose-fördernden Proteins bax.

Für die Aktivierung der Transkription muss p53 als Tetramer sequenzspezifisch an das zweimal vorkommende DNA-Motiv 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' binden (EL-DEIRY *et al.*, 1992). Es wurde gezeigt, dass die p300/CBP Koaktivator Familie mit p53 interagiert und dessen sequenzspezifische DNA-Bindung stimuliert (Gu und Roeder, 1997; Gu *et al.*, 1997). Somit repräsentiert p53 einen weiteren Aktivator der Transkription, welcher mit p300 kooperiert, was auch hier zur effizienten Aktivierung der Transkription beiträgt.

1.9 Das Nucleosome Assembly Protein

Die Nucleosome Assembly Proteine 1 und 2 (NAP-1 und -2) sind in eukaryoten Zellen universal exprimierte, konservierte molekulare Histon-Chaperone. Die Größen der Proteine liegen zwischen 40 und 55 kDa. Es wurde beschrieben, dass das humane NAP-1 (hNAP-1) und das NAP-1 der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (dNAP-1) und das der Hefe (yNAP-1) die Core-Histone H2A und H2B und das Dimer bestehend aus beiden Histonen *in vitro* und *in vivo* binden können, wobei ebenfalls eine Affinität zum H3-H4-Tetramer besteht (MCBRYANT *et al.*, 2003). Mit Hilfe dieser Histon-Bindung trägt NAP zur Formation der Nucleosomen-Struktur

(*Nucleosome Assembly*) bei, indem es als „Shuttle-Protein“ zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern Histone zur neu replizierten DNA bringt. (ISHIMI *et al.*, 1984, 1987 und 1991, BULGER *et al.*, 1995; ITO *et al.*, 1996; MOSAMMAPARAST *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 1997). Es wurde weiterhin gezeigt, dass der Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) die Histone H3 und H4 bindet und hier die entsprechenden Funktionen erfüllt (SMITH und STILLMAN, 1991; KAMAKAKA *et al.*, 1996; ADAMS und KAMAKAKA, 1999). Für die Ausbildung geordneter, regelmäßiger Nukleosomen *in vitro* ist jedoch neben Histon-Chaperonen wie NAP-1 und/oder CAF-1 ein weiterer Faktor – ACF (*ATP-utilizing Chromatin Assembly Factor*) – essentiell. Dieser besteht aus vier Polypeptiden, wobei das größte eine Nukleosomen-abhängige ATPase ist. Der Mechanismus und die Rolle des ATP in diesem Zusammenhang sind noch nicht bekannt (ITO *et al.*, 1997; ADAMS und KAMAKAKA, 1999; KRUDE und KELLER, 2001; NAKAGAWA *et al.*, 2001).

Neuere Studien verdichten Hinweise auf eine Rolle von Histon-Chaperonen bei der Aktivierung der Transkription. So konnte gezeigt werden, dass Histon-Chaperone *in vitro* die Bindung von Transkriptionsfaktoren (Gal4-AH, USF=*Upstream Stimulatory transcription Factor* und Sp1) an nukleosomale DNA stimulieren und somit ebenfalls bei der Destabilisierung von Nukleosomen eine Rolle spielen (CHEN *et al.*, 1994; WALTER *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 2000). Dabei erleichtert die Acetylierung von Histonen durch p300 deren Übertragung auf NAP (ITO *et al.*, 2000). hNAP-1 und hNAP-2 binden p300 *in vitro* und sind gemeinsam mit diesem in der Lage, die Genexpression durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie E2F und p53, welche p300 als Koaktivator nutzen, zu stimulieren (SHIKAMA *et al.*, 2000). Dabei steigt die Formation von NAP-1-p300-Komplexen in der S-Phase des Zellzyklus (ASAHARA *et al.*, 2002).

1.10 Das Ziel der vorliegenden Arbeit

Obwohl das E2 Protein bisher intensiv untersucht wurde, ist seine Funktion im viralen Lebenszyklus noch nicht verstanden. Um die Rolle von E2 als Regulator der PV Transkription besser zu verstehen, sollte systematisch nach zellulären Proteinen gesucht werden, die mit E2 interagieren. In einem in unserem Haus von Herrn Dr. Hanns-Martin Schmidt etablierten Yeast *two-Hybrid* System wurde unter anderem das hNAP-1 als Interaktionspartner für BPV1 E2 identifiziert. Diese Wechselwirkung

konnte in Hefe mit an die Gal4-Bindedomäne fusioniertem BPV1 E2 und an die Gal4-AD fusioniertem hNAP-1 bestätigt werden, was ebenfalls mit einer E2 Mutante, der die H-Region fehlt, möglich war. Weiterhin konnte von Herrn Schmidt innerhalb seiner Dissertation gezeigt werden, dass an die Glutathione-S-Transferase (GST) fusioniertes hNAP-1 mit den *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten E2 Proteinen von BPV1, HPV8 und HPV18 interagiert. Diese Interaktion ließ sich im Fall von BPV1 auf die AD des E2 Proteins (BPV1 E2 AS 1-203) eingrenzen. (SCHMIDT, 1999). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war neben dem *in vivo* Nachweis der Interaktion zwischen hNAP-1 und den E2 Proteinen eine weiterführende Charakterisierung dieser Wechselwirkung. Hierfür sollten die beteiligten essentiellen Regionen innerhalb des NAP Proteins herausgearbeitet und in diesem Zusammenhang auch die funktionelle Bedeutung der Bindung von E2 für die Regulation des PV Lebenszyklus geklärt werden. Analysen mit möglichen weiteren zellulären Interaktionspartnern, welche an dieser Funktion beteiligt sein könnten, sollten weiteren Aufschluss über die Aufgabe des NAP Proteins bei der Aktivierung der Transkription geben.

2. MATERIAL

2.1 Bakterienstämme

- ***Epicurian coli*® XL1-Blue**

Genotyp: recA1, endA1, gyr96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac^qZΔM15 Tn10(Tet^r)] (Stratagene, La Jolla, USA) – für Klonierungen

- ***Escherischia coli* DH5α-T1®**

Genotyp: F⁻, φ80lacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, tonA (Invitrogen, Groningen, Niederlande) – für Klonierungen

- ***Epicurian coli*® BL21(DE3)pLysS**

Genotyp: B, F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B-m_B), gal, λ(DE3), [pLysS Cam^r] (Stratagene, La Jolla, USA) – für Proteinexpressionen

2.2 Eukaryote Zellen

- **RTS3b**

Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus einer *Ev*-ähnlichen Läsion eines Nieren-Transplantat Empfängers; ursprünglich HPV5 und HPV8 positiv, nach mehreren Passagen HPV-negativ (PURDIE *et al.*, 1993)

- **NHEK-neo**

Normal Human Epidermal Keratinocytes - neonatal

„gepoolte“ primäre neonatale normale humane epidermale Keratinozyten der 1. Passage (Bio-Whittaker, Walkersville, USA)

- **293T (ATCC: CRL-1573)**

Humane embryonale, renale, Adenovirus transformierte Epithelzelllinie – exprimiert E1A und das SV40 T-Antigen (NUMA *et al.*, 1995)

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von den Firmen Eurogentec (Brüssel, Belgien), Interactiva (Ulm) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zahlenangaben entsprechen den Positionen der Aminosäuren im Protein (ausgenommen Oligonukleotide für die PCR des Chromatin-Immunpräzipitations-experimentes, hier entsprechen die Zahlen der jeweiligen Nukleotidposition innerhalb der veröffentlichten Sequenz pALuc). Enzymschnittstellen sowie Punktmutationen sind fett dargestellt. Stop- und Startcodons wurden unterstrichen. Die jeweilig angegebene Aminosäure im Namen des Oligonukleotids bzw. die erste und letzte Aminosäure im Protein wurde fett und kursiv gestaltet.

- Oligonukleotide für Klonierungen von hNAP-1-Konstrukten:

Name	Sequenz
NAP Bam for	GGGGATCCGCAGACATTGACAACAAAGAACAG
NAP Bam 92 for	GGGGATCCGAAGCCAAATTCTATGAGGAAGTTCATGATCTTGAAAGG
NAP Bam 162 for	GGGGATCCGAAGACCCCAAAGGAATTCCTG
NAP Bam 291 for	GGGGATCCACAGTTTCCAATGACTCTTTCT
NAP Bam back	GGGGATCC<u>TCA</u>CTGCTGCTTGCACTCTGCTGGG
Bam NAP stop 91 back	GGGGATCC<u>TCA</u><u>TAT</u>CTGTGCACATTTAACTTGCAGGTTTTTGAG
Bam NAP stop 162 back	GGGGATCC<u>TCA</u><u>TTT</u>TTTTTCTTCATCCTTTTTCTCATCTTCAATCTTGG
Bam NAP stop 290 back	GGGGATCC<u>TCA</u><u>TTT</u>AGTCACAGTACGAAGTGTCCACG
HA-NAP1.up	GGGGATCCGGACCA<u>TG</u>TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGCCAGGTGGT <u>AT</u>GGCAGACATTGACAACAAAGAACAGTCTG
BamHA-NAP 92 for	GGGGATCCGGACCA<u>TG</u>TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGCCAGGTGGT <u>GA</u>AGCCAAATTCTATGAGGAAGTTCATGAT
BamHA-NAP 162 for	GGGGATCCGGACCA<u>TG</u>TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGCCAGGTGGT <u>GA</u>AGACCCCAAAGGAATTCCTGAATTTTGG
BamHA-NAP 291 for	GGGGATCCGGACCA<u>TG</u>TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGCCAGGTGGT <u>ACA</u>GTTTTCCAATGACTCTTTCTTTAACTTT

- Oligonukleotide für die PCR der gesamtzellulären DNA aus den stabil transfizierten RTS3b Zellen:

P2 TATA A	AACCGACCGCACCCGGTACATAAAGGTGAGT
BPV1 E2 BS 1 B	TGGACAGGATGTGTACCGGGTGTGGTTCCAA
LUC/575-606 for	CAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATC
LUC/1800-1768 back	CCTCTAGAGTCATTACAATAGCTAAGAATTC

- Oligonukleotide für Klonierungen von E2-Konstrukten:

Name

Sequenz

BPV1 E2 aa204 Eco for	CATCGAGAATTCAGATTTTAGAGATCGCCAGACGGAGTC
BPV1 E2 aa203 Bam back	CGCATGGGATCCTTAAGAAGAGGTGGATGAGACACCAGC
BPV1 E2 Ep.u	CTAGCTGGATCCTCAGAAGTCCAAGCTGGCTGTAAAGC
BPV1 E2 Ep.o	GATCGAGAATTCGGAGACAGCATGCGAACGTTTACATG
E39A.A	CTGTTAGAACTGCGAACACACTGC
E39A.B	GCAGTGTGTTCCGAGTTCTAACAG
I73A.A	GCCAAGCAGGCCGCTGAAATGCAGTTG
I73A.B	CAACTGCATTTCAGCGGCCTGCTTGGC

2.3.2 Expressionsvektoren

- **pGEX2T** (4.9 kb) erlaubt unter der Kontrolle eines tac-Promotors (IPTG induzierbar) die Expression eines Proteins, das N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert ist (Amersham Biosciences, Freiburg).
- **pET14b/pET8c** (4.7 kb) erlauben unter der Kontrolle eines T7-Promotors die Expression eines Proteins, das N-terminal mit einem Epitop aus sechs Histidinen fusioniert ist (Novagen, Madison, USA).
- **pXJ41** (4.3 kb) ist ein Expressionsvektor mit einem CMV- und einem T7-Promotor sowie Ampicillin- und Tetracyclinresistenz (XIAO et al., 1991).
- **pcDNA3.1** (5.4 kb) erlaubt die Expression unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Der Vektor enthält einen SV40-Replikationsursprung und vermittelt eine Neomycin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pCB6** (6.2 kb) ermöglicht die Expression eines Proteins unter der Kontrolle des CMV-Promotors (STINSKI, unveröffentlicht).
- **pCMV2FLAG** (4.7 kb) erlaubt die Expression eines Proteins mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop unter Kontrolle des CMV-Promotors (Kodak, New Haven, USA).
- **pCMV-Myc** (3.8 kb) erlaubt unter der Kontrolle eines CMV-Promotors die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Myc-Epitop versehen sind (BD Biosciences, California, USA).
- **pM** (3.5 kb) ermöglicht unter der Kontrolle des SV40-Promotors die Expression eines Proteins, das N-terminal an die Gal4-DBD fusioniert ist (Clontech, Heidelberg).

- **pJ3 Ω** (3.5 kb) mit einem SV40 Promotor und Ori (erhalten von J. Ham, Paris), **pCMV1** (4.8 kb) mit einem CMV-Promotor, und **pUC18** (2.7 kb) wurden zum Auffüllen von DNA-Mengen in Transfektionsansätzen verwendet (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pTCF-Neo** (7.9 kb) kodiert für die β -Lactamase (Neomycin-Derivat) und ermöglicht zur Herstellung stabil transfizierter Zellen die Selektion mit G418 (PAN et al., 1994).
- **pCMV1-EGFP** (8.5 kb) enthält ein Gen für die Expression eines grün fluoreszierenden Proteins *Enhanced Green Fluorescence Protein* und ein Kanamycin-Resistenzgen (HADASCHIK, persönliche Mitteilung).

2.3.3 Reporterplasmide

- **pALuc** (5.2 kb) ermöglicht stromaufwärts des *firefly*-Luciferase-Gens den Einbau eines Promotors für transiente Transfektionen (DONG et al., 1994).
- **pBPV1LCR-Luc** (6.7 kb) enthält die LCR von BPV1 von Position 6958 bis 475 aus dem Gesamtgenom. Das HindIII/PstI-Fragment aus pdBPV1 wurde in pALuc kloniert.
- **pNCR8-Luc** (6.3 kb) enthält die NCR von HPV8 mit Teilen der flankierenden L1- und E6-Leserahmen (Position 7077-558). Das HindIII/BglII-Fragment aus pNCR8-CAT (STUBENRAUCH et al., 1992) wurde in die HindIII/BamHI-Schnittstellen von pALuc kloniert (LEMME, 1998).
- **pG5Luc** (5.3 kb) enthält das EcoRI/BamHI-Fragment (138 bp) aus pG5CAT (AUS_G 17mer x 5) im Vektor pALuc (STEGER, pers. Mitteilung).
- **p53CON** (5.2 kb) wurde abgeleitet von pGUP.PA.8 und enthält eine p53-Bindestelle vor dem minimalen basalen Promotor von hsp70 und dem Luciferase-Gen (FUNK et al., 1992).
- **pNCR8-CAT** (5.5 kb) wurde von pBL-CAT3, einem enhancer- und promotorlosen CAT-Vektor, abgeleitet (LUCKOW und SCHÜTZ, 1987). Das Plasmid enthält das 1133 bp große EcoRI/EcoRV-Fragment von HPV8, welches die gesamte HPV8 NCR und Teile der flankierenden L1- und E6-Gene (Nt 7077-558) umfasst (STUBENRAUCH et al., 1992).

2.3.4 Rekombinante Plasmide

E2-Konstrukte:

- **pCB6-HPV8E2** kodiert für den ORF von HPV8 E2. Ein BclI/BglII-Fragment aus pAM2-HPV8 (bp 2682-4220) wurde über BglII in pCB6 kloniert (STUBENRAUCH *et al.*, 1994).
- **pCMV2FLAG-BPV1E2** kodiert für den ORF von BPV1 E2. Ein PCR-Fragment wurde über EcoRI/BamHI in pCMV2FLAG kloniert (STEGER, pers. Mitteilung).
- **pCMV2FLAG-BPV1E2 Δ 1-203** (BPV1 E2 Δ N) kodiert für die Hinge-Region und den C-Terminus von BPV1 E2 von AS 204-410. Ein mit den Oligonukleotiden *BPV1 E2 aa204 Eco for* und *BPV1 E2 Ep.u* amplifiziertes PCR-Fragment wurde über EcoRI/BamHI in pCMV2FLAG kloniert.
- **pCMV2FLAG-BPV1E2 Δ 204-410** (BPV1 E2 N) kodiert für den N-Terminus von BPV1 E2 von As 1-203. Ein mit den Oligonukleotiden *BPV1 E2 Ep.o* und *BPV1 E2 aa203 Bam back* amplifiziertes PCR-Fragment wurde über EcoRI/BamHI in pCMV2FLAG kloniert.
- **pCMV2FLAG-HPV8E2** kodiert für den ORF von HPV8 E2, der über EcoRI/BamHI in den Vektor pCMV2FLAG kloniert wurde, mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop (STEGER *et al.*, 2002).
- **pCMV2FLAG-HPV18E2** kodiert für den ORF von HPV18 E2, der über EcoRI/BamHI in den Vektor pCMV2FLAG kloniert wurde, mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop (STEGER, pers. Mitteilung).
- **pC59** kodiert für den ORF von BPV1 E2 (Klon 59) von Position 2360-4203 unter der Kontrolle des SV40 Promotors. (YANG *et al.*, 1985).
- **pC59- Δ 1-203** (BPV1 E2 Δ N) kodiert für die Hinge-Region und den C-Terminus von BPV1 E2 von AS 204-410 (STEGER, pers. Mitteilung).
- **pC59- Δ 195-282** (BPV1 E2 Δ H) kodiert für den N- und C-Terminus von BPV1 E2 ohne die Hinge-Region von AS 195-282 (STEGER, pers. Mitteilung).
- **pC59-E39A** kodiert für den ORF von BPV1 E2 mit einer Punktmutation. Aus der Glutaminsäure an Position 39 wurde über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *E39A.A* und *E39A.B* die AS Alanin.

- **pC59-I73A** kodiert für den ORF von BPV1 E2 mit einer Punktmutation. Aus dem Isoleucin an Position 73 wurde über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *I73A.A* und *I73A.B* die AS Alanin.
- **pET8c-BPV1E2** kodiert für den ORF von BPV1 E2, das N-terminal mit einem Epitop aus sechs Histidinen fusioniert ist (erhalten von J. HAM, Paris).
- **pET8c-BPV1E2 Δ 326-410** (BPV1 E2 Δ C) kodiert für den N-Terminus und die Hinge-Region von BPV1 E2 von AS 1-325 (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pET8c-BPV1E2 E39A** kodiert für den ORF von BPV1 E2 mit einer Punktmutation. Aus der Glutaminsäure an Position 39 wurde über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *E39A.A* und *E39A.B* die AS Alanin.
- **pET8c-BPV1E2 I73A** kodiert für den ORF von BPV1 E2 mit einer Punktmutation. Aus dem Isoleucin an Position 73 wurde über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *I73A.A* und *I73A.B* die AS A.
- **pET14b-HPV8E2** kodiert für den ORF von HPV8 E2 mit N-terminal fusioniertem Histidin-Epitop. Ein PCR-Fragment wurde über BamHI in den Vektor pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pGEX2T-HPV8E2** kodiert für 8E2. Der ORF von 8E2 wurde über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert (ENZENAUER *et al.*, 1998).
- **pM-8E2 AD** kodiert für die Aktivierungsdomäne von HPV8 E2 mit N-terminal fusionierter Gal4-DBD. Ein PCR-Fragment wurde über BamHI/EcoRI in den Vektor pM kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).

hNAP-1-Konstrukte:

- **pGEX2T-hNAP-1** kodiert für den ORF von hNAP-1. Ein mit den Oligonukleotiden *NAP BAM for* und *NAP Bam back* amplifiziertes PCR-Fragment wurde über BamHI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-hNAP-1 Δ 1- Δ 10** kodieren für Deletionsmutanten von hNAP-1. Die PCR-Fragmente wurden über BamHI in pGEX2T kloniert. Dabei wurden die o.a. entsprechenden Oligonukleotide ohne das HA-Epitop (vgl. Abb. 14 des Ergebnisteils) für die PCR verwendet.
- **pET14b-hNAP-1** kodiert für den ORF von hNAP-1, der über BamHI in den Vektor pET14b kloniert wurde.

- **pXJ41-HA-hNAP-1** kodiert für hNAP-1. Der ORF von hNAP-1 wurde mit einem N-terminalen Hämagglutinin(HA)-Epitop über BamHI in pXJ41 kloniert.
- **pXJ41-HA-hNAP-1 $\Delta 1$ - $\Delta 10$** kodieren für Deletionsmutanten von hNAP-1. Die PCR-Fragmente wurden über BamHI in pGEX2T kloniert. Dabei wurden die o.a. entsprechenden Oligonukleotide mit dem HA-Epitop (vgl. Abb. 14 des Ergebnisteils) für die PCR verwendet.
- **pXJ41-HA-hNAP-1 NESmut** kodiert für hNAP-1 mit drei Punktmutationen. Aus der AS Valin an Position 78 und den AS Leucin an den Positionen 81 und 84 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *NAP NESmut for* und *NAP NESmut back* die AS Alanin.
- **pcDNA3.1-HA-hNAP-1** kodiert für hNAP-1. Der ORF von hNAP-1 wurde mit einem N-terminalen HA-Epitop über BamHI in pGEX2T kloniert.
- **pcDNA3.1-HA-hNAP-1 $\Delta 1$ - $\Delta 10$** kodieren für Deletionsmutanten von hNAP-1. Die PCR-Fragmente wurden über BamHI in pGEX2T kloniert. Dabei wurden die o.a. entsprechenden Oligonukleotide mit dem HA-Epitop (vgl. Abb. 14 des Ergebnisteils) für die PCR verwendet.
- **pCMV-Myc-hNAP1** kodiert für hNAP-1 mit einem N-terminal fusionierten Myc-Epitop. Der ORF wurde über BglII/BamHI in pCMV-Myc kloniert.

p300-Konstrukte:

- **pCMV β -p300HA** kodiert für p300, das über NotI/HindIII in den Expressionsvektor pCMV β kloniert wurde. C-terminal wurde über eine NheI-Schnittstelle ein Hämagglutinin-Epitop angefügt, weswegen 108 bp im C-Terminus von p300 wegfielen (ECKNER *et al.*, 1994).
- **pGEX2T-p300-4** kodiert für ein Fragment von p300, das die AS 1453-1882 enthält. Das PCR-Fragment wurde über BamHI in pGEX2T kloniert (MÜLLER, 1999).
- **pET14b-p300HAT**: Die HAT-Domäne von p300 wurde mit den Oligonukleotiden p300-4782Xhoup und p300-6482Xhodo über PCR amplifiziert und über XhoI in pET14b kloniert. Ein Fehler in p300-4782Xhoup (1 Basen-Insertion) wurde über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden p300HATok5' und p300HATok3' korrigiert (MÜLLER, 2003).

p53-Konstrukte:

- **pCp53-wt** wurde von pCMV-Neo-BAM abgeleitet und enthält den p53-ORF (Nt 66-1794) (NIGRO *et al.*, 1989).
- **pQE30-p53** kodiert für p53. Der ORF wurde über BamHI/HindIII in den Vektor pQE30 kloniert (ZIMMERMANN *et al.* 1999).
- **pGEX2T-p53** kodiert für p53. Der ORF wurde über BamHI/EcoRI in den Vektor pGEX2T kloniert (ZIMMERMANN *et al.* 1999).

weitere Konstrukte:

- **pET15b-H2B** kodiert für das Histon H2B. Der ORF wurde in pET15b kloniert (erhalten von A. HOFFMANN).
- **pM-TEF-1 AD** kodiert für die AD von TEF-1. Das Fragment wurde über PCR amplifiziert und über BamHI in den Vektor pM kloniert (MÜLLER, 2003).
- **pXJ41-TEF-1 AD** kodiert für die AD von TEF-1, die über BamHI in den Vektor pXJ41 kloniert wurde (R. DEGENKOLBE).
- **pCMV2FLAG-BAP** kodiert für eine Phosphatase: *Bacterial Alkaline Phosphatase* (Kodak, New Haven, USA).
- **pCB6-HPV8E1** kodiert für den HPV8 E1 Leserahmen, der über BamHI/PvuII aus dem Vektor pi8E1 (IFTNER *et al.*, 1988) in pCB6 kloniert wurde.

Alle im Rahmen dieser Arbeit über PCR hergestellten Konstrukte wurden über Sequenzierung verifiziert.

2.3.5 DNA-Längenstandards

- 1 kb DNA-Leiter (GibcoBRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein)
- 1 kb plus DNA-Leiter (GibcoBRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein)
- DNA-Molekulargewichtsmarker VIII (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.3.6 sonstige natürliche Nukleinsäuren

- Desoxynukleotide (dNTPs) (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.4 Proteine

2.4.1 Enzyme

- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus E.coli (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Pwo DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Proteinase K (GibcoBRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein)
- RNase A (GibcoBRL/Life Technologies GmbH, Eggenstein)
- T4 DNA-Ligase (New England BioLabs, Schwalbach)
- T4 Polynukleotidkinase (New England BioLabs, Schwalbach)
- Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:
 - Invitrogen, Karlsruhe
 - MBI Fermentas, St. Leon-Rot
 - New England BioLabs GmbH, Schwalbach
 - Roche Diagnostics, Mannheim

2.4.2 Antiseren

- α -hNAP-1: monoklonaler Antikörper gegen das hNAP-1 aus der Maus (erhalten von Y. ISHIMI, Tokyo, Japan).
- α -p53 (D10): monoklonaler Antikörper gegen das humane p53 aus der Maus (Santa Cruz, Heidelberg).
- α -p21: monoklonaler Antikörper gegen das humane p21 aus der Maus (BD Biosciences Pharmingen, California, USA).
- α -H2B: polyklonaler Antikörper gegen das humane Histon H2B aus dem Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg).
- α -HA: monoklonaler Antikörper gegen das humane Hämagglutinin-Epitop aus der Ratte (Roche Diagnostics, Mannheim).
- α -Myc: monoklonaler Antikörper gegen das humane Myc-Epitop aus der Maus (BD Biosciences Pharmingen, California, USA).
- α -FLAG (M5): monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop aus der Maus (Kodak, New Haven, USA).
- α -His HRP: mit HRP konjugiertes Ni²⁺-NTA-Konjugat gegen 6xHis (Qiagen, Hilden).

- α -Maus/Kaninchen POD: mit POD gekoppelter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-IgG (Roche Diagnostics, Mannheim).
- α -Maus POD (kappa): mit POD gekoppelter Antikörper gegen die leichte Kette des Maus-IgG (DPC Biermann, Bad Nauheim).
- α -Kaninchen POD: mit POD gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- α -Ratte POD: mit POD gekoppelter Antikörper gegen Ratten-IgG (Boehringer, Mannheim).
- α -p53 (D10) Agarose beads: an Agarose beads gekoppelter p53 Antikörper (D10, s.o.).
- α -p300 (N15) Agarose beads: an Agarose beads gekoppelter p300 Antikörper (Santa Cruz, Heidelberg).
- α -FLAG (M2) Agarose beads: an Agarose beads gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Kodak, New Haven, USA).

2.4.3 Größenstandards

- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, niedermolekular, farblos und vorgefärbt (BioRad, München)
- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, niedermolekular, vorgefärbt (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.5 Protease Inhibitoren

- **Aprotinin**: Serin-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Chymotrypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- **Leupeptin**: Serin-, Thiol-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Kallikrein, Proteinase K, Papain, Thrombin, Cathepsin A und B (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- **Pepstatin**: Aspartat-Protease-Inhibitor, inhibiert: Pepsin, Renin, Cathepsin D und mikrobische Säureproteasen (AppliChem, Darmstadt).
- **PMSF**: Serin-, Cystein-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Papain (Sigma-Aldrich, Steinheim).

2.6 Radioaktivität

- ^{35}S -Methionin (Amersham Biosciences, Freiburg)
- ^{35}S -Cystein (Amersham Biosciences, Freiburg)
- ^{32}P - α dATP (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.7 Medien

2.7.1 Medien und Antibiotika für die Bakterienkultivierung

LB-Broth-Base (*Luria-Bertani-Medium*)

Fertigmedium von USB (Cleveland, USA)

Bacto-Trypton 10 g/l

Bacto-Hefe-Extrakt 5 g/l

NaCl 8 g/l

(pH 7.2)

20 g/l H_2O , 20 min bei 121°C autoklaviert
und anschließend bei 4°C gelagert.

LB-Agar (*Luria-Bertani-Agar*)

Fertigmedium von USB (Cleveland, USA)

Bacto-Trypton 10 g/l

Bacto-Hefe-Extrakt 5 g/l

Bacto-Hefe-Extrakt 5 g/l

NaCl 8 g/l

Bacto-Agar 15 g/l

(pH 7.2)

32 g/l H_2O

20 min bei 121°C autoklaviert.

Der Agar wurde auf ca. 50°C abgekühlt und dann in Petrischalen gegossen, welche anschließend bei 4°C gelagert wurden.

Zur Selektion wurden $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin hinzugegeben.

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stocklösung: 100 mg/ml in H_2O , steril filtriert. Eingesetzt wurde eine Konzentration von $100\mu\text{g/ml}$.

2.7.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen

- **Dulbecco's MEM** (*Modified Eagle Medium*, für 293T-Zellen) (Invitrogen, Karlsruhe) mit Glutamax, 4500 mg Glucose, Pyridoxin, ohne Natriumpyruvat

Zusätze:

FCS	7.5%	(GibcoBRL/Life Tech., Eggenstein)
Streptomycinsulfat	120 mg/l	
Penicillin	120 mg/l	(beide Invitrogen, Karlsruhe)

- **E-Medium** (für RTS3b-Zellen)

Dulbecco's MEM	50%	
Dulbecco's Nut Mix F-12	50%	(beide Invitrogen, Karlsruhe)
Transferrin	5 µg/ml	
Triiodo-thyronin	2×10^{-11} M	
Adenin	1.8×10^{-4} M	
Insulin	5 µg/ml	
Hydrocortison	0.4 µg/ml	
Choleratoxin	10^{-10} M	
EGF	10 ng/ml	(alle Sigma-Aldrich, Steinheim)
FCS	10%	
Streptomycinsulfat	100 mg/l	
Penicillin	100 mg/l	(alle Invitrogen, Karlsruhe)

- Trypsin/EDTA
- PBS (beide Invitrogen, Karlsruhe)
- KGM-2 Medium für NHEK-neo
- HBBS für NHEK-neo
- Trypsin für NHEK-neo
- TNS (Neutralisierungslösung) für NHEK-neo (alle Bio Whittaker, Walkersville, USA)
- G418 für die Herstellung stabiler Zelllinien (Gibco BRL/Life Tech., Eggenstein)

- **Einfriermedium:**

DMSO	10%
FCS	90%

2.8 Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Difco (Detroit, USA), ICN (Aurora, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck AG (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen und besaßen den Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“(zur Analyse).

2.8.1 Puffer und Lösungen

Für Proteingele:

SDS-Polyacrylamidgel (PAG)

Trenngel:	
Acrylamid/Bisacrylamid	8-15%/0.2-0.4%
TrisCl/SDS, pH 8.8	25%
10% Ammoniumpersulfat	0.33%
TEMED	0.1%

Sammegel:	
Acrylamid/Bisacrylamid	3.9%/0.1%
TrisCl/SDS, pH 6.8	25%
10% Ammoniumpersulfat	0.5%
TEMED	0.1%

2x SDS-Probenpuffer

TrisCl, pH 6.8	125 mM
Glycerin	20%
SDS	2%
β -Mercaptoethanol	2%
Bromphenol-Blau	15 μ M
(mit 1N HCl auf pH 6.8 eingestellt)	

4x TrisCl/SDS, pH 8.8

Tris-Base	1.5 M
SDS	0.4%
(mit HCl auf pH 8.8 eingestellt)	

4x TrisCl / SDS, pH 6.8

Tris-Base	0.5 M
SDS	0.4%
(mit HCl auf pH 6.8 eingestellt)	

SDS-Elektrophorese-Puffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0.1%

Coomassie Färbelösung

Methanol	50%
Essigsäure	10%
<i>Coomassie brilliant blue</i>	0.05%

Entfärbelösung

Methanol	5%
Essigsäure	7%

Für Western Blots:**Transferpuffer**

Tris-Base	25 mM
Glycerin	192 mM
Methanol	20%

TBST

TrisCl, pH 7.9	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0.05%

Abblock-Lösung

BSA	2%
Milchpulver	2%
oder (bei Verwendung des FLAG Ak)	
Milchpulver	4-5%
jeweils in TBST	

Antikörper-Verdünnungslösung

BSA	0.2%
oder (Verwendung des FLAG Ak)	
Milchpulver	4-5%
jeweils in TBST	

Für Affinitätschromatographien:**HSLB** (*High Salt Lysis Buffer*)

Glycerin	10%
Tris/Cl pH 8.0	20 mM
NaCl	0.5 M
β -Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	10 μ g/ml
Pepstatin	10 μ g/ml
Aprotinin	10 μ g/ml
Imidazol	5 mM

Puffer A_{x-y} (verschiedene Puffer)

Glycerin	10%
Tris/Cl pH 8.0	20 mM
KCl (0 – 1000 mM)	x mM
Imidazol (0 – 1000 mM)	y mM
β -Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	1 mM

Für Ultrazentrifugationen:**HEMG Puffer** (*HEPES-EDTA-Mg-Glycerin*)

HEPES	25 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	12.5 mM
KCl	100 mM
NP40	0.1%
Glycerin	7.5-30%

Für Koimmunpräzipitationen:**LSDB** (*Low Salt Dilution Buffer*)

Glycerin	20%
Tris/Cl pH 7.9	50 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
NP40	0.1%
KCl	0 - 1000 mM

Als Resuspendierpuffer wurde der LSDB mit Proteaseinhibitoren (PI) versetzt. (A, L, P je 10 µg/ml)

Für die Extraktion episomaler DNA aus Eukaryotenzellen:

Resuspensionspuffer

Tris	25 mM
EDTA pH 8.6	10 mM
Glucose	50 mM

Lysepuffer II

NaCl	0.1 M
EDTA pH 8.6	10 mM
SDS	0.2%
Proteinase K	0.2 mg/ml

Lysepuffer I

NaOH	0.2 M
SDS	1%

Für Southern Blots:

Prähybridisierungspuffer

SSC	2x
Denhardt	1x
Hefe-RNA	0.1 mg/ml

20x SSC

NaCl	3 M
Na ₃ Citrat	0.3 M

50x Denhardt

Hybridisierungslösung

Formamid	50%
SSC	5x
Denhardt	1x
Hefe-RNA	0.1 mg/ml

BSA	1%
Polyvinylpyrrolidon	1%
Ficoll 400	1%

50x Na-P-Puffer

SDS	0.1%
Na-P-Puffer	20 mM

NaH ₂ PO ₄	1 M
Na ₂ HPO ₄	1 M
Na ₄ P ₂ O ₄	0.1 M

Waschpuffer

SSC	6x
SDS	0.5%

Für die Isolierung gesamtzellulärer DNA aus Eukaryotenzellen :**Extraktionspuffer**

NaCl	0.1 M
Tris-HCl, pH 7.5	10 mM
EDTA	10 mM

Lysispuffer

Extraktionspuffer + 0.5% SDS

Für die Herstellung von Zellkernextrakten:**Puffer A**

HEPES, pH 7.9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA	0.1 mM
EGTA	0.1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Pepstatin	5 µg/ml

Puffer C

HEPES, pH 7.9	20 mM
NaCl	0.4 M
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Pepstatin	5 µg/ml

Für Luciferase-Tests :**KPO₄-Puffer 1 M**

K ₂ HPO ₄	915 mM
KH ₂ PO ₄	85 mM

Reportersol-Puffer

KPO ₄ -Puffer, pH 7.8	100 mM
NP40	0.5%
DTT	1 mM

Luciferin-Stock (50 x)

D-Luciferin	100 mg
in 7140 µl Luciferase-Reaktions-Puffer	

Luciferase-Reaktions-Puffer

KPO ₄ -Puffer, pH 7.8	100 mM
MgSO ₄	15 mM
ATP	5 mM

ATP-Stammlösung

ATP	100 mM
TrisCl, pH 7.9	200 mM

Für Agarosegele :**50x TAE-Puffer (pH 8.0)**

Tris-Acetat	2 M
EDTA	50 mM

Farbmarker (6x)

Glycerin	30%
Bromphenolblaulösung	0.25%
Xylen-Cyanol-Lösung	0.25%

Ethidiumbromidbad

Ethidiumbromid	0.5 µg/ml
----------------	-----------

in H₂O

Tris pH 7.5	10 mM
EDTA	1 mM

sonstige Puffer:**PBS (Phosphate Buffered Saline)**

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	4.3 mM
KH ₂ PO ₄	1.4 mM

2x HBS

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	1.5 mM
HEPES pH 7.05	50 mM

TSB (Transformation Storage Buffer)

PEG (Mw = 3350)	30 mM
DMSO	5%
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

TE Puffer (pH 7.9)

TrisCl	10 mM
EDTA	1 mM

in LB-Medium; anschließend steril filtriert

2.8.2 Sonstige Chemikalien und Materialien

- Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)
- Agarose, Ultra Pure (BioRad, München)
- Albumin Fraktion V (Applichem, Darmstadt)
- Amplifizierer (*Amplify Fluographic Reagent*) (Amersham, Freiburg)
- β-Mercaptoethanol (14,1 M) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- D-Luciferin, freie Säure (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Formaldehyd (Merck AG, Darmstadt)

- FuGene6 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Glutathion-Sepharose™ 4B (Amersham, Freiburg)
- Glycogen (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Hybond-N⁺-Nylonmembran (Amersham, Freiburg)
- Hyperfilme für ECL und Autoradiographie (Amersham, Freiburg)
- IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)
- PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1) (Roth, Karlsruhe)
- Ponceau-S-Rot (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad, München)
- Rifampicin (AppliChem, Darmstadt)
- RNA (aus der Hefe) (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNAsin (Promega, Madison, USA)
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethyldiamin) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TSA (Trichostatin A) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ultrazentrifugationsröhrchen (Polyallomer) (Beckman, California, USA)
- Western Blot Membranen (Nitrocellulose 0,45/0,2 µm) (BioRad, München)

2.8.3 Reagenziensysteme (Kits)

- QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *Gel Extraction* Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *PCR Purification* Kit (Qiagen, Hilden)
- Quik Change™ *Site-directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, Heidelberg)
- T4-Rapid DNA-Ligase (Promega, Madison, USA)
- TNT *Coupled Reticulocyte Lysate* System (Promega, Madison, USA)
- TOPO Cloning *5-min PCR cloning Kit* (Invitrogen, Groningen, Niederlande)
- BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)
- MICROCON *Centrifugal Filter Devices* (YM-30) (Millipore, Billerica, USA)
- *Random Primers DNA Labeling System* (GibcoBRL/Life Tech. GmbH, Eggenstein)

3. METHODEN

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Kulturen zur Plasmidisolierung

Da fast alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide über ein Ampicillin-Resistenzgen verfügen (Ausnahme: pCMV1-EGFP [*Enhanced Green Fluorescence Protein*], welches ein Kanamycin-Resistenzgen trägt), konnte durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin (bzw. 200 µg/ml Kanamycin) sowohl in Flüssigmedium als auch in Agarplatten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden. Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml-PE-Röhrchen (Sarstedt) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Rotationsinkubator wachsen gelassen. Für die präparative Plasmidisolierung wurden die Kulturen in einem Volumen von 200 ml LB-Medium in einem sterilen 1 L Erlenmeyer-Kolben angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert.

