

**Das E6-Onkoprotein humaner Papillomviren und seine
Wechselwirkung mit E6AP als Zielstruktur für eine molekulare
Therapie zervikaler Karzinome**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Petric Kuballa

aus Lünen an der Lippe

Köln, 2004

Berichtersteller: Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Prof. Dr. Martin Scheffner

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 4.2.2005

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Scheffner für die Bereitstellung des Themas, die intensive Betreuung und seine Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen möchte ich mich für die Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich Dr. Arnd Hengstermann, Konstantin Matentzoglu und Stefanie Lang für ihre tatkräftige Unterstützung beim Verfassen bzw. beim Erstellen dieser Arbeit; Dr. Sandra Glockzin, Ulrike Kogel, Dr. Laëtitia Linares, Dr. Birgit Keck, Michael D´Silva und Rajesh Singh für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei Dr. Noel J. Whitaker für die Durchführung der *in vitro* Immortalisierungsassays und die gute Kooperation bedanken.

Den Mitgliedern meines real existierenden Soziallebens danke ich für die Unterstützung und die Leidenschaft in den letzten bzw. in all den Jahren. Mein besonderer Dank gilt dabei: meinen Eltern, Anke, Christian, Henrik, Henni und Muna.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Papillomviren	1
1.1.1	Das Virus	1
1.1.2	Humane Papillomviren und Gebärmutterhalskrebs	2
1.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	3
1.3	Die HPV Onkogene E6 und E7	4
1.3.1	E7	4
1.3.2	E6	5
1.3.2.1	Transformation	5
1.3.2.2	p53	6
1.3.2.2.1	Biologie und Regulation	6
1.3.2.2.2	Wechselwirkung mit HPV E6	8
1.3.2.3	E6AP	9
1.3.2.4	PDZ-Proteine	10
1.4	Ansätze für eine molekulare Therapie von Zervixkarzinomen	15
1.4.1	E6 als Zielstruktur	15
1.4.2	E6-Bindepeptide	15
1.5	Effektive Einbringung von Peptiden in Zellen: Protein Transduktion	17
1.6	Ziele dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Wachstumsplatten	20
2.1.2	Zellen	21
2.1.2.1	Bakterienstämme	21
2.1.2.2	Hefestämme	21
2.1.2.3	Humane Zelllinien	21
2.1.2.4	Maus-Zelllinien	22
2.1.3	Antikörper	22
2.1.4	Längenstandards	22
2.1.5	Zur Klonierung verwendete Ausgangsplasmide	23
2.1.6	Verwendete DNA-Konstrukte	23

2.1.6.1	pGEX-Konstrukte	23
2.1.6.2	Hefevektoren	24
2.1.6.3	pRc/CMV-Konstrukte	24
2.1.6.4	pCDNA3-Konstrukte	24
2.1.6.5	Weitere Konstrukte	25
2.1.7	Klonierte DNA-Konstrukte	25
2.1.7.1	pGEX-Konstrukte	25
2.1.7.2	pCDNA3-DHFR-HA-Ubiquitin-HA-Konstrukte	25
2.1.7.3	pLXSN-Konstrukte	26
2.1.7.4	pAD-Konstrukte	27
2.1.7.5	pET16b-Konstrukte	27
2.1.7.6	Andere Konstrukte	27
2.1.8	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Klonierung	28
2.1.9	Synthetische RNAs für die 'RNA-Interference'	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	Kultivierung von Zellen	30
2.2.1.1	Kultivierung und Gefrierlagerung von <i>E. coli</i> Bakterien	30
2.2.1.2	Kultivierung und Gefrierlagerung von <i>S. cerevisiae</i>	30
2.2.1.3	Kultivierung und Gefrierlagerung von eukaryontischen Zellen	31
2.2.2	Präparation und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA	31
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.2.3.1	PCR zur Generierung neuer DNA-Konstrukte	32
2.2.3.2	Mutagenisierende PCR	32
2.2.4	Analyse und Klonierung von DNA	32
2.2.4.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	32
2.2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.4.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.4.4	Ligation	33
2.2.4.5	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	33
2.2.4.6	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen (Elektroporation)	34
2.2.4.7	DNA-Sequenzierung	34

2.2.5	Proteinexpression- und aufreinigung	34
2.2.5.1	<i>In vitro</i> Translation	34
2.2.5.2	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	35
2.2.5.3	Expression von His-tag-Proteinen in <i>E. coli</i>	35
2.2.5.4	Aufreinigung von Proteinen	35
2.2.5.4.1	Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen	35
2.2.5.4.2	Säulenchromatographische Affinitätsreinigung von His-tag-Proteinen	36
2.2.5.4.3	Umpufferung mittels Säulenchromatographie	37
2.2.6	Analyse von Proteinen	37
2.2.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.6.3	Coomassie Blau Färbung	38
2.2.6.4	Fluorographie	38
2.2.6.5	Western Blot/ECL	38
2.2.6.6	Angleichung der Proteinmengen der verwendeten GST-E6-Fusionsproteine	39
2.2.7	<i>In vitro</i> -Assays	40
2.2.7.1	GST-Kopräzipitationsassays	40
2.2.7.2	<i>In vitro</i> -Ubiquitinierungsassays	40
2.2.8	Yeast Two Hybrid (YTH)	41
2.2.8.1	Transformation der pPC97-Konstrukte	41
2.2.8.2	Transformation der pAD-Konstrukte und Replika-Charakterisierung	41
2.2.8.3	<i>In vivo</i> Rekombination	41
2.2.8.4	Bestimmung der Transformationseffizienz	42
2.2.8.5	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	43
2.2.9	<i>In vitro</i> Zellkultur (' <i>in vivo</i> ' Untersuchungen)	43
2.2.9.1	Transiente Transfektion	43
2.2.9.2	Transfektion zur Erzeugung stabil exprimierender Zellpopulationen	44
2.2.9.3	Halbwertszeitmessungen mit Hilfe von Cycloheximid	44
2.2.9.4	Stabilisierung von Proteinen, die über das 26S Proteasom degradiert werden	45
2.2.9.5	' <i>In vivo</i> ' Ubiquitinierungsassays	45
2.2.9.6	'RNA Interference'	46

2.2.9.7	Immunpräzipitation von E6AP	47
2.2.9.8	Protein Transduktion	47
2.2.9.9	Fluoreszenzmikroskopie	48
2.2.9.10	Erzeugung von Retrovirus-produzierenden Zellen	48
2.2.9.11	Virustiter	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Generierung der E6 Mutanten	50
3.2	Wechselwirkungen von HPV E6 mit rDlg und Scribble <i>in vitro</i> und in transienten Transfektionsexperimenten	53
3.2.1	Kopräzipitation und Ubiquitinierung von rDlg durch HPV E6 <i>in vitro</i>	53
3.2.2	Kopräzipitation und Ubiquitinierung von Scribble durch HPV E6 <i>in vitro</i>	57
3.2.3	Transiente Koexpressionen von Scribble, rDlg und HPV E6 in H1299 Zellen	58
3.2.4	' <i>In vivo</i> ' Ubiquitinierung von rDlg und Scribble in transienten Expressionen	59
3.2.5	Transiente Koexpression von Scribble, 18E6 und E6AP in H1299 Zellen	60
3.2.6	Einfluss der Koexpression von wt-E6AP und mutierten Formen auf den Abbau von rDlg durch HPV18 E6 in transienten Transfektionsexperimenten	62
3.2.7	rDlg und p53 bei transienter Koexpressionen von HPV E6 Konstrukten	64
3.3	Untersuchungen zum Einfluss von E6AP auf den E6-vermittelten Abbau von rDlg in E6AP 'knock out' Mausfibroblasten	67
3.3.1	Transiente Koexpressionen von rDlg, p53, E6 und E6AP in E6AP -/- MEFs	67
3.3.2	Verhalten der E6 Chimären 11C18 und 45/47/49C18 in E6AP -/- MEFs	69
3.4	Untersuchungen zum Einfluss von E6 und E6AP auf die Proteinmengen von endogenem hDlg und Scribble in HeLa Zellen	71
3.4.1	Stabilitätsuntersuchungen für endogenes hDlg und Scribble	71
3.4.2	Untersuchungen zur Stabilität von endogenem hDlg und Scribble mittels RNA Interference (RNAi)	74
3.4.3	Vektorbasierte RNAi in den p53 'knock down' Zellen HeLa A1 und C2	76

3.5	<i>In vitro</i> Immortalisierung von primären Keratinozyten	79
3.6	Der E6/E6AP-Komplex als Ansatz für eine molekulare Therapie von HPV-assoziierten Karzinomen des Gebärmutterhalses: E6-Bindepeptide	82
3.6.1	Charakterisierung und Optimierung der Wechselwirkung von e6bp1 mit HPV16 E6 in <i>S. cerevisiae</i> (Yeast-Two-Hybrid-System)	83
3.6.2	ARG7-Fusionskonstrukte: Protein Transduktion	88
4	Diskussion	97
4.1	Biochemische Funktionen der E6 Mutanten. E6AP als einzige zelluläre Ligase, die von E6 rekrutiert werden kann ?	97
4.1.1	Die Wechselwirkung von p53, E6AP, rDlg und hScrib mit den E6 Mutanten <i>in vitro</i>	97
4.1.2	Transiente Transfektionsexperimente	99
4.1.2.1	Scribble	99
4.1.2.2	rDlg	100
4.1.2.3	Der Abbau von rDlg, aber nicht p53, durch E6 Mutanten, die mit E6AP <i>in vitro</i> nicht stabil interagieren	102
4.1.2.4	Die Wechselwirkung von 'low risk' E6 mit E6AP	103
4.1.3	Untersuchungen zu endogenem Scribble und hDlg in HeLa Zellen	104
4.1.3.1	Scribble	104
4.1.3.2	hDlg	105
4.2	Immortalisierung von primären Keratinozyten	106
4.2.1	Wildtyp E6 Proteine	107
4.2.2	Funktion des C-Terminus von E6 in der Immortalisierung	107
4.2.3	Wie wichtig ist p53 ?	109
4.3	E6-Bindepeptide und Protein Transduktion	110
4.3.1	Mutationsanalyse von e6bp1	110
4.3.2	Zellpenetrierende Peptide und Protein Transduktion	112
5	Literaturverzeichnis	115
6	Zusammenfassung	132
7	Abstract	133
8	Erklärung	134
9	Lebenslauf	135

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin; Alanin	m	milli
AS	Aminosäure(n)	mA	Milli-Ampere
Abb.	Abbildung	MCS	Multiple cloning site
ATP	Adenosyltriphosphat	μ	mikro
bp	Basenpaare	min	Minute(n)
bzw.	beziehungsweise	mRNA	messenger RNA
c	centi	Ω	Ohm
C	Cytosin; Cystein	Or.	Orientierung
°C	Grad Celsius	PVDF	Polyvinyliden Fluorid
cDNA	complementary DNA	r	Rattus Norvegicus
d.h.	das heißt	RNA	Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	rpm	rounds per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RS	Restriktionsschnittstelle
DTT	Dithiothreitol	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	s	Sekunde(n)
F	Farad	S	Svedberg; Serin
FCS	Fetal calf serum	[³⁵ S]	radioaktives Schwefel-Isotop
G	Guanin; Glycin	SDS	Natriumdodekylsulfat
g	Erdbeschleunigung; Gramm	s.o.	siehe oben
Gal	Galaktosidase	s.u.	siehe unten
GSH	Gluthation (reduzierte Form)	T	Thymin; Threonin
GST	Gluthation-S-Transferase	™	Eingetragenes Warenzeichen
h	Stunde(n); human	Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
HA	Häm-Agglutinin	U	unit(s)
IgG	Immunglobulin	u.a.	unter anderem
inkl.	inklusive	ÜN	über Nacht
' <i>in vivo</i> '	<i>in vitro</i> Zellkultur	UV	Ultraviolett
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid	V	Volt; Volumen
kb	Kilobasen	vgl.	vergleiche
kDa	Kilodalton	w	Gewicht
l	Liter	wt	Wildtyp
M	molar (mol / l)	YTH	Yeast Two Hybrid
		z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Papillomviren

1.1.1 Das Virus

Papillomviren gehören zur Familie der Papovaviridae und verursachen nach erfolgreicher Infektion beim Menschen und zahlreichen Wirbeltieren Hautwarzen (Papillome). Sie besitzen eine hohe Wirts- und Gewebespezifität, so dass sie in der Regel nur Gewebe epithelialen Ursprungs infizieren. Während die Infektion in den undifferenzierten Basalzellen eines Epithels erfolgt, ist die Replikation nur in ausdifferenzierten Keratinozyten möglich (zur Hausen, 2002). Man unterscheidet dabei zwei Hauptorte der klinischen Manifestation, die mit bestimmten Typen von Papillomviren korreliert werden können: kutanes und muköses Gewebe.

Alle Papillomviren verfügen über ein kovalent geschlossenes, zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 8kb Größe, welches in Assoziation mit zellulären Histonproteinen in Chromatinform vorliegt. Das Genom kann in zwei Bereiche eingeteilt werden, wobei eine Region für die früh im Vermehrungszyklus gebildeten Regulatorproteine (E1, E2, E4, E5, E6 und E7) kodiert und die andere Region die Gene für die spät synthetisierten Capsidproteine (L1 und L2) umfasst (Abb. 1).

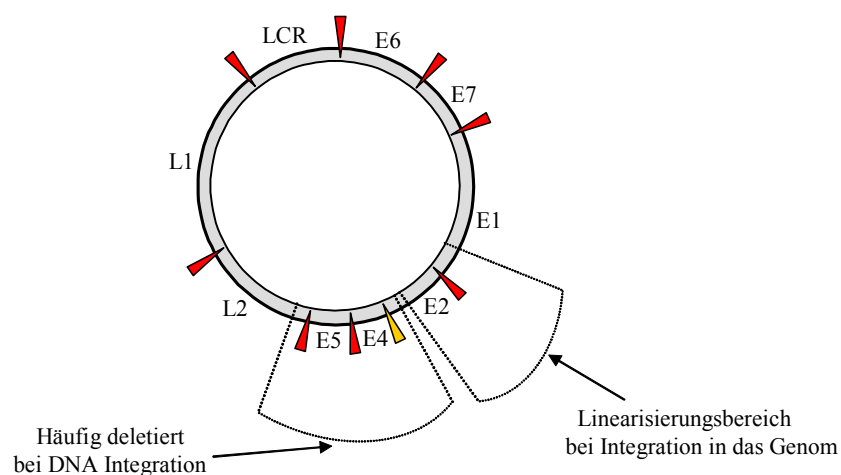


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der zirkulären DNA von HPV. E, frühe Proteine (Early). L, Capsidproteine (Late). Rote Dreiecke, Ende der cDNA für das angegebene Protein. Gelbes Dreieck, Stopp für eine Form von E2, aber nicht für eine zweite, längere Form. LCR, Lange Kontrollregion (Long control region).

1.1.2 Humane Papillomviren und Gebärmutterhalskrebs

Mittlerweile sind weit mehr als 100 humane Papillomviren (HPVs) identifiziert worden, wobei ein Virus als neuer Typ gilt, wenn die Gensequenzen für E6, E7 und L1 (vgl. Abb.1) weniger als 90 % mit denen bereits bekannter Typen übereinstimmen (de Villiers, 1994; Chan *et al.*, 1995). Ungefähr 30 HPV-Typen sind mit Läsionen des Anogenitaltrakts assoziiert. Diese HPVs können in 'low risk' und 'high risk' Typen unterteilt werden. Dabei lassen sich 'low risk' HPV-Typen in Warzen und gutartigen Läsionen nachweisen, während 'high risk' HPV-Typen mit malignen Läsionen assoziiert sind. So korreliert eine Infektion mit 'high risk' HPV-Typen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom). In über 99 % aller Zervixkarzinom-Biopsien konnte 'high risk' HPV-DNA, am häufigsten der Typen 16 und 18, nachgewiesen werden (Walboomers *et al.*, 1999; Stoler, 2000). Dabei lag fast immer wenigstens eine Kopie des Virusgenoms stabil in das zelluläre Genom integriert vor.

Bei Untersuchungen zum Transkriptions- und Expressionsmuster viraler Gene in den malignen Zellen war nur die Transkription und Translation der viralen Gene E6 und E7 ausnahmslos nachweisbar (Schwarz *et al.*, 1985). Den viralen Proteinen E6 und E7 scheint somit eine entscheidende Rolle in der HPV-induzierten Karzinogenese zuzukommen. Tatsächlich konnten für E6 und E7 onkogene Eigenschaften nachgewiesen werden, die zudem kooperativer Art zu sein scheinen. So wirkten in Studien zur HPV-vermittelten *in vitro* Immortalisierung von primären undifferenzierten Keratinozyten, den natürlichen HPV-Wirtszellen, nur 'high risk' HPV Typen immortalisierend. Im Gegensatz zu anderen HPV-kodierten Proteinen war dabei die Expression von E6 und E7 essentiell (Woodworth *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989). In einer vereinfachten Darstellung induziert E7 eine Hyperproliferation infizierter Zellen, die in Abwesenheit von E6 in letzter Konsequenz zu einem Zelltod durch Apoptose führt (Jones *et al.*, 1997). In Anwesenheit von E6 erfolgt hingegen keine Apoptose, so dass E7 eine antiapoptotische Wirkung von E6 'benötigt', um Zellen effektiv transformieren zu können.

Die biochemische Charakterisierung von E6 und E7 zeigte, dass beide viralen Proteine mit zellulären Proteinen wechselwirken können, die einen negativen Einfluss auf Zellzyklus bzw. Zellwachstum besitzen. Am besten untersucht ist dabei die Interaktion von E7 mit Mitgliedern der p110^{RB} Protein Familie (kurz: pRB; RB= Retinoblastoma) und von E6 mit dem Tumorsuppressor p53. In beiden Fällen wird ein Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System induziert (Boyer *et al.*, 1996; Scheffner *et al.*, 1990).

1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System besitzt eine essentielle Rolle für eukaryontische Zellen, da es in eine Vielzahl von fundamentalen Prozessen involviert ist. So erfolgt sowohl eine Beseitigung mißgefalteter Proteine als auch eine Regulation von Proteinen, die an Zellzyklus, Zellteilung, DNA-Reparatur, Immunantwort und anderen Prozessen beteiligt sind (Ciechanover *et al.*, 2004).

Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die kovalente Bindung von Ketten, die aus dem Protein Ubiquitin gebildet werden, an das entsprechende Substrat. Diese Polyubiquitinierung dient als Abbausignal und führt im zweiten Schritt zur Degradation des Substrats durch das 26S Proteasom. Bei Ubiquitin handelt es sich um ein 76 Aminosäure umfassendes Protein, das in allen eukaryontischen Zellen vorzufinden ist und zu den am stärksten konservierten eukaryontischen Proteinen zählt. Um Ketten von Ubiquitin an ein Substrat zu binden, ist ein mehrstufiger Prozess notwendig (Weissman, 2001) (Abb. 2).

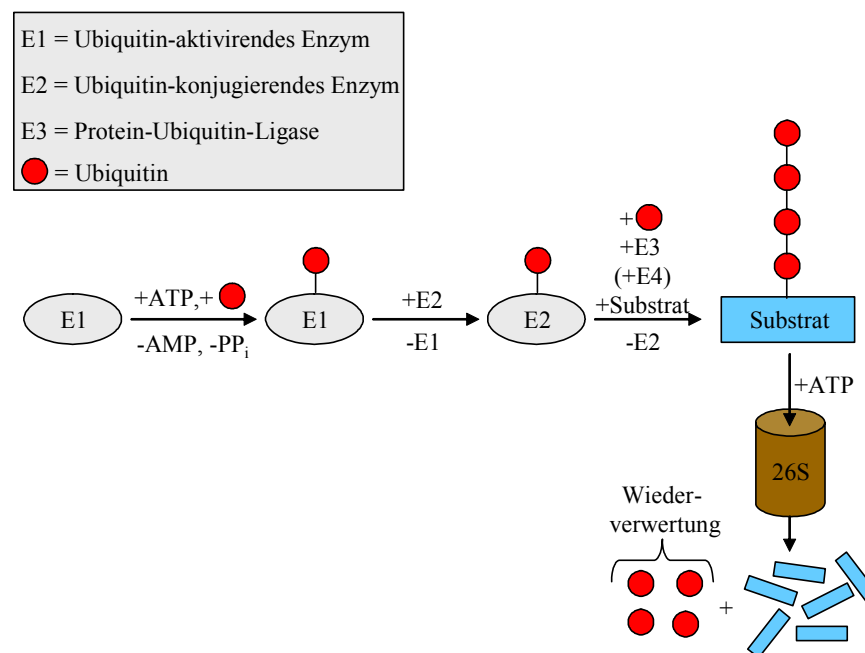


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Ubiquitin wird zunächst ATP-abhängig an E1 gebunden und so aktiviert (energiereiche Thioster-Bindung). Nach einer Übertragung auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) erfolgt in einem weiteren Schritt der Transfer von Ubiquitin auf das entsprechende Substrat. Dieser Schritt wird von einer Protein-Ubiquitin-Ligase (E3) vermittelt und erfordert möglicherweise zusätzliche Kofaktoren, sogenannte E4s. Als Endprodukt dieser Kaskade entsteht ein polyubiquitiniertes Substrat, welches vom Proteasom (26S) 'erkannt' und in Peptidfragmente gespalten wird. Dabei entstehende freie Ubiquitin-Moleküle können von der Zelle wiederverwertet werden. ATP, Adenosyltriphosphat. AMP, Adenosylmonophosphat. PP_i, Pyrophosphat.

In einem ersten Schritt wird unter ATP-Verbrauch ein Thioester zwischen dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) und dem C-terminal endständigem Glycin (G76) von Ubiquitin gebildet. Das so aktivierte Ubiquitin wird in einem zweiten Schritt auf einen Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen. Der dritte Schritt, die Übertragung des Ubiquitins auf das Substrat, wird durch eine Protein-Ubiquitin-Ligase (E3) vermittelt. In einigen Fällen sind möglicherweise zusätzliche Faktoren notwendig, die als E4 bezeichnet werden (Koegl *et al.*, 1999). Da Ubiquitin selbst als Substrat der kovalenten Ubiquitin-Anheftung dient, entstehen somit Ubiquitinketten. Ob diese Ketten am Substrat gebildet werden oder aber Ubiquitinketten als Ganzes auf das Substrat übertragen werden, ist bisher nicht bekannt. Ein mit einer Polyubiquitinkette modifiziertes Substrat wird vom 26S-Proteasom 'erkannt' und gespalten, wobei Peptidfragmente entstehen. Die Polyubiquitinkette wird dabei nur in seine Einzelbestandteile (Monoubiquitin) 'zerlegt', was eine Wiederverwertung der freien Ubiquitinmoleküle ermöglicht.

1.3 Die HPV Onkogene E6 und E7

1.3.1 E7

Die E7 Proteine von 'high risk' HPV-Typen umfassen ungefähr 100 Aminosäuren und weisen primär eine nukleäre Lokalisation auf (Greenfield *et al.*, 1991; Guccione *et al.*, 2002). Eine Hauptfunktion von E7 scheint seine Wechselwirkung mit pRB zu sein (Munger *et al.*, 1989; Dyson *et al.*, 1989). Die pRB Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Fortschreitens des Zellzyklus von der G₀/G₁- in die S-Phase. So bindet pRB in einem hypophosphorylierten Zustand an Transkriptionsfaktoren der E2F/DP Familie und unterbindet dadurch die Transkription einer Vielzahl von Genen, die für die DNA-Synthese benötigt werden. Dadurch wird der Eintritt in die S-Phase verhindert (Dyson, 1998; Bracken *et al.*, 2004). E7 ist in der Lage, an hypophosphoryliertes pRB zu binden (Dyson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989) und die Degradation von pRB zu vermitteln (Boyer *et al.*, 1996). Beide E7-Aktivitäten (Bindung an pRB und Abbau von pRB) interferieren mit der Bindung von pRB an die E2F Transkriptionsfaktoren, was ein Fortschreiten des Zellzyklus bewirkt, da nun Transkription E2F-abhängiger Gene und folglich DNA-Synthese erfolgen. Weitere Funktionen von E7, die nicht die

Wechselwirkung mit pRB betreffen, sind beschrieben, aber bisher in geringerem Ausmaß charakterisiert und verstanden (zur Hausen, 2000; Chakrabarti und Krishna, 2003).

1.3.2 E6

1.3.2.1 Transformation

'High risk' E6 Proteine bestehen aus ungefähr 150 Aminosäuren und besitzen zwei Zinkfinger-Motive (Abb. 3), deren Integrität essentiell für die Funktionalität von E6 Proteinen ist (Mantovani und Banks, 2001).

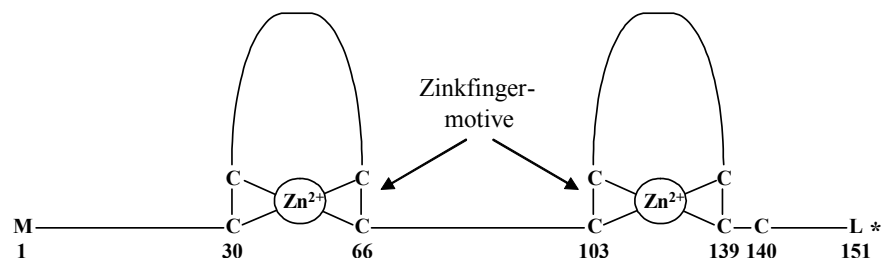


Abb. 3: Schematischer Aufbau von HPV16 E6. Die Angabe von Aminosäuren erfolgt im Einbuchstabencode. Zn^{2+} , 2-fach positiv geladenes Zink-Ion. *, Stopcodon.

Für E6 konnte gezeigt werden, dass seine alleinige Expression ausreicht, um eine Reihe von verschiedenen Epithelzellen zu immortalisieren (Kiyono *et al.*, 1998; Jarrard *et al.*, 1999). Durch E6-Mutationsanalysen konnte die E6-vermittelte Immortalisierung von Epithelzellen mit definierten Effekten bzw. Substraten korreliert werden. Die meisten dieser Daten wurden für Brustepithelzellen (MECs, Mammary epithelial cells) beschrieben. In diesem System wurde zuerst gezeigt, dass die Fähigkeit p53 abzubauen notwendig ist, um eine Immortalisierung von MECs zu erreichen (Dalal *et al.*, 1996). Mittlerweile wurde beschrieben, dass zusätzlich die Fähigkeit das Enzym Telomerase zu aktivieren, eine Interaktion mit hADA3 und der Abbau von E6TP1 mit der E6-vermittelten Immortalisierung von MECs korrelieren (Kiyono *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2002).

Als bestes System für die Untersuchung onkogener Eigenschaften von HPV gilt allerdings die *in vitro* Immortalisierung von undifferenzierten Keratinozyten. Zellen, die auf diese

Weise durch 'high risk' E6 und E7 immortalisiert wurden (vgl. 1.1.2), besitzen *per se* keine Tumor-induzierenden Eigenschaften in immundefizienten Mäusen. Erst durch zusätzliche transformierende Ereignisse, d.h. die zusätzliche Expression aktivierter Onkogene (DiPaolo *et al.*, 1989; Dürst *et al.*, 1989) oder eine intensive Passagierung der Zellen (Hurlin *et al.*, 1991), erfolgt eine vollständige Transformation. Gerade die Notwendigkeit zusätzlicher Ereignisse bzw. die lange Zeit bis zur Erlangung transformierender Eigenschaften reflektieren dabei sehr gut die lange Latenzzeit zwischen einer HPV Infektion und der Entstehung maligner bzw. invasiver Tumoren. Ein Vergleich von, mit E6, E7 oder E6 und E7 (E6/E7) immortalisierten Keratinozyten zeigte für die CD95-vermittelte Apoptose eine sehr hohe Sensitivität in E7, eine geringe Sensitivität in E6 und fast keine Sensitivität in E6/E7 immortalisierten Zellen (Aguilar-Lemarrooy *et al.*, 2002). Zudem wurde im Zuge dieser Untersuchungen eine Korrelation der Apoptose-Sensitivität mit der Stabilisierung von aktivem p53 beschrieben. Die Stabilisierung von p53 in E7-exprimierenden Zellen ist zudem schon lange bekannt (Demers *et al.*, 1994). Somit scheint der E6-vermittelte Abbau von p53 einen wichtigen Teil der anti-apoptotischen Wirkung von E6 darzustellen (vgl. 1.1.2). Zudem liegt im Gegensatz zu einer Vielzahl humaner Tumoren in Zervixkarzinomen nur selten mutiertes bzw. inaktives p53 vor (Hainaut *et al.*, 1998). Der E6-vermittelte Abbau von p53 wird deshalb als ein Pendant zur Mutation von p53 angesehen bzw. diskutiert.

1.3.2.2 p53

1.3.2.2.1 Biologie und Regulation

Das Tumorsuppressorprotein p53 besitzt eine fundamentale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Integrität des zellulären Genoms (Morris, 2002). Transgene Mäuse, die mutierte Formen oder gar kein p53 exprimieren, zeigen eine weitgehend normale Entwicklung, aber mit großer Häufigkeit bilden sie schon in frühen Lebensphasen unterschiedliche Krebsarten aus (Ko und Pirves, 1996). Tatsächlich sind p53 selbst oder Funktionswege von p53 in der großen Mehrheit aller beim Menschen auftretenden Krebsarten betroffen (Olivier *et al.*, 2004). Unter normalen Wachstumsbedingungen sind nur geringe Mengen an p53 nachweisbar, so dass p53 unter diesen Bedingungen vermutlich keinen Einfluss auf Zellzyklus oder Vitalität einer Zelle ausübt. Die

beschriebenen Halbwertszeiten von p53 liegen in diesen Fällen zwischen 10 bis 15 Minuten in Nagetier-Fibroblasten und 2 bis 4 Stunden in humanen Keratinozyten (Scheffner, 1998). Die Regulation der Proteinstabilität von p53 stellt sehr wahrscheinlich den Hauptfaktor für die Steuerung der Proteinmenge an p53 dar (Levine, 1997; Oren, 1999; Ashcroft und Vousden, 1999). P53 wird durch die Ubiquitin-Ligase Mdm2 polyubiquitiniert und einem Abbau durch das Proteasom zugeführt (Yang *et al.*, 2004). Wird die Proteinmenge an Mdm2 mittels 'RNA Interference' deutlich reduziert, ist ein drastischer Anstieg an p53 zu beobachten (Linares *et al.*, 2003). Weiterhin ist bekannt, dass bei Mdm2 'knock out' Mäusen eine frühe embryonale Letalität zu beobachten ist, die durch die zusätzliche Inaktivierung von p53 aufgehoben werden kann (Jones *et al.*, 1995; Montes de Oca Luna *et al.*, 1995). Mdm2 gilt unter anderem deswegen als Hauptregulatorprotein von p53 in 'normalen' Zellen. In jüngster Zeit wurden zwei weitere Proteine beschrieben, die die Proteinmenge an p53 über Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System regulieren können. Eine mögliche physiologische Relevanz dieser Beobachtungen ist allerdings noch nicht gesichert (Corcoran *et al.*, 2004).

Wird das 'normale' Wachstum von Zellen durch Stress-Stimuli, wie Hitze-Schock, DNA-Schäden, Hypoxie, aktivierte zelluläre oder virale Onkogene (z.B. HPV E7) etc. (Oren, 1999; May und May, 1999; Jimenez *et al.*, 1999) gestört, erfolgt eine Aktivierung der Eigenschaften von p53. Die damit verbundene starke Erhöhung der intrazellulären Menge an p53 kann unter bestimmten Umständen für die Aktivierung von p53 ausreichen (Chen *et al.*, 1996). Allerdings scheint die reine Erhöhung der p53-Menge in den meisten Fällen nicht für die Aktivierung auszureichen, so dass weitere Modifizierungen wie z.B. eine Phosphorylierung oder Acetylierung von p53 notwendig sind, um eine vollständige Aktivierung zu bewirken (Bode und Dong, 2004). Zudem scheint eine Acetylierung von p53 ein wichtiger Faktor zu sein, um dem Mdm2-vermittelten Abbau zu entgehen (Ito *et al.*, 2001). Allerdings ist p53 auch in der Lage, die Menge an Mdm2 durch Transaktivierung zu steigern (s.u.). Somit ergibt sich ein Szenario, in dem sich p53 und Mdm2 gegenseitig regulieren (p53-Mdm2-*feedback-loop*; Oren, 1999).

Eine Aktivierung von p53 führt zu einer starken Anreicherung von p53 im Zellkern, wo es einen homo-tetrameren Komplex bildet und in dieser Form als Transkriptionsfaktor wirken kann (Friedman *et al.*, 1993; Bode und Dong, 2004). Dabei bindet p53 an eine spezifische DNA-Doppelstrang-Sequenz (el-Deiry *et al.*, 1992), was zu einer Transaktivierung der Zielgene, unter anderem auch des negativen p53-Regulators Mdm2, führt. Unabhängig von seiner sequenzspezifischen DNA-Bindung kann p53 aber auch

bestimmte Gene, eventuell durch Bindung an das TATA bindende Protein TBP, reprimieren (Seto *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2002). In letzter Instanz ist ein reversibler oder irreversibler Zellzyklusarrest oder ein programmierter Zelltod durch Apoptose zu beobachten. Auf die Weise können Entartung und unkontrollierte Proliferation der betroffenen Zelle verhindert werden.

1.3.2.2 Wechselwirkung mit HPV E6

Sowohl für 'low risk' als auch 'high risk' E6 Proteine wurde eine Bindung an p53 beschrieben, wobei die Affinität von 'low risk' E6 Proteinen zu p53 wesentlich geringer ist als die von 'high risk' E6 (Crook *et al.*, 1991; Li und Coffino, 1996). Nur im Falle von 'high risk' E6 Proteinen wird zudem ein Abbau von p53 über das Ubiquitin-Proteasom-System induziert.

Im Rahmen der Erforschung des E6-vermittelten Abbaus von p53 konnte ein essentieller zellulärer Kofaktor identifiziert werden, der als E6AP (E6 assoziiertes Protein) bezeichnet wurde (Huibregtse *et al.*, 1991 und 1993) und die Funktion einer Protein-Ubiquitin-Ligase besitzt (Scheffner *et al.*, 1993). Während 'high risk' E6 Proteine an E6AP binden können, ist für 'low risk' E6 Proteine keine stabile Interaktion mit E6AP nachweisbar (Huibregtse *et al.*, 1993). In E6AP 'knock out' Mausfibroblasten erfolgt kein E6-vermittelter Abbau von p53 (Cooper *et al.*, 2003). Zudem scheint E6AP in Abwesenheit von E6 keinen Einfluss auf die Stabilität von p53 'in vivo' zu besitzen (Talis *et al.*, 1998). Somit scheinen 'high risk' E6 Proteine die zelluläre Ligase E6AP zu 'rekrutieren', um einen Abbau von p53 zu bewirken.

Der E6AP-abhängige Abbau von p53 durch 'high risk' E6 Proteine konnte *in vitro* rekonstituiert und folglich der Abbau-Mechanismus auf biochemischer Ebene sehr gut charakterisiert werden (Scheffner *et al.*, 1993 und 1994). So bindet in einem ersten Schritt E6 an E6AP. Der so gebildete E6/E6AP Komplex bindet anschließend an p53 und leitet in Gegenwart von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen, die funktionell mit E6AP interagieren können, eine E6AP-vermittelte Ubiquitinierung von p53 ein. Polyubiquitiniertes p53 wird vom Proteasom 'erkannt' und abgebaut.

In HPV-positiven Zellen ergeben sich prinzipiell zwei Kontrollmechanismen für die p53-Stabilität: der Mdm2- und der E6/E6AP-vermittelte Abbau von p53. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien, die aus HPV-assoziierten Zervixkarzinom-

Biopsien gewonnen wurden, der Mdm2-vermittelte Abbau von p53 inaktiv ist und die Proteinmenge an p53 ausschließlich von E6 reguliert wird (Hengstermann *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass p53 nur noch mittels des E6/E6AP-Komplexes degradiert wird, könnte von entscheidender Relevanz für die Entwicklung molekularer Ansätze in der Behandlung HPV-assoziiierter Karzinome sein (vgl. 1.4).

1.3.2.3 E6AP

E6AP wurde ursprünglich als zelluläres Protein isoliert und identifiziert, welches an 'high risk' E6 Proteine bindet und für die effiziente Wechselwirkung von E6 mit p53 benötigt wird, wobei E6AP als Ubiquitin-Ligase fungiert (vgl. 1.3.2.2). E6AP diente als Namensgeber für eine Klasse von Ubiquitin-Ligasen, die Ähnlichkeiten zu Struktur und Funktion von E6AP aufweisen. Charakteristisch ist dabei der konservierte, katalytisch aktive C-terminale Bereich von E6AP. Folglich werden die entsprechenden Proteine als HECT-Ligasen bezeichnet (HECT = Homologous to E6AP C-Terminus, vgl. Abb. 4, Huibregtse *et al.*, 1995).

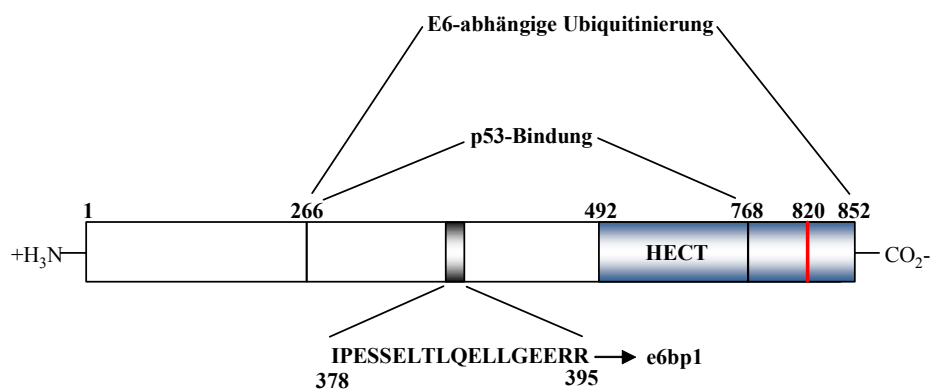


Abb. 4: Schematischer Aufbau von E6AP (wt-E6AP) und seine bekannten funktionellen Bereiche. Der für die Bindung an E6 essentielle Bereich ist grau unterlegt; die korrespondierende Aminosäuresequenz, aus der sich das erste beschriebene E6-Bindepeptid e6bp1 (E6 binding peptide 1) ableitet, ist im Einbuchstabencode angegeben. Die beiden Bereiche, die eine Bindung an p53 und die E6-abhängige Ubiquitinierung vermitteln, sind gezeigt. Die katalytische HECT-Domäne ist blau unterlegt und der katalytisch aktive Cystein-Rest an der Position 820 rot hervorgehoben. Eine Substitution des Cystein-Restes 820 gegen Alanin bewirkt einen Verlust der Ligaseaktivität von E6AP (820A-E6AP). Werden die Aminosäuren 378 bis 395 deletiert, ergibt sich eine Mutante von E6AP, die nicht mehr an 'high risk' E6 Proteine binden kann (Δ bs-E6AP). Die Aminosäure-Positionen entsprechen der Isoform I von E6AP (Yamamoto *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zum C-Terminus sind die N-terminalen Bereiche verschiedener HECT-Ligasen sehr unterschiedlich, was die Vermutung nahe legt, dass die variablen N-Termini für die unterschiedlichen Substrat-Spezifitäten verantwortlich sind (Schwarz *et al.*, 1998). Mutationen im Gen für E6AP, die zu einer Inaktivierung der Ligaseaktivität von E6AP führen, sind mit dem Angelman-Syndrom assoziiert. Es handelt sich dabei um eine erbliche Erkrankung, die eine Beeinträchtigung verschiedener neurologischer Funktionen beinhaltet (Scheffner, 1998; Fang *et al.*, 1999; Cassidy *et al.*, 2000). Mittlerweile wurden einige potentielle zelluläre Substrate von E6AP beschrieben. Dazu gehören HHR23A und HHR23B (Kumar *et al.*, 1999), Blk (Oda *et al.*, 1999), das pro-apoptotische Protein Bak (Thomas und Banks, 1998) und Mcm7 (Kühne und Banks, 1998). Die physiologische Relevanz dieser Wechselwirkungen ist aber bisher unklar. Auch über eine Funktion dieser E6AP-Substrate bei der HPV-induzierten Karzinogenese des Zervix kann nur spekuliert werden. So könnte die Wechselwirkung von E6 mit E6AP einen Einfluss auf Art oder Effizienz der E6AP-Substrat-Wechselwirkung haben. Weiterhin ist beschrieben, dass 'high risk' E6 Proteine die Autoubiquitinierung (Nuber *et al.*, 1998) und den Abbau von E6AP stimulieren (Kao *et al.*, 2000). Die resultierende Abnahme der Proteinmenge an E6AP könnte Auswirkungen auf die Wechselwirkung von E6AP mit seinen Substraten besitzen. Ob diesen Spekulationen eine physiologische Relevanz zukommt, ist allerdings bisher ungeklärt.

1.3.2.4 PDZ-Proteine

Zwar wird die E6-vermittelte Degradation von p53 allgemein als wichtiger Faktor bei der HPV-induzierten zellulären Transformation angesehen, doch ist andererseits auch klar, dass E6 'p53-unabhängiges' onkogenes Potential besitzt. So ist eine E6-vermittelte Induktion anti-apoptotischer Effekte auch in Abwesenheit von p53 (p53 'knock out' Mäuse) beschrieben (Pan und Griep, 1995). Weiterhin wurde in der Zervixkarzinom-abgeleiteten Zelllinie SW756 bei Unterdrückung der E6- und E7-Expression beobachtet, dass die Zellen die Fähigkeit zur Proliferation verlieren. Wurde zusätzlich eine E6 Mutante, die nicht stabil mit p53 wechselwirken kann, ektopisch exprimiert, blieb der zuvor beobachtete Proliferationsstopp allerdings aus (Spitkovsky *et al.*, 1996). Einen weiteren Hinweis auf p53-unabhängige Wirkmechanismen liefern E6 Mutanten, die p53

in vitro nicht binden oder abbauen können, aber eine Immortalisierung von Brustepithelzellen bewirken (Gao *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2002).

Mittlerweile wurde eine Reihe von zellulären Proteinen beschrieben, die an E6 binden können (Tabelle 1). Für viele dieser Proteine wurde zusätzlich eine E6AP-abhängige Degradation beobachtet. Für fünf Proteine wurde allerdings eine E6AP-unabhängige Degradation beschrieben, wobei der Abbau-Mechanismus in diesen Fällen bisher unbekannt ist. Somit ergibt sich die Möglichkeit, dass E6 noch mit einer zweiten, bisher nicht identifizierten Ligase funktionell wechselwirken kann. In all diesen Fällen (hDlg; MAGI-1, 2 und 3; MUPP-1) handelt es sich dabei um Proteine, die PDZ-Domänen enthalten, welche zudem für die Wechselwirkung mit E6 essentiell sind. Interessanterweise ist ein weiteres Protein (Scribble), das über seine PDZ-Domänen mit E6 wechselwirkt, als E6AP-abhängiges Abbausubstrat von 'high risk' E6 Proteinen charakterisiert worden (Nakagawa und Huibregtse, 2000).

Die Bezeichnung PDZ leitet sich von den ersten drei Proteinen ab, in denen diese Domäne identifiziert wurde (PDZ = PSD95/Dlg/ZO-1) (Harris und Lim, 2001). PDZ-Domänen sind als Protein-Protein Interaktionsmodule bekannt und werden häufig in membran-assoziierten Proteinen vorgefunden. In der Mehrzahl der beschriebenen Fälle vermitteln die PDZ-Domänen dabei eine Interaktion mit dem intrazellulären C-Terminus von Transmembranrezeptoren oder Kanalproteinen (Songyang *et al.*, 1997; Harris und Kim, 2001).

'High risk' E6 Proteine besitzen im Gegensatz zu 'low risk' E6 Proteinen ein PDZ-Bindemotiv, das die Bindung an eine oder mehrere PDZ Domäne(n) der beschriebenen Substrate (hDlg; Scribble; MUPP-1; MAGI-1, 2 und 3) vermittelt. Bei E6 Proteinen mit mutiertem PDZ-Bindemotiv erfolgt keine Degradation des entsprechenden PDZ-Proteins, während die Wechselwirkung mit E6AP und der Abbau von p53 nicht beeinflusst sind (Lee *et al.*, 1997; Kiyono *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000; Nakagawa und Huibregtse, 2000; Glaunsinger *et al.*, 2000, Thomas *et al.*, 2002).

Einen ersten Hinweis auf eine essentielle Funktion des 'high risk' E6 C-Terminus lieferte die Beobachtung, dass E6 Proteine ihre Fähigkeit zur Immortalisierung von Nagetier-Fibroblasten verlieren, wenn sie Mutationen im C-Terminus aufweisen (Kiyono *et al.*, 1997). Weitere Hinweise ergaben sich erst nach Beginn dieser Arbeit. So kann Wildtyp HPV16 E6 im Vergleich zu einer Form mit mutiertem PDZ-Bindemotiv, in SV40 immortalisierten Keratinozyten verstärkte Morphologie-Veränderungen und Epithel-Mesenchym-Übergänge verursachen (Watson *et al.*, 2003), in transgenen Mäusen die

Induktion epithelialer Hyperplasien bewirken (Nguyen *et al.*, 2003A) und im Epithel von Mauslinsen ähnliche Effekte wie Mutationen von Dlg hervorrufen (Nguyen *et al.*, 2003B).

