

# **Regulation der HPV16-Genexpression durch E2, E6 und zelluläre Faktoren**

**Inaugural-Dissertation**

zur

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

vorgelegt von

Ulla Krüppel  
aus Heinsberg

2007

|                      |   |
|----------------------|---|
| Berichterstatter:    | Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister<br>Prof. Dr. Jürgen Dohmen |
| Vorsitzender:        | Prof. Dr. Helmut W. Klein                                     |
| Beisitzer:           | Dr. Matthias Cramer   |
| Tag der Disputation: | 11. Februar. 2008   |

## Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Papillomviren   | 1         |
| 1.2      | Genomaufbau von PV  | 2         |
| 1.3      | Lebenszyklus von PV   | 3         |
| 1.4      | Funktionen des viralen E2-Proteins                                | 5         |
| 1.5      | Die Onkoproteine E6 und E7  | 6         |
| 1.6      | Die Regulation der viralen Transkription durch zelluläre Faktoren | 8         |
| 1.7      | Die Rolle des E2-Proteins bei der Transkription                   | 9         |
| 1.8      | Der zelluläre Ko-Aktivator p300                                   | 10        |
| 1.9      | Die zellulären Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie           | 13        |
| 1.10     | Zielsetzung der Arbeit  | 15        |
| <b>2</b> | <b>Material</b>   | <b>16</b> |
| 2.1      | Bakterienstämme   | 16        |
| 2.2      | Eukaryotische Zellen  | 16        |
| 2.3      | Nukleinsäuren   | 17        |
| 2.3.1    | Synthetisch hergestellte Oligonukleotide                          | 17        |
| 2.3.2    | Prokaryote Expressionsvektoren                                    | 18        |
| 2.3.3    | Eukaryote Expressionsvektoren                                     | 18        |
| 2.3.4    | Reporterplasmide  | 19        |
| 2.3.5    | Rekombinante Plasmide   | 20        |
| 2.3.6    | DNA Längenstandards   | 21        |
| 2.3.7    | Sonstige Nukleinsäuren  | 21        |
| 2.4      | Radioaktivität  | 21        |
| 2.5      | Proteine  | 22        |
| 2.5.1    | Enzyme  | 22        |
| 2.5.2    | Größenstandards   | 22        |
| 2.5.3    | Antikörper  | 22        |
| 2.5.4    | Proteine für EMSA-Experimente                                     | 23        |
| 2.6      | Präzipitations-Reagenzien   | 23        |
| 2.7      | Inhibitoren   | 24        |
| 2.8      | Reagenziensysteme (Kits)  | 24        |
| 2.9      | Puffer und Lösungen   | 25        |
| 2.10     | Sonstige Chemikalien und Materialien                              | 30        |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>3</b> | <b>Methoden .....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1      | Bakterienkultur.....  | 32        |
| 3.1.1    | Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation .....          | 32        |
| 3.1.2    | Transformation kompetenter Bakterien.....                               | 32        |
| 3.1.3    | Langzeitlagerung von Bakterien .....                                    | 32        |
| 3.2      | DNA-Methoden.....   | 33        |
| 3.2.1    | Plasmidisolierung aus Bakterien.....                                    | 33        |
| 3.2.2    | Plasmidpräparationen .....  | 33        |
| 3.2.3    | DNA-Standardmethoden .....  | 33        |
| 3.2.4    | DNA-Sequenzierung .....   | 34        |
| 3.2.5    | Polymerase-Kettenreaktion .....   | 34        |
| 3.2.6    | “Touchdown”-PCR.....  | 35        |
| 3.2.7    | Echtzeit-PCR.....   | 35        |
| 3.2.8    | <i>In vitro</i> -Mutagenese.....  | 37        |
| 3.3      | Zellkulturmethoden .....  | 37        |
| 3.3.1    | Kultivierung von RTS3b, HeLa, SiHa, Caski, PT67 und C33a-Zellen .....   | 38        |
| 3.3.2    | Kultivierung von NHEK.....  | 38        |
| 3.3.3    | Einfrieren und Lagerung von Zellen.....                                 | 38        |
| 3.3.4    | Zellzahlbestimmung .....  | 38        |
| 3.3.5    | Transfektion eukaryoter Zellen .....                                    | 39        |
| 3.3.5.1  | Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation .....               | 39        |
| 3.3.5.2  | Transfektion mittels "FuGENE 6" .....                                   | 39        |
| 3.3.6    | Ernte der transfizierten Zellen mittels chemischen Zellaufschluss ..... | 39        |
| 3.3.7    | Luciferase-Test .....   | 40        |
| 3.3.8    | Erzeugung von Zellextrakten.....  | 40        |
| 3.3.8.1  | Herstellung von Kernextrakten aus eukaryoten Zellen .....               | 40        |
| 3.3.8.2  | Herstellung von Ganzzellextrakten aus eukaryoten Zellen.....            | 40        |
| 3.3.9    | Retrovirale Infektion .....   | 41        |
| 3.3.9.1  | Herstellung rekombinanter Retroviren .....                              | 41        |
| 3.3.9.2  | Infektion von HeLa-Zellen mit Retroviren .....                          | 41        |
| 3.4      | Proteinmethoden .....   | 42        |
| 3.4.1    | Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....                              | 42        |
| 3.4.2    | <i>In vitro</i> -Translation.....                                       | 42        |
| 3.4.3    | Degradations-Assay.....   | 43        |
| 3.4.4    | Protein-Protein-Interaktionsstudien .....                               | 43        |
| 3.4.5    | Ko-Immünpräzipitationen.....  | 43        |
| 3.4.6    | Elektrophorese von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAG) .....    | 44        |

## Inhaltsverzeichnis

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.4.7    | Western Blot.....  | 44        |
| 3.4.8    | Quantitative Proteinbestimmung.....  | 45        |
| 3.5      | Protein-DNA-Interaktionsstudien .....  | 45        |
| 3.5.1    | Chromatin-Immunopräzipitations Assay (ChIP) .....  | 45        |
| 3.5.2    | Gelretardierungsanalysen „EMSA“ .....  | 46        |
| 3.6      | Radioaktive Markierung von DNA.....  | 46        |
| 3.7      | RNA-Methoden.....  | 47        |
| 3.7.1    | RNA Isolierung aus eukaryoten Zellen .....   | 47        |
| 3.7.2    | Reverse Transkription .....  | 47        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>48</b> |
| 4.1      | Der Sequenzabschnitt bis Nt. 523 ist notwendig für die kooperative .....   |           |
|          | Aktivierung des P <sub>97</sub> durch E2 und p300.....   | 49        |
| 4.2      | C/EBP $\alpha$ ist ein kompetenterer Transkriptionsaktivator als C/EBP $\beta$ .....   | 51        |
| 4.3      | C/EBP $\alpha$ und $\beta$ binden an die BS 469 .....  | 52        |
| 4.4      | Mutation der C/EBP-BS 469.....   | 54        |
| 4.4.1    | Die Mutation der BS 469 führt zur Reduktion der C/EBP $\alpha$ induzierten<br>Aktivierung des P <sub>97</sub> und zur Aktivierung eines weiteren Promotors ..... | 55        |
| 4.4.2    | Die Basalaktivitäten der verschiedenen Reporterkonstrukte wurden durch ....<br>die Mutation der BS 469 entscheidend beeinflusst .....                            | 57        |
| 4.5      | C/EBP $\alpha$ wird in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Caski exprimiert .  | 57        |
| 4.6      | C/EBP $\alpha$ bindet die BS 469 <i>in vivo</i> .....  | 59        |
| 4.7      | Die BS 469 ist notwendig für die koop. Aktivierung durch E2 u. p300.....   | 61        |
| 4.8      | C/EBP $\alpha$ und p300 kooperieren bei der Aktivierung der HPV16-.....<br>Genexpression .....   | 62        |
| 4.9      | Die Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) von p300 .....  | 63        |
| 4.9.1    | Die HAT von p300 ist essentiell für die Kooperativität mit C/EBP $\alpha$ .....  | 63        |
| 4.9.2    | Die HAT-Aktivität von p300 spielt keine Rolle bei der Kooperation mit 16E2..   | 65        |
| 4.10     | Die Rolle von E6 bei der Regulation der HPV16-Genexpression .....  | 65        |
| 4.10.1   | 16E6 hemmt die Kooperativität von p300 und C/EBP $\alpha$ .....  | 65        |
| 4.10.2   | 8E6 stimuliert die Kooperation von p300 und C/EBP $\alpha$ .....   | 67        |
| 4.11     | Expression von p300.....   | 67        |
| 4.11.1   | Die Expression von p300 in der Zervixschleimhaut .....   | 67        |
| 4.11.2   | p300 wird in HPV-positiven Zervixkarzinom-assoziierten Zelllinien stärker<br>exprimiert als in primären Keratinozyten .....                                      | 68        |
| 4.12     | Die E6-Proteine von HPV16 und 8 modulieren auf unterschiedliche<br>Weise die durch C/EBP-Faktoren induzierte Phosphorylierung von                                |           |

## Inhaltsverzeichnis

---

|  |            |
|--|------------|
| p300 .....   | 71         |
| 4.12.1    16E6 vermittelte Reduktion der Menge an phosphoryliertem p300 ist .....      |            |
| abhängig von einer durch Staurosporine inhibierbaren Kinase und einem                  |            |
| Faktor, der proteasomal abgebaut wird .....  | 74         |
| 4.12.2    16E6 führt nicht zur Degradation von p300 .....                              | 76         |
| 4.12.3    16E6 beeinflusst nicht die Menge an C/EBP $\alpha$ .....                     | 77         |
| 4.13    An der Repression der Transkription beteiligte Domänen von 16E6 .....          | 78         |
| 4.13.1    Einfluss verschiedener 16E6-Mutanten auf die Phosphorylierung von p300..     | 81         |
| 4.14    Der C-Terminus von 16E6 bindet <i>in vitro</i> an C/EBP $\alpha$ .....         | 82         |
| 4.14.1    GST-16E6-C präzipitiert in C33a-Zellen überexprimiertes C/EBP $\alpha$ ..... | 83         |
| 4.15    16E6 reprimiert seine eigene Expression .....                                  | 84         |
| 4.15.1    16E6 reprimiert seine eigene Expression auf Ebene der Transkription.....     | 84         |
| 4.15.2    16E6 ist in der Nähe des P <sub>97</sub> nachweisbar .....                   | 86         |
| 4.15.3    Die Überexpression von 16E6 führte in den HPV18-positiven                    |            |
| HeLa-Zellen zu keiner verminderten Expression von 18E6 und E7 .....                    | 87         |
| 4.15.4    Eine Reduzierung der Menge an 16E6 beeinflusst nicht die Expression von      |            |
| 16E7 in SiHa-Zellen .....  | 89         |
| <b>5    Diskussion .....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>6    Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>97</b>  |
| <b>7    Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>110</b> |
| <b>8    Zusammenfassung.....</b>   | <b>112</b> |
| <b>9    Abstract.....</b>  | <b>113</b> |
| <b>10   Danksagung.....</b>  | <b>114</b> |
| <b>11   Erklärung.....</b>   | <b>115</b> |
| <b>12   Lebenslauf .....</b>   | <b>116</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Papillomviren

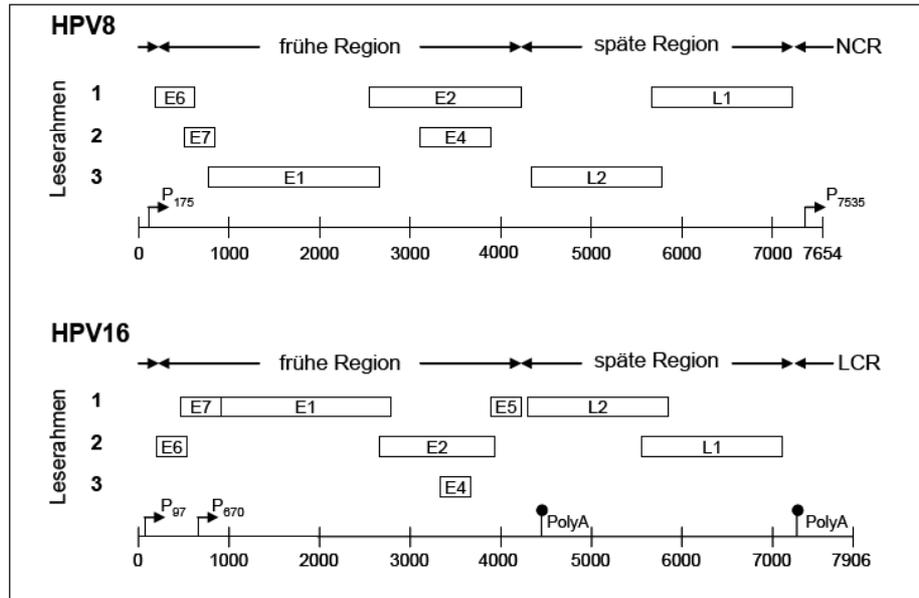
Papillomviren (PV) sind kleine ( $\varnothing$  55nm), nicht umhüllte DNA-Tumorviren und bilden die eigene Familie der *Papillomaviridae*. Sie zeigen eine hohe Gewebespezifität und infizieren das mehrschichtige Epithel der Haut oder der Schleimhaut vieler Säugetierarten, einschließlich des Menschen (Pfister, H., 1984). Sie sind die häufigsten sexuell übertragenen viralen Infektionserreger (Garland, S. M., 2002). Eine Infektion mit PV bleibt meist klinisch inapparent, es kann jedoch auch zur Ausbildung von benignen Tumoren wie Warzen, Kondylomen oder Papillomen kommen. Diese weisen ein begrenztes Wachstum auf und können sich, vermutlich im Zuge zellvermittelter Immunantwort, spontan wieder zurück bilden (Shah, K. & P.M. Howley, 1996).

Humane PV (HPV) sind strikt epitheliotrop und man gliedert sie in kutane und mukosale, bzw. genitale HPV-Typen, die wiederum aufgrund ihres onkogenen Potentials in Niedrigrisiko- und Hochrisiko-Typen unterteilt werden. In gutartigen Läsionen lässt sich die DNA der Niedrigrisiko-Typen, wie z.B. HPV1 oder 2 als Vertreter der kutanen HPVs oder die genitalen HPV-Typen 6 oder 11 nachweisen (zur Hausen, H., 2000). Die Infektion mit den Hochrisiko-HPV-Typen kann nach längerer Persistenz zur malignen Entartung der Tumoren führen. Besonders prädisponiert für diese Entwicklung sind die HPV-assoziierten Zervixdysplasien. Unterteilt werden sie je nach Anteil der abnormen Zellen im Epithel in die Schweregrade CIN 1-3 (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*). In 10-30% der Fälle kann sich aus diesen Vorläuferzellen ein invasives Zervixkarzinom entwickeln, das weltweit die zweithäufigste Krebserkrankung der Frau ist (Einstein, M.H. & G.L. Goldberg, 2002). In 99% aller Zervixkarzinome konnte HPV-DNA nachgewiesen werden (Walboomers, J. M. et al., 1999), so dass HPV seit 1995 von der WHO (*World Health Organization*) als notwendiger auslösender Faktor für Gebärmutterhalskrebs angesehen wird. Dabei wurde hauptsächlich (46-68%) HPV16-DNA isoliert und aus 10-14% der Karzinome HPV18-DNA. HPV45 und HPV31 wurden nur zu je 2-8% detektiert (Munoz, N., 2000; Clifford, G. M. et al., 2003). Seit Oktober 2006 steht ein Impfstoff zur Verfügung, der vor einer Infektion mit HPV16, 18 sowie HPV6 und 11 schützt (Lowy, D. R. & J. T. Schiller, 2006).

Die kutanen Hochrisiko-Typen HPV5 und HPV8 sind mit der seltenen, autosomal rezessiv vererbten Erkrankung *Epidermodysplasia verruciformis* (Ev) assoziiert, die sich durch am ganzen Körper auftretende makulöse Hautläsionen und flache Warzen auszeichnet. In 30-60% der Fälle können diese Läsionen nach langer Persistenz (10-30 Jahre), meist an Sonnenlicht exponierten Stellen, maligne zu Plattenepithelkarzinomen entarten (Pfister, H., 1992; Fuchs, P.G. & H. Pfister, 1996).

### 1.2 Genomaufbau von PV

Die doppelsträngige, zirkulär geschlossene DNA von PV liegt mit zellulären Histon-Proteinen assoziiert, in einer Nukleosomen-ähnlichen Struktur vor (Favre, M. et al., 1977). Das 7200-8000 bp große Genom wird in einen kodierenden und einen ca. 500-1000 bp großen, nicht kodierenden Bereich (Long Control Region (LCR) oder Non Coding Region (NCR)) unterteilt (Pfister, H. & P. G. Fuchs, 1994), der *cis*-wirksame Kontrollelemente wie Promotoren, Enhancer und den Replikationsursprung (*ori*) enthält (Ustav, M. et al., 1991; Fuchs, P. G. & H. Pfister, 1994; O'Connor, M. & H. U. Bernard, 1995). Alle offenen Leserahmen (ORF) sind, teils überlappend, auf einem DNA-Strang kodiert. Die Anordnung der ORF ist unter PV stark konserviert (Pfister, H. & P.G. Fuchs, 1987). Die Abbildung 1 zeigt die Genomorganisation von HPV8 und HPV16 im direkten Vergleich. Der kodierende Bereich umfasst mindestens sieben ORF, die abhängig von ihrer Expression im Lebenszyklus von PV in frühe (*early*, *E*) und späte (*late*, *L*) Gene unterteilt werden. Die früh gebildeten Proteine, wie E1 und E2, übernehmen hauptsächlich regulatorische Funktionen innerhalb des PV-Lebenszyklus. Die Gene werden, wie auch die Onkogene E6 und E7, in der Regel vom frühen Promotor aus transkribiert (Pfister, H. & P. G. Fuchs, 1994). Auf die Funktionen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten viralen Proteine E2 und E6 wird später detailliert eingegangen. Der späte Promotor steuert die Expression der beiden Strukturgene L1 und L2, sowie die von E1 und E2 (Stubenrauch, F. & L. A. Laimins, 1999). Da bei der Transkription meist eine polycistronische mRNA gebildet wird, können neben den vollständigen Proteinen durch alternatives Spleißen auch Fusionsproteine oder verkürzte Formen entstehen (Baker, C.C., 1993). Ein solches alternatives Spleißprodukt ist das E1<sup>E4</sup>-Transkript. Das E4-Protein ist vermutlich an der Freisetzung der infektiösen Viren beteiligt (Doorbar, J. et al., 1991).

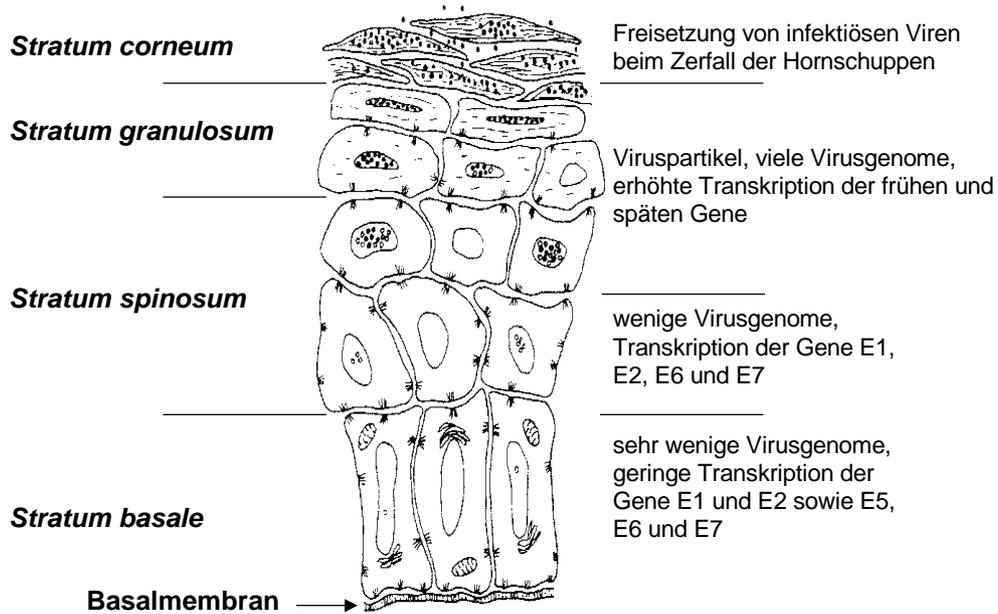


**Abb. 1: Genomorganisation von HPV8 und HPV16**

Das zirkuläre Genom von HPV8 und 16, das hier geöffnet dargestellt ist, unterteilt sich in die frühe, späte und nicht-kodierende Region (NCR/LCR). Die Lage der ORFs in den drei Leserastern, die Polyadenylierungssignale sowie die beiden Hauptpromotoren sind eingezeichnet (modifiziert nach: Baker and Calef, 1995 und 1996).

## 1.3 Lebenszyklus von PV

Der produktive Lebenszyklus von PV ist abhängig vom Differenzierungsgrad der epidermalen Zellen (s. Abb. 2). PV infizieren die noch undifferenzierten Basalzellen des Haut- bzw. Schleimhautepithels, die sie über Mikroverletzungen erreichen. Als mögliche Rezeptoren für die Adsorption des Virus an die Zielzelle gelten sowohl das Polysaccharid Heparansulfat als auch der Zelloberflächen-Rezeptor  $\alpha$ -6-Integrin (Evander, M. et al., 1997; Selinka, H. C. et al., 2002; Shafti-Keramat, S. et al., 2003). Nach Aufnahme des Virus über Endozytose und Transport in den Zellkern, liegt das Virusgenom in geringer Kopienzahl episomal vor. In dieser frühen Phase der Infektion kommt es zur Bildung der Proteine E1, E2, E5, E6 und E7. Im Zuge der Mitose der Basalzellen, wird auch die virale DNA, gekoppelt an das Wirtszellgenom, auf die Tochterzellen verteilt (Skiadopoulos, M. H. & A. A. McBride, 1998). Da die Virusreifung auf differenzierende Zellen beschränkt ist, werden die Zellen der Basalschicht nicht durch Virusproduktion geschädigt und proliferieren weiter. Auf diese Weise können infizierte Zellen mehrere Jahre in der Basalschicht persistieren (Stubenrauch, F. & L. A. Laimins, 1999).



**Abb. 2: Lebenszyklus von PV innerhalb der Epidermis**

Die Namen der einzelnen Zellschichten sind auf der linken Seite vermerkt. Rechts ist die Abhängigkeit der Virusreife vom Differenzierungsgrad der Epithelzellen dargestellt.

Die in den Zellen des *Stratum spinosum* beginnende Virusproduktion ist abhängig von differenziell im Epithel gebildeten Transkriptionsfaktoren (Longworth, M. S. & L. A. Laimins, 2004). Die Expression der regulatorischen Proteine nimmt zu und es beginnt die vegetative Replikation der viralen DNA. PV benötigen hierfür zelluläre Replikationsfaktoren, die in differenzierenden suprabasalen Zellen nicht mehr exprimiert werden. Aus diesem Grund wird der Zellzyklusblock, der die Keratinozyten in der G1-Phase arretiert, mit Hilfe der Onkoproteine E6 und E7 aufgehoben und die Zellen treten wieder in die S-Phase ein (Thomas, M. & L. Banks, 1998).

In den obersten Zellen des *Stratum spinosum* beginnt die Expression der späten Strukturproteine L1 und L2, die in den Zellen des *Stratum granulosum* noch verstärkt wird. In dieser Zellschicht nimmt die vegetative Replikation zu und reife Virionen werden vermehrt produziert. Die gereiften, infektiösen Viren werden mit dem Zerfall der Zellen des *Stratum corneum* freigesetzt (Doorbar, J., 1998).

Aufgrund einer verzögerten Differenzierung und verstärkter Proliferation der infizierten Keratinozyten kommt es im Zuge einer HPV-Infektion zur Ausbildung von Warzen, Papillomen und Kondylomen. In diesen gutartigen Tumoren sind alle Differenzierungsgrade vorhanden. In den Karzinomen hingegen wird eine Dedifferenzierung beobachtet. Bedingt durch den Verlust von negativen Transkriptions-Kontrollelementen ist die Expression der Onkogene E6 und E7 erhöht. Während in gutartigen Läsionen die HPV-DNA episomal

vorliegt, kann im Verlauf der Karzinogenese eine Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom auftreten (Arias-Pulido, H. et al., 2006). Diese Integration führt in der Regel zum Verlust des E2-ORF (Arias-Pulido, H. et al., 2006).

### 1.4 Funktionen des viralen E2-Proteins

**E2** ist ein 45-56 kDa großes, multifunktionales, nukleäres Phosphoprotein mit modularem Aufbau (Giri, I. & M. Yaniv, 1988). Es besitzt eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AD) und eine C-terminale Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne (DBD), mit der E2 spezifisch an die palindromische Konsensussequenz ACCG(N<sub>4</sub>)CGGT bindet (Androphy, E. J. et al., 1987). Obwohl die Anzahl der E2-Bindestellen (BS) innerhalb der LCR/NCR stark variiert, ist diese Erkennungssequenz unter den E2-Proteinen verschiedener PV-Typen hoch konserviert (Steger, G. et al., 1996). Die AD und die DBD der verschiedenen E2-Proteine weisen bis zu 35% Homologie auf (Mc Bride, A.A. & G. Meyers, 1996) und werden durch eine weniger konservierte und in ihrer Größe sehr variierende, flexible Linkerregion (*Hinge*) miteinander verbunden, die Kernlokalisierungssignale enthält (Androphy, E. J. et al., 1987; Giri, I. & M. Yaniv, 1988; Zou, N. et al., 2000; Hadaschik, D. et al., 2003). Bei Ev-assoziierten HPV ist die *Hinge*-Region auffallend groß und ist an der Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren, sowie vermutlich an Spleißprozessen beteiligt (Lai, M. C. et al., 1999; Steger, G. et al., 2002).

Neben seinen zahlreichen Aufgaben bei der Transkription, die unter 1.6 beschrieben werden, erfüllt E2 weitere Funktionen im viralen Lebenszyklus. E2 vermittelt die Bindung von E1 an den ori und leitet somit eine effiziente Replikation ein. Zusätzlich rekrutiert es rpA (*replication protein A*), das die DNA-Einzelstränge der Replikationsgabel bindet, um sie vor dem Abbau durch DNasen zu schützen (Mohr, I. J. et al., 1990). Wie bereits erwähnt, wird die virale DNA im Zuge der Mitose gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Für BPV1 konnte gezeigt werden, dass E2 über Bindung seiner AD an die Chromosomen und die gleichzeitige Bindung an seine Bindestellen innerhalb der LCR, das Virusgenom an die Wirts-DNA koppeln kann (Skiadopoulos, M. H. & A. A. McBride, 1998). Darüber hinaus ist E2 an der Verpackung der Virus-DNA in Kapside beteiligt (Day, P. M. et al., 1998).

In HPV-positiven, von Zervixkarzinomen abstammenden Zelllinien (SiHa, HeLa und Caski) ist E2 in der Lage, das Zellwachstum in der G1 Phase zu blockieren sowie Seneszenz und Apoptose über p53 und Caspase 8-Wege auszulösen. Dies erfolgt zum Teil über E2 vermittelte Repression der Expression von E6 und E7. Somit könnte E2 der von E6 und E7 gestörten Zellzykluskontrolle in den oberen Epithelschichten entgegen wirken. Der hierfür zu Grunde liegende Mechanismus ist noch ungeklärt (Dowhanick, J. J. et al., 1995; Desaintes,

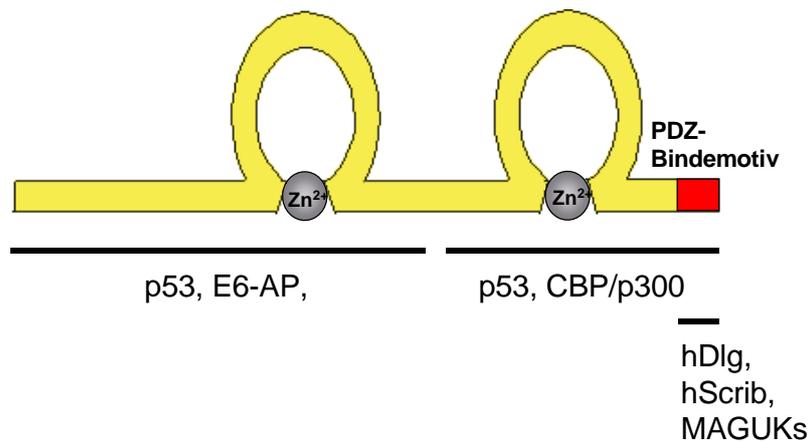
C. et al., 1997; Desaintes, C. et al., 1999; Webster, K. et al., 2000; Wells, S. I. et al., 2000; Demeret, C. et al., 2003). Im Gegensatz zu den E2-Proteinen von Hochrisiko-Typen konnte für HPV8 E2 gezeigt werden, dass es zelltransformierendes Potential besitzt (Iftner, T. et al., 1989).

### 1.5 Die Onkoproteine E6 und E7

**E7** ist ein aus ca. 100 Aa. bestehendes Zinkfingerprotein, das hauptsächlich für das transformierende Potential von PV, die die genitale Haut infizieren, verantwortlich ist. Das E7-Protein von Hochrisiko-HPV-Typen interagiert mit den Mitgliedern der *Retinoblastoma* (pRb) Tumorsuppressor Familie Rb105, Rb107 und Rb130 (Dyson, N. et al., 1989), die daraufhin dem Ubiquitin-abhängigen Abbau zugeführt werden (Gonzalez, S. L. et al., 2001). Dies hat die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F zur Folge, das im Komplex mit hypophosphoryliertem pRb inaktiv ist. Freies E2F aktiviert die Expression von wichtigen Proteinen für die DNA-Synthese sowie von Zellzyklusregulatoren, die den G<sub>1</sub>/S-Übergang steuern (Dyson, N. et al., 1989). Des Weiteren bindet E7 an die Zyklin-abhängigen Kinase-(CDK)-Inhibitoren p21<sup>CIP1</sup> und p27<sup>KIP1</sup> und inaktiviert sie (zusammengefasst in Münger, K. et al., 2001). Diese beiden Wege führen zum Eintritt der Zelle in die S-Phase und zu unregelmäßiger Zellteilung. So werden optimale Bedingungen für die vegetative Replikation der viralen DNA geschaffen.

Das **E6**-Protein von PV ist ein 18 kDa großes Phosphoprotein, das im Nukleus, sowie in nicht nukleären Membranen lokalisiert ist (Grossman, S. R. et al., 1989; Gao, Q. et al., 2000). Wie in der Abb. 3 dargestellt, kann E6 zwei (jeweils 29-30 Aa.) Zinkfinger bilden, die sowohl für die Proteinstabilität als auch für die Aktivität des E6-Proteins von entscheidender Bedeutung sind (Smola-Hess, S. & H. Pfister, 2002). Um primäre Zellen zu immortalisieren, muss E6 mit E7 kooperieren.

Die E6 Proteine von genitalen Hochrisiko-HPV-Typen besitzen am C-terminalen Ende ein sogenanntes PDZ-Bindemotiv, mit der Konsensussequenz X-S/T-X-V/L. Über dieses Motiv interagieren sie mit PDZ-Domänen-Proteinen, wie z.B. hDlg, MAGUKs und hScrib und führen diese zum Teil in die Ubiquitin-abhängige Proteolyse (Kiyono, T. et al., 1997; Gardiol, D. et al., 1999; Nakagawa, S. & J. M. Huibregtse, 2000; Thomas, M. et al., 2002).



### Abb. 3: Schematische Darstellung von E6

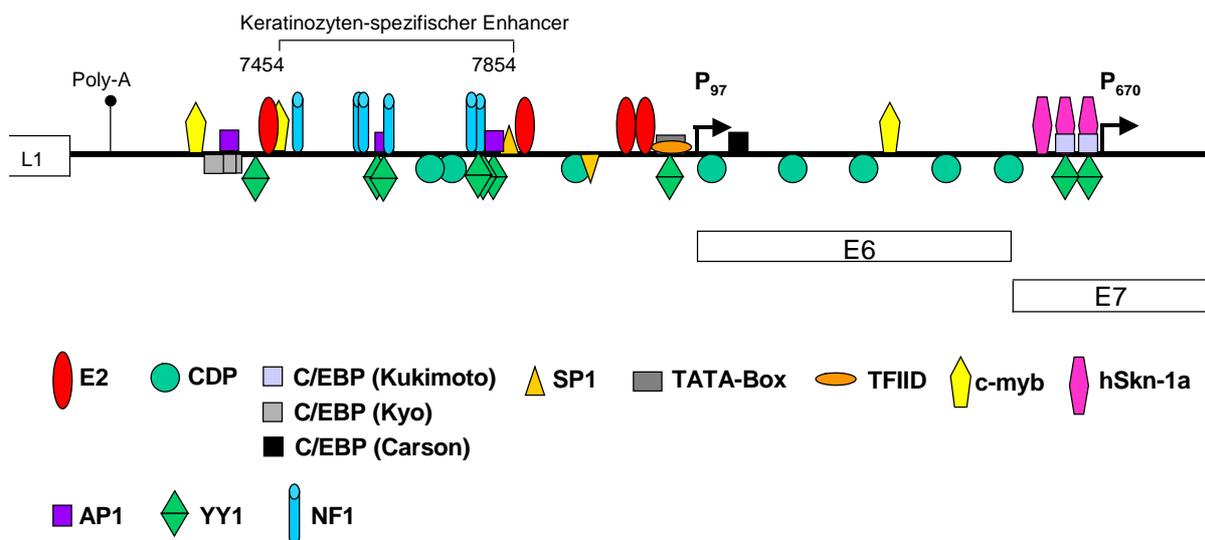
Dargestellt ist das E6-Protein mit seinen Zinkfingern und dem nur bei genitalen Hochrisiko-HPV-Typen konservierten PDZ-Bindemotiv. Die Bindedomänen verschiedener Interaktionspartner von 16/18E6 sind eingezeichnet (verändert nach Smola-Hess & Pfister, 2002)

Die E6-Proteine wirken einer vorzeitigen Apoptose der durch das E7-Protein in die S-Phase gebrachten Zellen entgegen. E6 der genitalen Hochrisiko-Typen bindet im Komplex mit E6-AP (E6 associated protein), einer Ubiquitin-Ligase, an p53. Daraufhin folgt die Ubiquitinierung von p53 und dessen Abbau durch das Proteasom (Scheffner, M. et al., 1990; Scheffner, M. et al., 1994). Die Bindung an PDZ-Domänen Proteine und p53 sind an der E6 vermittelten Transformation beteiligt. Während die Degradation von p53 zur Tumorprogression bis hin zur malignen Entartung beiträgt, ist die Interaktion mit zellulären PDZ-Domänen-Proteinen, die in einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert sind, zur Ausbildung von Papillomen notwendig (Simonson, S.J.S. et al., 2005). Mukosale Niedrigrisiko-E6-Proteine binden mit geringerer Affinität an p53 und können dieses nicht degradieren. E6 des Ev-assoziierten HPV8 besitzt ebenfalls onkogenes Potential, interagiert aber nicht mit p53 (Steger, G. & H. Pfister, 1992; Elbel, M. et al., 1997). Auf welche Weise die E6-Proteine Ev-assoziiierter HPV Zellen transformieren ist noch nicht bekannt. HPV16E6 hat einen weiteren Weg gefunden, um die Aktivität von p53 zu beeinflussen. Nach Bindung von E6 an den zellulären Ko-Aktivator p300/CBP kann p53 seine Zielgene nicht mehr aktivieren (Zimmermann, H. et al., 1999). Dieser Effekt ist aber nicht auf den Transkriptionsfaktor p53 beschränkt, sondern lässt sich auch bei anderen Aktivatoren, die p300/CBP als Ko-Aktivator nutzen, beobachten. Zum Beispiel hemmt E6 durch die Interaktion mit p300/CBP die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) und Mitgliedern der AP-1-Familie (*activator protein-1*) (Patel, D. et al., 1999; Huang, S. M. & D. J. McCance, 2002).

## 1.6 Die Regulation der viralen Transkription durch zelluläre Faktoren

Zwischen dem L1 und dem E6-ORF befindet sich der nicht kodierende Bereich, der cis-wirksame Kontrollelemente für die komplexe virale Transkription und Replikation enthält. Eng verwandte PV-Typen zeigen einen hoch konservierten Aufbau dieser Kontrollregion (Fuchs, P. G. et al., 1993). Am 3'-Ende der LCR, unmittelbar vor dem E6-Leserahmen befindet sich bei allen PV der frühe Promotor. Die Lage des späten Promotors ist hingegen nicht konserviert. Als Beispiel sind in der Abb. 4 die LCR und die anschließenden ORFs von HPV 16 mit dem frühen Promotor an Position 97 ( $P_{97}$ ) und dem späten Promotor an Position 670 ( $P_{670}$ ) schematisch dargestellt. Beide werden sowohl von viralen als auch von zellulären Faktoren reguliert, die an zahlreiche Erkennungssequenzen innerhalb der LCR binden. So sind z.B. Sp1 (Gloss, B. & H. U. Bernard, 1990), NF1 (Gloss, B. et al., 1989) und AP1 (Chan, W. K. et al., 1990) in der Lage, die  $P_{97}$ -Aktivität zu steigern, während Yin-Yang-1 (YY1) (Dong, X. P. et al., 1994; May, M. et al., 1994) die Promotoraktivität verringert. Das CCAAT/*Enhancer-binding protein*  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ), das unter 1.8 näher beschrieben wird, zeigt abhängig von der jeweiligen Isoform sowohl aktivierenden als auch reprimierenden Einfluss auf den  $P_{97}$  (Kyo, S. et al., 1993; Struyk, L. et al., 2000).

Des Weiteren wirkt die Ausbildung von Nukleosomen hemmend auf die Aktivität des frühen Promotors. Durch Bindung von CDP (CCAAT *displacement protein*) an seine BS, das eine Deacetylierung der Histone bewirkt, wird diese Repression noch verstärkt, die auch die Replikation betrifft (O'Connor, M. J. et al., 2000).