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Die kompetenten *E. coli* XL1-Blue Bakterien wurden nach der Methode von Chung und Miller (1988) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 2.5 ml einer frischen Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600nm von 0.5 inkubiert. Mit 20 ml dieser Kultur wurde nun eine zweite Kultur von 100 ml LB-Medium angeimpft, welche wiederum bis zu einer Absorption von 0.5 inkubiert wurde. Der Kolben mit den Bakterien wurde dann für 10 Minuten (min) auf Eis gestellt und die Bakterien anschließend 10 min bei 4°C und 3,000g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 5 ml eiskaltem TSB resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu je 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

Um die Effizienz der kompetenten Bakterien zu testen, wurden 100 µl der Bakterien mit 1 ng eines Testplasmids transformiert. Anhand der Anzahl der Kolonien konnte so die Effizienz der Bakterien für 1 µg zu transformierende DNA berechnet

werden. Die Effizienz lag in der Regel zwischen 5×10^5 und 3×10^6 Kolonien/ μg DNA.

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation von kompetenten XL1 Bakterien wurde die zu transformierende DNA mit 100 μl Bakterien vermischt und 20–30 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0.4 ml TSB/20 mM Glucose inkubierten die Zellen bei 37°C unter Schütteln für eine Stunde, um das Resistenzgen zu exprimieren. Anschließend erfolgte die Selektion der transformierten Zellen auf einer ampicillin- bzw. kanamycinhaltigen LB-Agar-Platte über Nacht bei 37°C.

3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien

Einer dichten Bakterienvorkultur wurden 750 μl entnommen, mit 250 μl 50% Glycerin vermischt, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2 Zellkulturen

3.2.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

Die **293T**- und **RTS3b**-Zellen wurden bei 37°C, 6% CO_2 und 85–90% Luftfeuchtigkeit in entsprechendem Medium kultiviert. Da strikt adhärente Zelllinien kontaktinhibiert sind, sobald der Boden der Petrischalen bzw. Zellkulturflaschen zu 100% bedeckt ist, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert. Dabei wurden die Monolayer unter der Sterilbank bei einer Konfluenz von höchstens 90% mit 1x PBS gewaschen und mit einer entsprechenden Menge an Trypsin versetzt, die den Zellrasen gerade bedeckte. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurden sie in frischem Medium resuspendiert und je nach erwünschtem Dichtegrad und Bedarf in ein neues Gewebekulturgefäß ausgesät.

Die **NHEK**-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert. Zum Passagieren wurden die 60-80% konfluent gewachsenen Zellen mit HBSS gewaschen und der Menge Trypsin/EDTA, die ausreichend ist, den Zellrasen gerade zu bedecken, ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 5 min wurde vorsichtig mit den Händen alle 30 Sekunden (sec) gegen die Kulturschale geklopft bis sich nahezu alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Das Trypsin wurde

anschließend durch die Zugabe der gleichen Menge Trypsin-Neutralisationslösung (TNS) inaktiviert, die Keratinozyten resuspendiert und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Zellen zu erhalten wurde daraufhin die Kulturschale ein weiteres Mal mit HBSS gespült. Alle abgelösten Keratinozyten wurden für 5 min bei 250g zentrifugiert, der Überstand bis auf 100–200 µl abgenommen und die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert und je nach Dichtegrad und Bedarf in ein neues Gewebekulturgefäß ausgesät.

3.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Für die Lagerung von 293T- und RTS3b-Zellen wurde ein 60–80% konfluenten Zellrasen einer Petrischale mit einem Durchmesser von 15 cm oder einer T-150 Kulturflasche mit PBS gewaschen, die Zellen mit 4 ml Trypsin/EDTA vom Boden gelöst, mit 15 ml des entsprechenden Mediums vermischt und bei 250g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 4.5 ml FCS und 0.5 ml DMSO resuspendiert und zu je 1.7 ml in Einfrierröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl in einer Suspension zu ermitteln, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Sie war in neun große zu einem Quadrat angeordnete Hauptfelder unterteilt, hatte eine Tiefe von 0.1 mm und eine Fläche von 0.002 m^2 . Mit einer Pasteur-Pipette wurde von der zuvor gut gemischten Suspension ein Aliquot entnommen und mit Hilfe der Kohäsionskräfte unter ein auf der Neubauer-Kammer haftendes Deckglas gesogen. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Zellen der vier Hauptfelder der Ecken gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl der in einem Hauptfeld gezählten Zellen multipliziert mit 10^4 entsprach der Anzahl an Zellen in einem ml der Suspension.

3.2.4 Transfektion von Zellen

Mit 293T-, RTS3b- und NHEK-Zellen wurden transiente Transfektionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden Transfektionsreagenzien verwendet, deren Prinzip darauf beruht, dass die eingesetzte DNA mit dem Reagenz eine Komplexbildung

eingeht. Diese Komplexe können von den Zellen aufgenommen werden, wobei die dabei eingeschleuste DNA in der Regel nicht in das Genom der Zelle integriert wird und somit im Verlauf der Zellteilung wieder verloren geht. Die so transfizierten Zellen wurden etwa 48 h nach der Transfektion auf die Expression eines Reportergens untersucht.

Die NHEK veränderten sich bis zur 6. Passage morphologisch nicht wesentlich und ließen sich bis zur 5. Passage gut transfizieren. Aus diesem Grund wurden die transienten Transfektionen zwischen der 2. und der 5. Passage durchgeführt.

3.2.4.1 Transfektion mit „FuGENE“

Für die Transfektion mit „FuGENE“ wurden konfluente Zellrasen von RTS3b- bzw. NHEK-Zellen mit 1x PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst, in Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Entsprechend der Anzahl der 6-Loch-Platten ($\varnothing = 2.5$ cm/Loch) wurde die Menge der benötigten Zellen in der Gesamtmenge des Mediums verdünnt und auf die einzelnen Löcher verteilt, so daß sich in jedem Loch 1×10^5 RTS3b-Zellen bzw. 2×10^5 NHEK-Zellen in 2 ml Medium befanden. Die so ausgesäten Zellen wurden anschließend bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

Am folgenden Tag wurden ca. 1–2 µg DNA transfiziert. In einem Gesamtansatz wurden hierfür pro Probe 100 µl serumfreies Medium und 2–4 µl „FuGENE“-Transfektionsreagenz für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, jeweils 100 µl des Gemisches auf die DNA geträufelt und zur Komplexbildung 15 min bei RT inkubiert. Das DNA-„FuGENE“ Gemisch wurde anschließend auf die Zellen eines Lochs der 6-Loch-Platte pipettiert, die Platten leicht geschwenkt und bis zur Ernte für ca. 48 h bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

3.2.4.2 Transfektion mit CaCl₂

Für die Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation (nach AUSUBEL *et al.*, 1992) wurden die Gewebegefäße 60–80% subkonfluenter 293T-Zellen wie unter 3.2.1 beschrieben mit Trypsin versetzt, die Zellen für 5 min bei 250g zentrifugiert, in Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Pro 15 cm Zellkulturschale wurden 6×10^6 Zellen in 25 ml Medium verdünnt in die Schalen gegeben und diese dann über

Nacht in den Brutschrank gestellt. Am darauf folgenden Tag wurde unter der Sterilbank die zu transfizierende DNA (bis zu 30 µg) mit H₂O auf ein Volumen von 650 µl aufgefüllt und mit 650 µl 2x HBS vermischt. Nach Zugabe von 102 µl 2M CaCl₂ wurden die Proben sofort 10 sec mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat vorsichtig auf die Zellen geträufelt und die Schalen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten ein einmaliges Waschen der Zellen mit PBS und eine weitere Inkubation in frischem Medium über Nacht im Brutschrank. Schließlich wurden die Zellen am 2. Tag nach der Transfektion geerntet.

3.2.5 Ernte der transfizierten Zellen

3.2.5.1 Ernte durch physikalischen Zellaufschluss

Die 293T-Zellen der 15 cm Zellkulturschalen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen und in jeweils 10 ml PBS mit einem Gummischaber vom Boden abkratzt, in ein 15 ml Röhrchen auf Eis überführt und 5 min bei 4°C und 250g pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 300-500 µl LSDB-Puffer resuspendiert und über vier „Frier-Tau“-Zyklen bestehend aus je 2-minütigem Einfrieren im Trockeneis-gekühlten-Ethanolbad, 1-minütigem Auftauen im 37°C-Wasserbad und darauf folgendem Mixen auf dem Vortexer aufgebrochen. Bei einer 10- bis 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 21,000g pelletierten die unlöslichen Zellbestandteile. Der im Überstand enthaltene Zellextrakt wurde z.B. weiter für eine Koimmunpräzipitation eingesetzt.

3.2.5.2 Ernte durch chemischen Zellaufschluss

Besonders fest am Boden des Gewebegefäßes haftende Zellen wie RTS3b- und NHEK-Zellen werden während des Abkratzens mit dem Gummischaber beschädigt und verlieren dadurch einen Großteil ihrer Luciferase-Aktivität. Diesem Effekt konnte durch einen chemischen Zellaufschluss mit NP40 entgegengewirkt werden. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit 2 ml PBS gewaschen, mit 300 µl Reportersol überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation konnte der Überstand mit dem Zellextrakt für die Luciferase-Analyse eingesetzt werden.

3.2.6 Luciferase-Test

Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte im Lumat LB9501 (Berthold, Wildbach). Hierfür wurde eine entsprechend der Anzahl der Proben adäquate Menge an Luciferase-Reaktions-Puffer 1:100 mit D-Luciferin versetzt. Nach 3 Waschschritten mit diesem Luciferinpuffer wurden jeweils 20-30 µl Zellextrakt in ein Messröhrchen gegeben und dieses unmittelbar danach in den Lumat gestellt. Nach Injektion von 300 µl Luciferinpuffer maß der Lumat die Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sec. Der ermittelte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der exprimierten Luciferase, die zur Anzahl der Zellen (Proteinkonzentrationsbestimmung aller Proben) relativiert wurde (RLU/Protein-konzentration).

3.2.7 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Mit 1.6 µg DNA in einem Verhältnis von 1:10 bestehend aus pTCF-Neo und dem Plasmid BPV1 LCR-Luc (bzw. pTCF-Neo und dem Kontrollplasmid pCMV1-EGFP, um die Transfektionseffizienz optisch mit Hilfe des Mikroskops zu prüfen) wurden RTS3b-Zellen mit dem Transfektionsreagenz „FuGENE“ wie beschrieben in 6-Loch-Platten transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen jeweils 1:3 in G418-haltigem Medium (800 µg/ml) passagiert und weiterhin alle 2 Tage mit G418 (600-400 µg/ml) versetzt. Transfizierte Zellen waren durch das pTCF-Neo Plasmid gegenüber dem Zellantibiotikum G418 resistent und konnten innerhalb von 2-4 Wochen Zellkolonien bilden. Die Klone wurden anschließend vereinzelt und weiter kultiviert.

3.2.8 Behandlung von stabil transfizierten Zellen mit TSA

Stabil transfizierte Zellen wurden 24 h nach transients Transfektion mit 400 µg/ml TSA (einem Histon-Deacetylasen-Inhibitor) versetzt. Weitere 24 h später erfolgte die Zellernte durch chemischen Aufschluss.

3.3 DNA-Methoden

3.3.1 DNA-Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von MANIATIS *et al.* (1989) und AUSUBEL *et al.* (1997) durchgeführt.

- Ethanol- und Phenolfällung von DNA
- Konzentrationsbestimmung von DNA
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase
- Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Polymerase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)
- Reinigung von PCR-Produkten

3.3.2 Plasmidpräparation

Sowohl für analytische und präparative Plasmidisolationen als auch für DNA-Fragment Reinigungen wurden Reagenziensysteme (Kits) der Firma QIAGEN verwendet (QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep, Plasmid Midi und Maxi, *Gel Extraction* und *PCR Purification* Kit). Die Reagenziensysteme basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach BIRNBOIM und DOLY (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzgel). Die über Nacht gewachsenen Kulturen wurden nach der Ernte entsprechend den Protokollen von QIAGEN behandelt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt spektralphotometrisch in Quarzküvetten bei einer OD von 260 nm bestimmt.

3.3.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden im ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) der Universität zu Köln mit einer automatisierten Methode nach SANGER (SANGER *et al.*, 1977) mit Fluoreszenz-markierten Primermolekülen durchgeführt.

Hierfür wurden jeweils 3-10 pmol beider Primer und 250-350 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über das Programm Edit View Version 1.0.2 (PERKIN ELMER).

3.3.4 Isolierung gesamtzellulärer DNA aus eukaryoten Zellen

Die Zellen wurden wie unter 3.2.5.1 beschrieben gewaschen, abgeschabt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 800 µl Lysispuffer resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 min bei 56°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit von 0.1 mg RNase A bei 37°C für 1 h und eine Inkubation mit 0.5 mg Proteinase K für eine weitere Stunde bei 37°C. Daraufhin wurde für die DNA-Extraktion 1 Volumen PCI hinzugegeben und das Gemisch mit einer 2 ml Spritze (40 x 0.9 mm Kanüle) 5–10 x auf- und abgezogen, um die DNA zu scheren. Nach Zentrifugation für 5 min mit 10,000g wurde mit dem wässrigen Überstand eine Ethanol-fällung durchgeführt, anschließend das getrocknete Pellet in 200µl sterilem destilliertem H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bei einer DNA-Verdünnung von 1:50 bis 1:100 bestimmt.

3.3.5 Transienter Replikationstest

Der Replikationstest wurde als Modifikation der Methode von USTAV und STENLUND *et al.*, 1991 etabliert.

3.3.5.1 Transfektion und Extraktion der episomalen DNA

Die (wie bereits beschrieben) mit Hilfe eines Gummischabers geernteten und pelletierten Zellen einer 10 cm Zellkutschale wurden zur Extraktion der episomalen DNA zunächst in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und durch Zugabe von 400 µl frisch angesetztem Lysepuffer I, leichtem Vortexen und einer 2-minütigen Inkubation bei RT lysiert. Es folgte eine Zugabe von 300 µl Neutralisierungspuffer (3 M KAc; pH 4.8) und eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Um die Zellfragmente abzutrennen, wurde anschließend der Rohextrakt für 5 min mit 21,000 g zentrifugiert, der Überstand in einem neuen Eppendorfreaktionsgefäß mit 540 µl Isopropanol versetzt und die Ansätze 5 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte eine weitere Zentrifugation für 15 min bei 21,000 g. Zur Entfernung der Proteinverunreinigungen

wurde das trockene Pellet in 200 μ l Proteinase-K-haltigen Lysispuffer II resuspendiert, für 1 h bei 37°C inkubiert und eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung durchgeführt. Das hierbei erhaltene getrocknete Pellet wurde in 20 μ l einer RNaseA-Lösung (62.5 μ g/ml) aufgenommen und in zwei gleiche Ansätze aufgeteilt. Während die zu testende DNA in einem Ansatz mit der Restriktionsendonuklease BamHI linearisiert wurde, wurde sie im anderen Ansatz zusätzlich mit einem Überschuss an DpnI gespalten. Dieses Enzym schneidet DNA, die am Adenosin im Motiv 5'-GATC-3' methyliert ist. Da die transfizierte DNA aus dam⁺-Bakterien isoliert wurde und entsprechend methyliert ist, wird sie so in einer DpnI-Spaltung in kurze Fragmente gespalten und kann nach der elektrophoretischen Auftrennung leicht von der neu replizierten, nicht-methylierten DNA, die von DpnI nicht gespalten wird, unterschieden werden. Nach einer zweistündigen Inkubation erfolgte eine Gelelektrophorese mit einem 0.8%igen Agarosegel, um die DNA aufzutrennen.

3.3.5.2 Southern Blot

Um die DNA zu depurinieren, wurde nun das zu blottende Agarosegel zunächst 20 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Danach wurde das Gel kurz mit Wasser gespült und zur Denaturierung der DNA in 0,4 M NaOH inkubiert. An diesem Punkt wurde die DNA unter alkalischen Bedingungen über Nacht auf eine Hybond-N⁺-Nylonmembran transferiert. Am nächsten Morgen folgte die Prähybridisierung der Membran für 3 h bei 65°C in 100 ml Prähybridisierungspuffer. Anschließend wurde dieser dekantiert und 20 ml Hybridisierungs-Lösung mit der radioaktiv markierten Sonde zur Membran gegeben. Als Hybridisierungs-Sonde wurden 25 ng pNCR8-CAT mit dem *Random Primers DNA Labeling System* nach den Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde der Filter zweimal in je 100 ml Waschpuffer bei 65°C gewaschen, in 2x SSC gespült, mit Frischhaltefolie umschlagen und daraufhin gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation einer DNA-Sequenz, die durch die Bindung zweier Oligonukleotide an eine DNA-Matrize begrenzt wird (MULLIS und FALOONA, 1987). Die beiden Oligonukleotide werden so gewählt, dass sie den zu amplifizierenden DNA-Bereich einrahmen und jeweils in 5'-3'-Richtung an einen der beiden DNA-Stränge hybridisieren.

Auf Eis wurden je nach Plasmid-Größe 1-30 ng der Plasmid-DNA und jeweils 0.5 µg beider Primer in sauberstem H₂O zusammenpipettiert. Alle Reaktionen wurden mit einer Konzentration von 25 µM der vier Desoxynukleotide und einer Mg²⁺-Konzentration von 1-2 mM durchgeführt. Unmittelbar nach Zugabe von 0.5 µl Pwo DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler Biometra, Göttingen) gestellt. Dabei wurde jede Reaktion nach folgendem Basisschema gestartet:

1 Temperaturzyklus:	94°C	2 min	
25 Temperaturzyklen:	94°C	15 sec	(Denaturierung)
	52°C	30 sec	(Hybridisierung)
	72°C	1.5-3 min	(Polymerisierung)
1 Temperaturzyklus:	72°C	7 min	

Je nach Größe des zu amplifizierenden DNA-Bereiches und der Schmelztemperatur der Oligonukleotide wurden die Temperaturen und Zeiten der Hybridisierung und/oder der Polymerisierung variiert. Bei der Amplifikation von DNA-Sequenzen mit einem großen GC-Gehalt wurde die Reaktion in 2-10% DMSO durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde schließlich einer Gelelektrophorese unterzogen und so auf Größe und Menge des Produktes und Spezifität der gewählten Oligonukleotide und Bedingungen überprüft.

3.3.7 *In vitro* Mutagenese

Mit Hilfe des Reagenziensystems „Quik Change™ *Site-directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) wurden Punktmutationen in DNA eingeführt. Dieses System arbeitet mit der PfuTurbo DNA-Polymerase und dem Restriktionsenzym DpnI. Für die *In vitro* Mutagenese wurden 20-50 ng des Plasmides, in welches die

gewünschte Mutation eingeführt werden soll, je 125 ng eines zueinander komplementären Primerpaares, das die Mutation enthält, 5 µl des Reaktionspuffers und 1 µl des dNTP-Mixes in einem 50 µl Gesamtansatz mit 1 µl PfuTurbo DNA Polymerase versetzt und unmittelbar danach in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät gestellt. Für diese PCR wurde folgendes Programm verwendet:

1 Temperaturzyklus:	94°C	30 sec
16 Temperaturzyklen:	94°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	2 min/kb der zu amplifizierenden DNA-Länge
1 Temperaturzyklus:	68°C	1 0 min

Die komplementäre DNA wurde von der Polymerase synthetisiert. Nachdem die Proben auf 37°C abgekühlt waren, wurde 1 µl des Restriktionsenzym DpnI, welches die parentale methylierte und nicht die neu synthetisierte dsDNA schneidet, hinzugegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Mit 1 µl des Spaltansatzes folgte eine Transformation in 50 µl XL1-Blue Bakterien. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht in den Brutschrank gestellt. Schließlich wurde die Plasmid-DNA der Klone durch Sequenzierung auf die Anwesenheit der Mutation überprüft.

3.4 Proteinmethoden

3.4.1 Herstellung von Zellextrakten

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden je nach Bedarf nicht-transfizierte oder transfizierte Zellen nach unterschiedlichen Methoden hergestellt (s. 3.2.5).

3.4.2 Herstellung von Zellkernextrakten

Für die Herstellung von Zellkernextrakten wurden 3x10cm Schalen subkonfluenten Zellen mit PBS gewaschen, in 10 ml PBS/Schale mittels Gummischaber abgekratzt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 250g wurden die Zellen pelletiert, in 400µl Puffer A + PI

resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Unmittelbar nach der Zugabe von 25 μ l 10% NP40 wurde das Gemisch für 10 sec auf dem Vortexer gemixt und für 1 min bei 21,000g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 50 μ l Puffer C + PI resuspendiert, die Proben 30 min bei 4°C geschüttelt und anschließend für 10-15 min bei 4°C und 21,000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 5 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

3.4.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Konzentration der Proteine wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt. Hierfür wurde in eine 96-Loch-Platte eine Verdünnungsreihe mit 0-10 μ g BSA als Eichkurve pipettiert und die proteinhaltige Lösung in der 96-Loch-Platte (unverdünnt oder bis zu 1:20 verdünnt) mit 150 μ l einer 1:5 Verdünnung des BioRad *Protein Assay Reagens* versetzt. Anschließend wurde die OD₆₂₀ im Spektralphotometer bestimmt und die Proteinkonzentration aus der jeweiligen Verdünnung errechnet.

3.4.4 Proteinaufreinigung

3.4.4.1 Reinigung von Proteinen mit Histidin-Epitop

Für die Expression von Proteinen mit einem Histidin-Epitop wurden 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium 1:100–1:50 mit einer Vorkultur entsprechend transformierter BL21pLysS Bakterien angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7-0.9 bei 30°C oder 37°C inkubiert. Die Expression erfolgte über die in den BL21-Zellen enthaltene T7-Polymerase, deren Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Um die Aktivität der bakteriellen Polymerasen zu inhibieren, wurde 45 min nach IPTG-Induktion 1 mM Rifampicin zugegeben. Nach insgesamt 2-3 h wurden die Zellen 10 min bei 3,000g und 4°C zentrifugiert.

Die Reinigung der Proteine mit einem Epitop aus sechs Histidinresten erfolgte anschließend mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Agarose. 500 μ l Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension (Säulenvolumen (SV) = 250 μ l) wurden im Kühlraum bei 4°C auf die Matrix einer noch verschlossenen Säule geträufelt. Nachdem die Agarose sedimentiert war, wurde die Säule geöffnet und zweimal mit 10 ml kaltem, sterilem H₂O gewaschen und mit 16 SV HSLB equilibriert. Während dieses Vorganges wurde das Pellet der induzierten Bakterien in 3-5 ml HSLB resuspendiert,

viermal für 20 sec bei 100 Watt auf Eis sonifiziert und die Zelltrümmer über 10-minütige Zentrifugation bei 21,000g und 4°C pelletiert. Daraufhin wurde der Überstand insgesamt 3x hintereinander auf die equilibrierte Säule gegeben. Um den Rest der Zellextrakte aus der Säule zu entfernen, wurde anschließend 1 SV HSLB auf die Säule gegeben. Nun wurde diese mit 2 SV A₁₀₀₀₋₀ und 24 SV A₃₀₀₋₂₀ gewaschen, bevor die Proteine in 4 SV A₁₈₀₋₁₅₀ eluiert wurden. Je 10 Fraktionen zu je 2 Tropfen (~100 µl) wurden aufgefangen, von jeder Fraktion 2-5 µl in ein gesondertes Eppendorfgefäß pipettiert und alle 20 Gefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Um den Gehalt des aufgereinigten Proteins in jeder Fraktion zu überprüfen, wurden die 2-5 µl jeder Fraktion aufgetaut und in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend folgte eine Auftrennung der Proteine über ein SDS-PAG und die Identifikation über einen Western Blot mit einem gegen das Histidin-Epitop gerichteten Antikörper.

3.4.4.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Proteine, welche an die Glutathion-S-Transferase fusioniert waren, wurden in BL21-pLysS-Bakterien exprimiert. Hierfür wurden 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium 1:100–1:50 mit einer dichten Vorkultur der Bakterien angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7-0.9 inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0.5-1 mM IPTG induziert und erfolgte für einen Zeitraum von 2-3 h bei 30 oder 37°C. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 3,000g pelletiert und daraufhin in 3-5 ml 0.5 M LSDB aufgenommen. Durch viermaliges Sonifizieren für je 20 sec auf Eis bei 100 Watt wurden die Bakterien lysiert und die Zelltrümmer bei 4°C und 21,000g abzentrifugiert. Der so entstandene Extrakt wurde in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Für die Reinigung der im Zellextrakt befindlichen GST-Fusionsproteine wurde Glutathion-Sepharose (Amersham) verwendet. Hierbei wird das an der Oberfläche der Sepharose exponierte Glutathion sehr effizient und spezifisch von dem GST-Fusionsanteil gebunden. Pro Ansatz wurden je 20 µl der Sepharose mit 0.75 ml H₂O und 0.75 ml 0.5 M LSDB gewaschen. Während dieser Waschschrte wurden die Eppendorfgefäße mit den Sepharosekügelchen etwa für 1 min in der Hand geschwenkt und anschließend für 1 min bei 1,000g pelletiert.

Für eine Testaufreinigung wurden 100 und 250 µl Zellextrakt auf die so equilibrierte Sepharose-Matrix gegeben und der Ansatz „über Kopf“ schwenkend für 1 h bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde 4x mit 1 M und 2x mit 0.1 M LSDB gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Durch die Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-minütige Inkubation bei 95°C wurden die gereinigten GST-Fusionsproteine von der Sepharose gelöst, über ein SDS-PAG aufgetrennt und anschließend durch eine 30-minütige Inkubation des Gels mit *Coomassie brilliant blue* visualisiert.

3.4.5 Aufkonzentration von gereinigten Proteinen mit Histidin-Epitop

Um die Konzentration des gereinigten p300 Proteins mit Histidin-Epitop zu erhöhen, wurden „MICROCON *Centrifugal Filter Devices*“ der Größe YM-30 (Millipore), welche für die Aufkonzentration von Proteinen größer oder gleich 30 kDa geeignet sind, nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.6 Western Blot

Für Western Blot Analysen wurden die über ein SDS-PAG aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (BioRad) übertragen. Dafür wurde eine luftblasenfreie Schichtung aus einem in Transfer-Puffer getränkten Schwamm, zwei Whatman-Papieren, dem Gel, der Membran, zwei weiteren Whatman-Papieren sowie einem weiteren Schwamm hergestellt und nach der Fixierung zwischen zwei Kunststoffplatten in eine Blotkammer übertragen. Es wurde entweder eine Spannung von 40V über Nacht oder von 80V über mindestens 2 h so angelegt, dass sich der Filter zwischen dem Gel und der Anode der Kammer befand. Bei Western Blots mit dem p300 Protein wurde aufgrund der Größe des Proteins und der daraus resultierenden schlechteren Übertragbarkeit auf die Membran grundsätzlich mindestens eine einstündige Spannung von 80V und eine anschließende Spannung von 40V über Nacht gewählt.

Nach dem Transfer folgte, sofern kein vorgefärbter Proteinmarker verwendet worden war, eine einminütige Anfärbung der Proteine mit einer Ponceau-S-Rot-Lösung. Anschließend wurde durch Waschen des Filters mit H₂O die Hintergrundfärbung entfernt und die Markerproteinbanden mit einem Stift nachgezeichnet. Mit einem Skalpell wurde die Membran zurechtgeschnitten und in

TBST wieder vollständig entfärbt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen zu verhindern, wurde der Filter für 1 h in Abblocklösung auf dem Taumler inkubiert und dann 3x5 min mit TBST gewaschen. Daraufhin wurde die Membran auf Parafilm gelegt, mit einer entsprechenden Menge an in Antikörper-Verdünnungslösung verdünntem 1. Antikörper überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Es folgten drei 10-minütige Waschschriffe in TBST und auf Parafilm eine einstündige Inkubation in verdünntem POD-gekoppelten 2. Antikörper. Die einzige Ausnahme bildete hier das Ni²⁺-NTA-Konjugat, welches bereits mit einer POD gekoppelt ist, so dass keine 2. Antikörper-Inkubation notwendig war. Anschließend wurde 4x10 min in TBST gewaschen, die Membran erneut auf Parafilm gelegt und für 1 min mit 0.5-1.0 ml „*BM Chemiluminescent Blotting Substrat*“ (10 µl Lösung A + 990 µl B pro ml) überschichtet. Diese Lösung enthält Luminol, das durch die an den 2. Antikörper gekoppelte POD in einer Oxidationsreaktion umgesetzt wird. Das entstandene Zwischenprodukt zerfällt unter Emission von Licht. Der Filter wurde vorsichtig auf Whatman-Papier abgetropft und zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Expositions-Kassette fixiert. In der Dunkelkammer konnte nun, je nach Stärke des Signals, für einige sec bis hin zu mehreren min ein ECL-Film aufgelegt und entwickelt werden.

3.4.7 *In vitro* Translation

Um Proteine *in vitro* zu translatieren wurde das „*TNT Coupled Reticulocyte Lysate System*“ (Promega) mit ³⁵S-Methionin zur Markierung verwendet. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.4.8 Protein-Protein Interaktionsanalysen

3.4.8.1 Interaktionen mit *in vitro* translatierten, GST- und gereinigten Proteinen mit Histidin-Epitopen

Für Interaktionen von GST-Proteinen mit *in vitro* translatierten Proteinen wurden die GST-Fusionsproteine wie bereits beschrieben an Sepharosekügelchen gebunden und gereinigt, wobei 100 µl des 0.1 M LSDB des letzten Waschschriffes im Eppendorfgefäß belassen wurden. Nun folgte eine Zugabe von 7–10 µl des *in vitro* Translationsansatzes und eine zweistündige Inkubation der Ansätze auf Eis taumelnd. Daraufhin wurden 5-6 Waschschriffe mit 0.1–0.3 M LSDB durchgeführt,

um unspezifische Interaktionen zu minimieren, und es folgte ein letzter Waschschrift mit 0.1 M LSDB. Anschließend wurden die Sepharosekügelchen mit den gebundenen Proteinen in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die so denaturierten Proteine wurden über ein SDS-PAG aufgetrennt, das Gel zur Verstärkung des Signals 10–30 min in Amplifizierer geschwenkt und zuletzt für 45 min im Gelrockner getrocknet. Ein über Nacht bei -80°C radiosensitiver, exponierter Film lieferte den Nachweis der radioaktiv markierten, gebundenen Proteine.

Für das Konkurrenzexperiment wurden die gereinigten, an die Sepharosekügelchen gebundenen GST-Fusionsproteine mit 0.3, 0.75 und 1.5 µg gereinigtem His₆-Protein 2 h bei 4°C „über Kopf“ schüttelnd vorinkubiert, 2x mit 0.1 M LSDB gewaschen und anschließend folgte eine weitere 2-stündige Inkubation mit den *in vitro* translatierten Proteinen. Daraufhin wurden die Sepharosekügelchen 4x mit 0.1 M LSDB gewaschen und weiter verfahren wie oben beschrieben. Um das gebundene His-Protein nachzuweisen, wurde in einem gleichen Experiment das SDS-PAG nicht getrocknet, sondern einem Western Blot mit einem gegen das Histidin-Epitop gerichteten Antikörper unterzogen.

3.4.8.2 Direkte Interaktionen

Für eine direkte Interaktion wurde das gereinigte GST bzw. GST-hNAP-1 mit 0.2 µg gereinigtem His-BPV1 E2 oder mit 0.6 µg gereinigtem His-BPV1 E2ΔC für 2 h bei 4°C „über Kopf“ schüttelnd inkubiert und 4x mit 0.1 M LSDB gewaschen. Die Sepharosekügelchen mit den gebundenen Proteinen wurden nun in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Nach der Auftrennung der Proteine über ein SDS-PAG wurde ein Western Blot dem entsprechenden Antikörper durchgeführt.

Für weitere direkte Interaktionen wurde GST bzw. GST-hNAP-1 mit 0.1 µg gereinigtem His-p53 oder GST bzw. GST-p53 mit 0.3 µg gereinigtem His-hNAP-1 inkubiert und weiter verfahren wie oben beschrieben.

3.4.8.3 Koimmunpräzipitationen

Für die Koimmunpräzipitationen wurden pro Ansatz ein bis zwei 15 cm Zellkulturschalen mit 293T-Zellen mit Expressionsvektoren für die entsprechenden Proteine transfiziert und nach etwa 48 h Zellextrakte hergestellt. Nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 0.5–2 mg Extrakt für 2-3 h mit FLAG-AK-gekoppelten oder für 4-5 h mit p300-AK-gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert. Es folgten 4–10 Waschschriffe mit 0.1–0.3 M LSDB und ein letzter mit 0.1 M LSDB, bevor 20 µl 2x SDS-Probenpuffer zugefügt wurden und eine 5-minütige Inkubation bei 95°C durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Proteine im SDS-PAG aufgetrennt und im Western Blot mit Hilfe entsprechender Antikörper visualisiert.

Für die Koimmunpräzipitation der beiden endogenen Proteine p53 und hNAP-1 wurden RTS3b- und NHEK-Zellkernextrakte hergestellt, je 85 µg mit p53-AK-gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert und entsprechend verfahren.

3.4.8.4 Analyse von Interaktionen mittels Ultrazentrifugation

Für die Interaktion wurden gereinigte Proteine mit Histidin-Epitop in 150 µl 0.1 M LSDB Puffer bei 4°C „über Kopf“ schüttelnd für 2 h inkubiert. In dieser Zeit wurde ein Glycerolgradient angelegt, indem je eine Schicht von 0.5 ml HEMG mit einer Glycerolkonzentration von 30%, 22.5%, 15% bzw. 7.5% in dünnwandige 2.2 ml Zentrifugenröhrchen (Beckman) pipettiert wurde und daraufhin eine Inkubation dieser Röhrchen für 30 min bei RT und für 1 h bei 4°C erfolgte. Nach Zentrifugation der Interaktionsansätze für 10 min bei 10,000g und 4°C wurden diese vorsichtig auf den Glycerolgradienten pipettiert und 8 h bei 250,000g in einer TL100 Tisch-Ultrazentrifuge (Beckman) und dem TLS-55 ausschwingenden Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden langsam und sehr vorsichtig von oben beginnend 36 Fraktionen von je 60 µl in 1.5 ml Eppendorfgefäße auf Trockeneis pipettiert. Für die Analyse wurden von jeder 2.-3. Fraktion 10 µl entnommen, diese mit 10 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und die Proteine in einem SDS-PAG aufgetrennt. Die anschließenden Western Blots wurden mit dem gegen das Histidin-Epitop gerichteten Antikörper durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1 GST-8E2 bindet hNAP-1 *in vitro*

Das E2 Protein der PV ist ein multifunktionales Protein, welches wichtige regulatorische Funktionen sowohl bei der viralen Transkription als auch bei der Replikation erfüllt. Neben diesen Aktivitäten spielt E2 in der infizierten Zelle auch eine Rolle innerhalb des Zellzyklus, der Apoptose, der Zelltransformation, der Zellalterung und der Aktivierung zellulärer Promotoren (s. Einleitung). Diese Effekte vermittelt das E2 Protein durch seine Interaktion mit zellulären Faktoren, weshalb eine Charakterisierung der Wechselwirkung von E2 mit zellulären Proteinen von Bedeutung ist, um Aufschluss darüber zu erlangen, inwiefern diese mit ihren jeweiligen Funktionen zu den E2-vermittelten Aktivitäten einen Beitrag leisten.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass an die Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniertes hNAP-1 mit den *in vitro* translatierten (ivt), ³⁵S-markierten E2 Proteinen von BPV1, HPV8 und HPV18 interagiert. Bei der Analyse zweier Deletionsmutanten des BPV1 E2 zeigte sich nur noch eine schwache Wechselwirkung mit BPV1 E2 Δ 1-160, welchem die 160 N-terminalen Aminosäuren (AS) fehlen. Mit einer Deletionsmutante, die nur die H und den C-Terminus besitzt (BPV1 E2 Δ 1-203) konnte dagegen keine Interaktion mehr beobachtet werden. Somit ließ sich die Wechselwirkung im Fall von BPV1 E2 auf die AD eingrenzen (SCHMIDT, 1999).

Um diese Bindung weiter zu überprüfen wurde in einem umgekehrten Experiment bakteriell exprimiertes und über Glutathion-Sepharose gereinigtes GST-8E2 mit ivt, ³⁵S-markiertem hNAP-1 inkubiert (Abb. 4). Unspezifisch gebundene Proteine wurden über vier Waschschrte mit 0.2 M LSDB entfernt. Die Spuren 4 und 5 in Abbildung 4B zeigen die eingesetzten Mengen der GST-Proteine nach einer Färbung des SDS-PAG mit *Coomassie brilliant blue*. Während eine Interaktion von hNAP-1 mit dem GST-8E2 Protein nachgewiesen werden konnte (Abb. 4A, Spur 3), lieferte die Inkubation mit GST allein nur ein Hintergrundsignal (2).