Tabelle 1: Beschriebene zelluläre Proteine, die an 'high risk' HPV E6 Onkoproteine binden können

Protein	Zelluläre Funktion	Abbau	E6AP-Einfluss
p53	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor	+	+
hDlg	Kontrolle von Zellpolarität und Wachstum	+	-
Scribble	Kontrolle von Zellpolarität und Wachstum	+	+
E6TP1	GAP Protein	+	+
Mcm7	Initiation der DNA Replikation	+	+
Bak	Apoptose induzierend	+	+
hAda3	Transkriptions-Koaktivator	+	n.u.
E6AP	Ubiquitin-Ligase	+	+
c-Myc	Transkriptionsfaktor	+	+
IRF-3	Transkriptionsfaktor	-	-
E6BP/ERC-55	Ca ²⁺ bindendes Protein	-	+
Paxilin	Signaltransduktion	-	-
MAGI-1, 2 und 3	Signaltransduktion (?)	+	-
MUPP-1	Strukturprotein, Signaltransduktion (?)	+	-
AMF-1/Gps2	Transkriptions-Koaktivator	+	n.u.
p300/CBP	Transkriptions-Koaktivator	-	-
Tuberin	Kontrolle von Zellwachstum und Proliferation	+	n.u.
Tyk2	Signaltransduktion	-	n.u.
Protein Kinase A	Signaltransduktion	-	n.u.
Protein Kinase PKN	Signaltransduktion	-	n.u.
Fibulin-1	Ca ²⁺ bindendes Protein	-	n.u.
NF-X1	Transkriptionsrepressor	+	+

n.u., nicht untersucht. (?), vermutete Funktion. Strukturprotein, dient als Plattform für andere Proteine ('scaffolding protein') und ermöglicht so die 'richtige' Orientierung der gebundenen Proteine. GAP, GTPase aktivierendes Protein.

Von allen PDZ-Proteinen, für die eine Induktion des Abbaus durch 'high risk' E6 Proteine beschrieben wurde (vgl. 1.5.1), wurden die Proteine hDlg und Scribble in ihrer Interaktion mit E6 bisher am besten charakterisiert (Humbert *et al.*, 2003).

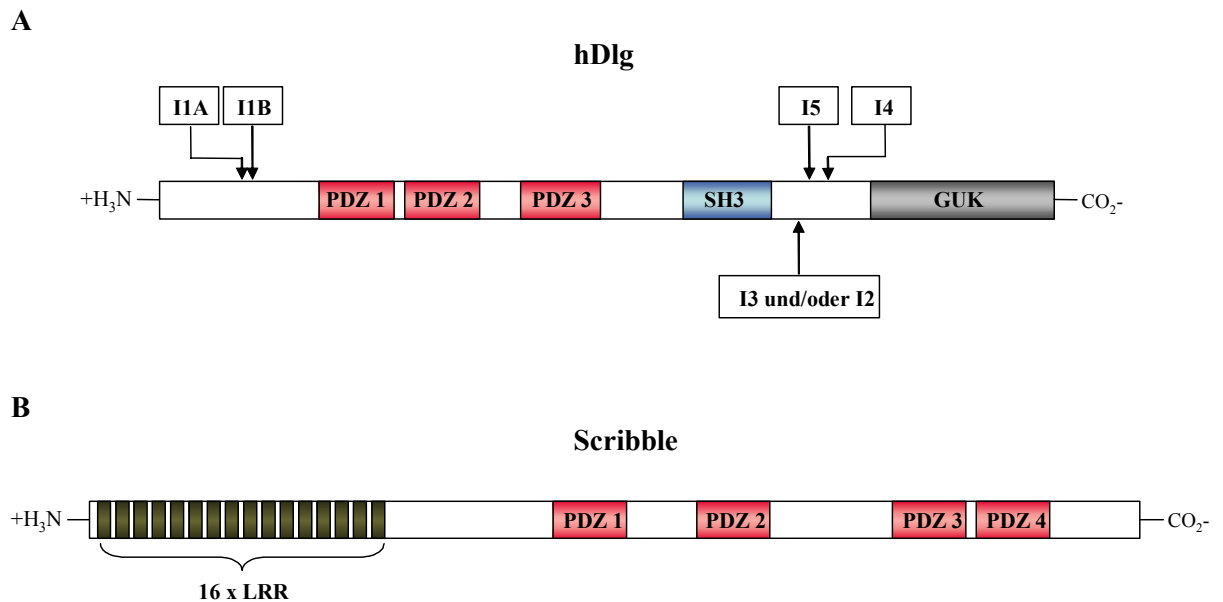


Abb. 5: Schematische Darstellung des Domänenaufbaus von hDlg und Scribble. (A) Für hDlg sind verschiedene Isoformen beschrieben, die teilweise gewebespezifisch sind und/oder die intrazelluläre Lokalisation beeinflussen (Mori *et al.*, 1998; McLaughlin *et al.*, 2002). I, Insertion; PDZ, PSD95/Dlg/ZO-1 homologe Domäne; SH3, Src Homologie 3 Region; GUK, Guanylat Kinase homologe Domäne; (B) Scribble. PDZ, siehe (A). LRR, *Leucin Rich Repeats*.

Sowohl für Scribble als auch hDlg konnte gezeigt werden, dass der E6-vermittelte Abbau durch das 26S-Proteasom erfolgt (Nakagawa und Huibregtse, 2000; Gardiol *et al.*, 1999). Auch in Abwesenheit von 'high risk' HPV E6 Proteinen wird hDlg über das Proteasom reguliert (Mantovani *et al.*, 2001), wobei eine phosphorylierungs-abhängige Interaktion von hDlg mit der β -TrCP Ubiquitin Ligase erfolgt. Ein 'knock down' von β -TrCP mittels 'RNA Interference' führt zu einem Anstieg an hDlg und eine transiente Überexpression von β -TrCP zu einem Abbau von endogenem hDlg. Dabei wurden mittels Immunfluoreszenz auch nukleäre Fraktionen detektiert, die aber bei einer Überexpression von β -TrCP nicht wie zytosolisches und membran-assoziiertes hDlg abgebaut wurden (Mantovani und Banks, 2003). Über die Regulation und Funktion nukleärer Formen von hDlg und über einen möglichen Einfluss von β -TrCP auf die Menge an hDlg in HPV positiven Zellen ist nichts bekannt. Jedoch wurde kürzlich beschrieben, dass bei einem 'knock down' der Expression von E6 und E7 in HPV positiven Zellen eine Anreicherung

von zytosolischem und nukleären Fraktionen von hDlg zu beobachten ist (Massimi *et al.*, 2004).

In HPV positiven Zervixkarzinom-Biopsien konnten im Vergleich zu 'normalen' Gewebeproben verringerte Proteinmenge an Scribble und hDlg beobachtet werden. Für Scribble konnte zudem in HPV negativen Zervixkarzinom-Biopsien keine Veränderung der Proteinmengen festgestellt werden. Da die Mengen an Scribble-mRNA in HPV positiven und negativen Biopsien vergleichbar waren, ist die Vermutung zulässig, dass Scribble tatsächlich *in vivo* E6-vermittelt abgebaut werden kann (Nakagawa *et al.*, 2004). hDlg weist im Laufe fortschreitender Karzinogenese verschiedene Muster bezüglich Expression und Lokalisation (zytosolisch bzw. membran-assoziiert) auf und scheint erst in invasiven HPV positiven Zervixkarzinomzellen drastisch in seiner Gesamtmenge reduziert zu sein (Lin *et al.*, 2004; Cavatorta *et al.*, 2004). Zwar konnte eine wechselnde Dominanz der Lokalisation von hDlg auch in Tumoren aus Dickdarm und Niere beobachtet werden, aber die drastische Abnahme der hDlg-Menge scheint spezifisch für HPV assoziierte invasive Zervixkarzinome zu sein (Cavatorta *et al.*, 2004). Auch konnten nukleäre Fraktionen von hDlg in Zervixkarzinom-Biopsien beobachtet werden, die allerdings ein uneinheitliches Expressionsmuster und zumindest keine offensichtliche Korrelation zum Entartungsgrad von Zellen aufwiesen (Watson *et al.*, 2002).

Eine prinzipielle Rolle von hDlg in der Proliferationskontrolle legt die Beobachtung nahe, dass eine Interaktion zwischen dem Produkt des APC (Adenomatous Polyposis Coli) Gens und hDlg besteht. Dabei bindet APC mit seinem extremen C-Terminus an die zweite PDZ-Domäne von hDlg (vgl. Abb. 5), was einen negativen Einfluss auf das Fortschreiten des Zellzyklus von der G₀/G₁-Phase in die S-Phase bewirkt (Ishidate *et al.*, 2000). In diesem Kontext würden sowohl die Bindung von 'high risk' E6 an die zweite PDZ-Domäne von hDlg als auch der Abbau von hDlg durch E6 eine Möglichkeit darstellen, Einfluss auf ein Fortschreiten des Zellzyklus zu nehmen. Eine Bindung an die zweite PDZ Domäne von hDlg ist auch für andere virale Onkogene beschrieben (Lee *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1999; Hirata *et al.*, 2004).

1.4 Ansätze für eine molekulare Therapie von Zervixkarzinomen

1.4.1 E6 als Zielstruktur

Die generelle Expression von E6 und E7 in allen HPV positiven Zervixkarzinomen (vgl. 1.1.2) und ihre Notwendigkeit zur Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps (vgl. 1.3.2.4) machen E6 und E7 zu attraktiven molekularen Zielstrukturen für HPV spezifische medizinische Applikationen. Denkbar wäre eine Reduktion ihrer Expressionsraten oder eine Hemmung ihrer onkogenen Funktionen auf Proteinebene. In einer vereinfachten Darstellung induziert E7 eine Hyperproliferation, aber gleichzeitig auch zelluläre Abwehrreaktionen wie Zellzyklusarrest oder Apoptose, weshalb ein anti-apoptotisch wirkendes E6 Protein für das Wachstum HPV positiver Zellen essentiell zu sein scheint (vgl. 1.1.2). So ist in transgenen Mäusen bei Expression von E7 eine erhöhte Proliferation, aber gleichzeitig eine hohe Anfälligkeit für Apoptose zu beobachten und es entstehen nur bei Koexpression von E6 Tumore (Pan und Griep, 1994). So korreliert die Aktivität von E7 hauptsächlich mit gutartigen Läsionen, während E6 eine entscheidende Rolle beim Übergang von gutartigen zu malignen Läsionen zukommt (Song *et al.*, 2000). Auch sind Expression und Funktionalität von E6 selbst nach jahrzehntelanger Passagierung unter Zellkulturbedingungen nachweisbar (Hengstermann *et al.*, 2001). Des Weiteren scheint der E6-vermittelte Abbau von p53 einen wichtigen Faktor in der HPV assoziierten Karzinogenese darzustellen (vgl. 1.3.2.1). Da der Mdm2-vermittelte Abbau von p53 in HPV positiven Zellen inaktiv ist (vgl. 1.3.2.2), sollte bei einer Inhibierung der E6/E6AP Wechselwirkung eine Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 möglich sein. Somit erscheint E6 als eine ideale Zielstruktur für Ansätze einer molekularen Therapie von Zervixkarzinomen.

1.4.2 E6-Bindepeptide

Nach der Entdeckung, dass die Ubiquitin-Ligase E6AP den Abbau von p53 durch 'high risk' HPV E6 vermittelt (Scheffner *et al.*, 1993), konnte in Mutationsstudien ein 18 Aminosäuren umfassender Bereich von E6AP identifiziert werden, welcher für die Bindung von E6AP an E6 notwendig ist (Huibregtse *et al.*, 1993). Das entsprechende

Peptid wird in dieser Arbeit als e6bp1 (E6 binding peptide 1) bezeichnet (vgl. 1.3.2.3, Abb. 4). Mittels Magnetresonanz-spektroskopie konnte gezeigt werden, dass e6bp1 eine α -helikale Konformation einnimmt. Einzelaminosäureaustausche gegen Prolin zerstören sowohl die α -helikale Struktur als auch die Bindung an HPV E6. Im Gegensatz dazu wird die α -helikale Konformation durch Einzelaustausche von drei zentral gelegenen Leucinresten gegen Alanin nicht beeinflusst, jedoch die Bindung an E6 vollständig unterbunden. Die Leucinseitengruppen, die sich zudem auf derselben Seite der α -Helix befinden, scheinen somit eine essentielle Rolle bei der Interaktion mit HPV E6 einzunehmen (Be *et al.*, 2001).

Auch in weiteren Proteinen, die an E6 binden, konnten Aminosäuresequenzen ausgemacht werden, die für die Interaktion essentiell sind (Chen *et al.*, 1998; Bohl *et al.*, 2000; Elston *et al.*, 1998). Beim Vergleich dieser E6-Bindesequenzen konnten einige hochkonservierte Aminosäurereste bestimmt werden. Diese Beobachtungen führten zur Definition eines Konsensusmotives der Abfolge Lhx ϕ Lsh (L = Leucin; h = eine Aminosäure, die Wasserstoffbrücken ausbilden kann; x = irgendeine Aminosäure; ϕ = hydrophobische Aminosäure; s = Alanin oder Glycin) (Be *et al.*, 2001).

Da die meisten zellulären Zielproteine von 'high risk' HPV E6 E6AP-abhängig abgebaut werden (vgl. Tabelle 1), sollte durch eine Inhibierung der E6/E6AP Wechselwirkung eine Vielzahl an Proteinen stabilisiert und so Funktionswege der zellulären Abwehr reaktiviert werden können. So wurden kürzlich im Rahmen der Identifizierung von weiteren E6-Bindepeptiden Peptide beschrieben, die den E6-vermittelten Abbau von p53, hDlg und Proteinen der MAGI-Familie *in vitro* inhibieren (Grm *et al.*, 2004). Für Zellkultursysteme sind bisher aber keine Daten für die spezifische Inhibierung der Bindestelle von E6 an E6AP durch e6bp1 oder andere E6-Bindepeptide publiziert. Für ein Peptid mit hoher Bindungskapazität für HPV16 E6 ist aber beschrieben, dass seine Expression spezifisch in HPV16 positiven Krebszelllinien zu einer Anreicherung von p53 und zu einem Zelltod durch Apoptose führt (Butz *et al.*, 2000). Allerdings ist nicht bekannt, an welche Region von 16E6 das Peptid bindet. Da aber dieses Peptid eine C-X-X-C-Sequenz (C = Cystein, X = irgendeine Aminosäure) enthält, die ein putatives Zink-Bindemotiv repräsentiert, wurde spekuliert, dass eine Interaktion mit E6 über die Bindung von Zink erfolgt, da E6 selbst vier C-X-X-C-Sequenzen enthält (vgl. 1.3.2.1). Das als 1/1 bezeichnete Peptid wurde in Fusion mit der aktiven Schleife des *E. coli* Proteins trxA (ThioredoxinA) exprimiert, wodurch das Peptid nur eine geringe Anzahl verschiedener Konformationen einnehmen

kann (Ladner, 1995). Eine Expression von 1/1 als lineares Peptid führt zu einem vollständigen Verlust des Apoptose-induzierenden Potentials (F. Hoppe-Seyler, persönliche Mitteilung). Da *trxA* *per se* zytotoxisch ist, sind die medizinischen Applikationsmöglichkeiten stark eingeschränkt. Zudem interagiert 1/1 nicht mit E6 Proteinen anderer 'high risk' HPV-Typen (HPV18, etc.).

Da alle 'high risk' E6 Proteine dieselbe Region auf E6AP zur Bindung benötigen, scheint diese Region ein geeigneter Kandidat für eine allgemeine E6/E6AP Inhibierung zu sein. Allerdings konnte für das von dieser Region abgeleitete Peptid e6bp1, auch in Fusion mit *trxA*, keine Stabilisierung von p53 oder ein Zelltod durch Apoptose in HPV-positiven Zellen beobachtet werden (F. Hoppe-Seyler, persönliche Mitteilung).

Als Hinweis für eine universelle Wirksamkeit der spezifischen Inhibierung des E6/E6AP Komplexes können Studien angesehen werden, in denen die Expression von E6 oder E6AP durch 'RNA Interference' stark verringert wurde. In diesen Fällen war eine Anreicherung von p53 und ein Zelltod durch Apoptose sowohl in HPV16 als auch HPV18 positiven Zellen zu beobachten (Butz *et al.*, 2003; Hengstermann *et al.*, zur Publikation eingereichte Daten).

1.5 Effektive Einbringung von Peptiden in Zellen: Protein Transduktion

1988 beschrieben zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass das von HIV (Human immunodeficiency virus) kodierte Protein TAT in der Lage ist, Zellmembranen zu passieren, d.h. intrazellulär vorzufinden war, nachdem es dem Zellkulturmedium zugesetzt wurde (Green und Loewenstein, 1988; Frankel und Pabo, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass für diesen als Transduktion bezeichneten Vorgang eine Denaturierung von TAT erforderlich ist und anschließend intrazellulär eine Renaturierung erfolgt (Bonifaci *et al.*, 1995). Das Potential zur Transduktion durch Zellmembranen konnte auch beim *Drosophila* Antennapedia Transkriptionsfaktor Antp (Joliot *et al.*, 1991) und dem DNA-bindenden Protein VP22 des Herpes-Simplex-Virus 1 (Elliott und O'Hare, 1997) beobachtet werden. In allen Fällen wurden minimale Bereiche identifiziert, die für die Transduktion essentiell sind. Diese Sequenzen, die zwischen 11 und 34 Aminosäuren umfassen, wurden als CPPs (cell penetrating peptides) bzw. PTDs (Protein Transduction domains) bezeichnet. Ihre Bedeutung erlangen CPPs zum einen dadurch, dass sie in Fusion mit Proteinen oder nach

Kopplung an synthetische Agenzien ihr Potential zur Transduktion nicht verlieren. Zum anderen konnte eine homogene, konzentrationsabhängige Aufnahme von CPP-Fusionskonstrukten beobachtet werden, so dass eine Definition der intrazellulären Konzentration möglich ist (Schwarze *et al.*, 2000). Schließlich konnte in Mäusen gezeigt werden, dass nach Injektion eines denaturierten Fusionskonstrukts von β -Galaktosidase mit den transduktionse essentiellen 11 Aminosäuren von TAT in allen untersuchten Mausgeweben β -Galaktosidase Aktivität zu beobachten war. Während so zum einen die *in vivo* Funktionalität von CPP-Fusionskonstrukten demonstriert werden konnte, war zusätzlich die Beobachtung interessant, dass trotz intakter Blut-Hirn-Schranke β -Galaktosidase Aktivität in Gewebeproben aus dem Gehirn der Mäuse nachgewiesen werden konnte (Schwarze *et al.*, 1999).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass Sequenzen, die nur aus einer Aneinanderreihung von sieben Argininresten bestehen (ARG7), das beschriebene Potential von CPPs besitzen. Die *in vivo* Funktionalität von Fusionskonstrukten mit ARG7 und weiteren Polyarginin-Peptiden (ARG11, etc.) wurde an einigen Beispielen demonstriert (Rothbard *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 2004). Funktionalität, Effektivität und Mechanismus der Transduktion durch CPPs werden aber mittlerweile sehr kontrovers diskutiert, da gezeigt werden konnte, dass beobachtete Phänomene zumindest zum Teil ein Artefakt von Zellfixierungen darstellen können (Leifert *et al.*, 2002; Vives *et al.*, 2003).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Das E6-Onkoprotein spielt bei der Entstehung des Zervixkarzinoms eine bedeutende Rolle. Ein genaues Verständnis der Eigenschaften und Wechselwirkungen von E6 ist notwendig, um Ansätze entwickeln zu können, die spezifisch das Wachstum HPV positiver Zellen unterbinden. Die Frage, welche Bedeutung den verschiedenen potentiellen Substraten von E6 für Pathogenese und Transformation zukommt, ist somit von hoher biomedizinischer Relevanz.

Aufgabenstellungen:

1) Die Immortalisierung von Keratinozyten stellt ein gutes Modellsystem für die Untersuchung der HPV assoziierten Karzinogenese dar (vgl. 1.1.2 und 1.3.2.1). Zwar wird über eine möglicherweise bedeutende Rolle der Wechselwirkung von E6 mit den potentiellen Tumorsuppressoren Scribble und Dlg spekuliert, aber Daten für ihre Rolle im Prozess der Immortalisierung von Keratinozyten gab es zu Beginn dieser Arbeit nicht. So sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von E6 Mutanten generiert und diese bezüglich ihrer Wechselwirkung mit Dlg, Scribble, p53 und E6AP charakterisiert werden. Die Korrelation der gewonnenen biochemischen Daten mit dem Potential der verschiedenen E6 Mutanten, primäre Keratinozyten zu immortalisieren, sollte helfen, die Frage zu klären, ob den untersuchten Substraten eine essentielle Rolle in der HPV Pathogenese zukommt.

2) Für die meisten der zellulären Substrate, die E6-vermittelt dem Abbau zugeführt werden können, ist die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase E6AP essentiell. Eine Inhibierung der Bindung von E6 an E6AP stellt somit einen viel versprechenden Ansatz für eine molekulare Therapie von HPV assoziierten Karzinomen dar. Ausgehend von der Sequenz des E6 bindenden Peptids e6bp1 sollten Peptide generiert werden, die über eine stärkere Bindung an E6 verfügen als e6bp1. Zusätzlich sollte ein System etabliert werden, das eine effiziente und konzentrationsabhängige Einbringung von Peptiden in Zellen ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Wachstumsplatten

<u>GuHCl-Lysepuffer:</u>	100 mM Na ₂ HPO ₄ , 6 M Guanidin-HCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin, 1 mM PefaBloc, (pH 8.0)
<u>Laemmli-Laufpuffer (10x):</u>	250 mM Tris-HCl, 2 M Glycin, 1 % SDS, (pH 8.4)
<u>Laemmli-Stopp-Puffer:</u>	62.5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 100 mM DTT, 0.001 % Bromphenolblau, (pH 6.8)
<u>LB-Medium</u>	10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-Trypton (pH 7.5)
<u>M9-Selektionsplatten:</u>	0.5 g/l NaCl, 2 mg/l Glukose, 1 g/l NH ₄ Cl, 2 mM MgSO ₄ , 3 g/l KH ₂ PO ₄ , 6 g/l Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O, 0.003 g/l CaCl ₂ , 1 g/l Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Tryptophan), 20 g/l Agar
<u>PBS:</u>	1.8 mM KH ₂ PO ₄ , 10.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, (pH 7.4)
<u>Puffer Z:</u>	100 mM NaH ₂ HPO ₄ , 10 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 50 mM β-Mercaptoethanol
<u>SC-Minimalmedium:</u>	5 g/l YNB (Yeast nitrogen base), 15 g/l (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 g/l Glukose, 4 g/l Aminosäuremix (im Einbuchstabencode: A, R, D, C, E, Q, G, I, , K, M, F, P, S, T, Y, V: je 6,25 % w/w) (pH 5.9); [je nach Selektion bzw. Reporterger: 0.8 mM Leucin, 0.32 mM Tryptophan, 0.16 mM Uracil, 0.8 mM Histidin, 0.2 g/l Adenin] [für Wachstumsplatten: + 20 g/l Agar]
<u>STET-Puffer:</u>	8 % Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, (pH 8.0)
<u>SOC-Medium:</u>	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 mM Glukose, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , (pH 7.5)
<u>TAE-Puffer (50x):</u>	2 M Tris-HCl, 950 mM Essigsäure, 50 mM EDTA
<u>T₂₅N₅₀:</u>	50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, (pH 7.6)
<u>TNE-T:</u>	10 mM Tris-HCl, 2.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1 % Tween 20, (pH 7.5)

<u>TNN-Lysepuffer:</u>	100 mM Tris-HCl, 1 % NP40 , 100 mM NaCl, 1 mM DTT, je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin, 1 mM PefaBloc, (pH 8.0)
<u>Transferpuffer:</u>	100 mM Glycin , 25 mM Tris-HCl, (pH 8.3)
<u>YPDA-Vollmedium:</u>	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glukose, 100 mg/l Adenin [für Wachstumsplatten: + 20 g/l Agar]

2.1.2 Zellen

2.1.2.1 Bakterienstämme

- *E. coli* DH5α, Genotyp: F⁻ φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen)
- *E. coli* BL21 (DE3), Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) (Novagen)
- *E. coli* MC1061, Genotyp: F⁻ *hsdR mcrB araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK Δ(lac)X74 rpsL thi* (Meissner *et al.*, 1987)

2.1.2.2 Hefestämme

- *S. cerevisiae* KF1, Genotyp: *MATa trp1-901 leu2-3 112 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2:: GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3*, abgeleitet von PJ 69-4A (Butz *et al.*, 2000)

2.1.2.3 Humane Zelllinien

- H1299: Großzelliges Bronchialkarzinom, p53-Null (H. Oie)
- SiHa: Zervixkarzinom, HPV16 positiv (M. Scheffner)
- HeLa: Zervixkarzinom, HPV18 positiv (M. Scheffner)
- C4II: Zervixkarzinom, HPV18 positiv (M. Scheffner)
- CaSki: Zervixkarzinom, HPV16 positiv (M. Scheffner)
- HPK1A: immortalisierte Keratinozyten, HPV16 E6/E7 (M. Dürst)
- HPKII: immortalisierte Keratinozyten, HPV16 E6/E7 (M. Dürst)

2.1.2.4 Maus-Zelllinien

- E6AP -/- MEFs: Mausfibroblasten, E6AP-Null (M. Scheffner)
- NIH-3T3: Immortale Mausfibroblasten (K. Butz)
- PA317: Amphotrope Verpackungszelllinie (Miller und Buttimore, 1986)
- Psi-2: Ecotrope Verpackungszelllinie (N.J. Whitaker)

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Referenz	Verdünnung*
Monoklonal, Maus, Anti-p53 IgG, DO-1	Dianova	1 : 1000
Monoklonal, Maus, Anti-HA IgG	Hiss Diagnostics	1 : 1000
Monoklonal, Maus, Anti-FLAG IgG, M2	Sigma	1 : 1000
Monoklonal, Kaninchen, Anti-SAP97 IgG, H-60	Santa Cruz Biotechnology	1 : 1000
Monoklonal, Ziege, Anti-Scrib IgG, K-21	Santa Cruz Biotechnology	1 : 250
Monoklonal, Maus, Anti-eGFP	A. Noegel	1 : 1
Monoklonal, Maus, Anti-E6AP IgG	M. Scheffner	3 μ l (IP)
Polyklonal, Kaninchen, Anti-E6AP	M. Scheffner	1 : 500
Peroxidase-gekoppelt, Ziege, Anti-Maus	Dianova	1 : 15000
Peroxidase-gekoppelt, Ziege, Anti-Kaninchen	Dianova	1 : 10000
Peroxidase-gekoppelt, Kaninchen, Anti-Ziege	Dianova	1 : 2000

*, Verhältnis Stocklösung : TNE-T-Puffer (V/V)

2.1.4 Längenstandards

DNA-Marker:

- λ (Lambda)-DNA Hind III-Marker (Invitrogen):
23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 545, 125 [bp]
- 100 bp ladder (New England Biolabs):
1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]

Proteinmarker:

- Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas):
180, 130, 100, 73, 54, 48, 35, 24, 16, 10 [kDa]
- MARK12TM Unstained Standard (Invitrogen):
200, 116.3, 97.4, 66.3, 55.4, 36.5, 31, 21.5, 14.4, 6 [kDa]

2.1.5 Zur Klonierung verwendete Ausgangsplasmide

Vektor	Charakteristika	Referenz
pCDNA3-HA	5.4 kb, Ampicillinresistenz, Neomycinresistenz, CMV-Promoter, zur <i>in vitro</i> und transienten Proteinexpression in Säugerzellen verwendet, HA-tag (N-terminal)	D. Roth
pAD	7.0 kb, Ampicillinresistenz, GAL4-Aktivierungsdomäne, TRP1-Selektionsmarker, verwendet im YTH	K. Butz
pGEX-2TK	5.0 kb, Ampicillinresistenz, Protein A-Kinase A Erkennungssequenz, Thrombin-Schnittstelle, zur bakteriellen Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen verwendet	Amersham Pharmacia Biotech
pLXSN	5.8 kb, Ampicillinresistenz, Neomycinresistenz, SV40-Promoter, zur Herstellung transgener Retroviren in Säugerzellenellen verwendet	A. D. Miller
pSilencer™ 3.1-H1 hygro	4.5 kb, Ampicillinresistenz, Hygromycinresistenz, H1-Promoter, für vektorbasierte RNAi in Säugerzellen verwendet	Ambion
pET16b	5.7 kb, Ampicillinresistenz, T7-Promoter, His-tag (N-terminal), zur bakteriellen Expression von His-tag-Fusionsproteinen verwendet	Novagen
pCDNA3-DHFR-HA-Ubiquitin-HA	6.4 kb, Ampicillinresistenz, Neomycinresistenz, CMV-Promoter, zur <i>in vitro</i> und transienten Proteinexpression in Säugerzellen verwendet	A. Varshavsky; L. Linares

2.1.6 Verwendete DNA-Konstrukte

2.1.6.1 pGEX-Konstrukte

HPV11-E6	M. Scheffner
HPV16-E6	M. Scheffner
HPV18-E6	M. Scheffner
HPV16-E6-8S9A10T	M. Scheffner
HPV16-E6-45Y47Y49H	M. Scheffner

2.1.6.2 Hefevektoren

pPC97	Invitrogen
pPC97-HPV11-E6	K. Butz
pPC97-HPV16-E6	K. Butz
pAD	K. Butz
pAD-e6bp1	K. Butz
pAD-TRX	K. Butz
pAD-TRX-1/1	K. Butz
pAD-TRX-e6bp1	K. Butz
pAD-TRX-Kopep	K. Butz

2.1.6.3 pRc/CMV-Konstrukte

β -Gal	A. Hengstermann
His-Ub	M. Scheffner
HPV11-E6	M. Scheffner
HPV16-E6	M. Scheffner
HPV18-E8	M. Scheffner
p53	M. Scheffner
HPV16-E6-8S9S10T	M. Scheffner
HPV16-E6-45Y47Y49H	M. Scheffner

2.1.6.4 pCDNA3-Konstrukte

FLAG-Scribble	Nakagawa und Huibregtse, 2000
HA-E6AP	M. Scheffner
HA-820A-E6AP	M. Scheffner
HA- Δ bs-E6AP	M. Scheffner

2.1.6.5 Weitere Konstrukte

PEGFP-C2	Clontech
cDNA für rDlg	L. Banks
cDNA für hUbiquitin	M. Scheffner

2.1.7 Klonierte DNA-Konstrukte

2.1.7.1 pGEX-Konstrukte

Bezeichnung	Aminosäuren	RS 1) 5', 2) 3'	Oligonukleotide
11C16	HPV11-E6 (1-140); HPV16-E6 (140-151)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, MS259
11C18	HPV11-E6 (1-140); HPV18-E6 (142-158)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, PK10
16C11	HPV16-E6 (1-139); HPV11-E6 (141-150)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, MS260
16C18	HPV16-E6 (1-139); HPV18-E6 (142-158)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, PK12
18C11	HPV18-E6 (1-141); HPV11-E6 (141-150)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, PK11
18C16	HPV18-E6 (1-141); HPV16-E6 (140-151)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, PK13
SATC11	HPV16-E6 (1-139; 8S9A10T); HPV11-E6 (141-150)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, MS260
SATC18	HPV16-E6 (1-139; 8S9A10T); HPV18-E6 (142-158)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, PK12
ESAT	HPV16-E6 (1-139; 2E8S9A10T)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	PK48, UN79
ESATC11	HPV16-E6 (1-139; 2E8S9A10T); HPV11-E6 (141-150)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	PK48, MS260
ESATC18	HPV16-E6 (1-139; 2E8S9A10T); HPV18-E6 (142-158)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	PK48, PK12
45/47/49C11	HPV16-E6 (1-139; 45Y47Y49H); HPV11-E6 (141-150)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, MS260
45/47/49C18	HPV16-E6 (1-139; 45Y47Y49H); HPV18-E6 (142-158)	1) BamHI 2) XbaI, EcoRI	UN71, PK12

2.1.7.2 pCDNA3-DHFR-HA-Ubiquitin-HA-Konstrukte

Alle Konstrukte wurden durch Subklonierung aus vorhandenen oder klonierten pGEX-Konstrukten generiert (vgl. 2.1.6.1 und 2.1.7.1).

Fragment/Insert *	Subklonierung aus pGEX
11, 16, 11C16, 11C18, 16C11, 16C18, SAT, SATC11, SATC18, ESAT, ESATC11, ESATC18, 45/47/49, 45/47/49C11, 45/47/49C18	5' BamHI 3' XbaI
18, 18C11, 18C16	5' BamHI 3' EcoRI + Klenow **/**

*, Aminosäuremuster: siehe pGEX-Konstrukte

** , Klenow: DNA Polymerase I, 'Large Fragment' (New England Biolabs)

***, pCDNA3-DHFR-HA-Ubiquitin-HA-Vektor: 5' BamHI, 3' XbaI + Klenow

2.1.7.3 pLXSN-Konstrukte

Alle Konstrukte wurden 5' EcoRI und 3' BamHI kloniert. Das Aminosäuremuster der Konstrukte entspricht den Angaben bei 'pGEX-Konstrukte'.

Konstrukt *	Oligonukleotide	HA-tag
11E6	PK17, PK14	-
	PK20, PK14	N-terminal
	PK17, PK23	C-terminal
16E6	PK18, PK15	-
	PK21, PK 15	N-terminal
	PK18, PK24	C-terminal
18E6	PK32, PK16	-
	PK33, PK16	N-terminal
	PK32, PK 25	C-terminal
11C16	PK17, PK15	-
	PK 20, PK15	N-terminal
	PK17, PK24	C-terminal
11C18	PK17, PK16	-
	PK20, PK16	N-terminal
	PK17, PK25	C-terminal
16C11	PK18, PK14	-
	PK21, PK14	N-terminal
	PK18, PK23	C-terminal
16C18	PK18, PK16	-
	PK21, PK16	N-terminal
	PK18, PK25	C-terminal
18C11	PK32, PK14	-
	PK33, PK14	N-terminal
	PK32, PK23	C-terminal
18C16	PK32, PK15	-
	PK33, PK15	N-terminal
	PK32, PK24	C-terminal
SAT	PK21, PK 15	N-terminal
	PK18, PK24	C-terminal

SATC11	PK21, PK14	N-terminal
	PK18, PK23	C-terminal
ESAT	PK36, PK15	N-terminal
	PK35, PK24	C-terminal
ESATC11	PK36, PK14	N-terminal
	PK35, PK23	C-terminal
45/47/49	PK21, PK 15	N-terminal
	PK18, PK24	C-terminal
45/47/49C11	PK21, PK14	N-terminal
	PK18, PK23	C-terminal

*, Aminosäuremuster siehe 'pGEX-Konstrukte'

2.1.7.4 pAD-Konstrukte

DNA-Konstrukt	pAD-Templat	RS 5', 3'	Oligonukleotide
e6bp1 (S5A)	e6bp1	EcoRI, PstI	PK68, PK45
e6bp1 (T8A)	e6bp1	EcoRI, PstI	PK70, PK45
e6bp1 (Q10A)	e6bp1	EcoRI, PstI	PK44, PK72
e6bp1 (R17A)	e6bp1	EcoRI, PstI	PK44, PK69
e6bp1 (S5A, T8A)	e6bp1(T8A)	EcoRI, PstI	PK68, PK45
e6bp1 (S5A, Q10A)	e6bp1(Q10A)	EcoRI, PstI	PK68, PK45
e6bp1 (S5A, R17A)	e6bp1	EcoRI, PstI	PK68, PK69
e6bp1 (T8A, Q10A)	e6bp1(T8A)	EcoRI, PstI	PK44, PK73
e6bp1 (T8A, R17A)	e6bp1(T8A)	EcoRI, PstI	PK44, PK69
e6bp1 (Q10A, R17A)	e6bp1(Q10A)	EcoRI, PstI	PK44, PK69
e6bp1 (S5A, T8A, R17A)	e6bp1(S5A, T8A)	EcoRI, PstI	PK44, PK69
e6bp1 (T8A, Q10A, R17A)	e6bp1(T8A, Q10A)	EcoRI, PstI	PK44, PK69

2.1.7.5 pET16b-Konstrukte

DNA-Konstrukt	RS 5', 3'	Oligonukleotide
GFP	NdeI, BamHI	PK37, PK43
ARG7-GFP	NdeI, BamHI	PK26, PK43
ARG7-GFP-MCS	NdeI, BsrGI, MCS: KpnI, SacII, XmaI, NheI, BamHI	PK49, PK50
ARG7-GFP-e6bp1	NheI, BamHI (e6bp1 in MCS)	PK51, PK52

2.1.7.6 Andere Konstrukte

DNA-Konstrukt	RS 5', 3'	Oligonukleotide
pCDNA3-HA-rDlg	EcoRI, XbaI	PK46, PK47
pSilencer18	BamHI, HindIII	PK66, PK67

2.1.8 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Klonierung

Bez.	Sequenz	Or.	Protein (AS)
PK8	GACTGACGACAGTTTTGACACGG	5'	<i>E. coli</i> trxA (8-16)
PK9	GCCAGGGTTTTGATCGATGTTTCAG	3'	<i>E. coli</i> trxA (59-66)
PK10	GCGGAATTCTCTAGATTAGGGTAACAAGTC TTCCATGCATGTTGTCCAGCACGAATGGC	3' EcoRI, XbaI	11E6 (141-150), 18E6 (138-141)
PK11	GCGGAATTCTCTAGATTATACTTGTGTTTCT CTGCGTCGTTGGAGTCGTTCTGTCGTGCTC GGTTGCAGCAGTGTAAGC	3' EcoRI, XbaI	18E6 (142-158), 11E6 (137-140)
PK12	GCGGAATTCTCTAGATTACAGCTGGGTTTC TCTACGTGTTCTTGATGATCTGCAGCACGAA TGGC	3' EcoRI, XbaI	16E6 (140-151), 18E6 (138-141)
PK13	GCGGAATTCTCTAGATTATACTTGTGTTTCT CTGCGTCGTTGGAGTCGTTCTGTCGTGCTC GGTTGCAACAAGACATAC	3' EcoRI, XbaI	18E6 (142-158), 16E6 (136-139)
PK14	GCGGGATCCTTTAGGGTAACAAGTCTTCC	3' BamHI	11E6 (145-150)
PK15	GCGGGATCCTTACAGCTGGGTTTCTCTACG	3' BamHI	16E6 (146-151)
PK16	GCGGGATCCTTATACTTGTGTTTCTCTGCG	3' BamHI	18E6 (153-158)
PK17	CGCGAATTCACCATGGAAAGTAAAGATGC CTCC	5' EcoRI	11E6 (1-7)
PK18	CGCGAATTCACCATGTTTCAGGACCCACA GGAG	5' EcoRI	16E6 (1-7)
PK20	CGCGAATTCACCATGTACCCATACGACGT CCCAGACTACGCTGAAAGTAAAGATGCCTC C	5' EcoRI	HA-tag, 11E6 (2-7)
PK21	CGCGAATTCACCATGTACCCATACGACGT CCCAGACTACGCTTTTCAGGACCCACAGGA G	5' EcoRI	HA-tag, 16E6 (2-7)
PK23	GCGGGATCCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTC GTATGGGTAGGGTAACAAGTCTTCC	3' BamHI	HA-tag, 11E6 (145-150)
PK24	GCGGGATCCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTC GTATGGGTACAGCTGGGTTTCTCTACG	3' BamHI	HA-tag, 16E6 (146-151)
PK25	GCGGGATCCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTC GTATGGGTATACTTGTGTTTCTCTGCG	3' BamHI	HA-tag, 18E6 (153-158)
PK26	GCGCATATGGGTCGTCGCCGTCGCCGTCGC CGTGGTGTGAGC	5' NdeI	G-ARG7-G, eGFP (1-6)
PK30	CCTTGAACCTCCTCGTTC	5'	pLXSN (Sequenzierung)
PK31	GCATGCTTGCATACTTC	3'	pLXSN (Sequenzierung)
PK32	CGCGAATTCACCATGGCGCGCTTTGAGGA CCCA	5' EcoRI	18E6 (1-7)
PK33	CGCGAATTCACCATGTACCCATACGACGT CCCAGACTACGCTGCGCGCTTTGAGGACC	5' EcoRI	HA-tag, 18E6 (2-7)
PK35	GCGGAATTCACCATGGAACAGGACCCACA GGAG	5' EcoRI	16E6 (1-7, 2E)
PK36	GCGGAATTCACCATGTACCCATACGACGT CCCAGACTACGCTGAAACAGGACCCACAGGA G	5' EcoRI	HA-tag, 16E6 (1-7, 2E)

PK37	GCGGAATTC ATATGGTGAGCAAGGGCGA GGAG	5' EcoRI, NdeI	eGFP (1-7)
PK42	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	3'	T7-Terminator (Sequenzierung)
PK43	GCGGGATC CTTACTTGTACAGCTCGTCCAT	3' BamHI	eGFP (234-239)
PK44	CGCGTTT GGAATCA CTACAGGG	5'	pAD
PK45	GAGATGGTGCACGATGCACAG	3'	pAD
PK46	GCGGAATTC ATGCCGGTCCGGAAGC	5' EcoRI	hDlg/rDlg (1-6)
PK47	GCGTCTAGATTATAGCTTTTCTTTTGC	3' XbaI	hDlg/rDlg (letzte 5)*
PK48	GCGGGATC CGAACAGGACCCACAGGAG	5' BamHI	16E6 (2-7, 2E)
PK49	GCGCGGTGTACAAGGGT ACCCGCGGGCG CCCGGG	5' BsrGI	eGFP (237-239) MCS (KpnI, SacII, XmaI)
PK50	CCGGGATC CCCGCGCGCTAG CCCGGGCG CCCGCGG	3' BamHI	MCS (NheI, XmaI, SacII)
PK51	GCGCGGG CTAG CATCCCTGAGTCCAGCG	5' NheI	e6bp1 (1-6)
PK52	GCGGGATC CTTATCTTCTTTCTTCTCCC	3' BamHI	e6bp1 (13-18)
PK66	GATCCCGCTAACACTGGGTATACAATTCAA GAGATTGTATAACCCAGTGTTAGTTTTTGG AAA	5' BamHI	18E6 siRNA
PK67	AGTTTTTCCAAAAA ACTAAC CTGGGTATACA CAATCTCTTGAATTGTATAACCCAGTGTTAG CGG	3' HindIII	18E6 siRNA
PK68	GCGGAATTC GGTCCGATCCCTGAGTCCGCC GAGCTG	5' EcoRI	e6bp1 (1-7, 5A)
PK69	GCGGCG CTGCAG CTAAGGACCTCTTGCTTC TTCTCCC	3' PstI	e6bp1 (11-18, 17A)
PK70	GCGGAATTC GGTCCGATCCCTGAGTCCAGC GAGCTGGCACTTCAGGAAC	5' EcoRI	e6bp1 (1-12, 8A)
PK72	GCGGCG CTGCAG CTAAGGACCTCTTCTTTC TTCTCCAAAAGTCCGCAAGTGTCAG	3' PstI	e6bp1 (5-18, 10A)
PK73	GCGGCG CTGCAG CTAAGGACCTCTTCTTTC TTCTCCAAAAGTCCGCAAGTGCCAG	3' PstI	e6bp1 (5-18, 8A, 10A)
MS259	GCGGAATTC TCTAGATTAGGGTAACAAGTC TTCCATGCATGTTGTCCAACAAGACATAC	3' EcoRI, XbaI	11E6 (141-150) 16E6 (136-139)
MS260	GCGGAATTC TCTAGATTACAGCTGGGTTC TCTACGTGTTCTTGATGATCTGCAGCAGTGT AAGC	3' EcoRI, XbaI	16E6 (140-151) 11E6 (137-140)
UN71	ACCATCCTCCAAAATCGG	5'	pGEX (Sequenzierung)
UN79	TGTCAGAGGTTTTACCG	3'	pGEX (Sequenzierung)

fett, Erkennungssequenz der angegebenen Restriktionsendonukleasen
unterstrichen, Sequenz des HA-tags

*, Nummerierung der letzten 5 AS von hDlg/rDlg ist abhängig von der jeweiligen Isoform

2.1.9 Synthetische RNAs für die 'RNA-Interference'

Korrespondierende mRNA (Strang)	RNA-Sequenz
Luciferase (sense)	AAACAUGCAGAAA AUGCUG
Luciferase (antisense)	CAGCAUUUUCUGCAUGUUU
HPV18-E6 (sense)	CUAACUAACACUGGGUUAU
HPV18-E6 (antisense)	AUAACCCAGUGUUAGUUAG
E6AP (sense)	UGAAGCCUGCACGAAUGAG
E6AP (antisense)	CUCAUUCGUGCAGGCUUCA

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

2.2.1.1 Kultivierung und Gefrierlagerung von *E. coli* Bakterien

Kulturen von Bakterien wurden bei 37 °C und ausreichender Belüftung in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikumzusatz über Nacht (ÜN) geschüttelt. Zur Anlage von Dauerkulturen wurden 150 µl Glycerin und 850 µl Bakterien-ÜN-Kultur steril in ein Cryoröhrchen eingefüllt, gemischt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2 Kultivierung und Gefrierlagerung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurden in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 30 °C kultiviert. Falls keine Selektion erforderlich war, wurde YPDA-Vollmedium verwendet. Zur Selektion auf die Gegenwart von Plasmiden, wurde SC-Minimalmedium, dem entsprechende Zusätze fehlten, verwendet. Für die Selektion auf Proteininteraktionen im YTH (Yeast Two Hybrid) wurde SC-Minimalmedium ohne Zusatz von Leucin, Tryptophan, Adenin, Histidin oder Uracil, wie angegeben, verwendet. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Hefekulturen mit 15 % Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.3 Kultivierung und Gefrierlagerung von eukaryontischen Zellen

Säugerzellen wurden auf Polystyrol-Gewebekulturschalen bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und 5 % Kohlendioxid-Atmosphärenanteil kultiviert. H1299 Zellen erhielten RPMI 1640 Medium, alle anderen Zelllinien DMEM. Medien wurden jeweils mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicilin und 0.1 mg/ml Streptomycin versetzt. Alle Zelllinien wurden nach Standardmethoden passagiert. Zur Gefrierlagerung wurden Zellen einer ca. 80 % konfluent bewachsenen 10 cm Gewebekulturschale geerntet und 5 min bei 4 °C und 800 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 3 ml vorgekühltem Einfriermedium (5.9 ml Vollmedium, 1.7 ml FCS, 1 ml DMSO) resuspendiert, zu je 1.5 ml in zwei Cryoröhrchen portioniert, über Nacht bei -80 °C in einer Styroporbox gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2 Präparation und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA

- Mini-Präparation:

Die DNA wurde aus 2 ml Übernachtskultur nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Jones und Schofield, 1990) gewonnen.