**Abb. 4: Ausschnitt des HPV16-Genoms**

Diese schematische Darstellung der LCR ist bis zum E7-Leserahmen erweitert. Diese Genomregion enthält neben den vier E2- BS auch DNA-BS zellulärer Proteine, sowie zwei Promotoren, das PolyA-Signal der späten Transkripte und das Keratinozyten-spezifische Verstärker Element (Enhancer). Am unteren Bildrand befindet sich die Legende der einzelnen Protein-Symbole.

Die Kontrollelemente der Transkription sind nicht auf die LCR beschränkt. Im Fall von HPV16 befinden sich sowohl im E6- als auch im E7-ORF weitere Promotoren (Braunstein, T. H. et al., 1999; Glahder, J. A. et al., 2003; Rosenstierne, M. W. et al., 2003). Im E7-Leserahmen an Position 670 liegt der späte Promotor von HPV16 (Grassmann, K. et al., 1996), der keine TATA-Box besitzt. Im Gegensatz zum frühen Promotor ist der späte Promotor nur in differenzierenden Zellen aktiv (Higgins, G. D. et al., 1992). Es wird vermutet, dass er in nicht differenzierten Zellen durch die Bindung von YY1 an eine stromaufwärts des späten Promotors gelegene BS reprimiert ist. hSkN-1a, ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression in differenzierten Zellen zunimmt, konkurriert mit YY1 um die Bindung an überlappende Erkennungssequenzen. Bei Zunahme der Differenzierung ist hSkN-1a in der Lage, YY1 vom Promotor zu verdrängen. Dies könnte zur Aufhebung der Promotorrepression beitragen (Kukimoto, I. & T. Kanda, 2001). Bindung von C/EBP $\beta$  an seine, ebenfalls mit den von hSkN-1a überlappenden BS, führt auch zur Aktivierung des späten Promotors (Kukimoto, I. et al., 2006).

Kyo *et al.* ermittelten mittels *Footprint*-Analysen im Bereich von Nt. 7003-7766 von HPV16 zahlreiche potentielle BS für C/EBP $\beta$ , die teilweise mit den Erkennungssequenzen für die Transkriptionsaktivatoren NF-1 und AP-1 überlappen. Funktionelle Analysen deuteten darauf hin, dass C/EBP $\beta$  diese Faktoren von ihren Bindestellen verdrängt und somit zur Hemmung der frühen Genexpression von HPV16 führt (Kyo, S. et al., 1993).

### 1.7 Die Rolle des E2-Proteins bei der Transkription

E2 kann über sequenzspezifische DNA-Bindung die virale Transkription sowohl aktivieren als auch reprimieren. Dabei ist die Lage der BS innerhalb der LCR für den jeweiligen Effekt verantwortlich. In der Regel werden Aktivierung vermittelnde BS mit hoher Affinität gebunden, während Repression vermittelnde BS niedrige Affinität aufweisen. So ist eine Dosis-abhängige Regulation der HPV-Genexpression möglich (Steger, G. et al., 1993; Thierry, F., 1993; Steger, G. & S. Corbach, 1997).

Die Regulation der Genexpression genitaler HPV-Typen ist bereits gut untersucht. Innerhalb der LCR liegen vier E2-BS an konservierten Positionen. Die Promotor distale BS weist die höchste Affinität auf und vermittelt eine geringe Aktivierung des frühen Promotors (Steger, G. & S. Corbach, 1997; Demeret, C. et al., 1997).

Eine Interaktion von E2 über seine N-terminale AD mit zellulären Transkriptionsfaktoren wie TFIIIB, TBP, Brd4 und p300/CBP führt zu einer Aktivierung der Transkription (Rank, N. M. & P. F. Lambert, 1995; Steger, G. et al., 1996; Benson, J. D. et al., 1997; Yao, J. M. et al., 1998; Lee, D. et al., 2000; Müller, A. et al., 2002; Schweiger, M. R. et al., 2006).

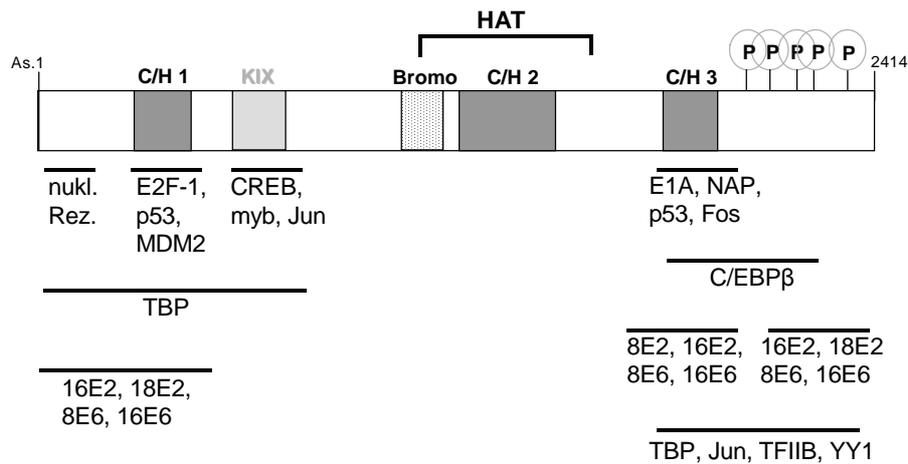
Die beiden niedrig affinen Promotor proximalen E2-BS vermitteln, aufgrund überlappender Erkennungssequenzen mit zellulären Transkriptionsaktivatoren, Repression. So liegen die BS für Sp1 und das *TATA-Box-binding-protein* (TBP) nur ein bzw. drei Nukleotide von den Konsensussequenzen für E2 entfernt. Bei Bindung von E2 kommt es zur Verdrängung dieser Faktoren und dadurch zu einer verminderten Transkription (Tan, S.H. et al., 1992; Demeret, C. et al., 1994; Dong, X. P. et al., 1994). Allerdings ist auch die AD von E2 für diese Repression nötig. Die Interaktion von E2 mit Brd4, vermittelt über seine AD, könnte hierbei eine Rolle spielen (Abbate, E. A. et al., 2006). Dies konnte allerdings in einer anderen Studie nicht bestätigt werden (Schweiger, M. R. et al., 2007). Eine effiziente Repression durch E2 konnte bislang nur in HPV-positiven von Zervixkarzinomen abstammenden Zellen beobachtet werden und nicht bei episomal vorliegendem Genom oder in transienten Transfektionen. Es wird vermutet, dass die Chromatinstruktur hierfür verantwortlich ist (Bechtold, V. et al., 2003).

E2 kann aber auch unabhängig von sequenzspezifischer DNA-Bindung Promotoren aktivieren. Hierbei wird E2 vermutlich durch Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren an den Promotor gebracht. Sp1 rekrutiert HPV8E2 an den Promotor von p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, der daraufhin aktiviert wird (Steger, G. et al., 2002). Über Interaktion mit C/EBP-Faktoren ist E2 ebenfalls in der Lage, ohne sequenzspezifische DNA-Bindung einen C/EBP abhängigen Promotor zu aktivieren (Hadaschik, D. et al., 2003).

### 1.8 Der zelluläre Ko-Aktivator p300

p300 und das homologe *CREB Binding Protein* (CBP) sind ubiquitär exprimierte, nukleäre Phosphoproteine mit einer Größe von 270 kDa (Abb. 5). Beide sind als Ko-Aktivatoren der Transkription an vielen physiologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Goodman, R. H. & S. Smolik, 2000).

p300 und CBP besitzen eine Region mit Acetyltransferase Aktivität und zahlreiche konservierte Domänen. Hierzu gehören die drei Cystein- und Histidin-reichen Regionen (C/H1, C/H2 und C/H3) sowie eine KIX-Domäne, die wichtige Funktionen bei Protein-Protein-Interaktionen ausüben. Diese Regionen werden von einer Vielzahl zellulärer und viraler Faktoren gebunden (Chan, H. M. & N. B. La Thangue, 2001). Wie der Abb. 5 zu entnehmen ist, besitzt p300 zusätzlich eine Bromodomäne, ein Proteinmotiv, das als Acetyl-Lysin-Bindedomäne fungiert und bei einer großen Anzahl von Acetyltransferasen konserviert ist (Zeng, L. & M. M. Zhou, 2002).



### Abb. 5: Schematische Darstellung von p300

Die Lage der Cystein/Histidin-reichen Regionen (C/H1-3), der KIX und der Bromodomäne sind eingezeichnet. In zentraler Position befindet sich die Region mit Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT). Am C-Terminus sind die fünf bekannten Phosphorylierungsstellen mit einem umkreisten P symbolisiert. Eine Auswahl zellulärer und viraler Faktoren, die mit p300 interagieren, sind inklusive der Lage ihrer Bindestellen eingezeichnet.

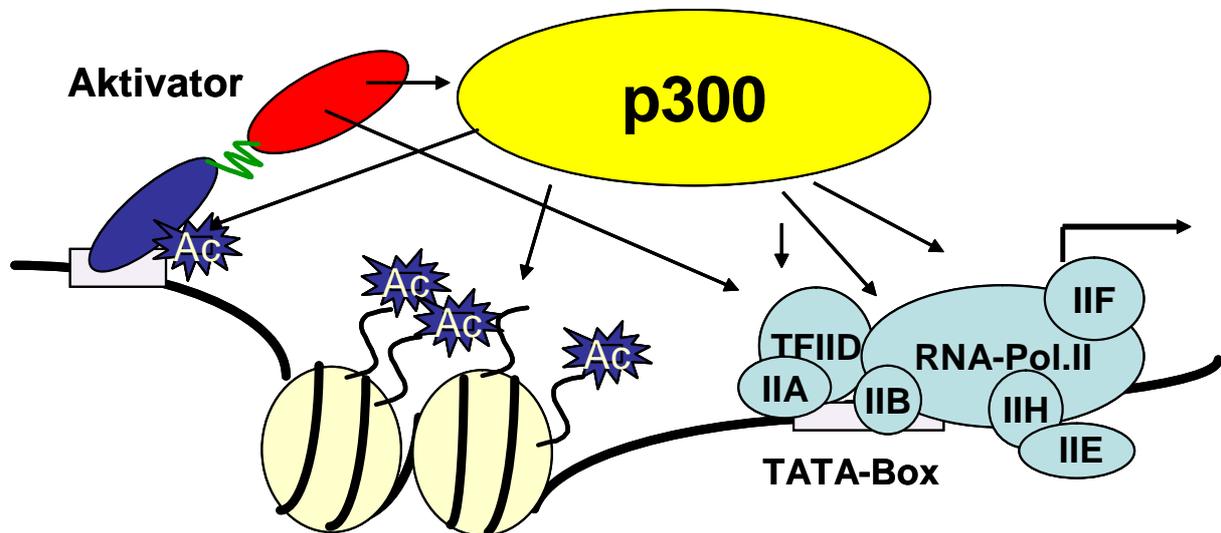
p300 kann auf verschiedenen Wegen zur Aktivierung der Transkription beitragen (zusammengefasst in Chan, H. M. & N. B. La Thangue, 2001), die in der Abb. 6 schematisch dargestellt sind.

Mit seiner intrinsischen Acetyltransferase (AT)-Aktivität ist p300 in der Lage, die  $\epsilon$ -Amino-Gruppe der Lysinreste von Histonen zu acetylieren (zusammengefasst in Brownell, J. E. & C. D. Allis, 1996). Der damit verbundene Verlust der positiven Ladung führt zu einem Affinitätsverlust der Histondenenden zur DNA. Daraufhin ist die DNA besser zugänglich für Transkriptionsfaktoren und die Transkription durch die RNA-Polymerase II wird erleichtert (Nightingale, K. P. et al., 1998). Hyperacetylierung der Histone könnte zusätzlich internukleosomale Interaktionen schwächen und somit geordnete Chromatinstrukturen destabilisieren (Tse, C. et al., 1998). Durch Bindung weiterer zellulärer Faktoren, wie z.B. p/CAF, SCR1 und ACTR besitzt p300 auch assoziierte HAT-Aktivität (Yao, T. P. et al., 1996; Chen et al., 1997).

Neben der Acetylierung der Histone, kann p300 auch Nicht-Histon-Proteine, wie z.B. p53 (Fu, M. et al., 2004), c-Myb (Tomita, A. et al., 2000), E2F-1 (Martinez-Balbas, M. A. et al., 2000) und C/EBP $\beta$  (Cesena, T. I. et al., 2007) acetylieren und deren Aktivität regulieren.

Über die Interaktion mit einer Vielzahl von DNA bindenden Transkriptionsfaktoren wird p300 an den Promotor rekrutiert. Die gleichzeitige Bindung an Komponenten des Präinitiationskomplexes (PIK), wie z.B. TBP und TFII $\beta$  (Goodman, R. H. & S. Smolik, 2000) könnte es p300 ermöglichen, ein Signal vom Aktivator zum PIK zu übertragen. Als

Gerüstfaktor erhöht p300 die relative Konzentration an Transkriptionsaktivatoren am Transkriptionsstart und erleichtert Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen. Auf diese Weise kann p300 zur Stabilisierung eines Multiproteinkomplexes beitragen (Barthel, R. et al., 2003).

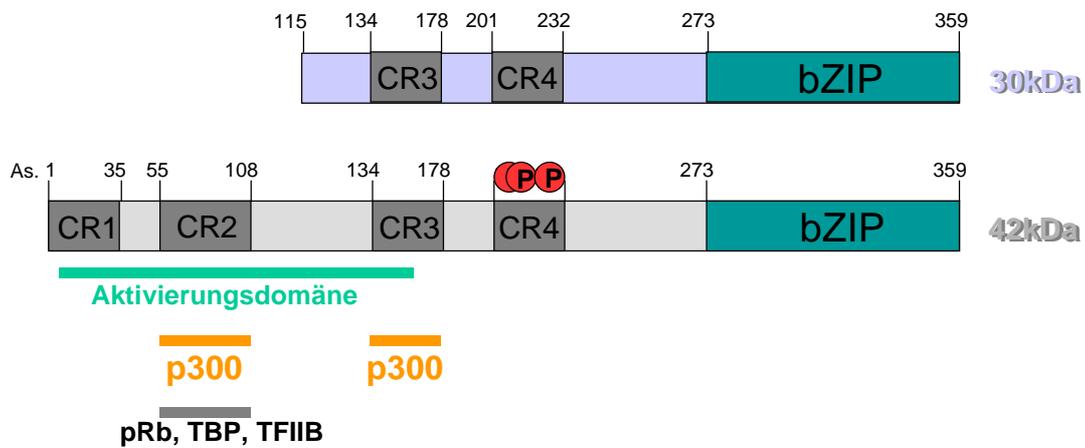


**Abb. 6: p300 als Ko-Aktivator der Transkription**

Schematische Darstellung verschiedener Wechselwirkungen von p300 mit anderen Transkriptionsfaktoren, die zur Aktivierung der Transkription beitragen können. Die Pfeile stellen Interaktionen dar.

Die Ko-Aktivatorfunktion von p300 wird auch über posttranslationale Modifikationen, wie Ubiquitinierung und Phosphorylierung reguliert. Die Mitglieder der C/EBP-Familie sind in der Lage, eine Phosphorylierung des C-Terminus von p300 zu induzieren. Dies führt neben einer erhöhten Aktivität von p300 auch zu einer Stabilitätssteigerung und benötigt die direkte Interaktion von C/EBP-Faktoren mit p300 und eine intakte DNA-Bindedomäne von C/EBP $\alpha$  und  $\beta$ . Die Phosphorylierung von p300 kann durch weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun, die an die C/H3-Domäne von p300 binden können, induziert werden (Schwartz, C. et al., 2003).

## 1.9 Die zellulären Transkriptionsfaktoren der C/EBP-Familie



**P** Phosphorylierte As. T222, T226 und S230 (Ross, S.E., 1999. Mol. Cell. Biol. 19(12):8433-41)

### Abb. 7: Schematische Darstellung von C/EBP $\alpha$

Es sind beide Formen von C/EBP $\alpha$ , die durch alternative Translationsstartpunkte entstehen, dargestellt. Zudem sind die unter C/EBP-Faktoren konservierten CR-Domänen und die Phosphorylierungsstellen innerhalb der CR4 im p42 eingezeichnet. Die Aktivierungsdomäne ist grün unterlegt. Die DNA-Bindedomäne und die Dimerisierungsdomäne ist als bZIP-Motiv zusammengefasst. Eine kleine Auswahl an zellulären Interaktionspartnern sind mit der Lage ihrer Bindedomänen eingezeichnet (modifiziert nach Erickson, R. L. et al., 2001).

Die CCAAT/*Enhancer-binding protein* (C/EBP)-Familie umfasst sechs Transkriptionsfaktoren mit einem basischen Leucin-Zipper (b-ZIP): C/EBP $\alpha$ - $\zeta$  (Cao, Z. et al., 1991), die chronologisch nach ihrer Entdeckung benannt wurden. Da in der vorliegenden Arbeit nur C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  verwendet wurden, werden diese beiden hier ausführlicher beschrieben.

C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau mit vier hoch konservierten Regionen (CR1-4, s. Abb. 7), einer N-terminalen Aktivierungsdomäne und dem C-terminalen b-ZIP-Motiv (Pei, D. Q. & C. H. Shih, 1991; Nerlov, C. & E. B. Ziff, 1994; Trautwein, C. et al., 1995; Williams, S. C. et al., 1995). Das b-ZIP-Motiv dient als Dimerisierungs- und DNA-Bindemotiv und ermöglicht C/EBP-Faktoren, Homo- oder Heterodimere sowohl mit anderen C/EBP-Familienmitgliedern als auch mit weiteren Proteinen, die ein ähnliches b-ZIP-Motiv besitzen, zu bilden (Williams, S. C. et al., 1991; Vinson, C. R. et al., 1993). Für C/EBP $\beta$  sind Protein-Protein-Wechselwirkungen mit NF- $\kappa$ B, CREB (*cAMP-response-element-binding-protein*) und AP1 nachgewiesen (Akira, S., 1997). Wechselwirkungen von C/EBP $\alpha$  mit TBP, TFIIB und p300 wurden beschrieben (Nerlov, C. & E. B. Ziff, 1995).

C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  können sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken (Bauknecht, T. & Y. Shi, 1998; Struyk, L. et al., 2000; Hadaschik, D. et al., 2003). Diese Ambivalenz kommt zum

einen durch verschiedene Isoformen zustande, die sich aus alternativen Translationsstartpunkten und regulierter Proteolyse ergeben (Welm, A. L. et al., 1999; Welm, A. L. et al., 2002). Von C/EBP $\alpha$  sind zwei Isoformen bekannt; eine 42kDa-Variante, die als Transkriptionsaktivator fungiert und eine 30kDa-Form, der große Teile der AD fehlen und die als Repressor der Transkription agiert (s. Abb. 7). Beide Formen regulieren unterschiedliche Promotoren und haben spezifische Zielgene. C/EBP $\alpha$  p30 reprimiert demnach nicht nur von C/EBP $\alpha$  p42-abhängige Promotoren (Wang, C. et al., 2007).

Zusätzlich wird die Funktion der einzelnen C/EBP-Faktoren über den Phosphorylierungsstatus reguliert (zusammengefasst in Hemati, N. et al., 1997; Ross, S. E. et al., 1999; Roesler, W. J., 2001). Dieser entscheidet über das Transaktivierungspotential und die DNA-Bindungs-Affinität (Piwien-Pilipuk, G. et al., 2002). Des Weiteren ist beschrieben, dass C/EBP $\beta$  die endogene Expression von C/EBP $\alpha$  in Maus Neuroblastoma-2A-Zellen induziert (Cortes-Canteli, M. et al., 2002). Somit könnten sich die einzelnen C/EBP-Faktoren, die differenziell exprimiert werden, selbst regulieren. Neben der Phosphorylierung wird die Funktion von C/EBP-Faktoren durch Acetylierung, Ubiquitylierung und Sumoylierung moduliert (Sato, Y. et al., 2006; Cesena, T. I. et al., 2007; Trivedi, A. K. et al., 2007).

C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  spielen eine Rolle bei der Differenzierung der Haut. Die Expression von C/EBP $\beta$  in der differenzierenden Haut nimmt ab der mittleren Zellschicht des *Stratum spinosum* zu und korreliert mit dem Einwandern von C/EBP $\beta$  in den Kern. C/EBP $\alpha$  wird erst ab den äußeren Schichten des *Stratum spinosum* gebildet (Maytin, E. V. & J. F. Habener, 1998; Oh, H.S. & R.C. Smart, 1998). C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  aktivieren die Promotoren für Keratin 1 und Keratin 10, beeinflussen jedoch nicht die späten Marker der Differenzierung, Involukrin und Lorikrin (Maytin, E. V. et al., 1999; Zhu, S. et al., 1999). Diese Expression von C/EBP-Faktoren weicht in HPV-infiziertem Gewebe deutlich ab. In hyperplastischer Epidermis und in Papillomen konnten beide C/EBP-Faktoren in allen suprabasalen Zellschichten nachgewiesen werden, während ihre Expression z.B. in Plattenepithelkarzinomen reduziert zu sein scheint (Oh, H.S. & R.C. Smart, 1998; Shim, M. et al., 2005; Bennett, K. L. et al., 2007; Loomis, K. D. et al., 2007). Die Überexpression von C/EBP $\alpha$  in Zellkultur inhibiert massiv die Zellproliferation (Lekstrom-Himes, J. A., 2001). C/EBP $\alpha$  gilt aufgrund seiner Wachstums-Inhibition als Tumorsuppressor in epithelialen Tumoren und bei AML (*acute myeloid leukemia*) (Loomis, K. D. et al., 2007). Dieser Effekt wird über Protein-Protein-Wechselwirkungen erzielt und benötigt keine DNA-Bindung. C/EBP $\alpha$  interagiert mit mehreren Faktoren, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Unter anderem wird die p21-Expression und Stabilität C/EBP $\alpha$  abhängig gesteigert und die Zelle in den p53-abhängigen Zelltod geleitet (Timchenko, N. A. et al., 1997; Cortes-Canteli, M. et al., 2002). Zusätzlich interagiert C/EBP $\alpha$  mit den Zyklin-abhängigen Kinasen cdk2 und 4, so dass diese zunächst inaktiviert und anschließend degradiert werden (Wang, H. et al., 2001; Wang, H. et al.,

2002). Des Weiteren wird angenommen, dass C/EBP $\alpha$  die Bildung des E2F-Rb-Komplexes unterstützt, aber zusätzlich auch mit freiem E2F interagiert (zusammengefasst in Johnson, P. F., 2005). Somit greift C/EBP $\alpha$  auf verschiedene Weise in die Zellzyklus-Regulation ein.

C/EBP-Faktoren nehmen auch Einfluss auf die Regulation von Promotoren und *Enhancern* verschiedener HPV-Typen. Im Fall von HPV18 konnte gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  an die regulatorische Region bindet (Arnett, B. et al., 2003). In HFK (*human foreskin keratinocytes*) führt die Bindung von C/EBP $\beta$  an seine Konsensussequenz im HPV11-Genom zu einer Repression der viralen Transkription und Replikation (Wang, H. et al., 1996; Zhao, W. et al., 1999). In der LCR von HPV16 sind ebenfalls mehrere Erkennungssequenzen für C/EBP $\beta$  vorhanden (Kyo, S. et al., 1993; Carson, A. & S. A. Khan, 2006; Kukimoto, I. et al., 2006). Die Bindung von C/EBP $\beta$  an zwei BS innerhalb der HPV16LCR (von Nt. 580-593 und Nt. 601-614) führt zur Aktivierung des P<sub>670</sub> (Kukimoto, I. et al., 2006). Die Transkriptionsrate des P<sub>97</sub> nimmt hingegen bei Bindung von C/EBP $\beta$  an die Erkennungssequenzen im Bereich der Nt. 7454-7766 ab (Kyo, S. et al., 1993). Somit ist C/EBP $\beta$  sowohl an der Regulation des frühen als auch an der des späten Promotors beteiligt.

### 1.10 Zielsetzung der Arbeit

Das virale E2-Protein und der zelluläre Ko-Aktivator p300 kooperieren bei der Aktivierung des späten Promotors in Position 7535 (P<sub>7535</sub>) von HPV8. Diese Kooperation korrelierte mit einer direkten Interaktion der beiden Proteine (Müller, A. et al., 2002). Auch das E2-Protein von HPV16 interagiert mit p300 (Krüppel, U., 2004). Transiente Transfektionen zeigten, dass 16E2 und p300 bei der Aktivierung der frühen Genexpression von HPV16 kooperierten (Krüppel, U., 2004). Somit ist die funktionelle Interaktion mit p300 unter verschiedenen E2-Proteinen konserviert, allerdings nicht ihre Rolle bei der Regulation der HPV-Genexpression. Obwohl bei HPV16 nur der frühe Promotor durch E2 und p300 aktiviert wurde, zeigten transiente Transfektionen mit entsprechenden Reporterkonstrukten, dass dies Sequenzabschnitte 3' des P<sub>97</sub> benötigte (Krüppel, U., 2004).

Im Zuge der Aktivierung des P<sub>97</sub> wird die Menge an E6 erhöht. Entsprechend der publizierten Daten, sollte E6 die Aktivierung durch E2 und p300 hemmen (Zimmermann, H. et al., 1999); (Müller-Schiffmann, A. et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Sequenzelemente, die zur Kooperation zwischen E2 und p300 notwendig sind, eingegrenzt, die daran bindenden Faktoren identifiziert und ihre Rolle bei der Regulation der HPV16-Genexpression untersucht werden.

Weiterhin sollte die Rolle des Onkoproteins E6 bei der Regulation der HPV16-Genexpression analysiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme

- ***Epicurian coli XL1-Blue*** (Stratagene, La Jolla, USA)  
Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]:  
- für Klonierungen
- ***Epicurian coli BL21(DE3)pLysS*** (Stratagene, La Jolla, USA)  
Genotyp: B, F-, dcm, ompT, hsdS(r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>), gal, λ(DE3), [pLysS Cam<sup>r</sup>]:  
- für Proteinexpression

### 2.2 Eukaryotische Zellen

- **RTS3b**: Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus einer *Ev*-ähnlichen Läsion eines Nieren-Transplantat-Empfängers; ursprünglich HPV5- und HPV8-positiv, nach mehreren Passagen HPV-negativ (Purdie, K. J. et al., 1993).
- **C33A (ATCC: HTB-31)**: Spontan immortalisierte humane Zervixkarzinomzelllinie ohne HPV-Genom und mit epithelialer Morphologie (Auersperg, N., 1964).
- **SiHa (ATCC: HTB-35)**: Humane zervikale Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, die 1-2 Kopien HPV16-DNA im Zellgenom integriert hat (Friedl, F. et al., 1970).
- **CaSki (ATCC: CRL-1550)**: Humane Zervixkarzinomzelllinie, die ca. 600 Kopien HPV16 pro Zelle trägt.
- **NHEK-neo** (Normale humane epidermale Keratinozyten-neonatal): "gepoolte" primäre Keratinozyten der 1. Passage (Cambrex Bio Science, Walkersville, USA).
- **HeLa (ATCC: CCL-2)**: Humane epitheliale Zelllinie aus einem zervikalem Adenokarzinom, aneuploid, HPV18-positiv (Gey, G.O. et al., 1952).
- **Retro Pack PT67**: Humane Brustkrebszelllinie, entstanden durch onkogene Transformation primärer Brustepithelzellen (Elenbaas, B. et al., 2001).

## 2.3 Nukleinsäuren

### 2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Folgende HPLC-gereinigte Oligonukleotide wurden von Qiagen Operon (Köln) bezogen. Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf die veröffentlichten Sequenzen von p300 (Eckner, R. et al., 1994) sowie die HPV16R und HPV18R Sequenzen aus der HPV-Datenbank. Enzymschnittstellen sind fett dargestellt, Bindestellen sind unterstrichen und Punktmutationen sind sowohl kursiv gedruckt als auch unterstrichen.

Zur *in vitro*-Mutagenese und im EMSA wurden jeweils komplementäre Oligonukleotidpaare verwendet. In den unten angegebenen Tabellen 1 und 2 ist deshalb nur das 5'→3'-Oligonukleotid angegeben.

**Tabelle 1: *In vitro*-Mutagenese Oligonukleotide**

|                         |   |                                    |
|-------------------------|---|------------------------------------|
| dHAT p300<br>a1472-1522 | GGAATGGTACAAAAAATGCTTGAGGAAGAAGAGAGAAAACG       | Deletion der HAT<br>Domäne in p300 |
| P97TATAmA               | CCGAAACCGGTTAGT <u>G</u> CAAAGCAGACATTTTATGCACC | Deletion der TATA-<br>Box des P97  |

**Tabelle 2: EMSA Oligonukleotide**

|                              |   |   |
|------------------------------|---|---|
| C/EBP<br>BS469<br>HPV16 mt   | GGACAAAAAGCAAAGAT <u>CC</u> TATAATATAAGGGGTCGGTGG     | wt C/EBP BS<br>7071 in der<br>HPV16LCR fw |
| C/EBP<br>BS7071<br>HPV16 mt  | GGCCAAACCAAATTTACATTAGGAGGACGAAAAGCTACAGTATGTG        | mt C/EBP BS<br>7071 in der<br>HPV16LCR fw |
| 16C/EBP<br>beta 469A<br>(wt) | GCAAAGATTCCATAATATAAGG                                | wt C/EBP BS<br>469 in der<br>HPV16LCR fw  |
| HPV16E2-<br>1mt              | GTAGCTTCA <u>A</u> T <u>CGAATTC</u> TATTGCATGCTTTTTGG | EMSA<br>Oligonukleotid:<br>E2BS-1 mt      |

**Tabelle 3: Klonierungsoligonukleotide**

|                                    |   |  |
|------------------------------------|---|--|
| C/EBP $\alpha$<br>30kDa XhoI<br>3' | CCAGTT <b>CTCGAG</b> TCACGCGCAGTTGCCATGGCCTTGACC  | 3'Oligonukleotid zur<br>Klonierung von C/EBP $\alpha$                                  |
| C/EBPalpha<br>42kDa XhoI<br>5'     | GGCGG <b>ACTCGAG</b> ATGGAGTCGGCCGACTTCTACGAGGCGG | 5'Oligonukleotid zur<br>Klonierung der 42kDa<br>Form von C/EBP alpha                   |
| 16LCR<br>BamHI<br>7007 5'          | CGGCAC <b>GGATCC</b> AGACCTAGATCAGTTTCCTTTAGGACGC | 3'Oligonukleotid zur<br>Klonierung der<br>verkürzten HPV16LCR-<br>Luciferasekonstrukte |
| 16LCR Kpnl<br>885 3'               | CCCCATT <b>GGTACCT</b> GCAGGATCAGCC               | 3'Oligonukleotid zur<br>Klonierung der verk.<br>HPV16LCR-Luc-Konstr.                   |

## Material

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
| 16LCRE7-864 Kpn up      | GGCCTC <b>GGTACCGG</b> TAGATTATGGTTTCTGAG    | 3' Oligonukleotid zur Klonierung der verkürzten HPV16LCR-Luciferasekonstrukte |
| 16LCR KpnI 641 3'       | GGCCTC <b>GGTACCTG</b> CTCATAACAGTAGAGATCA   | 3' Oligonukleotid zur Klonierung der verkürzten HPV16LCR-Luciferasekonstrukte |
| 16LCR KpnI 523 3'       | GGCCTC <b>GGTACCGCAACA</b> AGACATACATCGACCGG | 3' Oligonukleotid zur Klonierung der verkürzten HPV16LCR-Luciferasekonstrukte |
| HPV16 LCR nt394 KpnI 3' | CGGCTC <b>GGTACCACACA</b> ACGGTTTGTGTTATTGC  | 3' Oligonukleotid zur Klonierung der verkürzten HPV16LCR-Luciferasekonstrukte |
| HPV16 LCR nt160 KpnI 3' | GGGCTC <b>GGTACCCAGAT</b> CTGTGCATAACTGTGG   | 3' Oligonukleotid zur Klonierung der verkürzten HPV16LCR-Luciferasekonstrukte |

**Tabelle 4: ChIP Oligonukleotide**

|                    |                                 |   |
|--------------------|---------------------------------|---|
| HPV16 7177-7206 5' | CACAACAACACACATATACAAACATACA    | Oligonukleotid für den C/EBP ChIP           |
| HPV16 7177-7206 3' | TGTATGTTTGTATATGTGTTGTTTGTG     | Oligonukleotid für den C/EBP ChIP           |
| LUC 1352 for       | GGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACG    | Luciferase-spezifisches 5' Oligonukleotid r |
| LUC/1800-1768B     | CCTCTAGAGTCATTACAATAGCTAAGAATTC | Luciferase-spezifisches 3' Oligonukleotid   |

### 2.3.2 Prokaryote Expressionsvektoren

- **pGEX2T, pGEX5x2, pGEX5x3** (4,9 kb) erlauben die Expression von Proteinen, die N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert sind und unter der Kontrolle eines Lac-Promotors (IPTG induzierbar) stehen (Amersham Biosciences, Freiburg).

### 2.3.3 Eukaryote Expressionsvektoren

- **pcDNA 3.1+** (5,4 kb) erlaubt die Expression unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Er enthält ausserdem einen SV40-Replikationsursprung und eine Neomycin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pcDNA 3.1+FLAGII** (5,4 kb) exprimiert Proteine, die N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert sind und unter dem Einfluss eines T7 und einem CMV-Promotor stehen. Hierfür wurden die komplementären Oligonukleotide FLAG-HindIII/EcoRI-5'

und FLAG-HindIII/EcoRI-3´ über HindIII und EcoRI in pcDNA3.1+ kloniert (Steger pers. Mitteilung).

- **pCMV2FLAG** (4,7 kb) erlaubt die Expression eines Proteins mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop unter Kontrolle des CMV-Promotors (Kodak, New Haven, USA).
- **pCMV1** (4,8 kb), mit einem CMV-Promotor (M. Stinski, pers. Mitteilung), und **pUC18** (2,7 kb) wurden zum Auffüllen von DNA-Mengen in Transfektionsansätzen verwendet (Invitrogen, Karlsruhe).

### 2.3.4 Reporterplasmide

- **pHPV16LCR-E7-Luc** enthält ein BamHI/KpnI-Fragment aus pBR322HPV16 (bp 6150-885) mit der LCR von HPV16 vor dem Luciferasegen (Steger, pers. Mitteilung).
- **pHPV16LCR-E7-Luc P97TATAmt** enthält die durch *in vitro*-Mutagenese mutierte TATA-Box des P<sub>97</sub> (Krüppel, U., 2004).
- **pHPV16LCR-Luc** enthält ein BamHI-Fragment aus pBR322HPV16 (bp 7008-98) mit der LCR von HPV16 einschließlich des späten Promotors in Pos. 670 vor dem Luciferasegen (Dong, X. P. et al., 1994).
- **pHPV16LCR-Nt.885-Luc** enthält ein BamHI/KpnI-Fragment aus pBR322HPV16 (bp 7007-885) mit der LCR von HPV16 vor dem Luciferasegen (diese Arbeit)
- **pHPV16LCR-Nt.641-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 641 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).
- **pHPV16LCR-Nt.523-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 523 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).
- **pHPV16LCR-Nt.469-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 469 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).
- **pHPV16LCR-Nt.430-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 430 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).
- **pHPV16LCR-Nt.412-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 412 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).
- **pHPV16LCR-Nt.394-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 394 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).
- **pHPV16LCR-Nt.160-Luc** wurde mit dem Oligonukleotid-Paar 16LCR BamHI 7007 5´/16LCR KpnI 160 3´ in pALuc kloniert (diese Arbeit).

### 2.3.5 Rekombinante Plasmide

#### E2-Konstrukte:

- **CMV4-HPV16 E2** kodiert für den ORF von HPV16 E2. Ein PCR-Fragment wurde in CMV4 kloniert (Steger, G. & S. Corbach, 1997).

#### p300-Konstrukte:

- **pCMV $\beta$ -p300HA:** p300 wurde über NotI/HindIII in den Expressionsvektor pCMV $\beta$  kloniert. C-terminal wurde über eine NheI-Schnittstelle ein Hämagglutinin-Epitop angefügt, deshalb fielen 108 bp im C-Terminus von p300 weg (Eckner, R. et al., 1994).
- **pCMV $\beta$ -deltaHAT-p300HA:** entstand durch *In vitro*-Mutagenese mit dem Oligonukleotid-Paar dHAT p300 a1472-1522/ dHAT p300 a1472-1522-r aus pCMV $\beta$ -p300HA (diese Arbeit).
- **pcDNA 3.1<sup>+</sup>-p300-cBAES:** Ein Fragment von p300, das die As. 1751-2370 umfasst wurde in pcDNA 3.1<sup>+</sup> kloniert (Mink, S. et al., 1997).

#### C/EBP-Konstrukte:

- **pcDNA 3.1<sup>+</sup>-C/EBP $\alpha$ :** Dieses Plasmid generiert die 42 kDa-Form von C/EBP $\alpha$  (Hadaschik, D. et al., 2003).
- **pcDNA 3.1<sup>+</sup>-C/EBP $\beta$ :** Dieses Plasmid generiert C/EBP $\beta$  als volle Länge Protein (LAP), eine C/EBP $\beta$ -Isoform beginnend mit As. 24 und das sogenannte LIP (Smola, pers. Mitteilung).
- **pGEX2T-C/EBP $\alpha$ :** kodiert für die an GST-fusionierte 42kDa-Form von C/EBP $\alpha$  (Hadaschik, D. et al., 2003).
- **pGEX2T-C/EBP $\beta$ :** kodiert für das an GST-fusionierte C/EBP $\beta$  (Hadaschik, D. et al., 2003).

#### E6-Konstrukte:

- **pcDNA3.1<sup>+</sup>-FLAGII-8E6:** Ein mit dem Oligonukleotid-Paar HPV8E6pET5' / HPV8E6pET3' amplifiziertes PCR-Produkt wurde zur Expression eines an FLAG fusionierten HPV8E6 über BamHI in pcDNA3.1<sup>+</sup>-FLAGII kloniert. (Müller, A. et al., 2002).
- **pcDNA3.1<sup>+</sup>-FLAGII-16E6:** kodiert für HPV16E6. Ein mit den Oligonukleotiden HPV16E6Bamup und HPV16E6Bamdo amplifiziertes PCR Produkt wurde hierfür über BamHI in pcDNA3.1<sup>+</sup>-FLAGII kloniert (Müller, A. et al., 2002).

- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6 $\Delta$ 26-29:** Diese E2-bindungsdefekte Mutante von p300 wurde mittels *In vitro*-Mutagenese hergestellt (Steger, pers. Mitteilung).
- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6-N:** kodiert für die As. 1-84 von 16E6. Ein mit dem Oligonukleotid-Paar HPV16E6Bamup/16E6NdoEco amplifiziertes PCR-Produkt wurde hierfür über BamHI/EcoRI in pcDNA3.1+-FLAGII kloniert (Müller, A., 2003).
- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6-C:** kodiert für die As. 85-151 von 16E6. Ein mit dem Oligonukleotid-Paar HPV16E6CupBam/16E6Bamdo amplifiziertes PCR-Produkt wurde hierfür über BamHI in pcDNA3.1+-FLAGII kloniert (Müller, A., 2003).
- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6C $\Delta$ ETQL:** kodiert für die As. 85-147 von 16E6 (Müller, A., 2003).
- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6-C $\Delta$ p300:** kodiert für den C-Terminus von 16E6 (As. 85-151) mit einer Deletion der As. 123-127 (Müller, A., 2003).
- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6-C $\Delta$ p300 $\Delta$ ETQL:** kodiert für die As. 85-147 von 16E6 mit einer Deletion der As. 123-127. Dieser an Flag fusionierten Variante wurden die As. 123-127 mittels *In vitro*-Mutagenese auf der Matrize pcDNA3.1+-FLAGII-16E6C $\Delta$ ETQL deletiert (Müller, A., 2003).
- **pcDNA3.1+-FLAGII-16E6 $\Delta$ ETQL:** kodiert für ein an Flag-fusioniertes 16E6-Protein mit einer Deletion der letzten 4 As., dem PDZ-Binde-Motiv (ETQL) (Müller, A., 2003).

### 2.3.6 DNA Längenstandards

- 1kb<sup>+</sup>-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
- 100bp-DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

### 2.3.7 Sonstige Nukleinsäuren

- sss-DNA (*sonicated salmon sperm DNA*) (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Desoxyribonukleotide (dNTPs) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

## 2.4 Radioaktivität

- <sup>32</sup>P- $\gamma$ -Adenosintri-phosphat
- <sup>35</sup>S-Cystein
- <sup>35</sup>S-Methionin (alle Amersham Biosciences, Freiburg)

## 2.5 Proteine

### 2.5.1 Enzyme

#### Restriktionsendonukleasen:

Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen verwendet:

New England BioLabs, Schwalbach; Invitrogen, Karlsruhe; Roche Diagnostics, Mannheim;  
MBI Fermentas, St.Leon-Rot

- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Diagnostics, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Pwo DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (Roche Diagnostics, Mannheim)
- AccuPOL™ DNA Polymerase (Ampliqon, Biomol, Hamburg)
- Taq DNA Polymerase (Ampliqon, Biomol, Hamburg)
- T7-PNK (New England BioLabs, Schwalbach)
- RNase freie DNase (Qiagen, Hilden)

### 2.5.2 Größenstandards

- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, nieder- und hochmolekular, farblos und vorgefärbt (alle: MBI Fermentas, St. Leon-Rot), sowie den Magic Marker XP der Firma Invitrogen, Karlsruhe.

### 2.5.3 Antikörper

- **$\alpha$ -Actin (C-11) sc-1615:** Dieser polyklonale Antikörper wurde in einer Ziege hergestellt und erkennt den C-Terminus des humanen Aktin-Proteins (Santa-Cruz, Heidelberg)
- **Anti-HA High Affinity (3F10):** Monoklonaler Antikörper aus der Ratte, der die Hämagglutinin (HA) Peptid-Sequenz (YPYDVPDYA) des humanen Influenza Virus HA-Proteins erkennt (Roche, Penzberg)
- **CBP (C-1):** Monoklonaler Antikörper gegen CBP aus Maus (Santa Cruz, Heidelberg)
- **$\alpha$ -Maus/Kaninchen POD:** POD-gekoppelter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-IgG (Roche Diagnostics, Mannheim)
- **Anti-p300 (RW109, RW105 und RW128):** Gemisch aus monoklonalen Antikörpern gegen den C-Terminus von p300 aus der Maus (Biomol, Hamburg)

- **$\alpha$ -Ratte POD:** POD-gekoppelter Antikörper gegen Ratten IgG (Boehringer, Mannheim)
- **$\alpha$ -Ziege POD:** POD-gekoppelter Antikörper gegen IgG aus Ziege (Sigma, St. Louis, USA)
- **C/EBP $\alpha$  (14AA) sc-61:** Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, der sowohl die 42kDa als auch die 30kDa Form des CCAAT-enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ ) erkennt (Santa Cruz, Heidelberg)
- **C/EBP $\alpha$  (C-18) sc-9314X:** dieser polyklonale Antikörper wurde in einer Ziege hergestellt und erkennt den C-Terminus des humanen C/EBP $\alpha$  (Santa Cruz, Heidelberg)
- **M5- $\alpha$ FLAG:** Monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop aus der Maus (Kodak, New Haven, USA)
- **Monoclonal anti-E6 HPV16 (E6-6F4):** Monoklonaler Antikörper gegen das HPV16E6 Protein (Euromedex, Frankreich)
- **p300 (Ab-1):** Monoklonaler Antikörper gegen p300 aus der Maus (Calbiochem, Schwalbach)
- **Sp1 (PEP2) sc-59:** Dieser polyklonale Antikörper wurde in Kaninchen hergestellt und erkennt die Aminosäuren 528-546 des Ratten Sp1 (Santa Cruz, Heidelberg)

### 2.5.4 Proteine für EMSA-Experimente

- GST-C/EBP $\beta$
- GST-C/EBP $\alpha$ -42kDa

### 2.6 Präzipitations-Reagenzien

- Protein A-Agarose *Immunoprecipitation Reagent*: sc-2001 (Santa Cruz, Heidelberg)
- Protein G PLUS-Agarose *Immunoprecipitation Reagent*: sc-2002 (Santa Cruz, Heidelberg)
- ANTI-FLAG<sup>®</sup> M2-Agarose: Agarose mit gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen das FLAG-Epitop (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glutathion-Agarose (Biontix Laboratories, Martinsried)

## 2.7 Inhibitoren

- **Aprotinin:** Serin-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Chymotrypsin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Calyculin A:** Protein-Phosphatase-Inhibitor, inhibiert PP1 und PP2-A (Calbiochem, Schwalbach)
- **Leupeptin:** Serin, Thiol-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Kallikrein, Proteinase K, Papain, Thrombin, Cathepsin A und B (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **MG132:** Proteasom-Inhibitor (Biomol, Hamburg)
- **Natriumfluorid:** Serin-/Threonin-Phosphatasen-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Natriumorthovanadat:** Tyrosin-Phosphatasen-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Ocadaic Acid:** Protein-Phosphatase-Inhibitor, inhibiert PP1 und PP2-A (Biomol, Hamburg)
- **Pepstatin:** Aspartat-Protease-Inhibitor, inhibiert: Pepsin, Renin, Cathepsin D und mikrobiische Säureproteasen (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **PMSF:** Serin-, Cystein-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Papain (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **RNase Inhibitor** (MBI Fermentas; St. Leon, Rot)
- **Staurosporine:** Proteinkinase-Inhibitor, inhibiert z.B. PKC, PKA und ERK1 (Biomol, Hamburg)
- **Wortmannin:** Irreversibler PI3K-Inhibitor (Serva, Heidelberg)

## 2.8 Reagenziensysteme (Kits)

- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- Plasmid Maxi Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- QIAprep Spin /QIAprep 8 Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *Gel Extraction* Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *PCR Purification* Kit (Qiagen, Hilden)
- QuickChange™ *Site-directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, La Jolla, USA)
- TNT® *T7 Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Madison, USA)
- BM *Chemiluminescence Western Blotting* Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- *Pure Link™* Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Karlsruhe)
- *Omniscript Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden)
- *Super Script™ III* First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe)

## Material

- *Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit* (Biomol, Hamburg)
- *Light Cycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR green I* (Roche Diagnostics, Mannheim)
- *Biotin-Streptavidin Super Sensitive Nachweissystem* (BioGenex, San Ramon, USA)

### 2.9 Puffer und Lösungen

#### Proteinaufreinigung:

##### Puffer A für Kernextrakte

|              |        |
|--------------|--------|
| HEPES pH 7.9 | 10 mM  |
| KCl          | 10 mM  |
| EDTA         | 0,1 mM |
| EGTA         | 0,1 mM |
| DTT          | 1 mM   |
| PMSF         | 1 mM   |
| Leupeptin    | 0,1 mM |
| Pepstatin    | 0,1 mM |
| Aprotinin    | 0,1 mM |
| NaF          | 50 mM  |
| Orthovanadat | 1 mM   |

##### Puffer C für Kernextrakte

|              |        |
|--------------|--------|
| HEPES pH 7,9 | 20 mM  |
| NaCl         | 400 mM |
| EDTA         | 0,1 mM |
| EGTA         | 0,1 mM |
| DTT          | 1 mM   |
| PMSF         | 1 mM   |
| Leupeptin    | 0,1 mM |
| Pepstatin    | 0,1 mM |
| Aprotinin    | 0,1 mM |
| NaF          | 50 mM  |
| Orthovanadat | 1 mM   |

#### LSDB (low-salt-dilution-buffer)

##### 0-1000mM

|                |           |
|----------------|-----------|
| Glycerin       | 20 %      |
| Tris/Cl pH 7,9 | 50 mM     |
| DTT            | 1 mM      |
| NP40           | 0,1 %     |
| KCl            | 0-1000 mM |
| PMSF           | 1 mM      |

#### Puffer für SDS Gele:

##### 4x Tris/Cl SDS pH 8,8

|                |       |
|----------------|-------|
| Tris/Cl pH 8.8 | 1,5 M |
| SDS            | 0,4 % |

##### 4x Tris/Cl SDS pH 6,8

|                |        |
|----------------|--------|
| Tris/Cl pH 8,8 | 500 mM |
| SDS            | 0,4 %  |

## Material

---

### SDS-Polyacrylamid-Gel (PAG):

#### Trenngel:

|                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | 7,5-15 %/0,2-0,4 % |
| Tris/Cl-SDS pH 8,8     | 25 %               |
| Ammoniumpersulfat      | 0,03 %             |
| TEMED                  | 0,1 %              |

#### Sammelgel:

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | 3,9 %/0,1 % |
| Tris/Cl-SDS pH 6,8     | 25 %        |
| Ammoniumpersulfat      | 0,03 %      |
| TEMED                  | 0,1 %       |

### SDS-Elektrophorese-Puffer

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 25 mM  |
| Glycin    | 192 mM |
| SDS       | 0,1 %  |

### 2x SDS-Proben-Puffer

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| Tris/Cl pH 6,8           | 125 mM     |
| Glycerin                 | 20 %       |
| SDS                      | 2 %        |
| $\beta$ -Mercaptoethanol | 2 %        |
| Bromphenol-Blau          | 15 $\mu$ M |

### Färbelösung

|                  |        |
|------------------|--------|
| Methanol         | 50 %   |
| Essigsäure       | 10 %   |
| H <sub>2</sub> O | 40 %   |
| Coomassie        | 0,05 % |

### Entfärbelösung

|                  |      |
|------------------|------|
| Methanol         | 5 %  |
| Essigsäure       | 7 %  |
| H <sub>2</sub> O | 88 % |

### Für Western Blots:

#### 1x Transfer-Puffer

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris-Base | 25 mM  |
| Glycin    | 192 mM |
| Methanol  | 20 %   |

#### 1x TBST (*Tris buffered saline + Tween*)

|                |        |
|----------------|--------|
| 1M Tris pH 8,8 | 10 mM  |
| NaCl           | 150 mM |
| Tween 20       | 0,05 % |

### Abblock-Lösung (in TBST)

|                  |     |
|------------------|-----|
| Magermilchpulver | 4 % |
|------------------|-----|

### Für Luciferase Tests:

#### KPO<sub>4</sub>-Puffer 1 M

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 915 mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 85 mM  |

## Material

### Zellaufschlusspuffer (Reportersol)

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| KPO <sub>4</sub> -Puffer pH 7,8 | 100 mM |
| DTT                             | 1 mM   |
| NP40                            | 0,1 %  |

### Luciferase Reaktions-Puffer

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| KPO <sub>4</sub> -Puffer pH 7,8 | 100 mM |
| MgSO <sub>4</sub>               | 15 mM  |
| ATP                             | 50 mM  |
| DTT                             | 1 mM   |

### ATP-Stammlösung

|                |        |
|----------------|--------|
| ATP            | 100 mM |
| Tris/Cl pH 7,9 | 192 mM |

### Luciferin-Stocklösung 50 x

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

### Für EMSA-Experimente :

#### Bindungs-Puffer

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Glycerin          | 10 %     |
| HEPES pH 7,9      | 12 mM    |
| EDTA              | 0,5 mM   |
| MgCl <sub>2</sub> | 4 mM     |
| KCl               | 60 mM    |
| NP40              | 0,1 %    |
| BSA               | 50 ng/µl |
| DTT               | 2 mM     |
| Spermidin         | 4 mM     |
| SssDNA            | 25 ng/µl |
| PolydI/dC         | 50 ng/µl |

#### 5 % Polyacrylamidgel

|                        |             |
|------------------------|-------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid | 5 %/0,267 % |
| TBE                    | 0,5 x       |
| Ammoniumpersulfat      | 0,04 %      |
| TEMED                  | 0,2 %       |

### Für Agarosegele:

#### TAE-Puffer

|             |       |
|-------------|-------|
| Tris-Acetat | 40 mM |
| EDTA        | 1 mM  |

#### Farbmarker (6 x)

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Glycerin            | 30 %   |
| Bromphenolblau      | 0,25 % |
| Xylen-Cyanol-Lösung | 0,25 % |
| Tris/Cl pH 7,5      | 10 mM  |
| EDTA                | 1 mM   |

**Ethidiumbromid-Bad**

Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O      1 µg/ml

**Puffer für den ChIP-Assay:**

***ChIP Dilution Buffer***

NaCl                              167 mM  
 Tris/Cl pH 8,1                16,7 mM  
 EDTA                             1,2 mM  
 Triton X-100                  1,1 %  
 SDS                                0,01 %

***Low Salt Wash Buffer***

NaCl                              150 mM  
 Tris/Cl pH 8,1                20 mM  
 EDTA                             2 mM  
 Triton X-100                  1 %  
 SDS                                0,1 %

***High Salt Wash Buffer***

NaCl                              500 mM  
 Tris/Cl pH 8,1                20 mM  
 EDTA                             2 mM  
 Triton X-100                  1 %  
 SDS                                0,1 %

***LiCl Wash Buffer***

Tris/Cl pH 8,1                20 mM  
 EDTA                             1 mM  
 Natrium-Deoxycholat 1 %  
 IGEPAL-CA630                1 %  
 LiCl                                250 mM

**SDS-Lyse-Puffer**

Tris/Cl pH 8,1                50 mM  
 EDTA                             10 mM  
 SDS                                1 %

**Sonstige Puffer:**

**TSB-Puffer**

***(Transformation and Storage Buffer)***

PEG (MW= 3350)              30 mM  
 DMSO                             5 %  
 MgCl<sub>2</sub>                            10 mM  
 MgSO<sub>4</sub>                            10 mM

**PBS**

***(Phosphate Buffered Saline)***

NaCl                              137 mM  
 KCl                                2,7 mM  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O            4,3 mM  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                        1,4 mM

## Material

---

### **2x HBS**

|   |        |
|---|--------|
| NaCl  | 280 mM |
| KCl   | 10 mM  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O | 1,5 mM |
| HEPES pH 7,05   | 50 mM  |

### **Medium zur Bakterienkultivierung:**

#### **LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, pH 7,2 [Applichem])**

|                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| Bacto-Trypton         | 10 g/l               |
| Bacto-Hefe-Extrakt    | 5 g/l                |
| NaCl                  | 8 g/l                |
| Bacto-Agar (optional) | 100 µg/ml Ampicillin |
| Antibiotikum          | 1,5 g/l              |

### **Medien zur Zellkultivierung:**

#### **für C33a, Retro Pack PT67; Caski und SiHa-Zellen:**

#### **Dulbecco`s MEM (Modified Eagle Medium)**

Mit Glutamax, ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg Glukose, mit Pyridoxin (Invitrogen, Karlsruhe)

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Fötale Kälberserum (FCS) | 7,5 %     |
| Penicillin               | 120 mg/l  |
| Streptomycin             | 120 mg/ml |

#### **für RTS3b-Zellen:**

#### **E-Medium**

**Dulbecco`s DMEM (s.o.)** 50 %

**Dulbecco`s Nut Mix F12** 50 %

Mit Glutamax, mit Pyridoxin (Invitrogen, Karlsruhe)

|                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| L-Glutamin              | 350 µg/ml                |
| Transferrin             | 5 µg/ml                  |
| Triiodo-Thyronin        | 2 x 10 <sup>-11</sup> M  |
| Adenin                  | 1,8 x 10 <sup>-4</sup> M |
| Insulin                 | 5 µg/ml                  |
| Penicillin/Streptomycin | 100 µg/ml                |
| Hydrocortison           | 0,4 µg/ml                |
| FCS                     | 10 %                     |

## Material

---

|  |           |
|--|-----------|
| EGF ( <i>epidermal growth factor</i> ) | 10 ng/μl  |
| Epinephrin                             | 100 μg/ml |

### für HeLa-Zellen:

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| Dulbecco`s MEM (s.o.)   | 50 %      |
| FCS                     | 10 %      |
| Penicillin/Streptomycin | 100 μg/ml |

### Für NHEK:

**KGM-2 Medium für NHEK-neo** (Cambrex Bio Science, Walkersville, USA)

## 2.10 Sonstige Chemikalien und Materialien

Alle hier nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „zur Analyse“ von folgenden Firmen bezogen: Amersham Bioscience (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| Agarose  | (Biozym, Hess. Oldendorf)     |
| Agarose, höchster Reinheitsgrad                      | (BioRad, München)             |
| Albumin Fraktion V                                   | (AppliChem, Darmstadt)        |
| Ampicillin   | (Sigma-Aldrich, Steinheim)    |
| Amplifizierer ( <i>Amplify Fluographic Reagent</i> ) | (Amersham, Freiburg)          |
| Aprotinin (Serin-Protease-Inhibitor)                 | (Sigma-Aldrich, Steinheim)    |
| Aquatex  | (Merck, Darmstadt)            |
| β-Mercaptoethanol                                    | (AppliChem, Darmstadt)        |
| Bradford-Lösung für die Proteinbestimmung            | (BioRad, München)             |
| Chloramphenicol                                      | (Sigma-Aldrich, Steinheim)    |
| Chloroform   | (Roth, Karlsruhe)             |
| D-Luciferin, freie Säure                             | (Roche Diagnostics, Mannheim) |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)                              | (Sigma-Aldrich, Steinheim)    |
| Epidermal Growth Factor (EGF)                        | (Sigma-Aldrich, Steinheim)    |
| Fötale Kälberserum (FCS)                             | (Invitrogen, Karlsruhe)       |
| Formaldehyd  | (Merck AG, Darmstadt)         |
| FuGENE6  | (Roche Diagnostics, Mannheim) |
| Glutathion-Sepharose™ 4B                             | (Amersham, Freiburg)          |
| Glycogen   | (Sigma-Aldrich, Steinheim)    |

## Material

---

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Hematoxillin  | (Sigma-Aldrich, Steinheim)   |
| IPTG (Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid)        | (Sigma-Aldrich, Steinheim)   |
| Isoamylalkohol  | (Roth, Karlsruhe)            |
| LB-Agar   | (USB, Cleveland, USA)        |
| LB-Broth  | (USB, Cleveland, USA)        |
| Phenol  | (Roth, Karlsruhe)            |
| Ponceau-Rot   | (Sigma-Aldrich, Steinheim)   |
| RNasin  | (Promega, Madison, USA)      |
| Spermidin, freie Base (N-[Aminopropyl]-1,4-butandiamin) | (Sigma-Aldrich, Steinheim)   |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)                     | (Sigma-Aldrich, Steinheim)   |
| Western Blot Membranen aus Nitrocellulose 0,45 $\mu$ m  | (Schleicher&Schuell, Dassel) |

Plastikwaren wurden von den Firmen Falcon BD (Heidelberg), Greiner (Solingen) und Sarstedt (Nümbrecht) verwendet.

Der Chemilumineszenz-Nachweis sowie Autoradiographien erfolgten mit ECL-Hyperfilmen (Amersham, Freiburg).

## 3 Methoden

### 3.1 Bakterienkultur

#### 3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Die zu transformierenden *E. coli*-Stämme XL1 Blue und BL21pLysS wurden nach dem Protokoll von Chung, C.T. et al. (1989) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer frischen Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 unter Schütteln inkubiert. Bei BL21-Bakterien wurde das Medium zur Selektion auf das pLysS-Plasmid zusätzlich mit 170 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Die Bakterien wurden 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml eiskaltem TSB resuspendiert und erneut 10 min auf Eis gestellt. Dann konnten die Bakterien entweder direkt für eine Transformation eingesetzt werden oder in vorgekühlte Eppendorfggefäße zu je 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Um die Effizienz der kompetenten Bakterien zu testen, wurden 100 µl der Bakterien mit 1 ng eines Testplasmids transformiert. Anhand der Anzahl der Kolonien ließ sich die Effizienz der Bakterien für 1 µg zu transformierender DNA berechnen. Die Effizienz lag in der Regel zwischen  $5 \times 10^5$  bis  $3 \times 10^6$  Kolonien/µg DNA.

#### 3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter XL1-Blue- und BL21-pLysS-Bakterien wurden 1 ng DNA bzw. die DNA eines Ligationsansatzes mit 100 µl Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Beim anschließenden 45-sekündigen Hitzeschock bei 42°C gelangte die DNA in die Bakterien. Nach Zugabe von 400 µl LB/10 mM Glukose erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C unter Schütteln, um das Resistenzgen zu exprimieren. Die Bakterien wurden dann auf antibiotikumhaltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.1.3 Langzeitlagerung von Bakterien

Für die Langzeitlagerung wurde 1 ml einer dichten Bakterienvorkultur mit 500 µl 50 % Glycerin vermischt und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 3.2 DNA-Methoden

#### 3.2.1 Plasmidisolierung aus Bakterien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthielten ein Resistenzgen (meist Ampicillin), so dass durch Zugabe von 100 µg/ml Antibiotikum sowohl in LB-Medium als auch auf Agar-Platten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden konnte. Für die Plasmidisolierung wurden Bakterien aus Vorkulturen oder von einer LB-Agar-Platte in antibiotikumhaltigem LB-Medium angeimpft und bei 37°C unter Schütteln über Nacht dicht wachsen gelassen. Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (Sarstedt) und für eine präparative Plasmidisolierung bis zu 200 ml in einem sterilen 1 L Erlenmeyer-Kolben angeimpft.

#### 3.2.2 Plasmidpräparationen

Präparative Plasmidisolierungen (Mini-, Midi-, Maxipräparationen) wurden mit Reagenzsystemen der Firma QIAGEN (Hilden) oder der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Sie basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Birnboim, H.C. (1983) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzgel). Die DNA wurde zum Schluss in 10 mM Tris pH 8.0 aufgenommen, und der DNA-Gehalt spektrometrisch bei 260 nm im NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

#### 3.2.3 DNA-Standardmethoden

Die unten aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis, T. et al. (1989); Ausubel, F.M. et al. (1992) oder nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Phosphorylierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase
- Ligation von DNA mit T4-Ligase
- Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA
- Reinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion von DNA
- Phenol-Chloroform-Fällung von DNA

### 3.2.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von dem Servicelabor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin) der Universität zu Köln auf einem ABI-Prism 377-Sequenzierer (Applied Biosystems, Perkin Elmer) durchgeführt. Hierfür wurden 300 ng DNA-Matrize mit 3-10 pmol Oligonukleotiden in einem Gesamtvolumen von 6 µl eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über das Programm Edit View Vers.1.0.2 (Perkin Elmer).

### 3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifizierung von DNA-Sequenzen, die über die Bindung von zwei Oligonukleotiden, die in entgegengesetzter Orientierung an eine DNA-Matrize binden, definiert werden (Mullis, K.B. & F.A. Faloon, 1987).

Amplifizierungen für präparative Zwecke wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Als Matrize wurden 1-10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zwei Oligonukleotide, die je mit einem Strang der DNA-Matrize komplementär waren und das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzten, dienten als Oligonukleotide und wurden jeweils in einer Menge von 10-20 pmol hinzugefügt. Alle Amplifizierungen wurden mit einer  $Mg^{2+}$ -Konzentration von maximal 2 mM und je 25 µM der vier Desoxynukleotide durchgeführt. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Nach Zugabe von 2,5 Units (u) *Pwo*-, bzw. *Taq*-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt und die Temperaturzyklen nach folgendem Basisschema gestartet.

|    |      |         |                   |
|----|------|---------|-------------------|
| 1. | 94°C | 2 min   |                   |
| 2. | 94°C | 15 sek  | (Denaturierung)   |
|    | 52°C | 30 sek  | (Hybridisierung)  |
|    | 72°C | 1min/kb | (Polymerisierung) |
| 3. | 72°C | 20 min  |                   |

Der 2. Schritt wurde insgesamt bis zu dreißig Mal wiederholt. Die Hybridisierungstemperatur, die Extensionszeit sowie die Zyklenzahl des Basisprotokolls wurden je nach Beschaffenheit der Oligonukleotide und Größe des zu amplifizierenden Bereichs angepasst. Die Größe und die Menge der amplifizierten DNA wurden anschließend auf einem Agarose-Gel überprüft.

### 3.2.6 “Touchdown”-PCR

Das Prinzip einer *Touchdown*-PCR liegt in der Annäherung der Hybridisierungstemperatur an die zu erwartende Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des verwendeten Oligonukleotidpaars. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit immer verwendet, wenn die Amplifikation von DNA im Light Cycler mit dem SYBR GreenI Kit (Roche Diagnostics) erfolgte. Es entstehen weniger Artefakte, sowie Oligonukleotid-Dimere und es ist eine erhöhte Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt zu erwarten, auch wenn die tatsächliche Hybridisierungstemperatur nicht bekannt ist.

Zu diesem Zweck wird im ersten Amplifikationszyklus eine Hybridisierungstemperatur gewählt, die 5-10°C über der errechneten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotid liegt. In den folgenden 5-10 Zyklen wird die Hybridisierungstemperatur in 2°C-Schritten der eigentlichen Schmelztemperatur des Oligonukleotidpaars angeglichen, oder sogar um 5°C unterschritten. Die in den ersten Zyklen vermehrt gebildeten Amplifikate werden nun bevorzugt von den Oligonukleotiden gebunden und es entsteht vorwiegend das spezifische PCR-Produkt.

### 3.2.7 Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR erlaubt neben den bereits erwähnten PCR-Methoden nicht nur die Amplifikation eines spezifischen Produktes, sondern zusätzlich die Quantifizierung auch sehr geringer DNA-Mengen. Da in dieser Arbeit ausschließlich die Quantifizierung mittels des Farbstoffes SYBR GreenI erfolgte, wird im Folgenden nur auf das Prinzip dieser Methode näher eingegangen. SYBR GreenI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der ähnlich wie Ethidiumbromid, in doppelsträngige DNA interkaliert. Dieser DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 498$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 522$  nm. Bei dieser Echtzeit-PCR verbindet sich der verwendete Farbstoff mit der neu gebildeten DNA. Während der gesamten Reaktion kann das Fluoreszenzsignal verfolgt werden und gibt somit stets Auskunft über den Ablauf der Reaktion, davon leitete sich der Name Echtzeit-PCR (engl.: *real-time* PCR) ab. Wie jede PCR kann auch diese Reaktion in drei Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase kommt es nur langsam zum Anstieg der Produktmenge, da kein optimales Verhältnis von Oligonukleotiden, Polymerase und Ausgangsprodukt vorliegt. Im weiteren Verlauf beobachtet man einen exponentiellen Anstieg des Produkts und in der 3. Phase kommt es zur Stagnation. Diese resultiert zum einen aus der Hitzedegeneration der Polymerase, zum anderen aus dem Verbrauch des Substrats und aus der Hemmung durch das Produkt. Sobald die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt, wird der erste Zyklus, bei dem der Schwellenwert des Hintergrundsignals überwunden wird, als CT-Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus) erfasst und

ermöglicht eine genaue Quantifizierung der Produktmenge durch einen mitgeführten Standard mit definierter DNA-Menge. Als Standard für die Echtzeit-PCR wurden die Reporterplasmide HPV16LCR-E7-Luc, bzw. HPV18LCR-E7-Luc in den Konzentrationen  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  und  $1 \times 10^8$  Kopien/2  $\mu$ l verwendet. Nach der Echtzeit-PCR wird eine Schmelzkurve ermittelt, die die spezifische Temperatur angibt, bei der das doppelsträngige PCR-Produkt aufschmilzt und den interkalierenden Farbstoff SYBR GreenI freisetzt. Somit kann das spezifische Produkt von möglicherweise ebenfalls entstandenen Nebenprodukten differenziert werden. Als weiterer Nachweis des entstandenen Produktes wurde dieses stets zusammen mit dem verwendeten Standard auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Ethidiumbromid visualisiert.

Als Ausgangsmaterial für eine Echtzeit-PCR im Light-Cycler unter Verwendung des SYBR GreenI Kits (Roche) wurden entweder 2  $\mu$ l einer 1:10-Verdünnung der cDNA oder 2  $\mu$ l einer 1:10-Verdünnung der im ChIP-Assay erhaltenen DNA verwendet.

**Eine typische Echtzeit-PCR mit SYBR GreenI:**

|               |   |
|---------------|---|
| 2 $\mu$ l     | Pre-Mastermix (LightCycler SYBR GreenI Masterkit) |
| 1,4 $\mu$ l   | MgCl <sub>2</sub> (25 $\mu$ M)                    |
| 1 $\mu$ l     | 5' Oligonukleotid (10 $\mu$ M)                    |
| 1 $\mu$ l     | 3' Oligonukleotid (10 $\mu$ M)                    |
| 2 $\mu$ l     | DNA Matrize (1/10 Verdünnung)                     |
| ad 20 $\mu$ l | H <sub>2</sub> O                                  |

**Amplifikationsbedingungen der Echtzeit-PCR mit *touch-down*:**

**Aktivierung der „Hot start“ Polymerase**

|      |        |                            |
|------|--------|----------------------------|
| 95°C | 10 min | Aktivierung der Polymerase |
|------|--------|----------------------------|

***Touch down*:**

|                      |        |  |
|----------------------|--------|--|
| 95°C                 | 20 sek | Denaturierung des DNA-Doppelstrangs          |
| 65-60°C (1°C/Zyklus) | 20 sek | Anlagerung und Extension der Oligonukleotide |
| 72°C                 | 20 sek | Elongation der DNA-Matrize                   |

**Amplifikation:**

|      |        |  |        |
|------|--------|--|--------|
| 95°C | 20 sek | Denaturierung des DNA-Doppelstrangs          | } x 45 |
| 60°C | 20 sek | Anlagerung und Extension der Oligonukleotide |        |
| 72°C | 20 sek | Elongation der DNA-Matrize                   |        |

**Schmelzkurve:**

|                       |        |   |
|-----------------------|--------|---|
| 95°C                  | 20 sek | Denaturierung des DNA-Doppelstrangs         |
| 40°C-95°C (0,2°C/sek) |        | Dauerhafte Messung der Fluoreszenz bis 95°C |

### Kühlung der Kapillaren:

40°C            30 sek

### 3.2.8 *In vitro*-Mutagenese

Punktmutationen von ein oder mehreren Nukleotiden, Aminosäure-Austausche, sowie Deletionen von mehreren Aminosäuren wurden mit Hilfe des „*Quick Change Site-Directed Mutagenesis System*“ (Stratagene, La Jolla, USA) eingeführt. Hierfür wurde das zu mutierende Plasmid mit zwei zueinander komplementären Oligonukleotiden, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten, in einer PCR-Reaktion nach folgendem Schema eingesetzt:

5 µl Reaktionspuffer  
1 µl Plasmid (50ng/µl)  
1 µl Oligonukleotid A (125ng/µl)  
1 µl Oligonukleotid B (125ng/µl)  
1 µl dNTP-Mix (jeweils 10mM)  
1 µl *Pfu Turbo* DNA-Polymerase  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O

PCR-Bedingungen:            1x    95°C   30 sec  
                                     18x    95°C   30 sec  
    55°C   1 min  
    68°C   1 min/kb  
                                     1x    68°C   15 min

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Sequenz der Oligonukleotide und Größe des Plasmids angepasst. Die parentale, nicht mutierte Plasmid-DNA wurde nach der PCR-Reaktion durch Zugabe von 1 µl DpnI 1 h bei 37°C verdaut. Für die Transformation in *E. coli* wurden jeweils 1-4 µl des Ansatzes und 50 µl XL1-Bakterien verwendet.

### 3.3 Zellkulturmethoden

Die hier verwendeten adhärennten Zelllinien wurden bei 37°C, 6 % CO<sub>2</sub> und 80-90 % Luftfeuchtigkeit mit geeignetem Medium in Zellkulturflaschen gehalten. Alle Arbeiten mit den Zelllinien fanden unter einer Sterilbank statt.

### **3.3.1 Kultivierung von RTS3b, HeLa, SiHa, Caski, Retro Pack PT67 und C33a-Zellen**

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA je nach Zelllinie für 2-6 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und danach in neue Gewebekulturflaschen je nach Bedarf und Wachstumsverhalten der Zelllinie 1:3 bis 1:12 ausgesät.

### **3.3.2 Kultivierung von NHEK**

NHEK der 3. Passage wurden aufgetaut, indem die Zellen eines Einfrierröhrchens auf eine 150 cm<sup>2</sup> und eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem KGM-2 Medium ersetzt. Bei einer Konfluenz von 60-80 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen, 2,5 ml, bzw. 5 ml Trypsin hinzugegeben und die Zellen 5 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml, bzw. 5 ml TNS gestoppt und in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Restliche, in der Flasche verbliebene Zellen wurden in 5 ml HBSS resuspendiert und ebenfalls in das Röhrchen überführt, indem die Zellen dann 5 min bei 200 g pelletiert wurden. Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl verworfen und die Zellen in diesem restlichen Medium durch Erschütterung des Röhrchens resuspendiert. Danach wurde je nach weiterem Vorhaben eine entsprechende Menge KGM-Medium in das Röhrchen gegeben und die Zellen gezählt oder 1:6 geplittet.

### **3.3.3 Einfrieren und Lagerung von Zellen**

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen, die in einer Gewebekulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) zu 70-80 % konfluent gewachsen waren, trypsiniert, in Medium aufgenommen, bei 250 g pelletiert und anschließend mit PBS gewaschen. Nach erneutem Pelletieren wurden die Zellen in 4,5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1,5 ml in Einfrierröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte umgehend bei -80°C.

### **3.3.4 Zellzahlbestimmung**

Um die genaue Anzahl von Zellen in einer Suspension zu bestimmen, wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet, die eine Tiefe von 0,1 mm und einer Gesamtfläche von 0,002 m<sup>2</sup> aufweist. Nach Auflegen eines Deckglases wurde ein Aliquot der zuvor gut gemischten Zellsuspension in den Zwischenraum gegeben und die Zellzahl in vier Hauptquadranten

bestimmt. Der gebildete Mittelwert entspricht der Zellzahl multipliziert mit  $10^4$  in 1 ml Zellsuspension.

### **3.3.5 Transfektion eukaryoter Zellen**

#### **3.3.5.1 Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation**

Für die Transfektion von C33a-Zellen wurde die Calciumphosphat-Methode angewandt (Chen *et al.*, 1987). Zunächst wurden  $3,16 \times 10^6$  Zellen in eine Zellkulturschale (10 cm Ø) ausgesät. Am nächsten Tag wurde die zu transfizierende DNA-Menge (bis zu 17,5 µg) mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 430 µl aufgefüllt. Unter der Sterilbank wurden zunächst 493 µl 2x HBS hinzugegeben und anschließend 63 µl 2 M CaCl<sub>2</sub>, woraufhin die Probe sofort 15 sec auf dem Vortexer gemixt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde das Präzipitat dann vorsichtig ins Medium gegeben. Die Schalen wurden leicht geschwenkt und über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Morgen wurde das präzipitathaltige Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 ml frisches Medium hinzugefügt. Die Ernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

#### **3.3.5.2 Transfektion mittels „FuGENE 6“**

Die transiente Transfektion in RTS3b Zellen erfolgte mittels „FuGENE“. Zu diesem Zweck wurden 24 h vor der Transfektion  $0,33 \times 10^5$  Zellen in einer 12-Loch-Platte ausgesät. Pro µg zu transfizierende DNA wurden 2 µl FuGENE verwendet, das zunächst in 50 µl OptiMEM (Invitrogen, Karlsruhe) oder serumfreies Medium gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde dieses Gemisch zur DNA pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden dann vorsichtig auf die Zellen getropft, die Platten danach leicht geschwenkt und bis zur Ernte für 40-48 h in den Brutschrank gestellt.

### **3.3.6 Ernte der transfizierten Zellen mittels chemischen Zellaufschluss**

Da RTS3b-Zellen besonders fest am Boden haften, können sie während des Abkratzens mit dem Gummischaber beschädigt werden und dadurch einen Großteil ihrer Luciferase-Aktivität verlieren. Aus diesem Grund erfolgte der Zellaufschluss chemisch mit NP40.

Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurden 150 µl Zellaufschlusspuffer auf die Zellen gegeben und 5min bei RT inkubiert. Der Überstand konnte direkt, oder nach Abzentrifugation von Zellresten für die Luciferaseanalysen eingesetzt werden.

### **3.3.7 Luciferase-Test**

Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte im Lumat LB9501 (Berthold, Wildbad). Nach zwei Waschsritten mit Luciferase-Reaktions-Puffer wurde, je nach Aktivität des Reporterkonstruktes, ein Aliquot des Zellextraktes in ein 5 ml-Messröhrchen (Sarstedt) gegeben, welches unmittelbar danach in den Lumat gestellt wurde. Nach Injektion von 300 µl Luciferase-Reaktions-Puffer (1:100 versetzt mit D-Luciferin) wurde die Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sek gemessen. Der ermittelte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der exprimierten Luciferase.