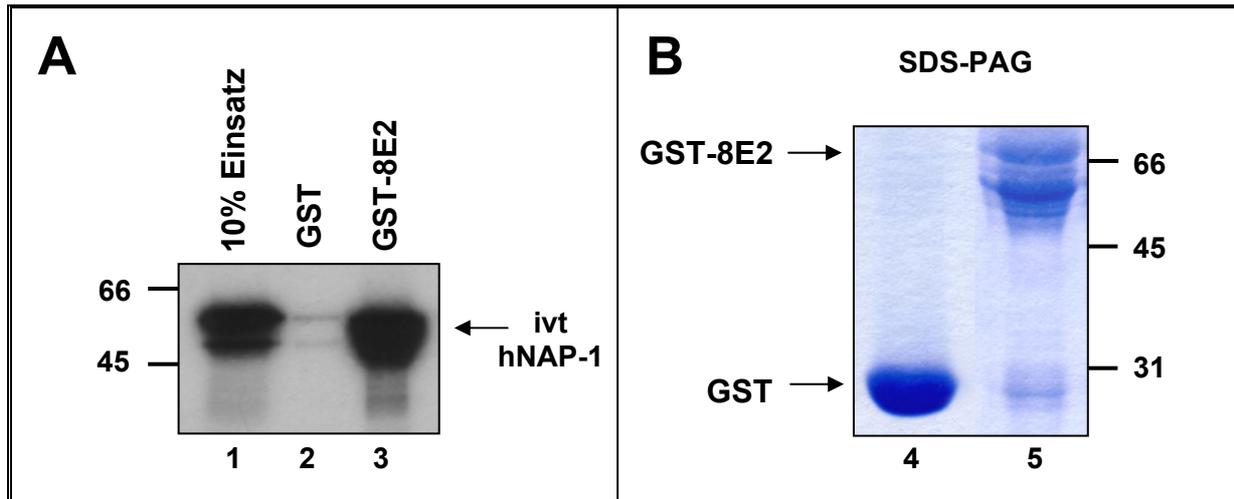


Abb. 4 GST-8E2 bindet *in vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes hNAP-1.

(A) Interaktionsanalyse. 2 µg GST (Spur 2) oder GST-8E2 (3) wurde über Glutathion-Sepharose gereinigt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem hNAP-1 inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.2 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Spur 1 zeigt 10% des eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes. (B) SDS-PAG. Zur Kontrolle wurden die für die Interaktionsanalyse eingesetzten Mengen an GST und GST-8E2 über Glutathion-Sepharose gereinigt, in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und mit *Coomassie brilliant blue* gefärbt. (ivt = *in vitro* translatiertes)

4.2 Die Bindung von hNAP-1 an BPV1 E2 ist direkt

Um auszuschließen, dass die Interaktion von hNAP-1 mit BPV1 E2 über einen dritten Faktor vermittelt wird, der sich in dem für die *in vitro* Translationen verwendeten Retikulozytenlysat befindet und somit als Brückenprotein dienen könnte, wurde untersucht, ob E2 und hNAP-1 direkt aneinander binden. Hierfür wurden bakteriell exprimierte, gereinigte, an ein Histidin-Epitop (His₆) fusionierte BPV1 E2 Proteine verwendet. Da das gesamte His-BPV1 E2 vergleichsweise gering exprimiert wurde, fungierte His₆-BPV1 E2ΔC als Kontrolle. Entsprechend den Vorversuchen, welche die AD von BPV1 E2 für die Bindung verantwortlich machten, sollte hier das BPV1 E2ΔC hNAP-1 ebenso binden. Bakteriell exprimiertes GST-hNAP-1 oder GST wurde über die Glutathion-Sepharose Matrix gereinigt (Abb. 5B, Spuren 9 und 10) und mit den His₆-Proteinen (Abb. 5B, Spuren 7 und 8) inkubiert. Gebundene Proteine wurden in einem Western Blot (WB) mit einem Ni²⁺-NTA-konjugierten Antikörper (Ak), der das Histidin-Epitop erkennt, detektiert (Abb. 5A). GST-hNAP-1 (3 und 6) war in der Lage His₆-BPV1 E2 (3) und His₆-BPV1 E2ΔC (6) zu präzipitieren, während GST alleine (2 und 5) kein Signal erzeugte. Hierbei sind die gebundenen volle-Länge Proteine mit einem Stern gekennzeichnet. Eine N-terminale, das Histidin-Epitop enthaltende, proteolytische Form des E2 Proteins

wurde ebenfalls in beiden Fällen von GST-hNAP-1 gebunden (3 und 6). Jeweils 10% der eingesetzten His₆-Proteine wurden in Spuren 1 und 4 aufgetragen. Dies demonstriert, dass E2 direkt an hNAP-1 bindet.

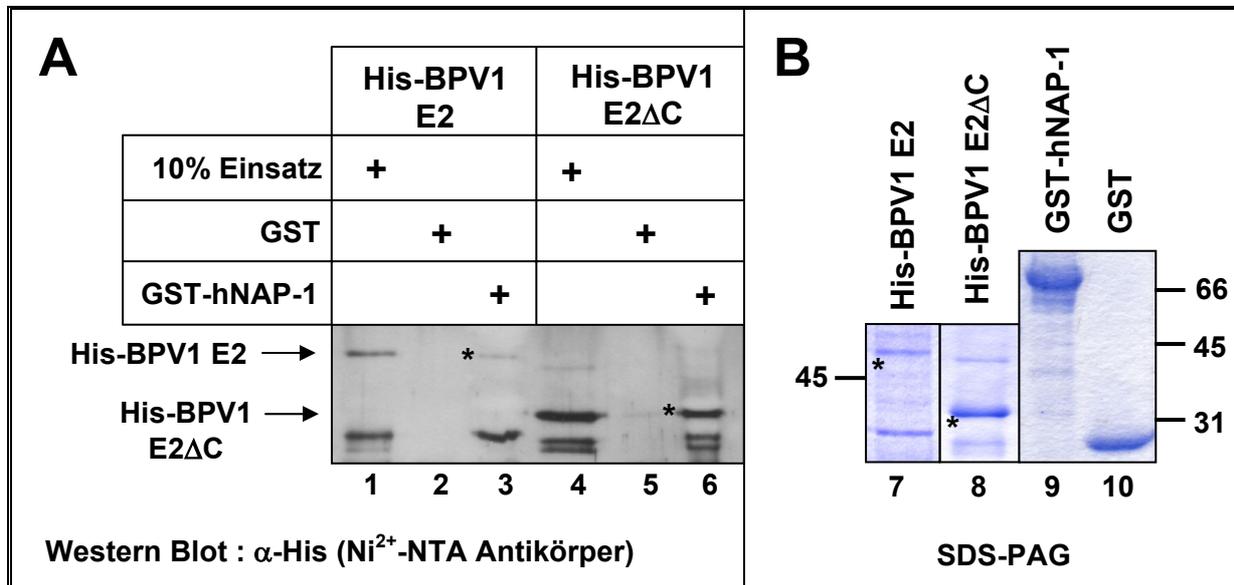


Abb. 5 BPV1 E2 bindet direkt an hNAP-1.

(A) Interaktionsanalyse mit bakteriell exprimierten, gereinigten Proteinen. 1 µg GST (Spur 2 und 5) oder GST-hNAP-1 (3 und 6) wurde über Glutathion-Sepharose gereinigt und mit 0.2 µg gereinigtem His-BPV1 E2 oder 0.6 µg gereinigtem His-BPV1 E2ΔC inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und diese in einem anschließenden Western Blot mit einem Ni²⁺-NTA-konjugierten Antikörper detektiert.

(B) Coomassie gefärbte SDS-PAG zeigen die eingesetzten, gereinigten His- und GST-Proteine.

4.3 hNAP-1 interagiert mit E2 Proteinen *in vivo*

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen hNAP-1 und E2 *in vivo* nicht nur in der Hefe, sondern auch in humanen eukaryoten Zellen stattfindet und somit von funktioneller Relevanz für die Infektion mit PV sein könnte. Für Koimmunpräzipitationen wurde der ORF für das mit einem Hämagglutinin(HA)-Epitop fusionierte hNAP-1 in den Vektor pXJ41 und sämtliche für die mit einem FLAG-Epitop fusionierten E2 Proteine kodierenden Gene in den Vektor pCMV2 kloniert. Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden allein und in Kombinationen in 293T Zellen (humane, Adenovirus transformierte Epithelzelllinie) transfiziert und die Extrakte über an Sepharosekügelchen gebundene FLAG-Antikörper gereinigt. Hierbei wurden unspezifische Wechselwirkungen über vier Waschschriffe in LSDB mit bis zu 0.25 M KCl entfernt. Gebundene Proteine wurden über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und in WB Analysen mit Antikörpern,

welche das HA- bzw. FLAG-Epitop erkennen, detektiert (Abb. 6). In Spuren 5 bis 8 ist im WB, der mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten AK entwickelt wurde, jeweils 1/40 des Einsatzes der Extrakte für die Immunpräzipitation (IP) zu sehen. Nur FLAG-BPV1 E2 war in der Lage, HA-hNAP-1 zu präzipitieren (Spur 3), während HA-hNAP-1 allein eine minimale Affinität zu der α -FLAG-gekoppelten Sepharose-Matrix zeigte (2). Extrakte aus Zellen, die entweder mit beiden Leervektoren (4) oder mit dem Expressionsvektor für FLAG- BPV1 E2 allein (1) transfiziert worden waren, lieferten kein Signal. Die Spuren 1 bis 4 des unteren WB, welcher mit dem FLAG-Ak entwickelt wurde, zeigen die Expression des E2 Proteins. In diesem WB ist auf annähernd gleicher Höhe ebenfalls ein anderes, mit dem FLAG-Antikörper kreuzreagierendes Protein sichtbar, weshalb das E2-Protein mit einem Stern gekennzeichnet wurde. Da die Bindung zwischen BPV1 E2 und hNAP-1 *in vitro* auf

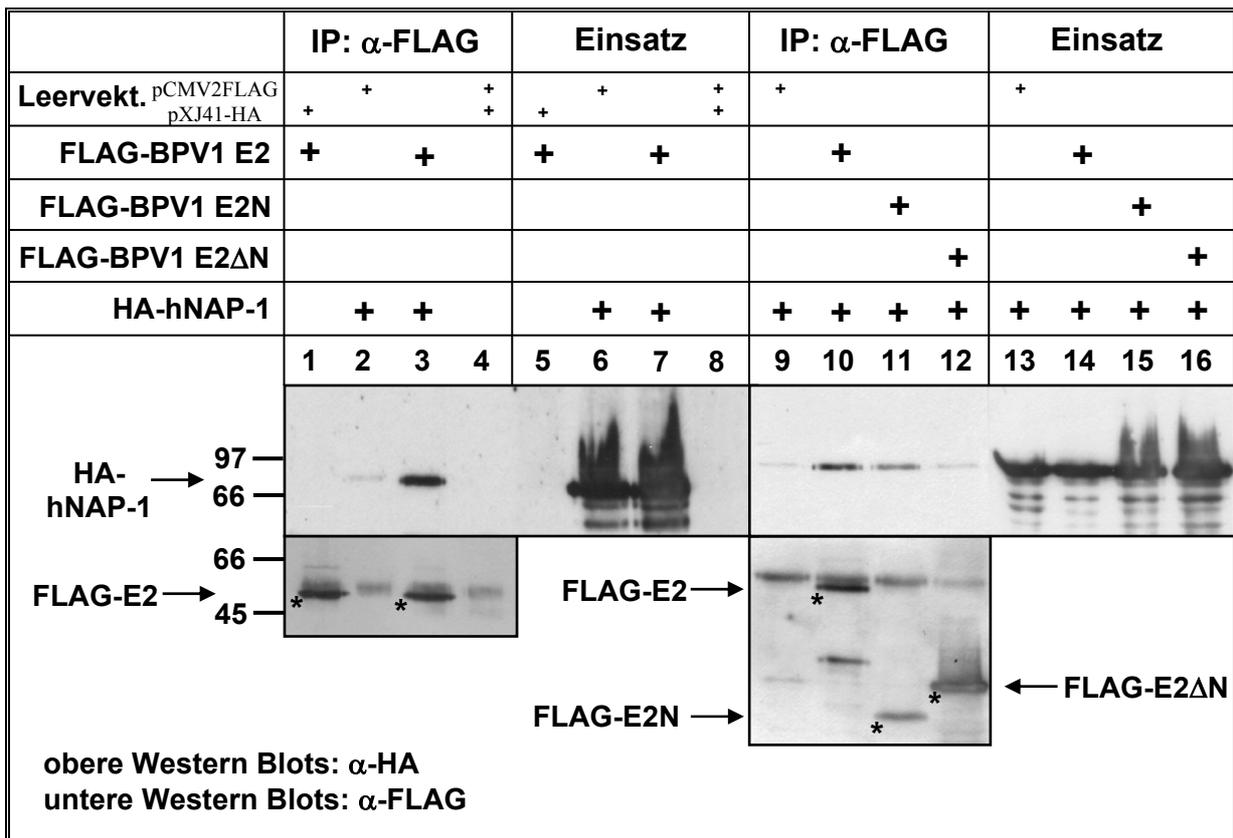


Abb. 6 FLAG-BPV1 E2 präzipitiert HA-hNAP-1. Koimmunpräzipitation. 293T-Zellen wurden mit jeweils 10 μ g pCMV2FLAG-BPV1 E2 (Spuren 1, 3, 5, 7, 10 und 14), pCMV2FLAG-BPV1 E2 N (11 und 15), pCMV2FLAG-BPV1 E2 Δ N (12 und 16), jeweils 5 μ g pXJ41-HA-hNAP-1 (2, 3, 6, 7 und 9-16) und entsprechenden Leervektoren transfiziert. 1.5 mg der nach 45h hergestellten Zellextrakte wurden mit FLAG-Antikörper-gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert, gebundene Proteine nach viermaligem Waschen mit 0.25 M LSDB Puffer in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem anschließenden Western Blot mit Antikörpern gegen das Hämagglutinin(HA)- und gegen das FLAG-Epitop (untere WB) detektiert. Spuren 5-8 und 13-16 zeigen im HA-WB 1/40 des Einsatzes für die Immunpräzipitation (IP) (Spuren 1-4 und 9-12). Die FLAG-getaggen Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. (Leervekt. = Leervektoren)

die AD des E2 Proteins eingegrenzt werden konnte, sollte untersucht werden, ob diese auch für die *in vivo* Bindung verantwortlich ist. Hierfür wurde ein äquivalentes Experiment zusätzlich mit Expressionsvektoren durchgeführt, welche entweder für den N-Terminus (FLAG-BPV1 E2N) oder für die Hinge-Region und den C-Terminus (FLAG-BPV1 E2ΔN) des BPV1 E2 Proteins kodieren (Spuren 9 bis 16). In Spuren 13 bis 16 ist jeweils 1/40 des Einsatzes der Extrakte für die IP im WB, der mit dem HA-Ak entwickelt wurde, mit HA-hNAP-1 (6 und 7) zu sehen und Spuren 9 bis 12 zeigen die gebundenen Proteine nach der IP. Sowohl FLAG-BPV1 E2 als auch FLAG-BPV1 E2N waren in der Lage, HA-hNAP-1 zu präzipitieren (10 und 11), während die Inkubation mit FLAG-BPV1 E2ΔN nur ein Hintergrundsignal lieferte (12). Auch hier wurde eine geringe Affinität des HA-hNAP-1 zu der α-FLAG-gekoppelten Sepharose-Matrix beobachtet (9). Die Expression der E2 Proteine ist im unteren Teil im WB, welcher mit dem FLAG-Ak entwickelt wurde, sichtbar (9 bis 12). Somit ist die BPV1 E2 AD auch *in vivo* für die Interaktion mit hNAP-1 verantwortlich.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob auch andere E2 Proteine *in vivo* hNAP-1 binden. Da *in vitro* bereits positive Ergebnisse bezüglich HPV8 E2 und HPV18 E2 vorlagen und diese neben dem animalen Vertreter BPV1 E2 jeweils ein repräsentatives Mitglied für einen *Ev*-assoziierten und einen mit dem Zervixkarzinom

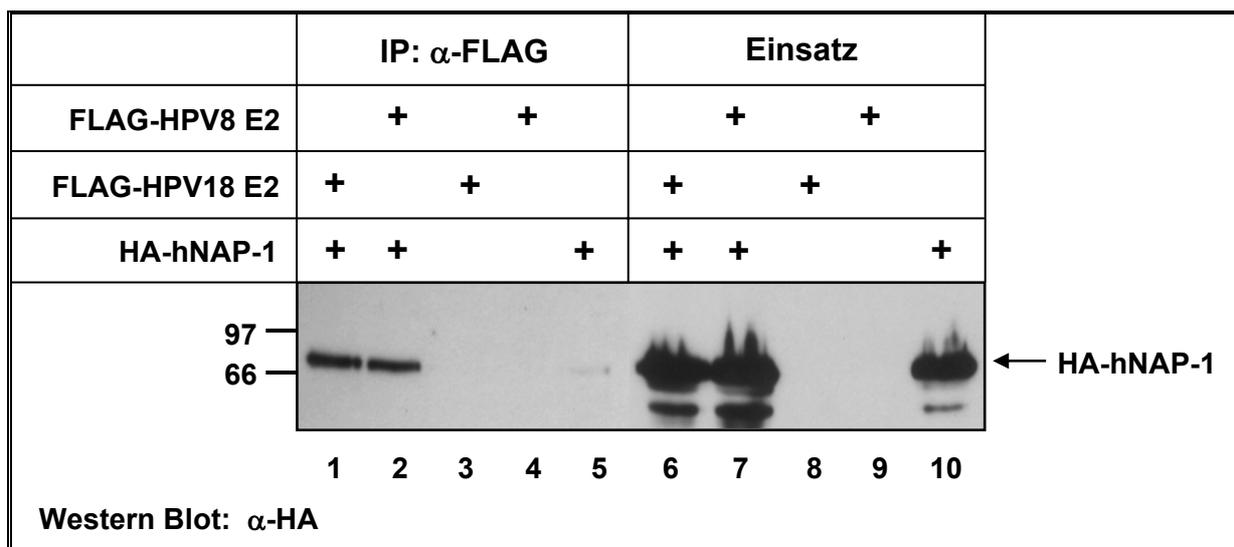


Abb. 7 FLAG-HPV8 und HPV18 E2 binden HA-hNAP-1.

Koimmunpräzipitation. 293T-Zellen wurden mit jeweils 10 µg pCMV2FLAG-HPV8 E2 (Spuren 2, 4, 7 und 9), pCMV2FLAG-HPV18 E2 (1, 3, 6 und 8), 5 µg pXJ41-HA-hNAP-1 (1, 2, 5 - 7 und 10) sowie den entsprechenden Leervektoren transfiziert, geerntet, wie in Abb. 6 beschrieben mit FLAG-Antikörpergekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert, gewaschen und gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. In einem Western Blot mit einem Antikörper gegen HA wurde das HA-getaggte hNAP-1 detektiert.

assoziierten Typen darstellen, wurde eine entsprechende Koimmunpräzipitation mit diesen E2 Proteinen durchgeführt (Abb.7). In Spuren 6 bis 10 ist jeweils 1/80 des Einsatzes der Extrakte für die IP im WB, der mit dem HA-Ak entwickelt wurde, mit HA-hNAP-1 (6, 7 und 10) zu sehen. Spuren 1 bis 5 zeigen die gebundenen Proteine nach der IP. Sowohl FLAG-HPV18 E2 (1) als auch FLAG-HPV8 E2 (2) waren in der Lage, HA-hNAP-1 zu präzipitieren. Extrakte aus Zellen, welche entweder mit dem Expressionsvektor für FLAG-18E2 oder dem für FLAG-8E2 transfiziert worden waren (3 und 4), lieferten kein Signal. Dieses Experiment bestätigt somit eine Wechselwirkung von HPV8 E2 und HPV18 E2 mit hNAP-1 *in vivo*.

4.4 Überexprimiertes BPV1 E2 präzipitiert endogenes hNAP-1

Da bis hierher alle Proteine entweder *in vitro* translatiert oder überexprimiert worden waren, stellte sich die Frage nach der Wechselwirkung der beiden Proteine innerhalb ihrer physiologischen Konzentrationen. Aufgrund der aktuellen biologischen, experimentellen Systeme gibt es keine Möglichkeit, E2 Proteine innerhalb ihrer normalen physiologischen Konzentrationen während einer Infektion zu untersuchen. In allen existierenden HPV positiven Zelllinien liegt das HPV Genom im zellulären Genom integriert vor. Dieses Ereignis hatte jeweils die Zerstörung des offenen E2 Leserahmens zur Folge (SCHWARZ *et al.*, 1985; MATSUKURA *et al.*, 1986). Somit sollte untersucht werden, ob überexprimiertes BPV1 E2 mit endogenem hNAP-1 interagiert. Hierfür wurden Expressionsvektoren für BPV1 E2 oder für die bakterielle, alkalische Phosphatase (BAP = *Bacterial Alkaline Phosphatase*) als Kontrolle in 293T-Zellen transfiziert und die Extrakte über die α -FLAG-gekoppelte Sepharose-Matrix gereinigt. Gebundene Proteine wurden in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und in einem WB mit einem gegen das humane NAP-1 gerichteten Antikörper detektiert (Abb. 8). Spuren 1 bis 3 zeigen 1/160 des Einsatzes der Extrakte für die IP. Überexprimiertes FLAG-BPV1 E2 war in der Lage, das endogene hNAP-1 zu präzipitieren (Spur 6), während in den Spuren mit Extrakten aus Zellen, welche mit dem Leervektor oder mit dem Expressionsvektor für BAP transfiziert worden waren, kein entsprechendes Signal beobachtet wurde (4 und 5). Um die Expression der FLAG-Proteine zu demonstrieren, wurden die Spuren 4 bis 6 zur Kontrolle zusätzlich mit dem FLAG-Ak inkubiert (unterer WB).

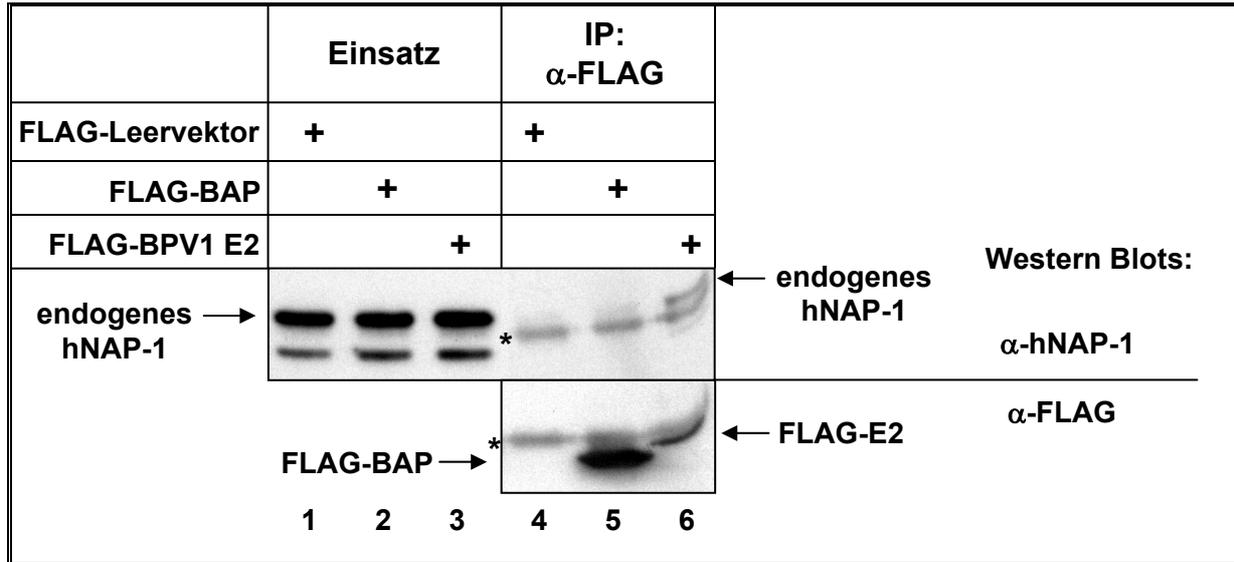


Abb. 8 Überexprimiertes FLAG-BPV1 E2 präzipitiert endogenes hNAP-1.
 Koimmunpräzipitation. 293T-Zellen wurden mit jeweils 15 μ g pCMV2FLAG-BPV1 E2 (Spuren 3 und 6), pCMV2FLAG-BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) (2 und 5) oder dem Leervektor (1 und 3) transfiziert und 815 μ g der nach 45h hergestellten Zellextrakte wurden mit FLAG-Antikörpergekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert. Gebundene Proteine wurden nach achtmaligem Waschen mit 0.25 M LSDB Puffer in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und in einem anschließenden Western Blot mit Antikörpern gegen das humane NAP-1 und gegen das FLAG-Epitop detektiert. Spuren 1-3 zeigen im hNAP-1-WB 1/160 des Einsatzes für die Immunpräzipitation (IP) (4-6). Auf ähnlicher Höhe befindet sich ein weiteres, mit beiden Antikörpern kreuzreagierendes Protein, welches mit einem Stern gekennzeichnet wurde.

Somit binden verschiedene E2 Proteine der PV hNAP-1 *in vitro* und *in vivo*, was im Falle von BPV1 auf die Aktivierungsdomäne des E2 Proteins zurückgeführt werden konnte. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass BPV1 E2 das in seinen physiologischen Mengen in der Zelle vorliegende hNAP-1 bindet.

4.5 hNAP-1 und BPV1 E2 aktivieren synergistisch die Transkription des synthetischen Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc

Nachdem nun nachgewiesen worden war, dass die E2 Proteine hNAP-1 auch *in vivo* binden, sollte untersucht werden, ob diese Bindung von funktioneller Relevanz ist. Wie bereits erwähnt, agiert die Familie der NAP Proteine als Histon Chaperone, welchen Funktionen sowohl bei der Transkription als auch bei der Replikation zugeschrieben wurden (ASAHARA *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 1996 und 2000; JIANG *et al.*, 2000; LEROY *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2001 und SHIKAMA *et al.*, 2000). In transienten Transfektionsanalysen sollte die Verwendung eines Konstruktes, welches die regulatorische Region von BPV1 einschließlich mehrerer viraler Promotoren, die von E2 reguliert werden, enthält, erste Hinweise über eine mögliche Funktion der Wechselwirkung bei der E2-vermittelten Aktivierung der Transkription geben.

Es wurde bereits früh gezeigt, dass das vollständige BPV1 E2 Protein durch Bindung an die 12 E2 BS innerhalb der LCR von BPV1 mehrere Promotoren aktivieren kann (SPALHOLZ *et al.*, 1985, 1987 und 1991; VANDE POL und HOWLEY, 1990; BARKSDALE und BAKER, 1993). Für die Transfektionsstudien wurde zunächst die gesamte BPV1 LCR in den Vektor pALuc kloniert (Abb. 9A). Als Expressionsplasmide dienten das bereits in den Immunpräzipitationen eingesetzte pXJ41-HA-hNAP-1 und pC59 (beschrieben in YANG *et al.*, 1985), welches BPV1 E2 unter der Kontrolle des SV40 Promotors exprimiert. RTS3b-Zellen – HPV-negative Keratinozyten, die aus einem Plattenepithelkarzinom der Haut isoliert wurden – welche natürliche PV Zielzellen darstellen (PURDIE *et al.*, 1993), wurden wie in Methoden beschrieben mit dem Reporterkonstrukt und den Expressionsplasmiden kotransfiziert. Um stets die gleiche Menge an Gesamt-DNA zu transfizieren, wurden die jeweiligen Ansätze variabler DNA-Mengen in allen in dieser Arbeit präsentierten transienten Transfektionen mit den entsprechenden Mengen an Leervektoren ergänzt. So lag außerdem für zelluläre DNA-bindende Faktoren grundsätzlich eine vergleichbare Anzahl an Promotoren vor. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz standen verschiedene β -Galactosidase-Konstrukte als interner Standard zur Verfügung. In Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, dass deren Promotoren durch die Überexpression von E2 ebenfalls beeinflusst wurden und somit nicht geeignet

waren. Aus diesem Grund wurden die ermittelten Luciferase-Werte gegen entsprechende Protein-Konzentrationen der jeweiligen Ansätze relativiert.

Die basale Aktivität nach Transfektion des Reporterkonstruktes allein wurde als 1 definiert und alle weiteren Werte dazu in Beziehung gesetzt. Wie in Abb. 9B zu sehen ist, führte die Transfektion des Expressionsplasmides für BPV1 E2 je nach eingesetzter Menge zu einer 100- bis 130-fachen Aktivierung der Luciferase-Expression, während hNAP-1 die Promotoraktivität zweifach stimulierte. Die Koexpression beider Proteine resultierte bei geringen E2 Konzentrationen in einer 500-fachen Aktivierung. Diese Kooperativität bei der Aktivierung der Transkription durch hNAP-1 und BPV1 E2 sank bei höheren E2 Mengen.

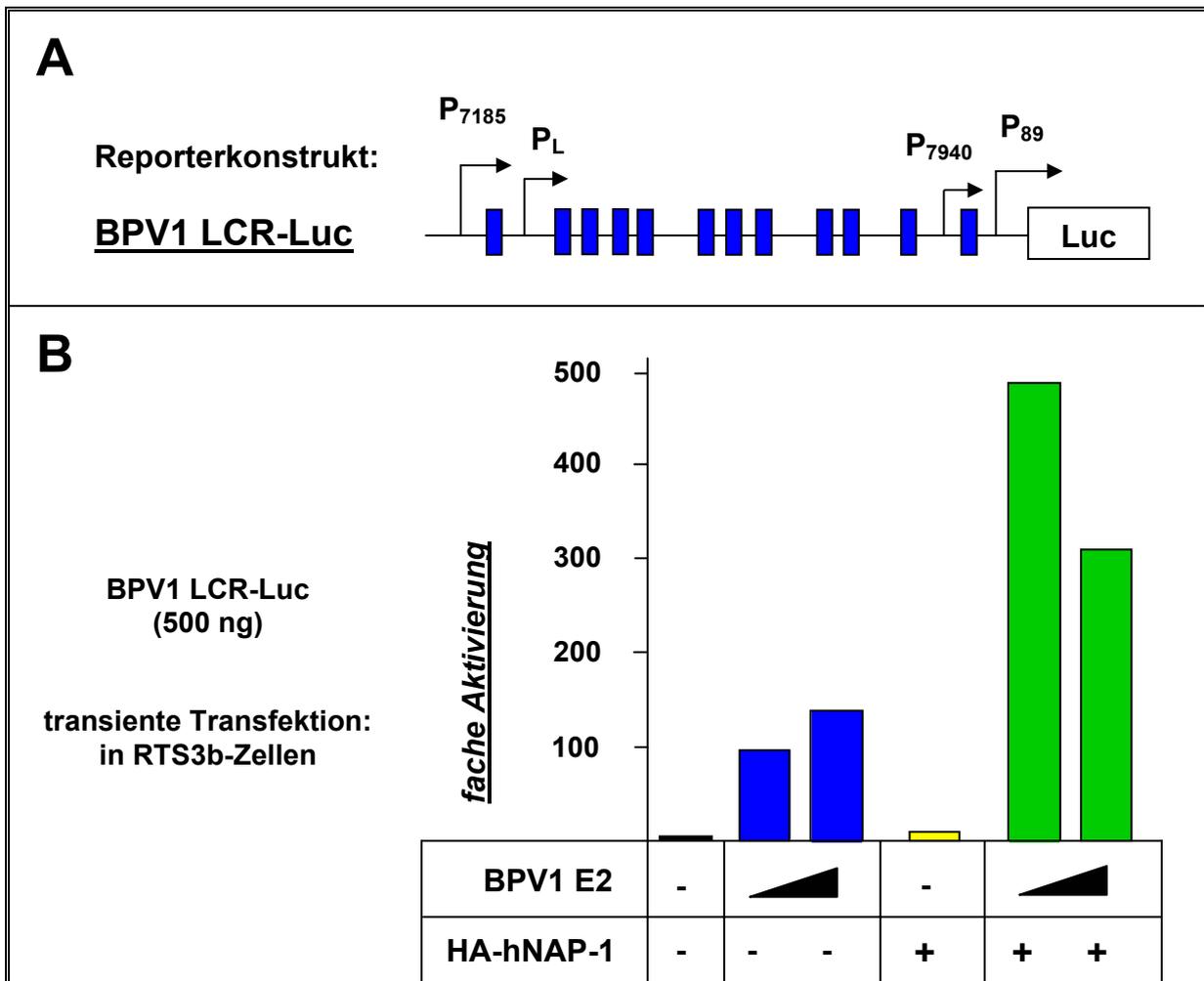


Abb. 9 BPV1 E2 und hNAP-1 kooperieren bei der Aktivierung der BPV1 Genexpression.

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc. Angegeben sind die in der LCR von BPV1 lokalisierten E2-Bindestellen (blaue Boxen) und die Promotoren. (B) Transiente Transfektionsstudie. In RTS3b-Zellen wurden 500ng des Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc, 5 bzw. 20 ng BPV1 E2 (pc59) und 500 ng pXJ41-HA-hNAP-1 kotransfiziert. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Die Koexpression der hier verwendeten Mengen an Expressionsplasmiden für E2 und hNAP-1 führte nicht zu einer erhöhten Aktivität des frühen SV40 Promotors, unter dessen Kontrolle das E2 Protein exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt), was die Möglichkeit ausschließt, dass der stimulierende Effekt auf erhöhte Expression von E2 durch hNAP-1 zurückzuführen ist. Somit konnte demonstriert werden, dass das E2 Protein und hNAP-1 die BPV1 Genexpression synergistisch aktivieren, was in Übereinstimmung zu einer direkten Bindung der beiden Proteine steht.

4.6 Die AD von BPV1 E2 ist für die Kooperation mit hNAP-1 verantwortlich

FERGUSON und BOTCHAN konnten durch die Einführung einer Vielzahl verschiedener Punktmutationen in das BPV1 E2 Protein zeigen, dass eine Änderung der Glutaminsäure an Position 39 in Alanin (E39A) zwar nur einen geringen Einfluss auf die Transkription hatte, die Replikation jedoch auf nur noch 15% der Wildtyp(wt)-Aktivität reduzierte. Eine Mutation des Isoleucins an Stelle 73 in Alanin (I73A) beeinflusste anders herum nicht die Replikation, führte aber zum Verlust der Transkriptionsaktivierung (FERGUSON und BOTCHAN, 1996). Um zu testen, ob diese Mutationen die durch E2 und hNAP-1 vermittelte Aktivierung der Genexpression von BPV1 beeinflussen, sollte zunächst in einem GST *pull-down* Experiment untersucht

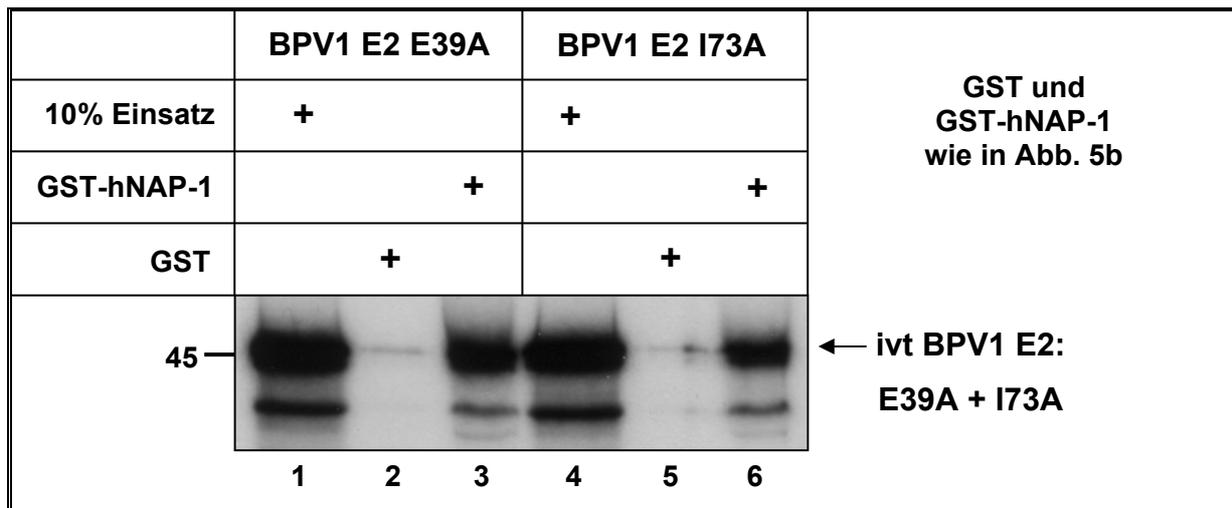


Abb. 10 GST-hNAP-1 bindet beide *in vitro* translatierten BPV1 E2 Mutanten.

Interaktionsstudie. 1 µg GST (Spur 2 und 5) oder GST-hNAP-1 (3 und 6) wurden über Glutathion-Sepharose gereinigt und mit 10µl des *in vitro* Translationsansatzes von BPV1 E2 E39A (replikationsdefizient, Spuren 1-3) oder BPV1 E2 I73A (transkriptionsdefizient, Spuren 4-6) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.2 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Die Spuren 1 und 3 zeigen 10% des Einsatzes des jeweiligen *in vitro* Translationsproduktes. (ivt = *in vitro* translatiertes)

werden, ob hNAP-1 die E2-Mutanten binden kann (Abb. 10). Mit Hilfe von *in vitro* Mutagenesen wurden hierfür die beiden Mutationen wie in Methoden beschrieben jeweils in das Konstrukt pET8c-BPV1 E2 eingeführt, welches die Expression von E2 unter der Kontrolle des T7-Promotors ermöglicht. Wie in der Abb. 10 zu sehen ist, beeinflussten beide Mutationen die Bindung an GST-hNAP-1 nicht (Spuren 3 und 6), wobei GST allein nur ein Hintergrundsignal lieferte (2 und 5). Spuren 1 und 4 zeigen jeweils 10% des Einsatzes der *in vitro* translatierten Proteine.