- Midi-Präparationen:

Die Präparation erfolgte aus 100 ml Übernachtskultur mit Säulen der Firma Macherey-Nagel gemäß der Vorschrift des Herstellers.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) in Quarzküvetten bestimmt. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} diente als Messgröße für die Reinheit der DNA-Lösung.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 PCR zur Generierung neuer DNA-Konstrukte

Zur Synthese von DNA-Fragmenten wurde die Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet, die aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine sehr geringe Fehlerrate beim Einbau von Nucleotiden aufweist. Die Reaktionen erfolgten mit 40 ng Templat-DNA nach Herstellerangaben.

2.2.3.2 Mutagenisierende PCR

Die Generierung von Zufallsmutationen in einem DNA-Fragment erfolgte publizierten Daten folgend (Spee *et al.*, 1993). Die PCR-Ansätze wurden mit 20 ng Templat-DNA unter Verwendung der Taq-Polymerase (Promega) durchgeführt. Die Ansätze enthielten 5 mM MgCl₂ (anstelle von 2 mM), 200 µM dITP (Desoxy-Inositol-Triphosphat) und jeweils ein Nucleotid (dATP, dCTP, dTTP bzw. dGTP) im Unterschuß, d.h. in einer Konzentration von 20 statt 200 µM. Jeder PCR-Ansatz durchlief 35 Zyklen. Zur Verwendung im YTH wurden die verschiedenen PCR-Ansätze vereinigt.

2.2.4 Analyse und Klonierung von DNA

2.2.4.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Verwendet wurden Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffer der Firmen New England Biolabs und Invitrogen. Die Ansätze enthielten 2 - 5 µg DNA in 30 - 50 µl Reaktionsvolumen und wurden für 2 Stunden bei der jeweils entsprechenden Temperatur im Wasserbad inkubiert.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Proben von zu analysierenden Restriktionsansätzen oder PCR-Reaktionen wurden mit Stopp-Puffer (Endkonzentration: 6 % Saccharose, 0.025 % Bromphenolblau, 0.025 % Xylencyanol, 0.025 M EDTA) versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente

erfolgte auf TAE-Agarosegelen mit einem Agaroseanteil zwischen 0.8 und 2 Gewichtsprozent und einem Zusatz an Ethidiumbromid von 1 µg/ml. Unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) wurde in die DNA interkaliertes Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Der Vergleich zu einem DNA-Marker (vgl. 2.1.4) ermöglichte eine Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

2.2.4.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für präparative Zwecke erfolgte eine Auftrennung von DNA-Fragmenten wie unter 2.2.4.2 beschrieben und eine Detektion der DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366 \text{ nm}$). Entsprechende DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskits QIAEX II der Firma Qiagen isoliert. So gewonnene DNA-Fragmente wurden in 20 – 50 µl Reinstwasser (Sigma) aufgenommen.

2.2.4.4 Ligation

Ligationen erfolgten unter Verwendung von Reaktionspuffer und T4-DNA-Ligase der Firma Gibco nach Angaben des Herstellers. Die Ligationsansätze wurden ÜN bei 14 °C inkubiert.

2.2.4.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation von chemisch kompetenten Bakterien wurden 50 ng Plasmid-DNA bzw. 4 µl eines Ligationsansatzes (vgl. 2.2.4.4) mit 100 µl kompetenten Bakterien vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis belassen. Danach wurde der Ansatz für 1 - 2 min bei 42 °C und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Bakterien für 45 min auf 37 °C erwärmt, zur Selektion resistenter Klone auf einer LB-Platte mit Ampicilin oder Kanamycin ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.4.6 Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen (Elektroporation)

Elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 40 μ l Zellen in eine vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvette (Biorad) gegeben und mit 2 μ l Ligationsansatz versetzt. Anschließend erfolgte ein Stromimpuls durch die Entladung einer Spannung von 2.5 kV bei einer elektrischen Kapazität von 25 μ F und einem Widerstand von 200 Ω . Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und für 1h in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen auf LB-Platten mit Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums ausplattiert und ÜN bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert.

2.2.4.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten durch das Service-Labor des ZMMK (Zentrum für molekulare Medizin Köln) auf einem ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma Applied Biosystems nach der Taq FS BigDye-terminator cycle sequencing Methode.

2.2.5 Proteinexpression- und aufreinigung

2.2.5.1 *In vitro* Translation

Die Proteinsynthese *in vitro* erfolgte unter Verwendung von RRL (Kaninchen-Retikulozytenlysat) oder WG (Weizenkeimextrakt) in Gegenwart von radioaktiv markiertem [³⁵S]-Methionin nach Herstellerangaben (Promega). Entsprechende Ansätze wurden für 2 h bei 25 °C inkubiert. Um überschüssiges, radioaktiv markiertes [³⁵S]-Methionin und andere Substanzen geringen Molekulargewichts aus dem *in vitro* Translatat zu entfernen, wurden die Ansätze einer Gelfiltration unterzogen. Die Gelfiltration erfolgte unter Verwendung von 'MicroSpin G-50 Columns' nach Vorschrift des Herstellers (Amersham Biosciences).

2.2.5.2 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Die Expression von GST-Fusionsproteinen (pGEX-Konstrukte, vgl. 2.1.6.1 und 2.1.7.1) erfolgte im *E. coli*-Stamm DH5 α . Für die Expression wurden zunächst 10 ml LB-Selektionsmedium mit den entsprechenden Bakterien inokuliert und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 250 – 500 ml LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotikum mit der ÜN-Kultur so angeimpft, dass eine OD₆₀₀ von 0.1 erreicht wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ungefähr 0.6 wurden die Kulturen mit IPTG versetzt (Endkonzentration: 0.15 mM) und weitere 4 h geschüttelt. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4 °C), in PBS/Triton (PBS + 1 % Triton-X 100) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (Sonifier W-250 Branson, 3 x 15 Pulse) auf Eis aufgebrochen. Nach Zentrifugation (10000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben aufgereinigt.

2.2.5.3 Expression von His-tag-Proteinen in *E. coli*

Die Expression von His-tag-Proteinen (pET-Konstrukte, vgl. 2.1.7.5) erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). 0.5 - 1 Liter LB-Selektionsmedium wurden mit den entsprechenden Kulturen inokuliert und ÜN bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit IPTG (Endkonzentration: 0.4 mM) versetzt und weitere 12 h bei 30 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000 rpm, 10 min, 4°C) und in 30 ml denaturierendem Lysepuffer (8 M Harnstoff, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM NaH₂PO₄, pH 8.0) resuspendiert und bei 37 °C vorsichtig für 30 min geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien durch Ultraschallbehandlung (Sonifier W-250 Branson, 3 x 15 Pulse) bei RT vollständig aufgebrochen, abzentrifugiert (15000 rpm, 60 min, 20 °C) und wie unter 2.2.5.4.2 beschrieben aufgereinigt.

2.2.5.4 Aufreinigung von Proteinen

2.2.5.4.1 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das Trägermaterial, Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences), wurde zunächst so mit PBS/Triton auf die Pufferbedingungen des Bakterienextraktes so eingestellt, dass das

Volumenverhältnis von Sepharose und flüssigem Überstand 1 zu 1 betrug. Das Bakterienextrakt wurde mit 30 µl Sepharose-Suspension pro 100 ml Bakterienlysat (vgl. 2.2.5.2) versetzt und ÜN bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Danach wurde viermal mit je 1ml PBS/Triton gewaschen und anschließend das GST-Fusionsprotein durch eine 10-minütige Inkubation der Sepharose in Gegenwart von Glutathionlösung (10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) auf Eis eluiert.

2.2.5.4.2 Säulenchromatographische Affinitätsreinigung von His-tag-Proteinen

Die Aufreinigung von His-tag-Proteinen erfolgte an einer FPLC-Anlage (FPLC = Fast Protein Liquid Chromatography) der Firma Amersham Biosciences (Controller VCC-501 Plus, Pump P-500 (2x), Uvicord VW 2251 Detektor, Frac100 Kollektor). Pro His-tag-Protein wurde jeweils eine 1 ml HiTrapTM Chelating HP Säule (Amersham Biosciences) verwendet. Sämtliche Lösungen, inklusive des jeweiligen Proteinextrakts (vgl. 2.2.5.3) wurden durch ein 0.45 µm Filter steril filtriert, um eine Ablagerung von Schwebstoffen in der FPLC-Anlage zu verhindern. Die Säulen wurden mit 10 ml Wasser bei einer Flussrate von 1 ml/min. gewaschen und anschließend bei einer Flussrate von 0.1 ml/min mit 1.5 ml 0.1 M NiCl₂-Lösung behandelt. Überschüssiges NiCl₂ wurde durch Waschen mit 10 ml Wasser bei einer Flussrate von 1 ml/min entfernt. Die so mit Ni²⁺ beladene Säule wurde mit 10 ml denaturierendem Lysepuffer (vgl. 2.2.5.3) äquilibriert und anschließend bei einer Flussrate von 1 ml/min mit dem Proteinextrakt inkubiert. Die Säule wurde mit 30 ml denaturierendem Puffer und anschließend mit 30 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8.0) behandelt, um unspezifisch an die Nickel-Matrix gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der His-tag-Proteine erfolgte durch die Inkubation der Säule mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 8.0) mittels eines Fraktionskollektors in 1 ml-Fractionen. Fractionen, die das entsprechende His-tag-Protein enthielten, wurden vereinigt und an einer Entsalzungssäule in PBS umgepuffert (vgl. 2.2.5.4.3).

2.2.5.4.3 Umpufferung mittels Säulenchromatographie

Eine 5 ml 'Desalting column' (Amersham Biosciences) wurde bei einer Flussrate von 3 ml/min mit 25 ml PBS äquilibriert. Das Eluat an His-tag-Protein (vgl. 2.2.5.4.2) wurde bei einer Flussrate von 3 ml/min auf die Säule injiziert und die Proteinfractionen in 2 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die so gewonnenen His-tag-Proteine wurden durch ein 0.2 µm Filter steril filtriert und in Proteintransduktions-Experimenten (vgl. 2.2.9.8) verwendet.

2.2.6 Analyse von Proteinen

2.2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BioRad Protein-Assays bei einer Wellenlänge von 595 nm nach Angaben des Herstellers an einem Spektrophotometer der Firma BioRad (SmartSpecTM 3000). Relative Absorptionen wurden gegen ein Gemisch aus TNN-Lysepuffer und Bradford-Reagenz (Leerwert) bestimmt. Die Mengen verschiedener Proteinlösungen konnten somit semiquantitativ über ihre relativen Absorptionswerte einander angeglichen werden.

2.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt, wobei je nach Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine die Prozentigkeit des Trenngels (370 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, pH 8.8) zwischen 7.5 und 17.5 % Polyacrylamid-Anteil lag. Das Sammelgel (125 mM Tris-HCl, 0.1 % SDS, pH 6.8) hatte in allen Fällen einen Polyacrylamid-Anteil von 5 %. Zu untersuchende Proteinproben wurden mit Laemmli-Stopp-Puffer versetzt und für 10 min. bei 100 °C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Puffer bei konstantem Strom von 44 mA für 220 min, wobei die maximale Spannung auf 250 V festgesetzt wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte wie unter 2.2.6.3 ff. beschrieben.

2.2.6.3 Coomassie Blau Färbung

Zur Coomassie-Färbung der Proteine wurden die SDS-Gele nach Auftrennung mittels PAGE (vgl. 2.2.6.2) in einer 0.2 %igen Coomassie Blau-Lösung (Coomassie Brilliant Blue, Serva) in 40 % Methanol und 10 % Essigsäure ÜN bei RT geschwenkt. Anschließend wurden die Gele in Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert, bis die gewünschte spezifische Färbung der Proteinbanden erreicht war.

2.2.6.4 Fluorographie

Zur Detektion von [³⁵S]-markierten Proteinen wurden die entsprechenden SDS-Gele (vgl. 2.2.6.2) zuerst für 30 min in Fixierlösung (40 % Methanol, 10% Essigsäure) und anschließend für 15 min in Amplify-Lösung (Amersham Biosciences) geschwenkt. Die Gele wurden bei 80 °C unter Vakuum getrocknet und fluorographiert (Kodak X-OMAT AR Röntgenfilme in Kodak X-Omatic-Filmkassetten). Je nach Intensität der Signale wurden die Filme zwischen 5 und 48 h bei -80 °C exponiert und anschließend entwickelt.

2.2.6.5 Western Blot/ECL

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel (vgl. 2.2.6.2) auf eine PVDF-Membran (Millipore) erfolgte in einer Blotkammer der Firma BioRad bei einer Spannung von 40 V für 150 min bei 4 °C in Transferpuffer. Anschließend wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung (TNE-T, 5 % Magermilchpulver) bei RT geschwenkt. Auch alle weiteren Schritte erfolgten bei RT auf einem Schwenker. Nach Blockierung wurde überschüssiges Magermilchpulver durch Waschen mit TNE-T entfernt. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (vgl. 2.1.3) erfolgte in TNE-T für 1 h. Nach erneutem Waschen mit TNE-T, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (vgl. 2.1.3) in TNE-T für 1 h. Nach intensivem Waschen mit TNE-T wurde nach Herstellerangaben eine ECL-Reaktion (ECL = Enhanced Chemiluminescence) durchgeführt und Kodak X-OMAT AR Röntgenfilme bis zum Erreichen der gewünschten Signalintensität exponiert.

2.2.6.6 Angleichung der Proteinmengen der verwendeten GST-E6-Fusionsproteine

Die verschiedenen GST-E6-Fusionskonstrukte wurden wie unter 2.2.5.2 beschrieben exprimiert und affinitätsgereinigt (vgl. 2.2.5.4.1). Mittels 12.5 % SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2) wurden jeweils 20 µl der erhaltenen Eluate aufgetrennt und durch Coomassie Blaufärbung (vgl. 2.2.6.3) sichtbar gemacht (Abb. 6). Unterschiede in den Intensitäten der verschiedenen Banden wurden abgeschätzt und somit Mengen an Eluat ausgemacht, die ungefähr identische Mengen an GST-Fusionskonstrukt darstellen sollten.

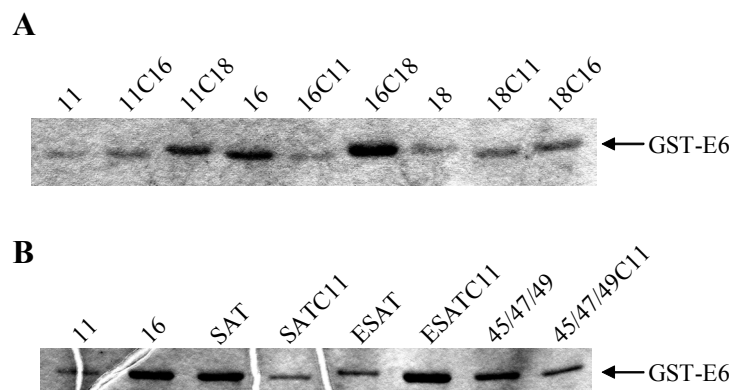


Abb. 6: Angleichung der einzusetzenden Mengen an GST-E6-Fusionsproteinen. Die angegebenen GST-E6-Fusionsproteine wurden jeweils (**A** und **B**) in *E. coli* exprimiert (vgl. 2.2.5.2), affinitätsgereinigt (vgl. 2.2.5.4.1), auf einer 12.5 % SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2) aufgetrennt und mittels Coomassie Blaufärbung (vgl. 2.2.6.3) sichtbar gemacht.

Zur Angleichung der Proteinmengen wurden folgende Faktoren, bezogen auf das stärkste Signal (16C18, Abb. 6A) verwendet:

Faktor:	GST-E6-Konstrukt:
1 x	16C18
1.5 x	16, 11C18, SAT, ESATC11
2 x	45/47/49
3 x	18C11, 18C16, ESAT, 45/47/49C11, 11C16
4 x	11, 16C11, 18, SATC11

2.2.7 *In vitro*-Assays

2.2.7.1 GST-Kopräzipitationsassays

Für die Durchführung von GST-Kopräzipitationsassays wurden GST-Fusionskonstrukte in DH5 α exprimiert (vgl. 2.2.5.2) und affinitätsgereinigt (vgl. 2.2.5.4.1), aber nicht von der Sepharosematrix eluiert. Um vergleichbare Mengen der verschiedenen E6-Konstrukte einzusetzen, wurden zwischen 10 und 40 μ l der mit GST-Fusionsprotein beladenen GSH-Sepharose eingesetzt. Die jeweilige eingesetzte Menge richtete sich dabei nach den in 2.2.6.6 ermittelten Faktoren (16C18: 10 μ l; 16: 15 μ l, etc.), wobei eine konstante Gesamtmenge von 40 μ l an Sepharose durch Zugabe von unbeladener GSH-Sepharose gewährleistet wurde. Den Ansätzen wurden 10 μ l [³⁵S]-markiertes *in vitro* Translatat (vgl. 2.2.5.1.) des möglichen Bindungspartners zugegeben und mit einer 3:1-Mischung von TNN-Lysepuffer und T₂₅N₅₀ auf ein Gesamtvolumen von 200 μ l aufgefüllt. Die Ansätze wurden für 4 h im Rotationsschüttler bei 4 °C inkubiert, dann abzentrifugiert und die Präzipitate viermal mit TNN-Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die Präzipitate mit 2-fach Laemmli-Stopp-Puffer versetzt, 10 min bei 100 °C aufgeköcht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle diente die Auftragung von 2 μ l *in vitro* Translatat des potentiellen Bindungspartners. Die Detektion der radioaktiv markierten Proteine erfolgte durch Fluorographie (vgl. 2.2.6.4).

2.2.7.2 *In vitro*-Ubiquitinierungsassays

In einem Reaktionsvolumen von 40 μ l wurden 1 -3 μ l des *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierten potentiellen Ubiquitinierungssubstrats in Gegenwart von 8 μ g nativem Ubiquitin, 50 ng bakteriell exprimiertem E1, 50 ng bakteriell exprimiertem UbcH7 und Ubc8 und 0.1 – 0.5 μ g in Insektenzellen exprimiertem E6AP inkubiert (Expression und Aufreinigung von E1, UbcH7, Ubc8 und E6AP erfolgten durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Scheffner). Weiterhin enthielten die Ansätze 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl, 4 mM DTT, 4 mM ATP und 4 mM MgCl₂. Zur Untersuchung der HPV E6 abhängigen Ubiquitinierung wurden den Ansätzen entsprechend der unter 2.2.6.6 ermittelten Faktoren GST-E6-Fusionkonstrukte zugesetzt (16C18: 2 μ l; 16: 3 μ l, etc.). Ein Gesamtvolumen von 40 μ l wurde mit T₂₅N₅₀ eingestellt. Nach einer zweistündigen

Inkubation bei 30 °C wurden die Ansätze mit 2-fach Laemmli-Sopp-Puffer versetzt, 10 min bei 100 °C aufgeköcht, in einer SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2) aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie (vgl. 2.2.6.4) sichtbar gemacht.

2.2.8 Yeast Two Hybrid (YTH)

2.2.8.1 Transformation der pPC97-Konstrukte

pPC97-Konstrukte (vgl. 2.1.6.2) wurden nach der Lithiumacetatmethode (Gietz und Woods, 2002) in den *S. cerevisiae* Stamm KF1 transformiert und auf SC-Minimalmedium-Platten ohne Leucinzusatz für 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert. So generierte Hefekulturen dienten als Ausgangshefekulturen für die Transformation von pAD-Konstrukten oder von geschnittenem pAD-Vektor und PCR-Fragment zur *in vivo* Rekombination.

2.2.8.2 Transformation der pAD-Konstrukte und Replika-Charakterisierung

Entsprechende Kulturen von pPC97-Konstrukten enthaltene Hefen (vgl. 2.2.8.1) wurden nach der Lithiumacetatmethode (Gietz und Woods, 2002) mit pAD-Konstrukten transformiert. SC-Minimalmedium-Platten ohne Leucin- und Tryptophanzusatz (LT-Platte) wurden zur Selektion benutzt. Auf diesen Platten können nur Hefen wachsen, die sowohl einen pPC97-als auch einen pAD-Vektor besitzen. Zur Charakterisierung von Interaktionen wurden zu untersuchende Klone auf einer LT-Platte ausgestrichen und am nächsten Tag mittels Replika auf eine weitere LT-Platte überführt (pre-clear). Von dieser Platte wurden anschließend die Hefen mittels Replika auf SC-Minimalmedium-Platten ohne Zusatz von Histidin (LT,His), Adenin (LT,Ade) oder Uracil (LT,Ura) überführt, bei 30 °C inkubiert und das Wachstum, d.h. die Aktivierung von Reporter genen, täglich kontrolliert.

2.2.8.3 *In vivo* Rekombination

Die Transformation von linearisiertem pAD- oder pAD-TRX-Vektor und entsprechenden PCR-Produkten erfolgte nach der Lithiumacetatmethode (Gietz und Woods, 2002). Ein

Hefestamm, der das entsprechende pPC97-Konstrukt enthielt, wurde in 50 ml SC-Medium ohne Leucinzusatz angeimpft und ÜN bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde so aus der ÜN-Kultur in 150 ml YPDA überimpft, dass sich eine optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) von 0.15 – 0.2 ergab. Die Kultur wurde solange bei 30 °C inkubiert, bis eine OD_{600} von 0.8 – 1.0 erreicht war. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (3000 x g, 5 min, RT), mit 75 ml sterilem Wasser gewaschen, in 6 ml Lithiumacetat (pH 8.0 – 9.0) resuspendiert und für 15 min auf 30 °C erwärmt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (s.o.) und das erhaltene Pellet mit Transformationsmischung überschichtet. Dazu wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zugegeben: 7.2 ml 50 % PEG 3350, 1.08 ml 1 M Lithiumacetat, 1.5 ml einzelsträngige DNA (Kalbthymus-DNA, 2 mg/ml, ROTH), 18 µl linearisierter pAD-Vektor (1 µg/µl), 40 µl PCR-Produkt und 962 µl steriles Wasser. Der Ansatz wurde bis zur vollständigen Resuspension des Pellets gevortext und anschließend für 30 min auf 30 °C erwärmt. Nach einem anschließenden Hitzeschock für 40 min bei 42 °C, wurden die Zellen abzentrifugiert und in 40 ml sterilem Wasser resuspendiert. Je 400 µl der transformierten Hefen wurden auf 10 cm SC-Minimalmedium-Platten ohne Zusatz an Leucin, Tryptophan und Adenin (pAD) oder Uracil (pAD-TRX) ausgestrichen und bei 30 °C in einem Brutschrank inkubiert. Als Positiv- und Negativkontrolle diente die Transformation von PCR-Produkten mit Sequenzen für Peptide mit bekannten Interaktionseigenschaften.

2.2.8.4 Bestimmung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz bestimmen zu können, wurden die im Rahmen der 'In vivo Rekombination' transformierten Hefen (vgl. 2.2.8.3) in unterschiedlichen Verdünnungen (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000) auf Selektionsplatten ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausgestrichen. Nach drei Tagen wurden die Anzahl der Klone (cfu, colony formation units) auf den verschiedenen Platten ermittelt und die Transformationseffizienz nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Cfu} \times \text{Resuspensionsvolumen}}{\text{Ausplattiertes Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{eingesetzte Menge an linearisiertem Vektor}}$$

2.2.8.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Um pAD-Vektoren aus Hefeklonen zu isolieren, wurden 3 ml ÜN-Kulturen in SC-Minimalmedium ohne Zusatz an Tryptophan angelegt. 1.5 ml der ÜN-Kultur wurden abzentrifugiert, in 200 µl STET-Puffer resuspendiert, mit 0.2 g Glasperlen (0.4 – 0.5 mm Durchmesser) versetzt und die Zellen für 5 min im Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Nach erneutem Zusatz von 200 µl STET-Puffer wurden die Zellen 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend abzentrifugiert (13200 rpm, 10 min, 4 °C). Zu 350 µl des Überstandes wurden 175 µl 7.5 M Ammoniumacetat-Lösung gegeben und die Ansätze für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (13200 rpm, 20 min, 4 °C), wurde der Überstand abgenommen, mit dem doppeltem Volumen an eiskaltem Ethanol versetzt und die Plasmid-DNA 1 h bei -20 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13200 rpm, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet dreimal mit eiskalter 70 %-iger Ethanol-Lösung gewaschen, getrocknet und in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen. Anschließend wurden MC1061 Bakterien mit 5 µl der erhaltenen Plasmid-Lösung mittels Elektroporation (vgl. 2.2.4.6) transformiert und auf M9-Selektionsplatten (vgl. 2.1.1) ausgestrichen. Positive Klone wurden in LB-Medium mit Ampicilinzusatz ÜN inkubiert und die Plasmid-DNA wie unter 2.2.2.1 beschrieben isoliert.

2.2.9 *In vitro* Zellkultur (*in vivo* Untersuchungen)

2.2.9.1 Transiente Transfektion

Für transiente Expressionen wurden Zellen in 6 cm oder 10 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 – 95 % nach Herstellerangaben mittels Lipofektion (Lipofectamine2000, Invitrogen) transfiziert. In allen Fällen entfielen 5 - 10 % der Gesamtmenge an transfizierter DNA auf den Vektor CMV-Gal, was eine Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität ermöglichte (s.u.). 24 h nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in Anwesenheit von 500 µl PBS geschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (6000 rpm, 1 min) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl TNN-Lysepuffer für 30 min auf Eis

inkubiert. Nach der Zentrifugation (13200 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden je 10 µl Lysat in Doppelbestimmungen eingesetzt, um die β-Galaktosidase-Aktivität zu bestimmen. Auf Eis wurden in einer 96-Loch-Platte 120 µl Puffer Z vorgelegt und anschließend mit 10 µl Zell-Lysat versetzt. Nach Zusatz von 5 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml Ortho-Nitorphenyl-β-D-galactopyranosid, 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.0) wurden die Ansätze durch vorsichtiges Schütteln der 96-Loch-Platte homogenisiert und lichtgeschützt bei 37 °C bis zum Erreichen einer deutlichen Gelbfärbung inkubiert. Die Messung der Absorptionen erfolgte an einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 410 nm. Als Nullwert diente Lysat von nicht transfizierten Zellen.

2.2.9.2 Transfektion zur Erzeugung stabil exprimierender Zellpopulationen

Die Zellen wurden auf 6 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90 – 95 % mit 2 µg des entsprechenden DNA-Konstrukts mittels Lipofektion (vgl. 2.2.9.1) transfiziert und nach 24 h auf 10cm Kulturschalen überführt. Nach weiteren 24 h wurden den Zellen entsprechendes Selektionsantibiotikum zugesetzt, um auf die vom transfizierten Vektor vermittelte Resistenz hin zu selektionieren. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle für eine effiziente Selektion. Alle 3 Tage erfolgte ein Mediumwechsel inkl. Antibiotikum-Zusatz. Stabil exprimierende Zellkolonien wurden vereint und nach Erreichen der Konfluenz entsprechenden Untersuchungen unterzogen.

Im Falle der Zelllinien HeLa pSuperp53/pEF A1 und C2 wurden den Zellen 700 µg/ml Neomycin (pEF vermittelt Neomycin-Resistenz) und zur Selektion auf die transfizierten Konstrukte pSilencerX bzw. pSilencerE6AP 200 µg/ml Hygromycin zugesetzt.

2.2.9.3 Halbwertszeitmessungen mit Hilfe von Cycloheximid

Zur Halbwertszeitmessung unter Verwendung von Cycloheximid (SIGMA) wurden die jeweiligen Zellen auf 6 cm Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Dann wurde das jeweilige Vollmedium durch Medium ersetzt, dem 50 µg/ml des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid (Stammlösung: 100 mg in 1 ml Methanol)

zugemischt worden war. Anschließend wurden die Zellen für 0, 2, 4 und 8 h inkubiert. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, geschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (6000 rpm, 1 min) wurde der Überstand verworfen, die Zellpellets in 150 µl TNN-Lysepuffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und bei 4 °C und 13200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C eingefroren.

Nach Abgleichung der einzusetzenden Volumina an Lysat durch Bestimmung der Proteinkonzentrationen (vgl. 2.2.6.1), wurden die Proteine auf einer SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2) aufgetrennt und mittels Western Blot/ECL (vgl. 2.2.6.5) detektiert.

2.2.9.4 Stabilisierung von Proteinen, die über das 26S Proteasom degradiert werden

Zellen wurden auf 6 cm Kulturschalen ausgesät und nach Erreichen einer angemessenen Konfluenz (20 % für Untersuchungen mit hDlg) mit einem Proteasom-Inhibitor versetzt. Dazu wurde zuerst das Medium abgesaugt und anschließend jede Platte mit 5 ml Vollmedium versetzt. Zum Vollmedium wurden 5 µl DMSO oder 5 µl einer 10 mM Stocklösung (in DMSO) des Proteasom-Inhibitors MG132 (SIGMA) pipettiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellpellets wie unter 2.2.9.3 beschrieben gewonnen und aufgearbeitet.

2.2.9.5 'In vivo' Ubiquitinierungsassays

H1299 Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen bei einer Konfluenz von 90 – 95 % mittels Lipofektion transient transfiziert (vgl. 2.2.9.1). Dabei wurden 4 µg Expressionskonstrukt (für das zu untersuchende Protein kodierend), 10 µg CMV-His-Ub und 6 µg CMV kotransfiziert. Um einen Einfluss von HPV E6-Proteinen auf die Ubiquitinierung zu untersuchen wurden anstelle des Vektors CMV 6 µg eines Expressionskonstrukts kotransfiziert, welches für ein E6 Protein kodiert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Gewinnung von Zellpellets wie unter 2.2.9.3 beschrieben. Die Zellpellets wurden in 200 µl GuHCl-Lysepuffer resuspendiert, 60 min auf Eis inkubiert und anschließend mit weiteren 300 µl GuHCl-Lysepuffer versetzt. Nach Zusatz von 30 µl Protein-A-Sepharose (in GuHCl-Lysepuffer) wurden die Ansätze für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler

inkubiert und anschließend zentrifugiert (13200 rpm, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde in eines neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, in GuHCl-Lysepuffer) versetzt und ÜN bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze abzentrifugiert (13200 rpm, 2 min, 4 °C) und das Präzipitat zweimal mit GuHCl-Lysepuffer, zweimal mit einer Lösung aus einem Teil GuHCl-Lysepuffer und 4 Teilen Imidazol-Lösung (20 mM Imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8) und abschließend zweimal mit Imidazol-Lösung gewaschen. Die Präzipitate wurden mit Imidazol-Stopp-Puffer (2-fach Laemmli-Stopp-Puffer, 200 mM Imidazol) versetzt, 10 min bei 100 °C aufgekocht, auf einer SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2) aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot/ECL (vgl. 2.2.6.5) detektiert.

Als Expressionskontrolle des zu untersuchende Proteins diente eine transiente Transfektion von 2 µg des entsprechende Expressionskonstrukts in H1299 Zellen auf 6 cm Kulturschalen. Die Aufbereitung dieser Zellen erfolgte wie unter 2.2.9.1 beschrieben.

2.2.9.6 'RNA Interference'

Synthetische einzelsträngige 'sense' und 'antisense' RNAs (vgl. 2.1.9) wurden nach Angaben des Herstellers 'annealed' (Dharmacon Research, Inc.), so dass die gebrauchsfertigen Lösungen an kurzer doppelsträngiger RNA (siRNA) eine Endkonzentration von 20 µM aufwiesen. Zu transfizierende Zellen wurden auf 3.5 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 30 – 50 % nach Herstellerangaben mit einer Menge an siRNA von 200 pmol transfiziert (Oligofectamine, Invitrogen). 24, 48 und 72 h nach der Transfektion wurden Zellpellets gewonnen und wie unter 2.2.9.3 beschrieben aufbereitet und die Proteine detektiert.

Zur Quantifizierung des 'knock down' von E6AP auf Proteinebene wurden Zellen auf 6 cm Kulturschalen mit 600 pmol siRNA transfiziert und Zellpellets nach 72 h gewonnen. Oder es wurden Zellen mit einem stabil exprimierendem vektorbasierten RNAi Konstrukt auf 10 cm Kulturplatten kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz Zellpellets gewonnen. Zur Detektion von E6AP wurden Immunpräzipitationen durchgeführt.

2.2.9.7 Immunpräzipitation von E6AP

Die Zellpellets (vgl. 2.2.9.6) wurden in 1 ml (Pellets von 10 cm Kulturplatten) oder 500 µl (Zellen von 6 cm Kulturschalen) TNN-Lysepuffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und der Überstand nach Zentrifugation (13200 rpm, 30 min, 4 °C) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Angleichung der einzusetzenden Mengen der verschiedenen Lysate wurde durch die Bestimmung ihre Proteinkonzentration (vgl. 2.2.6.1) vorgenommen. Alle Ansätze wurden mit TNN-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml (10 cm Kulturschalen) oder 500 µl (6 cm Kulturschalen) eingestellt. Nach Zusatz von 30 µl Protein-A-Sepharose wurden die Ansätze für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 1 min) wurde der Überstand mit 3 µl eines monoklonalen E6AP Antikörpers versetzt und für 1 h bei 4 °C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Nach Zusatz von 50 µl Protein-A-Sepahrose erfolgte unter identischen Bedingungen eine Inkubation ÜN. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (3000 rpm, 1 min) und viermal mit TNN-Lysepuffer gewaschen. Die Präzipitate wurden mit 2-fach Laemmli-Stopp-Puffer versetzt, 10 min bei 100 °C aufgekocht, in einer 7.5 % SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2) aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot/ECL (vgl. 2.2.6.5) unter Verwendung eines polyklonalen E6AP Primärantikörpers sichtbar gemacht.

2.2.9.8 Protein Transduktion

His-tag-GFP-Fusionsproteine (vgl. Abb.28) wurden nach Affinitätsreinigung (vgl. 2.2.5.4.2) durch Bestimmung ihrer Proteinkonzentration (vgl. 2.2.6.1) in ihren einzusetzenden Mengen einander angeglichen. Anschließend erfolgte eine Kontrolle der Reinheit und der Proteinmengen durch Coomassie Blaufärbung (vgl. 2.2.6.3) nach Auftrennung auf einer 12.5 % SDS-PAGE (vgl. 2.2.6.2). Entsprechende Mengenverhältnisse wurden bei Proteintransduktions-Experimenten beibehalten. Für Transduktionsexperimente wurden Zellen in 24-Loch-Platten auf Glasscheiben (cover slips) oder in 3.5 cm Platten kultiviert. Zellen wurden mit Medium ohne oder mit Zusatz von 10 % FCS überschichtet und nach Zugabe der verschiedenen Fusionsproteine für 4 h in einem Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Ansätze in 3.5 cm Kulturschalen dienten dem Nachweis von transduziertem GFP-Fusionsprotein mittels Western Blot/ECL.

Dazu erfolgte eine Aufbereitung der Zellen wie unter 2.2.9.3 beschrieben. Experimente in 24-Loch-Platten mit cover slips dienten der Untersuchung von Proteintransduktionen mittels Fluoreszenzmikroskopie (vgl. 2.2.9.9).

2.2.9.9 Fluoreszenzmikroskopie

Zellen auf cover slips wurden nach einem Transduktionsexperiment (vgl. 2.2.9.8), zunächst dreimal mit PBS/BSA (PBS, 3 % Bovines Serum Albumin) gewaschen und anschließend für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer 9:1-Methanol/Aceton-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Anfärbung von Zellkernen mittels DAPI-Reagenz (DAPI = 4', 6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid, Mobitec). Dazu wurden die Zellen mit einer Lösung von $0.1\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI-Reagenz in PBS überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. Zellen wurden anschließend viermal mit PBS gewaschen, cover slips danach in Wasser und dann in Ethanol getaucht und luftgetrocknet. Trockene cover slips wurden mittels Gelvatol-Lösung (100 mg/ml Gelvatol, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 2.5 % DABCO (1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octan), 25 % Glycerol) auf Objektträgern befestigt und lichtgeschützt ÜN bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ belassen, um ein vollständiges Aushärten des Gelvalols zu erreichen. Am nächsten Tag wurden die Proben an einem Fluoreszenzmikroskop bei entsprechenden Wellenlängen (DAPI-Anregung: $\lambda = 340\text{ nm}$, DAPI-Emission: $\lambda = 588\text{ nm}$; eGFP-Anregung: $\lambda = 488\text{ nm}$, eGFP-Emission: $\lambda = 507\text{ nm}$) untersucht.

2.2.9.10 Erzeugung von Retrovirus-produzierenden Zellen

Psi-2 Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 – 90 % mit $8\text{ }\mu\text{g}$ der jeweiligen retroviralen Plasmid-DNA mittels Lipofektion (Lipofectamine2000, Invitrogen) transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch 5 ml frisches Vollmedium ersetzt. Am selben Tag wurden PA317 Zellen so auf 6 cm Kulturschalen ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50 % besitzen sollten. Am folgenden Tag wurde der Überstand der transfizierten Psi-2 Zellen abgenommen, für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und der Überstand durch ein $0.45\text{ }\mu\text{m}$ -Filter steril filtriert. 2 ml dieser Lösung wurden mit 1 ml Vollmedium und $20\text{ }\mu\text{g}$ Polybrene versetzt und homogenisiert. Das Medium der PA317 Zellen (bei 50 %

Konfluenz) wurde abgesaugt und die Zellen anschließend mit dem Überstand/Polybrene-Gemisch überschichtet und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Infektionsgemisch abgesaugt und die infizierten PA317 Zellen mit 10 ml Vollmedium überschichtet. Nach weiteren 24 h wurde das Medium durch Vollmedium mit einem Gehalt von 1 mg/ml Geneticin ersetzt. Alle 3 Tage wurde ein Mediumwechsel inklusive Geneticin-Zusatz durchgeführt. Selektionierte Kolonien wurden vereint und nach Erreichen der Konfluenz die Effizienz der Virusproduktion durch die Bestimmung des Virustiters ermittelt.

2.2.9.11 Virustiter

NIH 3T3 Zellen wurden so auf 24-Loch-Platten ausgesät, dass pro Loch 1 x 10³ Zellen vorlagen. Virusproduzierende PA317 Zellen (vgl. 2.2.9.10) wurden von einer ca. 80 % konfluent bewachsenen 10 cm Kulturschale im Verhältnis 1:4 auf eine neue 10 cm Kulturschale transferiert. Nach Adhäsion an den Schalenboden (am selben Tag) wurde das Selektionsmedium (vgl. 2.2.9.10) abgenommen und die Zellen mit 6 ml Vollmedium (ohne Geneticin-Zusatz) überschichtet und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand der PA317 Zellen abgenommen, für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und durch ein 0.45 µm-Filter steril filtriert. 3.5 ml wurden mit 14 µg Polybrene (= 4 µg/ml Polybrene) versetzt (10⁰-Verdünnung); mit dem restlichen Überstand wurden sukzessive Verdünnungen in Vollmedium erzeugt, 1:10 (10⁻¹), 1:100 (10⁻²) bis einschließlich 1:10000000000 (10⁻¹⁰) und jeweils mit 4 µg/ml Polybrene versetzt. Das Medium über den NIH 3T3 Zellen wurde abgesaugt und in Form einer Dreifachbestimmung jeweils durch 1 ml der jeweiligen Verdünnung (10⁰ bis 10⁻¹⁰) ersetzt. Nach 24 h wurde der Überstand über den NIH 3T3 Zellen abgenommen und durch Selektionsmedium (DMEM + 600 µg/ml Geneticin) ersetzt. Alle 3 Tage erfolgte ein Wechsel an Selektionsmedium. Nach insgesamt 14 Tagen Selektionierung erfolgte eine Anfärbung der gewachsenen Zellkolonien. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min bei RT mit je 200 µl Färbelösung (35.5 ml PBS + 13.5 ml Formalin + 1g crystal violet) überschichtet. Anschließend wurden die 24-Loch-Platten ausgiebig mit destilliertem Wasser gereinigt und die Anzahl an Zellkolonien pro Loch ausgezählt. Der Virustiter entspricht der Anzahl der Zellkolonien multipliziert mit der eingesetzten Virusverdünnung (10⁰, 10⁻¹, etc.) multipliziert mit 10⁻¹/ml.

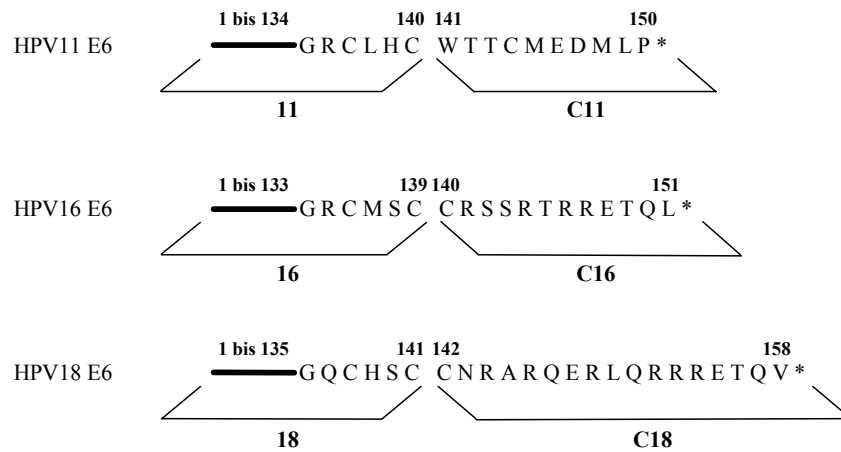
3 Ergebnisse

Die *in vitro* Immortalisierung von primären Keratinozyten durch HPV Onkogene stellt ein geeignetes Modellsystem dar, um die onkogenen Eigenschaften der HPV Onkoproteine zu untersuchen (vgl. 1.3.2.1). So sollten in dieser Arbeit biochemische Funktionen des HPV E6 Proteins mit dem Verhalten in der *in vitro* Immortalisierung von primären Keratinozyten korreliert werden.

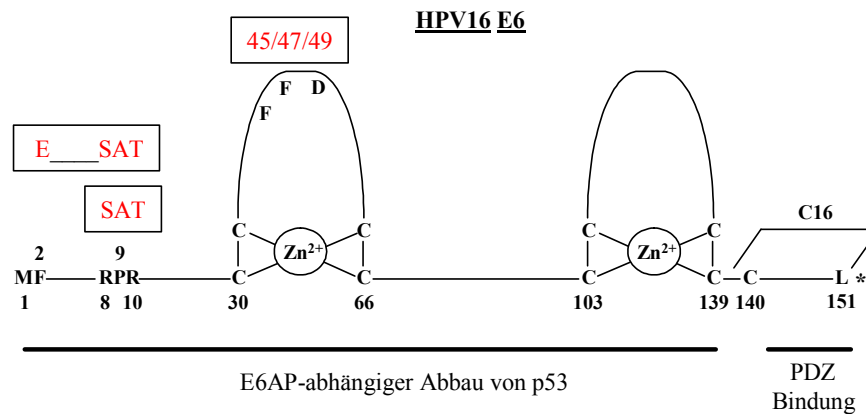
3.1 Generierung der E6 Mutanten

Es wurde eine Reihe von E6 Mutanten generiert, die sich publizierten Daten folgend in ihren Wechselwirkungen mit p53, E6AP und PDZ-Proteinen unterscheiden sollten. Zur Verfügung standen Sequenzen für die 'high risk' E6 Proteine der HPV-Typen 16 (16E6) und 18 (18E6) und für E6 des 'low risk' HPV-Typen 11 (11E6) (Abb. 7A). Im Gegensatz zu 'low risk' sind 'high risk' E6 Proteine in der Lage, funktionell mit p53, E6AP und PDZ-Proteinen zu wechselwirken. Dabei ist der extreme C-Terminus für die Wechselwirkung mit PDZ-Proteinen essentiell, für die funktionelle Interaktion mit p53 und E6AP hingegen nicht (vgl. 1.3.2.4 und Abb. 7B). Aus diesem Grund wurden chimäre Formen von E6 konstruiert, die sich von der jeweiligen Wildtyp-Sequenz dadurch unterscheiden, dass ihr extremer C-Terminus für die Sequenz eines E6 Proteins eines anderen HPV-Typen kodiert. Mit Chimären dieser Art sollte eine Unterscheidung zwischen einer Interaktion von E6 mit PDZ-Proteinen auf der einen Seite und p53 und E6AP auf der anderen Seite möglich sein (Abb. 7C und Tabelle 2). Zur weiteren Differenzierung zwischen p53 und E6AP wurden zusätzlich zwei etablierte Mutanten von 16E6 verwendet, die in ihren Wechselwirkungen mit p53 und E6AP bereits charakterisiert wurden (Kiyono *et al.*, 1998; Kao *et al.*, 2000; Crook *et al.*, 1991). Diese Mutanten werden als SAT bzw. 45/47/49 bezeichnet und kodieren an einigen Positionen anstelle der Aminosäuren von HPV16 E6 für Aminosäuren von 'low risk' E6 Proteinen (Abb. 7B). Eine erweiterte Form der Mutante SAT wurde generiert, indem die Aminosäure 2 (F) gegen die Aminosäure 2 (E) des 'low risk' HPV11 E6 ausgetauscht wurde (Abb. 7B). Diese Mutante wurde als ESAT bezeichnet und sollte in ihren Wechselwirkungen, die von einem extremen 'high risk' E6 N-Terminus abhängen, noch stärker gestört sein als die Mutante SAT.