### **3.3.8 Erzeugung von Zellextrakten**

#### **3.3.8.1 Herstellung von Kernextrakten aus eukaryoten Zellen**

Kernextrakte wurden nach Schreiber, E. et al. (1989) hergestellt. Die Zellen einer 10 cm Ø-Schale wurden zwei mal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend wurde der Überstand sorgfältig abgenommen. Es folgte das Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber in 400 µl Puffer A und eine 15-minütige Inkubation der Zellsuspension auf Eis. Nach Zugabe von 25 µl 10% NP40 wurden die Proben sofort 10 sec auf dem Vortexer gemixt und anschließend 30 sec bei 4°C und 21000 g zentrifugiert, um die Kerne zu pelletieren. Das Pellet wurde je nach Größe in 30-100 µl Puffer C aufgenommen und 30-120 min im Kühlraum (4°C) auf einem Rüttler inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 21000 g wurde der Überstand aliquotiert und sofort für eine Proteinbestimmung nach Bradford und anschließende Experimente verwendet oder bei -80°C gelagert.

#### **3.1.2.2 Herstellung von Ganzzellextrakten aus eukaryoten Zellen**

Die Zellen einer 10 cm Ø-Schale wurden zunächst zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen und anschließend in 400 µl 0,1 M LSDB mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf Reagiergefäß überführt. Nach fünfminütigem Sonifizieren in Eiswasser wurden die Zelltrümmer bei 21000 g und 4°C 10 min pelletiert und 1-2 µl des Überstandes zur Proteinbestimmung nach Bradford herangezogen. Die Lagerung der Proteinüberstände erfolgte bei -80°C.

### 3.3.9 Retrovirale Infektion

#### 3.3.9.1 Herstellung rekombinanter Retroviren

Für die Herstellung rekombinanter Retroviren wurde die Verpackungszelllinie pT67 verwendet. Zunächst wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit jeweils  $3 \mu\text{g}$  pLXSN-HPV16E6, bzw. mit dem Leervektor pLXSN mittels FuGENE transfiziert. 48 h nach der Transfektion begann die Selektion mit  $500 \mu\text{g/ml}$  G418. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und anschließend im Selektionsmedium ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte am folgenden Tag und ab dann alle zwei Tage mit G418-haltigem Medium. Die Selektion wurde abgeschlossen, wenn die untransfizierten pT67 Zellen gestorben waren und man die Zellen 1:6 auf eine große Zellkulturflasche aussäen konnte. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurde die Virusproduktion eingeleitet. Hierzu wurden die stabil transfizierten Zellen in 16 ml DMEM bei  $30^\circ\text{C}$  und 10 %  $\text{CO}_2$  24 h kultiviert. In dieser Zeit stellten die Zellen die Retroviren her und gaben sie ins Medium ab. Diese Virus enthaltenden Überstände wurden aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.9.2 Infektion von HeLa-Zellen mit Retroviren

Für die retrovirale Infektion wurden  $5 \times 10^4$  HeLa-Zellen pro 6-Loch ausgesät. Die Infektion erfolgte nach 24 h und bei einer Konfluenz von 30-40 %. Zunächst wurde das Medium abgenommen und gegen 2 ml MEM, das zuvor mit  $5 \mu\text{g/ml}$  Polybrene (Sigma-Aldrich) versetzt wurde, ausgetauscht. Die Zellen wurden dann 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. In der Zwischenzeit wurde in einem sterilen Glasbehälter (Polybrene ist plastikadhärent) pro Ansatz 2 ml MEM ohne Zusätze, Polybrene mit einer Endkonzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$ , sowie 2 ml des jeweiligen infektiösen Überstandes frisch angesetzt. Nach Ablauf der o.g Inkubationszeit wurde das Polybrene-haltige Medium gegen das frisch vorbereitete Medium, das den infektiösen Überstand enthielt, ausgetauscht. Die Platten wurden dicht verschlossen und 1 h bei 300 g bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in Serum-haltigem MEM bei  $37^\circ\text{C}$  weiter kultiviert. 48 h nach der Infektion begann die Selektion mit  $1000 \mu\text{g/ml}$  G418 in MEM. Nach zwei Tagen konnten die Zellen unter Selektionsdruck auf eine 10 cm  $\varnothing$ -Schale ausgesät werden und nach weiteren vier Tagen waren die nicht infizierten HeLa-Zellen der Kontrollplatte gestorben, so dass die RNA-Isolation der infizierten HeLa-Zellen durchgeführt werden konnte.

### 3.4 Proteinmethoden

#### 3.4.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden in BL21-pLysS-Bakterien exprimiert. Für die Isolierung der Fusionsproteine wurden 200 ml LB-Medium mit 5 ml einer dichten Vorkultur der Bakterien angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.6-0.9 inkubiert. Zur Selektion wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 2 h bei 30, bzw. 37°C. Anschließend wurden die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 3000 g pelletiert und in 5 ml 500 mM LSDB resuspendiert. Zusätzlich erfolgte ein physikalischer Aufschluss der Bakterien durch viermaliges Sonifizieren bei 100 Watt. Dabei wurden die Proben nach jedem Sonifizierungsschritt sofort wieder auf Eis gestellt. Die unlöslichen Zelltrümmer wurden 10 min bei 4°C und 21000 g abzentrifugiert und der Überstand in 2 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

Die im Zellextrakt befindlichen GST-Fusionsproteine wurden über Glutathion-Agarose (Biontex) aufgereinigt. Hierbei wird das an der Oberfläche der Agarose exponierte Glutathion sehr effizient und spezifisch von dem GST-Fusionsanteil gebunden. Pro Ansatz wurden 15 µl Agarose mit 1 ml H<sub>2</sub>O und anschließend mit 1 ml 500 mM LSDB gewaschen und äquilibriert. Bei jedem Waschschrift wurden die Agarosekügelchen zunächst durch mehrmaliges Invertieren des Reagiergefäßes mit der umgebenden Lösung vermischt und anschließend für 1 min bei 1000 g pelletiert und der Überstand verworfen.

Für eine Testaufreinigung wurden zwei Mengen (50 µl und 250 µl) Bakterienextrakt auf die zuvor äquilibrierte Agarose-Matrix gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 4°C in einem Rollinkubator inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde anschließend insgesamt viermal mit 1 M LSDB und zweimal mit 100 mM LSDB gewaschen. Durch Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-minütiger Inkubation der Proteine bei 95°C wurden die Proteine von den Agarosekügelchen gelöst und anschließend über ein SDS-PAG aufgetrennt. Das Anfärben der Proteinbanden erfolgte in einem Coomassie-blau-Bad. Das Gel wurde nach dem Entfärben schließlich im Gelrockner für 1 h bei 80°C getrocknet.

#### 3.4.2 *In vitro*-Translation

Für die *in vitro*-Translation von Proteinen wurde das „TNT *Coupled Reticulocyte Lysate* System“ (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteine wurden hierbei entweder mit <sup>35</sup>S-Methionin und/oder <sup>35</sup>S-Cystein radioaktiv markiert.

### 3.4.3 Degradations-Assay

Die Degradationsanalysen erfolgten mit  $^{35}\text{S}$ -Cystein markierten und *in vitro* translatierten Proteinen bei 30°C. Zunächst wurden die zu untersuchenden Proteine 90 min bei 30°C translatiert. 1 bzw. 3 µl des Ansatzes wurde mit 5 µl 2x SDS Probenpuffer versetzt und nach dem Aufkochen bei 95°C bei -20°C gelagert. Diese Probe diente als Kontrolle der Ausgangsmenge an Translationsprodukt und wurde mit t=0 bezeichnet. Jeweils 1 µl des zu untersuchenden Proteins wurde mit bis zu 3 µl IVT HPV16E6 3 Stunden und/oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden diese Proben auch in 5 µl 2x SDS Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und mit den Proben t=0 auf einem PAG aufgetragen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte nach Trocknen des Gels mit einem radiosensitiven Film.

### 3.4.4 Protein-Protein-Interaktionsstudien

Für Interaktionsstudien wurden GST-Fusionsproteine mit *in vitro*-translatierten Proteinen inkubiert.

Die GST-Fusionsproteine wurden, wie oben beschrieben, aufgereinigt und in 200 µl 100 mM LSDB aufgenommen. Hierzu wurden 10 µl eines *in vitro*-Translationsansatzes des jeweiligen  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteins gegeben. Das Gemisch wurde 2 h auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Um unspezifische Interaktionen zu minimieren wurde der Ansatz anschließend bis zu sechsmal mit 0,1-0,3 M KCl LSDB gewaschen, wobei der letzte Waschschrift immer mit 0,1 M LSDB erfolgte. Bei jedem Waschschrift wurden die Proben 1 min unter leichtem Schütteln inkubiert, dann 1 min bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Agarose-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen wurden dann in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Die im Probenpuffer denaturierten Proteine wurden über ein SDS-PAG aufgetrennt.

Für den Nachweis gebundener *in vitro*-translatierter Proteine wurde das Gel 30 min im Coomassie-blau-Bad gefärbt, in Entfärber entfärbt und zur Verstärkung des Signals 10-30 min in Amplifizierer inkubiert und zum Schluss eine Stunde im Geltrockner getrocknet. Das Gel wurde schließlich über Nacht bei -80°C in einer Autoradiographie-Kassette auf einem radiosensitiven Film exponiert.

### 3.4.5 Ko-Immunpräzipitationen

Für Ko-Immunpräzipitationen mit GST-Fusionsproteinen wurden 50 µg GZE aus C33a-Zellen, in denen CEBP $\alpha$  überexprimiert wurde, zu den an Agarose gekoppelten GST-Fusionsproteinen gegeben und 2 Stunden im Rollinkubator bei 4°C inkubiert. Die

gebundenen und mittels Agarose präzipitierten Proteine wurden viermal mit 0,1 M LSDB gewaschen und durch Zugabe von 20 µl 2xSDS-Probenpuffer und einer 5 minütigen Inkubation bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proteine im PAG aufgetrennt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen

### **3.4.6 Elektrophorese von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAG)**

Die Auftrennung von Proteinen nach Ladung und Gewicht erfolgte je nach Größe der zu untersuchenden Proteine in einem denaturierendem Polyacrylamidgel (PAG) unterschiedlicher Konzentration (von 6-15 %) nach dem Protokoll von Laemmli, U.K. (1970) in Gelkammern der Firma Biorad (München). Die anschließende Visualisierung der Proteine erfolgte durch Anfärben in einem Coomassie-blau-Bad.

### **3.4.7 Western Blot**

Für Western Blot Analysen wurden die über ein SDS-PAG aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde die Membran auf dem PAG zwischen je zwei Whatmanpapieren und zwei in Transfer-Puffer getränkten Schwämmen zwischen zwei Plastikplatten mit Druck fixiert und in die Blot-Kammer (BioRad, München) so eingesetzt, dass sich die Membran zwischen dem Gel und der Anode der Kammer befand. Zur Analyse von p300 wurde eine Stunde eine Spannung von 80 Volt und dann über Nacht eine Spannung von 35 Volt angelegt. Für alle weiteren Proteine wurde eine Spannung von 35 Volt über Nacht angelegt.

Nach dem Transfer erfolgte das Anfärben der Proteine mit einer *Ponceau*-Rot-Lösung. Durch Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde die Hintergrundfärbung entfernt, um die Markerbanden nachzeichnen zu können. Die Membran wurde anschließend mit 15 ml TBST wieder vollständig entfärbt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen der Membran zu verhindern, wurde sie 1 h in 25 ml Abblocklösung auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf Parafilm gelegt, mit 1-2 ml einer Verdünnung (4 % Magermilchpulver in TBST) des 1. Antikörpers überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Es folgten drei 10-minütige Waschschrte mit jeweils 15 ml TBST. Danach wurde die Membran wieder auf Parafilm mit 1-2 ml einer Verdünnung des 2. Antikörpers überschichtet und 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend viermal 10 min in 15 ml TBST gewaschen und dann auf Parafilm mit 1,5 ml „*BM Chemiluminescent Blotting Substrate*“ (Roche, Mannheim), welches 20 min zuvor angesetzt wurde, für 60-120 sek überschichtet. Das in der Lösung enthaltene Luminol wurde nun von der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase unter Lichtemission umgesetzt. Nach Abtropfen der Membran wurde sie zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Expositions-Kassette fixiert, in der

die Belichtung des ECL-Films erfolgte. War die Lichtemission jedoch sehr stark, konnte die Chemilumineszenz in einer Geldokumentationsanlage der Firma BioRad (München) detektiert werden. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Programm „Quantity One“ der Firma BioRad (München).

### 3.4.8 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford, M.M. (1976) bestimmt. 1 µl der Protein haltigen Lösung wurde in 96-Loch-Platten mit 150 µl des 1:5 verdünnten Protein-Assay-Reagens (BioRad) versetzt. Zusätzlich wurde auf dieser Platte eine BSA-Verdünnungsreihe als Eichkurve angelegt. Anschließend wurde die OD<sub>620</sub> in einem Spektralphotometer (Spectra, Tecan, Crailsheim) bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

## 3.5 Protein-DNA-Interaktionsstudien

### 3.5.1 Chromatin-Immunoprecipitations Assay (ChIP)

Der ChIP-Assay dient zum Nachweis von DNA-Protein-, sowie Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Das Prinzip dieser Methode ist die Ko-Präzipitation von DNA über spezifische Antikörper gegen daran gebundene Proteine.

Die verwendete Zellzahl durfte 1x10<sup>6</sup> Zellen nicht überschreiten. In das Medium einer 10 cm Ø-Schale wurden 270 µl einer 37 %igen Formaldehydlösung gegeben und anschließend 10 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt bedingt die chemische Kreuzvernetzung der Protein mit der DNA. Nach zwei Waschschritten mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und 4 min bei 4°C und 250 g pelletiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 200 µl SDS-Lysis-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen aufzubrechen und die DNA in ca. 300 Nukleotide große Stücke zu zerkleinern, wurden die Proben zweimal je 7 min im 30 sek Takt in Eiswasser sonifiziert (Bioruptor, Diagenode, Liège, Belgien). Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 21000 g wurde der Zellüberstand 10-fach mit *ChIP-Dilution Buffer* verdünnt und je 20 µl entnommen, die als Kontrolle der eingesetzten Menge (*Input*) dienen.

Zur Reduktion unspezifischer Bindung von Proteinen an die Protein A-, bzw. G-Sepharose wurde der verdünnte Zellüberstand mit 75 µl sssDNA/Protein A/G Agarose versetzt und 30 min bei 4°C im Rollinkubator inkubiert. Die Agarose wurde bei 4°C und 200 g pelletiert. Die Präzipitation der gewünschten Proteine und die daran gebundene DNA erfolgte durch Zugabe von 2 µg eines spezifischen Antikörpers über Nacht bei 4°C im Rollinkubator. Zur Immobilisierung der Antikörper wurden 60 µl sssDNA Protein A/G Sepharose hinzugegeben

gefolgt von einer weiteren Stunde Inkubation bei 4°C im Rollinkubator. Je nach Versuch wurde 1-2 mal mit *Low salt*, 1-4 mal mit *High salt*, 1-2 mal mit dem *LiCl Immune Complex Wash Buffer* und anschließend zweimal mit TE Puffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Ansätze 5-10 min im Rollinkubator bei 4°C inkubiert, bevor sie bei 4°C und 200 g pelletiert wurden.

Zur Amplifikation der präzipitierten DNA mussten die Nukleoproteinkomplexe von der Agarose getrennt werden. Zu diesem Zweck wurden je 2 x 250 µl Elutionspuffer zugefügt, kurz auf dem Vortexer gemixt und anschließend in einem Rollinkubator je 15 min bei RT invertiert. Nach der Zentrifugation wurde das Eluat vereinigt und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 20 µl 5 M NaCl wurde die Quervernetzung der DNA mit den Proteinen in einer vierstündigen Inkubation bei 65°C wieder aufgelöst. Die zuvor entnommenen *Input*-Proben wurden ebenfalls dieser Inkubation unterzogen. Bevor die DNA über eine Phenol/Chloroform-Fällung präzipitiert wurde, erfolgte eine einstündige Inkubation mit 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,5 und 2 µl 10 mg/ml Proteinase K bei 45°C. Als Trägersubstanz wurde den Ansätzen bei der Fällung 30 µg Hefe tRNA zugeführt. Die DNA Pellets wurden in 50 µl TE Puffer aufgenommen und im Light Cycler (Roche) mit spezifischen Oligonukleotiden, die die zu untersuchende DNA-Sequenz flankierten, quantifiziert.

### 3.5.2 Gelretardierungsanalysen „EMSA“

Der EMSA dient zur Analyse der Bindungsfähigkeit eines Proteins an DNA *in vitro*. Die zu untersuchenden Proteine wurden mit 250 pg des radioaktiv markierten Oligonukleotids in 20 µl Bindungspuffer 20 min bei 4°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 5%-PAG bei einer Spannung von 160 V in TBE-Puffer. Das Gel wurde 15 min fixiert und 1 h bei 80°C getrocknet. Die Visualisierung erfolgte mittels Exposition eines Röntgenfilm bei -80°C.

### 3.6 Radioaktive Markierung von DNA

Die Oligonukleotide für das Gelretardierungsexperiment wurden durch die Polynukleotidkinase des Phagen T4 am 5`-Ende radioaktiv markiert. Das Enzym katalysiert den Transfer des γ-Phosphats von ATP an das 5`OH-Ende der DNA. Für die radioaktive Markierung von 20 ng doppelsträngiger DNA wurden 5 µCi <sup>32</sup>P-γ-ATP (5000 Ci/mmol) verwendet. Die Reaktion fand eine Stunde bei 37°C im Kinase-Puffer (66 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 15 mM DTT; 1 mM Spermidin) mit 10 U Enzym in einem

Reaktionsvolumen von 5 µl statt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen auf 65°C für 10 min.

### 3.7 RNA-Methoden

#### 3.7.1 RNA Isolierung aus eukaryoten Zellen

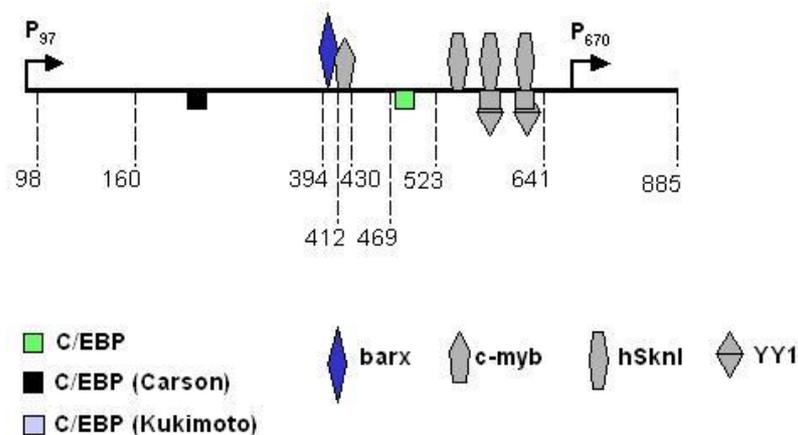
Zur Isolierung der Gesamtzell-RNA wurden die Reagenziensysteme der Firmen Qiagen (Hilden) und Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit einem  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigen Puffer lysiert, mit einem Gummischaber abgekratzt und über die QIAshredder-Säulen (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Das Eluat wurde nach Angaben des Herstellers für die weitere RNA-Isolation mit dem *Micro to Midi Total RNA Isolation Kit* der Firma Invitrogen verwendet. Dabei wurde die RNA säulenchromatographisch durch Adsorption an eine Silica-Gel-basierte Membran isoliert. Zusätzlich wurde die DNA, die trotz hoher RNA-Affinität der Säulen gebunden hatte, nach dem ersten Waschschrift durch RNase freie DNase abgebaut (Qiagen, Hilden). Die RNA wurde am Ende in RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und ihre Konzentration spektrometrisch bei einer OD von 260 nm im NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) bestimmt.

#### 3.7.2 Reverse Transkription

Um die Sensitivität einer RT-PCR zu erhöhen, empfiehlt es sich, die Reverse Transkription in einer von der PCR unabhängigen Reaktion durchzuführen. 2 µg der wie in 3.7.1 erhaltenen zelluläre Gesamt-RNA wurde zunächst laut Protokoll des *Micro to Midi Total RNA Isolation Kits* (Invitrogen, Mannheim) in einem 50 µl Ansatz in cDNA transkribiert. Im weiteren Verlauf wurden jeweils 2 µl einer 1:10-Verdünnung dieser cDNA in einer Echtzeit-PCR im Light Cycler (Roche) eingesetzt.

## 4 Ergebnisse

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine schwache Aktivierung der HPV16-Genexpression durch geringe Mengen E2 nach Koexpression von p300 deutlich stimuliert wurde. Neben hohen Mengen an p300, benötigte dies Sequenzen stromabwärts des frühen Promotors. Vermutlich muss p300 über direkte Interaktion mit zellulären Transkriptionsaktivatoren, deren Bindestellen (BS) stromabwärts des P<sub>97</sub> liegen, an die DNA geholt werden, um in Kooperation mit E2 zu aktivieren. Um potentielle BS für solche Transkriptionsfaktoren zu finden, wurde eine computergestützte Analyse des Sequenzabschnitts zwischen den beiden Promotoren P<sub>97</sub> und P<sub>670</sub> mit dem Programm *MatInspector* durchgeführt.



**Abb. 8: HPV16-Sequenz von Position 97 bis 885**

Die mittels *MatInspector* ermittelten BS zellulärer Transkriptionsfaktoren und eine Auswahl bereits bekannter BS sind mit ihrer Position (s. Zahlenangaben) im HPV16-Genom eingezeichnet. Die Legende der einzelnen Proteine befindet sich am unteren Bildrand.

Die Abb. 8 zeigt eine schematische Darstellung der Region des HPV16-Genoms von Position 97-885. Zwischen Position 394 und 412 liegt eine Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor barx (ACCTACTAATTGTGTTG). Angrenzend befindet sich ein Erkennungsmotiv für c-Myb (ATTAAGTGTCAAA). Eine *in vivo*-Bindung von c-Myb, dessen Expression im Zuge der Differenzierung zunimmt, ist an diese Region von HPV16 bereits beschrieben (Carson, A. & S. A. Khan, 2006). Allerdings wurde ein Einfluss auf die Promotoraktivität bislang nicht untersucht. Ebenso ist unbekannt, ob der Transkriptionsfaktor barx eine Rolle bei der Regulation der HPV16-Genexpression spielt. Weiterhin ergab die

Computeranalyse eine potentielle BS für C/EBP-Faktoren (optimale Sequenz: 5' RTTGCGYAAAY 3' (R = A oder G / Y = C oder T) (Kyo, S. et al., 1993), die bisher nicht charakterisiert war:

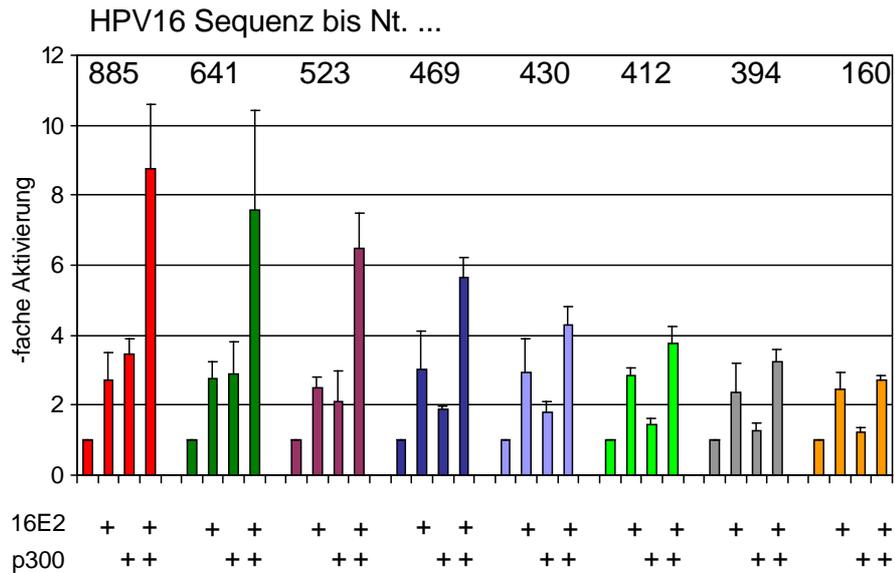
an Position 469-488 des Gegenstrangs mit der Erkennungssequenz  
5' TTATATTATGGAATCTTTG 3'

### **4.1 Der Sequenzabschnitt bis Nt. 523 ist notwendig für die kooperative Aktivierung des P<sub>97</sub> durch E2 und p300**

Um die Sequenzen 3' des P<sub>97</sub> einzugrenzen, die eine kooperative Aktivierung der frühen HPV16-Genexpression durch E2 und p300 vermitteln, wurden Deletionsmutanten des HPV16LCR-E7-Luc Reporterkonstruktes generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass durch das schrittweise Verkürzen keine der potentiellen BS für Transkriptionsfaktoren zerstört wurden. Die Nukleotidpositionen der verschiedenen HPV16LCR-E7-Luc-Deletionsmutanten sind in der Abb. 9 angegeben.

Das Reporterkonstrukt bis Nt. 885, das HPV16LCR-E7-Luc entspricht, konnte durch Expression geringer E2-Mengen 2,9-fach aktiviert werden (s. Abb. 9). Die Überexpression von p300 resultierte in einer 3,6-fachen Steigerung der Luciferaseaktivität. Nach Ko-Expression von E2 und p300, wurde die Promotoraktivität im Vergleich zur Basalaktivität um das 8,7-fache gesteigert. Dies bestätigt, dass E2 und p300 bei der HPV16-Genexpression kooperieren, da die annähernd 9-fache Aktivierung deutlich über der Summe der Einzelaktivierungen liegt.

Das Verkürzen der Reporterkonstrukte führte zu keiner signifikanten Reduzierung der Aktivierung durch 16E2. Alle Reporterkonstrukte zeigten bei Expression von 16E2 eine ca. 2,7-fache Aktivierung. Die p300-abhängige Stimulation nahm jedoch sukzessive von 3,6-fach, über 2-fach bei Nt.469-Luc bis hin zu 1,2-fach ab nach Deletion der Sequenzen bis Nt. 394. Mit zunehmendem Verlust der p300-Aktivierung verringerte sich auch die Stimulation nach Ko-Expression von E2 und p300. Während die kooperative Aktivierung mit HPV16LCR-E7-Luc bei fast 9-fach lag, wurden die Promotoren im Reporterkonstrukt Nt.160-Luc nicht ganz dreifach aktiviert. Die Deletion des Sequenzbereiches zwischen den Nukleotiden 523 und 430 schien dabei den Wendepunkt zwischen kooperativer und additiver Aktivierung zu markieren. Dies korrelierte mit dem Verlust der Aktivierung durch den Ko-Aktivator p300.



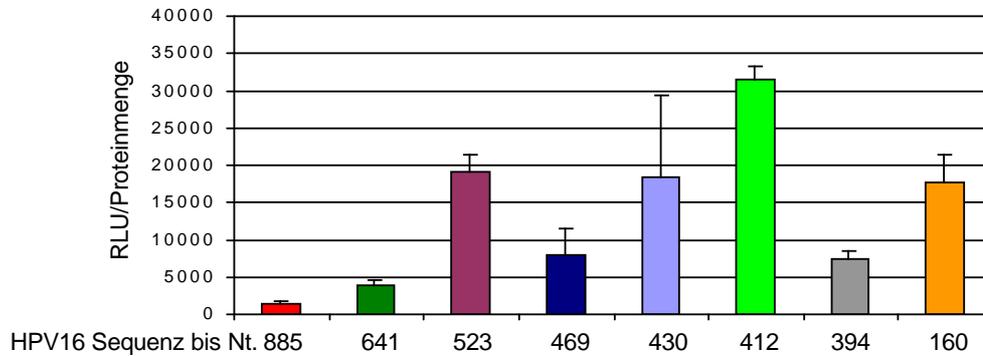
**Abb. 9: Die HPV16-Sequenz bis Nt. 523 ist notwendig für die kooperative Aktivierung durch E2 und p300**

Transiente Transfektion. RTS3b-Zellen wurden mit 1 ng des Expressionsplasmids CMV4-HPV16E2 und 500 ng CMV $\beta$ -p300-HA einzeln und in Kombination, wie in der Abbildung am unteren Rand angedeutet, mit je 500 ng des jeweiligen Reporterkonstruktes kotransfiziert. Alle Reporterkonstrukte enthalten die HPV16-LCR beginnend mit Nukleotid 7007 und enden an der jeweils im oberen Bildrand angegebenen Position im HPV16-Genom. Das Säulendiagramm stellt die fache Aktivierung dar, die sich ergibt, wenn die basale Luciferaseaktivität des Reporterkonstruktes eins gesetzt wird. Die Mittelwerte aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen sind angegeben.

Ein Vergleich der Luciferasewerte von Extrakten aus RTS3b-Zellen, die nur mit den HPV16-Reporterkonstrukten transfiziert wurden, verdeutlichte große Unterschiede (s. Abb. 10). Der Grundwert, d.h. die relative Lichtemission (RLU) pro Proteinmenge, nach Transfektion des Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc, lag im Durchschnitt bei 1000 RLU. Die Deletion der Sequenz von Nt. 885 bis 523 führte zu einem zwanzigfachen Anstieg der Basalaktivität. Dies könnte durch die Bindung von reprimierenden Transkriptionsfaktoren an diese Region erklärt werden. Die weitere Entfernung der Nukleotide bis Position 469 führte wiederum zu einem Abfall, was darauf hin weist, dass hier positiv agierende Faktoren binden. Ausgehend von diesem Nukleotid bis zur Position 412, erreichte die Basalaktivität den höchsten Wert (30000 RLU/Prot.). Dies bedeutet, dass in dem Bereich zwischen Pos. 469 und 412 mindestens zwei BS reprimierender Faktoren deletiert wurden. Das Verkürzen des Bereich bis Nt. 394 resultierte in einem erneuten Abfall der Basalaktivität bis auf einen Wert von ca. 5000 RLU/Prot.. Somit binden in dieser Region aktivierende Faktoren. Ein erneuter Anstieg und damit der Verlust negativ regulierender Elemente konnte bei der Mutante Nt.160-Luc beobachtet werden. Die Basalaktivität des Reporterkonstruktes HPV16LCR-Luc, das direkt nach dem P<sub>97</sub> endet (Pos.98), lag im Mittel zehnfach höher als die von HPV16-LCR-E7-Luc

## Ergebnisse

(Krüppel, U., 2004) und glich damit der Grundaktivität von Nt.469-Luc und Nt.394-Luc. Dies bedeutet, dass 3' des P<sub>97</sub> bis Nt. 160 negativ regulierende Faktoren binden.



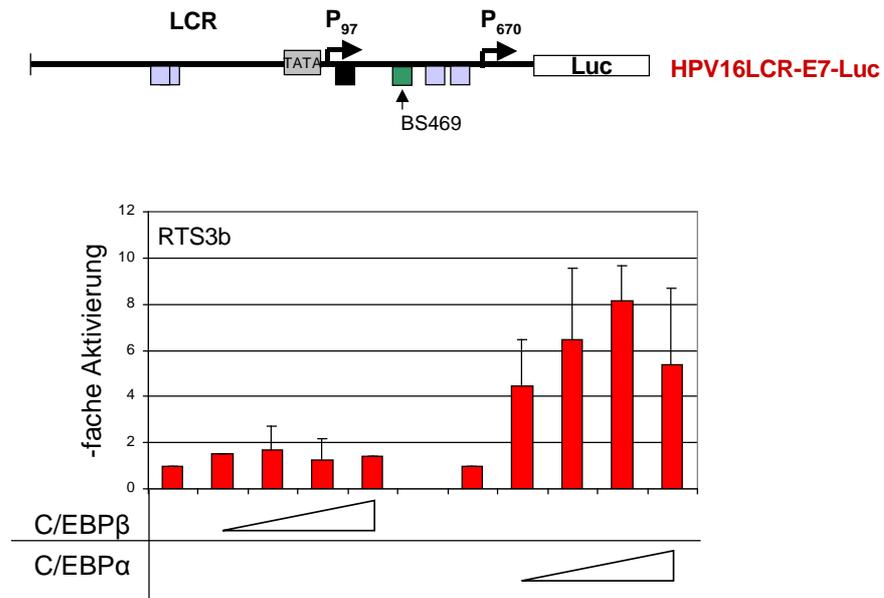
**Abb. 10: Basalaktivitäten der verkürzten Reporterkonstrukte**

Vergleich der Basalaktivitäten (RLU-Werte/Proteinmenge) der verkürzten Reporterkonstrukte. Der Median von drei voneinander unabhängigen transienten Transfektionen und die Standardabweichungen sind angegeben.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der transienten Transfektionen darauf hin, dass 1. der Bereich zwischen Pos. 97 und 885 für eine Reihe von BS für sowohl aktivierende als auch reprimierende zelluläre Transkriptionsfaktoren kodiert, und 2., dass der für die Kooperation notwendige Sequenzbereich zwischen den Nt. 523 und 430 liegt. Wie die Computeranalyse ergab, befindet sich innerhalb dieses Abschnitts eine potentielle BS für C/EBP-Faktoren.

### 4.2 C/EBP $\alpha$ ist ein kompetenterer Transkriptionsaktivator als C/EBP $\beta$

Um eine funktionelle Bedeutung dieser potentiellen C/EBP-BS für die Regulation der HPV16-Genexpression zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  auf die HPV16-Genexpression in transienten Transfektionen von RTS3b-Zellen unter Verwendung des Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc ermittelt. Dabei erwies sich C/EBP $\alpha$  als ein sehr kompetenter Transkriptionsaktivator. Es konnte die HPV16-Genexpression bis zu achtfach aktivieren (s. Abb. 11). C/EBP $\beta$  induzierte keinen deutlichen Effekt.



**Abb. 11: C/EBP $\alpha$  aktiviert HPV16LCR-E7-Luc bis zu achtfach, im Gegensatz zu C/EBP $\beta$**

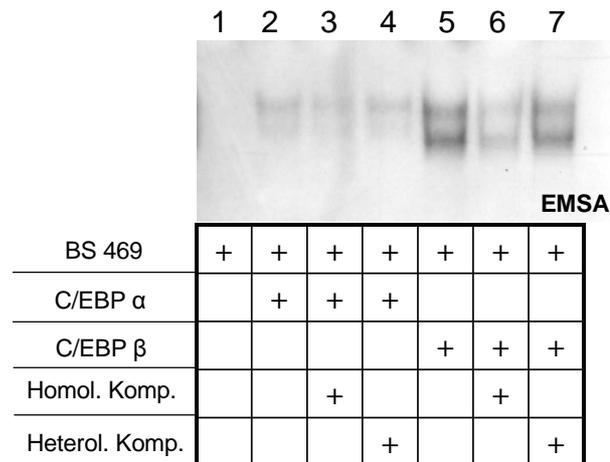
Transiente Transfektion von 10, 25, 50, 100 ng pcDNA-C/EBP $\alpha$ , bzw.  $\beta$  und dem Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc, das über dem Diagramm schematisch dargestellt ist. Die hier identifizierte C/EBP-BS in Pos. 469 sowie bereits bekannte C/EBP-BS sind eingezeichnet.

Die Expressionvektoren für barx und c-Myb wurde ebenfalls mit dem Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc einzeln und in Kombination mit den Expressionvektoren für E2 und p300 kotransfiziert. Beide Faktoren zeigten weder einen aktivierenden, noch einen reprimierenden Effekt und wurden deshalb nicht weiter untersucht (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 C/EBP $\alpha$ und $\beta$ binden an die BS 469

*MatInspector* schlägt BS für Transkriptionsfaktoren nach bestimmten Algorithmen vor. Um zu untersuchen, ob C/EBP-Faktoren die neu entdeckte potentielle BS tatsächlich *in vitro* binden, wurde ein Gelretardierungsexperiment (EMSA) durchgeführt. In dem folgenden EMSA wurden bakteriell exprimierte, GST fusionierte C/EBP $\alpha$ -, bzw.  $\beta$ -Proteine sowie ein Oligonukleotidpaar der vorgeschlagenen BS verwendet (s. Abb. 12).

## Ergebnisse



Sequenz der BS 469: 5' tatattatGGAAtct 3'

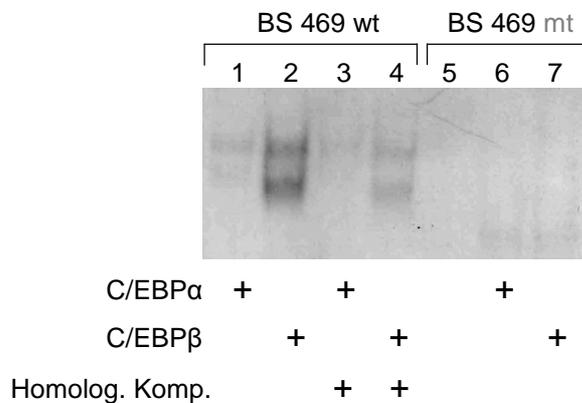
### Abb. 12: *In vitro*-Nachweis der Bindung von C/EBPα und β an die BS 469

EMSA mit 5 µg eines Bakterienextraktes, der die bakteriell exprimierte GST-C/EBPα-, bzw. GST-C/EBPβ-Proteine enthält, und 250 pg <sup>32</sup>P-markiertes doppelsträngiges Oligonukleotid, dessen Sequenz am unteren Bildrand angegeben ist. Die Nukleotide, die voraussichtlich den Kontakt mit dem Protein herstellen, sind in Großbuchstaben gedruckt. Die in rot angegebenen Nukleotide entsprechen der Konsensussequenz: 5' T(T/G)NNGNAA(T/G) 3'. Als heterologer Kompetitor, wurde die mutierte E2-BS 1 mit der Sequenz 5' ATCGAATTCTAT 3' verwendet. Unmarkierte BS diente als homologer Kompetitor.