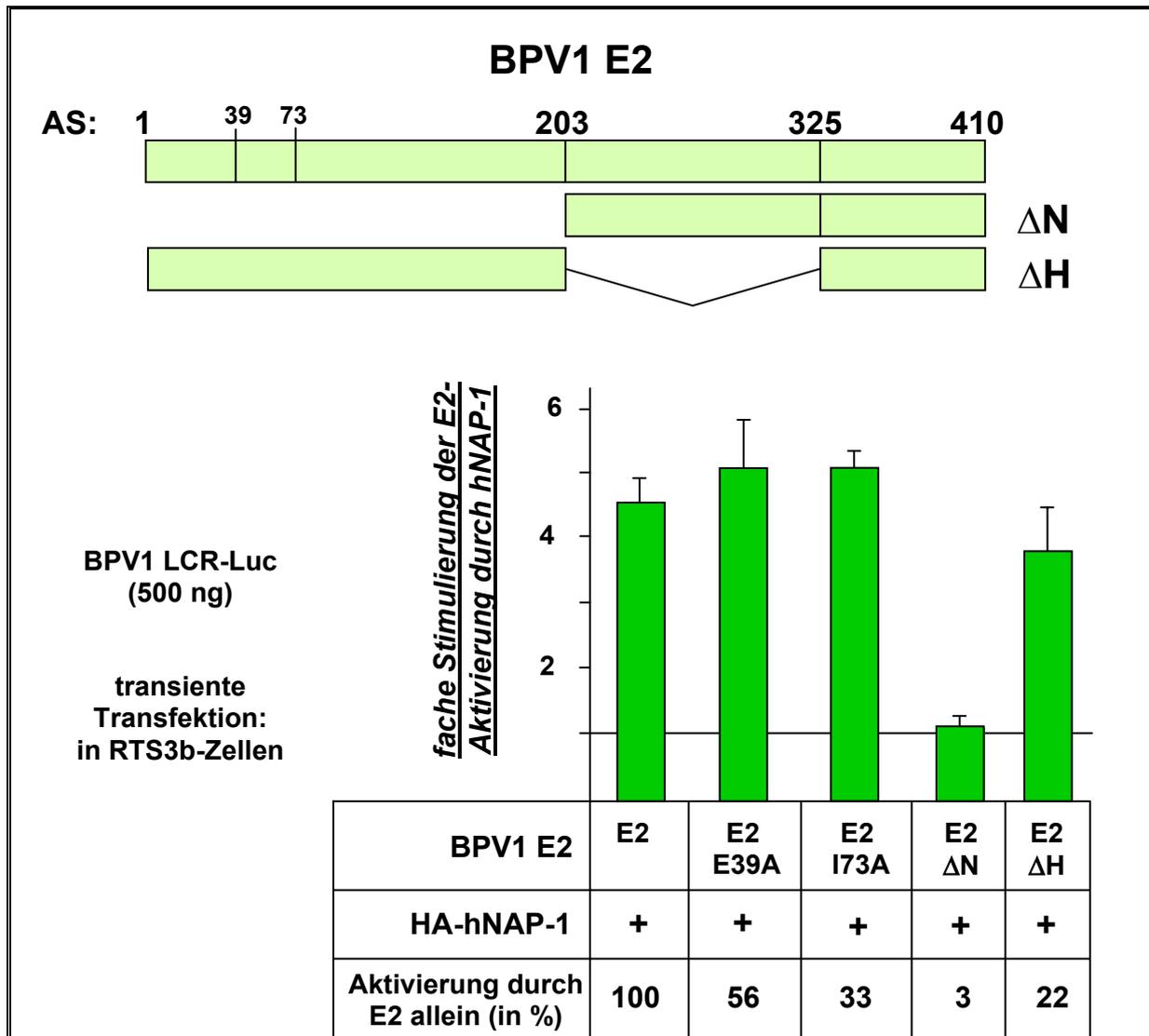


Abb. 11 Die Mutationen haben keinen Einfluss auf die Kooperation zwischen hNAP-1 und BPV1 E2 bei der Aktivierung der Genexpression.

Transiente Transfektionsanalyse. In RTS3b-Zellen wurden 500ng des Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc, 5 ng BPV1 E2, BPV1 E2 E39A oder I73A, zur Kontrolle BPV1 E2 ΔN oder ΔH (pc59 Konstrukte) und 500 ng pXJ41-HA-hNAP-1 kotransfiziert. Die Aktivierung durch BPV1 E2 wurde als 1 definiert und die fache Stimulierung der E2-Aktivierung durch hNAP-1 dargestellt. Die alleinigen Aktivierungen der jeweiligen E2 Proteine sind in % angegeben, wobei die Aktivierung durch BPV1 E2 als 100% definiert wurde. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben. (AS = Aminosäure)

Für die transienten Transfektionen wurden die beiden entsprechenden Mutationen – ebenfalls durch *in vitro* Mutagenese – in das Konstrukt pC59 eingeführt. Neben dem Reporterkonstrukt BPV1 LCR-Luc (Abb. 9A), den Expressionsvektoren für hNAP-1 und BPV1 E2 wurden diejenigen für die beiden E2 Mutanten E39A und I73A in RTS3b-Zellen transfiziert (Abb.11). Wie bereits früher gezeigt wurde, wird die Interaktion mit hNAP-1 von der AD des E2 Proteins vermittelt. Entsprechend war BPV1 E2 Δ N – im Gegensatz zu BPV1 E2 Δ H – nicht in der Lage hNAP-1 zu binden (Schmidt, 1999). Um die Rolle der AD bzw. der H-Domäne bei der Kooperativität mit hNAP-1 zu ermitteln, wurden zusätzlich Expressionsvektoren für BPV1 E2 Δ N und E2 Δ H transfiziert. Aufgetragen ist die fache Stimulierung der Aktivierung der verschiedenen E2 Proteine durch hNAP-1. Im oberen Teil der Abb.11 sind die E2-Proteine schematisch dargestellt. Im unteren Teil sind die relativen Aktivierungen der jeweiligen E2-Proteine angegeben, wobei diejenige durch das wt-E2 als 100% definiert wurde. Die Expression von E2 E39A resultierte dabei in 56% und die Expression von E2 I73A in 33% der Transkriptionsaktivierung im Vergleich zum wt-E2. Die jeweilige Koexpression dieser beiden E2-Mutanten zusammen mit hNAP-1 führte nicht zu einer signifikanten Verringerung der vier- bis fünffachen Stimulierung durch hNAP-1. Wie erwartet, konnte jedoch weder durch die Expression der Mutante, der die AD von E2 fehlt (E2 Δ N), allein (3%) noch durch Koexpression von hNAP-1 eine Aktivierung beobachtet werden. E2 Δ H wies dagegen im Vergleich zum wt-E2 noch 22% der Aktivierung auf, welche durch hNAP-1 vierfach stimuliert werden konnte.

Somit wird die Bindung an hNAP-1 und die daraus resultierende Kooperativität bei der Aktivierung der Transkription nicht durch die replikationsreduzierende Mutation E39A, aber auch nicht durch die transkriptionsreduzierende Mutation I73A beeinträchtigt. Überdies konnte gezeigt werden, dass die AD von BPV1 E2 nicht nur für die Bindung an hNAP-1, sondern ebenfalls für die Kooperativität der beiden Proteine verantwortlich ist.

4.7 hNAP-1 und BPV1 E2 kooperieren bei der Aktivierung des stabil in das zelluläre Genom integrierten Reporterkonstruktes

Als Histon Chaperon könnte hNAP-1 bei der Kooperativität mit BPV1 E2 während der Aktivierung der BPV1 Genexpression den Status des Chromatins ändern. Es ist bekannt, dass transient transfizierte DNA zwar mit Histonen assoziiert in Nukleosomen-ähnlichen Strukturen vorliegt, jedoch wird sie nicht in gleichmäßig angeordnete Nukleosomen oder in Chromatin verpackt und ist so für Transkriptionsfaktoren zugänglicher (ARCHER *et al.*, 1992; FRYER und ARCHER, 1998; CERVONI und SZYF, 2001; CHOW *et al.*, 2002). Um den Effekt von hNAP-1 bei der E2-vermittelten Aktivierung zu untersuchen, wenn die Promotor/Enhancer-Region in Chromatin organisiert vorliegt, wurde eine stabile Zelllinie hergestellt, welche das Reporterkonstrukt BPV1 LCR-Luc im zellulären Genom integriert trägt. Um sicherzustellen, dass BPV1 LCR-Luc in den Zellen vorlag, wurde nach Transfektion von RTS3b-Zellen und anschließender Selektion aus jeweils zwei verschiedenen Einzelklonen und einem gepoolten Mischklon (bestehend aus etwa 20 Kolonien) die gesamte DNA der Zellen aus je einer 15 cm Schale extrahiert und mit 1/30 des EtOH-gefällten Extraktes eine spezifische Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Abb. 12). Hierfür wurden zwei Oligonukleotidpaare verwendet: eines ließ eine Amplifikation der DNA im Luciferase-Gen von Nukleotid 575 bis 1800 (etwa 1.2 kb; Nukleotidpositionen nach DONG) zu und eines diente der Amplifikation der DNA vom Luciferase-Gen des Nukleotids 1800 bis zur E2 BS 1 innerhalb der BPV1 LCR (etwa 3 kb). Als Positivkontrolle wurde das Konstrukt BPV1 LCR-Luc selbst verwendet (Spuren 1 und 2). Sowohl der gepoolte Einzelklon (3 und 4) als auch die beiden Einzelklone (6-9) zeigten das erwartete Bandenmuster der Positivkontrolle. Die ohne DNA oder Extrakt durchgeführte Negativkontrolle (11 und 12) lieferte dagegen keine DNA-Amplifikation.

Nachdem beide Einzelklone und der gepoolte Mischklon einige Wochen kultiviert worden waren, lieferte eine wiederholte DNA-Extraktion und die anschließende Polymerase-Kettenreaktion ebenfalls die hier gezeigte DNA-Amplifikation.

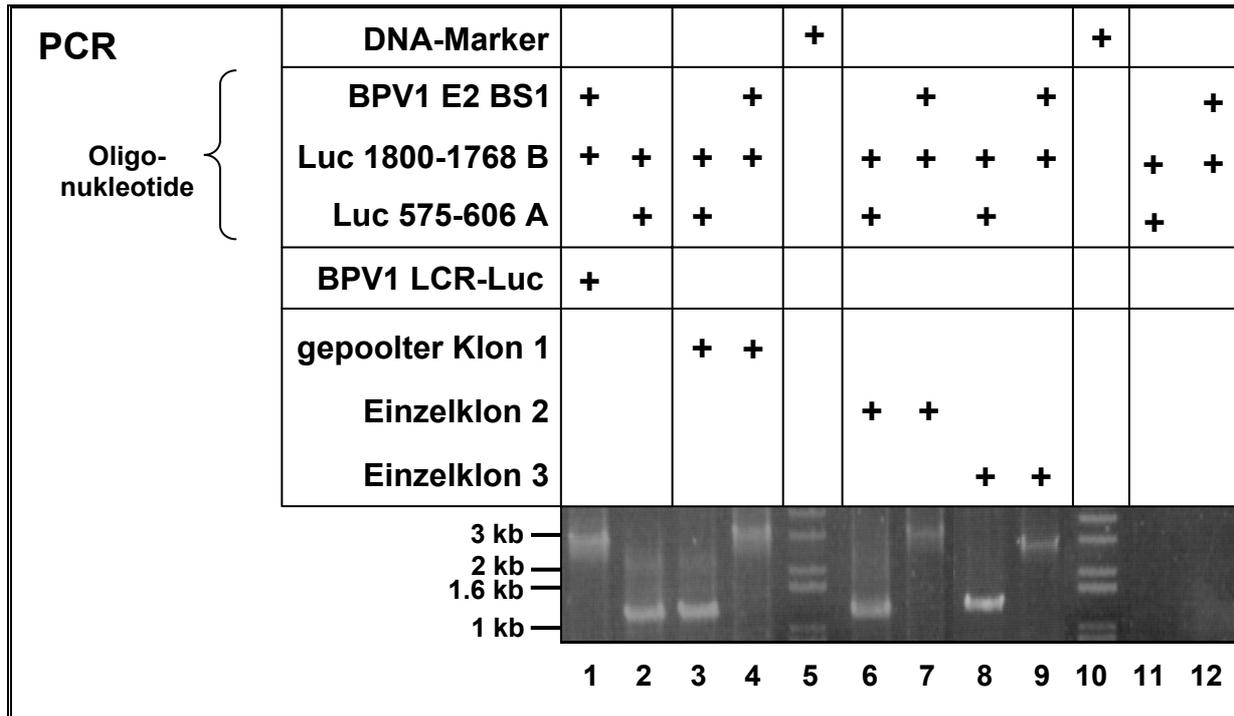


Abb. 12 Nachweis des stabil in das Genom integrierten Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc
 DNA-Agarosegel. RTS3b-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt BPV1 LCR-Luc und dem Resistenz-vermittelnden Selektionsplasmid pTCF-Neo transfiziert und mit G418 selektioniert. Von gepoolten (Spur 3 und 4) und Einzel-Zellklonen (Spuren 6-9) wurde eine DNA-Extraktion durchgeführt, die jeweilige DNA in einer PCR amplifiziert und in einem 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die mit dem Reporterkonstrukt durchgeführten Positivkontrollen sind in Spuren 1 und 2 gezeigt, die Negativkontrollen ohne DNA in Spuren 11 und 12.

Diese drei BPV1 LCR-Luc stabilen RTS3b-Zelllinien wurden daraufhin transient mit Expressionsvektoren für BPV1 E2 und hNAP-1 wie bereits beschrieben transfiziert. Es konnte jedoch keinerlei Aktivierung der Genexpression durch E2 gemessen werden, unabhängig davon, ob hNAP-1 kotransfiziert worden war oder nicht (Daten nicht gezeigt). Eine fehlende Aktivierung der Transkription durch Transkriptionsfaktoren von in Chromatin organisierter DNA wurde bereits häufig beobachtet (z.B. ARCHER *et al.*, 1992; FRYER und ARCHER, 1998; CHOW *et al.*, 2002). Da möglicherweise der inhibitorische Effekt der in Nukleosomen verpackten DNA das E2 Protein daran hinderte, Zugang zu seinen BS zu erhalten, wurden in weiteren Studien die stabilen Zellen 24 h nach transienter Transfektion mit TSA – Trichostatin A – einem Histon-Deacetylasen-Inhibitor behandelt (Abb. 13). Durch diese Behandlung wurden einmal acetylierte Histone nicht mehr deacetyliert. Nun war BPV1 E2 in der Lage, die BPV1 Genexpression zweifach zu aktivieren, was durch die Koexpression von hNAP-1 leicht auf etwa vierfach erhöht wurde. Hier wurden mit allen drei getesteten Klonen ähnliche Aktivierungen beobachtet. Dies deutet

darauf hin, dass hNAP-1 mit geringerer Effizienz ebenfalls in der Lage ist, die E2-vermittelte Aktivierung der Transkription von Promotoren, welche in Chromatin organisiert vorliegen, zu stimulieren.

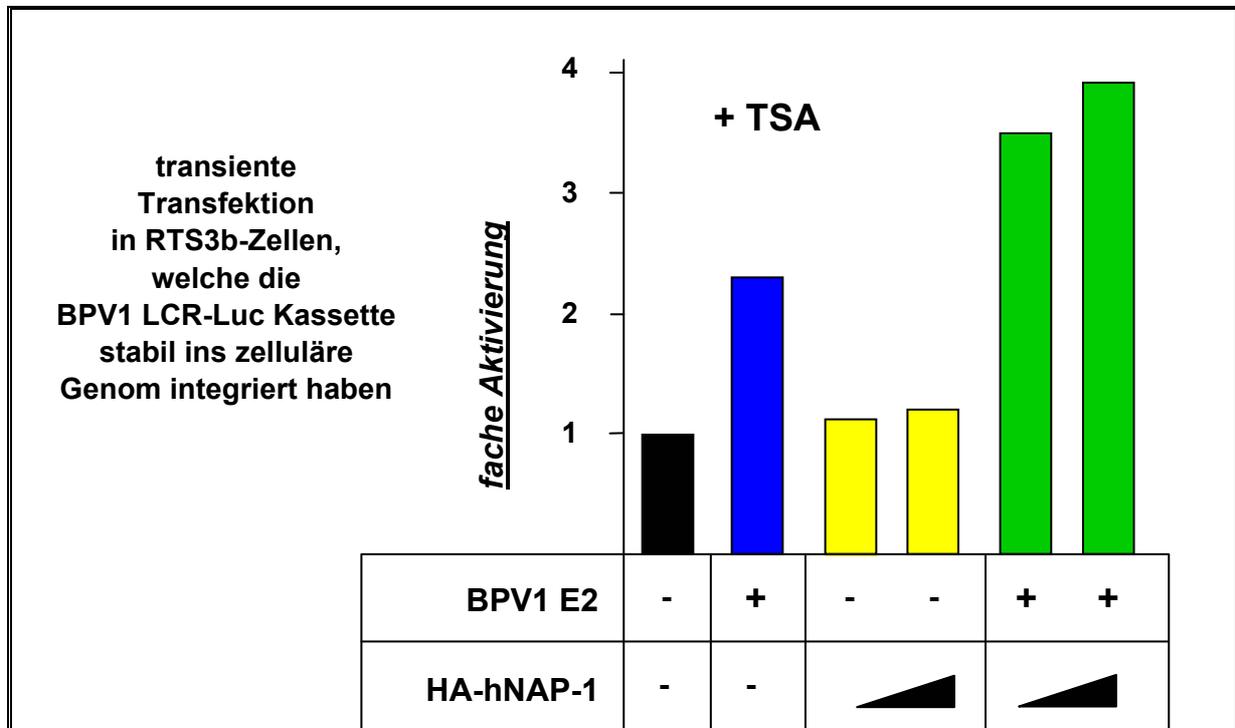


Abb. 13 BPV1 E2 und hNAP-1 kooperieren bei der Aktivierung der BPV1 Genexpression von stabil in das zelluläre Genom integrierter DNA.

Transiente Transfektionsstudie. RTS3b-Zellen mit stabil in das zelluläre Genom integriertem Reporterkonstrukt BPV1 LCR-Luc wurden mit Expressionsvektoren für HA-hNAP-1 (500 ng) und BPV1 E2 (5 ng) kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde dem Medium Trichostatin A (TSA) in einer Konzentration von 400µg/ml zugegeben und die Zellen nach weiteren 24 Stunden geerntet. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment des Einzelklons 2.

4.8 Analyse der Interaktion der E2 Proteine und des Histons H2B mit hNAP-1 Deletionsmutanten

Wie bereits beschrieben bindet das BPV1 E2 Protein hNAP-1 mit seiner AD. Um weitere Einsichten in den Mechanismus der Kooperativität der beiden Proteine zu erhalten, wurde untersucht, welche Region in hNAP-1 für diese Wechselwirkung verantwortlich ist. Hierfür wurden zehn hNAP-1 Deletionsmutanten (Dm) hergestellt. Die N- und/oder C-terminal verkürzten Fragmente decken dabei das gesamte Protein ab (Abb. 14), wobei hNAP-1 Δ 1 dem Teil des Proteins entspricht, welches zu Beginn der Arbeit im Yeast *two-Hybrid* System mit BPV1 E2 gefischt worden war. hNAP-1 Δ 5, Δ 6, Δ 7 und Δ 10 repräsentieren diejenigen Fragmente, die dem gesamten hNAP-1 ohne Überlappung entsprechen. Dabei stellt die Dm hNAP-1 Δ 9 das einzige Protein dar, in welchem durch die Fusion zweier im nativen Protein nicht aneinander grenzender Bereiche eine neue Region entsteht.

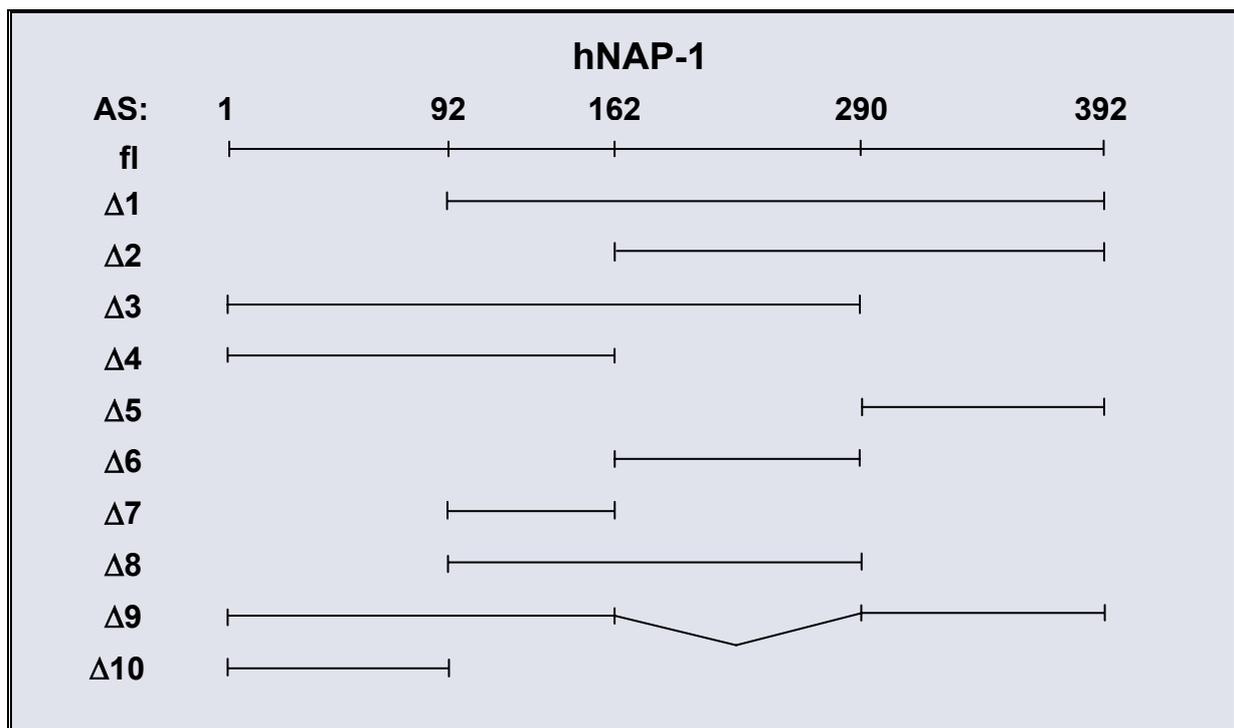


Abb. 14 Schematische Darstellung der hNAP-1 Deletionsmutanten
(fl = full length, AS = Aminosäure)

Nach der Klonierung der entsprechenden mit GST fusionierten ORFs wurden die Dm in Bakterien exprimiert, über Glutathion-Sepharose gereinigt, in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und mit *Coomassie brilliant blue* gefärbt (Abb. 15A, Spuren 3-13). Spur zwei zeigt das gereinigte GST allein. Dabei zeigte sich im Fall

des GST-hNAP-1 Δ 10 hauptsächlich ein starkes Degradationsprodukt, das dem GST allein entsprechen könnte.

Um die Bindung an BPV1 E2 zu überprüfen, wurden in einem GST *pull-down* Experiment jeweils 1.5 μ g GST, GST-hNAP-1 oder 1.5 μ g der GST-hNAP-1-Dm mit 10 μ l *in vitro* translatiertem, 35 S-markiertem BPV1 E2 inkubiert (Abb. 15B). In Spur 1 sind 10% des Einsatzes des radioaktiv markierten Proteins zu sehen. Während BPV1 E2 nicht oder kaum an GST allein (Spur 2), hNAP-1 Δ 4 (7), Δ 7 (10) und Δ 10 (13) band, konnte eine effiziente Interaktion mit dem internen Fragment Δ 6 (9) und mit dem C-terminalen Fragment Δ 5 (8) beobachtet werden. Wie erwartet wurde das E2 Protein auch durch die Dm hNAP-1 Δ 9, welcher die interne Region mit den AS 162-290 fehlt, präzipitiert (12). Dies deutet darauf hin, dass BPV1 E2 an zwei trennbare Bereiche innerhalb von hNAP-1 binden kann: an eine interne Region von AS 162-290 und an eine C-terminale Region von AS 291-392. Ein äquivalentes Experiment wurde mit HPV8 E2 durchgeführt (Abb. 15C). Auch HPV8 E2 band nicht GST allein (2), hNAP-1 Δ 4 (7), Δ 7 (10) und Δ 10 (13), während hier das interne Fragment Δ 6 (9) und das dieses enthaltende Fragment Δ 8 (11) stärker gebunden wurden. Im Vergleich zu BPV1 E2 war die Interaktion mit hNAP-1 Δ 5 und Δ 9, welche beide die C-terminalen 102 AS enthalten, schwächer. Somit wurden mit unterschiedlicher Stärke von HPV8 E2 die gleichen beiden Regionen innerhalb von hNAP-1 gebunden wie von BPV1 E2. Der Lauf der E2 Proteine wurde in diesen Interaktionsstudien dabei durch die Anwesenheit einiger GST-Proteine, welche eine ähnliche Größe wie das jeweilige E2 Protein aufweisen, beeinflusst.

Wie bereits beschrieben, ist bekannt, dass hNAP-1 als Histon Chaperon die Core-Histone – mit einer Präferenz für das Histon-Dimer H2A / H2B – bindet (s. Einleitung 1.9). Diese Ergebnisse konnten hier mit *in vitro* translatiertem, 35 S-markiertem hNAP-1 und mit an GST fusionierten Histonen H2A, H2B, H3 und H4 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Bisher wurde nicht untersucht, an welche Region von hNAP-1 Histone binden. Dafür wurde exemplarisch das Histon H2B mit einem Histidin-Epitop fusioniert in Bakterien exprimiert, gereinigt (Abb. 15D, Spur a) und jeweils 0.1 μ g in einem GST *pull-down* Experiment mit den GST-hNAP-1-Dm inkubiert. Gebundenes H2B wurde in einem WB mit einem gegen das humane H2B gerichteten Antikörper detektiert. In Spur 1 sind 10% des eingesetzten His₆-H2B zu

sehen. Hier präzipitierten GST, GST-hNAP-1 Δ 4 (7), Δ 5 (8) Δ 7 (10) und Δ 10 (13) das His-H2B nicht. Alle übrigen Fragmente von hNAP-1 banden annähernd 100% des eingesetzten H2B Proteins. Diese Analyse verdeutlicht, dass H2B nur diejenigen Fragmente bindet, die die AS 162-290 enthalten. Allerdings präzipitierte hNAP-1 Δ 9, welchem genau diese Region fehlt, mit der gleichen Effizienz, so dass hier letztlich keine sichere Aussage möglich ist. Hier könnte die neu entstandene Region in hNAP-1 Δ 9 zu einer unspezifischen Wechselwirkung geführt haben.

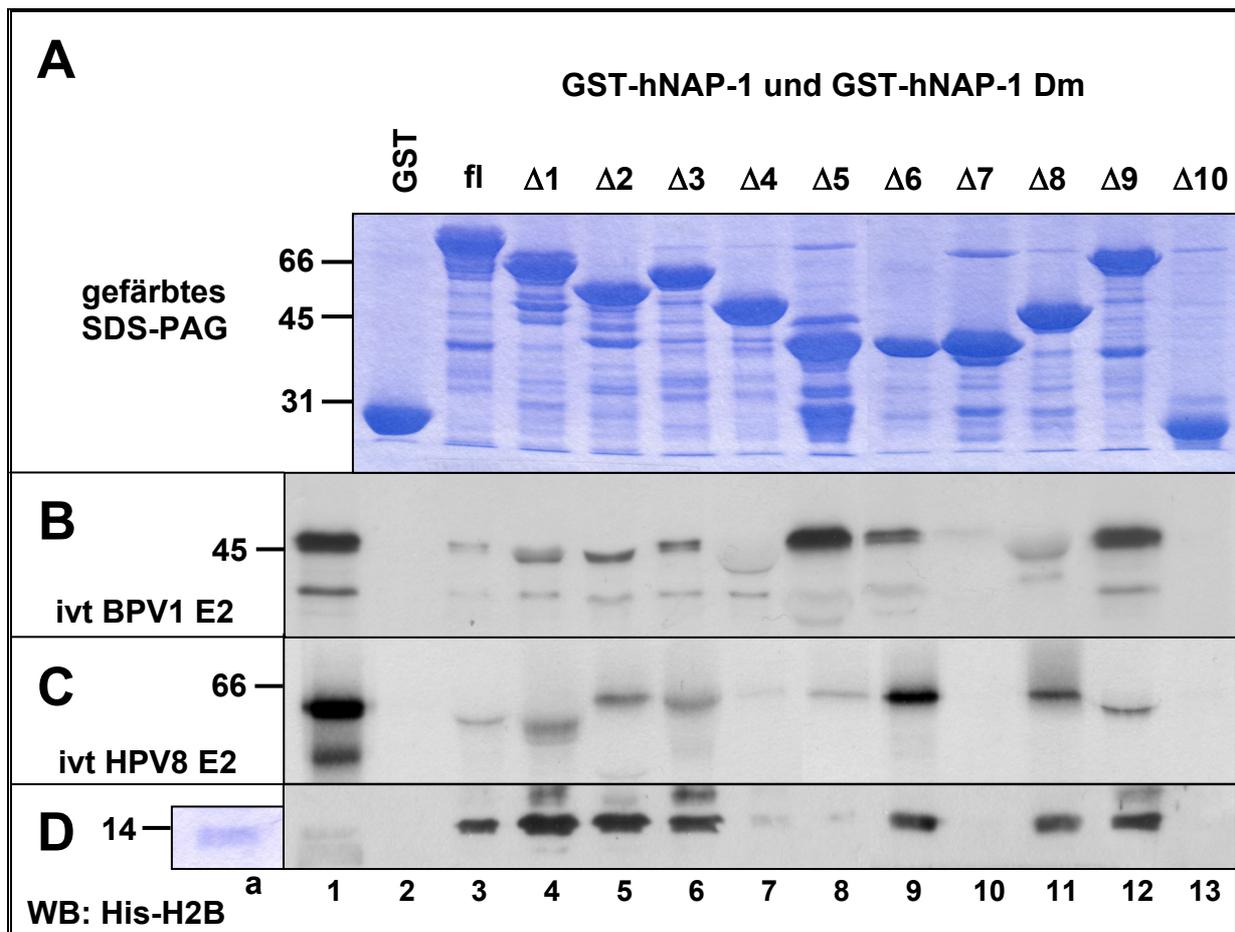


Abb. 15 Interaktionsstudien mit hNAP-1 Deletionsmutanten

(A) Coomassie gefärbtes SDS-PAG mit den über eine Sepharose-Matrix gereinigten, für die Interaktionen eingesetzten GST-Proteinen (Spuren 2-13). (B und C) 1.5 μ g bakteriell exprimiertes GST (2), GST-hNAP-1 oder 1.5 μ g der GST-hNAP-1-Deletionsmutanten (3-13) wurden über Glutathion-Sepharose gereinigt und mit 10 μ l des *in vitro* Translationsansatzes von BPV1 E2 (B) oder HPV8 E2 (C) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.25 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. (D) Direkte Interaktion der GST-Proteine mit 0.1 μ g bakteriell exprimiertem, gereinigtem Histon H2B mit His-Epitop. Nach der Inkubation der Proteine und viermaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer wurden die gebundenen Proteine in einem 15%igen SDS-PAG aufgetrennt und in einem anschließenden Western Blot mit einem gegen das humane H2B gerichteten Antikörper detektiert. Die für die Analyse eingesetzte Menge des gereinigten His-H2B Proteins ist in einem Coomassie gefärbten SDS-PAG dargestellt. Die Spur 1 zeigt 10% des Einsatzes des jeweiligen *in vitro* Translationsproduktes bzw. des gereinigten His-H2B Proteins, Spur a zeigt 0.1 μ g des gereinigten His-H2B im gefärbten SDS-PAG. (ivt = *in vitro* translatiertes, WB = Western Blot, Dm = Deletionsmutanten)

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich E2 Proteine in ihrer Wechselwirkung mit hNAP-1 unterscheiden. HPV8 E2 und BPV1 E2 erkennen effizient sowohl die AS 162-290 als auch die AS 291-392 von hNAP-1, jedoch mit unterschiedlicher Stärke. Die Bindung von H2B an die hNAP-1-Fragmente gleicht der Bindung von HPV8 E2.

4.9 Für die synergistische Aktivierung der Transkription mit E2 wird das gesamte hNAP-1 Protein benötigt

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Bindung von E2 an hNAP-1 für die Kooperativität beider Proteine notwendig ist. Dafür wurden die ORFs aller Dm mit einem N-terminal fusionierten HA-Epitop in den Vektor pXJ41 kloniert und zunächst die Expression überprüft. Extrakte von 293T-Zellen, welche mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert worden waren, wurden in einem Western Blot mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper analysiert, um die Expression der Dm nachzuweisen. Wie die Intensität der spezifischen Signale des WB in Abbildung 16 vermuten lässt, scheinen alle Mutanten in vergleichbaren Mengen exprimiert zu werden (Abb. 16, Spuren 2-7 und 9-12). Lediglich das Fragment $\Delta 8$ (8) scheint schwächer produziert zu werden. Eine äquivalente Expressionsstärke zeigte sich auch bei Verwendung der RTS3b-Zellen (Daten nicht gezeigt).

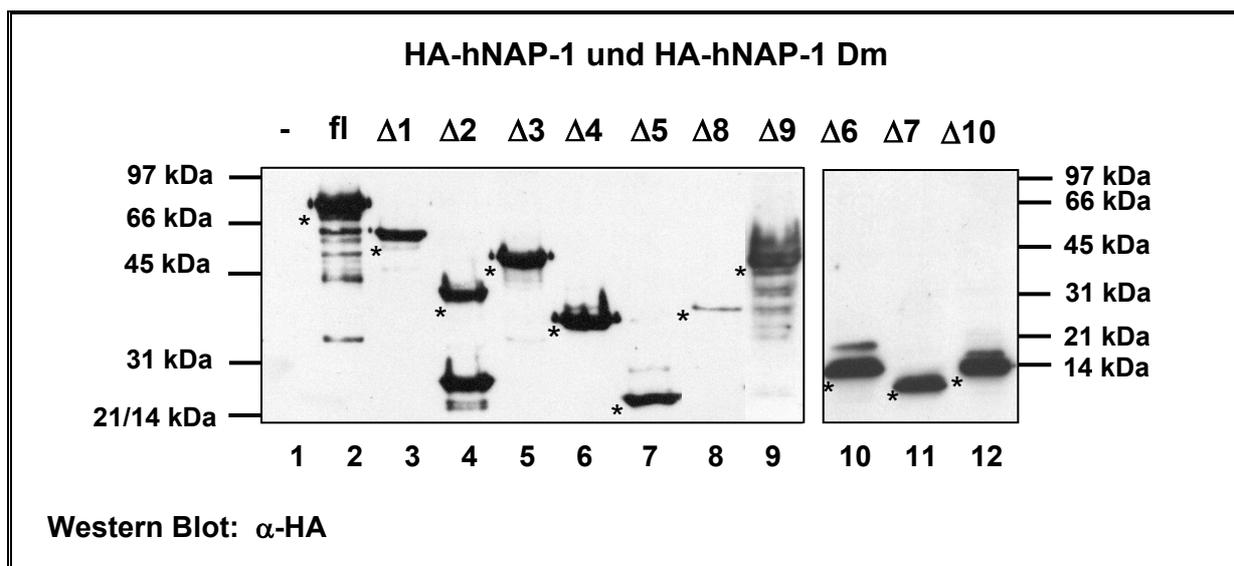


Abb. 16 Nachweis der Expression der HA-hNAP-1 Deletionsmutanten

293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für HA-hNAP-1 oder den Deletionsmutanten wie in Abb. 14 dargestellt, transfiziert. 10 μ g des 45 h später hergestellten Zellextraktes wurden in einem 10%igen (Spuren 1-9) oder 15%igen (10-12) SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden Western Blot wurden die Proteine mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper detektiert. Die volle-Länge Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. (fl = full length, Dm = Deletionsmutanten)

Um die Rolle der einzelnen Regionen von hNAP-1 bei der Kooperation mit E2 zu untersuchen, wurden RTS3b-Zellen wie bereits beschrieben mit BPV1 LCR-Luc und Expressionsvektoren für BPV1 E2 und für die hNAP-1 Derivate transfiziert (Abb. 17). In Abb. 17A ist der Effekt durch die einzelnen hNAP-1 Dm allein dargestellt. Das gesamte hNAP-1 aktivierte die basale Promotoraktivität, welche hier als 1 definiert wurde, 1.6-fach. Die Mutanten hNAP-1 Δ 3 und Δ 6 zeigten keinen signifikanten Einfluss, jedoch führte die Expression der anderen Mutanten zur Repression der Promotoraktivität von etwa 30-60% (Δ 2, Δ 4, Δ 5 und Δ 8- Δ 10) bis zu etwa 80% (Δ 1 und Δ 7). In Abb. 17B ist die fache Stimulierung der E2-vermittelten Aktivierung in Gegenwart von hNAP-1 bzw. der jeweiligen hNAP-1 Dm dargestellt, wobei hier die Aktivierung durch BPV1 E2 als 1 definiert wurde. Es stellte sich heraus, dass hNAP-1 Mutanten, denen beide E2-Bindestellen (Δ 4, Δ 7 und Δ 10) oder die ersten 91 AS fehlen (Δ 1, Δ 2, Δ 5, Δ 6 und Δ 8), nicht mehr mit BPV1 E2 bei der Aktivierung der Genexpression kooperieren konnten und diese teilweise sogar stark reprimierten (Δ 2, Δ 5 und Δ 7). Diese Repression resultierte dabei nicht aus einem möglichen *Squelching* aufgrund unphysiologisch hoher Proteinmengen in den Zellen im Vergleich zum gesamten hNAP-1 Protein, da alle Dm – mit Ausnahme von Fragment Δ 8 – in ähnlichen Mengen exprimiert wurden (s. Abb. 16). Des Weiteren zeigte eine Titration dieser Proteine eine konstante Dosis-abhängige Repression (Daten nicht gezeigt). Lediglich die beiden Dm, welche sowohl die ersten 91 AS als auch eine der beiden E2-Bindestellen enthielten (Δ 3 und Δ 9), vermochten den Promotor noch gemeinsam mit E2 synergistisch zu aktivieren. Dies geschah jedoch im Vergleich zur zehnfachen Stimulierung durch das gesamte hNAP-1 in reduziertem Maß. Dass hNAP-1 Δ 3 die E2-vermittelte Aktivierung noch etwa vierfach und hNAP-1 Δ 9 noch etwa dreifach stimulierte, weist auf die Notwendigkeit sowohl mindestens einer der beiden E2-Bindestellen innerhalb von hNAP-1 als auch der ersten 91 AS für die Stimulierung der E2-vermittelten Aktivierung der Genexpression hin. Für die volle Kooperativität zwischen BPV1 E2 und hNAP-1 ist jedoch das gesamte hNAP-1 Protein notwendig.