A



B



C

		p53	E6AP	PDZ
HPV11 E6	11 C11	-	-	-
HPV16 E6	16 C16	+	+	+
16C11	16 C11	+	+	-
11C16	11 C16	-	-	+

Abb. 7: (A) Vereinfachte Darstellung der Aminosäuresequenzen von HPV11, 16 und 18 E6 im Einbuchstabencode und Definition der variablen Regionen für die Chimaeren-Generierung. (B) Schematischer Aufbau von HPV16 E6. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Bekannte Interaktionsbereiche und kritische Aminosäuren sind dargestellt. PDZ, PSD95/Dlg/ZO-1 homologe Domäne. Zn²⁺, 2-fach positiv geladenes Zink-Ion. (C) Schematische Darstellung des Prinzips der Generierung der E6-Chimären und deren potentiellen Wechselwirkungen am Beispiel von HPV11 und HPV16 E6. PDZ, siehe (B). '-', keine stabile Interaktion. '+', stabile Interaktion.

Tabelle 2: Beschriebene und postulierte Induktion von Polyubiquitinierung und Degradation der angegebenen Proteine durch die E6-Konstrukte *in vitro* und *'in vivo'*.

E6-Konstrukt	Substratprotein:			
	p53	E6AP	rDlg	Scribble
11 E6	-	-	-	-
16 E6	+	+	+	+
18 E6	+	+	+	+
11C16	-	-	+	-
11C18	-	-	+	-
16C11	+	+	-	-
16C18	+	+	+	+
18C11	+	+	-	-
18C16	+	+	+	+
SAT	-	+	+	+
SATC11	-	+	-	-
SATC18	-	+	+	+
ESAT	-	+	+	+
ESATC11	-	+	-	-
ESATC18	-	+	+	+
45/47/49	-	-	+	-
45/47/49C11	-	-	-	-
45/47/49C18	-	-	+	-

*, unter der Prämisse, dass die Mutationen nicht die Wechselwirkung mit der bisher nicht identifizierten (vgl. 1.3.2.4) Ligase betreffen

Die Interaktionen der E6 Mutanten mit den PDZ-Proteinen rDlg und Scribble wurde charakterisiert, da der E6-vermittelten Degradation dieser potentiellen Tumorsuppressoren eine mögliche kausale Rolle in der HPV assoziierten Karzinogenese zukommt. Weil der Abbau von hDlg als E6AP-unabhängig beschrieben ist (vgl. 1.3.2.4), diente Scribble als Kontrolle für eine E6AP-abhängige Degradation eines PDZ-Domänen enthaltenen Proteins durch 'high risk' E6 Onkoproteine (vgl. 1.3.2.4).

Freundlicherweise wurden Expressionskonstrukte für humanes Scribble und Dlg zur Verfügung gestellt (J.M. Huibregtse, L. Banks). Eine vollständige Sequenzierung des für Dlg kodierenden Bereichs zeigte, dass es sich nicht um humanes Dlg, sondern um Dlg aus *Rattus Norvegicus* (rDlg) handelte. Von allen möglichen Insertionen (vgl. Abb. 5) enthielt das in dieser Arbeit verwendete rDlg die Insertionen I1B, I3 und I5 (McLaughlin *et al.*, 2002). Ein Vergleich mit der entsprechenden Isoform von hDlg (I1B, I3, I5) ergab, dass zwischen den beiden Proteinen eine Identität auf Aminosäureebene von 90 % besteht. Somit ist die Wahrscheinlichkeit recht hoch, dass Aussagen über rDlg auch auf hDlg zutreffen, was allerdings im Einzelfall jeweils nachzuweisen ist.

3.2 Wechselwirkungen von HPV E6 mit rDlg und Scribble *in vitro* und in transienten Transfektionsexperimenten

3.2.1 Kopräzipitation und Ubiquitinierung von rDlg durch HPV E6 *in vitro*

Um die Interaktionen der verschiedenen E6-Konstrukte (vgl. Tabelle 2) mit rDlg *in vitro* zu untersuchen, wurde rDlg in Weizenkeimextrakt (WG) oder Kaninchen Retikulozytenlysate (RRL) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem [³⁵S]-Methionin 2h bei 30 °C translatiert. Anschließend wurde das *in vitro* translatierte, [³⁵S]-markierte rDlg mit an GSH-Sepharose gebundenen GST-E6-Konstrukten vier Stunden bei 4 °C inkubiert (GST-Kopräzipitationsassay). Danach wurden die Ansätze abzentrifugiert, die GSH-Sepharose gewaschen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die von E6 kopräzipitierten Proteine mittels Fluorographie sichtbar gemacht.

Die Bindung von E6 an rDlg wies eine Abhängigkeit vom C-Terminus eines 'high risk' E6-Onkoproteins auf (Abb. 8). So konnten sämtliche E6-Konstrukte, die den C-Terminus eines 'high risk' E6 Onkoproteins besaßen (16, 18, XC16, XC18), rDlg kopräzipitieren, alle E6-Konstrukte mit dem C-Terminus des 'low risk' E6 Onkoproteins (11, XC11) waren dazu hingegen nicht in der Lage (Abb. 8A und B).

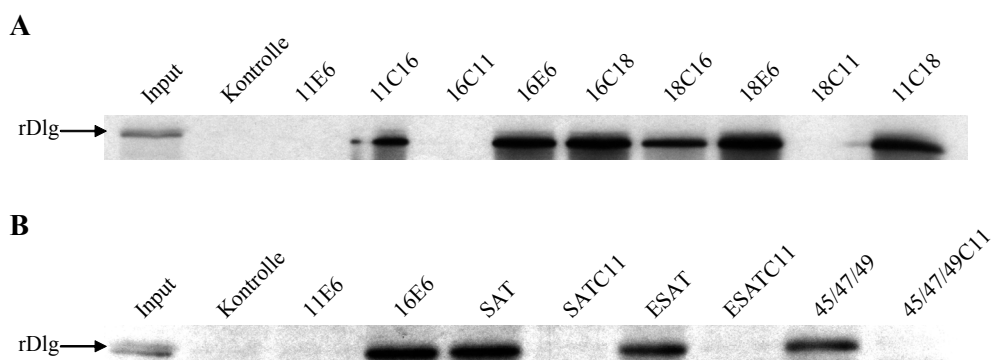


Abb. 8: Die Bindung von HPV E6 an rDlg *in vitro* ist abhängig vom extremen C-Terminus von 'high risk' E6 Proteinen. (A) + (B) Vergleichbare Mengen GST-E6 (vgl. 2.2.6.6) bzw. GST (Kontrolle) wurden mit *in vitro* translatiertem (RRL), [³⁵S]-markiertem rDlg 4 h bei 4 °C inkubiert und mit GSH-Sepharose präzipitiert (vgl. 2.2.7.1). Die kopräzipitierten Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und fluorographisch sichtbar gemacht. Input, 20 % der eingesetzten Menge an *in vitro*-Translatat.

Mutanten des 'high risk' 16E6 Onkoproteins, die nicht mehr mit E6AP und/oder p53 wechselwirken konnten (Daten nicht gezeigt), aber über ein intaktes PDZ-Bindemotiv verfügten (45/47/49, SAT, ESAT, vgl. Tabelle 2), konnten rDlg kopräzipitieren (Abb. 8B). Alle gezeigten GST-Kopräzipitationsassays (Abb. 8A und B) wurden mit rDlg wiederholt, welches in WG translatiert und radioaktiv markiert wurde (Daten nicht gezeigt). Da WG nicht über E6AP oder Homologe verfügt und alle Beobachtungen denen zuvor in RRL gemachten entsprachen, war dies ein deutlicher Hinweis auf eine E6AP-unabhängige Bindung von 'high risk' E6 Proteinen an rDlg *in vitro*.

Für hDlg ist ein proteasomaler Abbau durch 'high risk' HPV E6 Proteine '*in vivo*' beschrieben (Gardiol *et al.*, 1999), wobei hDlg E6-abhängig polyubiquitiniert und degradiert wird. Da hDlg auch in *in vitro* Abbauassays von 'high risk' E6 Proteinen degradiert wird (Gardiol *et al.*, 1999), wurde in einem nächsten Schritt zuerst dieser '*in vitro*-Abbau' auch für das vorliegende rDlg-Konstrukt untersucht. Da in diesen Assays kein Abbau von rDlg *in vitro* zu erkennen war (Daten nicht gezeigt, vgl. 4.1.1), sollte untersucht werden, ob HPV E6 Proteine eine Ubiquitinierung von rDlg *in vitro* induzieren können. Dazu wurde in Ubiquitinierungsassays (vgl. 2.2.7.2) *in vitro* translatiertes, [³⁵S]-markiertes rDlg mit den jeweiligen E6 Konstrukten, die als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt wurden, bei 30 °C inkubiert. Nach 2 Stunden wurden die Ubiquitinierungsreaktionen abgestoppt, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie detektiert, wobei modifizierte Proteine aufgrund ihres erhöhten Molekulargewichts vom unmodifizierten Protein unterschieden werden können.

In einem ersten Versuch, der nach einem in dieser Arbeitsgruppe etabliertem Protokoll (vgl. 2.2.7.2) durchgeführt wurde, konnte eine Ubiquitinierung von rDlg durch 18 E6 beobachtet werden. Da dieses Standardprotokoll den Zusatz von rekombinantem E6AP beinhaltet, welches für den beschriebenen Abbau von hDlg *in vitro* nicht benötigt wird (Pim *et al.*, 2000), wurde der Einfluss der Komponenten E6, E6AP und Ubiquitin auf die Ubiquitinierung von rDlg *in vitro* untersucht. Für diese Untersuchungen erfolgte eine *in vitro* Translation von rDlg in WG, da WG im Gegensatz zu RRL kein endogenes E6AP bzw. Homologe besitzt (s.o.). In diesen Assays wurde jeweils einem Ansatz kein rekombinantes 18E6, E6AP bzw. Ubiquitin zugesetzt.

In Anwesenheit aller Komponenten wurde rDlg polyubiquitiniert (Abb. 9A). In Abwesenheit von entweder 18E6, Ubiquitin oder E6AP war keinerlei Modifikation zu erkennen (Abb. 9A). Zwar war die Ubiquitinierung für die Translatate geringeren

Molekulargewichts sehr effizient, aber die Zuordnung der Effekte auf Gesamtlängen-rDlg erschien problematisch, da nicht in jedem durchgeführten Assay auch eine deutliche Abnahme des Signals an Gesamtlängenprotein zu beobachten war (vgl. Abb. 9A und 9C für 18E6).

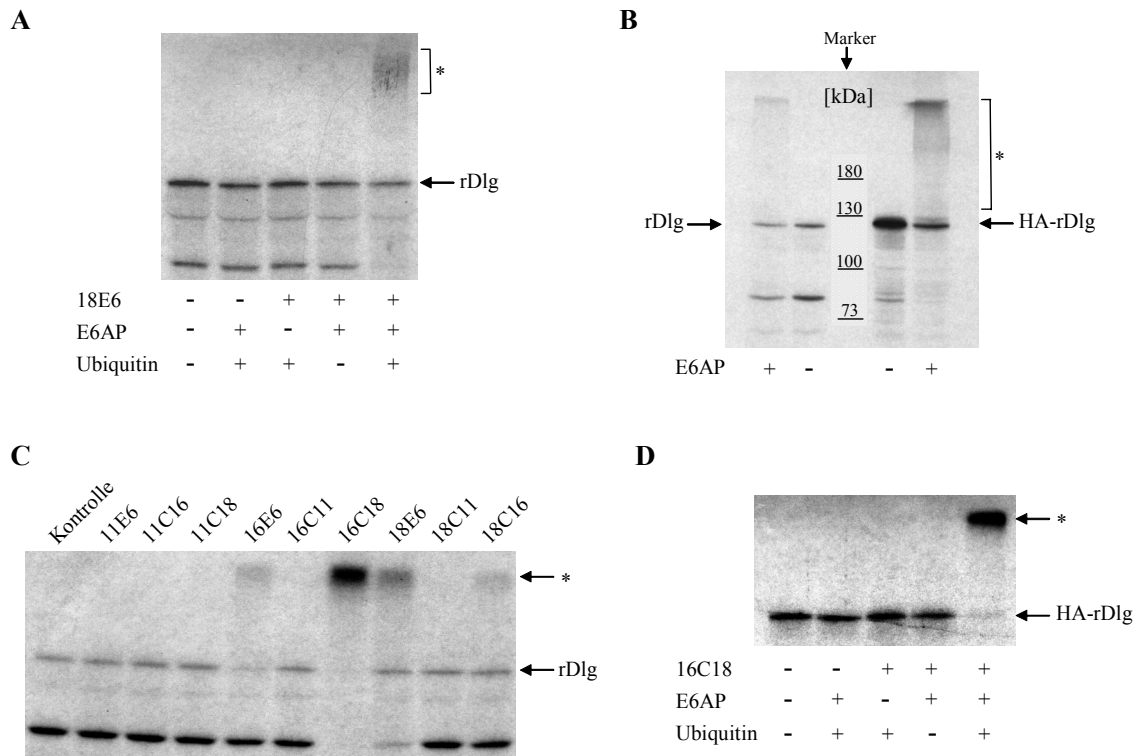


Abb. 9: Die Ubiquitinierung von rDlg durch HPV18 E6 *in vitro* ist abhängig von E6AP und 'high risk' E6 Onkoproteinen. (A) Ubiquitinierungsassays wurden unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.7.2) mit *in vitro* translatiertem (WG), [³⁵S]-markiertem rDlg in An- bzw. Abwesenheit von rekombinantem GST-HPV18-E6, E6AP und Ubiquitin, wie angegeben, für 2 h bei 30 °C inkubiert, aufgekocht, in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine fluorographisch sichtbar gemacht. *, ubiquitinierte Proteine. (B) Unter Verwendung des eukaryontischen Expressionsvektors, in dem rDlg mit einem N-terminalen HA-tag vorliegt (HA-rDlg), wurde rDlg in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin *in vitro* translatiert (WG). Ubiquitinierungsassays wurden in Gegenwart von HPV18 E6 wie unter (A) beschrieben in An- und Abwesenheit von rekombinantem E6AP, wie angegeben, durchgeführt. In einem zweiten Ansatz wurden entsprechende Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem (WG), [³⁵S]-markiertem rDlg ohne HA-tag durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer 8 % SDS-PAGE und die Detektion mittels Fluorographie. *, ubiquitinierte Proteine. (C) In Standardubiquitinierungsassays (vgl. 2.2.7.2) wurde *in vitro* translatiertes (RRL), [³⁵S]-markiertes rDlg mit GST (Kontrolle) oder vergleichbaren Mengen an GST-E6 (vgl. 2.2.6.6) inkubiert, in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie detektiert. *, ubiquitinierte Proteine. (D) Unter Standardbedingungen (vgl. 2.2.7.2) wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem (WG), [³⁵S]-markiertem HA-rDlg in An- und Abwesenheit von 16C18, E6AP und Ubiquitin, wie angegeben, durchgeführt. Die Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht, *, ubiquitinierte Proteine.

Ein im späteren Verlauf dieser Arbeit generierter eukaryontischer Expressionsvektor für rDlg mit einem N-terminalen HA-tag (HA-rDlg) zeigte bei einer Translation *in vitro* eine hohe Expressionsrate an Gesamtlängenprotein. Deshalb wurden erneut Ubiquitinierungsassays unter Verwendung von HPV18 E6 in An- und Abwesenheit von rekombinantem E6AP durchgeführt. Für das Translatat des zuvor verwendeten Expressionskonstruktes war nur eine geringe Ubiquitinierung von Gesamtlängen-rDlg zu beobachten (Abb. 9B, rDlg). Im Falle des Translatats mit HA-tag war hingegen eine sehr effektive Ubiquitinierung des Gesamtlängenproteins zu erkennen (Abb. 9B, HA-rDlg). Der Vergleich mit einem Proteingrößenmarker zeigte für rDlg und HA-rDlg ein Laufverhalten an, wie es sowohl für rDlg (Müller *et al.*, 1995) als auch hDlg (Lue *et al.*, 1994) beschrieben ist.

Da für hDlg ein Abbau *in vitro* durch E6 Mutanten, die nicht an E6AP binden können, beschrieben ist, wurde auch für solche Chimären (11C18, etc., vgl. Tabelle 2) eine mögliche Induktion einer Ubiquitinierung von rDlg untersucht.

In diesen Ubiquitinierungsassays konnte beobachtet werden, dass nur solche E6 Konstrukte eine Ubiquitinierung von rDlg induzierten, die ausschließlich Proteinsequenzen von 'high risk' E6 Proteinen besaßen (16, 18, 16C18, 18C16; Abb. 9C).

Sämtliche Chimären mit Sequenzanteilen von 'low risk' E6 Proteinen (11, 11C16, 11C18, 16C11, 18C11) waren nicht in der Lage rDlg *in vitro* zu ubiquitinieren. Die Effizienz der 'high risk' Konstrukte variierte beträchtlich. Während im Falle von 18E6 und 18C16 nur eine geringe Aktivität festzustellen war, wurde das Gesamtlängen-rDlg von 16E6 und 16C18 fast vollständig ubiquitiniert (Abb. 9C). Die vergleichsweise geringste Aktivität von 18C16 könnte mit der geringeren Kopräzipitation von rDlg korrelieren (vgl. Abb. 8A).

Für die 'effektivste' E6 Chimäre 16C18 (vgl. Abb. 9C) wurden Standardubiquitinierungsassays in An- bzw. Abwesenheit von entweder 16C18, E6AP oder Ubiquitin durchgeführt. Dazu wurde das Expressionskonstrukt für HA-rDlg verwendet, um eine hohe Translationsrate an Gesamtlängenprotein zu gewährleisten (s.o.). In Anwesenheit aller Komponenten war eine nahezu vollständige Polyubiquitinierung von Gesamtlängen-HA-rDlg zu beobachten (Abb. 9D). In Abwesenheit von entweder 16C18, E6AP oder Ubiquitin erfolgte hingegen keine Ubiquitinierung von HA-rDlg *in vitro*.

Somit zeigen die durchgeführten Experimente an, dass rDlg in Standardubiquitinierungsassays E6AP-abhängig ausschließlich durch 'high risk' E6 Proteine polyubiquitiniert wird.

3.2.2 Kopräzipitation und Ubiquitinierung von Scribble durch HPV E6 *in vitro*

In einem nächsten Schritt wurden die für rDIg durchgeführten Experimente *in vitro* mit Scribble wiederholt, da Scribble als E6AP-abhängiges Substrat von 'high risk' E6 Proteinen beschrieben ist (Nakagawa und Huibregtse, 2000). Zudem erfolgt die Bindung von E6 an Scribble wie im Falle von hDIg mittels des extremen C-Terminus von 'high risk' E6 Proteinen an eine oder mehrere PDZ-Domäne(n) von Scribble.

Es wurde in RRL translatiertes, [³⁵S]-markiertes Scribble mit an Glutathion-Sepharose gebundenen GST-E6-Konstrukten inkubiert (GST-Kopräzipitationsassays). Ubiquitinierungsassays erfolgten in An- und Abwesenheit von rekombinantem E6AP.

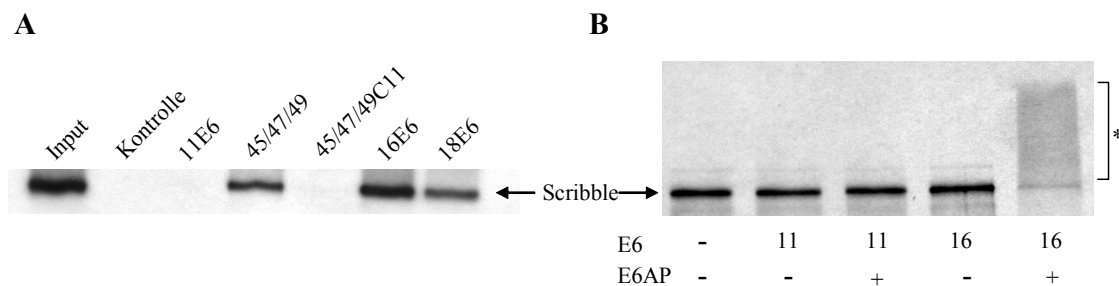


Abb. 10: C-Terminus-abhängige Kopräzipitation und E6AP-abhängige Polyubiquitinierung von Scribble durch 'high risk' E6 Proteine *in vitro*. (A) Mit GST-E6 bzw. GST (Kontrolle) und *in vitro* translatiertem (RRL), [³⁵S]-markiertem Scribble wurden GST-Kopräzipitationsassays durchgeführt (vgl. 2.2.7.1). Die Auftrennung der kopräzipitierten Proteine erfolgte in einer 8 % SDS-PAGE. Input, 20 % der eingesetzten Menge an Translatat. (B) In Standardubiquitinierungsassays (vgl. 2.2.7.2) wurde *in vitro* translatiertes (RRL), [³⁵S]-markiertes Scribble in An- und Abwesenheit von rekombinantem GST-E6 und E6AP inkubiert und die Ansätze mittels 8 % SDS-PAGE aufgetrennt. *, ubiquitinierte Proteine.

In den Kopräzipitationsassays konnten beide 'high risk' E6 Proteine (HPV16 und 18), jedoch nicht das 'low risk' E6 Protein (HPV11) Scribble kopräzipitieren (Abb. 10A). Zusätzlich wurde Scribble von einer HPV16 E6 Mutante, die nicht mehr an E6AP binden kann (45/47/49), kopräzipitiert. Ein Austausch des C-Terminus gegen den eines 'low risk' E6 Proteins (45/47/49C11) verhinderte die Kopräzipitation von Scribble. Die Ergebnisse bestätigen eine E6AP-unabhängige Bindung von ausschließlich 'high risk' E6 Proteinen an Scribble *in vitro*. Während die Bindung E6AP-unabhängig erfolgte, war die Induktion der Ubiquitinierung von Scribble E6AP-abhängig. So wurde Scribble nur in Gegenwart von E6AP und 'high risk' aber nicht 'low risk' HPV E6 Proteinen *in vitro* ubiquitiniert (Abb. 10B). Durch die Mutante 45/47/49, die zwar an Scribble, aber nicht an E6AP binden kann, erfolgte keine Ubiquitinierung von Scribble *in vitro* (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Transiente Koexpressionen von Scribble, rDlg und HPV E6 in H1299 Zellen

Um die *in vitro* beobachteten Wechselwirkungen von Scribble bzw. rDlg mit E6 und E6AP unter Zellkulturbedingungen zu überprüfen, wurden eukaryontische Expressionsvektoren für rDlg bzw. Scribble verwendet. Eine Immundetektion wurde dabei durch einen HA-tag (rDlg) bzw. einen FLAG-tag (Scribble) gewährleistet.

H1299 Zellen wurden mit Scribble bzw. rDlg, Expressionskonstrukten für HPV 11, 16 oder 18 E6 und einem Vektor, der für das Enzym β -Galaktosidase kodiert (CMV-Gal), mittels Lipofektion kotransfiziert. Als Kontrolle für eine spezifische Immundetektion durch die verwendeten Antikörper diente jeweils eine Transfektion ohne den Zusatz der Vektoren für rDlg bzw. Scribble (Kontrolle). Die Kotransfektion von CMV-Gal ermöglichte eine Bestimmung der jeweiligen Transfektionseffizienzen und somit eine Angleichung an einzusetzenden Mengen der gewonnenen Lysate.

Der beschriebene Abbau von Scribble durch 'high risk' HPV E6 Proteine (Nakagawa und Huibregtse, 2000) konnte unter den gewählten Bedingungen in H1299 Zellen nicht beobachtet werden (Abb. 11A). So konnten beide verwendeten 'high risk' E6 Proteine (HPV16 und 18) die Menge an Scribble nicht verringern.

Für rDlg ergab sich, wie für hDlg beschrieben (Gardiol *et al.*, 1999), ein Abbau durch 'high risk' HPV16 und 18 E6 Onkoproteine (Abb. 11B). Das verwendete 'low risk' E6 (HPV11) war nicht in der Lage, die Menge an rDlg zu reduzieren.

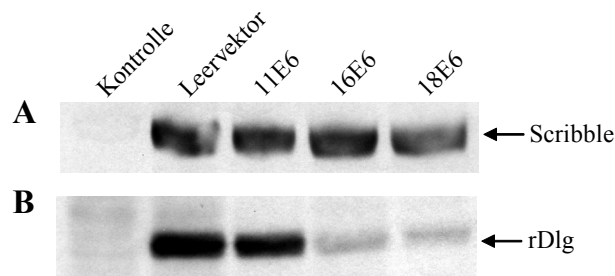


Abb. 11: rDlg, aber nicht Scribble, wird bei transienten Transfektionen in H1299 Zellen von 'high risk' E6 Proteinen abgebaut. (A) H1299 Zellen wurden transient mit 1 μ g Scribble und 200 ng β -Gal in An- bzw. Abwesenheit von HPV11, 16 und 18 E6 (jeweils 3.8 μ g) transfiziert. Nach 24 h wurden Zellextrakte gewonnen, in einer 5 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinmengen mittels Western Blot/ECL unter Verwendung des FLAG-Antikörpers sichtbar gemacht. (B) Transfektionen wurden wie unter (A) durchgeführt. Anstelle von Scribble wurde 1 μ g rDlg transfiziert. Die Auftrennung erfolgte in einer 7 % SDS-PAGE und der Nachweis mittels Western Blot/ECL mit einem HA-Antikörper.

Da für den 'high risk' E6-vermittelten Abbau von Scribble und rDlg Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation beschrieben sind (Nakagawa und Huibregtse, 2000; Gardiol *et al.*, 1999, Mantovani *et al.*, 2001), wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob Scribble und rDlg bei transienter Expression in H1299 Zellen ubiquitiniert werden.

3.2.4 'In vivo' Ubiquitinierung von rDlg und Scribble in transienten Expressionen

Der Nachweis von ubiquitinierten Proteinen '*in vivo*' erfolgte durch die Koexpression eines Ubiquitins, welches am N-Terminus einen 6-fach His-tag hatte (His-Ub). Aufgrund der hohen Affinität des 6-fach His-tag für Nickel-NTA-Agarose konnten mit His-Ub modifizierte Proteine aus dem Zellextrakt an Nickel-NTA-Agarose gebunden, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot/ECL nachgewiesen werden. Die Lyse der Zellen erfolgte dabei unter denaturierenden Bedingungen in einer 6M Guanidiniumchlorid-Lösung, um eine Abspaltung der Ubiquitinkette(n) durch Ubiquitin-spezifische Isopeptidasen zu unterbinden. Zur Kontrolle der Expression des zu untersuchenden Konstrukts (Scribble bzw. rDlg) wurde das entsprechende Expressionskonstrukt allein transfiziert und in TNN-Puffer lysiert (Rohlysat). Eine zusätzliche Koexpression von HPV11, 16 bzw. 18 E6 sollte zeigen, ob E6 Proteine einen Einfluss auf die Ubiquitinierung von rDlg bzw. Scribble haben. Um eine hohe Expressionsrate zu gewährleisten, wurden für die '*in vivo*' Ubiquitinierungsassays H1299 Zellen verwendet.

Für rDlg und Scribble konnte eine Ubiquitinierung in H1299 Zellen beobachtet werden. So war sowohl für rDlg (Abb. 12A) als auch für Scribble (Abb. 12B) nur bei Koexpression von His-Ub ein Signal detektierbar. Ohne Koexpression von His-Ub waren keine signifikanten Banden zu erkennen. Im Vergleich zum unmodifizierten Protein (Rohlysat) verfügten die Signale für rDlg und Scribble bei Koexpression von His-Ub über ein etwas höheres Molekulargewicht.

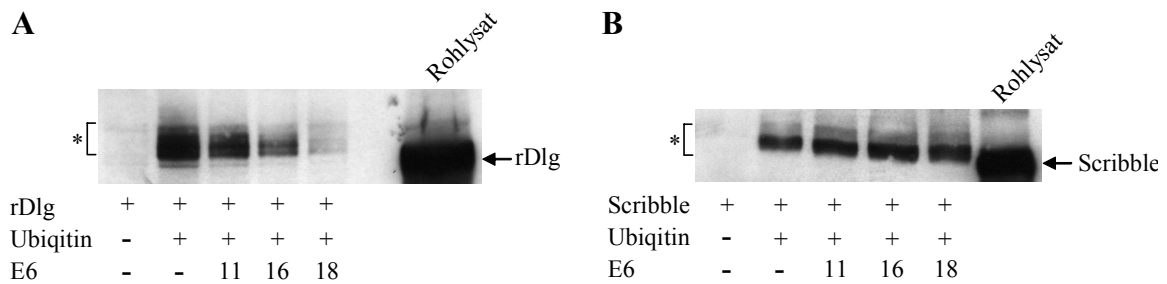


Abb. 12: Transient exprimiertes rDlg und Scribble werden in H1299 Zellen ubiquitiniert. H1299 Zellen wurden transient mit 4 μg rDlg (A) bzw. Scribble (B) transfiziert. Die Kotransfektion eines Expressionskonstrukts (10 μg), das für Ubiquitin mit einem N-terminalen 6-fach HIS-tag kodiert, ermöglichte die Präzipitation ubiquitiniertes Proteine an Nickel-NTA-Agarose. Erfolgte keine Koexpression von HPV11, 16 bzw. 18 E6 (je 6 μg), wurden die Transfektionsansätze mit Rc/CMV auf 20 μg Gesamt-DNA-Menge angeglichen. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Lyse der Zellen in GuHCl-Lysispuffer; nach Zugabe von Nickel-NTA-Agarose wurden die Proben bei 4 °C ÜN inkubiert und das Präzipitat am nächsten Tag in Tris-Puffer (pH 6.8, 20 mM Imidazol) umgepuffert. Die Proben wurden aufgeköcht (2-fach Lämmli, 200 mM Imidazol) und in einer 6 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mittels Western Blot/ECL unter Verwendung des HA- (rDlg) bzw. des FLAG- (Scribble) Antikörpers. Rohlysat, H1299 Zellen wurden transient mit 2 μg rDlg bzw. Scribble transfiziert und nach 24 h in TNN-Puffer lysiert.

Während im Falle von Scribble kein Einfluss der E6 Proteine auf die Menge an ubiquitiniertem Protein festzustellen war, war bei einer Koexpression von HPV16 und HPV18 E6 eine Abnahme der Intensität des Bandenmusters von rDlg zu erkennen. Vergleichende quantitative Aussagen konnten jedoch nicht getroffen werden, da wegen der Lysis unter denaturierenden Bedingungen keine Angleichung der jeweils einzusetzenden Lysatmengen über ein β -Gal-Assay erfolgte. Allerdings korrelierte die Abnahme des beobachteten Ubiquitinierungsmusters von rDlg in Anwesenheit von 16 und 18E6 mit dem zuvor beobachteten Abbau von rDlg durch 16 und 18E6 (vgl. Abb 11B). Aussagen über eine mögliche Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems beim E6-vermittelten Abbau von rDlg konnten allerdings nicht getroffen werden (vgl. 4.1.2.2).

3.2.5 Transiente Koexpression von Scribble, 18E6 und E6AP in H1299 Zellen

Da in transienten Transfektionen Scribble zwar ubiquitiniert wird, aber der beschriebene Abbau von Scribble (Nakagawa und Huibregtse, 2000) bei Koexpression von 'high risk' E6 nicht beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 11A und 12B), sollte eine zusätzliche Überexpression von E6AP einen Hinweis liefern, ob die Mengen an endogenem E6AP in den verwendeten Zellen zu niedrig waren, um den E6-vermittelten Abbau von Scribble zu vermitteln.

Während bei Koexpression von HPV18 E6 oder E6AP allein kein signifikanter Einfluss auf die Proteinmenge an Scribble zu beobachten war, war bei gleichzeitiger Koexpression von 18E6 und E6AP die verbleibende Menge an Scribble deutlich verringert (Abb. 13).

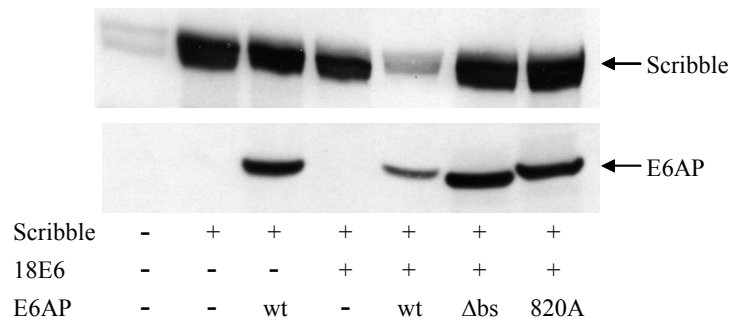


Abb. 13: Transiente Koexpression von E6AP ermöglicht den E6-vermittelten Abbau von Scribble. H1299 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für die angegebenen Proteine transfiziert (0.5 µg Scribble, 2.6 µg 18E6, 2.6 µg E6AP). Alle Ansätze wurden mit β-Gal (300 ng) kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Zellprotein-Extrakte gewonnen, anhand von β-Gal-Aktivität aufeinander abgeglichen, auf einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot/ECL unter Verwendung des FLAG-(Scribble) bzw. des HA- (E6AP) Antikörpers detektiert. wt-, Δbs-, 820A-E6AP, vgl. Abb. 4.

Koexpression von HPV18 E6 mit inaktivem E6AP (820A-E6AP, vgl. Abb. 4) und einer Mutante von E6AP mit deletierter E6-Binderegion (Δbs-E6AP, vgl. Abb. 4) wiesen eine unveränderte Expressionmenge an Scribble auf.

Koexprimiertes E6AP war in allen Fällen nachweisbar. Während für die Mutanten Δbs-E6AP und 820A-E6AP bei Koexpression von HPV18 E6 hohe Expressionsraten vorlagen, war die Menge an E6AP in Anwesenheit von 18E6 geringer, sowohl im Vergleich zu den Mutanten als auch im Vergleich zu einer Expression von E6AP in Abwesenheit von 18E6. Dies spiegelt vermutlich einen 'high risk' E6-vermittelten Abbau von E6AP wider, da E6AP als Ubiquitinierungssubstrat von 'high risk' E6 Proteinen beschrieben ist (Kao *et al.*, 2000).

Die Daten weisen darauf hin, dass in H1299 Zellen die Menge an endogenem E6AP zu gering ist, um einen Abbau von Scribble durch 'high risk' HPV E6 Proteine zu vermitteln. Wird E6AP überexprimiert, interagiert E6 funktionell mit E6AP, wobei dieselbe Region von E6AP benötigt wird wie beim E6AP-abhängigen Abbau von p53 durch E6 (Huibregtse *et al.*, 1993).

3.2.6 Einfluss der Koexpression von wt-E6AP und mutierten Formen auf den Abbau von rDlg durch HPV18 E6 in transienten Transfektionsexperimenten

Um einen möglichen Einfluss von E6AP auf den beobachteten Abbau von rDlg durch HPV18 E6 in H1299 Zellen zu untersuchen, wurden in weiteren transienten Expressionen zusätzlich zu rDlg und HPV18E6 drei verschiedene E6AP-Konstrukte (vgl. 3.2.5) koexprimiert. Als interne Kontrolle für ein Protein, das E6AP-abhängig von HPV18 E6 degradiert wird, wurde p53 kotransfiziert.

Während bei einer alleinigen Koexpression von E6AP kein signifikanter Einfluß auf die Menge an rDlg und p53 zu beobachten war, war bei alleiniger Koexpression von HPV18 E6 ein deutlicher Abbau von rDlg und p53 zu erkennen (Abb. 14). Wurde zusätzlich zu E6 Wildtyp E6AP (wt-E6AP, vgl. Abb. 4) exprimiert, erfolgte ein verstärkter Abbau von rDlg und p53, der bei Koexpression von Δ bs-E6AP nicht beobachtet werden konnte. Eine Bindung von E6 an E6AP ist also notwendig, um den Abbau von rDlg bzw. p53 zu vermitteln.

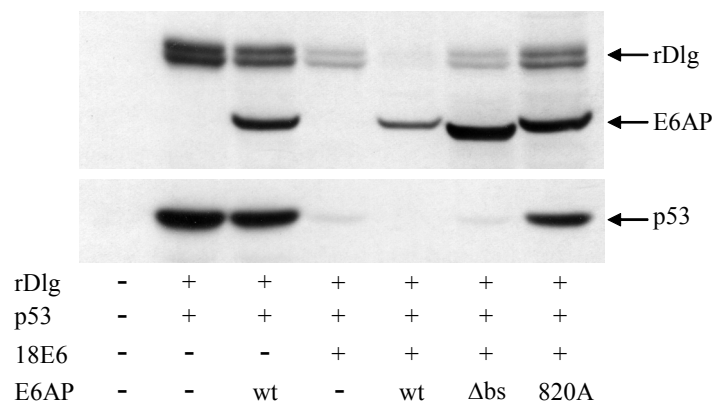


Abb. 14: Transiente Koexpression von E6AP begünstigt den E6-vermittelten Abbau von rDlg, während eine inaktive Form von E6AP diesen hemmt. H1299 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für die angegebenen Proteine transfiziert (1 μ g rDlg, 30 ng p53, 2 μ g 18E6, 2.67 μ g E6AP). Alle Ansätze wurden mit β -GAL (300 ng) kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Zellprotein-Extrakte gewonnen, anhand von β -Gal-Aktivität aufeinander abgeglichen, auf einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot/ECL unter Verwendung des HA (rDlg und E6AP) bzw. des DO-1 (p53) Antikörpers detektiert. wt-, Δ bs-, 820A-E6AP, vgl. Abb. 4.

Bei Koexpression von 820A-E6AP waren höhere Mengen an rDlg und p53 zu beobachten als bei einer alleinigen Koexpression von 18E6. Der negative Einfluss der Koexpression von 820A-E6AP auf den E6-vermittelten Abbau von rDlg und p53 deutet an, dass eine Bindung von E6 an endogenes E6AP notwendig ist, um den Abbau von rDlg und p53 zu

vermitteln. Eine Bindung von E6 an 820A-E6AP würde somit die Bindung von E6 an endogenes E6AP und folglich die Abbaurate von rDlg und p53 verringern.

Um den beobachteten Einfluss von E6AP auf den Abbau von rDlg in transienten Transfektionen auch für eine HPV-positive Zervixkarzinom Zelllinie zu verifizieren, wurde rDlg ohne oder mit E6AP bzw. 820A-E6AP in HeLa Zellen (HPV18 positiv) koexprimiert.

Die Koexpression von E6AP führte zu einer Verringerung der Menge an rDlg (Abb. 14), was auf einen Abbau von rDlg durch E6AP und endogen exprimiertes 18 E6 schließen lässt. Eine Koexpression von 820A-E6AP bewirkte keinen Unterschied zur Expression von rDlg ohne E6AP. Im Unterschied zu HPV-negativen Zellen waren die Mengen an E6AP und 820A-E6AP in Gegenwart von E6 (endogen bzw. überexprimiert) nahezu identisch (vgl. Abb. 14 und 15). Während bei den Transfektionen in H1299 Zellen HPV18 E6 kotransfiziert und somit überexprimiert wurde, erfolgte in HeLa Zellen keine zusätzliche Transfektion von 18E6. Somit reichte die Menge an endogenem E6 in den HeLa Zellen vermutlich nicht aus, um ektopisch exprimiertes E6AP effektiv abzubauen. Einen weiteren Unterschied zu den Beobachtungen in H1299 Zellen stellt die ausbleibende Anreicherung von rDlg in Anwesenheit von 820A-E6AP dar. In HeLa Zellen war in diesem Fall die Menge an rDlg im Vergleich zur Transfektion ohne E6AP nicht erhöht. In H1299 Zellen hingegen war die Menge an rDlg in Gegenwart von 820A-E6AP deutlich höher als bei Transfektion von 18E6 allein (vgl. Abb.10). Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei Expression von rDlg in HeLa Zellen ohne Koexpression von E6AP die Abbaurate von rDlg sehr gering ist und somit folglich auch bei Inhibierung des Abbaus keine deutlich höhere Menge an rDlg beobachtet werden kann. Diese Daten deuten auf eine geringe Abbaurate von endogenem hDlg in HeLa Zellen hin (vgl. 3.4.1).

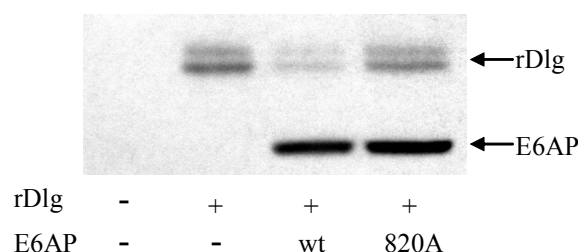


Abb. 15: In transienten Assays wird rDlg bei Überexpression von E6AP in HPV18 positiven HeLa Zellen degradiert. HeLa Zellen wurden transient mit rDlg (1 µg), β-Gal (200 ng) und, wie angegeben, mit oder ohne Wildtyp E6AP oder 820A-E6AP (jeweils 2,8 µg) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Mengen der erhaltenen Zellysate über β-Gal-Aktivität angeglichen und sowohl rDlg als auch E6AP unter Verwendung des HA-Antikörpers nach 8 % SDS-PAGE und Western Blot/ECL detektiert. wt-, 820A-E6AP, vgl. Abb. 4.

3.2.7 rDlg und p53 bei transienter Koexpressionen von HPV E6 Konstrukten

Da die bisher gewonnenen Daten einen E6AP-abhängigen Abbau von rDlg durch 'high risk' E6 Proteine anzeigten, wurde in weiteren Koexpressionsexperimenten der Einfluß der generierten E6 Mutanten (vgl. Tabelle 2) auf die Expressionmengen an kotransfiziertem rDlg getestet. Von besonderem Interesse waren dabei die Mutanten bzw. Chimären, die rDlg *in vitro* kopräzipitieren, aber nicht ubiquitinieren können und zudem keine Bindung an E6AP *in vitro* aufweisen. Dabei handelt es sich um die E6 Konstrukte 11C16, 11C18, 45/47/49 und 45/47/49C18. Vergleichbare Chimäre wurden von anderen Arbeitsgruppen in transienten Koexpressionen mit hDlg verwendet, um einen E6AP-unabhängigen Abbau von hDlg durch 'high risk' HPV E6 Proteine zu demonstrieren (Pim *et al.*, 2000).

Um gesicherte Aussagen über die Aktivitäten verschiedener E6 Proteine und Mutanten treffen zu können, ist der Nachweis ihre Expression notwendig. Daher wurden zunächst Expressionskonstrukte für E6 Proteine generiert, die für E6 mit einem HA-tag am N-Terminus kodieren (HA-E6). Allerdings konnten diese E6 Konstrukte nach Transfektion in H1299 Zellen nicht mittels HA-Immundetektion sichtbar gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Sehr wahrscheinlich sind die Halbwertszeiten von E6 Proteinen zu gering, so dass die vorliegenden Proteinmengen an E6 zu gering sind, um einen Nachweis mittels Western Blot/ECL zu ermöglichen. Tatsächlich wurde mittlerweile für eine Vielzahl von E6 Proteinen verschiedener HPV-Typen eine Regulation ihrer Proteinmengen durch das Ubiquitin-Proteasom-System beschrieben, wobei in den meisten Fällen erst nach Inhibierung des Proteasoms ein effektiver Nachweis von E6 möglich war (Kehmeier *et al.*, 2002; Stewart *et al.*, 2004).

Deshalb wurden Expressionsvektoren für E6 generiert, die einen indirekten Nachweis der E6-Expression ermöglichen. In diesen Konstrukten wird E6 als Fusionsprotein mit DHFR (Dihydrofolat Reduktase) kodiert (Abb. 16).

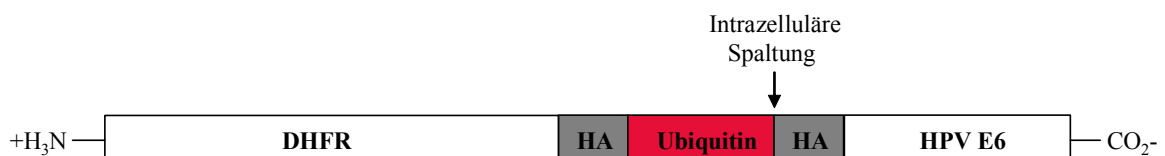


Abb. 16: Schematische Darstellung des 'DHFR-Ubiquitin-Fusionssystems'. DHFR, Dihydrofolat Reduktase. HA, Häm-Agglutinin.