Das Oligonukleotid, das die BS 469 der HPV16-Sequenz enthielt, wurde von GST-C/EBPα (Spur 2) und -β (Spur 5) gebunden. Wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide erkannt, entstanden bei beiden GST-C/EBP-Proteinen zwei Banden annähernd gleicher Intensität. Die Bindung von GST-C/EBPβ erschien deutlich stärker als die von GST-C/EBPα. Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurden ein homologer und ein heterologer Kompetitor eingesetzt. Zur homologen Konkurrenz wurde das gleiche Oligonukleotidpaar, das als Sonde diente, verwendet. Jedoch war es nicht radioaktiv markiert und lag im 750-fachen Überschuss vor. Die Inkubation in Gegenwart eines nicht markierten homologen Kompetitors führte bei beiden C/EBP-Proteinen zu Banden geringerer Intensität (Spuren 3 und 6). Keinen Einfluss auf die Bandenstärke hatte ein heterologer Kompetitor (Spuren 4 und 7). Somit können sowohl C/EBPα als auch β diese noch nicht beschriebene BS innerhalb des HPV16-Genoms binden.

#### 4.4 Mutation der C/EBP-BS 469

Um den Einfluss der Bindung von C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  an die BS 469 und auf die HPV16-Promotoraktivität zu untersuchen, sollte die Konsensussequenz der BS mutiert werden. Dabei wurden zwei Purine innerhalb der Kernerkennungssequenz ausgetauscht. Der Sequenzvergleich der mutierten BS mit bekannten Bindemotiven anderer Transkriptionsfaktoren ergab keine Übereinstimmung. Bevor das Oligonukleotidpaar für eine *In vitro*-Mutagenese verwendet wurde, sollte der Verlust, bzw. die Reduktion der Bindung von C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  an die mutierte Sequenz bestätigt werden.



BS 469 wt: 5` tatattatGGAAtct 3`

mt: 5` tatattatAGGAAtct 3`

**Abb. 13: C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  binden nicht mehr an die mutierte BS 469**

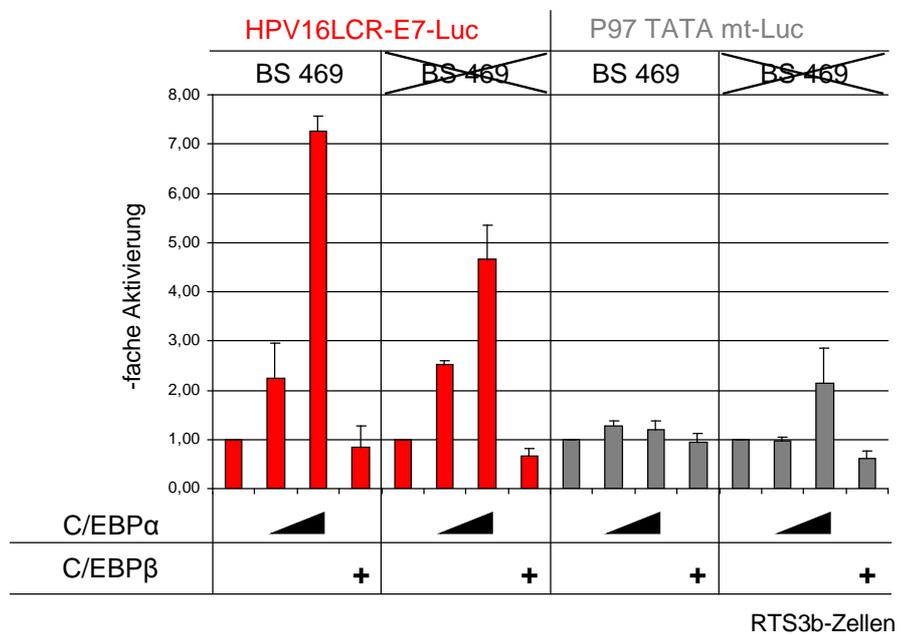
EMSA. 250 pg der radioaktiv markierten doppelsträngigen Oligonukleotide BS469wt und BS469mt wurden mit 5 $\mu$ g eines Bakterienextraktes, der GST-fusionierte C/EBP $\alpha$ -, bzw. C/EBP $\beta$ -Protein enthielt, inkubiert. In den Spuren 3 und 4 wurden die Ansätze, vor Zugabe des radioaktiv markierten Oligonukleotids, mit einem 1250-fachen Überschuss an doppelsträngigem, nicht radioaktiv markiertem wt-BS-Oligonukleotid inkubiert. Protein-DNA-Komplexe wurden mit Hilfe eines PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

Bei Verwendung eines 1250-fachen Überschusses an homologem Kompetitor zeigt der Vergleich der Spuren 1 mit 3 und 2 mit 4 der Abb. 13 eine deutliche Reduzierung der Bindung von GST-C/EBP $\alpha/\beta$  an die BS 469. Die niedrige Affinität von C/EBP $\alpha$  zur C/EBP-BS (wt) 469 war auch in diesem EMSA offensichtlich. Das Oligonukleotidpaar, das die Mutation enthielt, konnte weder von GST-C/EBP $\alpha$  noch von GST-C/EBP $\beta$  gebunden werden (Spuren 5-7). Dies demonstriert, dass diese Basenaustausche zum Verlust der Bindung der C/EBP-Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  *in vitro* führten.

#### 4.4.1 Die Mutation der BS 469 führt zur Reduktion der C/EBP $\alpha$ induzierten Aktivierung des P<sub>97</sub> und zur Aktivierung eines weiteren Promotors

Um den Effekt der Bindung von C/EBP $\alpha$ , bzw.  $\beta$  dem frühen oder dem späten Promotor von HPV16 zuordnen zu können, wurden zwei verschiedene Reporterkonstrukte als Matrize in der *In vitro*-Mutagenese eingesetzt. HPV16LCR-E7-Luc enthält beide Hauptpromotoren und diente zur Untersuchung der Aktivität des frühen Promotors. In P97TATAmt-Luc wurde die TATA-Box des frühen Promotors mutiert, so dass er inaktiv ist (Krüppel, U., 2004). Letzteres sollte dazu verwendet werden, den späten Promotor zu untersuchen, der normalerweise bei Transfektion dieses Reporterkonstruktes in RTS3b-Zellen von den Aktivitäten des frühen Promotors überlagert ist (Krüppel, U., 2004).

Um die Auswirkung der Mutationen zu untersuchen, wurden alle Reporterkonstrukte transient in RTS3b-Zellen transfiziert. Dabei wurden entweder 25, bzw. 50 ng des Expressionsvektors für C/EBP $\alpha$  oder 50 ng pcDNA-C/EBP $\beta$  kotransfiziert. Diese Mengen wurden gewählt, da sie in früheren Transfektionen (s. Abb. 11) eine Aktivierung der HPV16-Genexpression bewirkten.



**Abb. 14: Die C/EBP-BS 469 wird bei der Regulation der HPV16-Genexpression von C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  verwendet**

Transiente Transfektion. 500 ng der Reporterkonstrukte HPV16LCR-E7-Luc wt, HPV16LCR-E7-Luc BS469mt (beide in rot dargestellt), P97 TATA mt-Luc oder P97 TATA mt-Luc BS469mt (beide in grau dargestellt) wurden jeweils mit 25, bzw. 50 ng des Expressionsvektors für C/EBP $\alpha$  oder 50 ng des Expressionsvektors für C/EBP $\beta$  in RTS3b-Zellen kotransfiziert. Die Mittelwerte von fünf unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Überexpression von C/EBP $\beta$  (s. Abb. 14) führte zu einer schwachen Repression der Aktivität der jeweiligen Reporterkonstrukte (Vergleich s. Abb. 11). Die Effekte waren sehr gering und wurden durch die Mutation der BS469 nur leicht verstärkt.

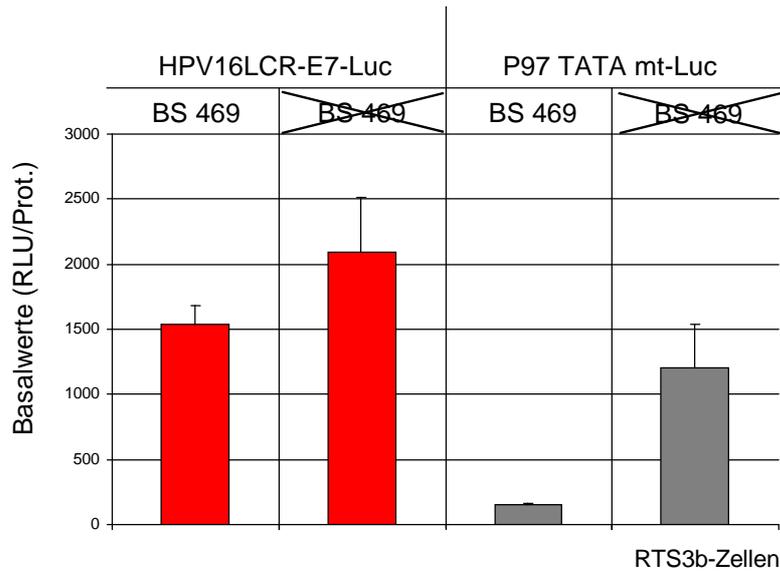
Die Genexpression des Wildtypkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc wurde durch Kotransfektion von 25 ng des Expressionsvektors für C/EBP $\alpha$  2,25-fach und bei Kotransfektion der doppelten Menge 7,25-fach aktiviert. Die Mutation der BS 469 verminderte diese Aktivierung auf 5-fach, während die Aktivierung durch die geringe Menge an C/EBP $\alpha$  annähernd gleich blieb (2,53-fach).

Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes P97 TATA mt-Luc lag an der Grenze zum messbaren Bereich und unterschied sich somit kaum von der Hintergrundaktivität untransfizierter Zellen (Krüppel, 2004). Erst nach Mutation der BS 469 und bei Kotransfektion von 50 ng pcDNA-C/EBP $\alpha$  lagen deutlich messbare Werte vor, so dass sich die fache Aktivierung nicht exakt bestimmen lässt.

Somit scheint die Bindung von C/EBP $\alpha$  an die BS 469 an der Aktivierung des P<sub>97</sub> beteiligt zu sein und einen weiteren Promotor zu reprimieren.

#### **4.4.2 Die Basalaktivitäten der verschiedenen Reporterkonstrukte wurden durch die Mutation der BS 469 entscheidend beeinflusst**

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse der transienten Transfektionen belegen, dass die Luciferase-Aktivität des Reporterkonstruktes P97 TATA mt-Luc BS469mt durch C/EBP $\alpha$  aktiviert werden konnte. Diese Aktivierung kann jedoch nicht auf eine Aktivität des P<sub>97</sub> zurück geführt werden, da dieser durch die Mutation der TATA-Box inaktiviert wurde, wie ich bereits früher zeigen konnte (Krüppel, U., 2004). Die Bindung von C/EBP $\alpha$  an diese BS bedingt anscheinend die Repression eines weiteren Promotors in diesem synthetischen Konstrukt. Die Betrachtung der Basalaktivitäten der einzelnen Reporterkonstrukte bei Kotransfektion der Leervektoren sollte dies bestätigen. Anhand der Basalaktivitäten der einzelnen Reporterkonstrukte ließe sich dann evtl. auch eine Aussage über den Einfluss von endogenem C/EBP $\alpha$  auf die BS 469 treffen.



**Abb. 15: Abhängigkeit der Basalwerte von der Mutation der C/EBP-BS 469**

Transiente Transfektion. Aus fünf Experimenten wurden die Basalaktivitäten der Wildtyp-Reporterkonstrukte HPV16LCR-E7-Luc (rot) und P97 TATA mt-Luc (grau) sowie den entsprechenden Mutanten, in denen die BS 469 mutiert wurde, gemittelt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Basalaktivität von HPV16LCR-E7-Luc lag im Durchschnitt bei 1500 RLU/Prot., erhöhte sich jedoch auf 2100 RLU/Prot. bei Mutation der BS 469 (s. Abb. 15). Das Reporterkonstrukt P97 TATA mt-Luc mit Mutation im Bereich der BS 469 hatte eine mindestens 1000-fach erhöhte Basalaktivität im Gegensatz zum Wildtypkonstrukt. Dies deutet darauf hin, dass ein in diesem Reporterkonstrukt vorhandener Promotor durch Bindung von C/EBP $\alpha$  an die BS 469 reprimiert wird. Endogene Mengen an C/EBP $\alpha$  sind für diese Repression bereits ausreichend.

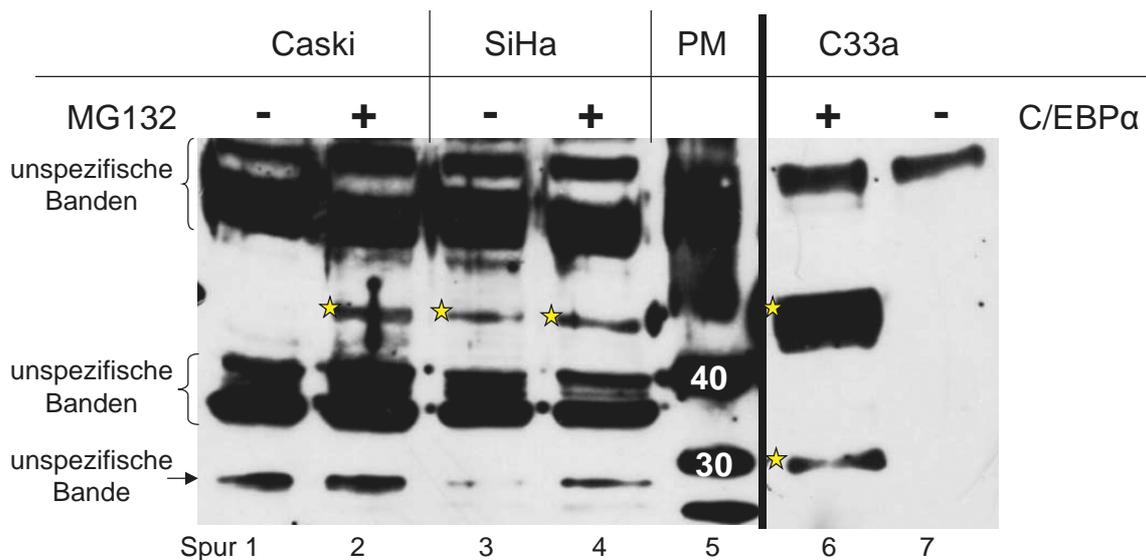
#### 4.5 C/EBP $\alpha$ wird in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Caski exprimiert

Untersuchungen der Keratinozytenzelllinie BALB/MK, die mit Calcium zur Differenzierung gebracht wurden, zeigten eine fünffache Zunahme der Expression von C/EBP $\alpha$  in den ersten beiden Tagen, die bis zum Tod der Zellen durch Apoptose anhielt. Dabei wurde die Expression von C/EBP $\alpha$  hauptsächlich im Zytoplasma der oberen Epidermis nachgewiesen, während C/EBP $\beta$ , dessen Expressionslevel nur 1-2-fach anstieg, in den Zellkernen der mittleren Epidermisschicht exprimiert wurde (Maytin, E. V. & J. F. Habener, 1998).

In dieser Arbeit wurde die Expression von endogenem C/EBP $\alpha$  in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Caski untersucht. Zu diesem Zweck wurden Ganzzellextrakte (GZE) aus diesen beiden HPV16-positiven Zellen hergestellt. Da C/EBP $\alpha$

## Ergebnisse

proteasomal abgebaut werden kann (Hattori, T. et al., 2003), wurden die Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132, bzw. als Negativkontrolle mit Ethanol, dem Lösungsmittel von MG132, behandelt. In Vorversuchen konnte kein C/EBP $\alpha$  in der Zervixkarzinomzelllinie C33a nachgewiesen werden, so dass diese Zellen mit dem Expressionsvektor für C/EBP $\alpha$  transfiziert wurden und als Positivkontrolle verwendet wurden. Der Expressions-Nachweis von C/EBP $\alpha$  erfolgte mit einem Antikörper gegen C/EBP $\alpha$  (14AA, Santa Cruz), der sowohl die 42kDa- als auch die 30kDa- Form detektieren sollte.



**Abb. 16: Die Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Caski exprimieren endogenes C/EBP $\alpha$**

Western Blot. Nachweis der endogenen Expression von C/EBP $\alpha$  in 80  $\mu$ g GZE. SiHa- und Caski-Zellen wurden 15 h vor Herstellung von GZE mit 25  $\mu$ M MG132, bzw. Ethanol behandelt. Als Positivkontrolle dienten Extrakte von C33a-Zellen, die mit den Expressionsvektoren für C/EBP $\alpha$ , bzw. dem Leervektor transfiziert waren. In Spur 5 (PM) sind die 30kDa und 40kDa Proteinmarkerbanden weiß beschriftet. Der Nachweis von C/EBP $\alpha$  erfolgte mit einem Antikörper gegen C/EBP $\alpha$ , der sowohl die 42kDa- als auch die 30kDa-Form erkennt, die jeweils mit einem gelben Sternchen versehen sind. Die übrigen Banden entstanden durch unspezifische Antikörperbindung. Die Spuren 6 und 7 entsprechen einer kürzeren Exposition. Die unspezifischen Banden waren hier nach längerer Exposition auch vorhanden.

Die Abb. 16 zeigt, dass die 42kDa-Form von C/EBP $\alpha$  sowohl in Caski- als auch in SiHa-Zellen exprimiert wird. Während in Caski C/EBP $\alpha$  erst nach Zugabe von MG132 detektierbar war, war es in SiHa auch unter normalen Bedingungen zu erkennen. Dies könnte bedeuten, dass C/EBP $\alpha$  in SiHa nicht durch das Proteasom abgebaut wird.

In keiner der beiden untersuchten Zelllinien konnte die 30kDa-Form nachgewiesen werden, die jedoch nach Transfektion des Expressionsvektors für C/EBP $\alpha$  in C33a-Zellen detektierbar war. Allerdings scheint diese Form im Gegensatz zur 42kDa-Form wesentlich schwächer exprimiert zu werden und könnte aus diesem Grund in Caski- und SiHa-Extrakten nicht zu sehen sein.

### 4.6 C/EBP $\alpha$ bindet die BS 469 *in vivo*

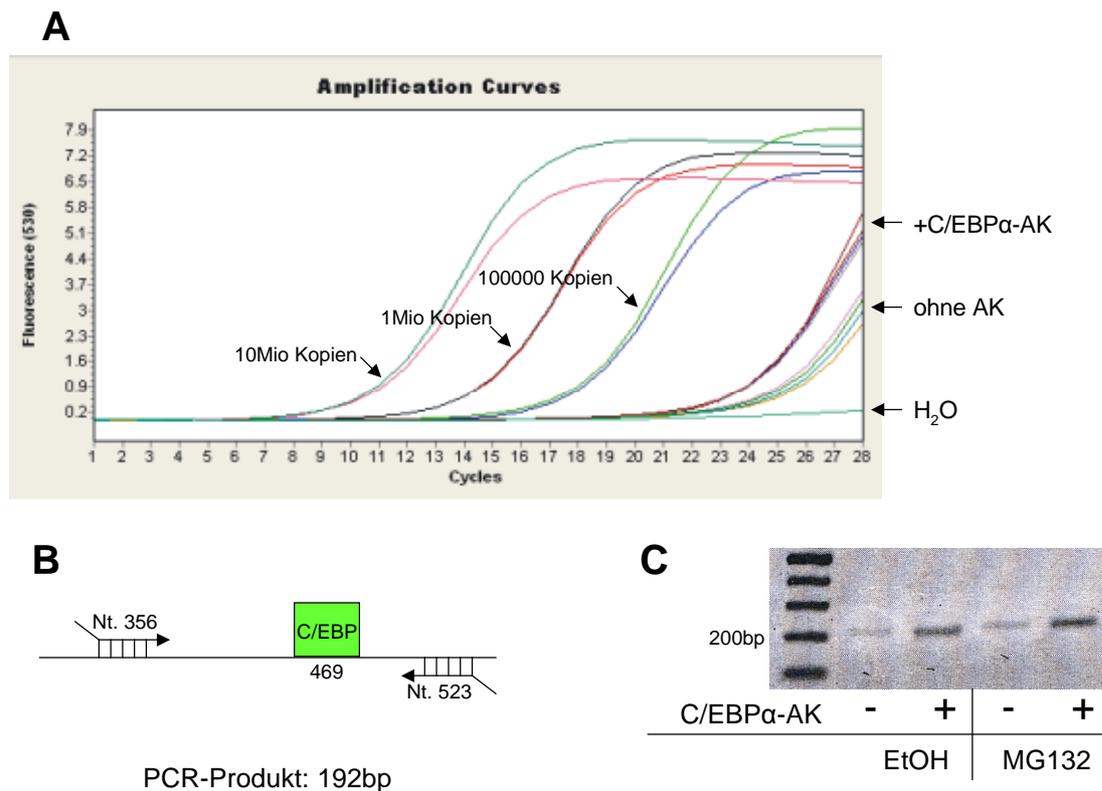
Obwohl die BS 469 im EMSA-Experiment von C/EBP-Proteinen nur schwach gebunden wurde, scheint sie entscheidend an der Regulation der HPV16-Genexpression beteiligt zu sein, wie die hier beschriebenen transienten Transfektionen mit C/EBP $\alpha$  belegen. Zudem wird C/EBP $\alpha$  in HPV16-positiven Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Caski exprimiert. Ein *Chromatine Immunoprecipitation Assay* (ChIP) sollte Aufschluss darüber geben, ob C/EBP $\alpha$  *in vivo* an die Region von HPV16 um Nt. 469 bindet.

Die Abb. 17 zeigt das Ergebnis eines ChIP-Experiments mit SiHa-Zellen. Diese haben 1-2 Kopien von HPV16 in ihrem Genom integriert, so dass sie das perfekte Modellsystem für diesen *in vivo*-Nachweis darstellen. Um möglicherweise die Menge an endogenem C/EBP $\alpha$  noch zu erhöhen, wurden die Zellen mit 25  $\mu$ M MG132, bzw. Ethanol (als Kontrolle) behandelt. Durch Formaldehyd-Behandlung wurden die Protein-DNA-Komplexe kovalent miteinander verknüpft und die DNA anschließend durch Sonifizieren auf ca. 300 bp Fragment-Länge verkürzt. Die Präzipitation der C/EBP $\alpha$ -DNA-Komplexe erfolgte mit einer Mischung der beiden bei Santa Cruz erhältlichen C/EBP $\alpha$  Antikörper (14AA und C-18). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne spezifischen Antikörper. Die mittels ChIP-Assay präzipitierten HPV16-DNA-Fragmente wurden im Light Cycler in einer Echtzeit-PCR amplifiziert und quantifiziert. In einer ersten PCR mit 45 Zyklen wurde die Plateauphase der Amplifikation erreicht, so dass der  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus) ermittelt werden konnte, anhand dessen die Quantifizierung der Proben vorgenommen wurde. Dieser  $C_T$ -Wert entspricht dem ersten Zyklus, bei dem der Schwellenwert des Hintergrundsignals überwunden wird und die PCR in die exponentielle Phase eintritt. Spezifische DNA-Fragmente der Proben, die mit dem C/EBP $\alpha$ -Antikörper inkubiert wurden, wurden ab Zyklus 23 amplifiziert (Mittelwert (MW) der  $C_T$ -Werte: 23,10 $\pm$ 0,12 [EtOH]; MW der  $C_T$ -Werte: 23,03 $\pm$ 0,03 [MG132]) während sie im Ansatz, der nicht mit einem spezifischen Antikörper inkubiert wurde, erst ab dem 24. Zyklus detektiert wurden (MW der  $C_T$ -Werte: 24,79 $\pm$ 0,32 [EtOH]; MW der  $C_T$ -Werte: 24,11 $\pm$ 0,01 [MG132]). Daraus ergibt sich ein gemittelter Abstand von 1,45 Zyklen. Dies bedeutet, dass über die spezifische Bindung des  $\alpha$ -Antikörpers fünfmal mehr DNA präzipitiert wurde als in der Kontrollprobe. Der in der Abb. 17 A gezeigte Versuch ist eine Wiederholung der oben beschriebenen Echtzeit-PCR. Allerdings wurde diese PCR nach dem 28. Zyklus abgebrochen, da die unterschiedlichen Mengen der Amplifikate im Agarosegel (C) nur vor Erreichen der Plateauphase darzustellen sind. Diese deutlich erhöhten Mengen an DNA-Fragmenten in den Proben, die mit dem Antikörper behandelt wurden, im Gegensatz zu denen ohne Antikörper, bestätigen, dass endogenes C/EBP $\alpha$  die BS 469 des HPV16-Genoms bindet.

Die in der Literatur von Kukimoto *et al.* beschriebenen C/EBP-BS, die mit der Konsensussequenz für hSknl $\alpha$  überlappen, beginnen an Position 582 (Kukimoto, I. et al.,

## Ergebnisse

2006). Sie liegen somit 100 Nt. von der BS 469 entfernt und außerhalb des amplifizierten Bereichs. Es kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die im ChIP erhaltenen Ergebnisse auf eine Bindung von C/EBP $\alpha$  an diesen Sequenzbereich zurück zu führen sind. Da aber die Länge der DNA-Fragmente durch Sonifizieren auf ca. 300bp reduziert wurde, ist es eher unwahrscheinlich, dass dieses ChIP-Experiment die Bindung von C/EBP $\alpha$  an den Bereich des HPV16 Genoms ab Position 582 bewies, sondern könnte zum ersten Mal die *in vivo*-Bindung von C/EBP $\alpha$  an die Sequenz um Nt. 469 zeigen.

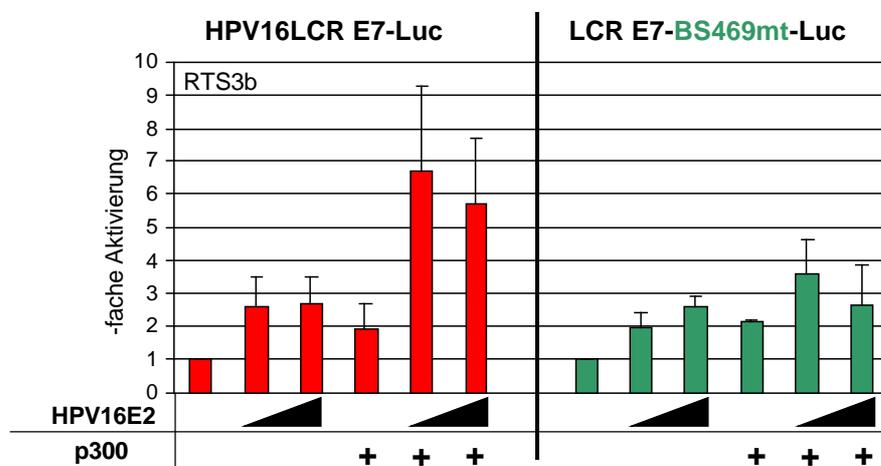


### Abb. 17: C/EBP $\alpha$ bindet in SiHa-Zellen an die BS 469

ChIP-Assay. HPV16-positive SiHa-Zellen wurden 16 h vor Ernte mit 25  $\mu$ M MG132, bzw. EtOH behandelt. Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen wurden durch Formaldehyd Zugabe zum Zellkulturmedium kovalent verknüpft. Anschließend wurden die Zellen 2x7 min sonifiziert, um die DNA in ca. 300 bp große Fragmente zu scheren. Dann folgte eine Inkubation mit einem C/EBP $\alpha$ -spezifischen Antikörper, um die von C/EBP $\alpha$  gebundenen DNA-Fragmente zu präzipitieren. Diese DNA-Fragmente wurden in einer Echtzeit-PCR mit Oligonukleotiden, die die C/EBP-BS 469 eingrenzen, (B) amplifiziert. 25% des PCR-Ansatzes wurden anschließend über ein 2%-iges Agarosegel aufgetrennt (C). Alle Proben wurden doppelt bestimmt und als Standard wurden 100000, 1 Million, und 10 Millionen Kopien des Reporterplasmids HPV16LR-E7-Luc verwendet. Der C<sub>T</sub>-Wert der Standardverdünnungen liegt jeweils drei Zyklen auseinander.

#### 4.7 Die BS 469 ist notwendig für die kooperative Aktivierung durch E2 und p300

Wie die oben beschriebenen Ergebnisse belegen, wird die BS 469 *in vitro* und *in vivo* von C/EBP $\alpha$  gebunden. Zudem zeigten transiente Transfektionen in RTS3b-Zellen, dass der Sequenzbereich, in dem die BS 469 liegt, essentiell für eine effiziente Aktivierung des P<sub>97</sub> ist. Eine Interaktion von C/EBP $\alpha$  mit p300 ist bereits beschrieben, so dass C/EBP $\alpha$  möglicherweise über Bindung an die BS 469 p300 an den Promotor rekrutiert (Mink, S. et al., 1997). Im Folgenden sollte die Auswirkung einer Mutation der BS 469 in HPV16LCR-E7-Luc auf die Kooperation von E2 und p300 mittels transients Transfektionen untersucht werden.



**Abb. 18: Die BS 469 spielt eine entscheidende Rolle bei der kooperativen Aktivierung der HPV16-Genexpression durch E2 und p300**

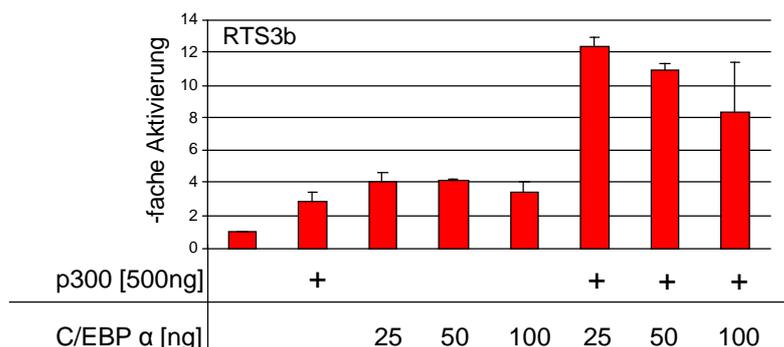
Transiente Transfektion. RTS3b-Zellen wurden mit 1, bzw. 5 ng CMV4-HPV16E2 und 500 ng CMVp300HA und dem Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc oder LCR E7-BS469mt-Luc ( je 500 ng), einem Reporterkonstrukt mit bindungsdefekter C/EBP $\alpha$ -BS kotransfiziert. Dieses Diagramm zeigt die mittlere Aktivierung von drei unabhängigen Transfektionen. Zur Ermittlung der fachen Aktivierung durch E2 und p300 wurde die Basalaktivität der beiden Reporterkonstrukte auf eins normiert. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Expression von 16E2 führte bei beiden Reporterkonstrukten zu einer nahezu identischen Aktivierung von 2,5-2,7-fach (s. Abb. 18). p300 zeigte auch in diesen Transfektionen eine zweifache Aktivierung. So wurde weder die Aktivierung durch E2 noch die durch p300 durch Mutation der BS 469 beeinflusst. Beide Proteine zusammen stimulierten die Promotoraktivität bei HPV16LCR-E7-Luc im Fall von 1 ng transfiziertem pCMV4-HPV16E2 annähernd siebenfach. Nach Mutation der BS 469 konnte jedoch keine Kooperativität mehr beobachtet werden. Die Kotransfektion von 1 ng des 16E2- und hohen Mengen des p300-Expressionsvektors aktivierten die HPV16-Genexpression lediglich 3,5-fach. Bei der größeren Menge E2 führte die Ko-Expression von p300 kaum zu einer weiteren Steigerung der Aktivität.

#### 4.8 C/EBP $\alpha$ und p300 kooperieren bei der Aktivierung der HPV16-Genexpression

Anhand der bisherigen Ergebnisse lässt sich postulieren, dass für die kooperative Aktivierung des P<sub>97</sub> durch E2 und p300 die Bindung von C/EBP $\alpha$  an die BS 469 notwendig ist. Es ist bekannt, dass C/EBP $\alpha$  p300 als Ko-Aktivator nutzt. C/EBP $\alpha$  rekrutiert wohl p300 über direkte Interaktion an diesen Sequenzbereich. Um dies zu bestätigen wurden RTS3b-Zellen mit 500 ng des Reporterplasmids HPV16LCR-E7-Luc sowie zunehmenden Mengen pcDNA3.1+C/EBP $\alpha$  einzeln und in Kombination mit dem Expressionsvektor für p300 transfiziert (s. Abb. 19).

Eine maximal vierfache Aktivierung durch C/EBP $\alpha$  wurde durch die Überexpression von p300 auf 12,4-fach erhöht (s. Abb. 19), nahm aber bei zunehmenden Mengen C/EBP $\alpha$  wieder ab. Dieses Experiment belegt, dass C/EBP $\alpha$  und p300 bei der Aktivierung der HPV16-Genexpression kooperieren.



#### Abb. 19: C/EBP $\alpha$ und p300 kooperieren bei der Aktivierung der HPV16-Genexpression

Transiente Transfektion. Das Diagramm stellt die Zusammenfassung von drei voneinander unabhängigen Experimenten dar. Zusätzlich zum Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc (500 ng) wurden die Expressionsvektoren für p300 und C/EBP $\alpha$  in den angegebenen Mengen kotransfiziert. Die Standardabweichungen sind angegeben.

#### 4.9 Die Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) von p300

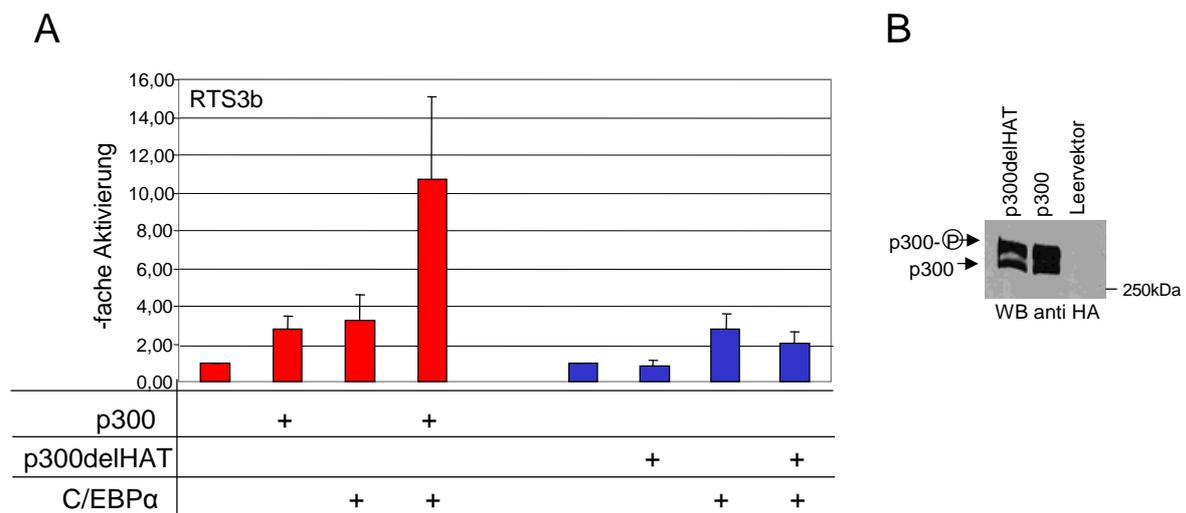
##### 4.9.1 Die HAT von p300 ist essentiell für die Kooperativität mit C/EBP $\alpha$

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, korrelierte die systematische Verkürzung der Sequenz 3' zum P<sub>97</sub> in den Reporterkonstrukten mit einer graduellen Abnahme der Kooperation von E2 und p300, einer verringerten Aktivierung durch p300 und einer Zunahme der

## Ergebnisse

Basalaktivitäten. Im Bereich zwischen dem P<sub>97</sub> und dem P<sub>670</sub> befinden sich zahlreiche BS für das CCAAT *displacement protein* (CDP) (O'Connor, M. J. et al., 2000) (s. auch Abb. 4). CDP ist ein Repressor der Transkription und agiert durch Rekrutierung von HDAC1, wodurch die Histone an den Lysinresten deacetyliert werden und so eine kompakte Nukleosomenstruktur der DNA hergestellt wird. Dies erschwert Transkriptionsfaktoren und Komponenten des PIK den Zugang zum Promotor. p300 könnte mit seiner intrinsischen Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) (Chan, H. M. & N. B. La Thangue, 2001) dem reprimierenden Effekt von CDP entgegenwirken. Falls dies so wäre, sollte eine p300-Mutante (CMV $\beta$ -p300delHAT-HA) mit inaktiver HAT-Funktion eine deutlich geringe Aktivierung zeigen als der Wildtyp.

Zunächst wurden die Aminosäuren 1472-1522, die die HAT-Aktivität vermitteln (Boyes, J. et al., 1998), im p300-Konstrukt CMV $\beta$ -p300-HA deletiert. Der Nachweis der Expression dieser Mutante erfolgte mittels Western Blot und Kernextrakten von transient transfizierten C33a-Zellen (s. Abb. 20 B).



### Abb. 20: Die HAT-Aktivität von p300 ist essentiell für die Ko-Aktivatorfunktion von p300

A: Transiente Transfektion. 500 ng CMV $\beta$ -p300HA bzw. CMV $\beta$ -p300delHAT-HA wurden einzeln oder in Kombination mit 25 ng des Expressionsvektors für C/EBP $\alpha$  und 500 ng des Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc in RTS3b-Zellen kotransfiziert. Die Aktivität der Promotoren im Reporterkonstrukt wurde auf den Wert eins normiert und dann die fache Aktivierung durch Kotransfektion der einzelnen Proteine errechnet. Das Säulendiagramm zeigt das Ergebnis von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

B: Western Blot. p300, p300delHAT, sowie der Leervektor CMV1HA wurden in C33a-Zellen überexprimiert und anschließend im Western Blot mit einem Antikörper gegen das HA-Epitop visualisiert. Man erkennt zwei Banden, da phosphoryliertes p300 ein langsames Laufverhalten im PAA-Gel aufweist (Schwartz, C. et al., 2003) als unphosphoryliertes p300.