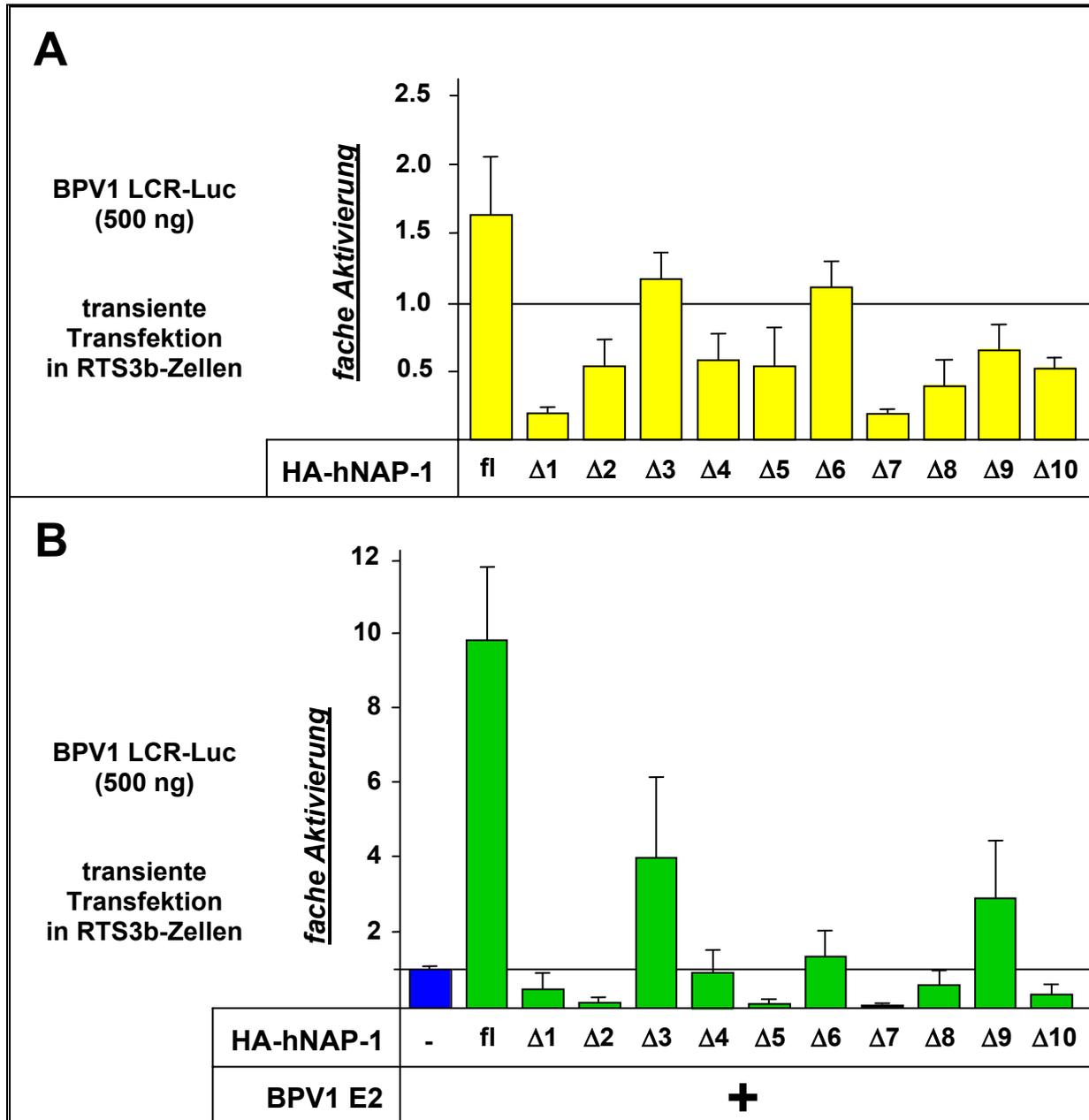


Abb. 17 Für die Kooperativität zwischen BPV1 E2 und hNAP-1 bei der Aktivierung der BPV1 Genexpression ist das gesamte hNAP-1 notwendig.

(A) Transiente Transfektionsanalyse. In RTS3b-Zellen wurden 500ng des Reporterkonstruktes BPV1 LCR-Luc und jeweils 500 ng pXJ41-HA-hNAP-1 bzw. hNAP-1 Deletionsmutanten kotransfiziert. Dargestellt ist die fache Aktivierung. Die basale Aktivität in Gegenwart des Reporterkonstruktes wurde als 1 definiert. (B) Transiente Transfektionsanalyse wie in (A). RTS3b Zellen wurden zusätzlich mit 5 ng BPV1 E2 (pc59) kotransfiziert und die fache Stimulierung der E2-Aktivierung durch hNAP-1 dargestellt. Hier wurde die Aktivierung der Luciferase-Expression durch E2 als 1 definiert.

Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben. (fl = full length)

Um wiederum zu untersuchen, ob auch die Bindung von HPV8 E2 an hNAP-1 mit der kooperativen Aktivierung der Transkription durch beide Faktoren korreliert, wurden weitere transiente Transfektionsstudien mit dem Reporterkonstrukt NCR8-Luc, welches die gesamte NCR von HPV8 – mit seinen fünf E2 BS von P0-P4 (blaue

Boxen) und beiden Promotoren (Abb. 18A) – vor dem Luciferase-Gen trägt, durchgeführt (Abb. 18). In Abb. 18B ist der Effekt von hNAP-1 und der Dm auf die HPV8 Promotoraktivität ohne E2 dargestellt. hNAP-1 allein aktivierte hier vierfach, hNAP-1 Δ 3 aktivierte noch zweifach. Die Expression aller anderen Mutanten führte zu keiner deutlichen Aktivierung, dabei wurden jedoch keine Repressionen wie bei der Verwendung des BPV1 LCR-Luc Reporterkonstruktes beobachtet. In Abb.18C wurde die Aktivierung durch HPV8 E2 als 1 definiert und die fache Stimulierung der E2-vermittelten Aktivierung der Genexpression durch hNAP-1 bzw. durch die Dm dargestellt. Im Gegensatz zu den transienten Transfektionsstudien mit BPV1 E2 zeigte sich hier eine Korrelation zwischen den Effekten der Mutanten mit oder ohne koexprimiertes E2. Lediglich hNAP-1 Δ 5 und Δ 7 reprimierten die E2-vermittelte Aktivierung leicht, während hNAP-1 diese vierfach und das Fragment Δ 3 sie 2.3-fach stimulierte. Alle anderen Mutanten waren nicht in der Lage, die Genexpression mit HPV8 E2 synergistisch zu verstärken. Auch das Fragment Δ 9, welches mit BPV1 E2 noch bei der Aktivierung der Genexpression kooperierte, konnte die HPV8 E2-vermittelte Aktivierung der Transkription nicht signifikant stimulieren. Jedoch stellte sich hier ebenfalls heraus, dass das gesamte hNAP-1 für die volle Kooperativität mit HPV8 E2 benötigt wird.

Diese Resultate weisen auf eine Korrelation der Transkriptionsaktivierung durch E2 mit der Bindung an hNAP-1 hin. BPV1 E2 wurde stark von den hNAP-1 Mutanten Δ 5 (AS 291-392) und Δ 6 (AS 162-290) gebunden. Die beiden Mutanten, die je eine dieser E2-Bindedomänen und die essentiellen N-terminalen AS enthalten (Δ 3 und Δ 9), aktivierten noch synergistisch die E2-vermittelte Aktivierung der BPV1 Genexpression. Dagegen zeigte sich eine starke Bindung von HPV8 E2 an Δ 6 und eine schwächere an Δ 5. Hier konnte dementsprechend nur mit der Mutante, welche die AS 162-290 und die essentiellen N-terminalen AS besitzt (Δ 3), eine Kooperation beobachtet werden. Die Dm hNAP-1 Δ 3 wurde somit als das Fragment von hNAP-1 identifiziert, das mindestens für den Synergismus zwischen E2 und hNAP-1 notwendig ist. Dies impliziert, dass innerhalb von hNAP-1 die interne E2-Bindestelle von AS 162-290 für die Kooperation wichtiger ist als die C-terminale von AS 291-392. Jedoch wird für die effiziente Aktivierung der Transkription in beiden Fällen das gesamte hNAP-1 benötigt.

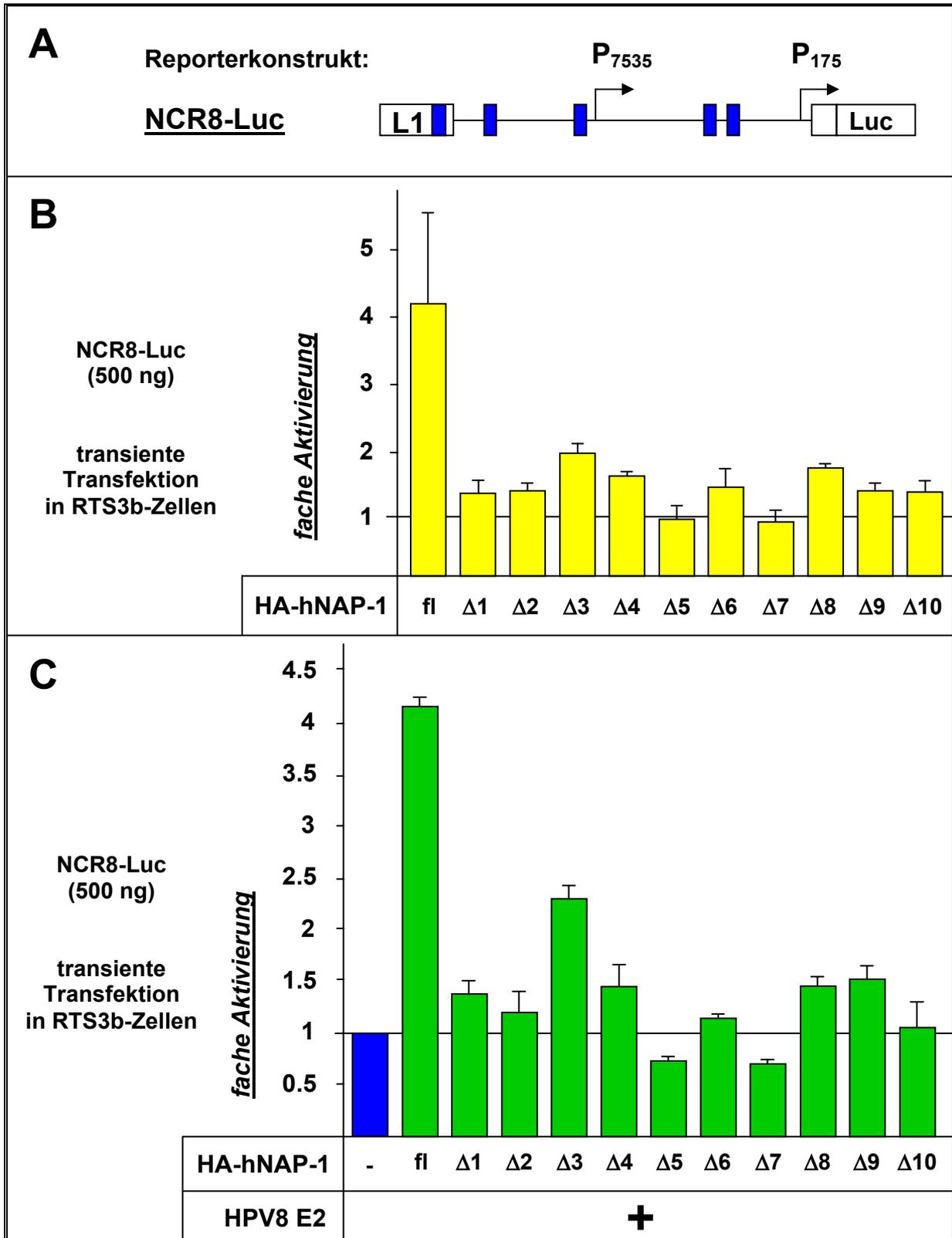


Abb. 18 Für die Kooperativität zwischen HPV8 E2 und hNAP-1 bei der Aktivierung der HPV8 Gen-expression ist ebenfalls das gesamte hNAP-1 notwendig.

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstruktes NCR8-Luc. Angegeben sind die unter den *Ev*-assoziierten HPV konservierten E2-Bindestellen (P0-P4, blaue Boxen) sowie der späte (P_{7535}) und frühe Promotor (P_{175}). (B und C) Transiente Transfektionsanalysen entsprechend der Abb. 17 (A und B) mit dem Reporterkonstrukt pNCR8-Luc und HPV8 E2 (pCB6-8E2). Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben. (fl = full length)

4.10 HPV8 E2, hNAP-1 und p300 aktivieren synergistisch das synthetische Reporterkonstrukt NCR8-Luc

Es wurde bereits publiziert, dass NAP-1 und NAP-2 mit p300 interagieren, wobei p300 – ähnlich wie E2 – an zwei Regionen innerhalb von hNAP bindet: an eine von AS 123-230 und eine zweite C-terminal ab AS 290 (SHIKAMA *et al.*, 2000; ASAHARA *et al.*, 2002). Somit schließen die Regionen in hNAP-1, welche für die Stimulierung der E2-vermittelten Aktivierung der Transkription notwendig sind, die Interaktionsdomäne für p300 ein. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch p300 bei dieser Stimulierung eine Rolle spielt. Da unsere Arbeitsgruppe und andere gezeigt haben, dass die E2 Proteine von BPV1, HPV8 und HPV18 ebenfalls direkt und funktionell mit p300 interagieren (LEE *et al.*, 2000; PENG *et al.*, 2000; MÜLLER *et al.*, 2002), sollte der Effekt von hNAP-1 und p300 gemeinsam auf die E2-vermittelte Aktivierung untersucht werden. Die Koexpression von p300 mit dem Reporterkonstrukt BPV1 LCR-Luc führte dabei jedoch zur Repression der Promotoraktivität (Daten nicht gezeigt), so dass diese transienten Transfektionsanalysen nur im HPV8 System mit dem Reporterkonstrukt NCR8-Luc und HPV8 E2 getestet werden konnten. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde dabei bereits beobachtet, dass HPV8 E2 und p300 bei der Aktivierung der HPV8 Genexpression kooperieren, wobei auch die Überexpression von p300 die Expression des E2 Proteins nicht veränderte (MÜLLER *et al.*, 2002).

Wie erwähnt, wurden bei den in dieser Arbeit präsentierten transienten Transfektionen die Ansätze mit variablen Mengen gleicher Expressionsvektoren stets mit entsprechenden Leervektoren ergänzt, um immer die gleiche Menge an Gesamt-DNA zu transfizieren. Im Fall des pCMV β -p300HA-Expressionsvektors, welcher für die folgenden transienten Transfektionen verwendet wurde, wurde dabei nur zu 1/3 mit dem Leervektor pCMV1 ergänzt, da dieser mit 4.8 kb nur etwa 1/3 der Größe des p300-Expressionsvektors aufweist. Hier wurden zusätzlich 2/3 der Menge mit pUC18 Leervektor aufgefüllt, um die Gesamt-DNA Menge dennoch konstant zu halten.

Abb. 19A zeigt das Ergebnis der transienten Transfektionen in RTS3b-Zellen. HPV8 E2 bzw. p300 stimulierten die HPV8 Genexpression jeweils vierfach und hNAP-1 dreifach. In Übereinstimmung mit den bisherigen Daten führte die Koexpression von p300 und HPV8 E2 zu einer 15.5-fachen, die von hNAP-1 und

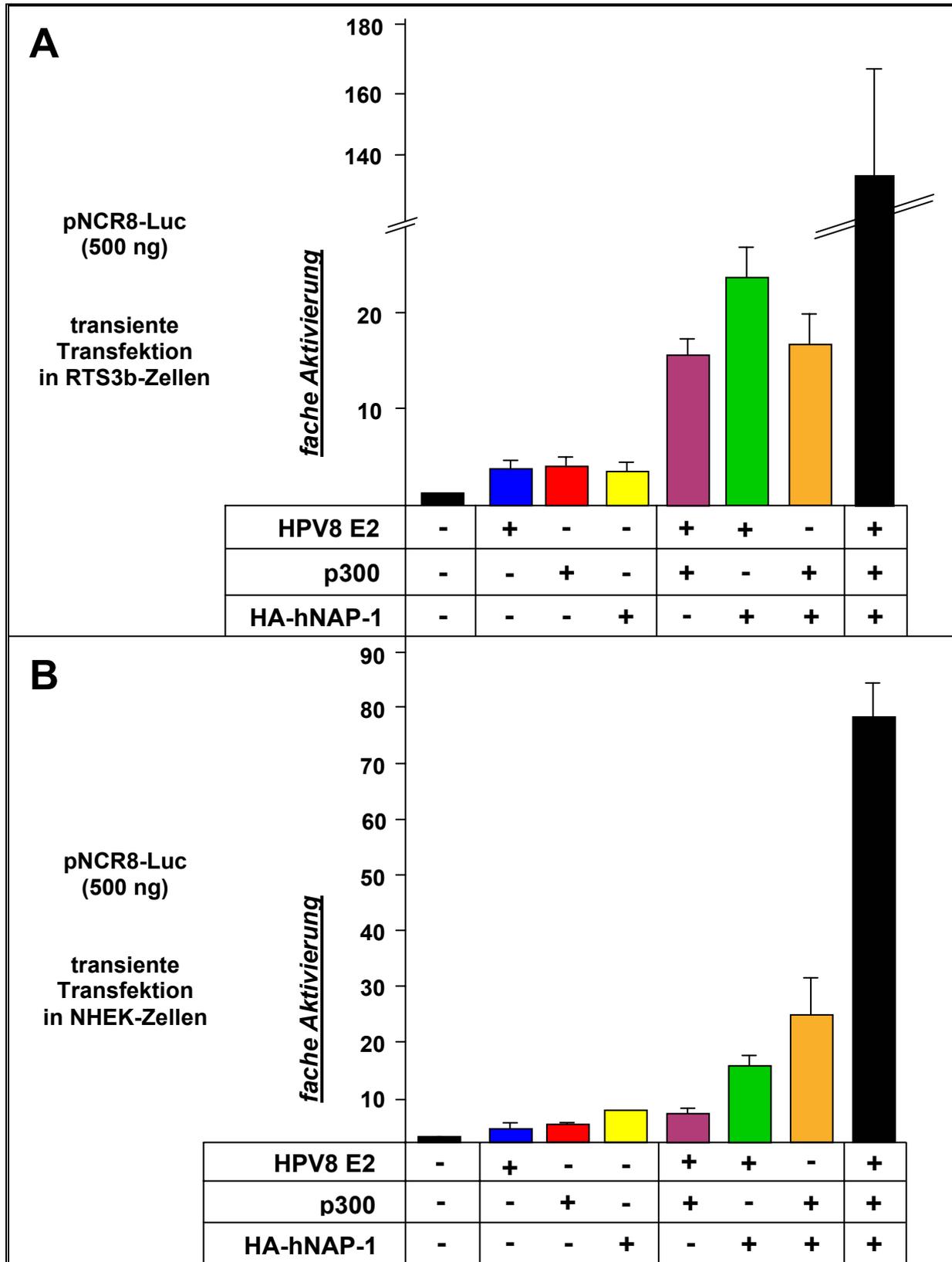


Abb. 19 HPV8 E2, hNAP-1 und p300 aktivieren synergistisch die HPV8 Genexpression.

Transiente Transfektionsstudien. (A) In RTS3b-Zellen und (B) in NHEK wurden 500ng des Reporterkonstruktes pNCR8-Luc, 10 ng HPV8 E2 (pcB6-HPV8 E2) und jeweils 500 ng pcDNA3.1-HA-hNAP-1 und pCMV-p300-HA kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität in Gegenwart des Reporterkonstruktes wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

p300 zu einer 17-fachen und die von hNAP-1 und E2 zu einer 23-fachen Aktivierung. Nach Überexpression aller drei Proteine zusammen wurde die HPV8 Genexpression 134-fach stimuliert. Somit kooperieren alle drei Faktoren bei der Aktivierung der Genexpression von HPV8.

RTS3b-Zellen kommen den Zielzellen von HPV zwar sehr nahe, weisen jedoch als immortalisierte Zelllinie ein anderes zelluläres Milieu auf als primäre Keratinozyten. So sind RTS3b-Zellen z.B. p53-negativ. Möglicherweise spielt das Protein jedoch für die Regulation der HPV8 Genexpression eine Rolle, denn die NCR von HPV8 enthält p53-Bindestellen (AKGÜL, 2002). Daher wurden die transienten Transfektionen in primären humanen Keratinozyten (NHEK), die den natürlichen Zielzellen von HPV entsprechen (FRATTINI *et al.*, 1996), wiederholt (Abb. 19B). Die dreifache Aktivierung der HPV8 Genexpression durch HPV8 E2 wurde in Gegenwart von hNAP-1 auf 16-fach erhöht. hNAP-1 kooperierte ebenfalls mit p300, dessen Aktivierung von vierfach bei Koexpression von hNAP-1 auf 24-fach anstieg. HPV8 E2 und p300 gemeinsam stimulierten die Transkription siebenfach. Die Überexpression aller drei Proteine zusammen resultierte in einer 80-fachen Stimulierung der HPV8 Genexpression. Obwohl in diesen Experimenten keine synergistische Aktivierung zwischen HPV8 E2 und p300 beobachtet werden konnte, kooperierten auch in den primären Keratinozyten alle drei Proteine bei der Aktivierung der HPV8 Genexpression.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hNAP-1 funktional mit E2 und mit p300 interagieren kann. Diese synergistische Aktivierung wurde dabei durch das jeweilige dritte Protein noch stark erhöht. Somit könnte die Kooperation bei der HPV8 Genexpression durch alle drei Proteine das Resultat eines ternären Komplexes aus diesen sein, welcher zur Stimulierung der Transkription sehr effizient beitragen kann.

Ein ternärer Komplex aus E2, hNAP-1 und p300 wäre nur möglich, wenn E2 und p300 verschiedene Motive von hNAP-1 binden. Um dies zu untersuchen wurden transiente Transfektionen und Interaktionsanalysen mit den hNAP-1 Dm und p300 durchgeführt.

4.11 Auch für die synergistische Aktivierung der Transkription mit p300 wird das gesamte hNAP-1 Protein benötigt

In transienten Transfektionsstudien sollte untersucht werden, welche Region von hNAP-1 für die Kooperation mit p300 bei der HPV8 Genexpression notwendig ist. Hierfür wurden RTS3b-Zellen mit dem Reporterkonstrukt pNCR8-Luc und den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert (Abb. 20). Der Effekt von hNAP-1 bzw. der einzelnen hNAP-1 Dm auf die Luciferase-Aktivität ist bereits in Abb. 18B dargestellt und änderte sich hier durch das Vorhandensein der p300-Leervektoren nicht. Die dreifache Aktivierung der HPV8 Genexpression durch p300 konnte durch hNAP-1 auf das 12-fache erhöht werden. Nach Expression von p300 und hNAP-1 Δ 3, Δ 4 bzw. Δ 8, welche jeweils allein 1.5- bis zweifach aktivierten (s. Abb. 18B), kam es zu einer fünf- bis sechsfachen Stimulierung, was nur noch einer additiven Wirkung entsprach. Alle anderen Dm hatten keinen signifikanten Einfluss auf die p300-vermittelte Aktivierung.

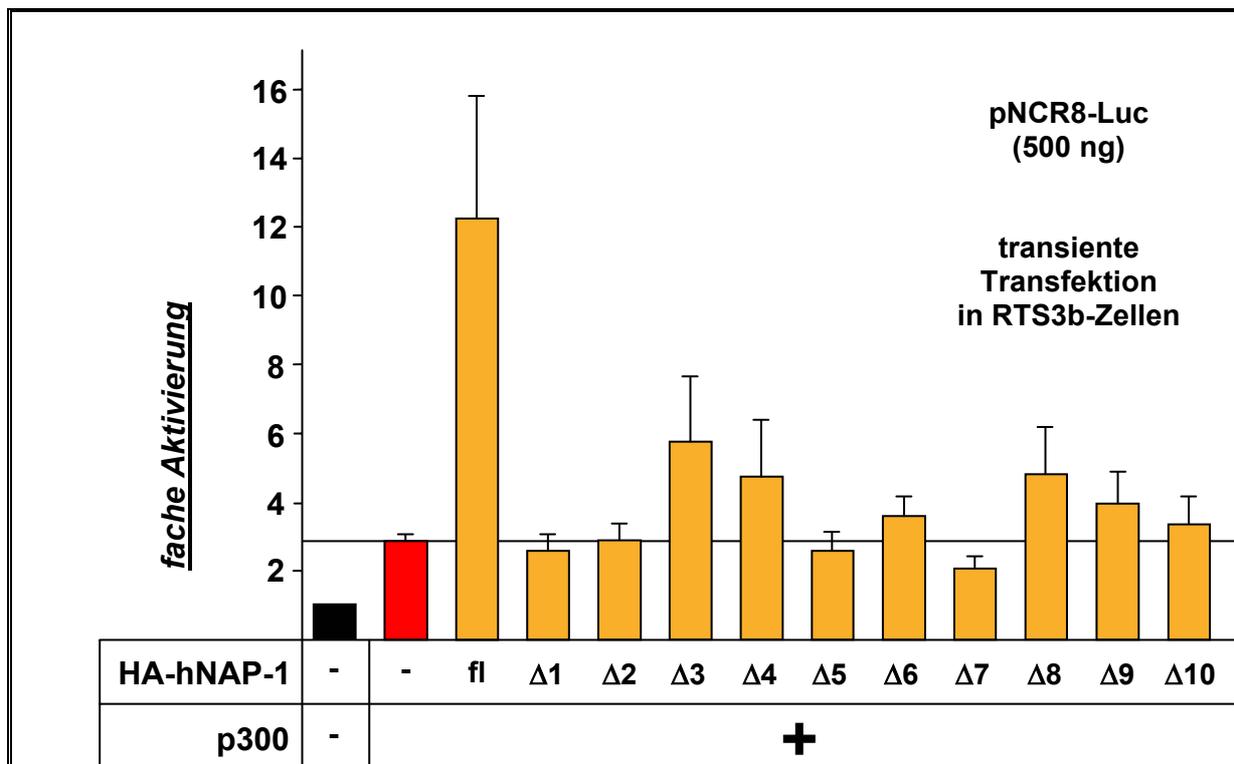


Abb. 20 Für die Kooperativität zwischen hNAP-1 und p300 wird das gesamte hNAP-1 Protein benötigt.

Transiente Transfektionsanalyse. In RTS3b-Zellen wurden 500ng des Reporterkonstruktes pNCR8-Luc, jeweils 500 ng pcDNA3.1-HA-hNAP-1 bzw. der hNAP-1 Deletionsmutanten und 500 ng pCMV-p300-HA kotransfiziert. Dargestellt ist die fache Aktivierung. Die basale Aktivität in Gegenwart des Reporterkonstruktes wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Dies zeigt, dass das gesamte hNAP-1 Protein für die Kooperation mit p300 bei der Aktivierung der HPV8 Genexpression notwendig ist.

4.12 Analyse der Interaktion des p300 mit den hNAP-1 Deletionsmutanten

Da die hNAP-1 Dm sich hier von den früher verwendeten (SHIKAMA *et al.*, 2000; ASAHARA *et al.*, 2002) unterschieden, sollte die Region, an welche p300 bindet, noch genauer bestimmt werden. Die Domäne innerhalb von p300, welche NAP-2 bindet, liegt innerhalb der AS 1572 und 1906 (SHIKAMA *et al.*, 2000) und ist ebenfalls Teil der HAT-Aktivität (s. Einleitung). Für die Bindungsstudie mit den GST-hNAP-1 Mutanten wurde ein Fragment von p300 von AS 1195-1761 (p300-HAT) in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiert, mit GST, GST-hNAP-1 bzw. den Dm inkubiert und die Bindungen analysiert (Abb. 21). Eine starke Bindung konnte mit Fragmenten Δ5 (Spur 8), Δ6 (9), Δ8 (11), Δ9 (12) und dem volle-Länge hNAP-1 (3) festgestellt werden (vgl. schematische Darstellung der Mutanten, Abb. 14). Hingegen banden Fragmente Δ4 (7), Δ7 (10) und Δ10 (13) p300 nur schwach. Somit interagiert p300 – wie das E2 Protein – mit zwei Regionen von hNAP-1: mit den internen AS 162-290 und dem C-terminalen Bereich von AS 291-392. Allerdings konnte mit der Mutante Δ1 nur eine sehr schwache Interaktion beobachtet werden, obwohl es beide Regionen enthält. Die für die Wechselwirkung verantwortlich gefundenen Bereiche

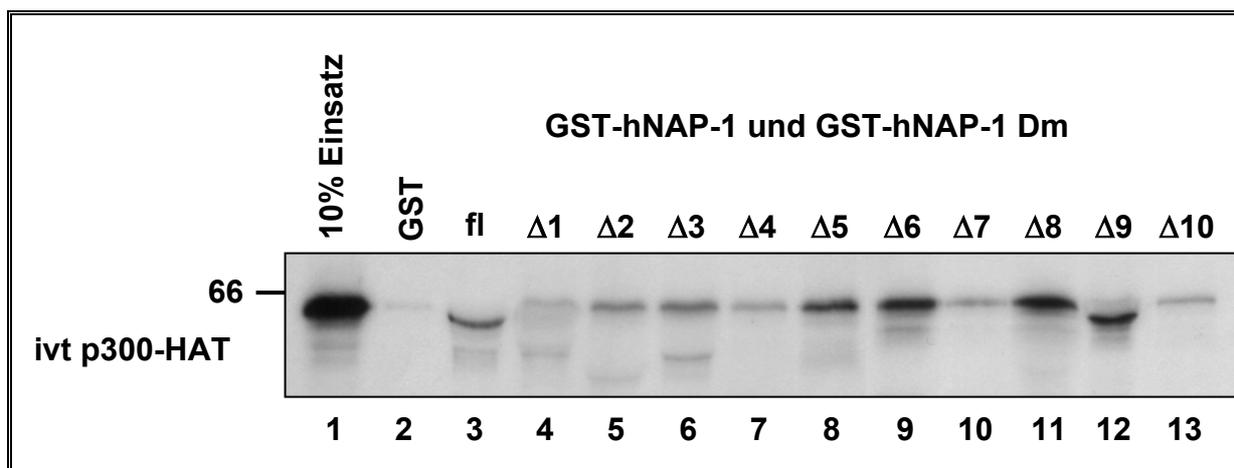


Abb. 21 p300 bindet an ähnliche Regionen in hNAP-1 wie die E2 Proteine.

Interaktionsstudie (wie in Abb.15). 1.5 µg bakteriell exprimiertes GST (2), GST-hNAP-1 oder GST-hNAP-1-Deletionsmutanten (3-13) wurden über Glutathion-Sepharose gereinigt und mit 10µl des *in vitro* Translationsansatzes von p300-HAT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.3 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. (ivt = *in vitro* translatiertes, fl = full length, Dm = Deletionsmutanten)

korrelieren gut mit den veröffentlichten Daten (SHIKAMA *et al.*, 2000; ASAHARA *et al.*, 2002). Die schwächere Bindung von p300 an den N-terminalen Bereich von hNAP-1 wurde ebenfalls vorher für NAP-2 gefunden und als unspezifisch eingestuft (SHIKAMA *et al.*, 2000).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass E2 und p300 ähnliche Regionen von hNAP-1 binden. Da die beiden Fragmente jedoch relativ groß sind, ist es nicht ausgeschlossen, dass E2 und p300 dennoch gemeinsam an hNAP-1 binden können.

4.13 hNAP-1, HPV8 E2 und p300 interagieren *in vivo* miteinander

Um zu testen, ob E2, hNAP-1 und p300 *in vivo* miteinander interagieren, wurden – ähnlich wie bereits für die E2 Proteine und hNAP-1 allein gezeigt – Koimmunpräzitationen durchgeführt. Hierfür wurden 293T-Zellen transient mit Expressionsvektoren für HA-p300, FLAG-HPV8 E2 und Myc-hNAP-1 transfiziert und deren Extrakte mit an Sepharose gekoppelten p300-Antikörpern inkubiert. An p300 gebundene Proteine wurden in WB Analysen mit Antikörpern gegen das Myc- bzw. FLAG-Epitop nachgewiesen (Abb. 22). In den oberen drei WB (von oben: α -HA, α -FLAG, α -Myc) ist jeweils 1/133 des Einsatzes der Extrakte für die IP zu sehen, wobei Spur 1 die Negativkontrolle repräsentiert, in welcher keines der drei Proteine überexprimiert vorlag. Diese WB zeigen, dass p300 (2, 5, 6 und 8), HPV8 E2 (Spuren 3, 5, 7 und 8) und hNAP-1 (4 und 6-8) in den jeweiligen Extrakten vorlagen.

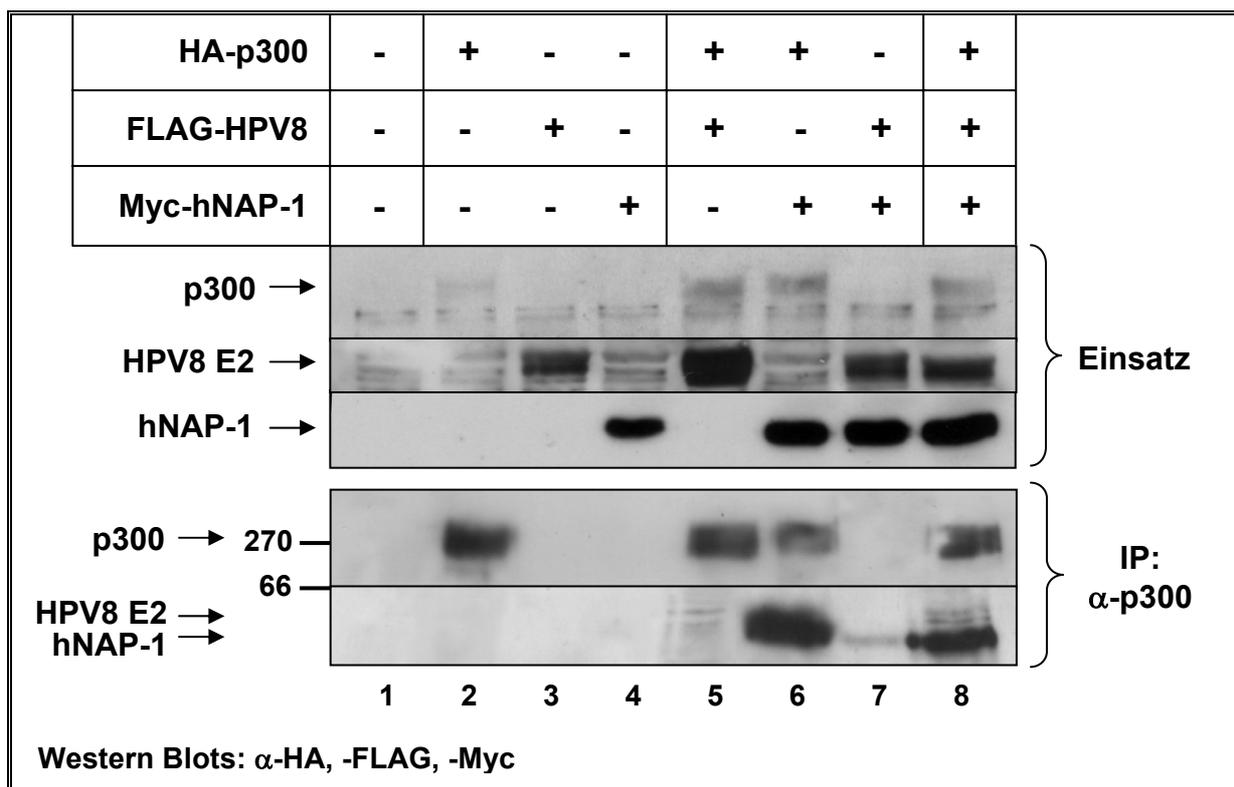


Abb. 22 p300 präzipitiert hNAP-1 und HPV8 E2 *in vivo*.

Koimmunpräzitation. 293T-Zellen wurden mit pCMV-p300-HA (Spuren 2, 5, 6 und 8), pCMV2FLAG-HPV8 E2 (3, 5, 7 und 8), pCMV-Myc-hNAP-1 (4, 6, 7 und 8) und entsprechenden Leervektoren transfiziert. 2 mg der 48h später hergestellten Zellextrakte wurden 4h mit p300-Antikörper-gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert, gebundene Proteine nach viermaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer in einem 8% SDS-PAG aufgetrennt und in anschließenden Western Blots mit Antikörpern gegen das Hämagglutinin (HA), das FLAG-Epitop und das Myc-Epitop detektiert. Die drei oberen Western Blots zeigen einen Teil des Einsatzes (15 μ g der Extrakte), die unteren die Immunpräzitation (IP).

Die beiden unteren WB (von oben: α -HA, α -Myc/ α -FLAG) zeigen die gebundenen Proteine nach der IP. Der HA-Antikörper detektierte das an die α -p300-Sepharosekügelchen gebundene p300 (2, 5, 6 und 8). Das hNAP-1 Protein konnte – dargestellt im unteren WB, der mit einer Mischung bestehend aus α -Myc und α -FLAG Antikörpern entwickelt wurde – nur detektiert werden, wenn ebenfalls p300 in dem Extrakt exprimiert worden war (6 und 8). Extrakte, in denen hNAP-1 allein vorlag (4) lieferten kein Signal. Wurden hNAP-1 und HPV8 E2 gemeinsam exprimiert (7) wurde nur ein Hintergrundsignal beobachtet. Auch das E2 Protein konnte nur dann vom α -FLAG Antikörper nachgewiesen werden, wenn es gemeinsam mit p300 exprimiert worden war (5 und 8). Weder wenn es allein (3) noch wenn es nur mit hNAP-1 vorlag (7), wurde HPV8 E2 durch den p300-Ak präzipitiert. Ein äquivalentes Experiment wurde mit BPV1 E2 durchgeführt. Auch in diesem Fall konnte p300 beide Proteine präzipitieren (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis zeigt, dass sowohl HPV8 E2 als auch hNAP-1 *in vivo* an p300 binden. Jedoch gibt dies keinen Aufschluss darüber, ob eine gleichzeitige Bindung beider Proteine an das gleiche p300-Molekül möglich ist und somit ein ternärer Komplex bestehend aus E2, hNAP-1 und p300 gebildet werden kann.