Die zwischen DHFR und E6 gelegene Sequenz kodiert für Ubiquitin (s.u.), was zu einer kotranslationalen Spaltung der Fusionsproteine durch Ubiquitin-spezifische Isopeptidasen führt (Bachmair *et al.*, 1986; Turner und Varshavsky, 2000). Sowohl in der Zelle als auch *'in vitro'* konnten die entsprechenden 'Spaltprodukte' DHFR-HA-Ub und HA-HPVE6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um einen Abbau von DHFR-HA-Ub zu verhindern, wurde anstelle von Wildtyp Ubiquitin eine Mutante verwendet, die an Position 48 anstelle von Lysin (K48) einen Argininrest besitzt. Diese mutierte Form kann keine K48-Ubiquitin-Ketten ausbilden, die vermutlich das hauptsächlich proteasomale Abbausignal darstellen (Chau *et al.*, 1989; Finley *et al.*, 1994). Somit besitzt das gebildete DHFR-HA-Ub eine lange Halbwertszeit und wird nicht durch das fusionierte Ubiquitin einem Abbau zugeführt (Bachmair und Varshavsky, 1989). Da die 'steady-state-levels' an E6 bei transienter Expression vermutlich nicht ausreichen, um sie durch HA-Immundetektion sichtbar zu machen (s.o.), könnte ein indirekter Nachweis ihrer Expression durch die Detektion von DHFR erfolgen.

Alle verwendeten Konstrukte wurden in H1299 Zellen allerdings in Raten exprimiert, die einen direkten Nachweis der E6 Proteine über HA-Immundetektion möglich machten. Da bei der Transfektion identischer Mengen an DNA die nachweisbaren Mengen der verschiedenen E6 Proteine große Unterschiede aufwiesen, wurden die Mengen der eingesetzten Vektoren titriert, um Bedingungen zu finden, bei denen die verschiedenen E6 Mutanten in vergleichbaren Proteinnengen vorliegen (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden die verschiedenen E6 Konstrukte zuerst mit p53 koexprimiert und anschließend in separaten Experimenten mit rDIg. Im Falle von p53 führten alle 'high risk' E6 Proteine unabhängig von ihrem C-Terminus zur Degradation von p53, während alle 'low risk' E6 Proteine ebenfalls unabhängig vom C-Terminus die Menge an p53 nicht veränderten (Abb. 17A). Sämtlichen Mutanten von HPV16 E6 (SAT, ESAT, 45/47/49) inkl. ihrer chimären Formen mit einem HPV11 E6 C-Terminus waren nicht in der Lage, p53 abzubauen. Diese E6 Mutanten wiesen eine annähernd identische Expressionsmenge auf (Abb. 17B). Somit verhielten sich bei der Koexpression von p53 alle E6-Konstrukte wie erwartet (vgl. Tabelle 2).

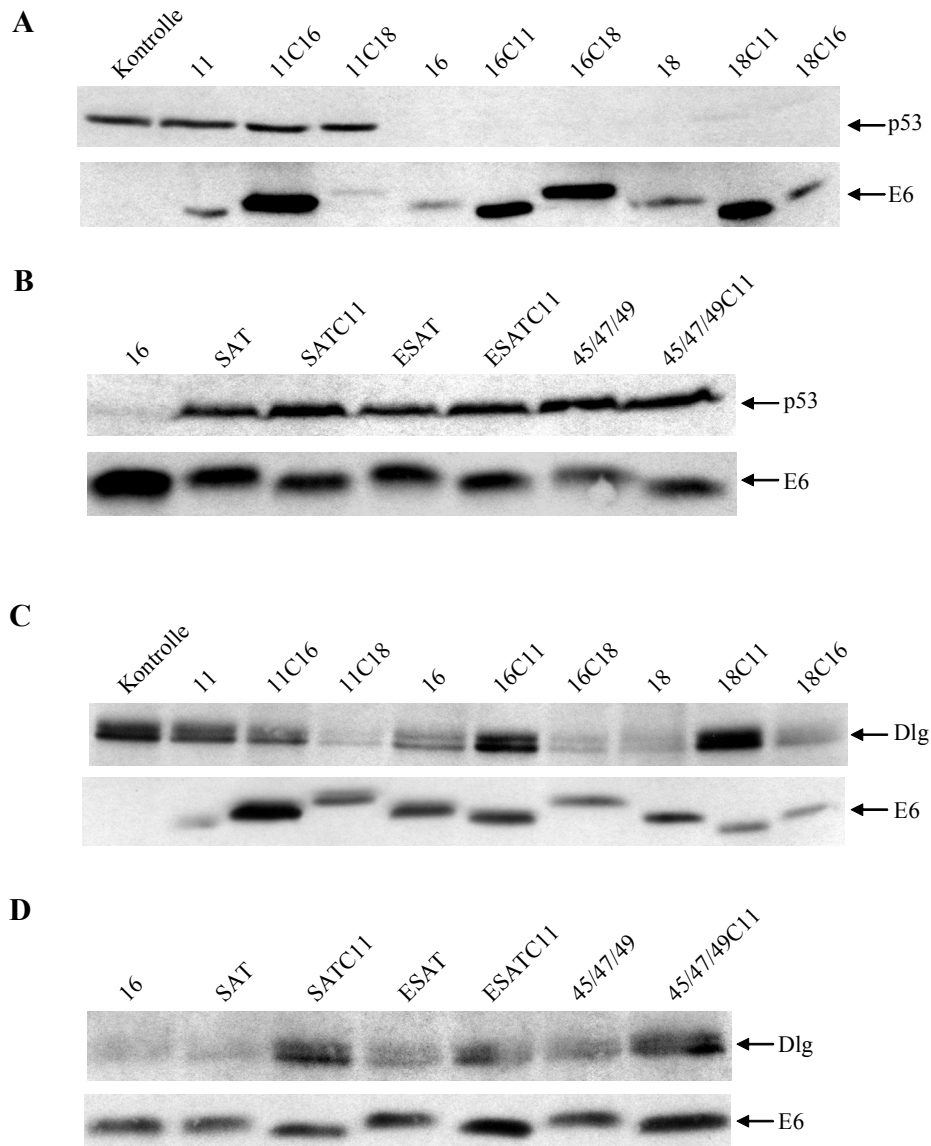


Abb. 17: Abbau von p53 und rDlg durch E6-Chimaere in transienten Koexpressionen in H1299 Zellen.

H1299 Zellen wurden mit **(A)** p53 (25 ng) und β -Gal (300 ng) transfiziert. Es erfolgte eine Kotransfektion von 5.675 μ g DHFR-Leervektor (Kontrolle), oder von DHFR-E6 Konstrukten (11: 2.3 μ g; 11C16: 3.6 μ g; 11C18: 1.8 μ g; 16: 1.3 μ g; 16C11: 1.1 μ g; 16C18: 2.0 μ g; 18: 3.5 μ g; 18C11: 3.6 μ g; 18C16: 4.6 μ g). Differenzen zu einer Gesamtmenge an DNA von 6 μ g wurden durch den DHFR-Leervektor ausgeglichen. Einer Angleichung der nach 24 h gewonnenen Zellextrakte über β -Gal-Aktivität folgten zwei separate Auftrennungen mittels 10 % (p53) und 17.5 % (E6) SDS-PAGE und eine Detektion der Proteine nach Western Blot/ECL unter Verwendung der Antikörper DO-1 (p53) oder HA (E6). **(B)** p53 (40 ng), β -Gal (200 ng) und 1.76 μ g der angegebenen DHFR-E6 Plasmide wurden transfiziert. Die Aufbereitung erfolgte wie unter (A) beschrieben. **(C)** 1.0 μ g rDlg und 200 ng β -Gal wurden transfiziert. Kotransfiziert wurden 4.7 μ g DHFR-Leervektor (Kontrolle) oder die angegebenen DHFR-E6 Konstrukte (11: 2.4 μ g; 11C16: 3.6 μ g; 11C18: 2.1 μ g; 16: 1.5 μ g; 16C11: 1.2 μ g; 16C18: 1.2 μ g; 18: 4.0 μ g; 18C11: 4.0 μ g; 18C16: 4.7 μ g). Differenzen zu einer Gesamtmenge an DNA von 6 μ g wurden durch den DHFR-Leervektor ausgeglichen. Nach 24 h wurden Zellextrakte gewonnen, über β -Gal-Aktivität einander angeglichen, die Proteine über 8 % (Dlg) oder 17.5 % (E6) SDS-PAGE aufgetrennt und sowohl rDlg als auch E6 mittels Western Blot/ECL unter Verwendung des HA-Antikörpers sichtbar gemacht. **(D)** 1.0 μ g rDlg, 200 ng β -Gal und 1.8 μ g der angegebenen DHFR-E6 Konstrukte transfiziert. Die Aufbereitung erfolgte wie unter (C) beschrieben.

Bei Koexpression von rDlg ergab sich eine, im Vergleich zu den Beobachtungen bei der Koexpression von p53, inverse Abhängigkeit vom E6 C-Terminus. E6-Chimäre, die über einen 'high risk' E6 C-Terminus verfügen, führten zum Abbau von rDlg, während chimäre Formen mit einem 'low risk' E6 C-Terminus keinen Abbau von rDlg vermitteln konnten (Abb. 17C und 17D). Die für den Abbau von hDlg beschriebene höhere Effizienz des HPV18 im Vergleich zum HPV16 E6 C-Terminus (Kiyono *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2001) konnte auch für rDlg in dieser Tendenz beobachtet werden. Die Expressionsmengen der E6 Chimären aus 11, 16 und 18 E6 waren homogener als bei den p53-Koexpressionsstudien (vgl. Abb. 17A und 17C).

Dass E6 Mutanten, die E6AP *in vitro* nicht kopräzipitieren können, in der Lage waren, rDlg bei transienter Koexpression zu degradieren, lässt vermuten, dass der E6-vermittelte Abbau von rDlg '*in vivo*' entweder I) E6AP-unabhängig verläuft oder II) E6AP-abhängig erfolgt, aber keine stabile Interaktion von E6 mit E6AP notwendig ist, oder aber III) E6AP-abhängig und -unabhängig erfolgt bzw. erfolgen kann.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss von E6AP auf den E6-vermittelten Abbau von rDlg in E6AP 'knock out' Mausfibroblasten

Bisher konnte eine Beteiligung von E6AP am E6-vermittelten Abbau von rDlg '*in vivo*' nur indirekt untersucht werden, weil alle verwendeten Zellen auch über endogenes E6AP verfügten und somit keine Aussagen über den Abbau von rDlg durch E6 in Abwesenheit von E6AP getroffen werden konnten. Aus diesem Grund wurden transiente Koexpressionsexperimente in Fibroblasten durchgeführt, die aus homozygoten E6AP 'knock out' Mäusen gewonnen wurden (E6AP *-/-* MEFs, Jiang *et al.*, 1998).

3.3.1 Transiente Koexpressionen von rDlg, p53, E6 und E6AP in E6AP *-/-* MEFs

Um die Rolle von E6AP beim E6-vermittelten Abbau von rDlg weiter zu charakterisieren, wurden E6AP *-/-* MEFs transient mit rDlg, HPV18 E6 und E6AP transfiziert. Da die E6AP-Abhängigkeit des E6-vermittelten Abbaus von p53 bekannt ist (Cooper *et al.*, 2003), wurde in einer weiteren Transfektion zunächst p53 anstelle von rDlg transient überexprimiert.

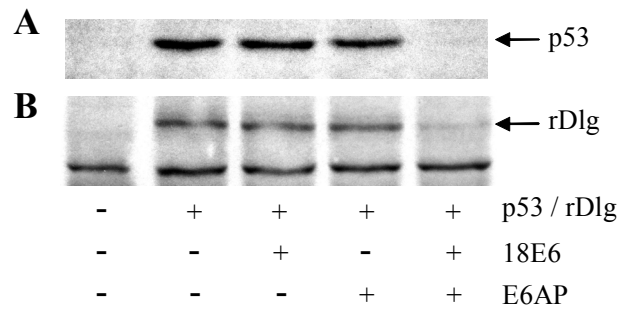


Abb. 18: p53 und rDlg werden in E6AP knock out Mausfibroblasten E6AP-abhängig von HPV18 E6 abgebaut. (A) E6AP ^{-/-} MEFs wurden transient mit p53 (300 ng) allein oder mit 18E6 (3 µg) und/oder E6AP (3 µg) transfiziert. Zur Angleichung der verschiedenen Ansätze wurde in allen Fällen β-GAL (700 ng) kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen aufbereitet (vgl. 2.2.9.1), auf einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und p53 mittels Western Blot/ECL unter Verwendung des Antikörpers DO-1 detektiert. (B) Transfektionen erfolgten wie unter (A), anstelle von p53 wurden jedoch rDlg (7 µg) und höhere Mengen an β-GAL (1 µg) transfiziert. Dlg wurde unter Verwendung des HA-Antikörpers nach 7,5 % SDS-PAGE und Western Blot/ECL sichtbar gemacht.

Wie erwartet zeigte p53 bei Koexpression von HPV18 E6 oder E6AP allein keine signifikante Veränderung seines 'steady state levels'. Bei gleichzeitiger Koexpression von 18E6 und E6AP hingegen verschwand das Signal für p53 nahezu vollständig (Abb. 18A). rDlg zeigte ein nahezu identisches Verhalten. Nur 18E6 und E6AP zusammen konnten die Menge an rDlg verringern, jedoch ist hier die Effizienz im Vergleich zum p53-Abbau etwas schwächer (Abb. 18B). Eine unspezifische Bande geringeren Molekulargewichts wies in allen Ansätzen keine Unterschiede auf. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten aus transienten Expressionen in H1299 Zellen (vgl. 3.2.6), die eine E6AP-abhängige Degradation von rDlg durch HPV18 E6 anzeigten.

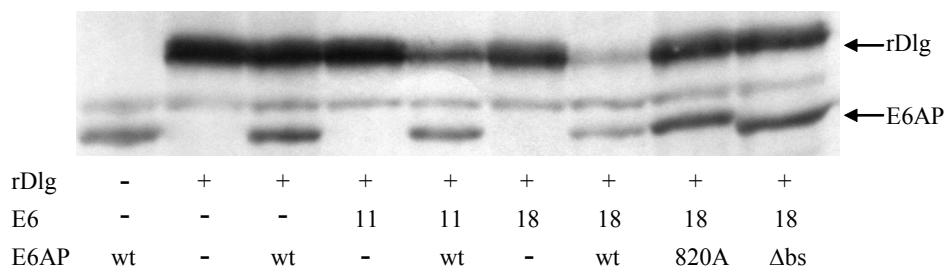


Abb. 19: Der Abbau von rDlg durch HPV18 E6 ist abhängig von der Bindung von E6 an E6AP und der funktionellen Ligase-Aktivität von E6AP. E6AP ^{-/-} MEFs wurden transient mit 6.25 µg rDlg, 750 ng β-Gal und, wie angegeben, mit oder ohne 4 µg wt-, 820A- oder Δabs-E6AP in An- bzw. Abwesenheit von HPV11 oder 18 E6 (jeweils 4 µg) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte gewonnen, über ihre β-Gal-Aktivität einander angeglichen, auf einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot/ECL unter Verwendung des HA-Antikörpers sichtbar gemacht. wt-, Δabs-, 820A-E6AP, vgl. Abb.4.

Wurden anstelle von Wildtyp E6AP 820A-E6AP oder Δ bs-E6AP koexprimiert, blieb der HPV18 E6-vermittelte Abbau von rDlg aus (Abb.19).

Wie zu erwarten, konnte auch HPV11 E6 bei alleiniger Kotransfektion die Proteinmenge an rDlg nicht verringern. Unerwarteterweise war bei einer Koexpression von HPV11 E6 und wt-E6AP eine Abnahme der Menge an rDlg zu erkennen. Mit Ausnahme der Beobachtung für HPV11 E6 verhält sich der Abbau von rDlg durch HPV18 E6 wie der von p53. Wie bei p53 ist der E6-vermittelte Abbau abhängig von der katalytischen Aktivität von E6AP und des weiteren wird dieselbe Region von E6AP für eine funktionelle Interaktion mit E6 benötigt.

3.3.2 Verhalten der E6 Chimären 11C18 und 45/47/49C18 in E6AP -/- MEFs

Die E6AP-abhängige Polyubiquitinierung (vgl. 3.2.1) und Degradation (vgl. 3.2.6; 3.3.1; 3.3.2) von rDlg durch 'high risk' E6 Proteine steht im Widerspruch zum Abbau von rDlg durch E6 Mutanten, die nicht an E6AP binden können (vgl. 3.2.7). Deshalb wurde das Verhalten dieser E6 Mutanten gegenüber rDlg in E6AP -/- MEFs getestet.

Ein erster Versuch sollte klären, ob sowohl HPV11 und HPV18 E6 als auch die Chimären aus diesen beiden (18C11 und 11C18) in transienten Assays in E6AP -/- MEFs ein identisches Verhalten aufweisen wie es zuvor in H1299 Zellen beobachtet wurde (vgl. 3.2.7).

Alle Ansätze wurden mit E6AP und zur internen Kontrolle mit p53 kotransfiziert. Wie aus Abb. 20A ersichtlich, hatten alle E6 Formen den erwarteten Einfluss auf p53. So konnten 11 E6 und die Chimäre 11C18 die Menge an p53 nicht reduzieren, während im Falle von 18 E6 und 18C11 ein vollständiger Abbau erfolgte.

Auch für rDlg entsprach das Verhalten den bisher beobachteten Phänomenen. Während 18 E6 und 11C18 rDlg effizient abbauten, war für 11 E6 wieder (vgl. Abb. 19) eine geringe und für 18C11 überhaupt keine Aktivität zu erkennen (Abb. 20A). Da kotransfiziertes p53 nicht von 11 E6 'erkannt' wurde, war dieses Experiment ein Hinweis, dass zumindest unter Bedingungen der Überexpression aller Komponenten (rDlg, E6 und E6AP) rDlg von 11E6 abgebaut werden kann.

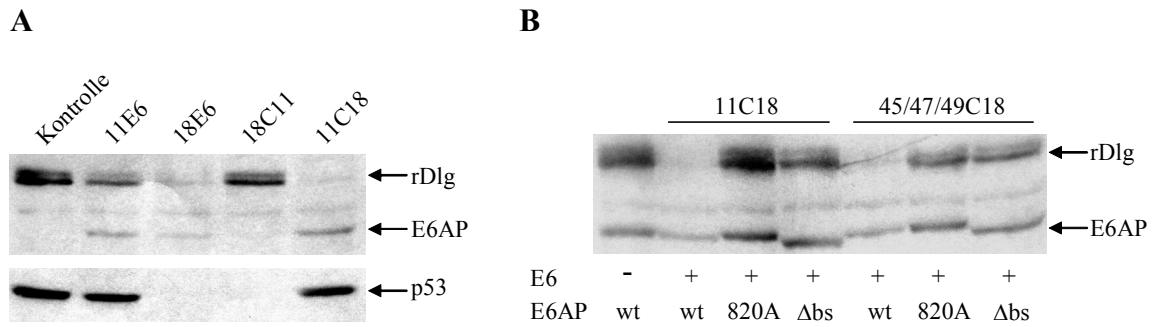


Abb. 20: In E6AP^{-/-} MEFs ist der Abbau von rDlg abhängig von einem 'high risk' E6 C-Terminus. Die Chimäre 11C18 und 45/47/49C18 können funktionell mit E6AP wechselwirken. (A) E6AP^{-/-} MEFs wurden transient mit rDlg (6 µg), p53 (200 ng), und β-Gal (800 ng) transfiziert (Kontrolle). In weiteren Ansätzen wurden jeweils 6 µg der angegebenen E6 Chimäre und zusätzlich E6AP (3 µg) kotransfiziert. Die Auftrennung nach Angleichung über β-Gal-Aktivität erfolgte auf einer 8 % SDS-PAGE und die Detektion nach Western Blot/ECL unter Verwendung der Antikörper HA (rDlg und E6AP) und DO-1 (p53). **(B)** E6AP^{-/-} MEFs wurden transient mit 6.25 µg rDlg, 750 ng β-Gal und 4 µg der verschiedenen E6AP Konstrukte transfiziert. Wie angegeben wurden 4 µg der E6 Chimäre 11C18 bzw. 45/47/49C18 kotransfiziert. Nach einer Angleichung über β-Gal-Aktivität wurden die Proben in einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot/ECL unter Verwendung des Antikörpers HA detektiert. wt-, Δbs-, 820A-E6AP, vgl. Abb.4.

In einem weiteren Experiment in E6AP^{-/-} MEFs wurde untersucht, ob die beobachtete Degradation von rDlg durch 11C18 E6AP-abhängig ist. Ähnlich wie für 18E6 (vgl. 3.3.1) wurden Transfektionen durchgeführt, in denen sowohl wt-E6AP als auch die E6AP-Mutanten 820A-E6AP und Δbs-E6AP koexprimiert wurden. Ähnliche Transfektionen wurden auch für die von HPV16 E6 abgeleitete Mutante 45/47/49 durchgeführt, die zudem anstelle des HPV16 E6 den extremen C-Terminus von HPV18 E6 besitzt. Sowohl 11C18 als auch 45/47/49C18 können nach bisherigen Erkenntnissen stabil an rDlg, aber nicht stabil an E6AP binden.

Beide getesteten Chimären verhielten sich wie HPV18 E6 (vgl. Abb. 19). So wurde bei Koexpression von wt-E6AP rDlg effizient abgebaut, während in Anwesenheit von 820A-E6AP und Δbs-E6AP keine Veränderung der Proteinmenge an rDlg festzustellen war (Abb. 20B).

Die Daten zeigen an, dass unter Überexpressionsbedingungen 11C18 und 45/47/49C18 funktionell mit E6AP interagieren und rDlg degradieren können und dieselbe Region von E6AP notwendig ist wie für die Interaktion mit 'high risk' E6 Proteinen.

3.4 Untersuchungen zum Einfluss von E6 und E6AP auf die Proteinmengen von endogenem hDlg und Scribble in HeLa Zellen

Alle bisherigen Beobachtungen erfolgten unter Bedingungen von Überexpression und betrafen im Falle von Dlg nur eine Isoform von Dlg aus *Rattus Norvegicus*. Somit ist unklar, ob die bisherigen Beobachtungen tatsächlich die Eigenschaften und die Wechselwirkungen der endogenen Proteine widerspiegeln. Allerdings ist aus histologischen Untersuchungen bekannt, dass die Proteinmengen von hDlg und Scribble in entarteten HPV-positiven Zervixkarzinom-Biopsien deutlich verringert sind im Vergleich zu normalen Gewebeproben (vgl. 1.3.2.4). Da keine Daten vorliegen, welche Isoformen (McLaughlin *et al.*, 2002) von hDlg im Gebärmutterhals exprimiert werden, erfolgte eine Versuchsreihe, in der die Eigenschaften von endogenem hDlg, im Besonderen seine Wechselwirkung mit E6 und E6AP, in HPV-positiven Zellen studiert werden sollte. Da die Wechselwirkung von hDlg mit dem HPV18 E6 Onkoprotein am stärksten ist (Kiyono *et al.*, 1997), wurden die folgenden Untersuchungen in der HPV18 positiven Zelllinie HeLa durchgeführt.

3.4.1 Stabilitätsuntersuchungen für endogenes hDlg und Scribble

Die Prämisse eines E6/E6AP vermittelten proteasomalen Abbaus von hDlg kann darauf hinweisen, dass es sich bei hDlg in HPV-positiven Zellen um ein kurzlebiges Protein handelt. Allerdings ist bereits beschrieben, dass die Proteinmenge an hDlg in HeLa Zellen nach Blockierung des Proteasoms nur geringfügig zunimmt. Zudem war die geringe Zunahme nur in isolierten Zellen zu beobachten und blieb bei einer Konfluenz der Zellen größer 50 % aus (Mantovani *et al.*, 2001).

Um die Stabilität von hDlg in HeLa Zellen zu untersuchen, wurden deshalb zunächst zwei 'klassische' Ansätze gewählt. Zum ersten wurde die Menge an endogenem hDlg mit und ohne Inhibition des Proteasoms verglichen und zum zweiten die Proteinsynthese blockiert und die Menge an hDlg vor und nach der Blockierung verglichen.

Da für hDlg eine Stabilisierung nach Inhibierung des Proteasoms in ausschließlich niedrigkonfluenten HeLa Zellen beschrieben ist (Mantovani *et al.*, 2001), wurden HeLa Zellen bei sehr niedriger Konfluenz mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt. Da bei einer niedrigen 'turn over' Rate nur geringe Effekte zu erwarten sind, wurden die

Auswirkungen der Proteasominhibierung über den relativ langen Zeitraum von 16 Stunden verfolgt.

Während p53 nach 4 Stunden eine deutliche Anreicherung aufwies, war für Scribble keinerlei und für hDlg eine geringe Erhöhung der Proteinmenge zu erkennen (Abb. 21). Erst nach 8 Stunden war eine deutlichere Anreicherung von hDlg zu erkennen, während für Scribble immer noch kein Unterschied ersichtlich war. p53 erfuhr im Vergleich zu einer 4-stündigen Behandlung mit MG132 keine verstärkte Anreicherung.

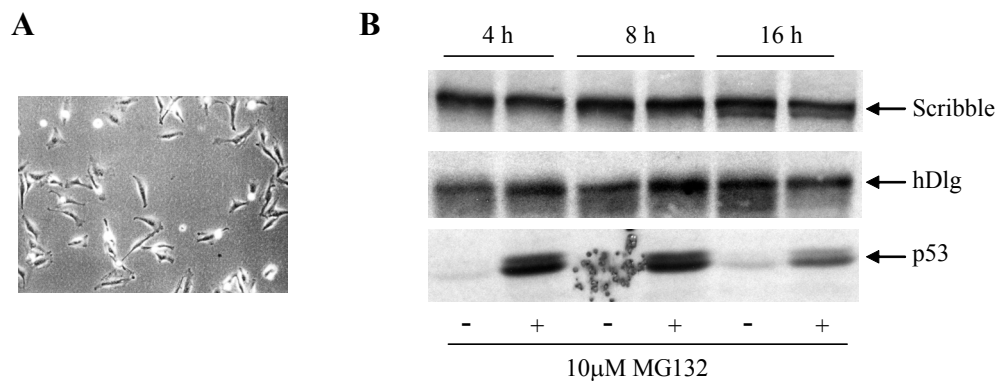


Abb. 21: In niedrigkonfluenten HeLa Zellen wird nach Inhibierung des Proteasoms p53 stark, hDlg schwach und Scribble gar nicht stabilisiert. (A) Durchlichtmikroskopische Aufnahme niedrigkonfluenten HeLa Zellen (B) Niedrigkonfluente HeLa Zellen (siehe (A)) wurden mit 10 μ M MG132 (Stocklösung: 10 mM in DMSO) (+) oder mit der jeweils identischen Menge an reinem DMSO (-) in DMEM für 4, 8 bzw. 16 h behandelt. Die Proteinmengen der gewonnenen Zellextrakte wurden abgeglichen, auf einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und die endogenen Proteine mittels Western Blot/ECL unter Verwendung der Antikörper K-21 (Scribble), H-60 (hDlg) und DO-1 (p53) detektiert.

Nach 16 Stunden war für Scribble und hDlg keine Anreicherung zu erkennen und die Bande für p53 in Anwesenheit des Proteasominhibitors fiel im Vergleich zur Negativkontrolle wesentlich schwächer aus als nach 4 und 8 Stunden. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Anwesenheit eines Proteasominhibitors einen 'Zellstress' verursacht, der mit zunehmender Zeit selbst im Durchlichtmikroskop anhand morphologischer Veränderungen ersichtlich war. So war in Gegenwart von MG132 eine Veränderung der Morphologie festzustellen, die sich in einer extrem ausgeprägten fibrillären Gestalt äußerte und sich dadurch deutlich von Zellen ohne MG132-Zusatz unterschied (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen war nach 16 Stunden Inkubation stark ausgeprägt, so dass die Spezifität der Beobachtungen, die zu diesem Zeitpunkt gemacht wurden, nicht gesichert bzw. nicht gegeben war. So kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass angereichertes hDlg und p53 bei längerer Behandlung auch unabhängig vom Proteasom degradiert

wurden. Auch ist nicht bekannt, über welchen Zeitraum nach Zugabe von 10 μM MG132 eine effektive Inhibierung des Proteasoms bewirkt wird.

In einem weiteren Experiment wurde die Proteinsynthese in HeLa Zellen blockiert und die Proteinmenge von bereits synthetisiertem hDlg über einen Zeitraum von 8 Stunden verfolgt. Dazu wurden HeLa Zellen in 6 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert und mit Medium versetzt, welches Cycloheximid in einer Konzentration von 50 μM enthält. Nach 0, 2, 4 und 8 Stunden Inkubationszeit wurden Zellextrakte gewonnen, über ihre Gesamtproteinmengen einander angeglichen und in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blot/ECL wurde unter Verwendung eines geeigneten Antikörpers das zu untersuchende Protein sichtbar gemacht. Aus dem Vergleich der verbleibenden Menge zu den verschiedenen Zeitpunkten konnte die Halbwertszeit zumindest grob abgeschätzt werden. Endogenes p53 diente dabei als Kontrolle für ein in HPV-positiven Zellen sehr kurzlebiges Protein. Während für Scribble die Proteinmenge über einen Zeitraum von 8 Stunden konstant blieb, war im Falle von p53 schon nach 2 Stunden kein Protein mehr detektierbar (Abb. 22). Die Menge an hDlg wies über einen Zeitraum von 8 Stunden nur geringe Unterschiede auf. Notwendig wäre eine genaue Bestimmung der Halbwertszeiten von hDlg und Scribble über 'pulse-chase'-Assays, da nur unter diesen Bedingungen mögliche kurzlebige Regulatorproteine von hDlg bzw. Scribble in ausreichenden Mengen vorlägen bzw. kontinuierlich synthetisiert würden. Die dafür erforderlichen Immunpräzipitationen von hDlg und Scribble waren mit den Antikörpern H-60 bzw. K-21 allerdings nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Somit kann eine mögliche Aussage über hDlg und Scribble als langlebige Proteine in HeLa Zellen nur unter der Einschränkung getroffen werden, dass keine kurzlebigen Proteine am Abbau beteiligt sind.

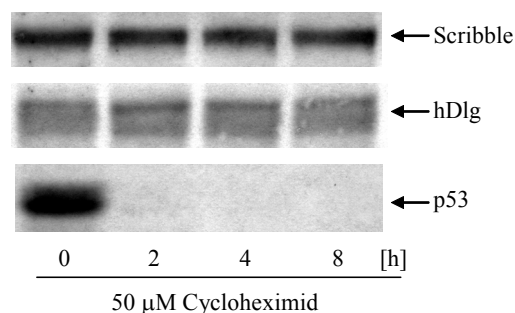


Abb. 22: Scribble und hDlg besitzen eine hohe Halbwertszeit in HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden bei 90 % Konfluenz mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid versetzt. Nach 0, 2, 4 und 8 Stunden wurden Zellextrakte gewonnen, semiquantitativ über ihre Gesamtproteinmenge einander angeglichen, auf einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Western Blot/ECL unter Verwendung der Antikörper K21 (Scribble), H-60 (Dlg) und DO-1 (p53) sichtbar gemacht.

3.4.2 Untersuchungen zur Stabilität von endogenem hDlg und Scribble mittels RNA Interference (RNAi)

Da in HeLa Zellen hDlg im Zeitraum von einigen Stunden nur geringe Unterschiede in seiner Proteinmenge bei Proteasominhibierung und Inhibierung der Proteinsynthese aufwies, sollte der mögliche Abbau von hDlg durch HPV18 E6 und E6AP über einen längeren Zeitraum untersucht werden. RNA Interference (RNAi) ist eine Methode, um spezifisch die Expression eines bestimmten Genprodukts zu unterbinden. Dabei wird durch Einbringung kurzer doppelsträngiger RNA (siRNA) in die Zelle, die der Sequenz der siRNA korrespondierende Messenger RNA (mRNA) zerstört. Je nach Halbwertszeit des bereits gebildeten Genprodukts sind zwischen 24 und 96 Stunden nach Transfektion 'knock down' Effekte zu beobachten. Soweit es im Einzelfall möglich ist, kann der 'knock down' auf Proteinebene mittels Western Blot/ ECL unter Verwendung geeigneter Antikörper nachgewiesen werden. Da in HPV positiven Zellen die Ausschaltung der Gene bzw. mRNAs von E6 und E6AP zu einem Anstieg an p53 und zum Zelltod durch Apoptose führt (Butz *et al.*, 2003; Hengstermann *et al.*, zur Publikation eingereichte Daten), wurden für die Untersuchung des hDlg-Abbaus zwei in unserem Labor etablierte Zelllinien (HeLa A1 bzw. C2) verwendet, in denen die Bildung von p53 durch ein stabil integriertes Plasmid (vektorbasierte RNAi) unterdrückt ist (Hengstermann *et al.*, zur Publikation eingereichte Daten). In den stabilen p53-'knock-down'-Zellen führt die Ausschaltung von E6 bzw. E6AP nicht zu einem Zelltod durch Apoptose (Hengstermann *et al.*, zur Publikation eingereichte Daten). Um einen Einfluss von HPV18 E6 und E6AP auf die Menge und die Stabilität von hDlg zu untersuchen, wurden HeLa A1 und C2 Zellen jeweils am Abend vor der Transfektion ausgesät, so dass am nächsten Tag eine Transfektion von siRNA bei einer Konfluenz der Zellen von 30 bis 50 % erfolgen konnte. Gemäß Angaben des Herstellers (Invitrogen) wurden 200 pmol pro 3.5 cm Platte der entsprechenden siRNAs transfiziert. Dabei war die Sequenz einer siRNA gegen E6AP und die einer zweiten gegen 18E6 gerichtet. Als Negativkontrolle fungierte eine siRNA, deren Sequenz gegen die mRNA von Luciferase gerichtet ist. Da das Einbringen doppelsträngiger RNA in Zellen *per se* eine Abwehrreaktion einleiten kann, war der Vergleich zur Negativkontrolle unerlässlich. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden Zellextrakte gewonnen, über ihre Gesamtproteinmenge einander angeglichen und nach SDS-PAGE und Western Blot/ECL die verschiedenen Proteine unter Verwendung von geeigneten Antikörpern sichtbar gemacht. Um den 'knock down' von E6AP auf Proteinebene zu kontrollieren, wurden in

separaten Transfektionen auf 6 cm Zellkulturschalen nach 72 Stunden Zellextrakte gewonnen, die Mengen angeglichen und E6AP unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen E6AP kopräzipitiert. Der Auftrennung mittels SDS-PAGE folgte die Detektion von E6AP nach Western Blot/ECL unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen E6AP. Da keine geeigneten Antikörper zur Detektion von HPV18 E6 zur Verfügung stehen, konnte ein 'knock down' von E6 nicht auf Proteinebene verifiziert und quantifiziert werden.

Während für Scribble über einen Zeitraum von 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede auftraten, war für hDlg eine deutliche Anreicherung in HeLa A1 und C2 Zellen nach Einbringung von gegen HPV18 E6 gerichteter siRNA (E6) zu erkennen (Abb. 23). Diese Anreicherung erfolgte abhängig von der Zeit, so dass erst nach 72 Stunden deutlich eine signifikante Doppelbande zu erkennen war, die jeweils bei der Kontrolltransfektion (Luc) nicht zu beobachten war.

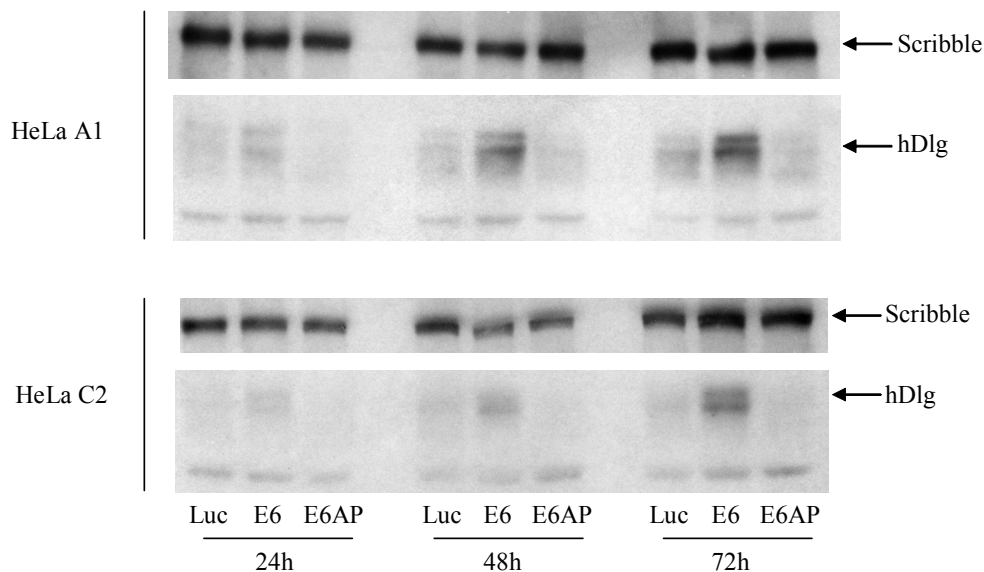


Abb. 23: Ein transienter 'knock down' von HPV18 E6 mittels siRNA führt zu einer Anreicherung von hDlg. p53 knock down HeLa Klone A1 bzw. C2 wurden bei 30-50 % Konfluenz auf 3.5 cm Platten mit 200 pmol/Platte synthetischer, kurzer doppel-strängiger RNA (siRNA) transfiziert. Die Sequenzen der siRNAs waren gerichtet gegen Luciferase (Luc), HPV18 E6 (E6) oder gegen E6AP (E6AP). 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurden Zellextrakte gewonnen, über ihre Gesamtproteinmenge einander angeglichen und in einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Unter Verwendung der Antikörper K-21 (Scribble) bzw. H-60 (Dlg) wurden die Proteine mittels Western Blot/ECL sichtbar gemacht

Auch wenn keine Möglichkeit bestand, endogenes E6 auf Proteinebene nachzuweisen, konnte die Anreicherung von hDIg als indirekter Nachweis für einen 'knock down' von E6 verstanden werden.

Anzumerken ist ein beobachteter Zelltod im Falle einer Transfektion von 200 pmol pro 3.5 cm Kulturschale an E6AP siRNA, so dass die unveränderten Mengen an Scribble und hDIg (Abb. 23) im Vergleich zur Negativkontrolle (Luc) nicht interpretierbar waren. Dieser Zelltod trat bei Transfektion von 200 pmol E6AP siRNA pro 3.5 cm Platte auch in HPV negativen Zelllinien auf (Daten nicht gezeigt). Die Mengen an E6AP wurden unter diesen Bedingungen nicht mittels Immunpräzipitation verfolgt. Eine Reduzierung der transfizierten Menge an E6AP siRNA um den Faktor 10 führte zu einer HPV spezifischen Reaktion in dem Sinne, dass für parentale HeLa Zellen ein Zelltod zu beobachten war, aber nicht für HPV negative Zellen und die p53 'knock down' Klone A1 und C2 (Daten nicht gezeigt.). Unter diesen Bedingungen (nur 60 statt 600 pmol siRNA pro 6 cm Platte) konnte ein 'knock down' an E6AP auf Proteinebene von ca. 40 % erzielt werden (Abb. 24). Für hDIg war unter diesen Bedingungen keine Anreicherung zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

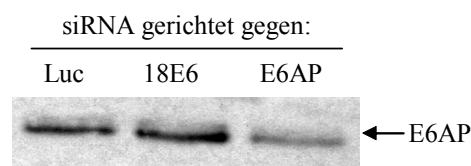


Abb. 24: Reduzierte Mengen an E6AP siRNA bewirken nur einen geringen 'knock down' an E6AP. p53 knock down Klon C2 Zellen wurden bei 30-50 % Konfluenz auf 6 cm Zellkulturschalen mit 60 pmol siRNA pro Schale gegen Luciferase (Luc), HPV18 E6 (18E6) oder E6AP transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte gewonnen, semiquantitativ anhand der Gesamtproteinmenge einander angeglichen und unter Verwendung eines monoklonalen E6AP Antikörpers eine Immunpräzipitation (vgl. 2.2.9.7) an Protein-A-Sepharose ÜN durchgeführt. Die Präzipitate wurden gewaschen, aufgekocht und in einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Unter Verwendung eines polyklonalen E6AP Antikörpers wurde nach Western Blot/ECL das Protein nachgewiesen.

3.4.3 Vektorbasierte RNAi in den p53 'knock down' Zellen HeLa A1 und C2

Bei transienten Transfektionen von E6AP siRNA in den p53 'knock down' HeLa Zellen A1 und C2 wurde keine Anreicherung an hDIg beobachtet (vgl. 3.4.2). Deshalb wurde eine mögliche Anreicherung von hDIg bei einem eventuell effektiverem 'knock down' von E6AP mittels stabiler, vektorbasierter RNAi untersucht. Dazu wurden HeLa A1 und C2 Zellen mit 2 µg der Konstrukte pSilencerX oder pSilencerE6AP transfiziert und

selektioniert. pSilencer X kodierte dabei für eine Kontroll-siRNA, deren Sequenz gegen keine bekannte mRNA gerichtet ist, während pSilencerE6AP für die bereits als synthetische siRNA verwendete Sequenz von E6AP kodierte. Da der Vektor pSilencer über eine Hygromycin-Resistenz verfügt, war durch Zugabe von 200 µg/ml Hygromycin eine Selektion gegen nicht-transfizierte Zellen möglich. Nach Selektion wurden Zellextrakte von konfluenten Zellpopulationen gewonnen und semiquantitativ über die Gesamtproteinmenge einander angeglichen. Der Großteil des Extraktes wurde für eine E6AP Immunpräzipitation verwendet und ein geringer Teil für einen Western Blot aufgekocht. Es wurden keine Transfektionen mit dem Vektor pSilencer18 durchgeführt, da bei transienten Transfektionen von 18E6 siRNA ein Zelltod bei Zeiten länger als 72 Stunden nach Transfektion zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

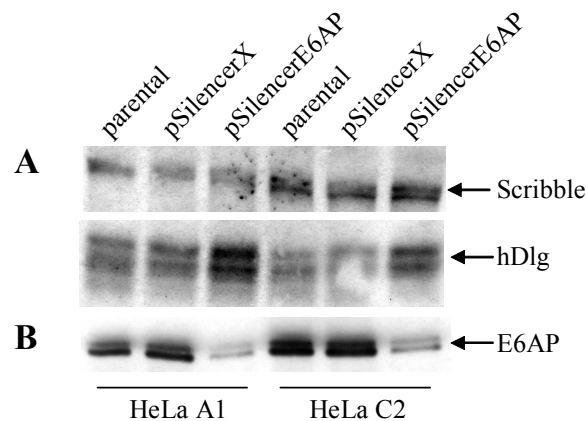


Abb. 25: Vektorbasierte RNAi bewirkt einen starken 'knock down' an E6AP und dieser korreliert mit einer Anreicherung von hDlg. (A) HeLa A1 und C2 Zellen wurden mit 2 µg pSilencerX oder E6AP transfiziert und mit 200 µg/ml Hygromycin selektioniert. Die gewonnenen Zellextrakte aus den stabilen Kulturen und den jeweiligen untransfizierten Zelllinien A1 und C2 (parental) wurden semiquantitativ über die Gesamtproteinmenge einander angeglichen, auf einer 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine unter Verwendung der Antikörper K-21 (Scribble) und H-60 (Dlg) nach Western Blot/ECL sichtbar gemacht. (B) Angeglichene Mengen der unter (A) gewonnenen Zellextrakte wurden unter Verwendung eines monoklonalen E6AP Antikörpers einer Immunpräzipitation (vgl. 2.2.9.7) unterzogen. Die Auftrennung erfolgte auf einer 7,5 % SDS-PAGE, der Nachweis von E6AP mittels eines polyklonalen E6AP Antikörpers nach Western Blot/ECL.

Scribble wies ein identisches Verhalten zu den transienten Transfektionen mit siRNA auf (vgl. Abb. 23) und zeigte keinerlei Anreicherung (Abb. 25A). Für hDlg hingegen konnte sowohl in der Zelllinie HeLa A1 als auch HeLa C2 eine Erhöhung der Proteinmenge an hDlg in Anwesenheit von pSilencerE6AP beobachtet werden (Abb. 25A). Ein Vergleich der E6AP Proteinmengen ergab eine Abnahme von ungefähr 80 % in Anwesenheit von

pSilencerE6AP im Vergleich zu pSilencerX und den parentalen Zellen HeLa A1 bzw. C2 (Abb. 25B). In transienten Experimenten war bei der Transfektion von E6AP siRNA keine Anreicherung der hDlg-Menge und eine Abnahme der Proteinmenge an E6AP von ca. 40 % zu beobachten (vgl. Abb. 24). Somit war im Falle eines 'knock down' von E6AP mittels pSilencerE6AP die verbleibende Menge an E6AP deutlich geringer als es in transienten Transfektionen mit siRNA beobachtet worden war. Dieser Unterschied an verbleibender E6AP-Proteinmenge (vgl. Abb. 26) könnte ein Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen für die Mengen an hDlg in den verschiedenen Untersuchungen sein. Zusätzlich wurden im Gegensatz zu transienten Assays Zellextrakte nicht nach 24 - 72 Stunden gewonnen, sondern ca. 20 Tage nach der Transfektion mit pSilencerX bzw. pSilencerE6AP.