Die Expression von Wildtyp-p300 sowie von C/EBP $\alpha$  führten jeweils zu einer ca. dreifachen Steigerung der Aktivität des Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc (s. Abb. 20 A). Die Ko-

## Ergebnisse

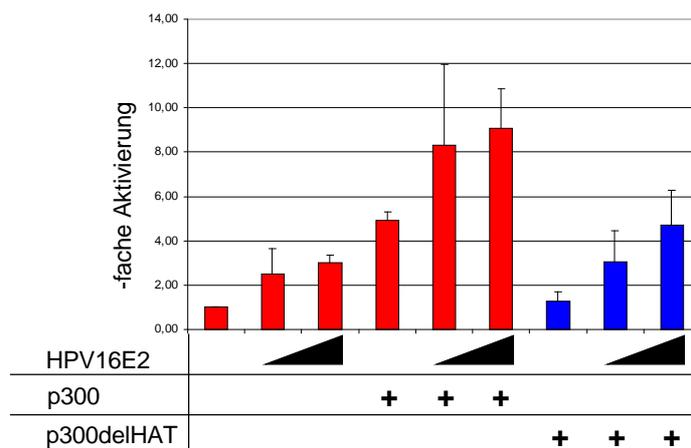
expression beider Proteine erhöhte die Aktivität auf 11-fach. Diese 3,5-fache Stimulation der Einzelaktivierungen bestätigt die Kooperation von C/EBP $\alpha$  und p300.

Durch die Deletion der HAT-Aktivität verlor p300 seine aktivierenden Eigenschaften. Zusätzlich war es nicht in der Lage, die dreifache Aktivierung der Luciferaseexpression durch C/EBP $\alpha$  zu stimulieren. Die Effekte resultierten nicht aus einer verminderten Expression der p300-Mutante (s. Western Blot in Abb. 20 B), denn auch ansteigende Mengen von p300delHAT konnten keine Kooperation bewirken (Daten nicht gezeigt).

Dies beweist, dass die HAT-Aktivität von p300 für die Kooperation mit C/EBP $\alpha$  notwendig ist.

### 4.9.2 Die HAT-Aktivität von p300 spielt keine Rolle bei der Kooperation mit HPV16E2

Um zu untersuchen, ob bei der Ko-Aktivatorfunktion von p300 im Rahmen der Kooperation mit E2 auch die HAT-Aktivität involviert ist, wurden RTS3b-Zellen mit den Expressionsvektoren für 16E2, p300, bzw. der Mutante p300delHAT und dem Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc kotransfiziert. Die Transfektion von CMV $\beta$ -p300delHAT-HA führte zu keiner signifikanten Aktivierung der HPV16-Genexpression, die bei Koexpression des wt-p300 bei fast 5-fach lag (s. Abb. 21). Dennoch stimulierte die Mutante die E2-vermittelte Aktivierung von 3 auf 5-fach. Demnach scheint die Kooperation von E2 und p300 nicht maßgeblich von der HAT-Aktivität abhängig zu sein.



**Abb. 21: Die Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) von p300 ist nicht essentiell für die Kooperativität mit 16E2**

Transiente Transfektion. HPV16LCR-E7-Luc, 1, bzw. 5 ng CMV4HPV16E2 wurden mit 500 ng des Expressionsvektors für p300, bzw. p300delHAT in RTS3b-Zellen kotransfiziert. Dieses Säulendiagramm zeigt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

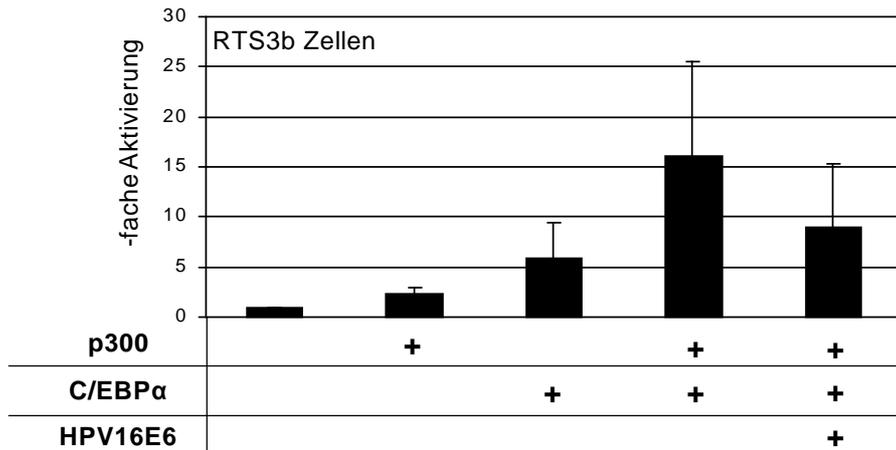
### **4.10 Die Rolle von E6 bei der Regulation der HPV16-Genexpression**

Die beschriebenen Ergebnisse stützen die Annahme, dass der frühe Promotor von HPV16 durch den Ko-Aktivator p300 in Kooperation mit E2 und/oder C/EBP $\alpha$  aktiviert wird. Dies führt zu einer vermehrten Expression der Onkogene E6 und E7. Durch Inaktivierung von wichtigen zellulären Faktoren tragen sie zur Aufhebung der Zellzykluskontrolle und zur Verhinderung der Apoptose der infizierten Zelle bei. Damit es zur Produktion reifer Virionen kommt, muss jedoch der normale Differenzierungsprozess der infizierten Keratinozyten erhalten bleiben. Die vermehrte Bildung der Onkoproteine E6 und E7 erhöht das Risiko der Zelltransformation. Entartete Zellen unterstützen aber nicht die Produktion reifer Viruspartikel. Um dies zu gewährleisten, müssen PV der Hochrisiko-Typen einen Mechanismus entwickelt haben, um die Menge an E6 (und auch an E7) genau zu kontrollieren.

#### **4.10.1 16E6 hemmt die Kooperativität von p300 und C/EBP $\alpha$**

Untersuchungen der Genexpression von HPV8 zeigten, dass die von 8E2 und p300 vermittelte kooperative Aktivierung der späten Genexpression durch die zusätzliche Expression von 8E6 stimuliert werden konnte (Müller-Schiffmann, A. et al., 2006). Die Überexpression von 16E6 hingegen führte zu einer Reduktion der p300 und E2 vermittelten Aktivierung um 50 % (Müller, A., 2003). Ähnliche Effekte hatten 8E6 und 16E6 auch auf die HPV16-Genexpression. Die Aktivierung des frühen Promotors von HPV16 durch 16E2 und p300 konnte 16E6-abhängig zu 2/3 reprimiert werden, während 8E6 kostimulatorisch wirkte (Krüppel, U. et al., 2008). Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die beobachtete Aktivierung der HPV16-Genexpression durch C/EBP $\alpha$  und den Ko-Aktivator p300 ebenfalls von 16E6 reprimiert werden kann.

## Ergebnisse



### Abb. 22: 16E6 hemmt die durch p300 und C/EBPα induzierte Aktivierung

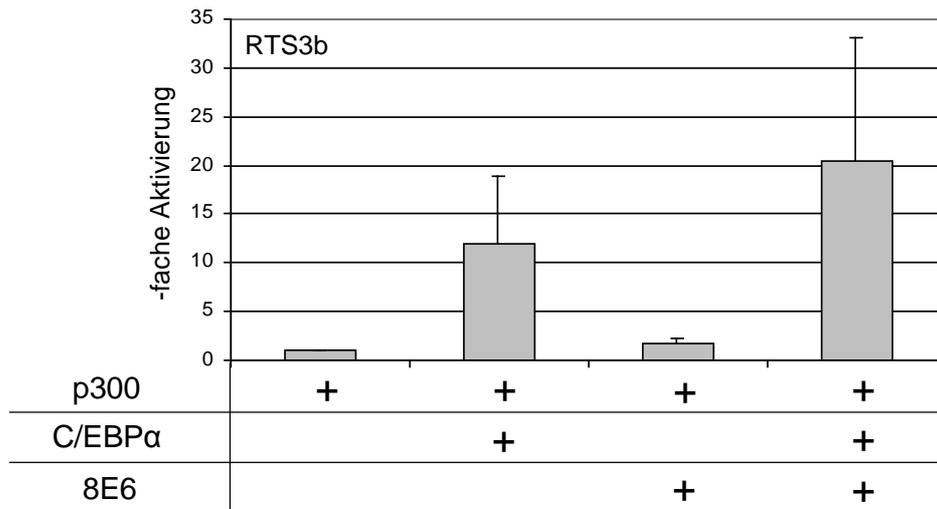
Transiente Transfektion. 500 ng HPV16LCR-E7-Luc, 500 ng CMVβp300HA, 25 ng pcDNA-C/EBPα und 500 ng pcDNA-Flag-HPV16E6 wurden einzeln und in Kombination in RTS3b-Zellen transfiziert. Die Grundaktivität des Reporterkonstruktes wurde als eins festgelegt und anhand dessen die fache Aktivierung durch die koexprimierten Proteine bestimmt. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die 16-fache Aktivierung erzielt durch C/EBPα und p300, wurde nach Ko-Expression von 16E6 auf 9-fach reduziert (s. Abb. 22). Dies zeigt, dass 16E6 neben der E2 und p300 vermittelten Aktivierung auch diese durch p300 und C/EBPα reprimiert. Es scheint, dass diese Repression über p300 vermittelt wird. Eine direkte Interaktion von 16E6 und p300 wurde bereits nachgewiesen (Müller, A., 2003).

### 4.10.2 8E6 stimuliert die Kooperation von p300 und C/EBPα

Entsprechend der Beobachtung von Müller-Schiffmann, A. et al. (2006), sollte 8E6 die Kooperation zwischen C/EBPα und p300 bei der Aktivierung der HPV16-Genexpression unterstützen, was auch in den folgenden transienten Transfektionen bestätigt wurde. 8E6 erhöhte eine p300 vermittelte Aktivierung auf zweifach und die 12-fache Aktivierung in Gegenwart von p300 und C/EBPα wurde durch Koexpression von 8E6 auf 20-fach verstärkt (s. Abb. 23).

## Ergebnisse



**Abb. 23: Die C/EBPα und p300 vermittelte Aktivierung wird durch 8E6 verstärkt**

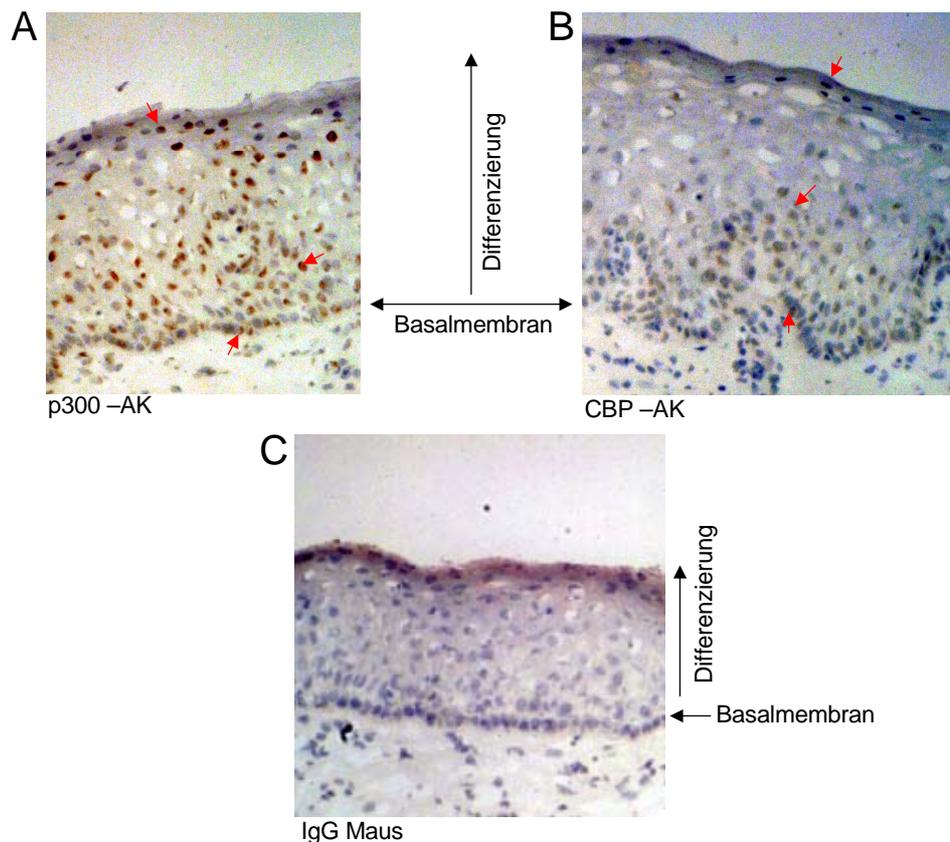
Transiente Transfektion in RTS3b Zellen. Die Aktivierung der Promotoren im Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc durch p300 wurde gleich eins gesetzt. Anhand dessen wurde die Aktivierung durch Expression von C/EBPα und 8E6 einzeln und in Kombination berechnet. Der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Experimenten und die Standardabweichungen sind eingezeichnet.

Die Ergebnisse der transienten Transfektionen in Abschnitt 4.10.1 und 4.10.2 verdeutlichen, dass die E6-Proteine von HPV16 und HPV8 die Aktivität des Ko-Aktivators p300 unterschiedlich modulieren.

### 4.11 Expression von p300

#### 4.11.1 Die Expression von p300 in der Zervixschleimhaut

Eine effiziente Aktivierung des frühen Promotors von HPV16 benötigt offensichtlich hohe Mengen des Ko-Aktivators p300. Obwohl p300 und CBP ubiquitär exprimiert werden, wurden gewebsspezifische Änderungen der p300-Expression beschrieben (Partanen, A. et al., 1999). Beispielsweise steigt die Menge an p300 mit dem Differenzierungsgrad der Haut an (Müller, A., 2003). Das Expressionsmuster von p300 in gesunder Zervix wurde bislang nicht untersucht. Zu diesem Zweck wurden hier immunhistochemische Färbungen von Cryoschnitten normaler Zervix mit einem Antikörper gegen p300 (Ab-1, Calbiochem, Schwalmbach) und dessen Homolog CBP (C-1, Santa Cruz, Heidelberg) durchgeführt.



**Abb. 24: p300/CBP wird in allen Zellschichten des Zervixepithels in annähernd gleichem Maße exprimiert**

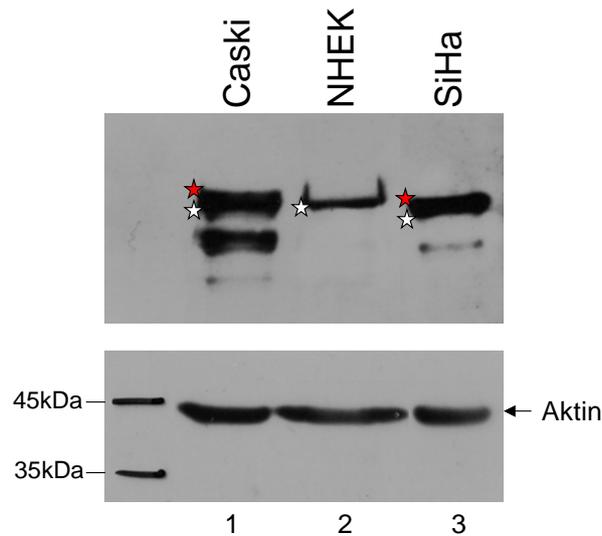
Immunhistochemische Färbungen. 5 µm Kryoschnitten gesunder Zervix wurden mit 1,5 µg/ml monoklonalem Antikörper gegen p300 (A), mit 1,5 µg/ml eines Antikörpers gegen das p300-Homolog CBP (B), bzw. mit einem negativ-IgG-Maus Kontrollserum (C) inkubiert. Die roten Pfeile zeigen auf einzelne gefärbte Zellen. Mittels Hämatoxyllin-Färbung wurden die Kryoschnitte im Anschluss an die Antikörperinkubation blau gefärbt. Zur Orientierung ist die Wanderungsrichtung der sich differenzierenden Zellen mit einem schwarzen Pfeil am Bildrand angegeben.

In der Abb. 24 sind drei repräsentative Kryoschnitte gesunder Zervix aufgeführt. Die Inkubation der Schnitte mit einem Antikörper gegen p300 (A) ergab, dass in jeder Zellschicht braun gefärbte Kerne zu erkennen sind. Die Nuklei einiger Zellen der Basalzellschicht sind in gleichem Maße gefärbt, wie die Zellen der darüber liegenden Schichten, bis hin zu den ausdifferenzierten Zellen des *Stratum granulosum*. Allerdings impliziert die unterschiedliche Farbintensität, dass wohl Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Zellen bestehen. Die Verwendung eines gegen das p300-Homolog CBP gerichteten Antikörpers zeigte ein ähnliches Bild. Trotz schwächerer Farbreaktion, erkennt man auch hier keinen Unterschied zwischen den einzelnen Zellschichten. Die CBP-Expression in den Nuklei der Zervixzellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade scheint nicht zu variieren (B). Exemplarisch sind einige gefärbte Kerne, die einer Expression von CBP entsprechen, mit roten Pfeilen markiert.

Keinerlei positive Signale ergab die Inkubation mit einem negativ-IgG-Maus Kontrollserum (C). Somit wird p300 in gesunder Zervix ubiquitär exprimiert.

### **4.11.2 p300 wird in HPV-positiven Zervixkarzinom-assoziierten Zelllinien stärker exprimiert als in primären Keratinozyten**

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass p300 in den suprabasalen Schichten von CIN-Läsionen vermehrt exprimiert wird, während die Expression in normaler Haut in den stark differenzierten Zellen verstärkt ist (Krüppel et al. 2007; Müller & Ritzkowsky et al. 2002). Demzufolge sollte die Expression von p300 in Zervixkarzinom-assoziierten Zelllinien im Gegensatz zu neonatalen epidermalen Keratinozyten (NHEK), die basalen Zellen entsprechen, erhöht sein. Um dies zu untersuchen, wurde die Expression von endogenem p300 mit GZE aus SiHa- und Caski-Zellen, sowie NHEK in einem Western Blot, der mit einem Antikörper gegen p300 entwickelt wurde, analysiert (s. Abb. 25 A). Als Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen diente der Nachweis von Aktin in den o.g. Extrakten (s. Abb. 25 B). In allen verwendeten Zelllinien war p300 nachweisbar. Die Expression von p300 war in den von Zervixkarzinomen abgeleiteten Zelllinien im Gegensatz zu primären Keratinozyten erhöht. In NHEK liegt anscheinend nur die inaktive, unphosphorylierte Form von p300 vor. SiHa-Zellen exprimieren ein mutiertes p300 mit einer Deletion in der Bromodomäne (Ohshima, T. et al., 2001). Deshalb zeigten entsprechende Banden ein schnelleres Laufverhalten.



**Abb. 25: Expressionsnachweis von p300 in verschiedenen Zelllinien**

Western Blot.

A: 80µg GZE aus Caski-, NHEK und SiHa-Zellen wurden hergestellt und 2/3 davon über ein 6%iges PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde endogenes p300 in einem Western Blot mit einem Gemisch aus monoklonalen Antikörpern, die gegen den C-Terminus von p300 gerichtet sind, detektiert. Das oberste Signal ist eine Doppelbande bestehend aus phosphoryliertem p300 (roter Stern) und unphosphoryliertem p300 (weißer Stern).

B: Aktin-Kontrolle mit dem restlichen Drittel der GZE.

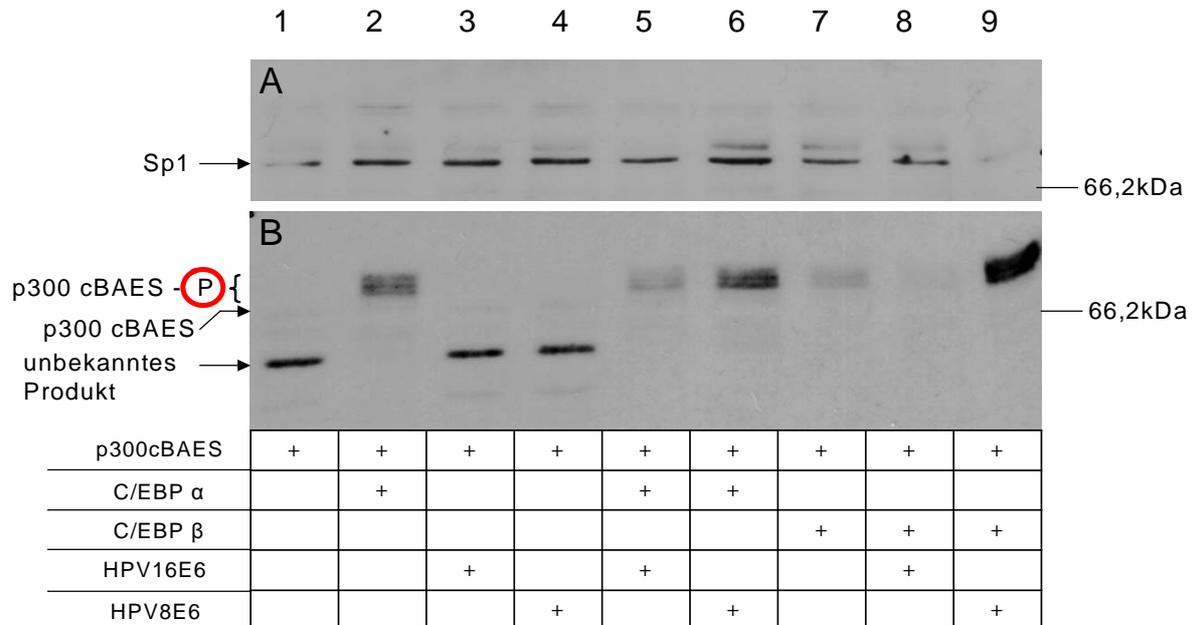
### 4.12 Die E6-Proteine von HPV16 und 8 modulieren auf unterschiedliche Weise die durch C/EBP-Faktoren induzierte Phosphorylierung von p300

Es ist hinreichend bekannt, dass 16E6 die Ko-Aktivatorfunktion von p300/CBP inhibiert (Patel, D. et al., 1999; Zimmermann, H. et al., 1999; Thomas, M.C. & C.-M. Chiang, 2005). Mehrere zugrundeliegende Mechanismen werden diskutiert. Es wurde gezeigt, dass 16E6 die HAT-Aktivität von p300 inhibiert (Thomas, M. et al., 2002). Andererseits wurde eine Konkurrenz von Aktivatoren und 16E6 um die Bindung an p300 vorgeschlagen (Patel, D. et al., 1999; Zimmermann, H. et al., 1999). Im Folgenden wird eine dritte Möglichkeit dargestellt, wie 16E6 die Aktivität von p300 regulieren könnte.

Der zelluläre Ko-Aktivator p300 weist im C-Terminus mindestens fünf potentielle Phosphorylierungsstellen auf. Die Phosphorylierung von p300 wird durch die Bindung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren induziert, u.a. auch C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  und führt zu einer verstärkten Ko-Aktivatorfunktion von p300 (Schwartz, C. et al., 2003). Es wäre demnach möglich, dass die E6-Proteine von HPV diese Phosphorylierung modulieren und damit eine Aktivitätsänderung von p300 induzieren.

## Ergebnisse

Zur Untersuchung des Effekts von 16E6 und 8E6 auf die von C/EBP $\alpha$  induzierte Phosphorylierung von p300, wurde ein verkürztes p300-Konstrukt (p300cBAES) verwendet. Dieses Expressionsplasmid enthält die As. 1752-2370 von p300 und erlaubt unterschiedliche Phosphorylierungsgrade des C-Terminus von p300 besser darzustellen (Schwartz, C. et al., 2003).



**Abb. 26: E6-Proteine modulieren die durch C/EBP-Faktoren induzierte Phosphorylierung von p300**

B: Western Blot. Entsprechend der Tabelle wurden C33a-Zellen mit jeweils 5  $\mu$ g der angegebenen Expressionsvektoren, bzw. entsprechenden Leervektoren transfiziert. Je 10  $\mu$ g Kernextrakte wurden über Nacht im Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die p300-Variante p300cBAES (As.1752-2370) wurde mit Hilfe eines p300-spezifischen Antikörpergemisches (RW109, RW105 und RW128, Biomol) visualisiert. Anschließend wurde zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen der WB mit einem SP1-Antikörper (PEP2) inkubiert (A).

Die phosphorylierte Form von p300 in den Extrakten der transfizierten C33a-Zellen wurde in einem Western Blot detektiert, der mit einem Gemisch aus mehreren Antikörpern gegen den C-Terminus von p300 entwickelt wurde. In dem Western Blot, der in Abb. 26 B gezeigt ist, war das C-terminale p300-Fragment allein kaum zu erkennen (Spur 1). Lediglich ein unbekanntes Produkt, das evtl. ein Degradationsprodukt von p300 sein könnte, war deutlich sichtbar (s. auch Abb. 27). Die Koexpression beider C/EBP-Faktoren bewirkte deutliche Banden mit höherem Laufverhalten (Spuren 2 und 7). Schwartz et al. konnten belegen, dass diese Banden verschiedene Phosphorylierungsstufen von p300 darstellen. Diese Phosphorylierungen, induziert durch Aktivatoren, führen zur erhöhten Stabilität von p300 (Schwartz, C. et al., 2003). Sowohl 16E6 (Spur 3) als auch 8E6 (Spur 4) allein hatten weder

Einfluss auf die Menge, noch auf den Phosphorylierungsstatus von p300. Die Koexpression von C/EBP $\alpha$ , bzw.  $\beta$ , 8E6 und p300cBAES (Spuren 6 und 9) ging mit einer weiteren Verstärkung des Signals für phosphoryliertes p300 einher. Der gegenteilige Effekt, nämlich eine Abnahme der Intensität der langsamer migrierenden Banden, wurde bei Koexpression von 16E6 und C/EBP $\alpha$ , bzw.  $\beta$  beobachtet (Spuren 5 und 8). Diese spezifischen, konträren Auswirkungen der beiden E6-Proteine auf die Menge an phosphoryliertem p300 waren nicht durch variierende Proteinmengen bedingt, denn die Inkubation des Western Blot mit einem Antikörper gegen Sp1 lieferte vergleichbare Mengen (s. A). Lediglich in den Spuren 1 und 9 schien die Proteinmenge leicht reduziert zu sein.

Somit könnte die Modulation der Phosphorylierung von p300 und die damit verbundene veränderte Gesamtmenge an p300 eine Grundlage sein, wie virale E6-Proteine die Transkriptionsaktivität von p300 variieren.

### **4.12.1 16E6 vermittelte Reduktion der Menge an phosphoryliertem p300 ist abhängig von einer Staurosporine-inhibierbaren Kinase und einem Faktor, der proteasomal abgebaut wird**

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie 16E6 die C/EBP $\alpha$  vermittelte Phosphorylierung von p300 beeinflussen könnte: 16E6 könnte die BS von C/EBP $\alpha$  an p300 besetzten und so die Phosphorylierung verhindern. Dies ist allerdings wenig wahrscheinlich, denn in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass 16E6 und 8E6 an gleiche Regionen von p300 binden (Müller, 2003), sich aber in ihrem Effekt auf die C/EBP vermittelte Phosphorylierung unterscheiden. Die dafür verantwortliche Kinase könnte inhibiert oder dem proteasomalen Abbau zugeführt werden. Möglich wäre auch eine 16E6 vermittelte Degradation von C/EBP $\alpha$  bzw. p300 selbst. 16E6 könnte auch eine Phosphatase, die p300 dephosphoryliert, aktivieren. Die im Folgenden dargestellten Experimente sollten zwischen diesen Möglichkeiten differenzieren, um den Mechanismus der 16E6 vermittelten Repression der HPV16-Genexpression näher zu analysieren.

Zunächst wurde untersucht, ob 16E6 die Ubiquitin-abhängige proteasomale Degradation eines Faktors, der zur Phosphorylierung benötigt wird, induziert. Dafür wurden die mit den Expressionsvektoren für p300cBAES, C/EBP $\alpha$  und 16E6 transfizierten Zellen (wie in der Abb. 27 eingetragen) mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt (Abb. 27 Spuren 4-6). Im Gegensatz zur Reduktion durch 16E6 in den mit DMSO (Kontrolle) behandelten Proben, blieb unter Einfluss des Inhibitors MG132 die Menge an phosphoryliertem p300 in Gegenwart von 16E6 konstant. Zusätzlich war die Menge an unphosphoryliertem p300

## Ergebnisse

---

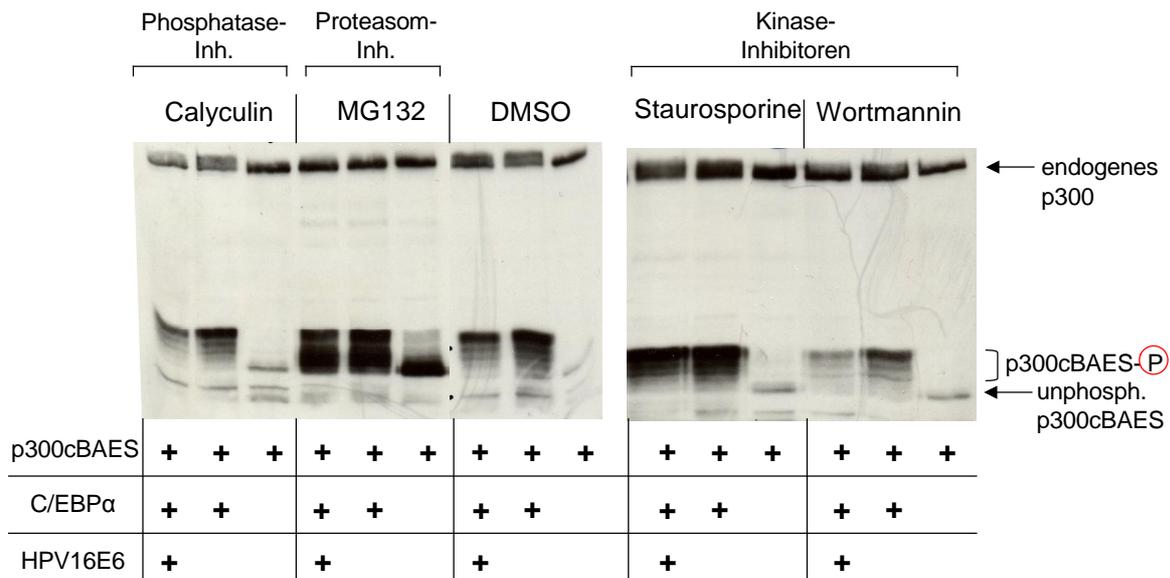
erhöht. Dies zeigt, dass unphosphoryliertes p300 vom Proteasom abgebaut wird. Ferner könnte an der 16E6 vermittelten Verringerung der Menge an phosphoryliertem p300 ein Faktor beteiligt ist, der proteasomal abgebaut wird.

Der Einsatz des Phosphatase-Inhibitors Calyculin A, der spezifisch die Phosphatase PP1 und PP2A inhibiert, zeigte weder auf die durch C/EBP $\alpha$  induzierte Phosphorylierung (Spur 2) noch auf den reduzierenden Effekt durch 16E6 (Spur 1) einen Einfluss. Dies belegt, dass diese Phosphatase-Aktivitäten für 16E6 nicht notwendig sind, um der Bildung von phosphoryliertem p300 entgegen zu wirken. Da bereits phosphoryliertes p300 nicht durch 16E6 vermittelte Aktivierung der Phosphatasen PP1 und PP2a schneller dephosphoryliert wird, agiert 16E6 wohl einen Schritt früher. Allerdings könnten natürlich auch andere Phosphatasen, die durch diese Inhibitoren nicht beeinflusst sind, betroffen sein.

Zur Identifizierung einer Kinase, die durch 16E6 gehemmt werden könnte, wurden die Inhibitoren Staurosporine und Wortmannin verwendet. Während Staurosporine eine Vielzahl an Proteinkinasen, wie z.B. PKA und PKC hemmt, ist Wortmannin ein irreversibler Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Inhibitor. Lediglich die Inkubation der Zellen mit Staurosporine zeigte keine Verminderung der Phosphorylierung durch 16E6 (Spur 10). Dies bedeutet, dass 16E6 die Aktivität einer Staurosporine-inhibierbaren Kinase benötigt, um die Menge an phosphoryliertem p300 zu reduzieren. Die Inkubation mit Wortmannin schloss eine Beteiligung der PI3-Kinase aus. Der jeweilige Effekt der einzelnen Inhibitoren ist auch an endogenem p300 zu erkennen, dessen Phosphorylierung durch das Auftreten einer langsamer wandernden Bande erkennbar ist.

Somit ist an dieser 16E6 vermittelten Repression ein Faktor, der proteasomal abgebaut wird sowie eine Staurosporine inhibierbaren Kinase beteiligt.

## Ergebnisse



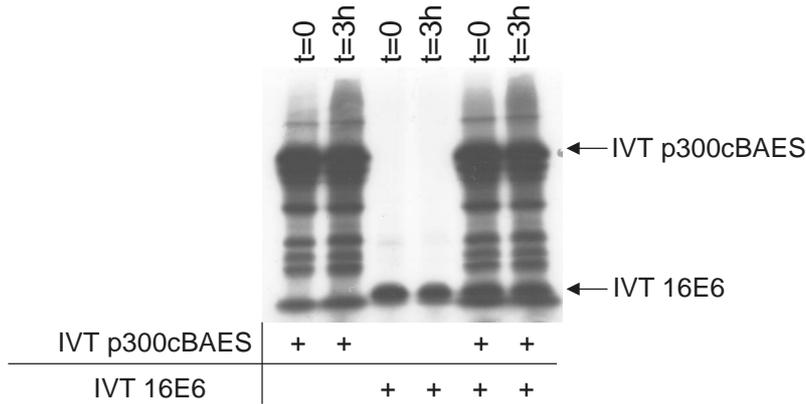
**Abb. 27: Modulation des reprimierenden Effekts von 16E6 durch verschiedene Inhibitoren**

Western Blot. C33a-Zellen wurden ca. 12 h nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren für p300cBAES, C/EBPα und HPV16E6 entweder mit 1 nM des Phosphatase-Inhibitors Calyculin A, 25 μM MG132, 10 nM des Kinase-Inhibitors Staurosporine oder 0,25 μM Wortmannin 16 h vor der Ernte behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO.

### 4.12.2 16E6 führt nicht zur Degradation von p300

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass der proteasomale Abbau eines Faktors bei der 16E6 vermittelten Reduzierung der p300-Phosphorylierung eine Rolle spielt. Es ist denkbar, dass die Bindung von 16E6 an p300 zum proteasomalen Abbau von p300 führt. Daher wurde überprüft, ob 16E6 p300, beide hergestellt in Kaninchen Reticulozytenlysat, *in vitro* degradieren kann. In diesem Retikulozytenlysat sind alle notwendigen Faktoren für den proteasomalen Abbau vorhanden (*TNT<sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate System*, Promega, Madison, USA), was anhand der Degradation von p53 durch 16E6 bestätigt wurde (S. Toepffer, pers. Mitteilung). Die Abb. 28 zeigt eins von mehreren Degradationsexperimenten. Die IVT Proteine wurden direkt nach dem Vereinen oder nach einer Inkubation über Nacht im PAG aufgetrennt. In Abb. 28 ist zu sehen, dass die Menge des C-Terminus von p300 nicht durch Inkubation mit 16E6 beeinflusst wurde. Eine Degradation von p300 durch 16E6 ist demnach unwahrscheinlich, wenn auch nicht ausgeschlossen, da die eingesetzten Mengen von 16E6 für diese hohe Menge an p300 evtl. nicht ausreichend gewesen sein könnten.

## Ergebnisse

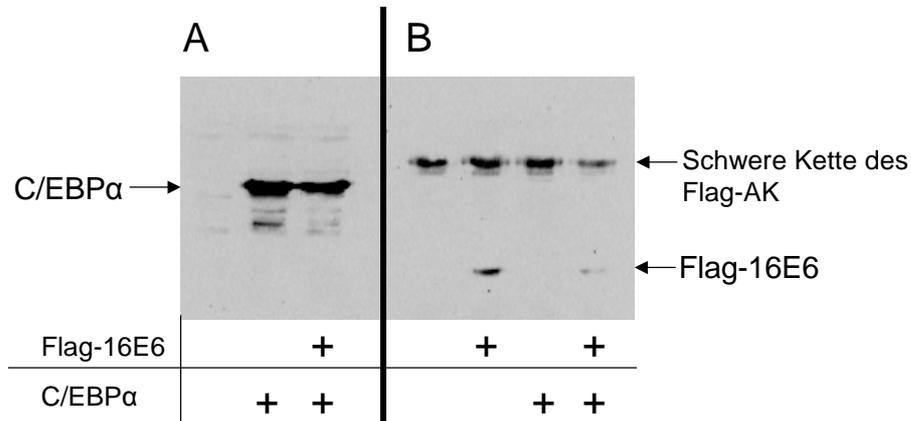


### Abb. 28: p300cBAES wird durch 16E6 nicht degradiert

Degradations-Assay. Jeweils 1  $\mu$ l IVT p300cBAES wurde 3 h ( $t=3$  h) mit 1  $\mu$ l IVT 16E6 bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in 2xSDS Probenpuffer aufgekocht und mittels PAG aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte nach Trocknen des Gels mit einem radiosensitiven Film.

### 4.12.3 16E6 beeinflusst nicht die Menge an C/EBP $\alpha$

16E6 könnte auch die Menge von C/EBP $\alpha$  reduzieren. Somit stünde weniger C/EBP $\alpha$  zur Induktion der Phosphorylierung von p300 zur Verfügung. Es wurde der Einfluss von 16E6 auf die Menge von C/EBP $\alpha$  in transient transfizierten C33a-Zellen untersucht.



### Abb. 29: Die Menge an C/EBP $\alpha$ wird durch Koexpression von 16E6 kaum beeinflusst

A: 50  $\mu$ g GZE von C33a-Zellen, die 48 h zuvor wie in der Abb. 29 angegeben mit je 7,5  $\mu$ g der Expressionsvektoren für C/EBP $\alpha$  und Flag-16E6 transfiziert wurden, wurden über ein PAG aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Antikörper gegen C/EBP $\alpha$ .