4.14 hNAP-1, BPV1 E2 und p300 bilden einen ternären Komplex *in vitro*

Um zu testen, ob die drei Proteine in der Lage sind, einen ternären Komplex zu bilden, sollten *in vitro* Experimente die gleichzeitige Bindung von hNAP-1, E2 und p300 aneinander demonstrieren.

4.14.1 BPV1 E2, hNAP-1 und p300 sedimentieren gemeinsam im Glycerolgradienten

Eine Möglichkeit, einen ternären Komplex *in vitro* zu untersuchen, ist die Analyse der Sedimentation eines Proteins allein bzw. in Anwesenheit der anderen Proteine in einem Dichtegradienten, da sich durch eine Interaktion mit einem oder mehreren Proteinen die Sedimentation des zu testenden Faktors ändern kann. Für die Untersuchung, ob die Sedimentation des E2 Proteins in Anwesenheit von hNAP-1 und p300 verändert wird, wurde eine Glycerolgradient-Analyse durchgeführt. Es wurde bisher gezeigt, dass zusätzlich zur KIX-Domäne (ASAHARA *et al.*, 2002) ein Fragment von p300, welches die AS 1572-1818 kodiert, von NAP-1 und NAP-2 gebunden wird (SHIKAMA *et al.*, 2000). Für das hier dargestellte Experiment wurden p300-HAT – welches die AS 1195-1761 kodiert und auch die E2-Bindedomäne einschließt (MÜLLER *et al.*, 2002) – hNAP-1 und BPV1 E2 Δ C (jeweils fusioniert an ein His₆-Epitop) bakteriell exprimiert und gereinigt. Dabei wurde die C-terminal verkürzte Form von BPV1 E2 verwendet, da sie in Bakterien besser exprimiert wird als das volle-Länge Protein (s. Abb. 5). Die gereinigten Proteine wurden in Interaktionsansätzen miteinander inkubiert und jeweils anschließend wie bereits beschrieben (TANESE *et al.*, 1997) auf einen zuvor angelegten 7.5%-30%igen Glycerolgradienten geladen. Nach achtstündiger Zentrifugation wurden von jedem Gradienten 36 Fraktionen oben beginnend entnommen und die Proteine in WB Analysen analysiert. Da alle drei Proteine anhand ihrer charakteristischen Größen leicht im WB zu unterscheiden waren, wurde hierfür der mit Ni²⁺-NTA-konjugierte Antikörper, welcher das Histidin-Epitop erkennt, verwendet. BPV1 E2 Δ C wurde dabei in limitierenden Mengen zugegeben, um sicherzustellen, dass der größte Teil des E2 Proteins durch hNAP-1 und/oder p300 gebunden wurde. Zu Beginn stellte sich heraus, dass alle drei Proteine in den Fraktionen 10 bis 31 sedimentierten, weshalb nur diese hier dargestellt sind (Abb. 23).

Die Abb. 23A zeigt, dass sich der größte Teil des E2 Proteins in Fraktionen 22 bis 24 befand. Nach einer Inkubation mit hNAP-1 sedimentierte E2 weiter oben im Gradienten mit den höchsten Konzentrationen innerhalb der Fraktionen 19 bis 22, was mit einer Bindung von hNAP-1 und BPV1 E2ΔC korreliert. Die Inkubation von

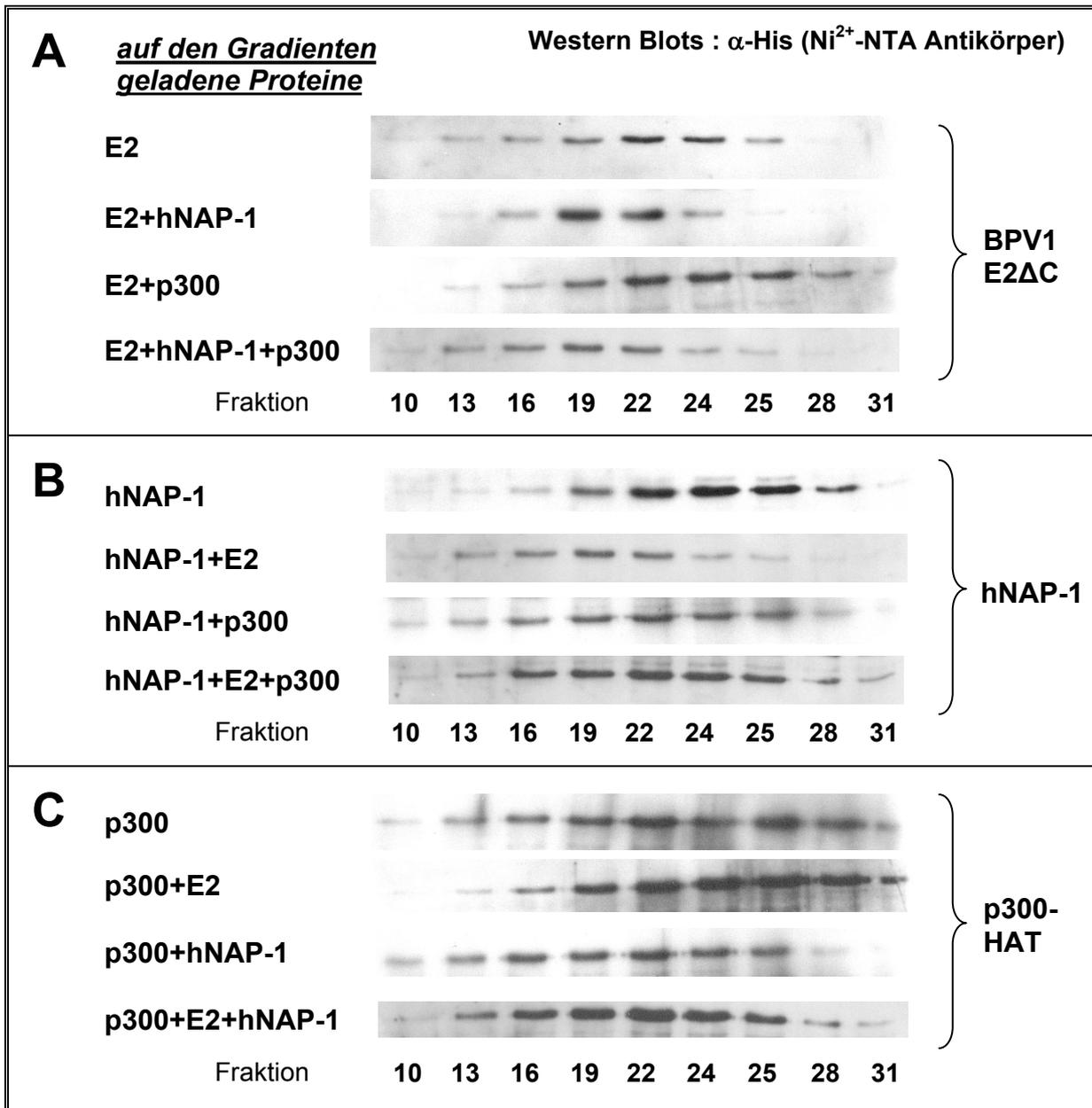


Abb. 23 Glyceroldichtegradient Analyse mit bakteriell exprimierten, gereinigten His-getaggten Proteinen.

200 ng His-BPV1 E2ΔC, 600 ng His-hNAP-1 und 800 ng His-p300-HAT wurden wie links angegeben miteinander inkubiert und auf einen 7.5-30% Glycerolgradienten gegeben. Nach achtstündiger Zentrifugation bei 250,000 g wurden von jedem Gradienten (oben beginnend) 36 Fraktionen entnommen, die Proteine in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit einem gegen das Histidin-Epitop gerichteten Antikörper visualisiert. Abb. **A** zeigt die Sedimentation des E2 Proteins, Abb. **B** die des hNAP-1 und Abb. **C** die des p300 (auch rechts neben den Abb. angegeben). Auf der linken Seite der Abb. sind die Proteine angegeben, die jeweils auf den entsprechenden Gradienten geladen worden waren, auf der rechten Seite ist dasjenige Protein aufgeführt, dessen Sedimentation in der jeweiligen Teilabb. betrachtet wird.

E2 mit p300 hatte im Gegensatz dazu den Effekt, dass E2 verstärkt in Richtung des Bodens sedimentierte und nun auch in den Fraktionen bis 31 detektiert wurde, dafür kaum noch in Fraktion 13. Somit kann durch dieses System eine direkte Bindung von BPV1 E2 Δ C an p300 bestätigt werden. Wurde das E2 Protein mit hNAP-1 und p300 vorinkubiert, befand sich dessen größter Anteil wieder weiter oben im Gradienten. Die hier erhaltene Verteilung des E2 Proteins unterschied sich jedoch von den drei vorherigen, was vermuten lässt, dass zumindest ein Teil des BPV1 E2 Δ C durch beide Proteine komplexiert wurde, da sich z.B. verglichen mit der Sedimentation des E2 Proteins allein nun weniger E2 in Fraktionen 24 und 25 befand, dafür jedoch mehr in Fraktionen 12 bis 16.

Die Abb. 23B zeigt, dass der größte Teil des hNAP-1 in Fraktionen 22 bis 25 sedimentierte, nach Zugabe des BPV1 E2 Δ C jedoch weiter oben im Gradienten vorlag und dann hauptsächlich in Fraktionen 16 bis 22 nachgewiesen wurde. Die Vorinkubation von hNAP-1 mit p300 hatte zur Folge, dass es ebenfalls weiter oben im Gradienten sedimentierte, nun aber in einer größeren Anzahl an Fraktionen ähnlich stark vertreten war (Fraktionen 16 bis 25). Die Inkubation beider Proteine mit hNAP-1 führte dazu, dass dieses nun auch bis in Fraktion 31 detektierbar war, was durch einen ternären Komplex erklärbar ist.

In der letzten Teilabb. 23C ist die Sedimentation von p300 zu sehen. Auch hier findet sich nach Inkubation mit den beiden anderen Proteinen ein verändertes Verteilungsmuster, da hier im Vergleich der größte Anteil an p300 in Fraktionen 19 bis 24 sedimentierte.

Somit wurden alle drei Proteine, nachdem sie miteinander inkubiert worden waren, jeweils in höheren Mengen in Fraktionen 13 bis 22 detektiert. Dies legt den Schluss nahe, dass *in vitro* ein ternärer Komplex bestehend aus BPV1 E2 Δ C, hNAP-1 und p300 gebildet werden kann. Jedoch stellt auch dieses Experiment hierfür noch keinen Beweis dar.

4.14.2 BPV1 E2 und hNAP-1 kompetieren nicht um die Bindung an p300-4

Da die Sedimentation im Glycerolgradienten keinen klaren Beweis für die mögliche gleichzeitige Bindung von hNAP-1, E2 und p300 aneinander *in vitro* erbracht hatte, wurde dies nun in einem Kompetitionsexperiment untersucht. Innerhalb unserer Gruppe konnte bereits gezeigt werden, dass das an GST fusionierte Fragment vier von p300, welches die AS 1453-1882 kodiert (p300-4), von BPV1 E2, HPV8 E2 und HPV18 E2 gebunden wird (MÜLLER *et al.*, 2002). Für das Kompetitionsexperiment wurde GST-p300-4 (Abb. 24A, Spuren 2-5 und 7-10) oder GST (Abb. 24B, Spuren 12-15 und 17-20) mit steigenden Mengen an bakteriell exprimiertem, gereinigtem His-hNAP-1 für 2h vorinkubiert (3-5, 8-10, 13-15 und 18-20). Um ungebundenes His-hNAP-1 zu entfernen, wurde zweimal mit 0.1 M LSDB Puffer gewaschen. Anschließend folgte eine weitere zweistündige Inkubation mit *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem BPV1 E2 (2-5 und 12-15) oder hNAP-1 (7-10 und 17-20). Nach vier Waschschrritten wurden die Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Spuren 1 und 6 bzw. 11 und 16 zeigen 10% (BPV1 E2) bzw. 20% (hNAP-1) des Einsatzes der radioaktiv markierten Proteine. Während in Abwesenheit von nicht-radioaktivem hNAP-1 59% des radioaktiven hNAP-1 an GST-p300-4 banden (7), reduzierte die Vorinkubation mit steigenden Mengen an His-hNAP-1 diese Bindung auf 19% (8-10). Dies lässt darauf schließen, dass die meisten Bindestellen innerhalb des p300-4 für hNAP-1 bereits durch das His-hNAP-1 besetzt waren. Dagegen führte die Vorinkubation mit den gleichen steigenden Mengen an His-hNAP-1 nicht zu einer reduzierten Bindung von BPV1 E2 an p300-4 (2-5). In Abwesenheit von gereinigtem hNAP-1 banden 17% radioaktives BPV1 E2, wobei 20% nach der Vorinkubation präzipitiert wurden. Dies zeigt, dass *in vitro* translatiertes BPV1 E2 an den Komplex bestehend aus GST-p300-4 und His-hNAP-1 binden kann.

Dabei ist in der Teilabb. 24B zu sehen, dass die Interaktionen mit GST-p300-4 in beiden Fällen spezifisch für GST-p300-4 sind, da keinerlei Signal durch die Verwendung des GST allein erhalten wurde (12-15 und 17-20).

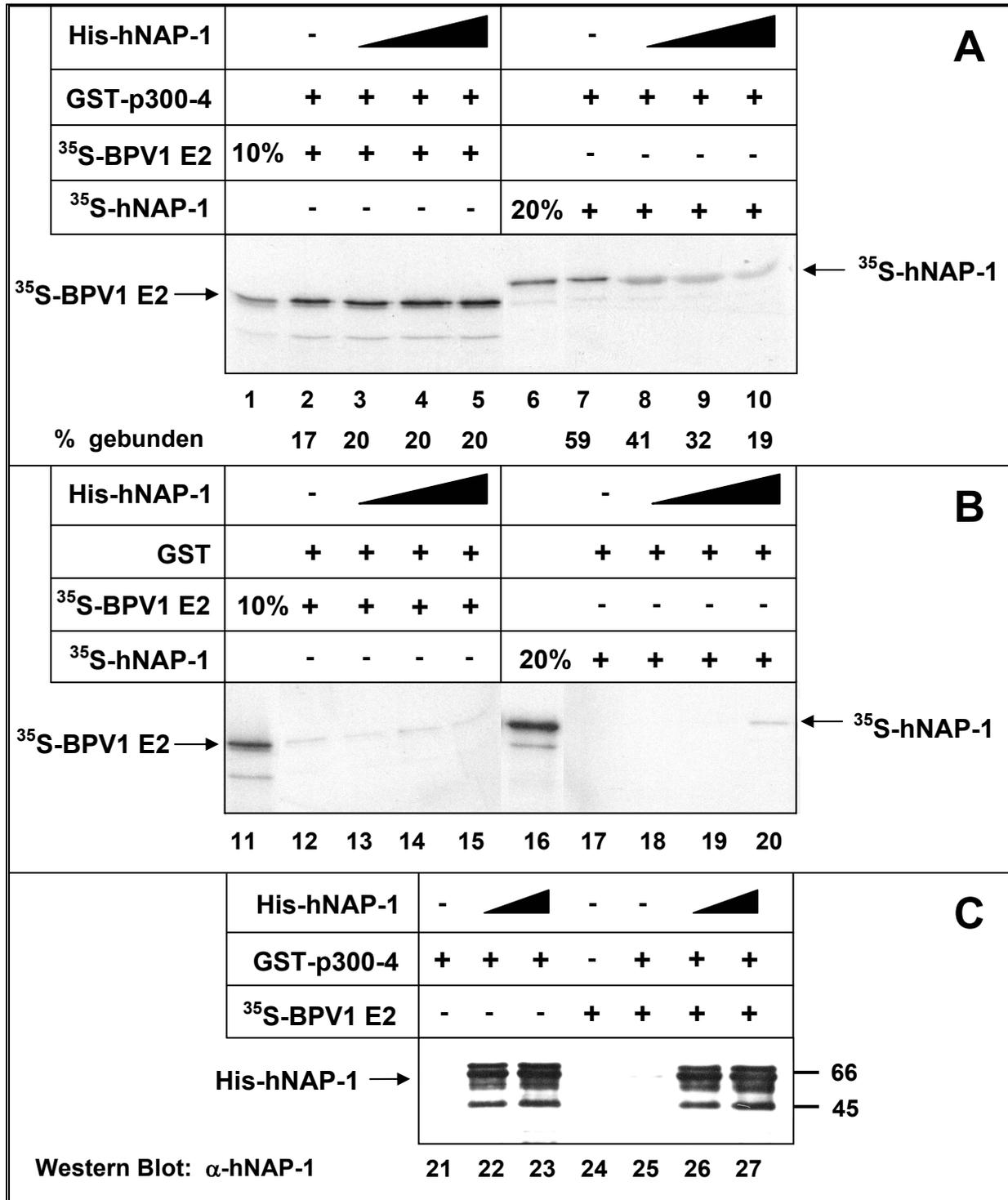


Abb. 24 BPV1 E2 und hNAP-1 kompetieren nicht um die Bindung an p300-4.

Kompetitionsexperiment. (A und B) Zu GST-p300-4 (Spuren 1-10) oder GST (11-20) wurden steigende Mengen gereinigtes, His-getaggetes hNAP-1 gegeben und für 2 h inkubiert (3-5, 8-10, 13-15 und 18-20). Nach zweimaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer folgte eine weitere zweistündige Inkubation mit *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem BPV1 E2 (2-5 und 12-15) oder hNAP-1 (7-10 und 17-20). Spuren 1, 6, 11 und 16 zeigen jeweils 10 bzw. 20% des Einsatzes der radioaktiven Proteine. Nach viermaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Die Signale wurden mittels PhosphorImager quantifiziert und prozentual in der Teilabb. A angegeben (% gebunden). (C) Western Blot eines der Abb. 24A entsprechenden Experimentes. Gebundenes hNAP-1 wurde mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper gegen hNAP-1 detektiert.

Um zu testen, ob BPV1 E2 das nicht-radioaktive hNAP-1, welches nach der Vorinkubation an GST-p300-4 gebunden hatte, verdrängte, wurde eine WB Analyse mit einem Antikörper, der gegen das humane NAP-1 gerichtet ist, durchgeführt (Abb. 24C). Spuren 22 und 23 zeigen das an GST-p300-4 gebundene His-hNAP-1. Die anschließende Inkubation des radioaktiv markierten BPV1 E2 und dessen Bindung an den Komplex verdrängte dabei das His-hNAP-1 nicht (26 und 27). Dies bestätigt, dass *in vitro* translatiertes BPV1 E2, GST-p300-4 und His-hNAP-1 einen ternären Komplex bilden können.

Die Ergebnisse aus den transienten Transfektionen, der Koimmunpräzipitation, der Glycerolgradient-Analyse und dem Kompetitionsexperiment deuten darauf hin, dass die einzelnen Wechselwirkungen zwischen E2 und p300, E2 und hNAP-1 und p300 und hNAP-1 dazu beitragen, dass ein ternärer Komplex entsteht. Damit wurde hier zum ersten Mal demonstriert, dass ein solcher Komplex *in vivo* bestehend aus einem Aktivator (E2), hNAP-1 und p300 effizient zur Transkriptionsaktivierung beitragen könnte.

4.15 hNAP-1 stimuliert die Replikation von HPV8 NCR-CAT

Die sequenzspezifische Bindung von E1 an den Replikationsursprung wird durch die Interaktion mit E2 und dessen Bindung an benachbarte E2-Erkennungssequenzen des PV-Genoms stabilisiert (HOLT *et al.*, 1994; FRATTINI und LAIMINS, 1994; SEDMAN und STENLUND, 1995). Wie in der Einleitung erwähnt, wurde bereits gezeigt, dass NAP Histone aus dem Zytoplasma in den Zellkern zur neu replizierten DNA bringt und so als *Shuttle*-Protein nach der Replikation zur Formation der Nukleosomen beiträgt. Aufgrund dieser bekannten Funktion der NAP Proteine sollte untersucht werden, ob die Interaktion von hNAP-1 mit E2 neben der Aktivierung der Transkription auch bei der PV Replikation eine Rolle spielt. Innerhalb unseres Institutes war bereits die HPV8 Replikation unter Verwendung der Konstrukte pNCR8-CAT, pCB6-8E1 und pCB6-8E2 nachgewiesen worden (Akgül, 1999).

RTS3b-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8-CAT, den Expressionsvektoren für HPV8 E1 und E2 sowie hNAP-1 transfiziert und nach 72 h ein klassisches Replikationsexperiment durchgeführt (Modifikation nach USTAV und STENLUND *et al.*, 1991). Die extrahierte episomale DNA wurde dabei in zwei gleiche Ansätze unterteilt. Die DNA des einen Ansatzes wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI linearisiert, während die des anderen Ansatzes zusätzlich mit DpnI behandelt wurde, welches nur die transfizierte, bakterielle, methylierte, isolierte DNA spaltet. Auf diese Weise lässt sich die neu replizierte DNA von der transfizierten DNA im Southern Blot unterscheiden (Abb. 25). Im Vergleich zu der Behandlung der DNA nur mit BamHI (Spuren 1, 3, 5 und 7) war nach der zusätzlichen Spaltung mit dem Restriktionsenzym DpnI (2, 4, 6 und 8) nicht weniger DNA nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass hier ausschließlich neu replizierte DNA betrachtet wird. In dem in Abbildung 25 dargestellten Experiment resultierte die Kotransfektion von 1 µg hNAP-1 Expressionsvektor in einer leichten Reduktion der Replikation um 34.5% (4). Jedoch führte eine Kotransfektion von 1.5 und 2 µg hNAP-1 Expressionsvektor zu einer Stimulierung der Replikation auf 126% (6) bzw. 168% (8). Diese Aktivierung sank bei einem Einsatz von 2.5 µg Expressionsvektor für hNAP-1 wieder auf 132% und ab 3 µg auf etwa 100% (Daten nicht gezeigt).

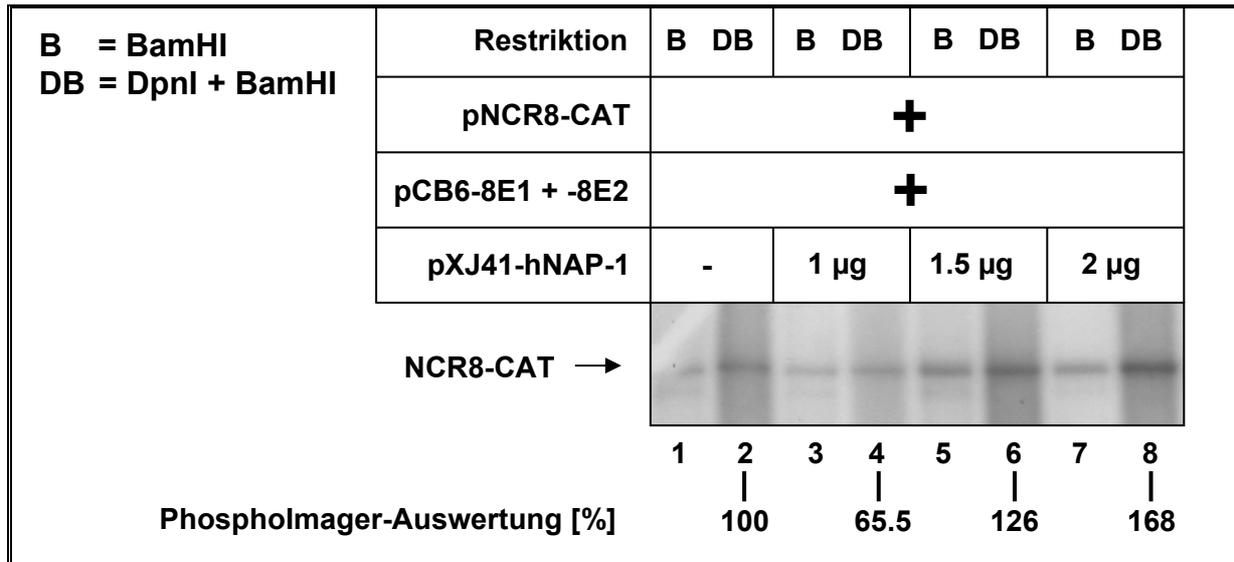


Abb. 25 hNAP-1 stimuliert die Replikation von HPV8.

RTS3b Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8-CAT und Expressionsvektoren für hNAP-1, HPV8 E1 und E2 transfiziert. Die extrahierte, episomale, gespaltene DNA wurde einem Southern Blot unterzogen und nach Hybridisierung mit der NCR8-CAT Sonde mittels Autoradiographie visualisiert. Die DNA-Menge, die ohne Zugabe des Expressionsplasmides für hNAP-1 erhalten wurde, wurde als 100% definiert. Die Signale wurden mit Hilfe des Phosphormagers quantifiziert und prozentual unten in der Abb. angegeben.

Der Replikationsassay wurde mehrmals durchgeführt, wobei die Stimulierung nicht immer reproduzierbar war, was möglicherweise in der geringen Sensitivität der Methode, welche von Southern Blot Analysen abhängig ist, begründet liegt. In einem Experiment kam es jedoch zu einer Stimulierung von 100% auf 590% (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hNAP-1 in der Lage ist, die HPV8 Replikation bis zu sechsfach zu stimulieren.

4.16 p53 bindet hNAP-1 direkt *in vitro*

Nachdem die Rolle der Interaktion zwischen hNAP-1 und E2 bei der Aktivierung der Transkription charakterisiert worden war, sollte untersucht werden, ob auch andere Aktivatoren hNAP-1 als Koaktivator verwenden. Es wurde bereits beschrieben, dass NAP-2 die Transkription durch Aktivatoren wie p53 und E2F, denen p300 als Koaktivator dient, verstärkt. Es wurde angenommen, dass die Interaktion von hNAP-1 mit p300 dafür essentiell ist (SHIKAMA *et al.*, 2000). Hier war jedoch nicht untersucht worden, ob diese Aktivatoren direkt an NAP binden. Um zu testen, ob p53 und hNAP-1 direkt miteinander interagieren, wurde GST oder GST-hNAP-1 mit bakteriell exprimiertem, gereinigtem His-p53 inkubiert (Abb. 26). Im WB, der mit einem Ni²⁺-NTA-konjugierten Antikörper entwickelt wurde, der das Histidin-Epitop erkennt, zeigte sich, dass His-p53 durch GST-hNAP-1 präzipitiert wurde (Spur 3), während das GST allein kein Signal lieferte (2). In einem umgekehrten Experiment unter Verwendung von GST-p53 und gereinigtem His-hNAP-1 konnte ebenfalls eine spezifische direkte Interaktion beobachtet werden (6).

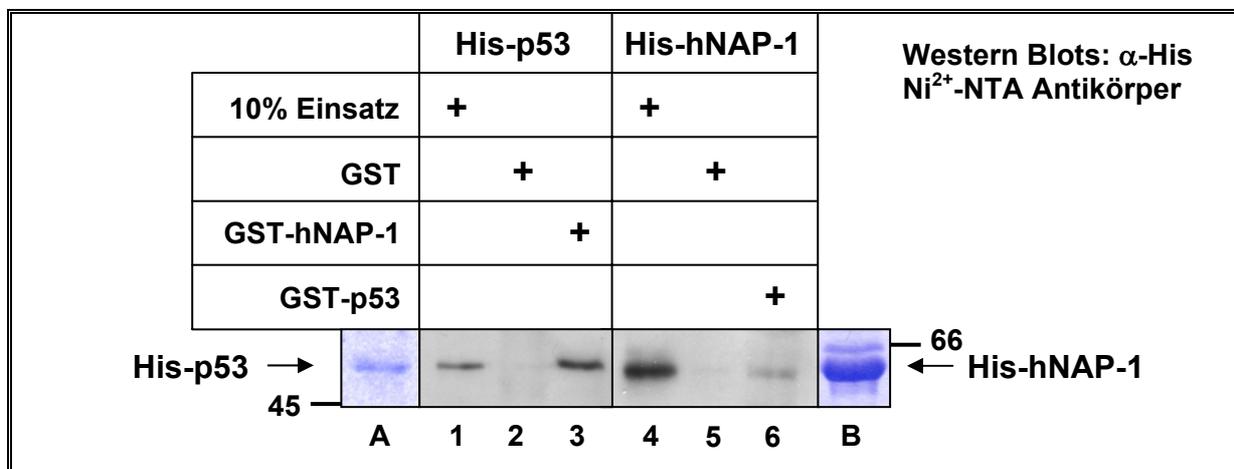


Abb. 26 hNAP-1 bindet p53 direkt *in vitro*.

Direkte Interaktionen. GST (Spur 2) oder GST-hNAP-1 (3) wurde mit 0.1 µg bakteriell exprimiertem, gereinigtem p53 mit His-Epitop (A, SDS-PAG) inkubiert; GST (5) oder GST-p53 (6) wurde mit 0.3 µg bakteriell exprimiertem, gereinigtem His-hNAP-1 (B, SDS-PAG) inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer wurden die gebundenen Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und in einem anschließenden Western Blot mit einem gegen das Histidin-Epitop gerichteten Antikörper detektiert. Die Spuren 1 und 4 zeigen jeweils 10% des Einsatzes des jeweiligen His-Proteins.

4.17 Endogenes p53 präzipitiert endogenes hNAP-1

Um zu untersuchen, ob p53 und hNAP-1 auch in normalen physiologischen Konzentrationen in der Zelle aneinander binden, sollten Koimmunpräzipitationen durchgeführt werden. Hierfür wurden primäre Keratinozyten (NHEK), welche das wt-p53 exprimieren, und p53-negative RTS3b-Zellen verwendet. Von beiden Zelllinien wurden Kernextrakte hergestellt, diese mit einer p53-Antikörpergekoppelten Sepharosematrix inkubiert (Abb. 27, Spur 3 und 4) und gebundene Proteine in einem WB mit einem gegen das humane NAP-1 gerichteten Antikörper detektiert (oberer WB). Nur aus dem NHEK-Kernextrakt wurde hNAP-1 durch den p53-spezifischen Antikörper präzipitiert (3), während kein hNAP-1 aus den p53-negativen RTS3b-Zellen nachgewiesen werden konnte (4). Zur Kontrolle wurde ein Teil des WB anschließend mit einem p53-Antikörper inkubiert, um die Expression des p53 zu überprüfen (unterer WB, Spuren 3 und 4). Wie erwartet, zeigte lediglich der Extrakt aus den NHEK eine p53 Expression.

Diese Daten demonstrieren, dass p53 und hNAP-1 direkt aneinander binden können. Demnach muss die früher publizierte funktionelle Wechselwirkung also nicht notwendigerweise über p300 vermittelt worden sein, wie bisher spekuliert wurde (SHIKAMA *et al.*, 2000).

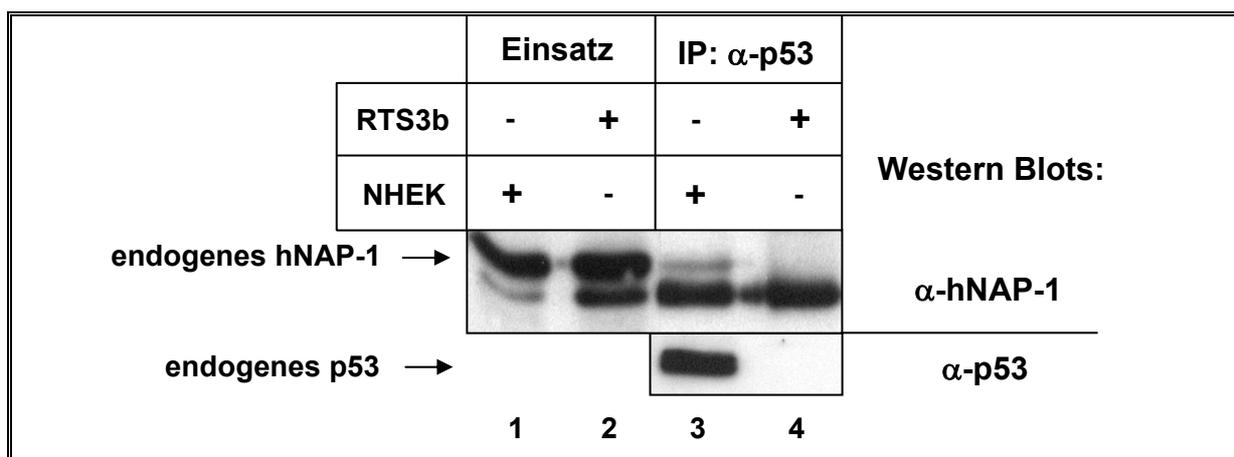


Abb. 27 Endogenes p53 präzipitiert endogenes hNAP-1.

Koimmunpräzipitation. 85 μ g eines Kernextraktes der p53-negativen Zelllinie RTS3b (Spuren 2 und 4) und von primären Keratinozyten NHEK (1 und 3) wurden mit p53-Antikörpergekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert (3 und 4). Anschließend wurde viermal mit 0.2 M LSDB Puffer gewaschen, gebundenes hNAP-1 in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt und im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper detektiert. Spuren 1 und 2 zeigen 1/6 des Einsatzes der Extrakte. Spuren 3 und 4 wurden zusätzlich mit einem Antikörper gegen das humane p53 inkubiert. (IP = Immunpräzipitation)

4.18 hNAP-1 und p53 aktivieren kooperativ den Promotor des synthetischen Reporterkonstruktes p53CON

Um zu überprüfen, ob die Bindung von p53 an hNAP-1 funktional ist und hNAP-1 hier als Koaktivator fungiert, wurden transiente Transfektionsstudien mit dem synthetischen Reporterkonstrukt p53CON (FUNK *et al.*, 1992) durchgeführt (Abb. 28). In der Teilabb. A ist eine schematische Darstellung des Reporterkonstruktes, welches eine p53 BS stromaufwärts des Hsp70 Promotors besitzt, zu sehen. Die p53-negative Zelllinie RTS3b wurde mit dem Reporterkonstrukt und Expressionsvektoren für p53 und hNAP-1 kotransfiziert (Abb. 28B). Es stellte sich heraus, dass hNAP-1 allein keinen signifikanten Einfluss auf den Promotor hatte, während p53 die Transkription der Luciferase zehnfach aktivierte. Diese p53-vermittelte Aktivierung konnte durch die Koexpression des hNAP-1 auf 44-fach stimuliert werden, was zeigt, dass hNAP-1 ohne die gleichzeitige Überexpression von p300 in der Lage ist, die p53-vermittelte Aktivierung der Transkription zu stimulieren.

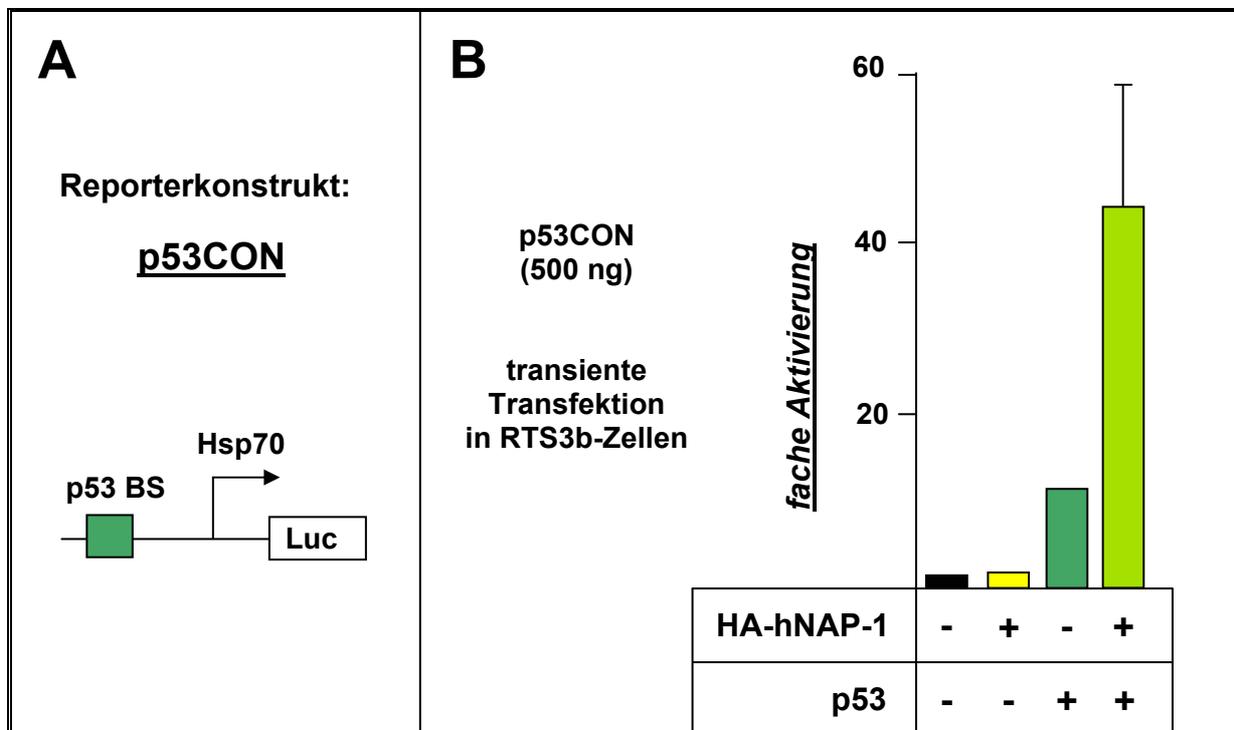


Abb. 28 hNAP-1 und p53 kooperieren bei der Aktivierung der Transkription. (A) Schematische Darstellung des synthetischen Reporterkonstruktes p53CON mit dem Hsp70 Promotor und der p53 Bindestelle. (B) Transiente Transfektionsanalyse. Die p53-negative Zelllinie RTS3b wurde mit dem Reporterkonstrukt p53CON und Expressionsvektoren für p53 und hNAP-1 kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität in Gegenwart des Reporterkonstruktes wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.19 hNAP-1 und p53 stimulieren die Expression von p21

Um zu bestätigen, dass die Interaktion von p53 mit hNAP-1 für die p53-vermittelte Aktivierung von Bedeutung ist, wurde der Effekt der Koexpression von p53 und hNAP-1 auf die p21 Expression, dessen Promotor p53-abhängig ist, analysiert (Abb. 29). Hierfür wurden Expressionsvektoren für p53 und hNAP-1 in der p53-negativen RTS3b-Zelllinie kotransfiziert. Das endogene p21 wurde anschließend in einem WB, der mit einem gegen das humane p21 gerichteten Antikörper entwickelt wurde, visualisiert. Lediglich die Koexpression von p53 und hNAP-1 in der höchsten hier eingesetzten Menge führte zum Nachweis des p21 Proteins (Spur 5). Dagegen konnte weder in Gegenwart der leeren Expressionsvektoren (1) noch durch p53 und/oder hNAP-1 in geringen Mengen die p21 Expression nachweisbar induziert werden (2-4). Zur Kontrolle wurde der WB anschließend zusätzlich mit einem gegen das p53 Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Wie in den Spuren 2, 4 und 5 zu sehen ist, wurde die p53 Expression durch hNAP-1 nicht signifikant stimuliert.