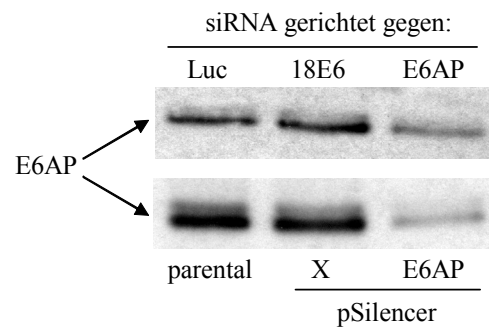


Abb. 26: Ein stabiler, vektorbasierter 'knock down' von E6AP ist effizienter als ein transienter mittels synthetischer siRNA. Gegenüberstellung der 'knock down' Effekte auf die Mengen an E6AP in der Zelllinie HeLa C2 bei stabiler Selektion nach Transfektion von pSilencerX bzw. pSilencerE6AP und bei transienten Transfektion mit synthetischer siRNA. Luc, synthetische siRNA gerichtet gegen Luciferase. X, pSilencer mit einer gegen keine bekannte mRNA gerichtete Sequenz.

3.5 *In vitro* Immortalisierung von primären Keratinozyten

In Kooperation mit Dr. Noel J. Whitaker (School of Biotechnology & Biomolecular Sciences, The University of New South Wales, Sydney, Australia. Zuvor: Institut für Biochemie, Universität zu Köln, Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Scheffner) wird das Potential von den in dieser Arbeit generierten und biochemisch charakterisierten E6 Mutanten untersucht, primäre Keratinozyten *in vitro* zu immortalisieren. Zwar ist die Effektivität einer Immortalisierung durch E6 in Kooperation mit E7 am höchsten, doch kann die stabile Expression von sowohl E6 als auch E7 allein eine Immortalisierung von primären Keratinozyten bewirken (Halbert *et al.*, 1991; Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002; N.J. Whitaker, unpublizierte Daten). Da die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Rolle von E6 klären sollten, erfolgten die *in vitro* Immortalisierungsstudien hauptsächlich mit E6 allein.

Für diesen Zweck wurden die E6 Mutanten in den retroviralen Vektor pLXSN subkloniert und sequenziert. Alle Konstrukte wurden dabei in insgesamt 3 Varianten erzeugt, wobei jeweils keine, eine N-terminale oder eine C-terminale Fusion der E6 Konstrukte mit einem HA-tag erfolgte, um so möglicherweise die Expression der E6 Proteine in den infizierten Keratinozyten mittels HA-Immundetektion nachweisen zu können.

Die rekombinanten Viren wurden nach einem etablierten Protokoll generiert (Halbert *et al.*, 1991; vgl. 2.2.9.10), wobei die amphotrope Zelllinie PA317 als Verpackungszelllinie diente. Die Überstände der virusproduzierenden Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen für die Infektion von 3T3 Mausfibroblasten verwendet. Nach einer Selektion gegen Geneticin konnte der jeweilige Virustiter durch die Anzahl an Zellkolonien bei den entsprechenden Infektionsverdünnungen bestimmt werden (vgl. 2.2.9.11) (Daten nicht gezeigt).

Alle weiteren Versuche wurden bzw. werden von Dr. Noel J. Whitaker und Mitarbeitern in Australien durchgeführt. Bisher konnten Keratinozyten aus 5 Vorhaut-Gewebeproben isoliert und für Immortalisierungsstudien verwendet werden. Nach Einbringung der E6 Konstrukte durch retrovirale Infektion erreichten infizierte Zellen nach ungefähr 10 Zellteilungen einen Zustand ohne Proliferation (Zellkrise). Zellen, die nach der Zellkrise zur Zellteilung fähig waren, wurden bis zum Erreichen einer Seneszenz oder der Immortalisierung kultiviert. Als immortal wurden dabei Zellen definiert, die mindestens 100 Zellteilungen nach Infektion durchliefen. Zusätzlich wurde in allen Fällen die Telomerase-Aktivität vor und nach der Zellkrise bestimmt.

Tabelle 3: Vorläufige Daten zur Immortalisierung von primären Keratinozyten durch verschiedene E6 Konstrukte nach retroviraler Infektion

Retrovirales Konstrukt	Anzahl der Zellteilungen nach Infektion	immortal	Relative* Telomerase Aktivität	
			Vor der Zellkrise	Nach der Zellkrise
Leervektor	≈10	Nein	-	-
11E6	≈10	Nein	-	-
11C16	≈10	Nein	-	-
16E6	≥ 100	Ja	+	++
16E6 N-HA	≥ 100	Ja	+	++
16C11	≈ 50	Nein	-	-
16C18	≥ 100	Ja	+	++
18E6	≥ 100	Ja	-	++
18C11	≈10	Nein	-	-
18C16	≈10	Nein	-	-

N-HA, das Protein besitzt einen N-terminalen HA-tag; *, Relativ im Vergleich zu HeLa Zellen. -, keine signifikante Aktivität. +, signifikante Aktivität. ++, höhere Aktivität im Vergleich zu '+'.

Wie zu erwarten (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002), konnten primäre Keratinozyten durch Infektion mit einem HPV16 E6 exprimierenden Virus immortalisiert werden. Es wurde eine Aktivierung des Enzyms Telomerase beobachtet, die nach der Zellkrise deutlich gesteigert war. Zwar ist die Zunahme der relativen Telomerase Aktivität nach der Zellkrise für 16E6 mit einem N-terminalen HA-tag geringer als ohne HA-tag (Daten nicht gezeigt), doch scheint dieser Unterschied zumindest keinen prinzipiellen Effekt auf die Fähigkeit der Immortalisierung zu besitzen.

Für 18E6 und 16C18 wurden ebenfalls Aktivierung der Telomerase und Immortalisierung von Keratinozyten beobachtet. Da 18E6 und 16C18 über alle biochemischen Eigenschaften verfügen sollten, die auch 16E6 besitzt, bestätigte die beobachtete Immortalisierung das erwartete Verhalten dieser Konstrukte.

Keratinozyten, die mit dem für die Chimäre 16C11 kodierenden Virus infiziert wurden, wiesen eine verlängerte Lebensspanne auf, erreichten aber nicht das Stadium der Immortalität. So vollzogen sie 50 Zellteilungen nach der Infektion, während bei den Kontrollzellen (Infektion mit Leervektor) nach 10 Zellteilungen keine weitere Proliferation mehr festzustellen war. Es konnte keine signifikante Aktivierung des Enzyms Telomerase beobachtet werden.

Überraschender weise verhielt sich das vergleichbare Konstrukt 18C11 nicht wie 16C11 und zeigte ein Verhalten wie die Negativkontrolle (Leervektor).

Die retroviralen Konstrukte für 11E6, 11C16 und 18C16 zeigten ein ähnliches Verhalten wie die Kontrolle (pLXSN-Leervektor), so dass primäre Keratinozyten nach der Infektion mit dem jeweiligen Virus nicht immortal wurden. Die Chimäre 18C16 sollte alle bekannten Eigenschaften von 'high risk' E6 Proteinen aufweisen und zeigte im Rahmen der biochemischen Charakterisierung (vgl. 3.2) keine signifikanten Unterschiede zu den 'high risk' E6 Proteinen. Somit ist die Beobachtung, dass die Infektion mit dem entsprechenden Virus nicht zur Immortalisierung der Zellen führte, überraschend.

Für die Fertigstellung der vorgestellten Studie werden 3-5 Jahre veranschlagt (Noel Whitaker, persönliche Mitteilung). So umfasst ein Immortalisierungsassays, von der Isolierung der Zellen aus den Gewebeproben bis zum Erreichen der Immortalität infizierter Zellen (100 Zellteilungen) ungefähr 1 Jahr. Notwendig ist eine Reproduktion der Experimente mit Keratinozyten aus Gewebeproben vieler Spender, um signifikante Daten zu erhalten, die vor allem unabhängig von genetischen Prädispositionen der einzelnen Spender sind. Weiterhin werden alle E6 Konstrukte (vgl. Tabelle 2) im weiteren Verlauf der Immortalisierungsstudien getestet und zudem ihre jeweilige Transkription mittels RT-PCR (RT = Reverse Transkriptase) überprüft. Da ein N-terminaler HA-tag keinen Einfluss auf das Immortalisierungsverhalten anzeigte (s.o.), soll die Möglichkeit der Detektion von E6 auf Translationsebene (Western Blot) nach Infektion mit entsprechenden pLXSN-E6-Konstrukten untersucht werden.

3.6 Der E6/E6AP-Komplex als Ansatz für eine molekulare Therapie von HPV-assoziierten Karzinomen des Gebärmutterhalses: E6-Bindepeptide

Publizierte (vgl. Tabelle 1) und die in dieser Arbeit erhaltenen Daten (hDIg) zeigen an, dass die meisten bekannten zellulären E6-Substratproteine mittels E6AP einem Abbau zugeführt werden können. Es ist daher nahe liegend, dass dem E6/E6AP-Komplex eine fundamentale Rolle bei der HPV assoziierten Karzinogenese bzw. beim Erhalt des transformierten Zustandes von HPV positiven Zellen zukommt. Die Inhibierung der Bildung des E6/E6AP-Komplexes mittels E6-Bindepeptiden (vgl. 1.4.2) stellt somit möglicherweise einen Ansatz für eine molekulare Therapie von Zervixkarzinomen dar. Da alle 'high risk' E6 Proteine dieselbe Region auf E6AP für eine funktionelle Wechselwirkung benötigen, scheint e6bp1 ein geeigneter Kandidat für eine allgemeine E6/E6AP Inhibierung zu sein. Allerdings wurde die prinzipielle Funktionalität von e6bp1 und weiteren E6-Bindepeptiden bisher hauptsächlich *in vitro* demonstriert. Zudem konnte für e6bp1 im Gegensatz zu dem Peptid 1/1 keine Stabilisierung von p53 und kein Zelltod durch Apoptose in HPV positiven Zellen beobachtet werden (vgl. 1.4.2).

Limitierende Faktoren für eine effektive Inhibierung des E6/E6AP-Komplexes in Zellkultursystemen sind die Bindungsaffinität der E6-Bindepeptide und die Einbringung ausreichender Mengen eines gegebenen Peptids in die Zellen. Notwendig wäre also ein System, das die Einbringung hoher Menge an Bindepeptid mit möglichst hoher Bindungskapazität für HPV E6 Proteine in Zellen ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb, ausgehend von e6bp1, zum einen Peptidsequenzen generiert werden, die eine höhere Bindungskapazität an HPV16 E6 aufweisen als e6bp1. Dazu sollte sowohl durch gezielte Mutagenese als auch mittels Zufallsmutations-Polymerase-Kettenreaktion, gekoppelt mit einem Yeast-Two-Hybrid-System, die Bindung an HPV16 E6 untersucht und möglicherweise optimiert werden. Zum anderen sollte ein System etabliert werden, das auf der Fusion mit zellpenetrierenden Peptiden basiert (vgl. 1.5) und die Einbringung großer Mengen an Peptiden in Zellen ermöglichen sollte.

3.6.1 Charakterisierung und Optimierung der Wechselwirkung von e6bp1 mit HPV16 E6 in *S. cerevisiae* (Yeast-Two-Hybrid-System)

Eine Möglichkeit, die Interaktion von Proteinen bzw. Peptiden *in vivo* zu untersuchen, stellt das Yeast-Two-Hybrid-System dar. Es ermöglicht Aussagen über die direkte Wechselwirkung von Proteinen bzw. Peptiden, da abhängig von einer Interaktion in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ein Transkriptionsfaktor rekonstituiert und Reportergene aktiviert werden (Fields und Song, 1989). Dabei wird ein potentieller Interaktionspartner als Fusionsprotein mit einer DNA-Bindedomäne (BD) und der andere in Fusion mit einer transaktivierenden Domäne (AD) exprimiert. Im Falle einer Bindung der Interaktionspartner in *S. cerevisiae* kommt es zu einer räumlichen Annäherung von Binde- und Transaktivierungsdomäne, welche ausreichend ist, um funktionell als Transkriptionsfaktor zu wirken. Als Reportersystem wurde in dieser Arbeit der *S. cerevisiae*-Stamm KF1 verwendet (Butz *et al.*, 2000), in dem nach Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4, abhängig von der Bindungsstärke der zu untersuchenden Proteine bzw. Peptide, die Gene GAL1-HIS3, GAL2-ADE2 und SPO13-URA3 aktiviert werden. Während GAL1-HIS3 einen schwachen Selektionsmarker darstellt, ist für die Aktivierung von GAL2-ADE2 eine mittelstarke und für SPO13-URA3 eine starke Interaktion der Bindepartner erforderlich (James *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1996; Butz *et al.*, 2000). Zur Verfügung standen Vektoren, welche HPV11 (pPC97-11E6) bzw. 16 E6 (pPC97-16E6) als Fusionsprotein mit der GAL4-Bindedomäne exprimieren. Der Vektor pPC97 enthält zudem den Selektionsmarker LEU, der das Wachstum von transformierten Zellen auf Hefepplatten ohne Zusatz der Aminosäure Leucin ermöglicht. Die potentiell interagierenden Peptide lagen in Fusion mit der GAL4-Bindedomäne im Vektor pAD vor. Dabei diente das Peptid 1/1 (pAD-TRX-1/1) als Positivkontrolle für eine starke Bindung an HPV16 E6 und Kopep (pAD-TRX-Kopep) fungierte als Negativkontrolle (Butz *et al.*, 2000). Die Expression des E6-Bindepeptids e6bp1 erfolgte sowohl linear (pAD-e6bp1) als auch im Kontext einer Thioredoxinschleife (pAD-TRX-e6bp1). Der Vektor pAD verfügt über den Selektionsmarker TRP, der ein Wachstum auf Hefepplatten ohne Zusatz der Aminosäure Tryptophan ermöglicht.

Alle möglichen Kombinationen der vorhandenen pPC97 zu den pAD-Vektoren wurden in KF1 transformiert und auf Platten ohne Zusatz von Leucin und Tryptophan (LT) ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Hefen zuerst auf eine Hefepplatte ohne Leucin und Tryptophan überführt (pre-clear) und anschließend auf

Selektionsplatten, die ein Wachstum in Abhängigkeit von der Stärke der Interaktion, d.h. der Aktivierung der verschiedenen Reportergene (s.o.), erlaubt.

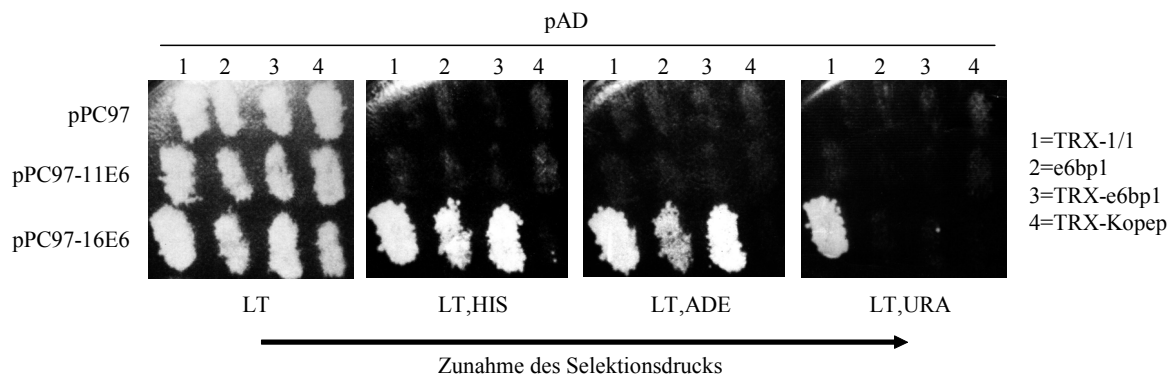


Abb. 25: e6bp1 weist eine mittelstarke Bindung an HPV16E6 in *S. cerevisiae* auf. Mit den angegebenen Vektoren stabil transformierte Zellen des *S. cerevisiae*-Stamms KF1 wurden auf Hefeagarplatten ohne Zusatz von Leucin und Tryptophan (LT) ausgestrichen, am nächsten Tag mittels Replika auf eine weitere Platte (LT) überführt (pre-clear) und anschließend auf Platten, denen zusätzlich zu den Aminosäuren Leucin und Tryptophan entweder kein Histidin (LT,HIS), Adenin (LT,ADE) oder Uracil (LT,URA) zugesetzt wurden, Replika-übertragen. Die Platten wurden 3 Tage bei 30 °C in einem Brutschrank inkubiert und das Wachstum täglich kontrolliert.

Während Hefen mit allen Kombinationen aus pPC97- und pAD-Konstrukten auf Interaktions-unabhängigen LT-Platten wuchsen (gezeigt sind die 'pre-clear-Platten'), war schon bei Abwesenheit der Aminosäure Histidin (LT,HIS), nur noch ein Interaktions-spezifisches Wachstum von Hefen zu beobachten, die HPV16 E6 und die Peptide TRX-1/1, TRX-e6bp1 und e6bp1 exprimierten (Abb. 25). Auf Platten, die eine mittelstarke Interaktion anzeigten (LT,ADE), waren dieselben Klone zum Wachstum fähig, mit dem Unterschied, dass auf 'LT,HIS' alle 3 Klone schon einen Tag nach der Überführung sichtbar waren, während auf 'LT,ADE' nach einem Tag nur die Kombinationen 16E6 mit TRX-1/1 bzw. TRX-e6ap 'sichtbar' war. Das lineare Peptid e6bp1 erschien auf 'LT,ADE' erst nach 2 Tagen und zeichnete sich insgesamt durch ein schwächeres Wachstum und eine rötliche Färbung aus, die einen Adeninmangel und somit eine schwache Aktivierung des Gens GAL2-ADE2 anzeigte.

Um Peptide mit höherer Bindungskapazität an HPV16 E6 zu erzeugen, wurde zunächst die Methode der PCR-generierten Mutagenese verwendet. Dabei wurde sowohl der Vektor pAD-TRX-e6bp1 als auch pAD-e6bp1 als PCR-Templat eingesetzt. Die Oligonukleotide waren so gewählt, dass sie sowohl 5' als auch 3' ungefähr 60 Basenpaare von der Peptid-kodierenden Sequenz entfernt lagen. Der jeweilige Leervektor (pAD-TRX bzw. pAD)

wurde mit Restriktionsendonukleasen linearisiert. Dabei wurden die Restriktionsendonukleasen so gewählt, wie es der Klonierung von e6bp1 in pAD-TRX-e6bp1 bzw. pAD-e6bp1 entspricht. Auf diese Weise enthalten PCR-Produkt und Vektor 5' und 3' von der Restriktionsstelle einen homologen Bereich, d.h. eine übereinstimmende Basenabfolge von ungefähr 80 Basenpaaren. Werden PCR-Produkt und geschnittener Vektor gleichzeitig in *S. cerevisiae* transformiert, erfolgt eine homologe Rekombination unter Bildung eines geschlossenen Plasmids. Für den Fall pAD-TRX-e6bp1 ist das Prinzip der homologen Rekombination *in vivo* in Abbildung 26 dargestellt.

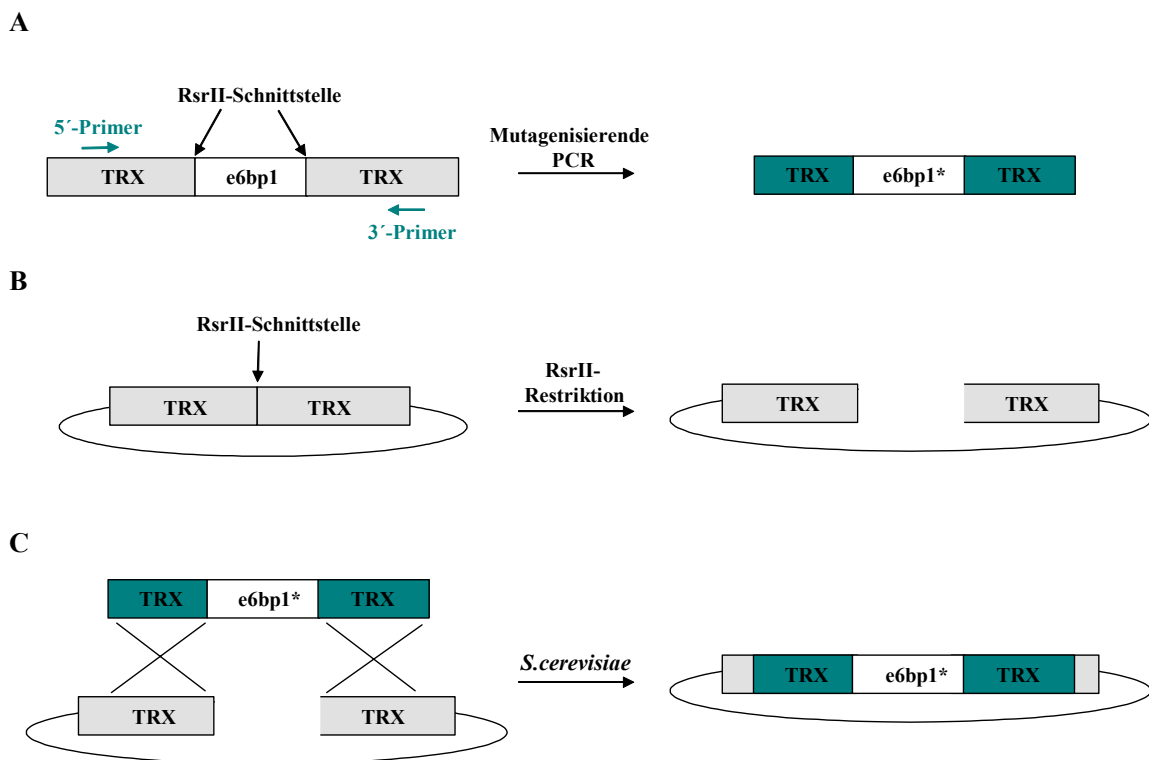


Abb. 26: Prinzip der homologen Rekombination in *S. cerevisiae*. (A) Unter mutagenisierenden Bedingungen wird eine Polymeraseketterreaktion mit der Templat-DNA (hier: pAD-TRX-e6bp1) durchgeführt (vgl. 2.2.3.2). (B) Der entsprechende Vektor ohne Insert (hier: pAD-TRX) wird mit der Restriktionsendonuklease linearisiert, die der Schnittstelle entspricht, die zur Einklonierung des Inserts verwendet wurde (hier: RsrII). (C) Der zu transformierende *S. cerevisiae*-Stamm wird nach einem Standardprotokoll für Transformationen hoher Effizienz (vgl. 2.2.8.3) mit dem geschnittenen Vektor und dem PCR-Produkt transformiert und auf einer jeweils entsprechenden Reportergerneplatte bei 30 °C bis zum Heranwachsen von Kolonien inkubiert. TRX, Thioredoxin. *, mutierte Sequenz.

Die Bedingungen wurden so gewählt, dass eine Aktivierung des Reportergens GAL2-ADE2 (pAD-e6bp1) oder SPO13-URA3 (pAD-TRX-e6bp1) notwendig war, um ein Wachstum transformierter Hefen zu ermöglichen. TRX-1/1 und e6bp1 bzw. TRX-e6bp1 wurden zusätzlich unter nicht-mutagenisierenden Bedingungen mittels PCR amplifiziert

und fungierten als Negativ- bzw. Positivkontrolle. Während bei Transformation von geschnittenem Vektor oder Insert allein kein Wachstum der Hefen beobachtet wurde, erfolgte bei gleichzeitiger Transformation der beiden Komponenten eine Aktivierung des jeweiligen Reportergens. Als weitere Kontrolle diente eine Isolierung von Plasmid-DNA nach homologer Rekombination, und es konnten in allen Fällen Plasmide gewonnen werden, die der Sequenz der Ausgangsplasmide entsprachen (Daten nicht gezeigt).

Obwohl in beiden Fällen ungefähr 20 Millionen Klone untersucht wurden (wobei für die gewählten PCR-Bedingungen bei einem ungefähr 200 Basenpaare großen Fragment in jedem zweiten PCR-Produkt eine Mutation erzeugt worden sein sollte (Spee *et al.*, 1993)), konnten keine Peptide generiert bzw. isoliert werden, die eine höhere Bindungskapazität an HPV16 E6 aufwiesen. Im Falle von pAD-e6bp1 enthielten alle Klone, die aufgrund eines helleren Erscheinungsbildes auf 'LT,ADE' (vgl. Abb. 25 ff.) isoliert wurden, Vektoren mit einer Sequenzabfolge von e6bp1.

Alle Klone, die von 'LT,URA' Platten isoliert wurden (pAD-TRX-e6bp1 als PCR-Templat) erwiesen sich als 'falsch-positiv'.

Alternativ zur Optimierung mittels Zufallsmutagenese wurden parallel gezielte Mutationen in der Sequenz von e6bp1 vorgenommen. Dabei wurden beschriebene Daten für e6bp1 und andere E6-Bindepeptide miteinander verglichen und so Aminosäurereste bestimmt, die einer Mutationsanalyse unterzogen werden sollten (Abb. 27). Da eine α -helikale Struktur von e6bp1 beschrieben ist (vgl. 1.4.2) erfolgten alle Substitutionen gegen Alanin, um so eventuell eine Stabilisierung der α -Helix und verbesserte Bindungsfähigkeit zu erzielen. So wurden Einzelsubstitutionen der Aminosäuren 5 (Serin), 8 (Threonin), 10 (Glutamin) und 17 (Arginin) vorgenommen.

1	5	8	10	17
I	P	E	S	S
E	L	T	L	Q
E	L	L	G	E
E	R	R	R	R
	↓	↓	↓	↓
	A	A	A	A

Abb. 27: Gezielte Mutationen von e6bp1. Aminosäuresequenz von e6bp1 im Einbuchstabencode und Angabe der zu Alanin substituierten Aminosäurereste.

Für den Austausch der Aminosäurereste 8, 10 oder 17 gegen Alanin wurde im Falle eines anderen E6-Bindepeptids eine optimierte Bindung an das E6 Protein des Rinderpapillomvirus 1 (BPV1-E6) beschrieben (Chen *et al.*, 1998). Dieses Bindepeptid

besitzt zudem einen Glycinrest (keine Hydroxylgruppe) an der Position, die in e6bp1 dem Serinrest (Hydroxylgruppe) an Position 5 entspricht. Die Übertragbarkeit der Daten für eine Bindung von E6-Bindepeptiden an BPV1-E6 auf HPV-E6 schien möglich, da bei Studien zu e6bp1 und mutierten Formen vergleichbare Bindeeigenschaften an BPV1-E6 und HPV16-E6 beschrieben wurden (*Be et al.*, 2000).

Neben Einzelsubstitutionen wurden auch Kombinationen dieser vorgenommen. Die generierten Plasmide wurden in den *S. cerevisiae*-Stamm K1, der zusätzlich stabil den Vektor pPC97-16E6 enthielt, transformiert und nach Einzelausstrich mittels Replika auf die verschiedenen Reporterplatten übertragen. Als Kontrolle dienten e6bp1, TRX-Kopep und TRX-1/1 (vgl. Abb. 25). Das Wachstum bei 30 °C wurde über 3 Tage verfolgt. Alle Kontrollplasmide zeigten ein Wachstum wie schon zuvor beobachtet (vgl. Abb. 25).

Tabelle 4: Wachstumsverhalten der gezielt manipulierten e6bp1-Mutanten in Abhängigkeit von ihrer Bindung an 16E6 und Reportergergenaktivierung

Peptid	Wachstum nach 3 Tagen auf den Reporterplatten:		
	HIS	ADE	URA
TRX-Kopep	-	-	-
TRX-1/1	+	+	+
e6bp1	+	+/-	-
5A	+	+/-	-
8A	-	-	-
10A	+	+/-	-
17A	+	+/-	-
5A,8A	+	-	-
5A,10A	+	+/-	-
5A,17A	+	+/-	-
8A,10A	+	-	-
8A,17A	-	-	-
10A,17A	+	+/-	-
5A,8A,17A	+	-	-
8A,10A,17A	+	-	-

+, Wachstum. +/- Wachstum, aber rötliche Färbung. -, kein Wachstum.

Sämtliche mutierten e6bp1-Derivate waren nicht in der Lage, das Reportergergen SPO13-URA3 zu aktivieren (Tabelle 4). Auffällig war ein im Vergleich zu e6bp1 gestörtes Wachstum aller Hefen mit Konstrukten, in denen die Aminosäure 8 (Threonin) gegen Alanin ausgetauscht wurde. Ein alleiniger Austausch (8A) und die Kombination mit einem Austausch von Aminosäure 17 (8A,17A) ließen keinerlei Wachstum auf allen Reporterplatten erkennen. Waren zusätzlich die Aminosäuren 5 oder 10 gegen Alanin ausgetauscht (5A,8A; 8A,10A; 8A,10A,17A; 5A,8A,17A) wurde eine Aktivierung des

schwächsten Reportergens GAL1-HIS3 beobachtet, aber eine Aktivierung von GAL2-ADE2 blieb aus. Alle weiteren Konstrukte verhielten sich wie e6bp1 (vgl. Tabelle 4). Weder durch gezielte Mutagenese noch durch Zufallsmutagenese konnten Peptide generiert werden, die sich von e6bp1 ableiten und eine stärkere Bindung an HPV16 E6 aufweisen. Unklar ist somit, ob eine Optimierung der Bindekapazität von e6bp1 unter Beibehaltung seiner Grundstruktur möglich ist (vgl. 4.3.1).

3.6.2 ARG7-Fusionskonstrukte: Protein Transduktion

Parallel zur Optimierung von e6bp1 sollte für Studien in der Zellkultur ein System etabliert werden, welches die Einbringung hoher und definierter Mengen an Peptiden in Zellen ermöglicht. Dazu wurden Fusionskonstrukte mit einem zellpenetrierenden Peptid erzeugt. Verwendet wurde ARG7, das aus einer Folge von sieben Argininresten besteht (vgl. 1.5). Die Klonierung erfolgte in der Weise, dass ARG7 sowohl N-terminal als auch C-terminal von jeweils einem Glycinrest flankiert wurde. Zur Detektion in der Zelle folgte C-terminal die Sequenz für eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein). e6bp1 wurde C-terminal von eGFP fusioniert (Abb. 28). Durch die Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pET16b erhielten die Gesamtkonstrukte einen N-terminalen 6-fach His-tag, was eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie an Nickel-NTA ermöglicht.

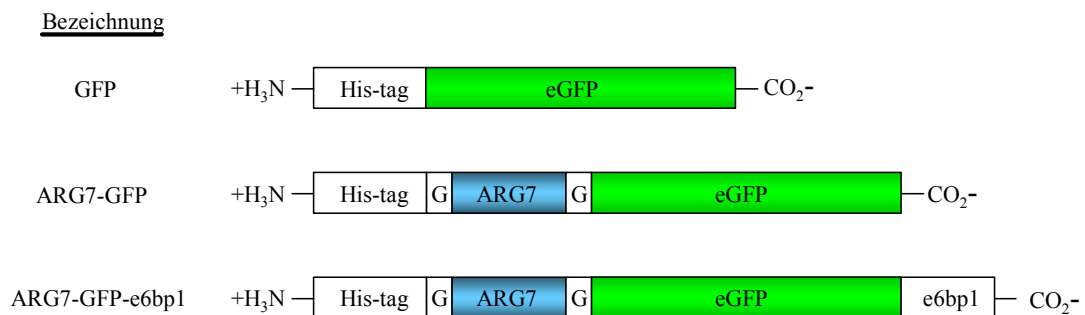


Abb. 28: Schematische Darstellung der erzeugten ARG7-Fusionsproteine. eGFP, enhanced Green Fluorescent Protein. G, Glycin.

Als Negativkontrolle fungierte ein Konstrukt, bei dem eGFP allein in pET16b subkloniert wurde. Alle Fusionskonstrukte wurden in dem *E. coli*-Stamm BL21 transformiert und die Expression der verschiedenen Fusionsproteine in Flüssigkultur bei 30°C durchgeführt.

Nach Lyse in einer 8 M Harnstofflösung wurden die Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt, mit einer 500 mM Imidazol Lösung eluiert und unter Verwendung einer Entsalzungssäule in PBS umgepuffert. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden in ihren Mengen einander angeglichen und sowohl Reinheit als auch Mengengleichung mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Blaufärbung überprüft.

In einem ersten Test wurde überprüft, ob ARG7 eine Aufnahme der Fusionsproteine in die Zelle ermöglicht. Dazu wurden HeLa Zellen mit DMEM ohne Serumzusatz überschichtet und mit vergleichbaren Mengen an GFP, ARG7-GFP und ARG7-GFP-e6bp1 versetzt (Abb. 29A). Nach 4 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert (vgl. 2.2.9.9).

Während GFP allein keine Aufnahme durch HeLa Zellen aufwies, schienen nahezu 100 % der Zellen die Konstrukte ARG7-GFP und ARG7-GFP-e6bp1 in vergleichbaren Mengen aufgenommen zu haben (Abb. 29B). Da keine konfokale Mikroskopie verwendet wurde, konnte über die intrazelluläre Lokalisation der Proteine keine Aussage getroffen werden. Eine dominante nukleäre Lokalisation, wie sie im Falle von mit ARG7 fusionierten Biotin beschrieben wurde (Rothbard *et al.*, 2000), konnte allerdings ausgeschlossen werden, da die beobachtete GFP-Fluoreszenz eher das Bild des Phasenkontrastes als das der Kernfärbung (DAPI) widerspiegelte. Anzumerken ist, dass bei der Präparation der Proteine sowohl in 8 M Harnstoff als auch in PBS (nach Umpufferung) grün fluoreszierende Lösungen vorlagen. Eine Interpretation dieses 'Phänomens' war weder im Rahmen dieser Arbeit noch anhand beschriebener Daten möglich. Die Beobachtung fluoreszierender Zellen kann somit nicht einer intrazellulären Renaturierung der Konstrukte zugeordnet werden.

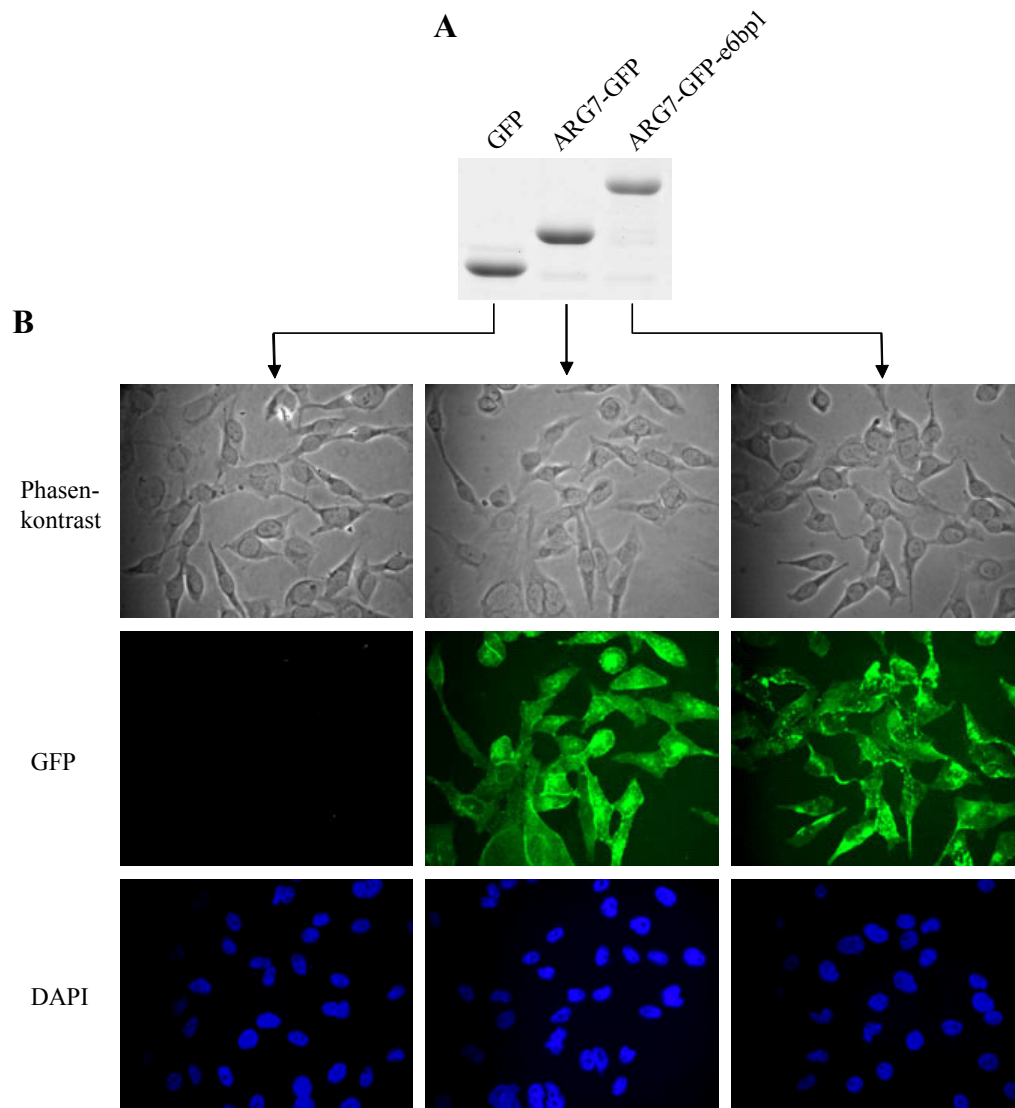


Abb. 29: ARG7-vermittelte Transduktion in HeLa Zellen. (A) Die angegebenen Proteine wurden im *E. coli*-Stamm BL21 bei 30 °C exprimiert, in 8 M Harnstofflösung denaturierend aufgeschlossen, mittels FPLC aufgereinigt und in PBS umgepuffert (vgl. 2.2.5.4.3). Die erhaltenen Proteinlösungen wurden semiquantitativ über ihre Gesamtproteinmenge angeglichen, auf einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie Blaufärbung sichtbar gemacht. (B) HeLa Zellen wurden auf 24-Lochplatten mit 250 µl DMEM und den unter (A) gezeigten Mengen des jeweiligen Proteins versetzt. Ein Gesamtvolumen von 350 µl wurde durch Zusatz von PBS gewährleistet. Nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C wurden die Zellen mit PBS gewaschen, fixiert, mit DAPI-Reagenz behandelt und für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert (vgl. 2.2.9.9).

Sechs weitere Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Aufnahmefähigkeit von GFP und ARG7-GFP untersucht und zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie alle ein vergleichbares Verhalten, wie es im Falle von HeLa Zellen beobachtet wurde (Abb. 30).

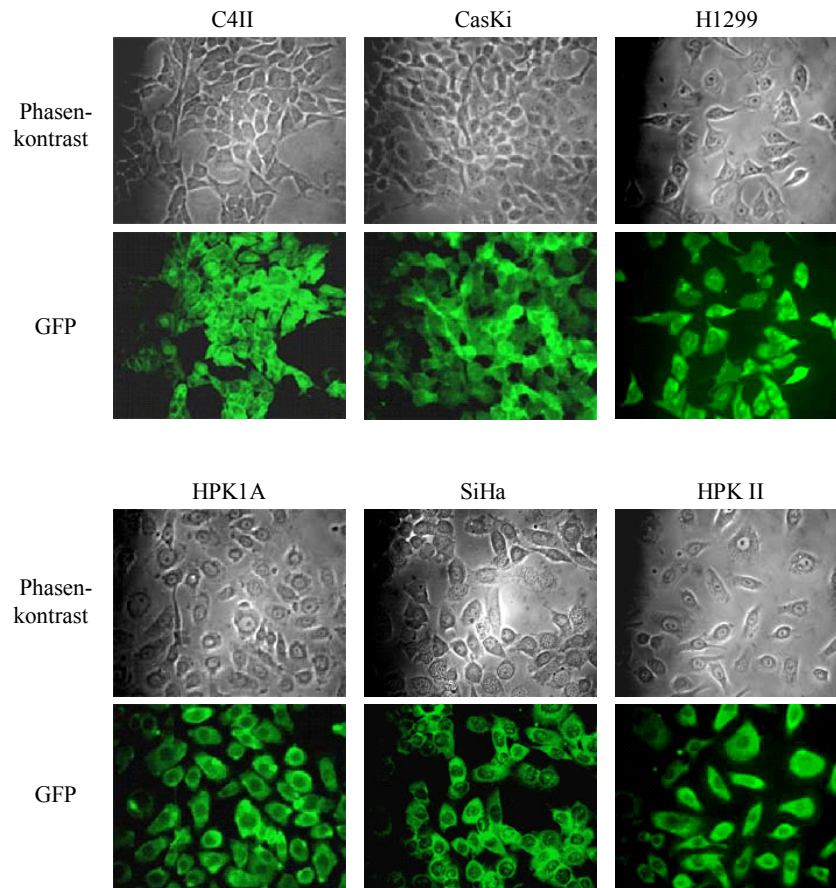


Abb. 30: Die ARG7-vermittelte Transduktion erfolgt mit hoher Effizienz in einer Vielzahl von Zelllinien. Die angegebenen Zelllinien wurden mit vergleichbaren Mengen an GFP und ARG7-GFP (vgl. Abb. 29) versetzt und nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert.

Somit schien eine ARG7-vermittelte Proteintransduktion in eine große Anzahl verschiedener Zelllinien möglich zu sein. Um weitere Hinweise für eine Aufnahme von ARG7-GFP durch verschiedene Zellen zu erhalten, wurden in weiteren Experimenten Zellysate gewonnen und ARG7-GFP mittels Western Blot/ECL nachgewiesen.

Bei Zusatz von GFP konnte nur für die Zelllinie HPK II eine schwache Bande nachgewiesen werden, die aufgrund ihres Laufverhaltens eGFP mit einem 6-fach His-tag repräsentieren könnte (Abb. 31). Nach Inkubation mit ARG7-GFP konnten sowohl für HPK II als auch H1299 Zellen, Signale beobachtet werden, die weder in unbehandelten Zellen (parental) noch bei Zusatz von GFP detektierbar waren.

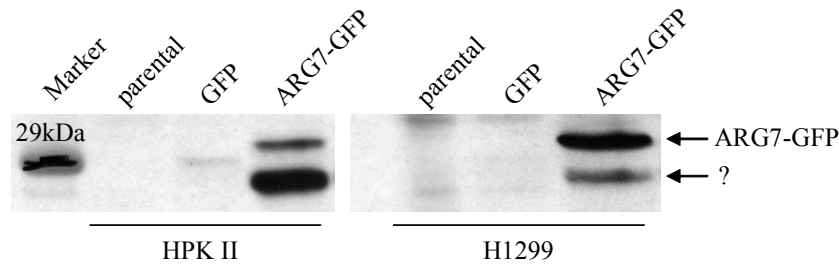


Abb. 31: Aufnahme von ARG7-GFP durch HPK II und H1299 Zellen. HPK II und H1299 Zellen wurden auf 3.5 cm Kulturschalen ausgesät, ohne (parental) oder mit vergleichbaren Mengen an GFP und ARG7-GFP versetzt. Nach 4 h bei 37°C wurden Zellextrakte gewonnen und diese in ihren Mengen angeglichen. Nach einer Auftrennung in einer 12,5 % SDS-PAGE wurden möglicherweise aufgenommene GFP oder ARG7-GFP 'Konstrukte' unter Verwendung eines monoklonalen eGFP-Antikörpers (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Noegel, Institut für Biochemie I, Universität zu Köln) mittels Western Blot/ECL nachgewiesen. ?, nicht näher untersuchte Bande.

In beiden Fällen (HPK II und H1299) konnten zwei Banden nachgewiesen werden, wobei jeweils die Bande, deren Laufverhalten ein höheres Molekulargewicht widerspiegelt, ARG7-GFP darstellen sollte (Abb. 31). Die Bande geringeren Molekulargewichts wurde nicht weitergehend untersucht, könnte aber ein intrazelluläres Spaltprodukt darstellen. Die Daten weisen auf eine Aufnahme und mögliche intrazelluläre Prozessierung von ARG7-GFP hin, wobei das Ausmaß der Prozessierung Zelltyp-abhängig verlaufen könnte.

Da die bisherigen Daten eine Aufnahme von ARG7-GFP durch unterschiedliche Zelllinien anzeigen, sollte als weiteres Charakteristikum der Proteintransduktion die Konzentrationsabhängigkeit der Aufnahme untersucht werden (vgl. 1.5). Dazu wurden HeLa Zellen mit verschiedenen Mengen an ARG7-GFP inkubiert und nach 4 Stunden für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert. Bei Zusatz von 25 % der in Abbildung 29A gezeigten Menge ist eine geringe Aufnahme von ARG7-GFP zu beobachten (Abb. 32, 0,25 x). Bei Zusatz von 100 % an ARG7-GFP ist eine deutlich stärkere Fluoreszenz messbar (Abb.32, 1 x). Wurden HeLa Zellen mit der 4-fachen Menge an ARG7-GFP behandelt, so war eine sehr starke Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 32, 4 x). Somit ist die messbare Fluoreszenz abhängig von der Konzentration an ARG7-GFP, da bei Zusatz steigender Mengen an ARG7-GFP das Gesamtvolumen konstant gehalten wurde.