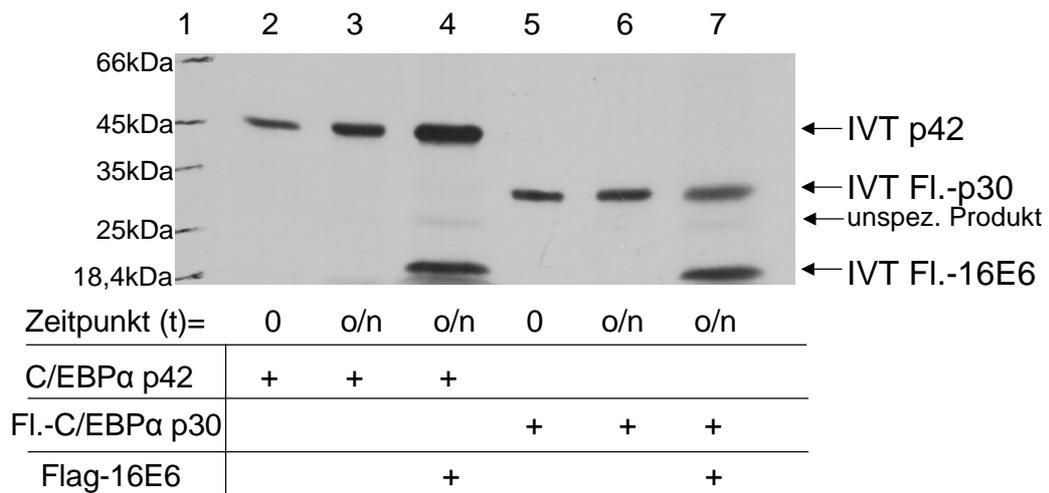
B: 1400  $\mu$ g GZE von C33a-Zellen, die wie in der Tabelle angegeben transient transfiziert wurden, wurden über Flag-AK-gekoppelte Sepharose aufgereinigt und anschließend über ein PAG aufgetrennt. Der hier gezeigte Western Blot wurde mit einem gegen das Flag-Epitop gerichteten Antikörper inkubiert. Der Zweitantikörper erkennt auch die schwere Kette des Flag-AK, der an die Sepharose gekoppelt war.

## Ergebnisse

GZE von C33a-Zellen, die mit den Expressionsvektoren für C/EBP $\alpha$  und Flag-16E6 transfiziert wurden, wurden zum Nachweis von C/EBP $\alpha$  in einem Western Blot eingesetzt. Wie die Abb. 29 A zeigt, war die Menge von C/EBP $\alpha$  in den Extrakten aus Zellen, die mit 16E6 transfiziert wurden gleich der Menge mit dem Leervektor transfizierter Zellen. Als Kontrolle wurde in den verwendeten GZE die Expression von Flag-fusioniertem 16E6 überprüft.

Zum erneuten Ausschluss eines proteasomalen Abbaus von C/EBP $\alpha$  durch 16E6, wurde ein *in vitro*-Degradationsexperiment durchgeführt (s. Abb. 30). Hierbei wurde an Flag fusioniertes 16E6 verwendet.

Der Abb. 30 ist zu entnehmen, dass 16E6wt nicht in der Lage war, weder C/EBP $\alpha$  noch die Flag-fusionierte Repressorform C/EBP $\alpha$  p30 zu degradieren. Die Menge der C/EBP $\alpha$ -Proteine blieb in Anwesenheit des E6-Proteins unverändert.



### Abb. 30: 16E6 degradiert weder C/EBP $\alpha$ p42, noch die 30kDa-Form

Degradations-Assay über Nacht. Je 2  $\mu$ l IVT C/EBP $\alpha$  p42, bzw. Flag-C/EBP $\alpha$  p30 wurden über Nacht mit 3  $\mu$ l IVT Flag-16E6 inkubiert und anschließend bei 95°C denaturiert und über ein 12%iges PAA-Gel aufgetrennt. Der Proteinmarker ist in Spur 1 geladen. Als Kontrolle diente eine Inkubation o/n der IVT C/EBP $\alpha$ -Proteine in Abwesenheit von IVT 16E6 und die Ausgangsmenge zum Zeitpunkt 0. Die  $^{35}$ S-markierten Proteine wurden über einen radiosensitiven Film visualisiert.

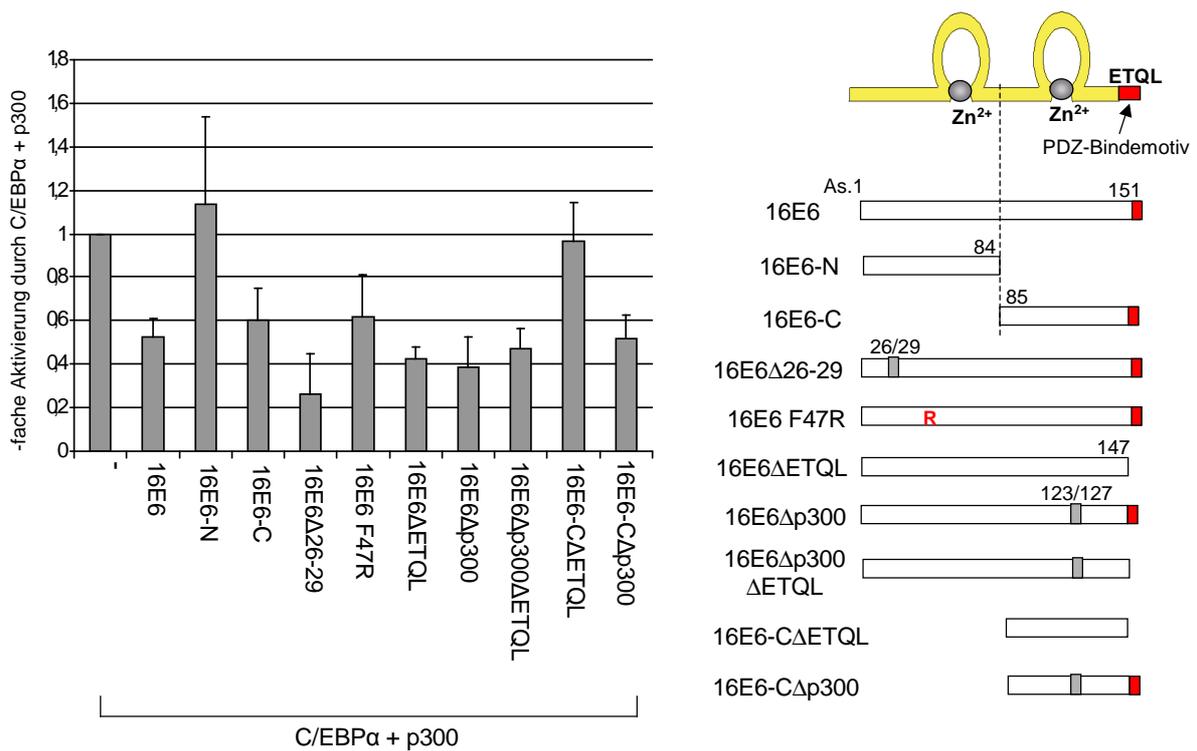
Zusammenfassend geben weder der *in vivo* noch der *in vitro* Degradations-Assay Hinweise, dass 16E6 C/EBP $\alpha$  dem proteasomalen Abbau zuführt.

### **4.13 An der Repression der Transkription beteiligte Domänen von 16E6**

Die bisher gezeigten Ergebnisse implizieren, dass 16E6 einen Faktor degradiert, der an der Reduktion der Phosphorylierung von p300 beteiligt ist. Zudem scheint eine Staurosporine-abhängige Kinase involviert zu sein. Um den Mechanismus der Repression der Transkription durch 16E6 genauer zu untersuchen, wurden in den folgenden Experimenten verschiedene Mutanten von 16E6 verwendet. In der Regel läuft eine 16E6 induzierte Degradation über Interaktion mit E6-AP und dem Substrat ab, wie bereits für p53 und PDZ-Domänen-Proteine gezeigt wurde (Kuballa, P. et al., 2007). Die Verwendung von verschiedenen 16E6-Mutanten sollte eine Korrelation zwischen der Bindung von zellulären Zielproteinen von 16E6 und der Repression der Kooperation zwischen C/EBP $\alpha$  und p300 herstellen.

Zwei Regionen innerhalb des 16E6-Proteins, die für die Repression der E2 und p300-vermittelten Aktivierung notwendig sind, wurden bereits identifiziert. Dies war zum einen die N-terminalen As. 1-84, sowie das unter den Hochrisiko-HPV-Typen konservierte C-terminale PDZ-Bindemotiv (Krüppel, U. et al., 2008). Um zu vergleichen, ob die Aktivierung durch C/EBP $\alpha$  und p300 über ähnliche Domänen von 16E6 reprimiert wird, wurden transiente Transfektionen mit Expressionsvektoren für entsprechende 16E6-Mutanten durchgeführt (s. Abb. 31). Die 16E6-Varianten lagen im Expressionsvektor pcDNA-Flag vor und ihre Expression wurde bereits über das N-terminal fusionierte Flag-Epitop im Western Blot mit einem gegen Flag gerichteten Antikörper nachgewiesen (Müller, A., 2003; Töpfer, S. et al., 2007).

## Ergebnisse



**Abb. 31: Die Repression der C/EBPα und p300 vermittelten Transkription wird von Bereichen im C-Terminus und N-terminalen As. des 16E6-Proteins vermittelt**

Transiente Transfektion von RTS3b-Zellen. Die Aktivierung des Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc durch 500 ng CMVβ-p300HA und 25 ng pcDNA-C/EBPα wurde gleich eins gesetzt und anhand dessen die Effekte von 16E6 und verschiedener 16E6-Mutanten getestet, die im rechten Bildrand skizziert sind. Die Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Transfektionen sowie die daraus resultierenden Standardabweichungen sind angegeben.

Wie schon gezeigt, lag die Repression des volle Länge 16E6-Konstruktes, bei fast 50% (s. Abb. 31). Eine annähernd gleiche Repression der durch C/EBPα und p300 aktivierten HPV16-Genexpression erzeugte die C-terminale Hälfte von 16E6 (16E6-C, As. 85-151). Dies bedeutet, dass die im C-Terminus liegenden As. zur Inhibition der C/EBPα und p300 induzierten Aktivierung ausreichend sind. Nach Mutation des PDZ-Bindemotivs im C-Terminus von 16E6 (16E6-CAETQL) wurde die Repression aufgehoben. Somit vermittelt die PDZ-Bindedomäne im Konstrukt, das nur den C-Terminus (As. 85-151) enthält, die Repression der von p300 und C/EBPα induzierten Aktivierung. Jedoch reprimierte das volle Länge E6-Protein mit deletiertem PDZ-Bindemotiv (16E6ΔETQL) in gleichem Maße wie der Wildtyp. Der N-Terminus alleine (16E6-N) zeigte hingegen keine Repression der Aktivierung des P<sub>97</sub>. Dies bedeutet, dass neben dem PDZ-Bindemotiv innerhalb des N-Terminus (As. 1-84) eine weitere reprimierende Domäne enthalten ist, die jedoch Motive im C-Terminus benötigt. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Müller-Schiffmann bezüglich der Repression der p300 und E2 vermittelten Aktivierung des P<sub>97</sub>. Für eine effektive Repression der p300, E2 und/oder C/EBPα vermittelten Aktivierung der frühen HPV16-Genexpression

sind der C-Terminus und vor allem das darin enthaltene PDZ-Bindemotiv notwendig sowie eine davon unabhängig agierende Domäne im N-Terminus, die jedoch C-terminale Bereiche benötigt (Müller, A., 2003; Krüppel, U. et al., 2008).

16E6 $\Delta$ p300, eine p300- und E6-AP-bindungsdefekte Mutante (Gewin, L. et al. 2004), 16E6F47R, das E6-AP-bindungsdefekt ist (Zanier, K. et al., 2005), 16E6 $\Delta$ p300 $\Delta$ ETQL und 16E6-C $\Delta$ p300 reprimierten wie wt 16E6.

Die Mutante 16E6 $\Delta$ 26-29 enthält eine Deletion der entsprechenden As. in der ersten Zinkfinger-Region und ist E2-bindungsdefekt (Grm, H.S. et al., 2005). Weitere Defekte dieser Mutante sind nicht bekannt. Diese E6-Variante reprimierte die durch C/EBP $\alpha$  und p300 vermittelte Genexpression um 75%, somit stärker als 16E6-wt.

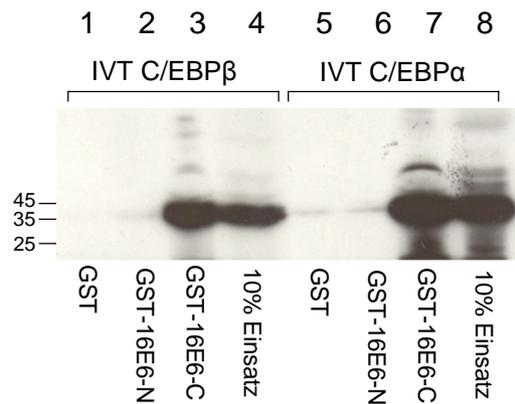
### **4.13.1 Einfluss verschiedener 16E6-Mutanten auf die Phosphorylierung von p300**

16E6 scheint für eine effektive Repression ein intaktes PDZ-Bindemotiv oder Aminosäuren im N-Terminus in Verbindung mit anderen C-terminalen Aminosäuren zu benötigen. Um zu untersuchen, ob diese Domänen auf Ebene der Reduzierung der Phosphorylierung von p300 agieren, wurden verschiedene E6-Mutanten im „Phosphorylierungs-Assay“ von p300 eingesetzt (s. Abb. 32).

Eine Verringerung der Menge an phosphoryliertem p300 konnte bei Wildtyp 16E6 beobachtet werden (Spur 3). In diesem Fall war keine p300-spezifische Bande nachweisbar (s. auch Spur 1). Das Maß der Phosphorylierung von p300 ist nach Koexpression aller Mutanten von 16E6 (Spuren 4-9) mit denen in der Positivkontrolle in Spur 2 vergleichbar, mit Ausnahme von 16E6 $\Delta$ 26-29 (Spur 13). Dies wurde sowohl am rekombinanten C-Terminus von p300 als auch an endogenem p300 deutlich. Lediglich die Koexpression von 16E6 $\Delta$ 26-29 führte zu einer wesentlichen Reduzierung der Phosphorylierung von p300, die die von 16E6 noch übertraf (Spuren 12 und 13). Dies korreliert mit den Ergebnissen der transienten Transfektionen (s. Abb. 31) in denen 16E6 $\Delta$ 26-29 die p300 und C/EBP $\alpha$  vermittelte Aktivierung effizienter als 16E6 wt inhibierte. Diese Ergebnisse belegen allerdings, dass die Reduktion des Phosphorylierungsgrades von p300 nicht die Grundlage der 16E6 vermittelten Repression der Transkription durch C/EBP $\alpha$  und p300 sein kann, sondern lediglich dazu beitragen könnte.



## Ergebnisse



### Abb. 33: C/EBP-Faktoren binden den C-Terminus von 16E6 *in vitro*

**GST-Pull-down-Assay.** Bakteriell exprimiertes GST-16E6-N (As.1-85) und GST-16E6-C (As.86-151), sowie GST alleine wurden mittels Glutathion-S-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl in Reticulozytenlysat *in vitro* translatierten und <sup>35</sup>S-markiertem C/EBPβ-, bzw. C/EBPα-Proteinen inkubiert und jeweils viermal mit 0,1 M LSDB gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden über ein 12%iges PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Spur 4 und 8 zeigen 10% des eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes.

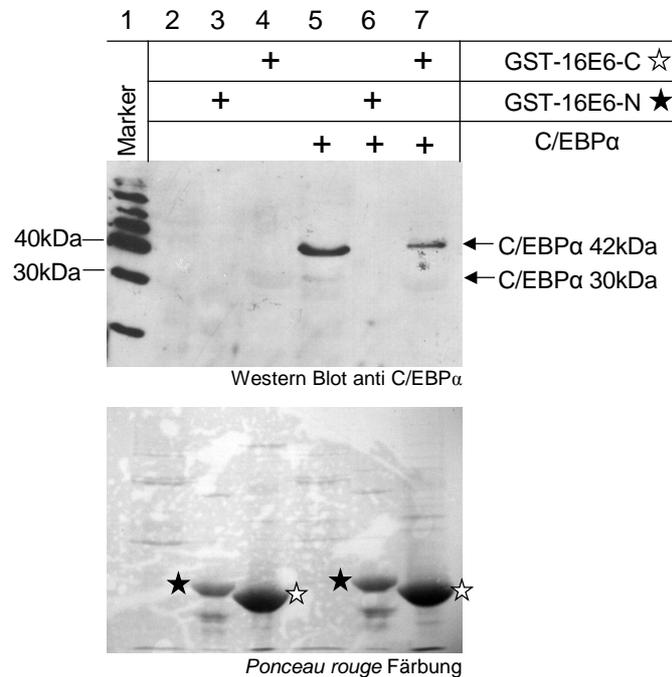
Zur Überprüfung einer Interaktion wurde zunächst ein *GST-Pull-down-Assay* durchgeführt. GST-fusionierte Fragmente von 16E6 (16E6-N und 16E6-C) wurden mit *in vitro* translatiertem <sup>35</sup>S-markiertem C/EBPα, bzw. β inkubiert. In Abb. 33 wird deutlich, dass sowohl C/EBPα als auch C/EBPβ eine starke Bindung an den C-Terminus von 16E6 zeigen. Es war jedoch keine Interaktion mit dem N-Terminus und der Negativkontrolle GST nachweisbar.

#### 4.14.1 GST-16E6-C präzipitiert in C33a-Zellen überexprimiertes C/EBPα

Um zu bestätigen, dass 16E6 auch an zelluläres C/EBPα binden kann, wurden bakteriell exprimierte und über Sepharose aufgereinigte GST-Proteine (GST-16E6-N und GST-16E6-C) mit GZE aus C33a-Zellen, die mit einem Expressionsvektor für C/EBPα transfiziert wurden, inkubiert (Abb. 34). Als Negativkontrolle dienten GZE aus untransfizierten C33a-Zellen (Spur 1), die kein endogenes C/EBPα exprimieren (Vergleich, s. Abb. 16, Spur 7). Wie der Western Blot, entwickelt mit einem Antikörper gegen C/EBPα belegt, war 16E6-C in der Lage, C/EBPα p42 zu präzipitieren, da auf Höhe der 40kDa Markerbande ein deutliches Signal ist. Die 30kDa-Repressorform von C/EBPα, die in 10% der eingesetzten Menge des Extraktes in Spur 5 schwach zu erkennen ist, konnte durch 16E6-C (Spur 7) nicht präzipitiert

## Ergebnisse

werden. Hier ist nur ein Signal auf Höhe der 40kDa Markerbande zu erkennen. Dieses Experiment zeigt, dass C/EBP $\alpha$  auch in der Zelle mit Motiven im C-Terminus von 16E6 interagiert.



**Abb. 36: GST-fusioniertes 16E6-C präzipitiert in C33a-Zellen überexprimiertes C/EBP $\alpha$**

Western Blot anti C/EBP $\alpha$ . An Sepharose gekoppelte GST-Fusionsproteine (s. *Ponceau rouge* gefärbter WB im unteren Bildabschnitt) wurden mit 50  $\mu$ g Ganzzelextrakten aus C33a-Zellen, die mit dem Expressionsvektor für C/EBP $\alpha$  transfiziert wurden, 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal mit 0,1 M LSDB gewaschen und über ein SDS-PAG aufgetrennt. Die gebundenen Proteine wurden in einem Western Blot mit einem gegen C/EBP $\alpha$  gerichteten Antikörper detektiert.

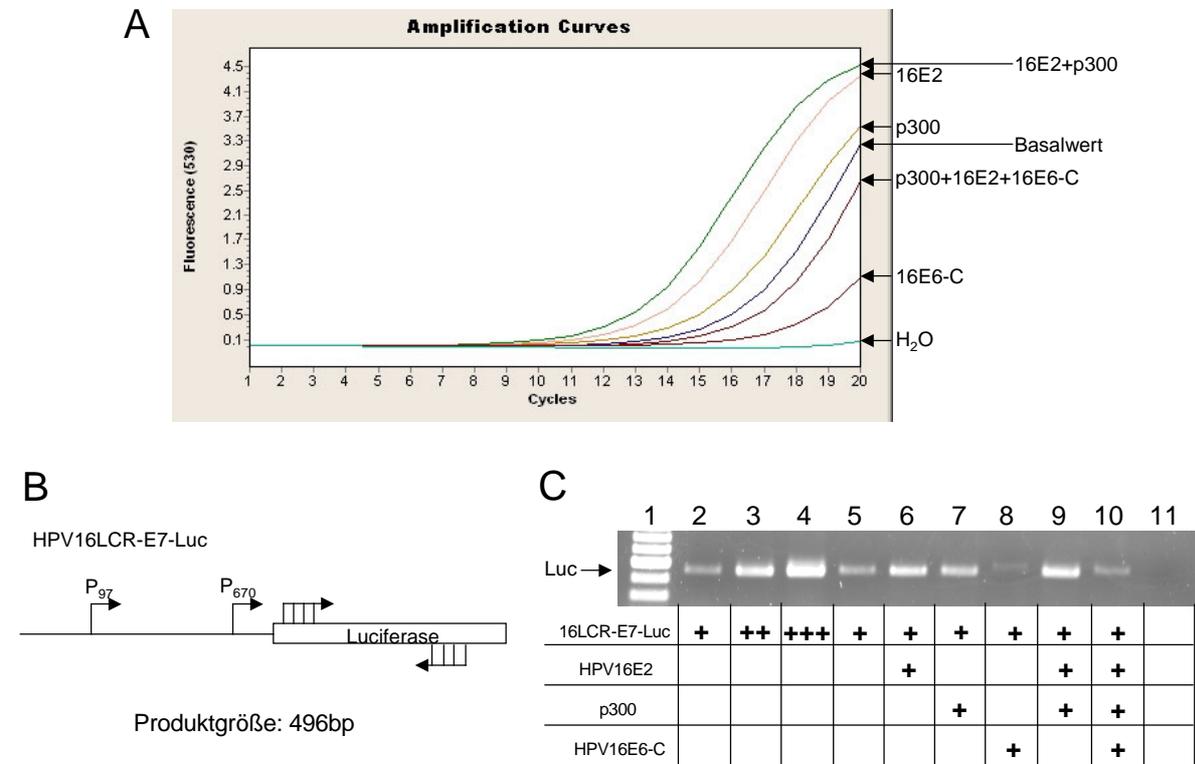
### 4.15 16E6 reprimiert seine eigene Expression

#### 4.15.1 16E6 reprimiert seine eigene Expression auf Ebene der Transkription

Um zu untersuchen, ob die Repression von 16E6 auf die p300 und E2 vermittelte Aktivierung der HPV16-Genexpression auf Ebene der Transkription oder der Translation erfolgt, wurde eine RT-PCR mit Oligonukleotiden, die eine Amplifikation Luciferase-spezifischer Transkripte erlauben, durchgeführt. Es wurde zelluläre Gesamt-RNA aus transient transfizierten RTS3b-Zellen mit einem Oligo dT *Primer* in cDNA umgeschrieben. Diese diente dann als Matrize in einer quantitativen Echtzeit-PCR (A) mit Luciferase-Gen-spezifischen Oligonukleotiden (B). In allen Zellen wurde das Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc nebst den Expressionsvektoren für p300, 16E2 und 16E6-C, wie in der Tabelle in Abb. 37C angegeben,

## Ergebnisse

transfiziert. Wie bereits erwähnt, war die C-terminale Hälfte für die Repression ausreichend (Krüppel, U. et al., 2008).



### Abb. 37: 16E6 reprimiert den P<sub>97</sub> auf Ebene der Transkription

A: Echtzeit-PCR. RTS3b-Zellen wurden mit 1 ng des Expressionsvektors für 16E2, 500 ng CMV $\beta$ -p300-HA, 750 ng pcDNA-Flag-HPV16E6-C und HPV16LCR-E7-Luc kotransfiziert (s. Tabelle in Abb. C). 2  $\mu$ g RNA dieser Zellen wurden mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. 20% dieses RT-Ansatzes wurden anschließend in einer quantitativen PCR mit SYBR-green Sonden im Light Cycler mit Luciferase-Gen-spezifischen Oligonukleotiden (B) amplifiziert. 25% des PCR-Ansatzes wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (C). In Spur 11 ist die Negativkontrolle der PCR (H<sub>2</sub>O) aufgetragen.

Die Bande in Spur 5 der Abb. 37 stellt die Menge der Luciferase-spezifischen Transkripte dar, wenn nur HPV16LCR-E7-Luc transfiziert wurde. Diese erhöhte sich bei Kotransfektion des Expressionsvektors für p300 (Spur 7) und für 16E2 (Spur 6). Eine Abschwächung des Signals verglichen zum Basalwert (Spur 5) wurde durch Ko-Expression von 16E6-C erreicht (Spur 8). Die entsprechende Bande in Spur 9 zeigte die höchste Intensität. Somit wurde die in transienten Transfektionen beobachtete kooperative Aktivierung der HPV16-Genexpression auch auf mRNA-Ebene bestätigt. Die Intensität dieser Bande nahm um ein vielfaches bei Ko-Expression von 16E6-C ab (Spur 10). Dies zeigt, dass 16E6-C den P<sub>97</sub> auf Ebene der Transkription reprimiert.

### 4.15.2 16E6 ist in der Nähe des P<sub>97</sub> nachweisbar

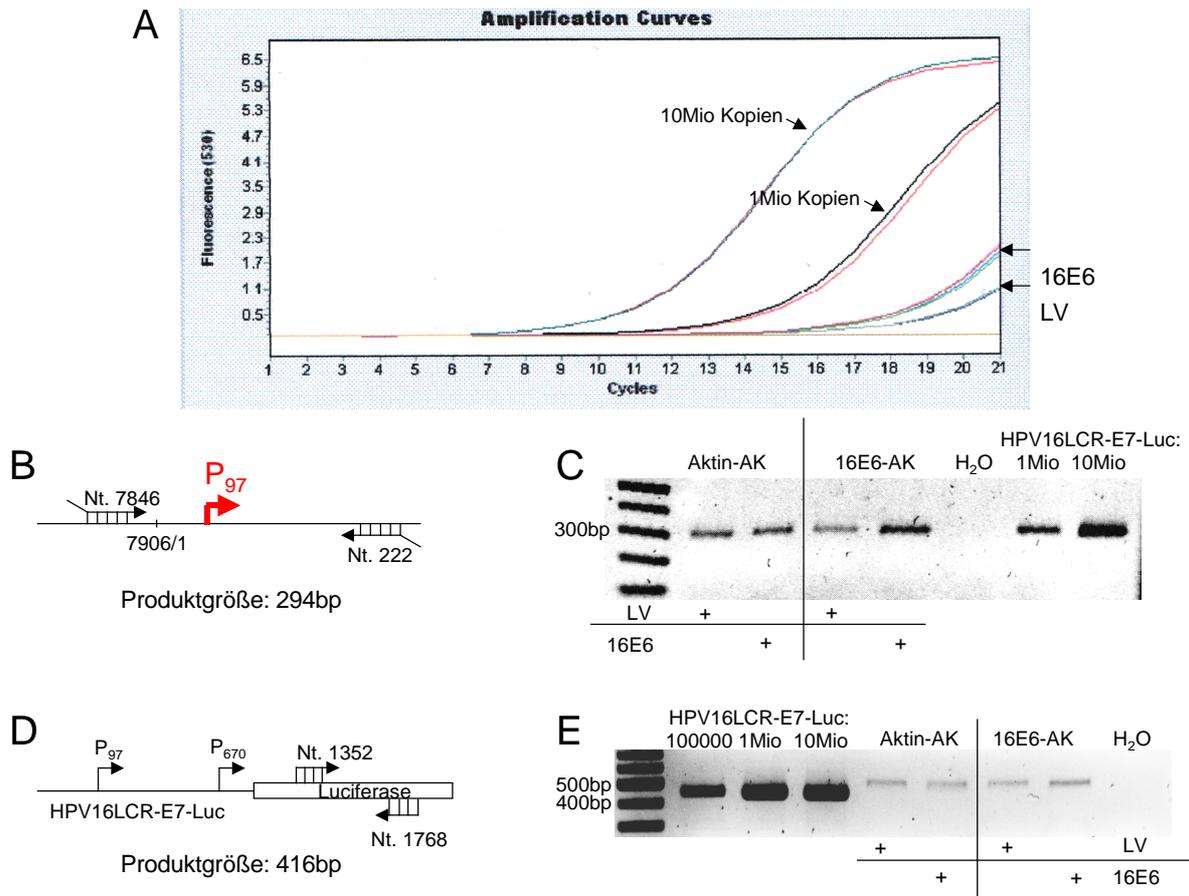
Die gesamte Luciferaseaktivität nach Transfektion des wt Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc stammt vom frühen Promotor, da nach Mutation der TATA-Box des P<sub>97</sub> keinerlei Aktivität mehr nachweisbar ist (s. Abb. 14). Erst nach Mutation der C/EBP-BS 469 wird ein weiterer Promotor aktiv. Das bedeutet, dass die hier beobachtete Regulation der HPV16-Genexpression durch Faktoren wie E2, p300, C/EBP $\alpha$  und 16E6 den P<sub>97</sub> betreffen. Die Repression des P<sub>97</sub> auf der Ebene der Transkription macht die Gegenwart von 16E6 am PIK sehr wahrscheinlich. Durch seine Bindung an p300 und C/EBP $\alpha$ , wie bereits nachgewiesen, könnte 16E6 über Protein-Protein-Wechselwirkungen in die Nähe des Promotors rekrutiert werden. Um dies zu untersuchen, wurde ein ChIP-Assay, der den *in vivo* Nachweis von Protein-Protein, sowie Protein-DNA-Interaktionen erlaubt, durchgeführt (s. Abb. 38).

RTS3b-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc und dem Expressionsvektor für 16E6 bzw. dem entsprechenden Leervektor kotransfiziert. Nach Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) mit einem 16E6-spezifischen Antikörper, wurden die daran gebundenen, den P<sub>97</sub>-kodierenden DNA-Fragmente durch eine Echtzeit-PCR im Light Cycler nachgewiesen.

Wie der Abb. 38 C zu entnehmen ist, konnten mittels 16E6-spezifischem Antikörper aus der 16E6 enthaltenden Probe mehr DNA-Fragmente, die den P<sub>97</sub>-Promotorbereich einschließen (B), präzipitiert werden, als in Abwesenheit von 16E6. Der Aktin-Antikörper präzipitierte vergleichbare Mengen an P<sub>97</sub>-DNA-Fragment, unabhängig von der Anwesenheit von 16E6. Dies wurde in einer Echtzeit-PCR im Light Cycler ermittelt (A). Um eine unspezifische DNA-Bindung von 16E6 (Ristriani, T. et al., 2000) auszuschließen, wurde als weitere Negativkontrolle ein Abschnitt des Luciferasegens des Reporterkonstruktes HPV16LCR-E7-Luc amplifiziert (D). Wie das Agarosegel in Abb. 38 E zeigt, war die Menge an Luciferase-spezifischer cDNA in allen ChIP-Proben annähernd gleich und nur in sehr geringer Konzentration vorhanden.

Dies zeigt, dass 16E6 in der Nähe des P<sub>97</sub> lokalisiert ist. Es könnte somit im PIK inkorporiert sein.

## Ergebnisse



### Abb. 38: 16E6 befindet sich in Promotornähe

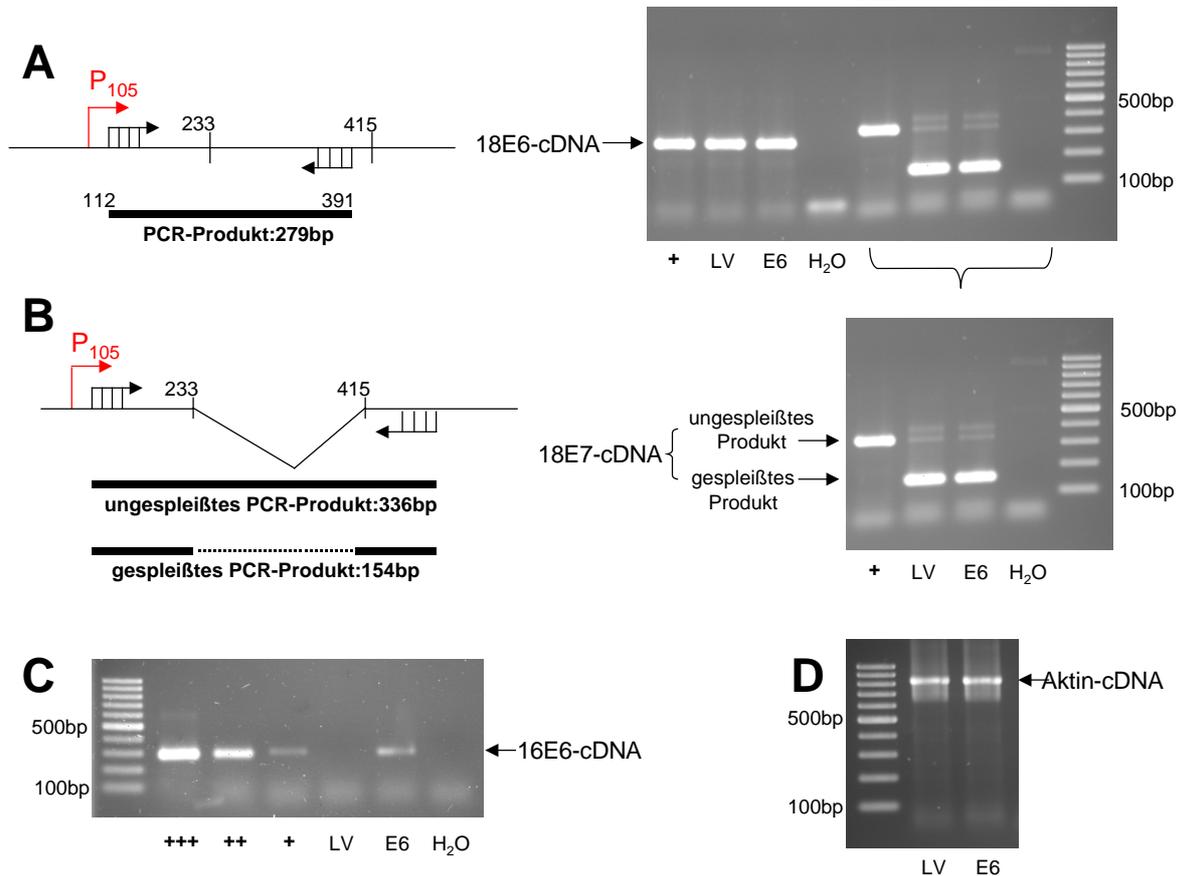
ChIP-Assay in RTS3b-Zellen, die mit HPV16LCR-E7-Luc und den Expressionsvektoren für pcDNA-Flag-HPV16E6 oder dem Leervektor pcDNA-Flag kotransfiziert wurden. Die ChIP-Proben wurden mit 2 µg eines monoklonalen 16E6-Antikörpers, bzw. einem Aktin-spezifischen Antikörper (Negativkontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die durch Formaldehyd kovalent verknüpften und AK-gebundenen Protein-DNA-Fragmente über Protein-G-Agarose präzipitiert. Die in B skizzierte Promotorregion, bzw. ein Bereich innerhalb des Luciferasegens (Negativkontrolle, D) wurden mittels Echtzeit-PCR im Light Cycler (A) mit Oligonukleotiden, die die zu untersuchende Sequenz eingrenzen (B,D), amplifiziert und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (C,E).

### 4.15.3 Die Überexpression von 16E6 führte in den HPV18-positiven HeLa-Zellen zu keiner verminderten Expression von 18E6 und E7

Die beschriebenen Ergebnisse implizieren, dass 16E6 seine eigene, durch E2, p300 und/oder C/EBPα aktivierte Expression, reprimiert. Allerdings wird in HPV16-positiven Zervixkarzinomen und in den davon abstammenden Zelllinien eine relativ hohe Menge an E6 vorgefunden. Diese hohen 16E6-Mengen sollten aufgrund der bisherigen Ergebnisse den P<sub>97</sub> reprimieren. Um den Einfluss von 16E6 auf die Aktivität des frühen HPV-Promotors in Zellen, die von einem Zervixkarzinom abstammen, zu untersuchen, wurden HPV18-positive HeLa-Zellen mit rekombinanten Retroviren, die 16E6 produzieren, infiziert. Anschließend wurde die

## Ergebnisse

mRNA-Menge von 18E6 und 18E7 ermittelt. In Vorversuchen wurde bereits bestätigt, dass 16E6 auch den  $P_{105}$  von HPV18 reprimiert (Daten nicht gezeigt). Dieses System wurde gewählt, um die Transkripte des künstlich in HeLa eingebrachten 16E6 von denen des endogenen 18E6, die die Aktivität des frühen Promotors  $P_{105}$  reflektieren, unterscheiden zu können.



**Abb. 39: Die Expression von 18E6 und 18E7 ist unabhängig von der Anwesenheit von 16E6 in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa**

A: Aus HeLa-Zellen, infiziert mit rekombinanten Retroviren, die 16E6, bzw. den Leervektor produzieren, wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels RT in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Matrize in einer Echtzeit-PCR im Light Cycler. Die 18E6-cDNA wurde mit den links in der Abbildung A schematisch dargestellten Oligonukleotiden amplifiziert. Als Positivkontrolle der PCR diente das Reporterkonstrukt HPV18LCR-E7-Luc als Matrize und Wasser als Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O).

B: Nachweis der E7-cDNA in den, wie unter A beschrieben, infizierten HeLa-Zellen. Die zwei durch alternatives Spleißen amplifizierten Produkte sowie die verwendeten Oligonukleotide sind links skizziert.

C: Zur Kontrolle der erfolgreichen Infektion diente der Nachweis der 16E6-cDNA. Die Positivkontrolle der PCR (HPV16LCR-E7-Luc) wurde in drei verschiedenen Ausgangskonzentrationen eingesetzt. Wasser diente als Negativkontrolle.

D: Zur Kontrolle der Qualität der eingesetzten cDNA aus den infizierten HeLa-Zellen diente der Nachweis der Aktin-cDNA mit Aktin-spezifischen Oligonukleotiden.