Somit ist hNAP-1 in der Lage, gemeinsam mit p53 die Expression des p21 Proteins zu verstärken und folglich auch die p53-vermittelte Aktivierung eines endogenen Promotors zu stimulieren.

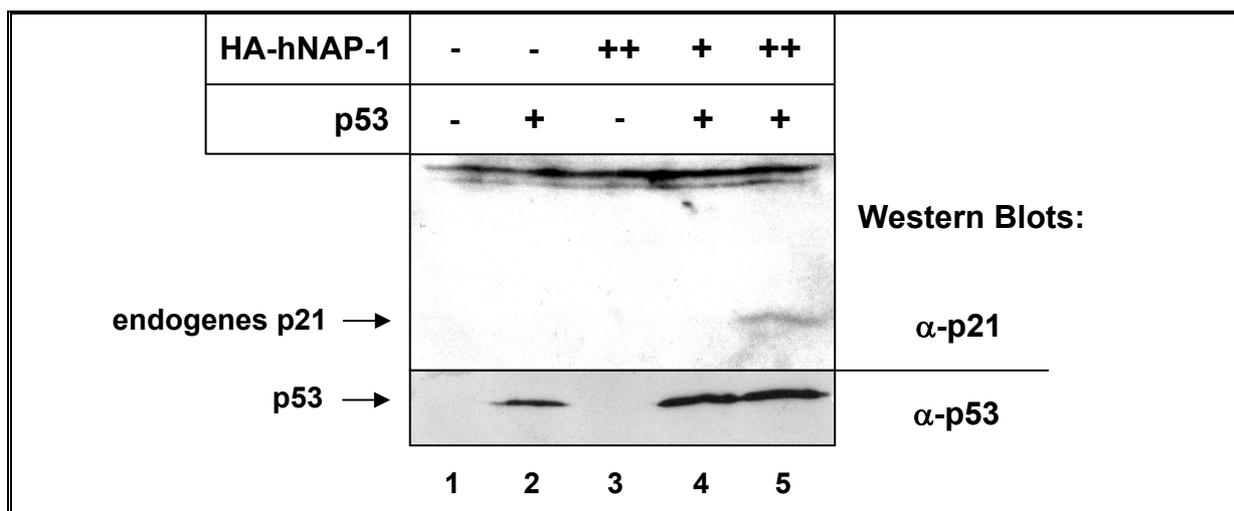


Abb. 29 hNAP-1 und p53 stimulieren die Expression von p21.

Western Blots. Expressionsvektoren für p53 (Spuren 2, 4 und 5) und für HA-hNAP-1 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (3-5) wurden in RTS3b-Zellen kotransfiziert. 90 µg der Kernextrakte wurden für ein SDS-PAG und den anschließenden Western Blot mit einem gegen das humane p21 gerichteten Antikörper verwendet. Der Blot wurde zusätzlich mit einem Antikörper gegen das humane p53 inkubiert.

4.20 hNAP-1 interagiert nicht mit dem Aktivator TEF-1

Um schließlich zu testen, ob eine funktionelle Interaktion mit hNAP-1 eine allgemeine Strategie für Aktivatoren der Transkription darstellt oder ob sie nur auf Faktoren beschränkt sein könnte, welche mit p300 interagieren, wurde der *Transcriptional Enhancer Factor-1* (TEF-1) untersucht (Abb. 30). Dieser Faktor ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsaktivator, der p300 weder *in vitro* bindet noch als Koaktivator verwendet (SLEPAK *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002). Zunächst sollte analysiert werden, ob hNAP-1 an TEF-1 bindet (Abb. 30A). Wie das GST *pull-down* Experiment zeigt, konnte weder mit GST allein noch mit hNAP-1 eine Bindung der

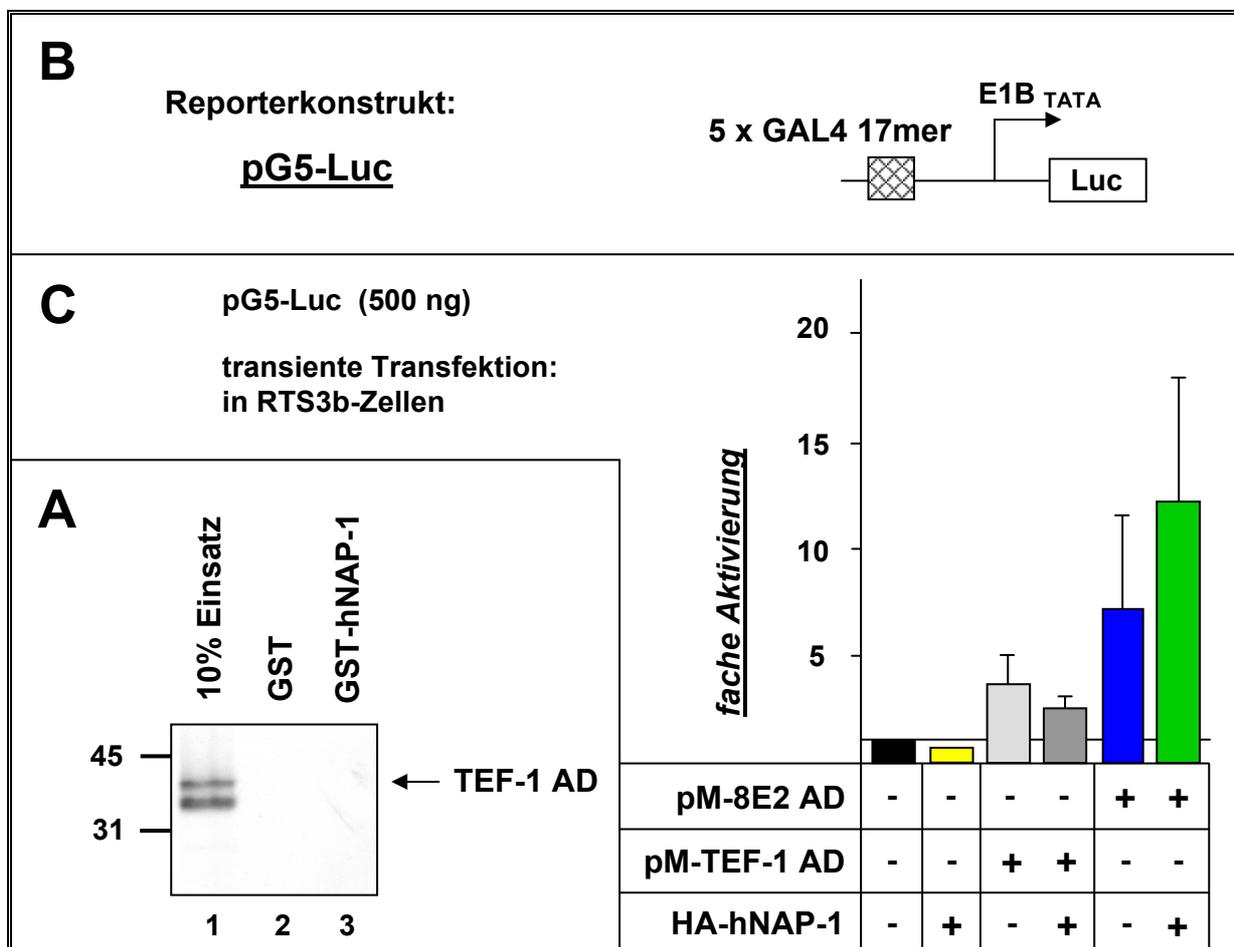


Abb. 30 TEF-1 interagiert nicht mit hNAP-1.

(A) Interaktionsanalyse. 1.5 µg GST (Spur 2) oder GST-hNAP-1 (3) wurde mit 10 µl *in vitro* translaterter ³⁵S-markierter TEF-1 AD inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.1 M LSDB Puffer wurden gebundene Proteine in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch visualisiert. Spur 1 zeigt 10% des Einsatzes des radioaktiv markierten Proteins. (B) Schematische Darstellung des Reporterkonstruktes pG5-Luc. (C) Transiente Transfektionsstudie. In RTS3b-Zellen wurden mit dem Reporterkonstruktes pG5-Luc und Expressionsvektoren für HA-hNAP-1 bzw. für die Aktivierungsdomänen von HPV8 E2 oder TEF kotransfiziert. Dargestellt ist die fache Aktivierung. Die basale Luciferase-Aktivität des Reporterkonstruktes wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

radioaktiv markierten, *in vitro* translatierten TEF-1 AD beobachtet werden (2 und 3). Zusätzlich sollten transiente Transfektionen Aufschluss über eine mögliche funktionelle Wechselwirkung bringen. Hierfür wurde das Reporterkonstrukt pG5-Luc (Abb. 30B), welches fünf GAL4 BS und den minimalen Adenovirus E1B Promotor vor dem Luciferase-Gen trägt, und Expressionsvektoren, die für Hybridproteine bestehend aus der AD von TEF-1 bzw. HPV8 E2 jeweils fusioniert an die GAL4 DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne (DBD) kodieren, verwendet. RTS3b-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt, den Expressionsvektoren für die Hybridproteine und für hNAP-1 kotransfiziert (Abb. 30C). Durch hNAP-1 allein änderte sich die Promotoraktivität nicht signifikant. Die TEF-1 AD aktivierte dagegen vierfach, was durch die Koexpression von hNAP-1 nicht stimuliert wurde. Zur Kontrolle zeigte sich auch in diesem System, dass hNAP-1 die siebenfache Aktivierung durch die HPV8 E2 AD auf zwölffach erhöhen konnte.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass hNAP-1 nicht in der Lage ist, die Transkription mit TEF-1 synergistisch zu stimulieren. Diese Beobachtung korreliert mit dem Modell, dass der kooperative Effekt bei der Stimulierung der Transkription durch hNAP-1 ausschließlich auf Aktivatoren beschränkt ist, die p300 als Kofaktor verwenden.

5. DISKUSSION

Bisher wurde noch kein Histon Chaperon mit einer Aktivierung der Replikation der PV in Verbindung gebracht, jedoch wurde spekuliert, dass Proteine, die an der Modulation von Chromatin beteiligt sind, beide Prozesse – die Transkription sowie die Replikation – erleichtern könnten (LI und BOTCHAN, 1994). Da hNAP-1 hier in der Lage war, die HPV8 Replikation *in vivo* von 1.7-fach bis sechsfach zu stimulieren, gibt diese Arbeit erstmals Hinweise darauf, dass hNAP-1 Funktionen bei der Replikation der PV erfüllen könnte. Der Grund für die unterschiedlich starke Stimulierung der Replikation ist momentan unklar. Eine experimentelle Variation wie die Transfektionseffizienz und/oder der Zustand der Zellen könnten hier die Ursache für die Schwankungen in der Effizienz der Aktivierung durch hNAP-1 gewesen sein. Weiterhin waren bisher transiente Replikationsstudien, in welchen die E1/E2-vermittelte PV Replikation detektiert wurde, von Southern Blot Analysen abhängig, die auch in dieser Arbeit zum Nachweis der replizierten DNA angewandt wurden. Kürzlich wurde jedoch eine neue, sensitivere Technik entwickelt, welche durch ein Echtzeit-PCR Protokoll zum Nachweis der HPV16 Replikation führte, die in Southern Blot Analysen nicht messbar gewesen war (TAYLOR und MORGAN, 2003). Der Einsatz einer ähnlichen Methode könnte zukünftig darüber Aufschluss bringen, ob hNAP-1 grundsätzlich in der Lage ist, in Kooperation mit E2 die Replikation der PV zu stimulieren.

Es gibt Hinweise, dass E2 noch weitere Replikationsfunktionen ausübt, die unabhängig von der E1-Bindung sind, da z.B. einige E2-Mutanten E1 noch binden können, die Replikation jedoch nicht mehr stimulieren (BROKAW *et al.*, 1996; BREIDING *et al.*, 1997). Eventuell spielt hier die Bindung von hNAP-1 und/oder p300 eine Rolle.

Jüngste Publikationen weisen darauf hin, dass hNAP-1 während der Aktivierung der Transkription eine wichtige Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass NAP-1 und andere Histon Chaperone wie z.B. ASF1 und CAF-1 mit ATP-abhängigen Chromatin Remodeling Komplexen kooperieren (JIANG *et al.*, 2000; NAKAGAWA *et al.*, 2001; ASAHARA *et al.*, 2002; MOSHKIN *et al.*, 2002). Weiterhin sind NAP-1 und NAP-2 Teil des p300/CBP Koaktivator Komplexes (ITO *et al.*, 1996; SHIKAMA *et al.*, 2000; ASAHARA *et al.*, 2002). In Vorarbeiten konnte in einem Yeast two-Hybrid System das hNAP-1 als Interaktionspartner für die AD von BPV1 E2 identifiziert werden. Die

Bindung konnte innerhalb dieser Arbeit in GST *pull-down* Experimenten und in Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Da demnach drei verschiedene Methoden sowie unterschiedlich exprimierte Proteine (in Hefe, in Bakterien und in humanen Zellen) mit verschiedenen Epitopen zum Nachweis der Interaktion führten, ist es unwahrscheinlich, dass sie artifiziell ist oder auf falscher Proteinfaltung beruht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BPV1 E2 ebenfalls das endogene hNAP-1 präzipitiert, was einen zusätzlichen Hinweis auf eine spezifische Interaktion darstellt.

Auch die E2 Proteine von zwei humanen Hochrisiko-PV Typen interagieren *in vitro* und *in vivo* mit hNAP-1. Dies sind die E2 Proteine von HPV8, das die Haut infiziert und mit der Krankheit *Epidermodysplasia verruciformis* assoziiert ist, und von HPV18, welches die Schleimhaut infiziert und einen bedeutenden Vertreter der aus Zervixkarzinomen isolierten Typen darstellt. Demnach könnte die Interaktion mit hNAP-1 unter den verschiedenen E2 Proteinen konserviert sein.

Da auch bakteriell exprimiertes, gereinigtes BPV1 E2 an gereinigtes hNAP-1 band, ist die Wechselwirkung direkt. Überdies konnte gezeigt werden, dass ein weiterer Aktivator – p53 – direkt an hNAP-1 bindet, was deutlich macht, dass die Interaktion mit hNAP-1 nicht durch einen dritten Faktor vermittelt werden muss. Ein solcher Faktor könnte der zelluläre Koaktivator p300 sein, da dieser sowohl die Transkriptionsaktivatoren E2 und p53 als auch NAP bindet (AVANTAGGIATI *et al.*, 1997; GU *et al.*, 1997; PENG *et al.*, 2000; SHIKAMA *et al.*, 2000; ASAHARA *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2002).

Für die Interaktion mit hNAP-1 ist die AD von BPV1 E2 verantwortlich, was im Yeast two-Hybrid System, den GST *pull-down* Experimenten und den Koimmunpräzipitationen deutlich wurde. Die Tatsache, dass hNAP-1 in der Lage ist, die E2-vermittelte Aktivierung der BPV1 und HPV8 Genexpression zu stimulieren, weist darauf hin, dass diese Interaktion spezifisch und funktional ist. Sogar in Anwesenheit von sättigenden E2 Konzentrationen können hNAP-1 und E2 kooperieren, was den Schluss nahe legt, dass diese Wechselwirkung ein limitierender Faktor für E2 ist. Obwohl die Mutante BPV1 E2 I73A (FERGUSON und BOTCHAN 1996) ein wesentlich geringeres Potential bei der Aktivierung der Transkription zeigte, konnte hNAP-1 in gleicher Weise mit ihr bei der Aktivierung der

Genexpression kooperieren wie mit dem wt-E2. Dies deutet darauf hin, dass neben der Wechselwirkung mit hNAP-1 weitere essentielle Aktivitäten des E2 Proteins, welche durch die Mutation I73A beeinträchtigt werden, involviert sein müssen, damit es zur effizienten Aktivierung der Transkription kommt. Diese könnten z. B. Interaktionen mit den Proteinen des PIC wie TBP und TFIIB sein (RANK und LAMBERT, 1995; BENSON *et al.*, 1997). Überdies bindet E2 Koaktivatoren wie AMF-1/Gps, CBP/p300 und P/CAF (LEE *et al.*, 2000; PENG *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2002). Es wurde bereits gezeigt, dass die E2-vermittelte Aktivierung der Transkription in Hefe mit einer Veränderung der Chromatinstruktur einhergeht (Lefebvre *et al.*, 1997). Hier könnte die Interaktion mit NAP-1 die entscheidende Rolle spielen.

Während E2 die Transkription von transient transfizierten Reporterkonstrukten stark aktivierte, war es nicht in der Lage, den Promotor zu aktivieren, wenn dieser im zellulären Genom integriert vorlag. Transient transfizierte Plasmide werden zwar mit Histonen in Nukleosomen-ähnliche Strukturen verpackt, jedoch werden sie nicht in Chromatin und somit nicht in gleichmäßig angeordnete Nukleosomen organisiert (ARCHER *et al.*, 1992; FRYER und ARCHER, 1998; CERVONI und SZYF, 2001; CHOW *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass eine Behandlung der Zellen mit TSA – einem Histon-Deacetylasen-Inhibitor – die Fähigkeit des E2 Proteins, die Transkription zu aktivieren und mit hNAP-1 zu kooperieren, teilweise wiederherstellt, unterstützt die Vermutung, dass die kompakte Chromatinstruktur den Zugang für E2 zu seinen BS inhibiert und dass eine Bindung von E2 notwendig ist, damit hNAP-1 die E2-vermittelte Aktivierung verstärken kann. Demnach ist hNAP-1 offensichtlich nicht in der Lage, *in vivo* die Bindung von E2 an seine in Chromatin organisiert vorliegenden BS zu stimulieren, wie es für GAL4 *in vitro* gezeigt wurde (Walter *et al.*, 1995).

Durch die Verwendung verschiedener hNAP-1 Dm konnten die Bereiche, an welche E2 bindet, eingegrenzt werden. Es zeigte sich, dass die E2 Proteine von BPV1 und HPV8 mit der C-terminale Domäne (AS 291-392 = $\Delta 5$) und einer internen Region (AS 162-290 = $\Delta 6$) von hNAP-1 interagieren. Diejenigen Mutanten, welche keine der beiden Domänen aufwiesen ($\Delta 4$, $\Delta 7$ und $\Delta 10$), konnten von beiden E2 Proteinen nicht mehr gebunden werden. Dabei wurde die Dm GST-hNAP-1 $\Delta 10$ nur sehr schwach exprimiert. Diese Region ist jedoch im Fragment $\Delta 4$ enthalten, an

welches die E2 Proteine ebenfalls nicht banden. Es wurde beobachtet, dass einige der kleineren Fragmente wie z. B. $\Delta 5$, $\Delta 6$ und $\Delta 8$ eine stärkere Interaktion mit E2 lieferten als das gesamte hNAP-1, was möglicherweise an einer veränderten Faltung dieser Fragmente lag. Jedoch könnte hier durch die Deletion benachbarter Regionen der Zugang für E2 zu seinen Bindestellen innerhalb von hNAP-1 auch erleichtert worden sein. Dabei stellte sich heraus, dass die Bindung von E2 an hNAP-1 für die Stimulierung der E2-vermittelten Aktivierung wichtig ist. Die Dm hNAP-1 $\Delta 4$, welcher beide E2-Interaktionsdomänen fehlen, konnte die Transkription durch E2 nicht mehr stimulieren und die Dm hNAP-1 $\Delta 3$ und $\Delta 9$, welche jeweils nur eine der beiden E2 Bindedomänen tragen, konnten nur noch in reduziertem Maß oder kaum stimulieren. Zusätzlich zu den beiden E2-Interaktionsdomänen, welche ebenfalls von p300 gebunden werden, zeigte sich, dass die N-terminalen 91 AS von hNAP-1 für die Kooperativität essentiell sind. Fehlten den Proteinfragmenten diese AS, konnten sie nicht nur nicht mehr mit E2 kooperieren, sondern reprimierten die BPV1 E2-vermittelte Aktivierung der Transkription (hNAP-1 $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 5$ und $\Delta 7$). Einige der N-terminal verkürzten Mutanten könnten mit endogenem hNAP-1 um die Bindung an E2 konkurrieren. Das Rekrutieren von E2 durch diese Dm könnte so zu nicht-funktionalen Komplexen führen, welche nicht mehr in der Lage sind, die Transkription zu aktivieren. Überdies ist es denkbar, dass diese hNAP-1 Mutanten andere Faktoren, welche für die Aktivierung der Transkription wichtig sind, binden und/oder in ihren sonstigen Funktionen inhibieren. Dies könnte für hNAP-1 $\Delta 7$ und $\Delta 10$ gelten, welche die E2-vermittelte Aktivierung reprimieren, E2 jedoch nicht binden können. Einige der Mutanten reprimierten nicht nur die BPV1 E2-vermittelte Aktivierung, sondern auch die basale Promotoraktivität, was darauf hindeutet, dass außer E2 und p300 noch weitere Faktoren von hNAP-1 gebunden werden könnten, welche zur Aktivierung der BPV1 Genexpression beitragen. Im Gegensatz dazu zeigte die Expression der Dm unter Verwendung des HPV8 Reporterkonstruktes keinerlei Repression der basalen Promotoraktivität und auch kaum eine Repression der HPV8 E2-vermittelten Aktivierung der Transkription. Dies legt den Schluss nahe, dass Faktoren, welche für die BPV1 Genexpression wichtig sind und durch die Expression der hNAP-1 Dm in ihren jeweiligen Funktionen beeinträchtigt werden könnten, für die HPV8 Genexpression keine Rolle spielen.

Die direkten Interaktionsanalysen der hNAP-1 Dm mit bakteriell exprimiertem, gereinigtem Histon H2B zeigten, dass sich hier die Interaktion auf die interne Region, welche auch von E2 und p300 gebunden wird, beschränkt. Alle Mutanten, denen die internen AS von 162-290 fehlten ($\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 7$ und $\Delta 10$), wurden von H2B nicht gebunden. Eine Ausnahme bildet hier die Dm $\Delta 9$, welcher diese AS fehlen und die dennoch gebunden wurde. Dieses Fragment stellt die einzige Mutante dar, in der zwei im nativen Protein nicht angrenzende Bereiche aneinander fusioniert worden waren. Möglicherweise entstand durch diese Fusion der AS 1-161 an die AS 291-392 von hNAP-1 eine neue Domäne, die für die Interaktion mit H2B verantwortlich war. Eine nachfolgende Bindung des Histons H2B an das durch E2 zur DNA rekrutierte hNAP-1 ist somit denkbar und könnte effizient zur E2-vermittelten Transkriptionsaktivierung beitragen.

Es stellt sich die Frage, welche Rolle der N-Terminus von hNAP-1 bei der Aktivierung der Genexpression spielt. Dieser Domäne wird die Dimerisierung/Multimerisierung von NAP Proteinen zugeschrieben (SHIKAMA *et al.*, 2000), die für die hNAP-1-Funktion bei der Transkriptionsaktivierung wichtig sein könnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass die *Nucleosome Assembly* Aktivität des NAP-1 aus der Hefe (yNAP-1), auf die AS 43-365 zurückgeführt werden kann (FUJII-NAKATA *et al.*, 1992). Möglicherweise ist somit auch ein Teil des N-Terminus des humanen NAP-1 für diese Aktivität von Bedeutung und könnte hier eine entscheidende Rolle spielen. Zieht man die aktuellen Publikationen (SHIKAMA *et al.*, 2000; ASAHARA *et al.*, 2002) und die hier gefundenen Daten in Betracht, so scheint er nicht für die Bindung an p300 verantwortlich zu sein, da sich hier höchstens sehr schwache Wechselwirkungen finden (SHIKAMA *et al.*, 2000). Es wird spekuliert, dass der Import der Histone H2A und H2B in den Zellkern für die Funktion des NAP Proteins bei der Aktivierung der Transkription essentiell ist. Im Falle des yNAP-1 wurde gefunden, dass Mutationen, welche ein Leucin-reiches Kern-Export-Signal (*Nuclear Export Signal* = NES) innerhalb des N-Terminus inaktivierten, eine Reduktion der Transkription einiger Gene zur Folge hatten (MOSAMMAPARAST *et al.*, 2002). Jedoch konnte in dieser Arbeit durch die Mutation entsprechender, konservierter AS im humanen NAP-1 diese Reduktion nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus hatten die Mutationen keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass im

humanen NAP-1 ein NES wahrscheinlich an anderer Stelle kodiert wird. Lokalisationsexperimente mit den N-terminal verkürzten hNAP-1 Dm zeigten eine stärkere Färbung im Zellkern im Vergleich zu den C-terminal verkürzten Mutanten oder dem gesamten Protein (Daten nicht gezeigt). So befand sich z.B. die Dm hNAP-1 Δ 3, welche noch die stärkste Kooperation in der Aktivierung der Transkription mit E2 zeigte, größtenteils im Zytosol. Neben der Tatsache, dass dieser Mutante je eine Bindedomäne für E2 und p300 fehlt, könnte somit ein weiterer Grund für die Reduktion ihres Aktivierungspotentials bei der Transkription die geringere Konzentration im Zellkern sein, was demnach auch mit einem reduzierten Transport der Histone H2A und H2B in den Zellkern einhergehen muss. Eine detaillierte Analyse der N-terminalen 91 AS könnte hier Aufschluss darüber bringen, ob der Import der Histone in den Zellkern, für welchen ein funktionales NES benötigt wird, auch für die Aktivierung der Transkription durch hNAP-1 bei der Kooperation mit E2 wichtig ist.

Das Rekrutieren von hNAP-1 zum Promotor durch die Fusion mit der GAL4 DBD führte nicht zur Aktivierung der Transkription (Daten nicht gezeigt), was den Schluss nahe legt, dass hNAP-1 gemeinsam mit einer AD agieren muss, um die Genexpression effizient stimulieren zu können. Die Beobachtung, dass die Stimulierung der E2-vermittelten Aktivierung durch hNAP-1 bei nicht-sättigenden E2 Konzentrationen viel stärker war, könnte dadurch erklärt werden, dass hNAP-1 die Interaktion von E2 und einem weiteren Faktor – möglicherweise p300 – beeinflusst. Die Bindung von p300 an zwei separate Regionen innerhalb der C-terminalen 300 AS von hNAP-1 (SHIKAMA *et al.*, 2000), welche wie bereits erwähnt ebenfalls von E2 gebunden werden, konnte hier bestätigt werden. Weiterhin zeigte ein Kompetitionsexperiment, dass die Bildung eines ternären Komplexes *in vitro* bestehend aus BPV1 E2 Δ C, hNAP-1 und p300-4 wahrscheinlich ist, da hier radioaktiv markiertes BPV1 E2 Δ C das an p300-4 gebundene His-hNAP-1 nicht verdrängte, sondern darüber hinaus an diesen bestehenden Zweierkomplex band. In einem Kontrollexperiment konnte dagegen der Komplex aus p300-4 und His-hNAP-1 das radioaktiv markierte hNAP-1 nur noch schwach binden, was darauf hinweist, dass das His-hNAP-1 die meisten der vorhandenen BS innerhalb von p300-4 bereits besetzt hatte. Die Tatsache, dass nach Vorinkubation mit His-hNAP-1 prozentual nicht signifikant mehr BPV1 E2 Δ C band, könnte dadurch erklärt werden, dass die

17-20% des gebundenen BPV1 E2 die sättigende Konzentration repräsentiert und hier alle BS für E2 sowohl im Fragment p300-4 als auch im Zweierkomplex p300-4-His-hNAP-1 besetzt waren.

Das Modell der Bildung eines ternären Komplexes wurde durch eine Glyceroldichte-zentrifugation unterstützt. Gereinigtes hNAP-1 bzw. p300-HAT beeinflussten jeweils die Sedimentation von BPV1 E2 Δ C, was mit einer direkten Interaktion beider Proteine mit E2 korreliert. Dabei änderte die Vorinkubation mit p300 die Sedimentation von E2 in Richtung des Bodens, während eine Inkubation mit hNAP-1 die entgegengesetzte Wirkung hatte. Dies impliziert, dass der Proteinkomplex bestehend aus hNAP-1 und E2 sich möglicherweise strukturell derart verändert hat, dass seine Sedimentation trotz der größeren Masse verlangsamt wurde. In Anwesenheit beider Proteine änderte sich die Sedimentation von E2 wiederum, was darauf hindeutet, dass zumindest ein Teil des E2 Proteins mit beiden Proteinen gleichzeitig komplexiert vorlag. Die gegensätzliche Wirkung der Bindung von hNAP-1 bzw. p300 auf die Sedimentation des E2 Proteins könnte den Effekt der Bindungen teilweise maskiert haben, weshalb der Dreierkomplex in diesem Experiment weniger offensichtlich ist. Ein ähnliches Resultat zeigte die Sedimentation von p300. Während auch hier die Bindung an E2 zu einer Sedimentation von p300 in Richtung des Bodens führte, hatte die Inkubation mit hNAP-1 – wie bei der Wechselwirkung zwischen E2 und hNAP-1 – die gegenteilige Auswirkung, so dass auch hier die Visualisierung des ternären Komplexes durch die beiden unterschiedlichen Effekte erschwert wurde. Darüber hinaus kosedimentierten jedoch alle drei Proteine ähnlich stark in den gleichen Fraktionen, wenn sie miteinander inkubiert worden waren.

Möglicherweise hätte hier eine Auftrennung mittels Molekularsiebchromatographie weitere Beweise erbracht, konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

Das Resultat der Koimmunpräzipitation der drei Proteine unterstützt die Annahme einer Bildung des ternären Komplexes *in vivo*. p300 präzipitierte sowohl HPV8 E2 und hNAP-1 allein als auch beide Proteine gemeinsam. Es kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden Proteine jeweils an verschiedene p300 Moleküle banden. Jedoch liegt der Schluss nahe, dass das

präzipitierte p300 mit hNAP-1 gesättigt war und HPV8 E2 hier zusätzlich gebunden hatte. Diese Vermutung liegt einerseits in der wesentlich stärkeren Expression des hNAP-1 im Vergleich zu HPV8 E2 oder p300 begründet. Ferner scheint die Interaktion von hNAP-1 mit p300 deutlich stärker zu sein als die von E2 mit hNAP-1 bzw. mit p300, worauf sowohl die Interaktionsanalyse von GST-hNAP-1 mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem p300-HAT als auch das Kompetitions-experiment hinweist. Durch diese Analyse konnte auch erstmals eine Koimmun-präzipitation von HPV8 E2 und p300 *in vivo* gezeigt werden.

Die hier gefundene starke synergistische Aktivierung der HPV8 Genexpression durch E2, hNAP-1 und p300 sowohl in RTS3b-Zellen als auch in primären Keratinozyten deutet ebenfalls darauf hin, dass ein Komplex aus diesen drei Proteinen auch *in vivo* gebildet wird. Es wurde gezeigt, dass die Acetylierung von in Nukleosomen verpackten Histonen durch p300 den Transfer der Histone H2A und H2B auf hNAP-1 begünstigt (ITO *et al.*, 2000). Überdies wird diskutiert, dass die Abwesenheit von H2A/H2B *in vitro* durch eine weniger dichte Chromatinfaltung mit verstärkter Transkriptionsaktivität korreliert (CHAN und LA THANGUE, 2001). Dies impliziert, dass die Rekrutierung von hNAP-1 und p300 durch E2 dazu führen kann, dass eine solche H2A/H2B freie Umgebung geschaffen wird und der inhibitorische Effekt der Nukleosomen für die Aktivierung der Transkription aufgehoben wird. Ein Chromatin Assembly Experiment, dessen Durchführung aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr möglich war, wird künftig weitere Hinweise erbringen, ob das E2 Protein hNAP-1 und p300 zur DNA rekrutiert.

Trotz der Bindung von p300 auch an BPV1 E2 *in vitro* (Müller, 2003) ist nach Koexpression von BPV1 E2 und p300 keine synergistische Aktivierung der BPV1 Genexpression zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Ursache hierfür konnte bisher nicht geklärt werden. Möglicherweise spielt die unterschiedliche Komposition von BS für zelluläre Faktoren innerhalb der BPV1 LCR bzw. HPV8 NCR eine Rolle.

Eine Funktion von hNAP-1 bei der Aktivierung der Transkription scheint nicht auf E2 beschränkt zu sein, da gereinigtes p53 gereinigtes hNAP-1 ebenso *in vitro* direkt bindet und auch beide endogenen Proteine *in vivo* kopräzipitieren. Überdies ist diese Wechselwirkung funktional, denn hNAP-1 stimulierte die p53-vermittelte

Aktivierung der Transkription eines synthetischen Reporterkonstruktes und war darüber hinaus in der Lage, gemeinsam mit p53 die Expression von p21 zu induzieren und somit die Aktivierung eines p53-abhängigen endogenen Promotors zu verstärken. Die Kooperation zwischen p53 und hNAP-1 weist auf eine Interaktion beider Proteine *in vivo* hin. Da p53 ebenso wie E2 p300 direkt bindet und als Koaktivator verwendet, wurde bisher spekuliert, dass für eine Aktivierung der Transkription die Koexpression von p300 erforderlich ist (SHIKAMA *et al.*, 2000). Hier reichte offensichtlich die Menge des endogen exprimierten p300, um zur Aktivierung der Transkription beitragen zu können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *Transcriptional Enhancer Factor-1* (TEF-1), welcher weder an p300 bindet noch dieses als Koaktivator verwendet (SLEPAK *et al.*, 2001, MÜLLER *et al.*, 2002), nicht mit hNAP-1 interagiert und auch nicht mit diesem bei der Aktivierung der Transkription kooperiert. Obwohl die Zahl der Aktivatoren, die hier untersucht wurden, gering ist, könnte dies darauf hinweisen, dass hNAP-1 bei der Aktivierung der Transkription nur gemeinsam mit p300 agiert. Zukünftige Experimente werden darüber Aufschluss bringen, ob die Bindung und Aktivierung durch hNAP-1 für Faktoren spezifisch ist, welche p300 binden und als Koaktivator verwenden, wie es in dieser Arbeit für E2 und p53 gezeigt wurde.

Die in dieser Arbeit dargestellten Daten zeigen zum ersten Mal, dass neben p300 auch hNAP-1 ein für Aktivatoren der Transkription essentielles Protein darstellt. Über seine spezifische DNA-Bindung rekrutiert E2 wahrscheinlich sowohl p300 als auch hNAP-1 in Promotornähe. Auf diese Weise tragen offensichtlich beide Proteine mit ihren chromatinmodulierenden Eigenschaften entscheidend dazu bei, den inhibitorischen Effekten der Nukleosomen entgegenzuwirken, um die effiziente Genexpression der PV zu gewährleisten.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams CR, and Kamakaka RT (1999). Chromatin assembly: biochemical identities and genetic redundancy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**:185-190.

Akgül B (1999). Kartierung und Charakterisierung des DNA-Replikationsursprungspunktes der *Epidermodysplasia verruciformis*-assoziierten humanen Papillomvirustypen HPV8 und HPV9. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Akgül B (2002). Regulation der Transkription und Replikation von HPV8 und Charakterisierung der transformierenden Eigenschaft des viralen E7-Proteins. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Androphy E, Lowy DR, and Schiller JT (1987). Bovine papillomavirus E2 *trans*-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature.* **325**: 70-73.

Archer TK, Lefebvre P, Wolford RG, and Hager GL (1992). Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. *Science.* **255**: 1573-1576.

Armstrong DJ, and Roman A (1997). The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology.* **239**: 238-246.

Asahara H, Tartare-Deckert S, Nakagawa T, Ikehara T, Hirose F, Hunter T, Ito T, and Montminy M (2002). Dual Roles of p300 in Chromatin Assembly and Transcriptional Activation in Cooperation with Nucleosome Assembly Protein 1 In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 2974-2983.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K (editors). (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc., New York.

Avantaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, and Kelly K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53 dependent signal pathways. *Cell* **89**: 1175-1184.

Baker CC (1993). The genomes of papillomaviruses. In: *S.J. O'Brien* (Herausg.), Genetic maps: locus maps of complex genomes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1.134-1.146.

Barksdale SK, and Baker CC (1993). Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P₂₄₃ and late promoters. *J. Virol.* **67**: 5605-5616.

Bechtold V, Beard P, and Raj K (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J. Virol.* **77**: 2021-2018.

Benson JD, Lawande R, and Howley PM (1997). Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator protein with human and yeast TFIIIB proteins. *J. Virol.* **71**: 8041-8047.

Berkhout RJ, Bouwes Bavinck JN, and ter Schegget J (2000). Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2087-2096.

Birnboim HC and Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **6**: 1513-1523.

Boeckle S, Pfister H, and Steger G (2002). A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2. *Virology.* **293**: 103-117.

Bouvard V, Storey A, Pim D, and Banks L (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO.* **13**: 5451-5459.

Bouwes Bavinck JN, and Berkhout RJ (1997). HPV infections and immunosuppression. *Clin. Dermatol.* **15**: 427-437.

Boxman IL, Mulder LH, Russell A, Bouwes Bavinck JN, Green A, and Ter Schegget J (1999). Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br. J. Dermatol.* **141**: 246-249.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Bioch.* **72**: 248-254.

Breiding DE, Sverdrup F, Grosse MJ, Moscufo N, Boonchai W, and Androphy EJ (1997). Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 7208-7219.

Brokaw JL, Blanco M, and McBride A (1996). Amino acids critical for the functions of the bovine papillomavirus type 1 E2 transactivator. *J. Virol.* **70**: 23-29.

Bulger M, Ito T, Kamakaka RT, and Kadonaga JT (1995). Assembly of regularly spaced nucleosome arrays by *Drosophila* chromatin assembly factor 1 and a 56-kDa histone-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 11726-11730.

Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, and Schlegel R (1989). The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology.* **170**: 334-339.