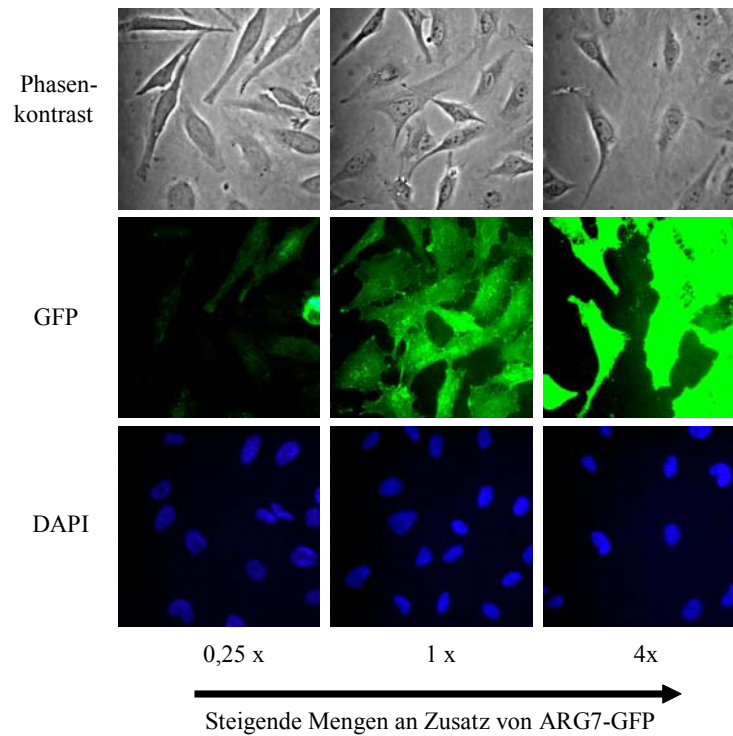


Abb. 32: Konzentrationsabhängige Aufnahme von ARG7-GFP durch HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden bei gleichbleibendem Gesamtvolumen mit unterschiedlichen Mengen an ARG7-GFP versetzt und nach 4 h bei 37 °C für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert.

Eine Transduktion von ARG7-GFP-Fusionskonstrukten in Zellen war prinzipiell möglich und schien zudem konzentrationsabhängig zu erfolgen.

Alle bisherigen Beobachtungen wurden in Abwesenheit von Serum (FCS) gemacht. Da aber die Anwesenheit von Serum essentiell für das Wachstum von Zellen *in vitro* ist, sollte eine Transduktion in Anwesenheit von Serum 'Zellstress' und folglich, vor allem bei funktionellen Studien, die Wahrscheinlichkeit unspezifisch auftretender Phänomene minimieren. Das Potential von ARG7-GFP zur Transduktion in HeLa Zellen wurde deshalb in Ab- und Anwesenheit von 10 % FCS nach 4 Stunden Inkubation kontrolliert. Wie aus Abbildung 33 ersichtlich, erfolgte auch in Anwesenheit von 10 % FCS eine Aufnahme von ARG7-GFP durch HeLa Zellen. GFP zeigte in An- und Abwesenheit von Serum keine Transduktion (Daten nicht gezeigt).

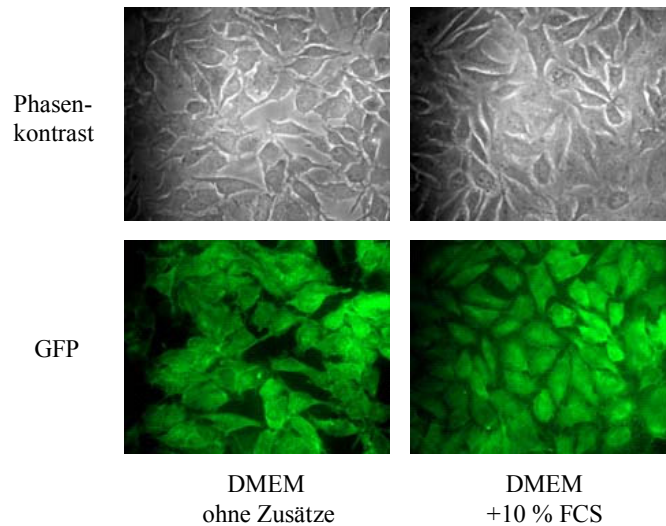


Abb. 33: ARG7-vermittelte Transduktion in Anwesenheit von Serum. HeLa Zellen wurden mit 250 μ l DMEM ohne Zusätze oder mit 10 % FCS-Anteil überschichtet und mit ARG7-GFP versetzt (siehe auch Abb. 27A). Nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert (vgl. 2.2.5.4.3).

Bevor für das Konstrukt ARG7-GFP-e6bp1 untersucht wurde, ob es nach Transduktion mit dem Waschsumsverhalten von HPV-positiven Zelllinien interferieren kann, wurde zuerst getestet, ob ARG7-GFP-e6bp1 die HPV16 E6 vermittelte Polyubiquitinierung von p53 *in vitro* hemmen kann. Zunächst wurde die Effizienz der p53-Polyubiquitinierung *in vitro* durch Titration von GST-16 E6 so eingestellt, dass die Ubiquitinierung zwar deutlich, aber suboptimal ausfiel (Abb. 34A). Anschließend wurden die p53-Ubiquitinierungsassays unter diesen Bedingungen in Anwesenheit von ARG7-GFP bzw. ARG7-GFP-e6bp1 wiederholt. Bei Zugabe von ARG7-GFP-e6bp1 konnte dabei eine Verringerung des Ubiquitinierungsgrads von p53 im Vergleich zur Zugabe von ARG7-GFP beobachtet werden (Abb. 34B).

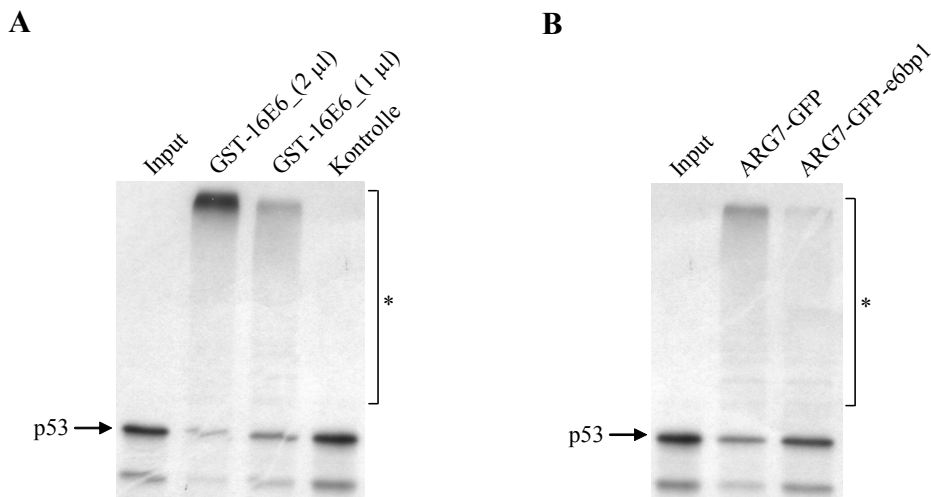


Abb. 34: ARG7-GFP-e6bp1 ist funktionell *in vitro*. (A) Unter Standardbedingungen wurden Ubiquitinierungsassays mit *in vitro* translatiertem (RRL), [³⁵S] markiertem p53 in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Gegenwart von 1 bzw. 2 µl GST-16E6, wie angegeben, inkubiert. Nach 2 h bei 30 °C wurden die Ansätze aufgekocht, die radioaktiv markierten Proteine in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht. Input, eingesetzte Menge an *in vitro* Translatat. *, ubiquitinierte Proteine (B) Ubiquitinierungsassays wurden unter Standardbedingungen, wie unter (A) beschrieben, in Gegenwart von 1 µl GST-16E6 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Ansätze mit vergleichbaren Mengen an ARG7-GFP oder ARG7-GFP-e6bp1 (vgl. Abb. 29A), wie angegeben, versetzt. Die Aufbereitung erfolgte wie unter (A) beschrieben. Input, eingesetzte Menge an *in vitro* Translatat. *, ubiquitinierte Proteine.

Da somit für das Konstrukt ARG7-GFP-e6bp1 sowohl Funktionalität als auch Transduktion in Zellen gewährleistet schien, wurde nun untersucht, ob die Zugabe von ARG7-GFP-e6bp1 mit dem Wachstum von HeLa Zellen interferieren kann. Dazu wurde das Wachstum von HeLa Zellen in Abhängigkeit von der Transduktion des Fusionsproteins ARG7-GFP-e6bp1 über einen Zeitraum von fünf Tagen verfolgt, wobei alle 24 Stunden ein Mediumwechsel und eine erneute Zugabe der Proteine erfolgte. Die Proteinlösungen für ARG7-GFP und ARG7-GFP-e6bp1 wurden dafür mit PBS auf eine identische Konzentration eingestellt, so dass eine Zugabe von 100 µl (Abb. 35A) den Zusatz gleicher Proteinmengen widerspiegelte. Nach 5 Tagen konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten festgestellt werden (Abb. 35A). Dieselben Beobachtungen gelten auch für SiHa Zellen (Daten nicht gezeigt).

Als Kontrolle für eine effektive Hemmung des Wachstums von HeLa Zellen diente ein 'knock down' von HPV18 E6 mittels RNA Interference. So wuchsen innerhalb von 5 Tagen nach der Transfektion von 50 pmol gegen Luciferase gerichteter siRNA HeLa Zellen zur Konfluenz, während bei Transfektion von gegen 18E6 gerichteter siRNA nach 5 Tagen keine adhärenen Zellen mehr vorlagen (Abb. 35B).

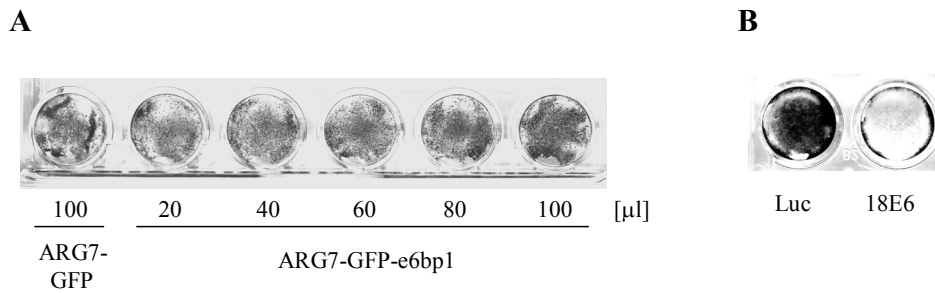


Abb. 35: ARG7-GFP-e6bp1 verringert nicht die Zellzahl an HeLa Zellen (A) HeLa Zellen wurden mit 300 μ l DMEM (+10 % FCS) und 20 bis 100 μ l der angegebenen Fusionskonstrukte überschichtet, wobei durch Zugabe von PBS in allen Fällen ein Gesamtvolumen von 400 μ l gewährleistet wurde. Im Rhythmus von 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen wie beschrieben überschichtet. Nach 5 Tagen erfolgte eine Fixierung und Färbung der verbleibenden Zellen durch crystal violet-Lösung (vgl. 2.2.9.9 und 2.2.9.11). **(B)** HeLa Zellen wurden bei 30-50 % Konfluenz mit 50 pmol gegen Luciferase (Luc) oder 18E6 gerichteter siRNA nach Angaben des Herstellers transfiziert (vgl. 2.2.9.6). Nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und nach insgesamt 5 Tagen eine Fixierung und Färbung mittels crystal violet-Lösung.

Während durch einen 'knock down' von 18E6 also ein Zelltod von HPV18 positiven HeLa Zellen bewirkt werden kann, scheint das Konstrukt ARG7-GFP-e6bp1 nicht mit dem Wachstum von HeLa Zellen zu interferieren. Da ARG7-GFP-e6bp1 tatsächlich intrazellulär in HeLa Zellen vorliegen sollte (vgl. Abb. 29), kann vermutet werden, dass entweder e6bp1 die Bildung des E6/E6AP Komplexes 'in vivo' nicht effizient genug hemmt oder aber eine spezifische Inhibierung der Bindung von E6 an E6AP nicht ausreicht, um das Wachstum von HPV positiven Zellen negativ zu beeinflussen.

4 Diskussion

Humane 'high risk' Papillomviren sind etiologisch mit der Entstehung von Zervixkarzinomen assoziiert. Das HPV kodierte Protein E6 besitzt anti-apoptotische Eigenschaften, die unter anderem seine essentielle Rolle in der Transformation von Zellen erklären (vgl. 1.1.2). E6 kann potentiell mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen interagieren, wobei die Relevanz der jeweiligen Wechselwirkung *in vivo* bisher weitestgehend unbekannt ist. Deshalb sollten in dieser Arbeit E6 Mutanten generiert und biochemisch charakterisiert werden, die sich in ihren Interaktionen mit p53, E6AP, hDlg und Scribble unterscheiden. Die Korrelation ihrer biochemischen Eigenschaften mit der Fähigkeit die natürlichen Wirtszellen von HPVs zu immortalisieren, sollte Hinweise liefern, welche physiologische Bedeutung den einzelnen Wechselwirkungen zukommt.

Aufgrund seiner anti-apoptotischen Eigenschaften stellt E6 eine viel versprechende Zielstruktur für molekulare Ansätze HPV spezifischer Therapien dar (vgl. 1.4). Eine Vielzahl der E6-Wechselwirkungen beinhaltet einen Abbau des jeweiligen Substratproteins unter Rekrutierung der zellulären Ligase E6AP. Daher sollten in dieser Arbeit Peptide generiert werden, die die Bildung des E6/E6AP Komplexes effizient inhibieren. Peptide dieser Art könnten möglicherweise spezifisch mit dem Wachstum HPV positiver Zellen interferieren. Zusätzlich sollte ein System etabliert werden, das eine konzentrationsabhängige Einbringung von Peptiden in Zellen ermöglicht.

4.1 Biochemische Funktionen der E6 Mutanten. E6AP als einzige zelluläre Ligase, die von E6 rekrutiert werden kann ?

4.1.1 Die Wechselwirkung von p53, E6AP, rDlg und hScrib mit den E6 Mutanten *in vitro*

In allen Untersuchungen *in vitro* dienten die Interaktionen der E6 Mutanten mit p53, Scribble und E6AP als Positivkontrolle und es wurden keine Beobachtungen gemacht, die nicht im Einklang mit beschriebenen Daten wären (so kann z.B. die Mutante SAT *in vitro* E6AP kopräzipitieren und eine Ubiquitinierung von Scribble, aber nicht von p53 induzieren; Crook *et al.*, 1991; Nakagawa und Huibregtse, 2000). Da für die

Wechselwirkung von E6 mit p53 und E6AP zahlreiche *in vitro* Mutationsanalysen beschrieben sind, wurde auf eine Darstellung der in dieser Hinsicht in dieser Arbeit erhaltenen Daten verzichtet. Auch das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Mutanten gegenüber p53 und Scribble wurde schon für vergleichbare Mutanten im Zuge der Identifizierung von Scribble als Substrat von E6 beschrieben (Nakagawa und Huibregtse, 2000). Somit konnten alle in Tabelle 2 (vgl. 3.1) aufgeführten biochemischen Funktionen der E6 Mutanten für ihre Wechselwirkung mit p53, Scribble und E6AP bestätigt werden.

Ein Großteil der Beobachtungen für die Wechselwirkung der E6 Mutanten mit rDlg steht hingegen nicht im Einklang mit Postulaten, die aufgrund beschriebener Daten für die Wechselwirkung von HPV E6 mit hDlg aufgestellt wurden. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gewonnenen Daten für rDlg, wurde für hDlg eine E6AP-unabhängige Degradation *in vitro* und in der Zelle beschrieben (Pim *et al.*, 2000). Für rDlg wurden identische Ergebnisse erwartet, da eine Identität zu hDlg von 90 % auf Aminosäureebene besteht (vgl. 3.1). Dem für hDlg publizierten Protokoll für einen *in vitro* Abbau folgend (Pim *et al.*, 1994) konnte aber keine entsprechende Beobachtung (Abbau *in vitro*) für rDlg in Gegenwart von 18E6 gemacht werden (vgl. 3.2.1). Hingegen konnte im Rahmen eines Ubiquitinierungsassays, nach einem in unserem Labor etablierten Standardprotokoll, eine E6AP-abhängige Ubiquitinierung von rDlg durch 'high risk' E6 Proteine nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9). Diese Ubiquitinierung wurde auch bei Verwendung von rDlg, welches in RRL *in vitro* translatiert wurde, nur bei Zugabe von rekombinantem E6AP beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein im RRL vorliegendes Kaninchen-Homolog von E6AP scheint somit, zumindest in den vorliegenden Mengen nicht auszureichen, um eine Ubiquitinierung von rDlg induzieren zu können.

Zwar wurde ein Abbau von hDlg *in vitro* beschrieben (s.o.), jedoch sind keine Daten, die einen Einfluss von Ubiquitin oder dem Proteasom auf den *in vitro* Abbau betreffen, publiziert. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine (E6-vermittelte) Ubiquitinierung eines Dlg-Proteins *in vitro* demonstriert werden. Eine E6/E6AP-abhängige Ubiquitinierung von Dlg (s.o.) wurde mittlerweile auch von einer weiteren Arbeitsgruppe beobachtet (J.M. Huibregtse, persönliche Mitteilung). Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Gruppe eventuell mit humanem Dlg arbeitet und welche Isoform (vgl. Abb. 5) untersucht wurde. Es sollte aber auch angemerkt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete rDlg-Konstrukt (als 'hDlg', vgl. 3.1) von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurde, durch die der Großteil der Daten für den E6-vermittelten Abbau von hDlg

beschrieben wurde. Ob diese Arbeitsgruppe folglich auch die Wechselwirkung von HPV E6 mit rDlg untersucht hat und welche Beobachtungen gemacht wurden, ist allerdings nicht bekannt. Ob die geringen Sequenzunterschiede von rDlg zu hDlg für die unterschiedlichen Beobachtungen *in vitro* verantwortlich sind, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

Zumindest für rDlg entspricht die Wechselwirkung mit E6 *in vitro* der für Scribble beschriebenen Interaktion mit E6 (Nakagawa und Huibregtse, 2000). So erfolgt eine E6AP-unabhängige Bindung von 'high risk' E6 Proteinen an rDlg (vgl. 3.2.1) bzw. Scribble (vgl. 3.2.2), aber eine E6AP-abhängige Ubiquitinierung der beiden PDZ-Proteine (vgl. Abb. 9 und 10). In Zellkulturstudien wurden zudem Hinweise gefunden, dass rDlg auch '*in vivo*' E6AP-abhängig abgebaut wird (vgl. 3.2.6, 3.3 und 4.1.2.2). Interessanterweise konnten im Rahmen der '*in vivo*' Untersuchungen Beobachtungen gemacht werden, die auf eine E6AP-abhängige Degradation auch von hDlg hinweisen (vgl. 3.4 und 4.1.3.2).

4.1.2 Transiente Transfektionsexperimente

4.1.2.1 Scribble

Für Scribble konnte eine E6AP-abhängige Degradation durch 'high risk' E6 Proteine in H1299 Zellen gezeigt werden (vgl. Abb. 13). Diese war allerdings nur bei einer Überexpression von E6AP zu beobachten. Eine Erklärung für die Notwendigkeit der Überexpression von E6AP in H1299 Zellen könnte eine zu geringe Expressionsrate an endogenem E6AP in H1299 Zellen sein. Allerdings sind die Mengen an endogenem E6AP prinzipiell ausreichend für eine funktionelle Wechselwirkung mit E6, da ein Abbau von p53 ohne Überexpression von E6AP beobachtet wurde (vgl. Abb. 14 und 17). Weiterhin zeigt der beobachtete Abbau von rDlg an, dass überexprimiertes E6 mit PDZ-Proteinen interagieren kann (vgl. Abb. 11). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Scribble in H1299 Zellen ubiquitiniert wird (Abb. 12). So könnte die E6-vermittelte Interaktion von E6AP mit Scribble '*in vivo*' schwach und deshalb ein Überschuss an E6AP notwendig sein, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein ternärer Komplex gebildet wird.

Im Rahmen der Identifizierung von Scribble als E6AP-abhängiges Abbausubstrat von E6 (Nakagawa und Huibregtse, 2000) wurden nicht H1299 Zellen verwendet, und es war

keine Überexpression von E6AP notwendig, um einen proteasomalen Abbau von Scribble zu beobachten. Daher ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich bei der Notwendigkeit der Überexpression von E6AP um ein für H1299 Zellen spezifisches Phänomen handelt.

In den hier durchgeführten *'in vivo'* Ubiquitinierungsassays kann nicht zwischen Mono- und Polyubiquitinierung unterschieden werden, da in beiden Fällen durch den 6-fach His-tag des koexprimierten Ubiquitins (vgl. 3.2.4) eine Kopräzipitation mit Nickel-NTA erfolgt. Folglich ist nicht auszuschließen, dass der Anheftung von Ubiquitin an Scribble, vor allem in Abwesenheit von HPV E6, eine andere Funktion als Polyubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom zukommt. Vorstellbar wäre eine *'Mehrfach-Monoubiquitinierung'* von Scribble, die als Signal für eine lysosomale Degradation dienen könnte, wie sie für einige andere membran-assoziierte Proteine bereits beschrieben wurde (Haglund *et al.*, 2003; Ciechanover und Iwai, 2004). Hinweise für eine lysosomale Degradation von Scribble können durch Experimente gewonnen werden, bei denen die Proteinmengen an Scribble in An- und Abwesenheit von Inhibitoren des lysosomalen Abbauwegs verglichen werden.

4.1.2.2 rDlg

In transienten Transfektionsexperimenten waren E6 Mutanten, die nicht stabil mit E6AP wechselwirken können, in der Lage rDlg abzubauen (vgl. Abb. 17). Aus dieser Beobachtung könnte man schließen, dass in Zellen eine E6AP-unabhängige Degradation von rDlg durch HPV E6 erfolgt, was somit im Widerspruch zu den *in vitro* Ergebnissen steht, die eine E6AP-abhängige Ubiquitinierung von rDlg anzeigten (vgl. Abb. 9). Tatsächlich wurden vergleichbare Beobachtungen *'in vivo'* bereits für hDlg beschrieben und daraus geschlossen, dass eine andere Ligase als E6AP die Degradation von hDlg durch E6 vermittelt (Pim *et al.*, 2000), wobei diese *'andere Ligase'* bisher nicht identifiziert werden konnte. Die für die Untersuchungen an hDlg verwendeten E6 Mutanten entsprechen zudem prinzipiell den in dieser Arbeit generierten Mutanten. Allerdings wurden bisher keine Daten beschrieben, die eine mögliche Wechselwirkung solcher E6 Mutanten mit E6AP *'in vivo'* betreffen. In der vorliegenden Arbeit konnten unter Verwendung von E6AP *-/-* MEFs eindeutige Hinweise auf eine funktionelle Wechselwirkung von E6AP mit den entsprechenden E6 Mutanten in Zellen gefunden werden. Der prinzipielle Mechanismus der Wechselwirkung mit E6AP scheint zudem für

die E6 Mutanten und Wildtyp 'high risk' E6 Proteine identisch zu sein, d.h. dass dieselbe Region von E6AP für eine Interaktion benötigt wird und der Cysteinrest an Position 820 von E6AP für die katalytische Aktivität essentiell ist. Somit weisen die gewonnenen Daten darauf hin, dass: I) der E6-vermittelte Abbau von rDlg E6AP-abhängig ist und II) die Wechselwirkungen von E6 mit E6AP 'in vivo', zumindest mit den verwendeten Methoden, nicht vollständig *in vitro* reproduzierbar sind. So scheinen physiologisch funktionelle Wechselwirkungen von E6 mit E6AP zu existieren, für die keine starke Bindung von E6 an E6AP *in vitro* beobachtet werden kann (vgl. auch 4.1.2.3). Ein Grund für die beobachtete Diskrepanz könnten notwendige Kofaktoren sein, die unter den gewählten Bedingungen *in vitro* nicht vorhanden oder inaktiv sind. Des Weiteren sollte die Faltung der Proteine, die *in vitro* und in Zellen unterschiedlich sein kann, einen Einfluss auf die Art der Wechselwirkung haben.

Dass für die Wechselwirkung von E6AP mit E6 'in vivo' teilweise andere Beobachtungen gemacht werden als *in vitro*, wurde im Verlaufe dieser Arbeit auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (Cooper *et al.*, 2003). Dabei wurden Mutanten von sowohl E6 als auch E6AP generiert, die jeweils einen Abbau von p53 in E6AP -/- MEFs, aber nicht *in vitro* induzieren konnten. Die Beobachtungen führten unter anderem zu der Spekulation, dass eine zweite Region von E6AP existiert, die eine Bindung an E6 vermittelt (Cooper *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings Hinweise gefunden, dass bei Interaktionen von E6 Mutanten mit E6AP, die 'in vivo', aber nicht *in vitro* beobachtet werden, dieselbe Region von E6AP für die Bindung an E6 essentiell ist. So konnte die Deletionsmutante Δ bs-E6AP in den durchgeführten Transfektionsexperimenten in E6AP -/- MEFs keinen Abbau von rDlg durch 11C18 bzw. 45/47/49C18 vermitteln (vgl. Abb. 20B). Allerdings könnten in der Deletionsmutante andere Bereiche von E6AP in ihrer Konformation und Funktionalität betroffen und somit auch die putative zweite Binderegion 'inaktiv' sein (Cooper *et al.*, 2003). Die Beobachtung, dass die Mutante Δ bs-E6AP wie wt-E6AP die Fähigkeit zur Autoubiquitinierung besitzt und dazu Bereiche notwendig sind, die N- und C-terminal von der E6-Binderegion gelegen sind (Nuber *et al.*, 1998), kann aber als Hinweis verstanden werden, dass die Gesamtstruktur von Δ bs-E6AP weitestgehend der von wt-E6AP entspricht.

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass rDlg bei transienter Überexpression 'in vivo' ubiquitiniert wird (vgl. Abb. 12). Ob die beobachtete Ubiquitinierung in Abwesenheit von E6 durch die für hDlg beschriebene Ligase β -TrCP

(Mantovani und Banks, 2003) oder eine andere Ligase erfolgt, wurde nicht untersucht. Zumindest ist das putative Konsensusbindemotiv für das F-Box-Protein β -TrCP in hDlg und rDlg identisch. Bei Koexpression von 'high risk' E6 Proteinen wurde eine Abnahme der Signalintensität beobachtet, die nicht unmittelbar durch einen Ubiquitin-abhängigen Abbau durch das 26S Proteasom zu erklären ist. Dazu müssen die entsprechenden Experimente für rDlg in An- und Abwesenheit von Proteasominhibitoren wiederholt werden, um möglicherweise einen proteasomalen Abbau nachweisen zu können.

4.1.2.3 Der Abbau von rDlg, aber nicht p53, durch E6 Mutanten, die mit E6AP *in vitro* nicht stabil interagieren

Die Induktion eines Abbaus durch E6 Mutanten, die nicht stabil mit E6AP *in vitro* interagieren können, konnte in der vorliegenden Arbeit nur für rDlg beobachtet werden. Im Gegensatz zu rDlg konnte ein Abbau von p53 nur durch E6 Mutanten induziert werden, die E6AP *in vitro* kopräzipitieren konnten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass in einem ersten Schritt eine stabile Bindung von E6 an E6AP notwendig ist, um dann in einem nächsten Schritt als E6/E6AP Komplex an p53 binden zu können (Abb. 36A; vgl. 1.3.2.2.2). Eine Bindung von E6 an rDlg erfolgt hingegen E6AP-unabhängig (Abb. 36B; vgl. 3.2.1 und 4.1.1), so dass E6AP nicht als 'Adapter' benötigt wird, sondern die katalytische Aktivität von E6AP ausreicht, um einen Abbau von rDlg durch bereits stabil gebundenes E6 zu vermitteln. Für diese 'rein' enzymatische Aktivität könnten möglicherweise schwächere Wechselwirkungen, d.h. *in vitro* nicht stabile Bindungen, von E6 mit E6AP ausreichend sein (Abb. 36B). Dieses Modell kann allerdings nicht die beschriebenen Beobachtungen für den Abbau von p53 durch E6 bzw. E6AP Mutanten, die *in vitro* nicht stabil interagieren, erklären (Cooper *et al.*, 2003).

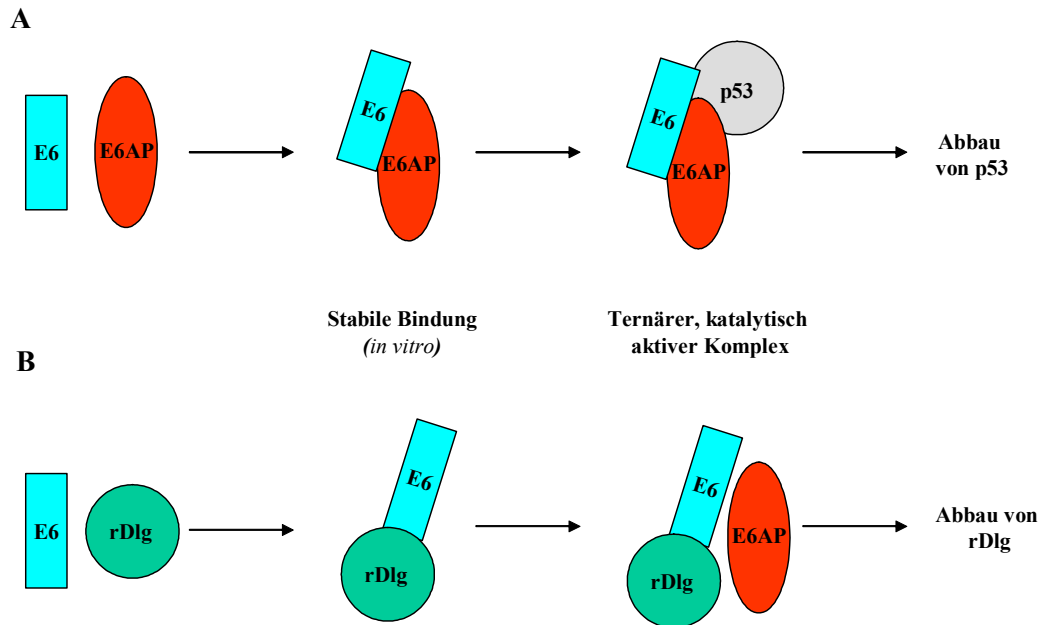


Abb. 36: Modell für die Interaktion von E6 und E6AP mit (A) p53 bzw. (B) rDlg. (A) In einem ersten Schritt bindet E6 stabil an E6AP; der dimere Komplex bindet dann an p53, so dass Ubiquitinierung und Abbau von p53 induziert werden. (B) E6 bindet über sein PDZ-Bindemotiv stabil an rDlg, so dass in einem nächsten Schritt eine nicht-stabile Interaktion mit E6AP ausreicht, um einen Abbau von rDlg zu vermitteln.

4.1.2.4 Die Wechselwirkung von 'low risk' E6 mit E6AP

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zur Wechselwirkung von E6 mit E6AP in E6AP^{-/-} MEFs weisen darauf hin, dass HPV11 E6 das Potential hat, funktionell mit E6AP zu interagieren. Eine physiologische Relevanz der Interaktion von 11E6 mit E6AP ist aber ungewiss, da bei den Untersuchungen in dieser Arbeit die starke Bindung von 11E6 an ein Substrat artifizieller Natur war (Bindung an rDlg durch einen 'high risk' E6 C-Terminus). Allerdings sind einige Daten beschrieben, die eine Verbindung von HPV11 E6 und dem Ubiquitin-Proteasom-System anzeigen. So kann HPV11 E6 an das pro-apoptische Protein Bak binden und dessen Abbau induzieren (Thomas und Banks, 1999). Da die Abbauvermittelnde Ligase nicht bekannt ist, könnten vergleichbare Experimente in E6AP^{-/-} MEFs Hinweise liefern, ob der 11E6-vermittelte Abbau von Bak eine Wechselwirkung von 11E6 mit E6AP beinhaltet. Weiterhin wurde HPV11 E6 selbst als Substrat für einen proteasomalen Abbau beschrieben (Stewart *et al.*, 2004). Da 11E6 *in vitro* nicht stabil an E6AP binden kann, wäre der Schluss nahe liegend, dass HPV11 E6 E6AP-unabhängig ubiquitiniert und abgebaut wird. Interessant wären daher nun

Untersuchungen zur Proteinstabilität von HPV11 E6 in E6AP ^{-/-} MEFs in An- und Abwesenheit von E6AP.

Sollte eine physiologisch relevante Interaktion von 11E6 mit E6AP nachgewiesen werden können, könnte die Wechselwirkung mit E6AP eine bisher nicht bekannte konservierte Eigenschaft von E6 Proteinen verschiedener Papillomviren darstellen, da zudem auch für das vom Rinderpapillomvirus Typ1 kodierte E6 Protein Wechselwirkungen mit E6AP beschrieben sind (Bohl *et al.*, 2000; Be *et al.*, 2001). Um dies zu untersuchen, könnte die Generierung von E6-Chimären der Form XC18, wobei 'X' E6 Proteine verschiedener Papillomviren (sowohl kutane und muköse HPVs (vgl. 1.1.1) als auch nicht-humane Papillomviren) repräsentiert, hilfreich sein. In E6AP ^{-/-} MEFs könnte der E6AP-abhängige Abbau von rDIg als System dienen, um prinzipielle Interaktionsmöglichkeiten mit E6AP für die E6 Chimären, und somit indirekt für ihre Wildtyp Formen, zu untersuchen.

4.1.3 Untersuchungen zu endogenem Scribble und hDIg in HeLa Zellen

4.1.3.1 Scribble

Die hier vorgestellten Untersuchungen in HeLa Zellen konnten keine Hinweise für einen Abbau von Scribble durch einen E6/E6AP Komplex liefern. So konnte über einen Zeitraum von 8 Stunden eine Anreicherung von Scribble weder bei einer Inhibierung des Proteasoms noch ein Abbau von Scribble bei einer Inhibierung der Proteinsynthese beobachtet werden (vgl. Abb. 21 und 22). Auch Untersuchungen über einen längeren Zeitraum bei einem 'knock down' von E6 oder E6AP zeigten keine Anreicherung von Scribble an (vgl. Abb. 23 und 25). Diese Daten weisen darauf hin, dass zumindest zur Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps von HeLa Zellen ein E6-vermittelter Abbau von Scribble nicht notwendig ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Subpopulationen von Scribble Abbaubstrate des E6/E6AP-Komplexes sind, deren Detektion mit den verwendeten Methoden nicht möglich war. Weiterhin können auch keine Aussagen getroffen werden, ob eventuell eine Bindung von E6 an Scribble, unabhängig von einer E6AP-vermittelten Degradation, erfolgt und diese Bindung mit Funktionswegen von Scribble interferiert.

Auch könnte einer E6-vermittelten Degradation von Scribble zu einem früheren Zeitpunkt im Verlauf der HPV induzierten Karzinogenese eine Rolle zukommen. So konnten im Vergleich zu HPV-negativen in HPV-positiven Zervixkarzinom-Biopsien verringerte Mengen an Scribble beobachtet werden (Nakagawa *et al.*, 2004; vgl. 1.3.2.4). Interessant erscheint somit eine Untersuchung der Mengen an Scribble im Prozess der Immortalisierung von primären undifferenzierten Keratinozyten durch HPV E6 Proteine und Mutanten (vgl. 3.5 und 4.2).

Nicht auszuschließen ist auch eine Regulation der Mengen an Scribble durch einen lysosomalen Abbau (vgl. auch 4.1.2.1). Ein Nachteil von Cycloheximidassays, die zur Bestimmung der Halbwertszeit von Scribble durchgeführt wurden, besteht darin, dass bei der Regulation der Proteinstabilität des zu untersuchenden Substrats kurzlebige Proteine mechanistisch involviert sein können. In einem Cycloheximidassay würden solche Regulatorproteine sehr schnell abgebaut und da keine Neusynthese der negativen Regulatorproteine erfolgt (inhibiert durch Cycloheximid), würde somit kein Abbau des Substratproteins beobachtet werden. So könnte ein lysosomaler Abbau von Scribble erfolgen, in dessen Ablauf kurzlebige Proteine involviert sind. Um diese Möglichkeit zu bestätigen, müssten prinzipiell zwei Beobachtungen gemacht werden können: I) eine Anreicherung von Scribble nach Inhibierung des lysosomalen Abbauwegs und II) ein Abbau von Scribble in einem pulse-chase-assay nach radioaktiver Markierung von Scribble. In einem pulse-chase-assay werden im Gegensatz zu einem Cycloheximidassay der Zelle kurzlebige Proteine nicht 'entzogen'. Die dazu notwendige Immunpräzipitation von Scribble war allerdings mit dem Antikörper K-21 nicht möglich (vgl. 3.4.1).

4.1.3.2 hDlg

Da in dieser Arbeit ein E6AP-abhängiger Abbau von rDlg durch 'high risk' E6 Proteine beobachtet wurde, sollten Hinweise gefunden werden, ob diese Beobachtung auch für hDlg in HPV positiven Zellen Gültigkeit besitzt. Tatsächlich konnte in HeLa Zellen eine Anreicherung von hDlg nach Inhibierung des Proteasoms (vgl. Abb. 21) und nach einem 'knock down' von E6 (vgl. Abb. 23) beobachtet und somit beschriebene Daten bestätigt werden (Gardioli *et al.*, 1999; Mantovani *et al.*, 2001). Allerdings sind bisher keine Daten beschrieben, die einen Einfluss von E6AP auf die beobachtete Anreicherung betreffen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei einer Verringerung der

E6AP-Mengen um ca. 80 % in p53 'knock out' HeLa Zelllinien ein Anreicherung von hDlg zu beobachten ist (vgl. Abb. 25). Bei einer Verringerung der E6AP-Menge um nur ungefähr 40 % blieb diese Anreicherung allerdings aus (vgl. 3.4.2). Somit scheinen relativ geringe Mengen an E6AP auszureichen, um einen E6-induzierten Abbau von hDlg zu vermitteln. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass für den E6-vermittelten Abbau von rDlg auch eine schwache, d.h. *in vitro* nicht stabile, Interaktion von E6 mit E6AP ausreichend ist, um einen Abbau von rDlg zu vermitteln (vgl. 4.1.2.2). Allerdings kann die Anreicherung von hDlg bei einem 'knock down' der E6AP-Menge um 80 % nicht eindeutig bzw. nicht ausschließlich einer Wechselwirkung mit 18E6 zugeordnet werden. Notwendig sind dazu Untersuchungen in HPV-negativen Zellen bei einem vergleichbar starken 'knock down' von E6AP. Sollte dabei keine Anreicherung von hDlg zu beobachten sein, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf eine ausschließlich E6-vermittelte Interaktion von E6AP mit hDlg.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl rDlg als auch hDlg E6AP-abhängig von E6 abgebaut werden. Zwar kann mit den bisher generierten Daten ein Einfluss einer anderen Ligase auf den Abbau von Dlg, wie er postuliert wurde (Pim *et al.*, 2000), nicht ausgeschlossen werden, allerdings konnten keinerlei Hinweise auf eine Notwendigkeit einer Interaktion von E6 mit einer weiteren Ligase gefunden werden. Somit könnte der E6AP-abhängige Abbau von Dlg-Proteinen durch HPV E6 darauf hinweisen, dass E6AP die einzige zelluläre Ligase ist, mit der E6 funktionell wechselwirken kann. Sinnvoll erscheinen deshalb Untersuchungen in E6AP -/- MEFs zur Stabilität von Proteinen, für die, wie für hDlg, ein E6AP-unabhängiger Abbau durch E6 beschrieben ist (vgl. Tabelle 1). Die generierten HeLa Zelllinien mit einem stabilen 'knock down' von 80 % an E6AP auf Proteinebene bieten zudem die Möglichkeit, die in E6AP -/- MEFs erworbenen Daten für die entsprechenden endogenen Proteine in HPV-positiven Zellen zu überprüfen.

4.2 Immortalisierung von primären Keratinozyten

Die durchgeführten Immortalisierungsassays sollen zum einen die Frage klären, ob die Wechselwirkung von HPV E6 mit PDZ-Proteinen notwendig ist, um eine Immortalisierung zu bewirken. Zum zweiten sollen Mutanten, die mit E6AP und PDZ-Proteinen wechselwirken, aber keinen Abbau von p53 vermitteln können, Hinweise liefern wie

wichtig die Degradation von p53 und PDZ-Proteinen für das Transformationspotential von E6 ist.

Da in den bisher durchgeführten Immortalisierungsassays die Expression der verschiedenen E6 Konstrukte nicht kontrolliert wurde, werden alle erhaltenen Ergebnisse unter dem Vorbehalt diskutiert, dass die getesteten E6 Konstrukte in den infizierten Zellen tatsächlich in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden.

4.2.1 Wildtyp E6 Proteine

Während das verwendete 'low risk' Protein 11E6 keine Immortalisierung bewirken konnte, waren beide 'high risk' Proteine, 16E6 und 18E6 in der Lage primäre undifferenzierte Keratinozyten zu immortalisieren (vgl. Tabelle 3). Da eine Immortalisierung durch 16E6 bereits beschrieben ist (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002) und 18E6 nach bisherigen Erkenntnissen über dieselben biochemischen Fähigkeiten verfügt wie 16E6, entspricht die beobachtete Immortalisierung durch 18E6 den Erwartungen. Die Beobachtungen für die Wildtyp E6 Proteine korrelieren mit beschriebenen Daten für das Immortalisierungspotential der entsprechenden HPV-Typen bei Transfektion des jeweiligen Gesamt-Genoms (Woodworth *et al.*, 1989). Auch für 16E6, das einen N-terminalen HA-tag hatte, konnte eine Immortalisierung beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass ein N-terminaler HA-tag nicht mit den physiologischen Interaktionen von E6 interferiert. Somit sollte bei den Versuchen zur Reproduktion der vorgestellten Ergebnisse eine Verwendung von E6 Konstrukten mit einem N-terminalem HA-tag praktikabel sein. Dadurch sollte ein Nachweis der Expression der verschiedenen E6 Konstrukte auf Proteinebene möglich sein, so dass eine eindeutigere Interpretation der Beobachtungen erfolgen kann. Antikörper, die einen direkten Nachweis von E6, d.h. nicht über einen fusionierten tag, ermöglichen würden, sind bisher nicht beschrieben.

4.2.2 Funktion des C-Terminus von E6 in der Immortalisierung

Während für 16E6 und die Mutante 16C18 eine Immortalisierung beobachtet werden konnte, war die Chimäre 16C11 nicht in der Lage infizierte Zellen zu immortalisieren. Diese Befunde zeigen an, dass ein 'high risk' E6 C-Terminus für eine Immortalisierung von primären undifferenzierten Keratinozyten notwendig ist. Eine Zuordnung einer

biochemischen Funktion ist allerdings schwierig. So kann die Chimäre 16C11 weder mit PDZ-Proteinen wechselwirken noch eine Aktivierung der Telomerase induzieren (vgl. Tabelle 3). Weiterhin könnte der 16E6 C-Terminus für Interaktionen notwendig sein, die nicht bekannt sind bzw. hier nicht untersucht wurden. Um zumindest zwischen der Wechselwirkung mit PDZ-Proteinen und der Aktivierung der Telomerase unterscheiden zu können, müssen Mutanten von E6 generiert werden, die jeweils in einer dieser beiden Eigenschaften gestört sind. Eine bereits generierte Mutante könnte möglicherweise die Fähigkeit besitzen, eine Telomerase-Aktivierung zu bewirken, aber nicht mit PDZ-Proteinen zu interagieren. Wildtyp HPV16 E6 mit einem C-terminalen HA-tag sollte nicht in seiner Fähigkeit der Telomerase-Aktivierung beeinflusst sein. Da aber die C-terminal endständige Carboxylatgruppe bei der Bindung an PDZ-Domänen partizipiert (Baruch *et al.*, 2001), sollte 16E6 durch die C-terminale Fusion mit einem HA-tag in seiner Wechselwirkung mit PDZ-Proteinen gestört sein. Bereits beschrieben wurde, dass 18E6 mit einem C-terminalen AU-Epitop-tag in transienten Expressionen p53 degradieren kann, aber nicht MAGI-1, bei dem eine Wechselwirkung von E6 mit einer PDZ-Domäne von MAGI-1 essentiell für die E6-vermittelte Degradation ist (Stewart *et al.*, 2004). Es sind einige E6 Mutanten beschrieben (Kiyono *et al.*, 1998; McMurray und McKane, 2004), die keine Aktivierung der Telomerase, aber einen E6AP-abhängigen Abbau von p53 induzieren können. Bei Untersuchungen zur Wechselwirkung dieser Mutanten mit PDZ-Proteinen, könnten eventuell Mutanten ausgemacht werden, die mit PDZ-Proteinen interagieren, aber nicht die Telomerase aktivieren können.

Da 16C11 funktionell mit E6AP und p53 wechselwirken kann (vgl. Abb. 17), scheint der E6-vermittelte Abbau von p53 nicht auszureichen, um primäre undifferenzierten Keratinozyten zu immortalisieren. Weiterhin zeigen die Befunde an, dass zwar der C-Terminus von 16E6 für die Immortalisierung notwendig (s.o.), aber nicht ausreichend ist, da die Chimäre 11C16 keine Immortalisierung bewirken konnte (vgl. Tabelle 3).

Zwar wurde durch 16C11 eine verlängerte Lebensspanne induziert (vgl. 3.5), doch ist eine Interpretation zu diesem Zeitpunkt schwierig, weil die vergleichbare Chimäre 18C11 diese Aktivität nicht aufwies. Des Weiteren war auch die Chimäre 18C16 nicht in der Lage eine Immortalisierung oder eine verlängerte Lebensspanne von infizierten Zellen zu vermitteln. Da die Chimäre 18C16 in ihren prinzipiellen biochemischen Eigenschaften zu 16E6, 18E6 und 16C18 äquivalent sein sollte (vgl. Tabelle 2 und Abb. 17A und B), ist das Verhalten von 18C16 in der *in vitro* Immortalisierung überraschend. Aber eine Interpretation dieser Beobachtung wäre beim derzeitigen Stand der Untersuchungen rein spekulativ. Somit

erscheint, im Besonderen für die Chimären 18C11 und 18C16, eine Überprüfung von Transkription und der daraus resultierenden Proteinmengen unerlässlich. Sinnvoll erscheint auch eine Bestimmung der Halbwertszeiten der verschiedenen E6 Konstrukte. Erforderlich wären dazu pulse-chase-assays, die z.B. bei transienten Expressionsexperimenten in H1299 Zellen möglich wären. Die Halbwertszeiten könnten Hinweise liefern, ob bestimmte E6 Mutanten 'zu' kurzlebig sind, um effektiv physiologische Wechselwirkungen ausüben zu können.

4.2.3 Wie wichtig ist p53 ?

Da für das Verhalten weiterer Konstrukte in den Immortalisierungsassays noch keine Daten vorliegen, kann über die Bedeutung des p53-Abbaus bei der Expression von E6 in Abwesenheit von E7, keine Aussage getroffen werden. Allerdings kann vermutet werden, dass eine Degradation von p53 nicht ausreicht, um eine Immortalisierung zu bewirken (vgl. 4.2.2) Um Aussagen treffen zu können, inwieweit der Abbau von p53 essentiell für die Immortalisierung ist, wären Ergebnisse für die Mutanten SAT und ESAT notwendig. Diese Mutanten sollten alle bekannten biochemischen Funktionen von 16E6 besitzen, mit der Ausnahme, dass sie keinen Abbau von p53 vermitteln können (Crook *et al.*, 1991). In Immortalisierungsstudien unter gleichzeitiger Koexpression von HPV16 E7 wurde die Mutante SAT bereits als immortalisierungs-inkompetent beschrieben (McMurray und McCane, 2004). Da aber eine Expression von E7 eine Stabilisierung von p53 bewirkt (Demers *et al.*, 1994), ist in diesem System ein p53-Antagonist notwendig, während dies in Abwesenheit von E7 nicht notwendigerweise der Fall ist. Somit könnte die Mutante SAT möglicherweise eine Immortalisierung bei 'normalen' p53-Mengen bewirken, aber nicht bei erhöhten Mengen von p53, wie sie bei Koexpression von E7 beobachtet werden.

4.3 E6-Bindepeptide und Protein Transduktion

4.3.1 Mutationsanalyse von e6bp1

Die Wechselwirkung von 'high risk' HPV E6 Proteinen mit der zellulären Ligase E6AP scheint eine essentielle Rolle in der HPV assoziierten Karzinogenese zu spielen. Da diese Wechselwirkung auch anti-apoptotische Funktionen von E6 vermittelt (u.a. einen Abbau des Tumorsuppressors p53), stellt die Inhibierung der E6/E6AP Interaktion einen Ansatz für eine HPV-spezifische Therapie auf molekularer Ebene dar. Das E6-Bindepeptid e6bp1 besitzt die prinzipielle Eigenschaft die Bildung des E6/E6AP Komplexes zu hemmen, wobei die Bindekapazität von e6bp1 anscheinend nicht ausreicht, um in Zellkulturexperimenten einen Zelltod von HPV-positiven Zellen zu induzieren. Deshalb wurde eine Mutationsanalyse an e6bp1 durchgeführt. Aufgrund publizierter Daten (Chen *et al.*, 1998) wurden an 4 Aminosäurepositionen in e6bp1 Substitutionen gegen Alanin vorgenommen (vgl. Abb. 29). Da e6bp1 eine α -helikale Konformation einnimmt und diese essentiell für seine Wechselwirkung mit HPV E6 zu sein scheint (Be *et al.*, 2001), sollte der 'Helixbildner' Alanin eventuell die Konformation von e6bp1 stabilisieren und somit die Bindung an 'high risk' HPV E6 Proteine verstärken. Da keine Optimierung beobachtet wurde, könnte vermutet werden, dass eine Optimierung durch eine 'Einbringung' von Alanin in die Struktur von e6bp1 nicht möglich ist. Allerdings wurde das Potential der generierten Peptide, eine α -helikale Konformation einzunehmen, nicht untersucht. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass keine Stabilisierung der helikalen Konformation erfolgte und deshalb keine optimierten Bindeeigenschaften in *S. cerevisiae* beobachtet werden konnten.

Eine Zuordnung beobachteter Effekte auf die Funktion von Seitenketten der 'ausgetauschten' Aminosäuren erscheint schwierig. So hätte die Seitenkette von Threonin an Position 8 in e6bp1 eine essentielle Funktion, da bei einem Austausch gegen Alanin keine Indizien für eine Bindung an 16E6 in *S. cerevisiae* gefunden wurden (vgl. Tabelle 4). Allerdings konnte durch eine Substitution der Aminosäure 5 oder 17 gegen Alanin, zusätzlich zum Austausch an der Position 8 (5A,8A; 8A,10A; vgl. Tabelle 4) eine Aktivierung des Reportergens GAL1-HIS3 beobachtet werden, die bei alleinigem Austausch an Position 8 ausblieb. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Konformation in

8A gestört ist und Alanin an Position 5 oder 10 dem negativen Effekt von 8A auf die Konformation in gewissen Massen entgegenwirken kann. Diese Beobachtung würde dem Argument einer essentiellen Funktion der Threonin-Seitengruppe in gewissen Massen widersprechen. Einen weiteren Hinweis auf einen Einfluss der Konformation von e6bp1 auf seine Bindung an HPV16 E6 stellt der Vergleich der Eigenschaften von pADe6bp1 und pAD-TRX-e6bp1 dar. So konnte das lineare Peptid (pADe6bp1) eine geringere Aktivierung des Reportergens GAL2-ADE2 bewirken als e6bp1 in Fusion mit Thioredoxin (pAD-TRX-e6bp1) (vgl. 3.6.1, Abb. 27). Dies könnte anzeigen, dass durch eine Fusion mit Thioredoxin eine bestimmte Konformation von e6bp1 stabilisiert wird, die für eine Bindung an 16E6 günstig ist. Allerdings wurden die Expressionsraten der beiden Konstrukte nicht untersucht, so dass die beobachteten Unterschiede auch auf eine unterschiedlich starke Expression zurückzuführen sein könnten.

Bereits beschrieben ist, dass ein Austausch der Leucinreste an den Positionen 9, 11 und 12 gegen Alanin die Bindung an HPV16 E6 *in vitro* vollständig unterbindet (Be *et al.*, 2001). Diese Befunde sind hilfreich für alternative Ansätze zur Optimierung von e6bp1. Vorstellbar wäre zum Beispiel, Mutationen über synthetische Oligonukleotide zu erzeugen. Dabei wären die Nukleotidsequenzen für die entsprechenden kritischen Aminosäuren (T8, L9, L11 und L12) vorgegeben. Alle anderen Bereiche wären hingegen undefiniert, so dass bei der Synthese der Oligonukleotide in diesen Bereichen alle möglichen Kombinationen der Nukleotide (G, A, T und C) erfolgen würde. Auf diese Weise könnte eine Peptid-Datenbank erzeugt werden, die sehr spezifisch für Bindungen an 'high risk' HPV E6 Proteine sein sollte und alle möglichen Aminosäurekombinationen in nicht-essentiellen Bereichen abdeckt. Naheliegender wäre auch, bereits beschriebene E6-Bindepeptide in *S. cerevisiae* zu untersuchen. So könnten eventuell Peptide ausgemacht werden, die eine stärkere Bindung an E6 aufweisen als e6bp1 und zudem spezifisch mit der E6/E6AP Interaktion interferieren. Darüber hinaus ist für einige E6-Bindepeptide beschrieben, dass sie mit dem HPV16 und HPV18 E6-vermittelten Abbau einiger Substrate *in vitro* interferieren (Grm *et al.*, 2004).

Mit diesen alternativen Ansätzen könnten auch Probleme umgangen werden, die bei einer Optimierung durch eine PCR-vermittelte Zufallsmutagenese bestehen. So konnten innerhalb der durchgeführten Zufallsmutagenese für e6bp1 keine Peptide mit optimierten Bindeeigenschaften an HPV16 E6 generiert werden (vgl. 3.6.1). Verschiedene Ursachen minimieren dabei die Effektivität des Systems. Zwar wurden zusammengenommen (pADe6bp1 und pAD-TRX-e6bp1 als Templat für die PCR) über 40 Millionen Klone

untersucht, doch ist die Anzahl an mutierten Peptiden weitaus geringer. So sollte aufgrund publizierter Daten (Spee *et al.*, 1993) in jedem zweiten PCR-Produkt eine Mutation erfolgt sein, was eine Anzahl untersuchter Mutationen von ungefähr 20 Millionen Klonen ergäbe. Da die Zielsequenz nur ungefähr 30 Prozent des PCR-Produkts umfasst, ergäben sich 6 Millionen untersuchte PCR-Produkte mit einer Mutation in der Zielsequenz (bei einem Ansatz, der nur die Zielsequenz amplifizieren sollte, konnte unter Verwendung der Taq-Polymerase kein PCR-Produkt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt)). Diese Mutationen beinhalten auch Wirkungen wie eine Leserasterverschiebung, ein frühzeitiges Stopcodon oder auch stille Mutationen. Die Anzahl an untersuchten Klonen mit einem tatsächlichen Aminosäureaustausch innerhalb von e6bp1 ist somit schwer abschätzbar. Der größte Nachteil der gewählten Methode liegt wahrscheinlich in der Generierung von mutierten Peptiden, in denen nur selten mehr als eine einzelne Aminosäure verändert ist. Beschrieben ist, dass bei einem PCR-Produkt ähnlicher Größe unter den verwendeten PCR-Bedingungen nur mit sehr geringer Häufigkeit mehr als ein Nukleotidaustausch beobachtet werden konnte (Spee *et al.*, 1993). So konnte bei der gezielten Mutagenese von e6bp1 (s.o.), durch die Substitution einzelner Aminosäuren, keine Optimierung der Bindeeigenschaften von e6bp1 erzielt werden. Auch besitzen alle beschriebenen E6-Bindepeptide, die eine Ähnlichkeit zu e6bp1 aufweisen, an mehr als einer Position andere Aminosäuren als e6bp1 (Grm *et al.*, 2004, Elston *et al.*, 1998). Da bisher keine Peptide beschrieben sind, die sich direkt von e6bp1 ableiten und optimierte Bindeeigenschaften an HPV E6 aufweisen, ist unklar ob eine Optimierung von e6bp1 unter Beibehaltung seiner Grundstruktur möglich ist. Die Generierung einer von e6bp1 abgeleiteten E6-spezifischen Datenbank (s.o.) könnte helfen diese Frage zu klären.

4.3.2 Zellpenetrierende Peptide und Protein Transduktion

Zu Beginn dieser Arbeit war der Prozess der Protein-Transduktion durch zellpenetrierende Peptide als ATP-, Rezeptor- und Temperatur-unabhängig beschrieben und seine Funktionalität *in vivo* bestätigt (Schwarze, 2000). ARG7 war zu diesem Zeitpunkt das kleinste bekannte zellpenetrierende Peptid (Fischer *et al.*, 2001) und zudem als effektiver im Vergleich zu anderen CPPs beschrieben (Wender *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2000). Folglich wurde in dieser Arbeit ARG7 als zellpenetrierendes Peptid verwendet. Für ARG7-GFP konnten in dieser Arbeit wichtige Charakteristika von CPP-

Fusionskonstrukten bestätigt werden. So wurde für alle untersuchten Zelllinien eine Transduktion von ARG7-GFP beobachtet (vgl. Abb. 31 und 32) und zudem verlief diese Transduktion konzentrationsabhängig (vgl. Abb. 34). Erst gegen Ende dieser Arbeit wurden Daten beschrieben, die Hinweise lieferten, dass einige Beobachtungen für das Verhalten von CPPs Artefakte der Zellaufbereitung darstellen könnten (Vives *et al.*, 2003). So zeigten zellpenetrierende Konstrukte nach einer Zell-Fixierung eine Lokalisation innerhalb der Zellen auf, die in unfixierten Zellen nicht beobachtet wurde (Richard *et al.*, 2003). Es ergab sich ein Bild, dass eine starke Bindung an die Zellmembran und eine schwache Aufnahme der Fusionskonstrukte durch Endozytose vermuten ließ (Lundberg *et al.*, 2003; Trehin und Merkle, 2004). Alle in dieser Arbeit generierten Daten für ARG7-GFP wurden unter Bedingungen erzeugt, die eine Beobachtung von Artefakten nicht ausschließen. Gegen eine ineffektive Transduktion von ARG7-Fusionskonstrukten sprechen allerdings beschriebene Daten für eine physiologische Funktionalität solcher Konstrukte *in vivo* (Rothbard *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001). Dies weist darauf hin, dass die in Zellkulturexperimenten gemachten Beobachtungen zwar in ihrer hohen Effizienz *in vivo* eventuell nicht zutreffen, aber ihre prinzipielle Funktionalität *in vivo* nicht betreffen. Des Weiteren könnte ARG7 eine besondere Stellung innerhalb zellpenetrierender Peptide zukommen. So wurde für ARG7, aber nicht für Penetratin (ein weiteres zellpenetrierendes Peptid) eine Energie- und Endozytose-unabhängige Aufnahme durch lebende, d.h. nicht-fixierte, Zellen beschrieben (Thoren *et al.*, 2003). Um die Effizienz der Aufnahme des in dieser Arbeit verwendeten 'ARG7-GFP-Systems' zu testen, könnte ein Fusionskonstrukt mit Ubiquitin (Ub) verwendet werden. Ein Fusionskonstrukt der Form ARG7-Ub-GFP sollte nach Transduktion in eine Zelle durch Ubiquitin-spezifische Hydrolasen gespalten werden (Bachmair *et al.*, 1986), so dass freies GFP in der Zelle vorliegen sollte. Sollte keine Transduktion erfolgen, sollte das ARG7-Ub-GFP Konstrukt unmodifiziert extrazellulär an der Membran verhaftet sein. Bei einer denaturierenden Lyse von mit ARG7-Ub-GFP behandelten Zellen kann auch keine postlytische Spaltung von ARG7-Ub-GFP erfolgen. Mittels WesternBlot/ECL unter Verwendung GFP-spezifischer Antikörper könnte so über das Laufverhalten zwischen Transduktion (GFP, ca. 29 kDa) und extrazellulärer Anheftung an die Zellmembran (ARG7-Ub-GFP, ca. 38 kDa) unterschieden werden.

Da unklar ist, ob das Konstrukt ARG7-GFP-e6bp1 tatsächlich von Zellen aufgenommen wurde, sind Aussagen über dessen Einfluss auf das Wachstum von HeLa und SiHa Zellen (vgl. Abb. 37) zu diesem Zeitpunkt schwierig. Unter der Annahme, dass

ARG7-GFP-e6bp1 tatsächlich von den Zellen aufgenommen wurde, können verschiedene Faktoren die Funktionalität dieses Konstrukts beeinträchtigt haben. Möglicherweise hat die intrazellulär vorliegende Menge an ARG7-GFP-e6bp1 nicht ausgereicht, um mit dem Wachstum dieser HPV-positiven Zellen zu interferieren. Auch könnte die Bindekapazität von e6bp1 an E6 zu gering sein, um eine effektive Inhibierung des E6/E6AP Komplexes und eine ausreichende Stabilisierung entsprechender E6-Substrate 'in vivo' zu bewirken. Weiterhin sollte auch die intrazelluläre Lokalisation von ARG7-GFP-e6bp1 einen Einfluss auf die Wirksamkeit dieses Konstrukts besitzen. So erfolgt der Abbau von p53 durch den E6/E6AP Komplex möglicherweise im Zytosol, doch könnten Wechselwirkungen von E6 und/oder E6AP mit p53 im Nukleus notwendig sein, um einen Export ins Zytosol und eine anschließende Degradation zu bewirken (Mantovani und Banks, 2001). Folglich könnte eine Unterbindung der E6/E6AP Wechselwirkung im Nukleus für eine effektive Stabilisierung von p53 notwendig sein. Immunfluoreszenz-Daten zur Induktion einer Anreicherung von p53 und Apoptose in SiHa Zellen durch das Konstrukt TRX-1/1 scheinen diese Frage nicht eindeutig beantworten zu können (Butz *et al.*, 2000). Die Generierung eines Fusionskonstruktes von ARG7-GFP-e6bp1, das um ein NLS (nuclear localisation signal) erweitert ist (ARG7-GFP-NLS-e6bp1), könnte helfen die Frage zu klären, welchen Einfluss der intrazellulären Lokalisation von e6bp1 zukommt, um eine Inhibierung des E6/E6AP Komplexes zu erzielen. Zwar zeigen die Daten in dieser Arbeit an, dass ARG7-GFP-e6bp1 zytosolisch lokalisiert ist (vorausgesetzt, dass keine Artefakte beobachtet wurden) (vgl. Abb. 29), über eine mögliche Lokalisation im Nukleus konnten aber keine Aussagen getroffen werden (vgl. 3.6.2). Unter Verwendung von ARG7-GFP-e6bp1 und ARG7-GFP-NLS-e6bp1 sollte es prinzipiell möglich sein, die Bildung eines E6/E6AP Komplexes im Zytosol und im Nukleus zu inhibieren.

5 Literaturverzeichnis

- Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH und Rosl F (2002). "Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis." *Oncogene* **21** (2): 165-175.
- Ashcroft M und Vousden KH (1999). "Regulation of p53 stability." *Oncogene* **18** (53): 7637-7643.
- Bachmair A, Finley D und Varshavsky A (1986). "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue." *Science* **234** (4773): 179-186.
- Bachmair A und Varshavsky A (1989). "The degradation signal in a short-lived protein." *Cell* **56** (6): 1019-1032.
- Be X, Hong Y, Wei J, Androphy EJ, Chen JJ und Baleja JD (2001). "Solution structure determination and mutational analysis of the papillomavirus E6 interacting peptide of E6AP." *Biochemistry* **40** (5): 1293-1299.
- Bode AM und Dong Z (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." *Nat Rev Cancer* **4** (10): 793-805.
- Bohl J, Das K, Dasgupta B und Vande Pol SB (2000). "Competitive binding to a charged leucine motif represses transformation by a papillomavirus E6 oncoprotein." *Virology* **271** (1): 163-170.
- Bonifaci N, Sitia R und Rubartelli A (1995). "Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding." *Aids* **9** (9): 995-1000.
- Boyer SN, Wazer DE und Band V (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." *Cancer Res* **56** (20): 4620-4624.
- Bracken AP, Ciro M, Cocito A und Helin K (2004). "E2F target genes: unraveling the biology." *Trends Biochem Sci* **29** (8): 409-417.

- Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M und Hoppe-Seyler F (2000). "Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (12): 6693-6697.
- Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M und Hoppe-Seyler F (2003). "siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells." *Oncogene* **22** (38): 5938-5945.
- Cassidy SB, Dykens E und Williams CA (2000). "Prader-Willi and Angelman syndromes: sister imprinted disorders." *Am J Med Genet* **97** (2): 136-146.
- Cavatorta AL, Fumero G, Chouhy D, Aguirre R, Nocito AL, Giri AA, Banks L und Gardiol D (2004). "Differential expression of the human homologue of drosophila discs large oncosuppressor in histologic samples from human papillomavirus-associated lesions as a marker for progression to malignancy." *Int J Cancer* **111** (3): 373-380.
- Chakrabarti O und Krishna S (2003). "Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression." *J Biosci* **28** (3): 337-348.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL und Bernard HU (1995). "Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy." *J Virol* **69** (5): 3074-3083.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK und Varshavsky A (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." *Science* **243** (4898): 1576-1583.
- Chen X, Ko LJ, Jayaraman L und Prives C (1996). "p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells." *Genes Dev* **10** (19): 2438-2451.
- Chen JJ, Hong Y, Rustamzadeh E, Baleja JD und Androphy EJ (1998). "Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6." *J Biol Chem* **273** (22): 13537-13544.

- Chen L, Wright LR, Chen CH, Oliver SF, Wender PA und Mochly-Rosen D (2001). "Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective epsilonPKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R(7)." *Chem Biol* **8** (12): 1123-1129.
- Ciechanover A und Iwai K (2004). "The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed." *IUBMB Life* **56** (4): 193-201.
- Cooper B, Schneider S, Bohl J, Jiang Y, Beaudet A und Vande Pol S (2003). "Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53." *Virology* **306** (1): 87-99.
- Corcoran CA, Huang Y und Sheikh MS (2004). "The p53 Paddy Wagon: COP1, Pirh2 and MDM2 Are Found Resisting Apoptosis and Growth Arrest." *Cancer Biol Ther* **3** (8): 721-725.
- Crook T, Tidy JA und Vousden KH (1991). "Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation." *Cell* **67** (3): 547-556.
- Dalal S, Gao Q, Androphy EJ und Band V (1996). "Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells." *J Virol* **70** (2): 683-688.
- de Villiers EM (1994). "Human pathogenic papillomavirus types: an update." *Curr Top Microbiol Immunol* **186**: 1-12.
- Demers GW, Halbert CL und Galloway DA (1994). "Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene." *Virology* **198** (1): 169-174.
- DiPaolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V und Doniger J (1989). "Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras." *Oncogene* **4** (4): 395-399.
- Du M, Fan X, Hong E und Chen JJ (2002). "Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1." *Biochem Biophys Res Commun* **296** (4): 962-969.

- Dürst M, Gallahan D, Jay G und Rhim JS (1989). "Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene." *Virology* **173** (2): 767-771.
- Dyson N, Howley PM, Münger K und Harlow E (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." *Science* **243** (4893): 934-937.
- Dyson N (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." *Genes Dev* **12** (15): 2245-2262.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW und Vogelstein B (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." *Nat Genet* **1** (1): 45-49.
- Elliott G und O'Hare P (1997). "Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein." *Cell* **88** (2): 223-233.
- Elston RC, Naphtine S und Doorbar J (1998). "The identification of a conserved binding motif within human papillomavirus type 16 E6 binding peptides, E6AP and E6BP." *J Gen Virol* **79** (Pt 2): 371-374.
- Fang P, Lev-Lehman E, Tsai TF, Matsuura T, Benton CS, Sutcliffe JS, Christian SL, Kubota T, Halley DJ, Meijers-Heijboer H, Langlois S, Graham JM, Jr., Beuten J, Willems PJ, Ledbetter DH und Beaudet AL (1999). "The spectrum of mutations in UBE3A causing Angelman syndrome." *Hum Mol Genet* **8** (1): 129-135.
- Fields S und Song O (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." *Nature* **340** (6230): 245-246.
- Finley D, Sadis S, Monia BP, Boucher P, Ecker DJ, Crooke ST und Chau V (1994). "Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant." *Mol Cell Biol* **14** (8): 5501-5509.
- Frankel AD und Pabo CO (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* **55** (6): 1189-1193.

- Friedman PN, Chen X, Bargonetti J und Prives C (1993). "The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (8): 3319-3323.
- Gao Q, Singh L, Kumar A, Srinivasan S, Wazer DE und Band V (2001). "Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells." *J Virol* **75** (9): 4459-4466.
- Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R und Banks L (1999). "Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation." *Oncogene* **18** (40): 5487-5496.
- Gardiol D, Galizzi S und Banks L (2002). "Mutational analysis of the discs large tumour suppressor identifies domains responsible for human papillomavirus type 18 E6-mediated degradation." *J Gen Virol* **83** (Pt 2): 283-289.
- Gietz RD und Woods RA (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Glaunsinger BA, Lee SS, Thomas M, Banks L und Javier R (2000). "Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins." *Oncogene* **19** (46): 5270-5280.
- Green M und Loewenstein PM (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." *Cell* **55** (6): 1179-1188.
- Greenfield I, Nickerson J, Penman S und Stanley M (1991). "Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (24): 11217-11221.
- Grm HS, Weber M, Elston R, McIntosh P, Griffin H, Banks L und Doorbar J (2004). "Inhibition of E6-induced degradation of its cellular substrates by novel blocking peptides." *J Mol Biol* **335** (4): 971-985.

- Guccione E, Massimi P, Bernat A und Banks L (2002). "Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins." *Virology* **293** (1): 20-25.
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP und Dikic I (2003). "Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation." *Nat Cell Biol* **5** (5): 461-466.
- Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC und Montesano R (1998). "IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools." *Nucleic Acids Res* **26** (1): 205-213.
- Halbert CL, Demers GW und Galloway DA (1991). "The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells." *J Virol* **65** (1): 473-478.
- Harris BZ und Lim WA (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." *J Cell Sci* **114** (Pt 18): 3219-3231.
- Hengstermann A, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ und Scheffner M (2001). "Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (3): 1218-1223.
- Hirata A, Higuchi M, Niinuma A, Ohashi M, Fukushi M, Oie M, Akiyama T, Tanaka Y, Gejyo F und Fujii M (2004). "PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line." *Virology* **318** (1): 327-336.
- Huang H, Kaku S, Knights C, Park B, Clifford J und Kulesz-Martin M (2002). "Repression of transcription and interference with DNA binding of TATA-binding protein by C-terminal alternatively spliced p53." *Exp Cell Res* **279** (2): 248-259.
- Huibregtse JM, Scheffner M und Howley PM (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." *Embo J* **10** (13): 4129-4135.

- Huibregtse JM, Scheffner M und Howley PM (1993). "Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53." *Mol Cell Biol* **13** (2): 775-784.
- Huibregtse JM, Scheffner M und Howley PM (1993). "Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins." *Mol Cell Biol* **13** (8): 4918-4927.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S und Howley PM (1995). "A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (7): 2563-2567.
- Humbert P, Russell S und Richardson H (2003). "Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer." *Bioessays* **25** (6): 542-553.
- Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA und McDougall JK (1991). "Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (2): 570-574.
- Ishidate T, Matsumine A, Toyoshima K und Akiyama T (2000). "The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase." *Oncogene* **19** (3): 365-372.
- Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E und Yao TP (2001). "p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2." *Embo J* **20** (6): 1331-1340.
- James P, Halladay J und Craig EA (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." *Genetics* **144** (4): 1425-1436.
- Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, Nassif N, Meisner L, Newton MA, Waldman FM und Reznikoff CA (1999). "p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells." *Cancer Res* **59** (12): 2957-2964.

- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD und Beaudet AL (1998). "Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation." *Neuron* **21** (4): 799-811.
- Jimenez GS, Khan SH, Stommel JM und Wahl GM (1999). "p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses." *Oncogene* **18** (53): 7656-7665.
- Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H und Prochiantz A (1991). "Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (5): 1864-1868.
- Jones DS und Schofield JP (1990). "A rapid method for isolating high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing." *Nucleic Acids Res* **18** (24): 7463-7464.
- Jones SN, Roe AE, Donehower LA und Bradley A (1995). "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53." *Nature* **378** (6553): 206-208.
- Jones DL, Thompson DA und Munger K (1997). "Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis." *Virology* **239** (1): 97-107.
- Kao WH, Beaudenon SL, Talis AL, Huibregtse JM und Howley PM (2000). "Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase." *J Virol* **74** (14): 6408-6417.
- Kehmeier E, Ruhl H, Volland B, Stoppler MC, Androphy E und Stoppler H (2002). "Cellular steady-state levels of "high risk" but not "low risk" human papillomavirus (HPV) E6 proteins are increased by inhibition of proteasome-dependent degradation independent of their p53- and E6AP-binding capabilities." *Virology* **299** (1): 72-87.
- Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T und Ishibashi M (1997). "Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (21): 11612-11616.

- Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA und Klingelhutz AJ (1998). "Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells." *Nature* **396** (6706): 84-88.
- Ko LJ und Prives C (1996). "p53: puzzle and paradigm." *Genes Dev* **10** (9): 1054-1072.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU und Jentsch S (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." *Cell* **96** (5): 635-644.
- Kühne C und Banks L (1998). "E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box." *J Biol Chem* **273** (51): 34302-34309.
- Kumar S, Talis AL und Howley PM (1999). "Identification of HHR23A as a substrate for E6-associated protein-mediated ubiquitination." *J Biol Chem* **274** (26): 18785-18792.
- Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE, Band H und Band V (2002). "Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3." *Mol Cell Biol* **22** (16): 5801-5812.
- Ladner RC (1995). "Constrained peptides as binding entities." *Trends Biotechnol* **13** (10): 426-430.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227** (5259): 680-685.
- Lee SS, Weiss RS und Javier RT (1997). "Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (13): 6670-6675.
- Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L und Javier RT (2000). "Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins." *J Virol* **74** (20): 9680-9693.

- Leifert JA, Harkins S und Whitton JL (2002). "Full-length proteins attached to the HIV tat protein transduction domain are neither transduced between cells, nor exhibit enhanced immunogenicity." *Gene Ther* **9** (21): 1422-1428.
- Levine AJ (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* **88** (3): 323-331.
- Li X und Coffino P (1996). "High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation." *J Virol* **70** (7): 4509-4516.
- Lin HT, Steller MA, Aish L, Hanada T und Chishti AH (2004). "Differential expression of human Dlg in cervical intraepithelial neoplasias." *Gynecol Oncol* **93** (2): 422-428.
- Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Muller S und Scheffner M (2003). "HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (21): 12009-12014.
- Lue RA, Marfatia SM, Branton D und Chishti AH (1994). "Cloning and characterization of hdlg: the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to protein 4.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (21): 9818-9822.
- Lundberg M, Wikstrom S und Johansson M (2003). "Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains." *Mol Ther* **8** (1): 143-150.
- Mantovani F und Banks L (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." *Oncogene* **20** (54): 7874-7887.
- Mantovani F, Massimi P und Banks L (2001). "Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumour suppressor protein." *J Cell Sci* **114** (Pt 23): 4285-4292.
- Mantovani F und Banks L (2003). "Regulation of the discs large tumor suppressor by a phosphorylation-dependent interaction with the beta-TrCP ubiquitin ligase receptor." *J Biol Chem* **278** (43): 42477-42486.
- Massimi P, Pim D, Kühne C und Banks L (2001). "Regulation of the human papillomavirus oncoproteins by differential phosphorylation." *Mol Cell Biochem* **227** (1-2): 137-144.

- Massimi P, Gammoh N, Thomas M und Banks L (2004). "HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumour suppressor substrates for proteasome-mediated degradation." *Oncogene* **23** (49): 8033-8039.
- May P und May E (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein." *Oncogene* **18** (53): 7621-7636.
- McLaughlin M, Hale R, Ellston D, Gaudet S, Lue RA und Viel A (2002). "The distribution and function of alternatively spliced insertions in hDlg." *J Biol Chem* **277** (8): 6406-6412.
- McMurray HR und McCance DJ (2004). "Degradation of p53, not telomerase activation, by E6 is required for bypass of crisis and immortalization by human papillomavirus type 16 E6/E7." *J Virol* **78** (11): 5698-5706.
- Meissner PS, Sisk WP und Berman ML (1987). "Bacteriophage lambda cloning system for the construction of directional cDNA libraries." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (12): 4171-4175.
- Miller AD und Buttimore C (1986). "Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production." *Mol Cell Biol* **6** (8): 2895-2902.
- Montes de Oca Luna R, Wagner DS und Lozano G (1995). "Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53." *Nature* **378** (6553): 203-206.
- Mori K, Iwao K, Miyoshi Y, Nakagawara A, Kofu K, Akiyama T, Arita N, Hayakawa T und Nakamura Y (1998). "Identification of brain-specific splicing variants of the hDLG1 gene and altered splicing in neuroblastoma cell lines." *J Hum Genet* **43** (2): 123-127.
- Morris SM (2002). "A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation." *Mutat Res* **511** (1): 45-62.
- Müller BM, Kistner U, Veh RW, Cases-Langhoff C, Becker B, Gundelfinger ED und Garner CC (1995). "Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein." *J Neurosci* **15** (3 Pt 2): 2354-2366.

- Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM und Schlegel R (1989). "The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes." *J Virol* **63** (10): 4417-4421.
- Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E und Howley PM (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." *Embo J* **8** (13): 4099-4105.
- Nakagawa S und Huibregtse JM (2000). "Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase." *Mol Cell Biol* **20** (21): 8244-8253.
- Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Takizawa S, Suzuki Y, Yasugi T, Huibregtse JM und Taketani Y (2004). "Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix." *Br J Cancer* **90** (1): 194-199.
- Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE und Lambert PF (2003A). "The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo." *J Virol* **77** (12): 6957-6964.
- Nguyen MM, Nguyen ML, Caruana G, Bernstein A, Lambert PF und Griep AE (2003B). "Requirement of PDZ-containing proteins for cell cycle regulation and differentiation in the mouse lens epithelium." *Mol Cell Biol* **23** (24): 8970-8981.
- Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, Li ST, Kobayashi N, Matsumoto S, Tanaka K, Tanaka N und Matsui H (2004). "A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice." *Nat Med* **10** (3): 305-309.
- Nuber U, Schwarz SE und Scheffner M (1998). "The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate." *Eur J Biochem* **254** (3): 643-649.
- Oda H, Kumar S und Howley PM (1999). "Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (17): 9557-9562.

- Olivier M, Hussain SP, Caron de Fromentel C, Hainaut P und Harris CC (2004). "TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer." *IARC Sci Publ*(157): 247-270.
- Oren M (1999). "Regulation of the p53 tumor suppressor protein." *J Biol Chem* **274** (51): 36031-36034.
- Pan H und Griep AE (1994). "Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development." *Genes Dev* **8** (11): 1285-1299.
- Pan H und Griep AE (1995). "Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development." *Genes Dev* **9** (17): 2157-2169.
- Pim D, Storey A, Thomas M, Massimi P und Banks L (1994). "Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells." *Oncogene* **9** (7): 1869-1876.
- Pim D, Thomas M, Javier R, Gardiol D und Banks L (2000). "HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase." *Oncogene* **19** (6): 719-725.
- Pim D, Thomas M und Banks L (2002). "Chimaeric HPV E6 proteins allow dissection of the proteolytic pathways regulating different E6 cellular target proteins." *Oncogene* **21** (53): 8140-8148.
- Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV und Lebleu B (2003). "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." *J Biol Chem* **278** (1): 585-590.
- Rothbard JB, Garlington S, Lin Q, Kirschberg T, Kreider E, McGrane PL, Wender PA und Khavari PA (2000). "Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation." *Nat Med* **6** (11): 1253-1257.

- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ und Howley PM (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63** (6): 1129-1136.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD und Howley PM (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." *Cell* **75** (3): 495-505.
- Scheffner M, Huibregtse JM und Howley PM (1994). "Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (19): 8797-8801.
- Scheffner M (1998). "Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation." *Pharmacol Ther* **78** (3): 129-139.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A und zur Hausen H (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." *Nature* **314** (6006): 111-114.
- Schwarz SE, Rosa JL und Scheffner M (1998). "Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7." *J Biol Chem* **273** (20): 12148-12154.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A und Dowdy SF (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." *Science* **285** (5433): 1569-1572.
- Schwarze SR, Hruska KA und Dowdy SF (2000). "Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?" *Trends Cell Biol* **10** (7): 290-295.
- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ und Shenk T (1992). "Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (24): 12028-12032.
- Song S, Liem A, Miller JA und Lambert PF (2000). "Human papillomavirus types 16 E6 and E7 contribute differently to carcinogenesis." *Virology* **267** (2): 141-150.

- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM und Cantley LC (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." *Science* **275** (5296): 73-77.
- Spee JH, de Vos WM und Kuipers OP (1993). "Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP." *Nucleic Acids Res* **21** (3): 777-778.
- Spitkovsky D, Aengeneyndt F, Braspenning J und von Knebel Doeberitz M (1996). "p53-independent growth regulation of cervical cancer cells by the papillomavirus E6 oncogene." *Oncogene* **13** (5): 1027-1035.
- Stewart D, Kazemi S, Li S, Massimi P, Banks L, Koromilas AE und Matlashewski G (2004). "Ubiquitination and proteasome degradation of the E6 proteins of human papillomavirus types 11 and 18." *J Gen Virol* **85** (Pt 6): 1419-1426.
- Stoler MH (2000). "Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis." *Int J Gynecol Pathol* **19** (1): 16-28.
- Suzuki T, Ohsugi Y, Uchida-Toita M, Akiyama T und Yoshida M (1999). "Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control." *Oncogene* **18** (44): 5967-5972.
- Talis AL, Huibregtse JM und Howley PM (1998). "The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells." *J Biol Chem* **273** (11): 6439-6445.
- Thomas M und Banks L (1998). "Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6." *Oncogene* **17** (23): 2943-2954.
- Thomas M und Banks L (1999). "Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types." *J Gen Virol* **80** (Pt 6): 1513-1517.

- Thomas M, Glaunsinger B, Pim D, Javier R und Banks L (2001). "HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation." *Oncogene* **20** (39): 5431-5439.
- Thomas M, Laura R, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L und Banks L (2002). "Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation." *Oncogene* **21** (33): 5088-5096.
- Thoren PE, Persson D, Isakson P, Goksor M, Onfelt A und Norden B (2003). "Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells." *Biochem Biophys Res Commun* **307** (1): 100-107.
- Trehin R und Merkle HP (2004). "Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery." *Eur J Pharm Biopharm* **58** (2): 209-223.
- Turner GC und Varshavsky A (2000). "Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo." *Science* **289** (5487): 2117-2120.
- Vidal M, Braun P, Chen E, Boeke JD und Harlow E (1996). "Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (19): 10321-10326.
- Vives E, Richard JP, Rispal C und Lebleu B (2003). "TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry." *Curr Protein Pept Sci* **4** (2): 125-132.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ und Munoz N (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* **189** (1): 12-19.
- Watson RA, Rollason TP, Reynolds GM, Murray PG, Banks L und Roberts S (2002). "Changes in expression of the human homologue of the Drosophila discs large tumour suppressor protein in high-grade premalignant cervical neoplasias." *Carcinogenesis* **23** (11): 1791-1796.

- Watson RA, Thomas M, Banks L und Roberts S (2003). "Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes." *J Cell Sci* **116** (Pt 24): 4925-4934.
- Weissman AM (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2** (3): 169-178.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L und Rothbard JB (2000). "The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (24): 13003-13008.
- Woodworth CD, Doniger J und DiPaolo JA (1989). "Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma." *J Virol* **63** (1): 159-164.
- Yamamoto Y, Huibregtse JM und Howley PM (1997). "The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing." *Genomics* **41** (2): 263-266.
- Yang Y, Li CC und Weissman AM (2004). "Regulating the p53 system through ubiquitination." *Oncogene* **23** (11): 2096-2106.
- zur Hausen H (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." *J Natl Cancer Inst* **92** (9): 690-698.
- zur Hausen H (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." *Nat Rev Cancer* **2** (5): 342-350.

6 Zusammenfassung

Bestimmte Typen humaner Papillomviren ('high risk' HPVs) spielen bei der Entstehung des Zervixkarzinoms eine kausale Rolle. Dabei scheint die Expression der viralen Proteine E6 und E7 in allen Stadien der Karzinogenese essentiell zu sein. E6 besitzt anti-apoptotisches Potential, das vermutlich zur Kompensation einer E7-vermittelten Apoptose-Sensitivität infizierter Zellen benötigt wird. Für E6 sind potentielle Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen beschrieben, wobei die physiologische Relevanz für die meisten Interaktionen weitestgehend unbekannt ist. In dieser Arbeit wurden mutierte Formen von E6 durch gezielte Mutagenese generiert und jeweils in ihren Wechselwirkungen mit dem Tumorsuppressor p53, der Protein-Ubiquitin-Ligase E6AP und den PDZ-Proteinen Scribble und Dlg charakterisiert. Dabei wurden Beobachtungen gemacht, die auf einen E6AP-vermittelten Abbau von Dlg durch E6 hinweisen und somit im Widerspruch zu publizierten Daten stehen. Dies ist aber vermutlich dadurch zu erklären, dass in vorherigen Studien ein Abbau von Dlg durch Formen von E6, die sich von 'low risk' E6 Proteinen ableiten, beobachtet wurde. Da diese E6 Formen nicht in der Lage sind, E6AP *in vitro* zu kopräzipitieren, wurde geschlussfolgert, dass sie nicht mit E6AP interagieren. Durch die Verwendung von E6AP *-/-* Mausfibroblasten konnten in dieser Arbeit allerdings deutliche Hinweise für eine Interaktion von E6AP mit dem E6 Protein des 'low risk' HPV-Typen 11 gefunden werden. Zusätzlich wurde das onkogene Potential der generierten E6 Mutanten in Zellkulturstudien untersucht. Vorläufige Ergebnisse zeigen an, dass dem extremen C-Terminus von 'high risk' E6 Proteinen eine wichtige Rolle bei der Immortalisierung von Zellen zukommt. Um diesen Einfluss des C-Terminus näher zu spezifizieren, ist die Generierung weiterer E6 Mutanten notwendig.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von E6 mit E6AP eine potentielle Zielstruktur für molekulare Ansätze bei der Behandlung des Zervixkarzinoms darstellt, wurde die Methode der Proteintransduktion etabliert. Dazu wurde das von E6AP-abgeleitete E6-Bindepeptid e6bp1 an ein zellpenetrierendes Peptid (im vorliegenden Fall 'ARG7') fusioniert und es konnten alle wesentlichen Eigenschaften von zellpenetrierenden Peptiden beobachtet werden. Allerdings wurden alle Untersuchungen unter Bedingungen durchgeführt, für die kürzlich die Möglichkeit der Erzeugung von Artefakten beschrieben wurde. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um Aussagen über einen Einfluss von e6bp1 auf das Wachstum von HPV-positiven Zellen treffen zu können.

7 Abstract

Certain types of human paillomaviruses ('high risk' HPVs) play a causal role in the development of cervical cancer. The expression of the viral proteins E6 and E7 seems to be essential in all phases of carcinogenesis. E6 has anti-apoptotic potential, which has been proposed to compensate an E7-mediated sensitivity of infected cells towards apoptosis. For E6, a number of potential cellular interacting proteins has been described, but the physiological relevance of most of these interactions remains poorly understood. In this study, a panel of mutated forms of E6 was generated by site-directed mutagenesis and their potential to interact with the tumour suppressor p53, the ubiquitin ligase E6AP and the PDZ-proteins Scribble and Dlg respectively, was determined. The results obtained indicate that Dlg is degraded by E6 in an E6AP-dependent manner, which is in contrast to published data. A possible explanation for this difference is provided by the notion that, in previous studies, it was demonstrated that Dlg can be degraded in cells by forms of E6, which are derived from 'low risk' E6 proteins. These forms of E6 do not co-precipitate E6AP *in vitro*, and thus it was concluded that they do not interact with E6AP. However, in the present study evidence for a functional interaction of E6AP and the E6 protein of the low risk HPV-type 11 was obtained by the use of E6AP *-/-* fibroblasts. In addition, the oncogenic activity of the various mutated E6 proteins was tested in cell culture experiments. Preliminary results indicate that the very C terminus of 'high risk' E6 proteins is necessary to induce an immortalization of primary keratinocytes. To further specify the role of the C terminus in immortalization, the generation of additional E6 mutants is necessary.

To study if the interaction of E6 and E6AP provides a potential target for a molecular therapy of cervical cancers, the method of protein transduction was established. For this purpose, the E6AP-derived E6 binding peptide e6bp1 was fused to a cell penetrating peptide ('ARG7' was used in this work) and all essential properties of cell penetrating peptides were observed. However, the data were generated under conditions that have recently been described to be prone to artefacts. Thus, further work will be required to study the possible interference of e6bp1 with the growth of HPV-positive cells.

8 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzen 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 Prof. Dr. Jürgen Dohmen betreut worden.

Teilpublikationen:

- Hengstermann A, D´Silva M, Kuballa P, Butz K, Hoppe-Seyler F, Scheffner M. 'Apoptosis induced by downregulation of E6AP expression in HPV-positive cancer cell lines depends on p53'. Eingereicht.

(Petric Kuballa)

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Petric Kuballa
Geburtsdatum: 5.12.1973
Geburtsort: Lünen an der Lippe
Familienstand: ledig
Anschrift: Roonstrasse 108
50674 Köln
Telephon: 0221-9211778

Schulbildung / Zivildienst

bis 9.6.1993: Hochschulreife am Gymnasium 'Lünen-Altünen'
2.8.1993-31.7.1994: Zivildienst bei der Arbeiterwohlfahrt in Lünen

Studium

1.10.1994: Beginn des Studiengangs 'Diplom-Chemie' an der Westfälischen Wilhelms Universität Münster
7.2.1997: Diplom-Chemiker-Vorprüfung (Gesamtnote: gut)
10.3.-15.7.1998: Auslandssemester an der Heriot Watt University, Edinburgh, Schottland, in der Arbeitsgruppe von Prof. A.J. Welch (Forschungsbericht und Beteiligung an einer Publikation: *Journal of Organometallic Chemistry* (1999) **575**, 57-62).
4.2.1999: mündliche Diplomprüfungen
1.4.-23.12.1999: Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Krebs (Institut für anorganische Chemie) in Kooperation mit dem Institut für Biochemie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. F. Spener) mit dem Titel 'Untersuchungen zur heterologen Expression des Uteroferrins und des Uteroferrin-assoziierten Proteins in *Escherichia Coli*'; Beteiligung an einer Publikation: *Arch. Biochem. Biophys.* (2004) **432**, 25-36. Gesamtnote der Diplomprüfung: gut.
ab 4.2000: Promotion an der Universität zu Köln.
Praktische Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Scheffner (Institut für Biochemie, Medizinische Fakultät). Betreuung der Promotion durch Prof. Dr. R. J. Dohmen (Institut für Genetik, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät). Thema der Doktorarbeit: 'Das E6-Onkoprotein humaner Papillomviren und seine Wechselwirkung mit E6AP als Zielstruktur für eine molekulare Therapie zervikaler Karzinome'.