Canman CE, and Kastan MB (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature.* **384**: 213-214.

Cervoni N, and Szyf M (2001). Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **276**: 40778-40787.

Chan HM, and La Thangue NB (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.* **114**: 2363-2373.

Chen H, Li B, and Workman JL (1994). A histone-binding protein, nucleoplasmin, stimulates transcription factor binding to nucleosomes and factor-induced nucleosome disassembly. *EMBO J.* **13**. 380-390.

Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, and Evans RM (1997). Nuclear receptor co-activator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* **90**: 569-580.

Chow L, and Broker T (1994). Papillomavirus DNA replication. *Intervirol.* **37**: 150-158.

Chow L, and Broker T (1997). Small DNA tumor viruses. In: *Viral Pathogenesis*. Neal Nathanson, et al., (eds); Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 267-301.

Chow CM, Athanassiadou A, Raguz S, Psiouri L, Harland L, Malik M, Aitken MA, Grosveld F, and Antoniou M (2002). LCR-mediated, long-term tissue-specific gene expression within replicating episomal plasmid and cosmid vectors. *Gene Ther.* **9**: 327-36

Conrad M, Bubb VJ, and Schlegel R (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* **67**: 6170-6178.

Corona R (1996). Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **32**: 37-42.

Cueille N, Nougarede R, Mechali F, Philippe M, and Bonne-Andrea C (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and Cyclin E-Cdk2. *J. Virol.* **72**: 7255-7262.

Day PM, Roden RBS, Lowy DR, and Schiller JT (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**: 142-150.

De Villiers E-M (2001). Taxonomic classification of papillomaviruses. Review. *Papillomavirus Report.* **12**: 57-63.

Demeret C, Garcia-Carranca A, and Thierry F (2003). Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene.* **22**: 168-175.

Desaintes C, and Demeret C (1996). Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Cancer Biol.* **7**: 339-347.

Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, and Thierry F (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.* **16**: 504-514.

- Desaintes C, Goyat S, Garbay S, Yaniv M, and Thierry F** (1999). Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*. **18**: 4538-4545.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, and Crawford L** (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. **352**:824-827.
- Dowhanick JJ, McBride AA, and Howley PM** (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* **69**: 7791-7799.
- Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, and Reed SI** (1994). P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*. **76**: 1013-1023.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, and Harlow E** (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. **243**: 934-937.
- Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Bentley-Lawrence J, and Livingston DM** (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev*. **8**: 869-884.
- Einstein MH, and Goldberg GL** (2002). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest.* **20**: 1080-1085.
- Elbel M, Carl S, Spaderna S, and Iftner T** (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology*. **239**: 132-149.
- EI-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, and Vogelstein B** (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**: 45-49.
- EI-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, and Vogelstein B** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. **75**: 817-25.
- Enzenauer C, Mengus G, Lavigne A, Davidson I, Pfister H, and May M** (1998). Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirology* **41**: 80-90.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, and McMillan NA** (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.
- Favre M, Breitburd F, Croissant O, and Orth G** (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* **21**: 1205-1209.

Ferguson MK, and Botchan MR (1996). Genetic analysis of the activation domain of bovine papillomavirus protein E2: its role in transcription and replication. *J. Virol.* **70**: 4193-4199.

Frattini MG, and Laimins LA (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12398-12402.

Frattini MG, Lim HB, and Laimins LA (1996). In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes of differentiation-dependent late expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **93**: 3062-3067.

Fryer CJ, and Archer TK (1998). Chromatin remodelling by glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature.* **393**: 88-91.

Fuchs PG, Iftner T, Weninger J, and Pfister H (1986). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.* **58**: 626-634.

Fuchs PG, Horn S, Iftner T, May M, Stubenrauch F, and Pfister H (1993). Molecular biology of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses. In: *Virus strategies*. Doerfler, W. & Böhm, P. (eds.) (Verlag Chemie, Weinheim): 517-529.

Fuchs PG, and Pfister H (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology.* **37**: 159-167.

Fuchs PG, and Pfister H (1996). Papillomaviruses in Epidermodysplasia verruciformis. In: *Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses*, S. 253-261. by C. Lacey. Leeds: Leeds University press.

Fujii-Nakata T, Ishimi Y, Okuda A, and Kikuchi A (1992). Functional Analysis of Nucleosome Assembly Protein, NAP-1. *J. Biol. Chem.* **267**: 20980-20986.

Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, and Shay JW (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2866-2871.

Gao Q, Kumar A, Srinivasan S, Singh L, Mukai H, Ono Y, Wazer DE, and Band V (2000). PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **275**: 14824-14830.

Garland SM (2002). Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology.* **34**: 213-224.

Garrido-Guerrero E, Carrillo E, Guido M, Zamorano R, Garcia-Carranca A, and Gariglio P (1996). Different arrangement of human papillomavirus E2 binding sites distinguishes cutaneous types from those associated with mucosal lesions. *Arch. Med. Res.* **27**: 389-394.

Giri I, and Yaniv M (1988). Structural and mutational analysis of E2 transactivating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.* **7**: 2823-2829.

Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, and Sapp M (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **75**: 1565-1570.

Gonzales SL, Stremlau M, He X, Basile JR, and Münger K (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J. Virol.* **75**: 7583-7591.

Goodman RH, and Smolik S (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* **14**: 1553-1577.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, and Harris CC (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* **15**: 4855-78.

Grossman SR, Mora R, and Laimins LA (1989). Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *J. Virol.* **63**: 366-374.

Gu W, Shi XL, and Roeder RG (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823.

Gu W, and Roeder RG (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA-binding by acetylation of p53 C-terminal domain. *Cell.* **90**: 595-606.

Hadaschik D (2002). Das Papillomvirus E2-Protein: Lokalisation und Modulation der zellulären Transkription. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Halbert CL, Demers GW, and Galloway DA (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* **65**: 473-478.

Haller K, Stubenrauch F, and Pfister H (1995). Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology.* **214**: 245-255.

Ham J, Dostatni N, Gauthier JM, and Yaniv M (1991A). The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 440-444.

Ham J, Dostatni N, Arnos F, and Yaniv M (1991B). Several different upstream promoter elements can potentiate transactivation by the BPV-1 E2 protein. *EMBO J.* **10**: 2931-2940.

Harwood CA, Suretheran T, McGregor JM, Spink PJ, Leigh IM, Breuer J, and Proby CM (2000). Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.* **61**: 289-297.

Haugen TH, Turek LP, Mercurio FM, Cripe TP, Olson BJ, Anderson RD, Seidl D, Karin M, and Schiller J (1988). Sequence specific and general transcriptional activation by bovine papillomavirus-1 E2 transactivator require an N-terminal amphipathic helix containing E2 domain. *EMBO J.* **7**: 4245-4253.

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, and Schiller JT (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO. J.* **8**: 3905-3910.

Heike T, Miyatake S, Yoshida M, Arai K, and Arai N (1989). Bovine papillomavirus encoded E2 protein activates lymphokine genes through DNA elements, distinct from the consensus motif, in the long control region of its own genome. *EMBO J.* **8**: 1411-1417.

Higgins GD, Uzelin DM, Phillips GE, McEvoy P, Marin R, and Burrell CJ (1992). Transcription patterns of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial differentiation. *J. Gen. Virol.* **73**: 2047-2057.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, and Harris CC (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic. Acids Res.* **22**: 3551-3555.

Holt S, Schuller G, and Wilson V (1994). DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences containing within an 18 base-pair inverted repeat element at the origin of replication. *J. Virol.* **68**: 1094-1102.

Horn S, Pfister H, and Fuchs PG (1993). Constitutive transcriptional activator of Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8. *Virology.* **196**: 674-681.

Hou SY, Wu SY, and Chiang CM (2002). Transcriptional Activity among High and Low Risk Human Papillomavirus E2 Proteins Correlates with E2 DNA Binding. *J. Biol. Chem.* **277**: 45619-45629.

Howley PM, and Lowy (2001). Papillomaviruses and Their Replication. In: *Fields Virology. 4th edition; Raven Press, Philadelphia* : 2197-2229.

Iftner T, Bierfelder S, Csapo Z, and Pfister H (1988). Involvement of human papillo-mavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J. Virol.* **62**: 3655-3661.

Iftner T, Fuchs PG, and Pfister H (1989). Two independently transforming functions of human papillomavirus 8. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **144**: 167-173.

Iftner T, Oft M, Böhm S, Wilczynski SP, and Pfister H (1992). Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J. Virol.* **66**:4639-4646.

- Ishimi Y, Hirosumi J, Sato W, Sugasawa K, Yokota S, Hanaoka F, and Yamada M** (1984). Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **142**: 431-439.
- Ishimi Y, Kojima M, Yamada M, and Hanaoka F** (1987). Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-1) and histones. *Eur. J. Biochem.* **162**: 19-24.
- Ishimi Y, and Kikuchi A** (1991). Identification and Molecular Cloning of Yeast Homolog of Nucleosome Assembly Protein I Which Facilitates Nucleosome Assembly *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* **266**: 7025-7029.
- Ito T, Bulger M, Kobayashi R, and Kadonaga JT** (1996). *Drosophila* NAP-1 Is a Core Histone Chaperone That Functions in ATP-Facilitated Assembly of Regularly Spaced Nucleosomal Arrays. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3112-3124.
- Ito T, Tyler JK, and Kadonaga JT** (1997). Chromatin assembly factors: a dual function in nucleosome formation and mobilization? *Genes Cells.* **2**: 593-600.
- Ito T, Ikehara T, Nakagawa T, Kraus WL, and Muramatsu M** (2000). p300-Mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone. *Genes Dev.* **14**: 1899-1907.
- Jablonska S, and Majewski S** (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**: 157-175.
- Jiang W, Nordeen SK, and Kadonaga JT** (2000). Transcriptional Analysis of Chromatin Assembled with Purified ACF and dNAP1 Reveals That Acetyl-CoA Is Required for Preinitiation Complex Assembly. *J. Biol. Chem.* **275**: 39819-39822.
- Jones DL, Alani RM, and Münger K** (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**: 2101-2111.
- Jones DL, and Münger K** (1997). Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.* **71**: 2905-2912.
- Joyce JG, Thung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, Jansen KU, and Keller PM** (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 5810-5822.
- Kamakaka RT, Bulger M, Kaufman PD, Stillman B, and Kadonaga JT** (1996). Postreplicative chromatin assembly by *Drosophila* and human chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol.* **16**: 810-817.
- Kiyono T, Nagashima K, and Ishibashi M** (1989). The primary structure of major viral RNA in a rat cell line transfected with type 47 human papillomavirus DNA and the transforming activity of its cDNA and E6 gene. *Virology.* **173**: 551-565.

Kiyono T, Hiraiwa A, and Ishibashi M (1992). Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E6 genes of several papillomavirus associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology*. **186**: 628-639.

Ko LJ, and Prives C (1996). P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. **10**: 1054-1072.

Krubke J, Kraus J, Delius H, Chow L, Broker T, Iftner T, and Pfister H (1987). Genetic relationship among human papillomaviruses associated with benign and malignant tumours of patients with Epidermodysplasia verruciformis. *J. Gen. Virol.* **68**: 3091-3103.

Krude T, and Keller C (2001). Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell. Mol Life Sci.* **58**: 665-672.

Kuo S, Liu J, Broker T, and Chow L (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J. Biol. Chem.* **269**: 24058-24065.

Lai M-C, Teh BH, and Tarn WY (1999). A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J. Biol. Chem.* **274**: 11832-11841.

Lane DP (1992). Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature*. **394**: 616-617.

Lee D, Lee B, Kim JH, Kim DW, and Choe J (2000a). cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **275**: 7045-7051.

Lee D, Hwang SG, Kim J, and Choe J (2002). Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 6483-6489.

Leechanachai P, Banks L, Moreau F, and Matlashewski G (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*. **7**: 19-25.

Lefebvre O, Steger G, and Yaniv M (1997). Synergistic transcriptional-activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. *J. Mol. Biol.* **266**: 465-478.

Lemme W (1998). Vergleichende Analyse der Promotoraktivitäten verschiedener Epidermodysplasia verruciformis-assoziiierter humaner Papillomviren. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

LeRoy G, Loyola A, Lane WS, and Reinberg D (2000). Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J. Biol. Chem.* **275**: 14787-14790.

Li R, Knight J, Bream G, Stenlund A, and Botchan M (1989). Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev*. **3**: 510-526.

Li R, Knight JD, Jackson SP, Tjian R, and Botchan MR (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell*. **65**: 493-505.

Li R, and Botchan MR (1994). Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 7051-7055.

Luckow B, and Schütz G (1987). CAT constructions with multiple unique sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5490.

Maniatis T, Sambrook J, and Fritsch EE (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York.

Matsukura T, Kanda T, Furuno A, Yoshikawa H, Kawana T, and Yoshiike K (1986). Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J. Virol.* **58**: 979-982.

McBride AA, Romanczuk H, and Howley PM (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 18411-18414.

McBride AA, and Myers G (1996). The E2 Proteins. Papillomavirus Colloquium, III 15-31.

McBryant SJ, Park YJ, Abernathy SM, Laybourn PJ, Nyborg JK, and Luger K (2003). Preferential Binding of the Histone (H3-H4)₂ Tetramer by NAP1 Is Mediated by the Amino-terminal Histone Tails. *J Biol. Chem.* **278**: 44574-44583.

Modrow S, Falke D, and Truyen U (2003). Molekulare Virologie. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, McPherson P, and Botchan MR (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**: 1694-1699.

Mosammamaparast N, Ewart CS, and Pemberton F (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* **21**: 6527-6538.

Moshkin YM, Armstrong JA, Maeda RK, Tamkun JW, Verrijzer CP, Kennison JA, and Karch F (2002). Histone chaperone ASF1 cooperates with the Brahma chromatin-remodelling machinery. *Genes Dev.* **16**: 2621-2626.

Müller A (1999). Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen dem zellulären Koaktivator p300 und den viralen E2-Proteinen von HPV8, HPV18 and BPV1. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Müller A, Ritzkowsky A, and Steger G (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular co-activator p300. *J. Virol.* **76**: 11042-11053.

- Müller** (2003). Die Rolle der Interaktion des zellulären Koaktivators p300 mit den E2- und E6-Proteinen von Papillomviren bei der Regulation der viralen Genexpression. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.
- Mullis KB, and Fallona FA** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods. Enzym.* **155**: 335-350.
- Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzales SL, Grace M, and Zacny VL** (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, **20**: 7888-7898.
- Muñoz N** (2000). Human papillomaviruses and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* **19**: 1-5.
- Myers G, Sverdrup F, Baker C, Mc Bride A, Münger K, and Bernard HU** (1997). Human papillomaviruses. *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos*.
- Nakagawa T, Bulger M, Muramatsu M, and Ito T** (2001). Multistep Chromatin Assembly on Supercoiled Plasmid DNA by Nucleosome Assembly Protein-1 and ATP-utilizing Chromatin Assembly and Remodeling Factor. *J. Biol. Chem.* **276**: 27384-27391.
- Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, Lee CG, Hurwitz J, Parvin JD, and Montminy M** (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell.* **90**: 1107-1112.
- Nightingale KP, Wellinger RE, Sogo JM, and Becker PB** (1998). Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila hsp26* gene in chromatin. *EMBO J.* **17**: 2865-2875.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, and Vogelstein B** (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**: 705-708.
- Nishimura A, Ono T, Ishimoto A, Dowhanick JJ, Frizzell MA, Howley PM, and Sakai H** (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol.* **74**: 3752-3760.
- Numa F, Hirabayashi K, Tsunaga N, Kato H, O'Rourke K, Shao H, Stechmann-Lebakken C, Varani J, Rapraeger A, and Dixet VM** (1995). Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.* **55**: 4676-4680.
- O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, and Bernard HU** (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by squenching AP-1 activity. *J. Virol.* **7**: 6529-6539.

- Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, and Nakatani T** (1996). The transcriptional co-activators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. **87**: 953-959.
- Ohtani K, DeGregori J, and Nevins JR** (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 12146-12150.
- Pan HQ, Wang YP, Chissoe SL, Bodenteich A, Wang Z, Iyer K, Clifton SW, Crabtree JS, and Roe BA** (1994). The complete nucleotide sequences of the SacBII Kan domain of the P1 pAD10-SacBII cloning vector and three cosmid cloning vectors: pTCF, svPHEP, and LAWRIST16. *Genet. Anal. Tech. Appl.* **11**: 181-186
- Peng YC, Breiding DE, Sverdrup F, Richard J, and Androphy EJ** (2000). AMF1/Gps2 binds to p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *J. Virol.* **74**: 5872-5879.
- Pfister H** (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **99**: 111-181.
- Pfister H** (1987). Papillomaviruses. General Description, Taxonomy, and Classification. *The Papovaviridae, Vol. 2*. Herausg.: N.P. Salzman und P.M. Howley. Plenum Publishing Corporation.
- Pfister H** (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin. Cancer Biol.* **3**: 263-271.
- Pfister H, and Fuchs P** (1987). Papillomaviruses: particles, genome organisation and proteins. In: *Papillomaviruses and human disease*. Herausg.: K. Syrjänen, L. Gissmann, L.G. Koss, *et al.*
- Pfister H, and Ter Schegget J** (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin. Dermatol.* **15**: 335-347.
- Phelps WC, Yee CL, Münger K, and Howley PM** (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*. **53**: 539-547.
- Pim D, Collins M, and Banks L** (1992). Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*. **7**: 27-32.
- Purdie KJ, Sexton CJ, Proby CM, Glover MT, Williams AT, Stables JN, and Leigh IM** (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res.* **53**: 5328-5333.
- Ramoz N, Rueda LA, Bouadjar B, Montoya LS, Orth G, and Favre M** (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat. Genet.* **32**: 579-581.

Rank NM, and Lambert PF (1995). Bovine Papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J. Virol.* **69**: 6323-6334.

Roberts S, Ashmole I, Sheehan TM, Davies AH, and Gallimore PH (1994). Human papillomavirus type 1 E4 is a zinc binding protein. *Virology.* **202**: 865-874.

Rodriguez P, Munroe D, Prawitt D, Chu LL, Bric E, Kim J, Reid LH, Davies C, Nakagama H, Loebbert R, Winterpracht A, Petruzzi MJ, Higgins MJ, Nowak N, Evans G, Shows T, Weissman BE, Zabel B, Housman DE, and Pelletier J (1997). Functional Characterization of Human Nucleosome Assembly Protein-2 (NAP1L4) Suggests a Role as a Histone Chaperone. *Genomics.* **44**: 253-265.

Sanders CM, and Stenlund A (1998). Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J.* **17**: 7044-7055.

Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.

Sato H, Watanabe S, Furuno A, and Yoshiike K (1989). Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in Escherichia coli and monkey COS-1-cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology.* **170**: 311-315.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, and Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* **63**: 1129-1136.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, and Howley PM (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* **75**: 495-505.

Schmidt HM (1999). Wechselwirkungen der E2-Proteine von Papillomviren mit zellulären Faktoren. *Doktorarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Schmidt HM, Steger G, and Pfister H (1997). Competitive binding of viral E2 protein and mammalian core-binding factor to transcriptional control sequences of human papillomavirus type 8 and bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* **71**: 8029-8034.

Schmitt A, Harry JB, Rapp B, Wettstein FO, and Iftner T (1994). Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high- risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7-protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* **68**: 7051-7059.

Schulze A, Zerfass K, Spitkovsky D, Middendorp S, Berges J, Helin K, Jansen-Durr P, and Henglein B (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 11264-11268.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, and zur Hausen H (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. **314**: 111-114.

Sedman SA, Barbosa MS, Vass WC, Hubbert NL, Haas JA, Lowy DR, and Schiller JT (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.* **65**: 4860-4866.

Sedman J, and Stenland A (1995). Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J.* **14**: 6218-6228.

Selinka HC, Giroglou T, and Sapp M (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology*. **299**: 279-287.

Shikama N, Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Lee CW, Cairns W, and La Thangue NB (2000). Functional Interaction between Nucleosome Assembly Proteins and p300/CREB-Binding Protein Family Coactivators. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8933-8943.

Skiadopoulos MH, and McBride AA (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J. Virol.* **72**: 2079-2088.

Slepek TI, Webster KA, Zang J, Prentice H, O'Dowd A, Hicks MN, and Bishopric NH (2001). Control of cardiac-specific transcription by p300 through myocyte enhancer factor-2D. *J. Biol. Chem.* **276**: 7575-7585.

Smith S, and Stillman B (1991). Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*. *EMBO J.* **10**: 971-980.

Smola-Hess S, and Pfister H (2002). Interaction of papillomaviral oncoproteins with cellular factors. In: *Structure-function relationships of human pathogenic viruses*. New York, London, Dodrecht, Boston, Moscow. Kluwer Academic/ Plenum Publishers.

Smotkin D, and Wettstein FO (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmatic phosphoprotein. *J. Virol.* **61**: 1686-1689.

Somasundaram K (2000). Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front. Biosci.* **5**: D424-D437.

Spalholz BA, Yang YC, and Howley PM (1985). Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell.* **42**: 183-191.

Spalholz BA, Lambert PF, Yee CL, and Howley PM (1987). Bovine Papillomavirus Transcriptional Regulation: Localization of the E2-Responsive Elements of the Long Control Region. *J. Virol.* **61**: 2128-2137.

Spalholz BA, Vande Pol SB, and Howley PM (1991). Characterization of the *cis* Elements Involved in Basal and E2-Transactivated Expression of the Bovine Papillomavirus P₂₄₄₃ Promotor. *J. Virol.* **65**: 743-753.

Steger G, Ham J, Thierry F, and Yaniv M (1993). The E2 proteins of papillomaviruses as transcription and replication factors. In: *Virus strategies, VCH, Weinheim; Doerfler, W. and Böhm, P (ed):* 263-278.

Steger G, Ham J, and Yaniv M (1996). E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol.* **274**: 173-185.

Steger G, Ham J, Levebvre O, and Yaniv M (1995). The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J.* **14**: 329-340.

Steger G, Schnabel C, and Schmidt HM (2002). The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21^{WAF1/CIP1} promoter via interaction with Sp1. *J. Gen. Virol.* **83**: 503-510.

Steger G, and Pfister H (1992). In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch. Virol.* **125**: 355-360.

Steger G, and Corbach S (1997). Dose dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2-protein. *J. Virol.* **71**: 50-58.

Stenlund A, and Botchan MR (1990). The E2 trans-activator can act as a repressor by interfering with a cellular transcription factor. *Genes Dev.* **4**: 123-126.

Stoler M, Rhodes CR, Whitebeck A, Wolinsky SM, Chow LT, and Broker TR (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasia. *Hum. Pathol.* **23**:117-128.

Stubenrauch F, Malejczyk J, Fuchs PG, and Pfister H (1992). Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation. *J. Virol.* **66**: 3485-3493.

Stubenrauch F, and Pfister H (1994). Low-affinity E2-binding site mediates downmodulation of E2 transactivation of the human papillomavirus type 8 late promoter. *J. Virol.* **68**: 6959-6966.

Stubenrauch F, Leigh I, and Pfister H (1996). E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentration by interfering with cellular factors. *J. Virol.* **70**: 119-126.

Stubenrauch F, and Laimins LA (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Sem. Canc. Biol.* **9**: 379-386.

Stubenrauch F, Zobel T, and Iftner T (2001). The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high risk human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **75**: 4139-4149.

- Sun S, Thorner L, Lentz M, MacPherson P, and Botchan M** (1990). Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* **64**: 5093-5105.
- Tanese N** (1997). Small-scale density gradient sedimentation to separate and analyze multiprotein complexes. *Methods* **12**: 224-234.
- Taylor ER, and Morgan IM** (2003). A novel technique with enhanced detection and quantification of HPV-16 E1- and E2-mediated DNA replication. *Virology* **1**: 103-109.
- Thierry F** (1993). Proteins involved in the control of HPV transcription. *Papillomavirus Report.* **4**: 27-32.
- Thomas JT, and Laimins LA** (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J. Virol.* **72**: 1131-1137.
- Tse C, Sera T, Wolffe AP, and Hansen JC** (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 4629-4638.
- Turek LP** (1994). The structure, function, and regulation of papillomavirus genes in infection and cervical cancer. *Adv. Virus Res.* **44**: 305-356.
- Ushikai M, Lace MJ, Yamakawa Y, Kono M, Anson J, Ishiji T, Parkkinen S, Wicker N, Valentine ME, Davidson I, Turek LP, and Haugen TH** (1994). Transactivation by the full-length E2 proteins of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1 in vitro and in vivo: cooperation with activation domains of cellular transcription factors. *J. Virol.* **68**: 6655-6666.
- Ustav M, and Stenlund A** (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* **10**: 449-457.
- Vande Pol SB, and Howley PM** (1990). A Bovine Papillomavirus Constitutive Enhancer Is Negatively Regulated by the E2 Repressor through Competitive Binding for a Cellular Factor. *J. Virol.* **64**: 5420-5429.
- Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane-Robinson C, Allis CD, and Workman JL** (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* **15**: 2508-2518.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, and Munoz N** (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**: 12-19.
- Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS, and Greenblatt MS** (1999). Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene.* **18**: 211-218.

- Walter PP, Owen-Hughes TA, Côté J, and Workman JL** (1995). Stimulation of Transcription Factor Binding and Histone Displacement by Nucleosome Assembly Protein 1 and Nucleoplasmin Requires Disruption of the Histone Octamer. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6178-6187.
- Webster K, Parish J, Pandya M, Stern PL, Clarke AR, and Gaston K** (2000). The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**: 87-94.
- Wells SI, Francis DA, Karpova AY, Dowhanick JJ, Benson JD, and Howley PM** (2000). Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *EMBO J.* **19**: 5762-5771.
- Werness BA, Levine AJ, and Howley PM** (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* **248**: 76-79.
- Wilson VG, West M, Woytek K, and Rangasamy D** (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Gene.* **24**: 275-290.
- Xiao JH, Davidson I, Matthes H, Garnier JM, and Chambon P** (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**: 551-568.
- Yang YC, Okayama H, and Howley PM** (1985). Bovine papillomavirus contains multiple transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**:1030-1034.
- Yang L, Mohr I, Li R, Nottoli T, Sun S, and Botchan M** (1991). Transcription factor E2 regulates BPV-1 DNA replication in vitro by direct protein-protein interaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **LVI**: 335-46.
- Yang L, Mohr I, Clark R, and Botchan M** (1993). The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 5086-5090.
- Yao TP, Ku G, Zhou N, Scully R, and Livingston DM** (1996). The nuclear hormone receptor co-activator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 10626-10631.
- Yao JM, Breiding DE, and Androphy EJ** (1998a). Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J. Virol.* **72**: 1013-1019.
- Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernhard HU, and O'Conner MJ** (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can downregulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* **73**: 6209-6219.
- Zou N, Lin BY, Duan F, Lee KY, Jin G, Guan R, Yao G, Lefkowitz EJ, Broker TR, and Chow LT** (2000). The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localisation and nuclear matrix association. *J. Virol.* **74**: 3761-3770.

zur Hausen H, and de Villiers EM (1994). Human Papillomaviruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**: 427-447.

zur Hausen H (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 690-698.

zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer.* **5**: 342-350.

Zwerschke W, Joswig S, and Jansen-Durr P (1996). Identification of domains required for transcriptional activation and protein dimerisation in the human papillomavirus type-16 E7 protein. *Oncogene.* **12**: 213-220.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ak	Antikörper
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure, -n
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galactosidase
bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDK	zyklinabhängige Kinase
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
DBD	DNA-binde- und Dimerisierungsdomäne
Dm	Deletionsmutanten
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i>
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β-aminoethyl Ether)
et al.	und andere
FCS	Fötale Kälberserum
fl	full length
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBS	HEPES gefufferte PBS Lösung
HEMG	HEPES EDTA Mg Glycerin

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSLB	<i>High Salt Lysis Buffer</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ivt	<i>in vitro</i> translatiert/-e/-es
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCR	<i>Long Control Region</i>
LEP	<i>Luciferase Extraction Buffer</i>
LSDB	<i>Low Salt Dilution Buffer</i>
Luc	Luciferase
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
NaAc	Natriumacetat
NAP	<i>Nucleosome Assembly Protein</i>
NCR	<i>Non Coding Region</i>
NHEK	<i>Normal Human Epidermal Keratinocytes</i>
NP40	Nonidet P40
Nt	Nukleotid
Oct	<i>Organic cation transporter 1</i>
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAG	Polyacrylamid-Gel
PBF	<i>Papillomavirus Binding Factor</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
p/CAF	<i>p300/CBP Associated Factor</i>
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI	Proteaseinhibitoren
PIC	<i>Preinitiationcomplex</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
pRb	Retinoblastom-Protein
PV	Papillomvirus
RHA	<i>RNA Helicase A</i>
RLU	Relative Lumineszenz-Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	<i>Rous Sarkoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur

RUNX-1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp1	<i>Specific protein 1</i>
SV	Säulenvolumen
TAF	<i>TBP Associated Factor</i>
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TBST	Tris Buffered Saline + Tween20
TEF-1	<i>Transcriptional Enhancer Factor 1</i>
Teilabb.	Teilabbildung
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TFII(x)	<i>Transcription Factor II (x)</i>
TNS	<i>Trypsine Neutralization Solution</i>
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSB	<i>Transformation and Storage Buffer</i>
u.a.	unter anderen, -m
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
YY1	Yin Yang 1
z.B.	zum Beispiel

8. ZUSAMMENFASSUNG

Papillomviren (PV) infizieren die Basalzellen der Haut oder Schleimhaut und induzieren die Bildung gutartiger Tumoren, die abhängig vom infizierenden PV-Typ maligne entarten können. Das virale E2 Protein spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation des viralen Lebenszyklus. Es kann die virale Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren und erfüllt gemeinsam mit dem PV E1 Protein Funktionen bei der effizienten Aktivierung der viralen Replikation. Innerhalb dieser Studie wurden Wechselwirkungen des E2 Proteins mit zellulären Proteinen, die für die Aktivierung der Transkription wichtig sind, untersucht. In Vorarbeiten konnte mit Hilfe eines Yeast *two-Hybrid* Systems das humane Nucleosome Assembly Protein 1 (hNAP-1), ein Histon Chaperon, als Interaktionspartner der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsaktivators BPV1 E2 (*Bovine* PV1 E2) identifiziert werden. Diese Interaktion wurde *in vitro* in GST *pull-down* Experimenten mit den E2 Proteinen von BPV1, HPV8 (*Human* PV8) und HPV18 bestätigt. Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der Interaktion von E2 mit hNAP-1 für E2-spezifische Funktionen zu charakterisieren.

Die Wechselwirkung von hNAP-1 mit diesen drei E2 Proteinen konnte *in vivo* durch Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Interaktion direkt ist und nicht nur durch den zellulären Koaktivator p300, der E2 und hNAP-1 bindet, vermittelt wird. Durch die Koexpression von hNAP-1 wurde die E2-vermittelte Aktivierung der Transkription stark stimuliert, was auf eine Rolle dieser Wechselwirkung für die E2-spezifische Aktivator-Funktion hinweist. E2 bindet an zwei separate Regionen von hNAP-1, an eine innerhalb des C-Terminus und eine interne Region. Durch die Verwendung von hNAP-1 Deletionsmutanten wurde gefunden, dass die Interaktion von hNAP-1 mit E2 für die Kooperativität der beiden Proteine notwendig ist, dass jedoch überdies die N-terminalen 91 Aminosäuren von hNAP-1 für dessen Koaktivator-Funktion essentiell sind. Überdies konnte hier zum ersten Mal die Existenz eines ternären Komplexes bestehend aus hNAP-1, E2 und p300 *in vitro* durch ein Konkurrenzexperiment und eine Glycerolgradientanalyse gezeigt werden. Dieser ternäre Komplex scheint sehr effizient zur Aktivierung der Transkription beizutragen, denn E2, hNAP-1 und p300 kooperierten bei der Aktivierung der HPV8 Genexpression. Somit könnten sowohl p300 als auch hNAP-1 durch E2 in Promotornähe rekrutiert werden, um die PV Genexpression effizient zu aktivieren. Weiterhin interagiert auch p53, das ebenfalls p300 als Koaktivator verwendet, direkt mit hNAP-1. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass auch diese Interaktion funktional ist, da hNAP-1 die p53-vermittelte Aktivierung der Genexpression stimulieren konnte. Dagegen band TEF-1, welches p300 nicht als Koaktivator verwendet, *in vitro* nicht an hNAP-1, und in Korrelation dazu war hNAP-1 auch nicht in der Lage, die TEF-1-vermittelte Aktivierung der Transkription zu stimulieren.

9. ABSTRACT

Papillomaviruses (PV) infect the basal cells of the skin or mucosal epithelium thereby inducing benign tumors which may undergo malignant transformation dependent on the infecting PV type. The viral E2 protein plays an essential role within the regulation of the viral life cycle. It is able to activate or repress viral gene expression, and together with the PV E1 protein E2 fulfills functions in the activation of viral replication. In this study the role of the interaction of E2 with cellular proteins which are important for transcriptional activation were investigated. In previous experiments the human Nucleosome Assembly Protein 1 (hNAP-1), a histone chaperone, was identified as a protein interacting with the activation domain of the transcriptional activator BPV1 E2 (Bovine PV1 E2) by a yeast two-hybrid screen. This interaction was confirmed *in vitro* by GST pull-down experiments with the E2 proteins of BPV1, HPV8 (Human PV8) and HPV18. The aim of this study was to characterize the importance of the interaction of E2 and hNAP-1 for E2-specific functions.

The binding of hNAP-1 to these three E2 proteins was confirmed *in vivo* by coimmunoprecipitations. In addition, it was shown that the interaction is direct and not merely mediated by the cellular coactivator p300, which is bound by E2 and hNAP-1. E2-mediated activation of transcription was strongly stimulated by coexpression of hNAP-1, indicating a role of this interaction for the activator function of E2. Two separable domains of hNAP-1 are bound by E2, one within the C-terminus and an internal domain. By using hNAP-1 deletion mutants it turned out, that the binding of hNAP-1 to E2 is necessary for the cooperativity between both factors but in addition, the N-terminal 91 amino acids of hNAP-1 also are crucial for its coactivator function. Moreover, for the first time evidence for the existence of a ternary complex consisting of hNAP-1, E2 and p300 *in vitro* was provided by a competition experiment and a glycerol gradient sedimentation. This ternary complex seems to be very efficient in activation of transcription since E2, hNAP-1 and p300 cooperated in activating HPV8 gene expression. Hence, p300 and hNAP-1 as well may be recruited to the DNA by E2 to efficiently activate PV gene expression. Furthermore, p53 which also uses p300 as a coactivator, directly interacts with hNAP-1. This interaction was also shown to be functional since hNAP-1 could enhance p53-mediated activation of gene expression. In contrast, TEF-1 which does not use p300 as a coactivator did not bind to hNAP-1 *in vitro* and in correlation hNAP-1 was not able to stimulate TEF-1-mediated activation of transcription.

10. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Gertrud Steger für ihre hervorragende Betreuung in allen praktischen und theoretischen Belangen. Ihre Unterstützung durch unermüdliche Diskussionsbereitschaft und wertvolle Ratschläge hat ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Herbert Pfister danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Virologie durchgeführt haben zu können und für die kritische Diskussion meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. Karin Schnetz und Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg danke ich für ihre Bereitschaft, die vorliegende Arbeit vor dem Biologischen Fachbereich der Universität zu Köln zu vertreten.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Rolf Kaiser, der mir die Möglichkeit gab, an dem interessanten Projekt „Entwicklung von Microbalance Array/Mass Spectrometry („MAMS“) als Werkzeug für die funktionelle Proteomanalyse“ teilzunehmen. Der größte Teil meiner Arbeit wurde mit Hilfe dieses Projektes finanziert.

Mein Dank gilt ebenfalls Carsta Schnabel, Steffi Boeckle, Andreas Müller, Nadine Sichtig und Ulla Krüppel für die regen Diskussionen sowie die unübertreffbar nette Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Den Menschen, die mich begleiten – ganz besonders meinem Freund – danke ich für die ständige Unterstützung und die aufbauenden Worte und Taten in der kritischen Phase meiner Arbeit.

11. ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Herbert Pfister betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel zur Veröffentlichung eingereicht:

Rehtanz M, Schmidt HM, Warthorst U, and Steger G (2004). Direct interaction between nucleosome assembly protein 1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 24(5): 2153-68.

Köln, 28.04.04

.....
Manuela Rehtanz

12. LEBENS LAUF

Zur Person

Name	Manuela Rehtanz
Anschrift	Rolandstrasse 70, 50677 Köln
Geburtsdatum	10.06.1973
Geburtsort	Leverkusen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

Sept. 1979 – Apr. 1983	Marienschule, kath. Grundschule, Dinslaken
Mai 1983 – Juli. 1983	Otto-Willmann-Schule, Gemeinschaftsgrundschule, Voerde
Aug. 1983 – Jan. 1985	Otto-Hahn-Gymnasium Dinslaken
Feb. 1985 – Juni 1993	Städtisches Humanistisches Gymnasium, Viersen (1991 Zusammenlegung und Umbenennung in: Erasmus-von-Rotterdam-Gymnasium, Viersen) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Beruf

Juli 1993	Praktikum in der Rechtsanwaltskanzlei Heuking, Kühn & Partner, Düsseldorf
Aug. 1993 – Dez. 1994	Freie Mitarbeiterin im kaufmännischen Bereich bei MPS GmbH + Co. Betriebs-KG, Düsseldorf
Jan. 1994 – Sep. 1994	Praktikum beim Fernsprechbuch-Verlag Schwann KG, Düsseldorf
Okt. 1994 – Nov. 1999	Hochschulstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Studiengang: Diplom-Biologie Hauptfach: Genetik 1.Nebenfach: Entwicklungsbiologie 2.Nebenfach: Biochemie Abschluss: Diplom-Biologin
Jan. 2000 – Juli 2004	Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Experimentelle Arbeit im Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln, Arbeitsgruppe Dr. G. Steger Betreuer: Prof. Dr. Herbert Pfister

Veröffentlichungen

Steger G, Rehtanz M and Schnabel C (2001). Identification of a promoter in position 56 within the long control region of human papillomavirus type 18. *Arch Virol.* **146**: 2069-2084.

Rehtanz M, Schmidt HM, Warthorst U and Steger G (2004). Direct interaction between nucleosome assembly protein-1 and the papillomavirus E2 proteins involved in activation of transcription. *Mol Cell Biol.* **24**(5): 2153-2168.