Nach der Selektion der infizierten HeLa-Zellen wurde die zelluläre Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in einer Echtzeit-PCR im Light Cycler eingesetzt. Wie auch das Agarosegel widerspiegelt (Abb. 44 A), ist bei Verwendung von Oligonukleotiden, die innerhalb des 18E6 ORF binden, kein Unterschied in der Bandenintensität der mit Leer- oder 16E6-Viren infizierten Proben zu erkennen. Gleiches gilt für die Expression von E7 (Abb. 39 B). Wie in der Abb. 39 B zu sehen ist, befindet sich an Position 233 des HPV18 Genoms ein Spleißdonor mit entsprechendem Akzeptor an Position 415. Somit sollte die gespleißte mRNA eine Größe von 154 Nukleotiden aufweisen, während die ungespleißte Form 336 Nukleotide groß sein sollte. Bei Verwendung der 18E7-spezifischen Oligonukleotide, die Spleißdonor und Akzeptor umschließen, ergeben sich drei Produkte. Die oberste Bande im Gel scheint ein unspezifisches PCR-Produkt zu sein, da sie auf eine mRNA hinweist, die größer als die ungespleißte 18E7-mRNA ist, deren Signal in der Mitte zu sehen ist. Die unterste Bande entspricht der gespleißten Variante der E7-mRNA, die im Gegensatz zur ungespleißten mRNA, deutlich abundant ist. Zum Nachweis einer erfolgreichen Infektion wurde mit 16E6-spezifischen Oligonukleotiden die 16E6-mRNA mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 39 C). Als interne Kontrolle der Qualität der eingesetzten cDNA wurde eine PCR mit Aktin-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (Abb. 39 D). Somit scheint die Überexpression von 16E6 in HeLa-Zellen keinen Einfluss auf die Expression der Onkoproteine 18E6 und E7 zu haben.

Entweder ist 16E6 nicht in der Lage, den frühen Promotor in Zervixkarzinomen zu inhibieren, oder die Hemmung ist bereits durch die Menge an endogenem E6 optimal. Falls dies der Fall wäre, sollte eine Verringerung der E6-Menge zu einer verstärkten Promotoraktivität führen.

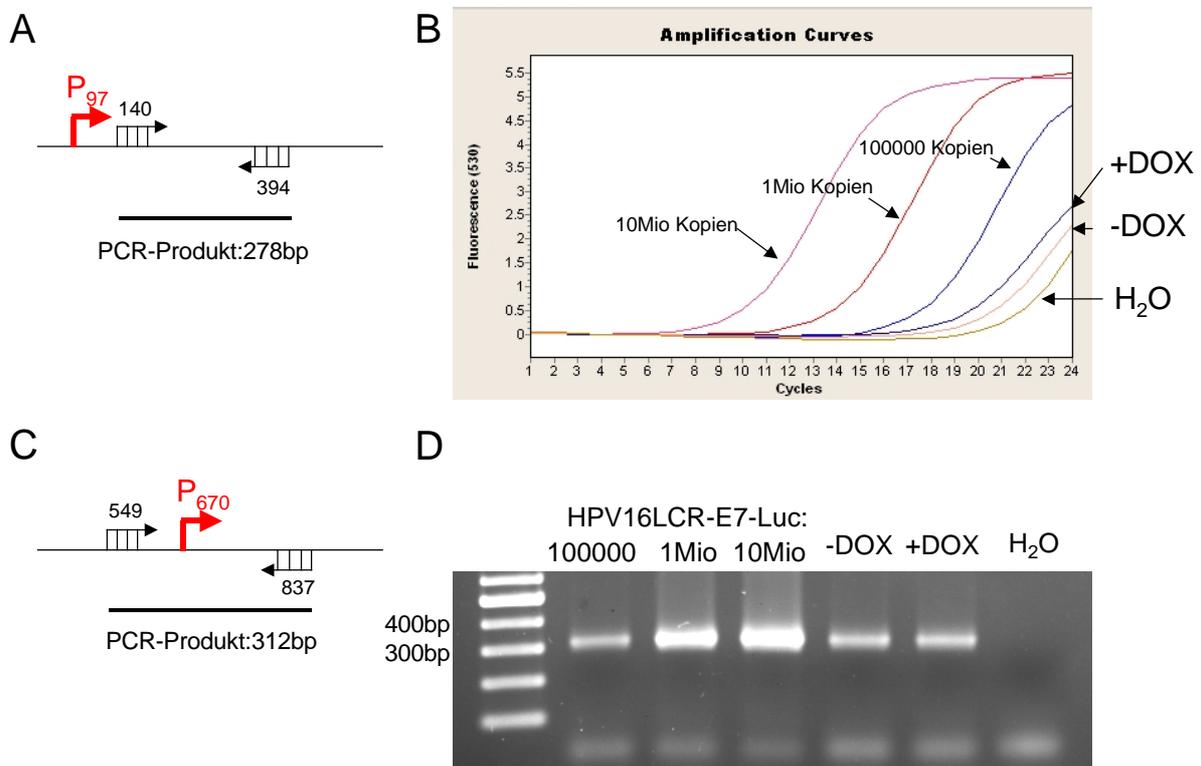
#### **4.15.4 Eine Reduzierung der Menge an 16E6 beeinflusst nicht die Expression von 16E7 in SiHa-Zellen**

Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine Reduzierung der Menge an E6 in SiHa-Zellen auf die Aktivität des P<sub>97</sub> hat, wurde eine monoklonale, stabil transfizierte Zelllinie (pcDNA6TR8pTERsiRNA16E6B) verwendet. Diese produziert, bei Zugabe von Doxycyclin, eine sh-RNA, die spezifisch die Expression von 16E6 hemmt. Diese SiHa-Zelllinie wurde von Stephanie Töpffer in unserem Labor wie folgt hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde eine stabile SiHa-Zelllinie hergestellt, die den Tet-Repressor produziert. Durch Transfektion eines Vektors, der nach Inaktivierung des Tet-Repressors, eine siRNA gegen 16E6B exprimiert (Kelley, M.L. et al., 2005), wurden doppelt-stabile SiHa-Zellen etabliert. Die Zugabe von Doxycyclin, einem Tetracyclin-Analogon, inaktivierte den Tet-Repressor, so dass dieser nicht mehr den Operator des pTER-Vektors

## Ergebnisse

binden konnte. Die 16E6-shRNA wurde produziert und führte zum Abbau der mRNA spezifisch für 16E6. Dies hatte eine deutliche Zunahme der Menge von p53 zur Folge, das normalerweise durch 16E6 dem proteasomalen Abbau zugeführt wird, was die Reduzierung von 16E6 durch Zugabe von Doxycyclin zum Zellkulturmedium beweist (S. Töpfer, pers. Mitteilung).

RNA aus Doxycyclin behandelten und unbehandelten Zellen wurde isoliert, und mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde in einer Echtzeit-PCR im Light Cycler mit 16E6-spezifischen Oligonukleotiden (Abb. 40 A) die E6-spezifische cDNA amplifiziert. Die Quantifizierung ergab eine Reduzierung der Menge an 16E6 durch Doxycyclin-Zugabe von  $4,81 \cdot 10^4$  Kopien auf  $2,54 \cdot 10^4$  Kopien. Somit senkte die siRNA die E6-spezifische mRNA um 53%.



**Abb. 40: Eine Verringerung der 16E6-Menge führt in SiHa-Zellen nicht zu einer verstärkten Promotoraktivität**

RT-PCR. 2 µg RNA einer stabil transfizierten SiHa-Zelllinie pcDNA6TR8pTERsiRNA16E6B, die unter Doxycyclin-Zugabe eine 16E6sh-RNA produziert, wurde mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und anschließend als Matrize in einer Echtzeit-PCR (B) mit 16E6-spezifischen Oligonukleotiden (A) eingesetzt.

Die o.g. cDNA wurde in einer weiteren Echtzeit-PCR mit E7-spezifischen Oligonukleotiden (C) verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt (D).

## Ergebnisse

---

Die spezifische Sequenz der sh-RNA wurde so gewählt, dass die Menge an 16E6-mRNA reduziert wurde, die mRNA für 16E7 jedoch nicht betroffen war (Kelley, M.L. et al., 2005). Es sollte demnach möglich sein, anhand der Menge der E7-mRNA die Aktivität des P<sub>97</sub> zu beurteilen. Mit Hilfe von E7-spezifischen Oligonukleotidpaaren (Abb. 40 C) wurde in einer Echtzeit-PCR im Light Cycler mit der o.g. cDNA die E7-mRNA vor und nach Zugabe von Doxycyclin quantifiziert. Wie im Agarosegel zu erkennen ist, ergab die Quantifizierung der PCR keine Zunahme der 16E7-mRNA bei reduzierter 16E6-Menge.

Somit konnte weder durch überexprimiertes 16E6, noch durch eine Reduktion der Menge an 16E6 die Promotoraktivität des frühen Promotors in Zervixkarzinom abgeleiteten Zelllinien beeinflusst werden, was sich in der stets gleich bleibenden E7-mRNA-Menge widerspiegelt. Demnach scheint 16E6 in Zervixkarzinomen keiner Autoregulation zu unterliegen.

## 5 Diskussion

Der Lebenszyklus der PV wird in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Haut-, bzw. Schleimhautkeratinozyten auf Ebene der Transkription reguliert. Ubiquitär, keratinozyten-spezifisch, sowie differenzierungsabhängig exprimierte, zelluläre Transkriptionsfaktoren müssen für eine effiziente Transkription an Sequenzen innerhalb des HPV-Genoms binden. Zusätzlich wird die virale Genexpression von viral kodierten Proteinen moduliert.

Untersuchungen der Transkriptionskontrolle bei HPV8 und die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Regulation der HPV16-Genexpression lassen auf völlig unterschiedliche Mechanismen der Genregulation bei diesen PV-Typen schließen, obwohl sie beide zu den Hochrisiko HPV-Typen gehören. So konnte zwar für HPV16, wie bei HPV8 (Müller, A. et al., 2002), eine kooperative Aktivierung der Genexpression durch geringe Mengen E2 und den Ko-Aktivator p300 bestätigt werden, jedoch wurde bei HPV16 der frühe Promotor P<sub>97</sub> aktiviert (Krüppel, U., 2004) und bei HPV8 der späte Promotor P<sub>7535</sub>. Beide Prozesse benötigen hohe Mengen des Ko-Aktivators p300. Im Fall von HPV16 war die Bindung von E2 an mindestens zwei der vier innerhalb der LCR lokalisierten Bindestellen (BS) (Krüppel, U., 2004) und ein, bzw. mehrere Faktoren, die an Sequenzen stromabwärts des P<sub>97</sub> binden, notwendig. Ziel dieser Arbeit war es, den notwendigen Sequenzbereich einzugrenzen, der für die Kooperation von E2 und p300 bei der Aktivierung der HPV16-Genexpression essentiell ist, um somit einen Hinweis auf beteiligte Ko-Faktoren zu erhalten.

Im Allgemeinen zeigten die verwendeten verkürzten Reporterkonstrukte sehr voneinander abweichende Grundaktivitäten. Diese Aktivitätsschwankungen könnten auf das Entfernen von zwei Promotoren zurück zu führen sein, die in diesem Sequenzabschnitt gefunden wurden. Zum Einen liegt hier der P<sub>542</sub>, der eine monocistronische E7-mRNA generiert (Glahder, J. A. et al., 2003). Zudem wurden in SiHa- und Caski-Zellen an Pos. 448 bzw. 480 weitere Transkriptionsstartpunkte entdeckt. Allerdings sind diese Promotoren sehr schwach. Eine weitere Rolle könnten die zahlreichen CDP-Bindestellen (*CCAAT displacement protein*) innerhalb des Sequenzbereichs von Pos. 98-885 spielen. CDP ist assoziiert mit der *Histon Deacetylase1* (HDAC1) und vermittelt die Deacetylierung der Lysinreste der Histone und führt somit zu einer kompakten Chromatinstruktur (Bernard, H.-U., 2000; O'Connor, M. J. et al., 2000). Dies zieht eine verringerte Promotoraktivität nach sich (Nepveu, A., 2001). Zum Anderen könnten aber auch BS für diverse zelluläre Transkriptionsaktivatoren in diesem Bereich lokalisiert sein, die der CDP vermittelten Repression (O'Connor, M. J. et al., 2000) entgegenwirken. Das Reporterkonstrukt Nt.412-Luc hatte die höchste Basalaktivität, die bei Deletion der Sequenz bis Nt. 394-412 um ca. 75% reduziert war, was dafür spricht, dass

auch in diesem 18 bp Bereich ein Aktivator bindet. Die Sequenzanalyse fand eine potentielle BS für barx. Allerdings hatte die Überexpression von barx in transient transfizierten RTS3b-Zellen keinen Einfluss auf die HPV16-Promotoren im Reporterkonstrukt HPV16LCR-E7-Luc. Barx ist ein Homöodomänen Protein, das als Aktivator oder Repressor agieren kann (Edelman, D. B. et al., 2000) und in den Haarwurzeln exprimiert wird. Haarwurzeln gelten als Reservoir für persistierende HPV (Adachi, A. et al., 2004). Es wäre weiter zu prüfen, ob barx eine Rolle bei der Regulation der Genexpression von genitalen HPV spielt.

Bei Deletion des Sequenzbereichs von Pos. 523 bis 430 ging die Kooperativität von E2 und p300 verloren. Dies korrelierte mit einer reduzierten Aktivierung durch p300 und könnte bedeuten, dass innerhalb dieses Bereichs ein Faktor bindet, der p300 an den Promotor rekrutiert. Abgesehen von dem Effekt auf die p300 und E2 vermittelte Aktivierung des P<sub>97</sub>, sank die Basalaktivität des Reporterkonstruktes bei Deletion des Sequenzbereiches bis Nt. 469 um fast 60% ab. In diesem Bereich konnte in dieser Arbeit eine bisher unbekannte BS für C/EBP gefunden werden. Die Bindung von C/EBP $\alpha$  an die BS 469 könnte eine wesentliche Rolle bei der differenzierungsabhängigen Regulation unterschiedlicher HPV Promotoren spielen könnte. DNA-Bindungsstudien ergaben, dass die BS 469 von C/EBP $\alpha$  und C/EBP $\beta$  gebunden wird. Die Spezifität der Protein-DNA-Wechselwirkung wurde durch den Einsatz eines homologen Kompetitors im Gelretardierungsexperiment (EMSA) bestätigt. Zusätzlich verloren GST-C/EBP $\alpha$  und GST-C/EBP $\beta$  nach Mutation von zwei Basenpaaren innerhalb der Kernerkennungssequenz ihre Affinität zur DNA. Endogenes C/EBP $\alpha$  band diese Sequenz *in vivo*. Innerhalb der HPV18-Sequenz befindet sich an Position 480 eine homologe Sequenz, die von C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  im EMSA erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Somit scheint diese BS unter Schleimhaut-assoziierten Hochrisiko-PV konserviert zu sein.

C/EBP $\alpha$  aktivierte die frühe Genexpression von HPV16. Dies belegten transiente Transfektionen mit einem Reporterkonstrukt, in dem der P<sub>97</sub> inaktiviert war. Die Mutation der TATA-Box des P<sub>97</sub> führte zum Verlust messbarer Luciferase-Aktivität, d.h., dass alle Effekte mit wt HPV16LCR-E7-Luc den frühen Promotor betreffen. Mit der Aktivierung des P<sub>97</sub> durch C/EBP $\alpha$  ging offensichtlich eine Repression eines weiteren Promotors einher, da es zu einem Anstieg der Basalaktivität des Reporterkonstruktes mit mutiertem P<sub>97</sub> nach zusätzlicher Mutation der BS 469 kam. Der durch C/EBP reprimierte Promotor konnte in dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Wahrscheinlich ist es nicht der späte Promotor P<sub>670</sub>, denn es wurde gefunden, dass im Zuge der Differenzierung einer HPV16-positiven zervikalen Zelllinie die Expression an C/EBP $\alpha$  zunimmt (Carson, A. & S. A. Khan, 2006). Differenzierung korreliert aber auch mit Induktion des späten Promotors. Erste *RNase Protection*-Experimente lassen vielmehr auf einen weiteren Promotor innerhalb der Region

von Nt. 350-650 schließen (Daten nicht gezeigt). Wie bereits erwähnt, liegen hier der P<sub>542</sub>, (Glahder, J. A. et al., 2003) und die beiden Transkriptionsstartpunkte an den Positionen 448 und 480 des HPV16 Genoms (Rosenstierne, M. W. et al., 2003). Der P<sub>480</sub> überlappt mit der C/EBP BS 469. Gebundenes C/EBP $\alpha$  könnte die Ausbildung des PIK an dieser Position behindern, während die Mutation der BS die Ausbildung des PIK wieder erlauben und zur Initiation der Transkription führen könnte. Ferner könnte C/EBP $\alpha$  spezifische HPV16-Promotoren reprimieren, in dem es den Ko-Repressor CA150 an den Promotor rekrutiert. Dieser Faktor wurde erst kürzlich in einem Hefe-*Two-Hybrid*-System als Interaktionspartner von C/EBP $\alpha$  identifiziert. CA150 war an Promotoren lokalisiert, die durch C/EBP $\alpha$  reprimiert wurden, nicht jedoch an solchen, die C/EBP $\alpha$  aktivierte (McFie, P. J. et al., 2006).

Die Mutation der BS 469 hob die Kooperation zwischen überexprimierten E2 und p300 auf. Möglicherweise sind sowohl E2 als auch an die BS 469 gebundenes C/EBP $\alpha$  nötig, um p300 mit höchst möglicher Effizienz an den Promotor zu rekrutieren. Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektionen zeigten keinen zusätzlichen stimulatorischen Effekt von E2 auf den durch C/EBP $\alpha$  und p300 aktivierten P<sub>97</sub> (Daten nicht gezeigt). Erhöhte Mengen von C/EBP $\alpha$  rekrutieren demnach genügend p300 an den Promotor oder verändern seine Funktion so, um maximale Ko-Aktivatorfunktion zu erreichen. Da die intrinsische HAT-Aktivität entscheidend an der Kooperation von C/EBP $\alpha$  mit p300 beteiligt ist, jedoch kaum Relevanz bei der Transaktivierung durch E2 und p300 hat, nutzen E2 und C/EBP $\alpha$  p300 anscheinend auf unterschiedliche Weise. Neben Histonen acetyliert p300 auch Transkriptionsfaktoren, deren Affinität zur DNA dadurch erhöht sein kann und die daraufhin als kompetente Aktivatoren fungieren können (Liu, L. et al., 1999; Tomita, A. et al., 2000). Während E2 von p300 nicht acetyliert wird (Müller-Schiffmann, pers. Mitteilung), wäre es möglich, dass p300 C/EBP $\alpha$  acetyliert, so wie es für C/EBP $\beta$  bereits beschrieben ist. Die C/EBP $\beta$ -Sequenz enthält mehrere Lysine, die von p300 acetyliert werden können. Durch Mutation des Lys39 zum Beispiel verlor C/EBP $\beta$  die Fähigkeit, die Promotoren von C/EBP $\alpha$  und c-fos zu aktivieren (Cesena, T. I. et al., 2007). Dies würde erklären, warum die HAT-Aktivität für die Kooperation von p300 mit C/EBP $\alpha$  essentiell ist, nicht aber für die Zusammenarbeit mit E2.

Eine weitere Möglichkeit der Stimulierung der Koaktivatorfunktion von p300 durch C/EBP $\alpha$  wurde bereits von Schwartz *et al.*, 2003 beschrieben und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  sind in der Lage, eine Phosphorylierung des C-Terminus von p300 zu induzieren, die zur Stabilisierung des p300-Proteins führt und zusätzlich seine Ko-Aktivatorfunktion erhöht (Schwartz, C. et al., 2003). Mittels Reticulozytenlysat translatiertes

C/EBP $\alpha$  konnte *in vitro* keine Phosphorylierung von p300cBAES induzieren, so dass weitere Faktoren an diesem Prozess beteiligt sein müssen.

Da sowohl C/EBP $\alpha$  als auch E2 mit überexprimiertem p300 kooperieren, scheint die Menge an p300 ein limitierender Faktor für die Aktivierung der HPV16-Genexpression zu sein. Die intrazelluläre Konzentration von p300 ist unter physiologischen Bedingungen limitiert (Yao, T.-P. et al., 1998). p300 ist an vielen zellulären Signalwegen beteiligt, die zum Teil auch antagonistisch sind. Somit konkurrieren die einzelnen Transkriptionsfaktoren um die Bindung an eine begrenzte Anzahl von p300-Molekülen. PV E2-Proteine könnten dieses empfindliche Gleichgewicht zu Gunsten des Virus verschieben und somit zelluläre, physiologische Prozesse stören. In den transienten Transfektionen variierte die Qualität der Aktivierung durch 16E2 und p300. Dies wurde bereits früher beschrieben (Müller, A., 2003). Vor allem in Keratinozyten-Kulturen höherer Passagen führte die Überexpression von p300 kaum noch zu einer Stimulation, was sich auch in einer verminderten kooperativen Aktivierung mit E2 widerspiegelte. Zusätzlich war die Basalaktivität des Reporterkonstruktes in diesen Zellen erhöht. Möglicherweise ist in Zellen höherer Passagen die Expression von endogenem p300 bereits gesteigert ist und maskiert somit den Effekt von zusätzlich exprimiertem p300.

Während in gesunder Zervix eine gleichmäßige p300-Expression unabhängig vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten beobachtet wurde, war sie in HPV16-positiven zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) hauptsächlich auf die proliferierenden suprabasalen Zellen beschränkt (Krüppel, U. et al., 2008). Entsprechend hatten die von Zervixkarzinomen abgeleiteten Zelllinien SiHa und Caski höhere Mengen an endogenem p300 verglichen mit NHEK. Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen korreliert somit mit erhöhten p300 Mengen. In den HPV16-positiven CIN-Läsionen könnte dies zur Aktivierung des P<sub>97</sub> beitragen, so dass die Onkogene E6 und E7 vermehrt exprimiert werden. In niedrig gradigen HPV16-positiven Läsionen, die den produktiven Lebenszyklus unterstützen (Doorbar, J., 2006), wurde 16E2 hauptsächlich in den obersten Zellschichten detektiert, aber auch in den basalen Schichten (Maitland, N. J. et al., 1998; Stevenson, M. et al., 2000). In einer Läsion könnte es somit Zellen geben, die entsprechende Mengen an p300 und E2 exprimieren, die zur kooperativen Aktivierung des P<sub>97</sub> führen.

Transiente Transfektionen belegten, dass 16E6 die C/EBP $\alpha$  und p300 induzierte Aktivierung der HPV16-Genexpression reprimiert. Die hier dargestellten Untersuchungen demonstrieren, dass die Reduktion der Menge an phosphoryliertem p300 durch 16E6 eine Rolle spielen könnte. Die Beobachtungen, dass HPV8 E6, das die Ko-Aktivatorfunktion von p300 erhöht und auch die funktionelle Kooperativität zwischen p300 und C/EBP $\alpha$  stimuliert, die C/EBP $\alpha$

vermittelte Phosphorylierung von p300 verstärkte und, dass eine Mutante von 16E6, 16E6 $\Delta$ 26-29, die stärker als der Wildtyp reprimierte und zusätzlich die Konzentration an phosphoryliertem p300 verringerte, unterstützten dies. Hierbei ist ein Faktor involviert, der durch 16E6 proteasomal abgebaut wird, da unter Einfluss des Proteasominhibitors MG132 die Menge an phosphoryliertem p300 nicht reduziert wurde. Alle hier verwendeten 16E6-Mutanten, außer 16E6 $\Delta$ 26-29, sind E6-AP-Interaktions-defekt (Liu, Y. et al., 1999; Pim, D. et al. 2002) und haben auch keinen negativen Einfluss auf phosphoryliertes p300. Somit könnte die Bindung von 16E6 an E6-AP eine Rolle spielen. Obwohl 16E6 mit C/EBP $\alpha$  und p300 interagiert (s. Abb. 33 und Patel et al., 1999; Zimmermann et al., 1999) und die Stabilität beider Proteine in der Zelle über Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau reguliert wird (Chen, J. et al., 2007; Trivedi, A. K. et al., 2007), lieferten Degradationsexperimente keine Hinweise auf einen 16E6-vermittelten proteasomalen Abbau von p300, bzw. C/EBP $\alpha$ . Der hier von 16E6 proteasomal abgebaute Faktor muss noch identifiziert werden. Die fünf bekannten Phosphorylierungsstellen innerhalb des C-Terminus von p300 weisen Ähnlichkeiten mit Erkennungssequenzen für Prolin-abhängige Protein-Kinasen sowie die Protein-Kinasen A und C auf (Blom, N. et al., 1999; Schwartz, C. et al., 2003). Die Protein-Kinasen A und C werden durch Staurosporine effizient inhibiert. Staurosporine hatte keinen Einfluss auf die Entstehung von phosphoryliertem p300, was belegt, dass andere Kinasen dafür verantwortlich sind. Allerdings impliziert die Beobachtung, dass Staurosporine den negativen Effekt von 16E6 auf die Menge von phosphoryliertem p300 aufhob, dass 16E6 nach der Entstehung von phosphoryliertem p300 agiert. D.h., die Aktivität einer Staurosporine-abhängigen Kinase ist nötig für 16E6-vermittelte Reduktion der Menge an phosphoryliertem p300. 16E6 könnte beispielsweise eine Staurosporine inhibierbare Kinase induzieren, die eine Phosphatase phosphoryliert und somit aktiviert, die dann wiederum p300 dephosphoryliert. Es sind einige zelluläre Kinasen bekannt, die durch HPV Onkogene moduliert werden, wie z.B. die PKR (*double-stranded RNA protein kinase*) oder die AKT-Kinase (Hebner, C. M. et al., 2006; Menges, C. W. et al., 2006). Eine Wechselwirkung von 16E6 mit einer durch Staurosporine inhibierbaren Kinase wurde bislang nicht beschrieben. Allerdings werden Hochrisiko-E6-Proteine von Protein-Kinase A in der Nähe des PDZ-Bindemotivs phosphoryliert und verlieren dadurch ihre Fähigkeit Dlg zu degradieren (Kühne, C. et al., 2000).

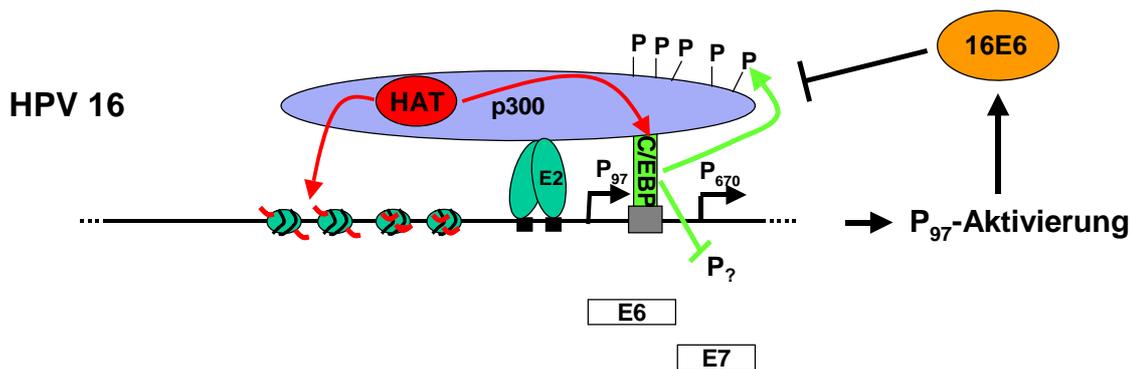
Die Reduktion der Phosphorylierung von p300 trägt nur zur Repression bei. Die transkriptionelle Repression durch die C-terminale Hälfte von 16E6 wird vermittelt durch das PDZ-Motiv. Zudem ist die N-terminale Hälfte von 16E6 in Verbindung mit Domänen im C-Terminus an der Repression beteiligt, denn die Deletion des PDZ-Motivs im gesamten E6-Protein hob die Repression der Transkription nicht auf. Dies korreliert mit den Ergebnissen

von Müller-Schiffmann, die beschreiben, dass die gleichen Domänen an der Repression der kooperativen Aktivierung von 8E2 und p300 durch 16E6 beteiligt sind (Müller, A., 2003). Da 16E6-C keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von p300 hatte und E2 nicht die Phosphorylierung von p300 induziert (Daten nicht gezeigt), muss hier ein anderer Mechanismus zugrunde liegen. Welchen Beitrag diese Domänen zur 16E6 vermittelten Repression der Transkription leisten, ist ungeklärt. Die hier gezeigten Daten belegen allerdings, dass dies auf der Ebene der Transkription statt findet. 16E6 ist am P<sub>97</sub> nachweisbar. Eine DNA-Bindung von 16E6 scheint unwahrscheinlich, da eine Echtzeit-PCR mit Luciferase-spezifischen Oligonukleotiden keine unspezifische DNA-Bindung von 16E6 (Ristriani, T. et al., 2000) zeigte. Somit gelangt 16E6 zur Regulation über Protein-Protein-Wechselwirkungen in die Nähe des P<sub>97</sub>.

Im Gegensatz zu transient transfizierten Reporterkonstrukten, lieferten Untersuchungen in den Zervixkarzinomzelllinien SiHa und Caski keinen Hinweis auf eine Rolle von 16E6 bei der Regulation des P<sub>97</sub>. 16E6 konnte im ChIP-Assay nicht in Promotornähe gefunden werden (ChIP-Assay in Caski-Zellen nicht gezeigt). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der E6-Antikörper evtl. die geringe Menge an endogenem 16E6 nicht effizient präzipitieren konnte. In SiHa-Zellen, in denen die 16E6-Expression mittels siRNA reduziert wurde, blieb die Menge an E7mRNA gleich. Die retrovirale Infektion der HPV18-positiven Zelllinie HeLa mit einem 16E6 produzierenden Virus ergab auch keinen signifikanten Unterschied in der E6- und E7-mRNA. Möglicherweise ist die Fähigkeit von E6, seine Transkription zu reprimieren, im Verlauf der Karzinogenese verloren gegangen.

Möglicherweise spielt die Genomorganisation eine entscheidende Rolle bei der Transkription des HPV-Genoms. Es wird angenommen, dass transient transfizierte Reporterkonstrukte in Assoziation mit Histonen eine Nukleosomen-ähnliche Struktur bilden (Cervoni, N. & M. Szyf, 2001; Lee, D. et al., 2002). Allerdings sind sie wohl nicht wie zelluläres Chromatin organisiert (Cervoni, N. & M. Szyf, 2001). Die Beobachtung, dass E2 kaum einen Effekt auf die HPV16-Transkription hat, wenn das Genom episomal vorliegt, im Gegensatz zu transient transfizierten Reporterkonstrukten, bestätigt dies (Bechtold, V. et al., 2003). In Zervixkarzinomen ist der frühe HPV-Promotor hoch aktiv und die Wiedereinführung von E2 in entsprechenden Zelllinien führt zu einer effizienten Promotorrepression. Eine veränderte Chromatinstruktur in den o.g. Systemen könnte die Grundlage für die spezifischen Effekte von E6 darstellen. Untersuchungen der reprimierenden Aktivität von 16E6 auf episomales HPV16-Genom, würden darüber mehr Informationen liefern und eine Rolle von E6 bei der Regulation seiner Genexpression im Lebenszyklus von HPV16 untermauern.

Die in dieser Arbeit heraus gearbeitete Regulation der Transkription von HPV16 ist zusammenfassend in der Abb. 41 dargestellt. Zunächst bindet E2 an mindestens zwei seiner BS innerhalb der LCR und rekrutiert den zellulären Ko-Aktivator p300 an den frühen Promotor. Diese Rekrutierung wird unterstützt durch C/EBP $\alpha$ , das an seine BS an Position 469 der HPV16-Sequenz gebunden vorliegt. Die Interaktion von C/EBP $\alpha$  mit p300 induziert dessen C-terminale Phosphorylierungen. Auf diese Weise wird der Ko-Aktivator p300 aktiviert und vor proteasomalen Abbau geschützt. Die Bindung von C/EBP $\alpha$  an die BS 469 resultiert zusätzlich in der Repression eines weiteren Promotors. Der durch E2, p300 und/oder C/EBP $\alpha$  aktivierte P<sub>97</sub> führt zu einer vermehrten Expression der Onkoproteine E6 und E7. Erhöhte Mengen an E6 wiederum wirken einer starken Aktivierung des P<sub>97</sub> entgegen. Dies unterstützt eine normale Differenzierung der infizierten Keratinozyten, da erhöhte 16E6 und E7 Mengen das Risiko einer malignen Entartung der Zellen erhöhen.



**Abb. 41: Modell zur Regulation der HPV16-Genexpression**

Ausschnitt des HPV16-Genoms mit seinen beiden Hauptpromotoren P<sub>97</sub> und P<sub>670</sub> (abgeknickte schwarze Pfeile) sowie zwei der vier E2-BS (■). Die zwei türkisen ovalen Kreise symbolisieren die E2-Proteine und das große blaue Oval stellt p300 mit den fünf angehängten Phosphatresten (P) dar. Die Bindung von E2 an zwei seiner BS ist für die Kooperation mit p300 ausreichend. C/EBP $\alpha$  ist gebunden an seine BS 469 in hellgrün gezeichnet. Im vordersten Abschnitt der LCR sind exemplarisch Histone eingezeichnet, deren Lysinreste von der in rot dargestellten HAT-Aktivität von p300 acetyliert wurden, was eine Öffnung der Chromatinstruktur bewirkt. Aktivierende Funktionen sind als spitze Pfeile und reprimierende Effekte als stumpfe Pfeile gezeichnet. Im unteren Bildabschnitt sind die offenen Leserahmen der beiden Onkogene E6 und E7, die vom frühen Promotor gebildet werden, skizziert.

## 6 Literaturverzeichnis

Abbate, E. A., C. Voitenleitner und M. R. Botchan (2006). Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association. *Mol Cell* 24, 877-89.

Adachi, A., T. Suzuki und Y. Tomita (2004). Detection of human papillomavirus type 56 DNA, belonging to a mucous high-risk group, in hair follicles in the genital area of a woman no longer suffering from viral warts. *Br J Dermatol* 151, 212-5.

Akira, S. (1997). IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1401-18.

Androphy, E. J., D. R. Lowy und J. T. Schiller (1987). Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature* 325, 70-3.

Arias-Pulido, H., C. L. Peyton, N. E. Joste, H. Vargas und C. M. Wheeler (2006). Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 44, 1755-62.

Arnett, B., P. Soisson, B. S. Ducatman und P. Zhang (2003). Expression of CAAT enhancer binding protein beta (C/EBP beta) in cervix and endometrium. *Mol Cancer* 2, 21.

Auersperg, N. (1964). Long-Term Cultivation of Hypodiploid Human Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst* 32, 135-63.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl. (1992). *Short protocols in molecular biology*. Volum, Greene publishing and Wiley-Interscience, New York.

Baker, C.C. (1993). *The genomes of papillomaviruses*. Genetic maps, Volum, O'Brien, S.J., N.Y.

Barthel, R., A. V. Tsytsykova, A. K. Barczak, E. Y. Tsai, C. C. Dascher, M. B. Brenner und A. E. Goldfeld (2003). Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol Cell Biol* 23, 526-33.

Bauknecht, T. und Y. Shi (1998). Overexpression of C/EBPbeta represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. *J Virol* 72, 2113-24.

Bechtold, V., P. Beard und K. Raj (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* 77, 2021-8.

Bennett, K. L., B. Hackanson, L. T. Smith, C. D. Morrison, J. C. Lang, D. E. Schuller, F. Weber, C. Eng und C. Plass (2007). Tumor suppressor activity of CCAAT/enhancer binding protein alpha is epigenetically down-regulated in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 67, 4657-64.

Benson, J. D., R. Lawande und P. M. Howley (1997). Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator proteins with human and yeast TFIIB proteins. *J Virol* 71, 8041-7.

- Bernard, H.-U. (2000). Regulation of the transcription of genital human papillomaviruses by CDP, nucleosomes and nuclear matrix attachment regions. *Papillomavirus Report* 11, 73-80.
- Birnboim, H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.
- Blom, N., S. Gammeltoft und S. Brunak (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-62.
- Boyes, J., P. Byfield, Y. Nakatani und V. Ogryzko (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594-8.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Braunstein, T. H., B. S. Madsen, B. Gavnholt, M. W. Rosenstjerne, C. K. Johnsen und B. Norrild (1999). Identification of a new promoter in the early region of the human papillomavirus type 16 genome. *J Gen Virol* 80 ( Pt 12), 3241-50.
- Brownell, J. E. und C. D. Allis (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-84.
- Cao, Z., R. M. Umek und S. L. McKnight (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-52.
- Carson, A. und S. A. Khan (2006). Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation. *J Virol* 80, 4356-62.
- Cervoni, N. und M. Szyf (2001). Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J. Bio. Chem.* 276, 40778-40787.
- Cesena, T. I., J. R. Cardinaux, R. Kwok und J. Schwartz (2007). CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem* 282, 956-67.
- Chan, H. M. und N. B. La Thangue (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114, 2363-73.
- Chan, W. K., T. Chong, H. U. Bernard und G. Klock (1990). Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Res* 18, 763-9.
- Chen, H., R. J. Lin, R. L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M. L. Privalsky, Y. Nakatani und R. M. Evans (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-80.
- Chen, J., S. Halappanavar, J. P. Th' ng und Q. Li (2007). Ubiquitin-dependent distribution of the transcriptional coactivator p300 in cytoplasmic inclusion bodies. *Epigenetics* 2, 92-9.
- Chung, C.T., S.L. Niemela und R.H. Miller (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 21172-21175.

- Clifford, G. M., J. S. Smith, M. Plummer, N. Munoz und S. Franceschi (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88, 63-73.
- Cortes-Canteli, M., M. Pignatelli, A. Santos und A. Perez-Castillo (2002). CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 277, 5460-7.
- Day, P. M., R. B. Roden, D. R. Lowy und J. T. Schiller (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72, 142-50.
- Demeret, C., M. Yaniv und F. Thierry (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol* 68, 7075-82.
- Demeret, C., A. Garcia-Carranca und F. Thierry (2003). Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene* 22, 168-75.
- Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv und F. Thierry (1997). Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 71, 9343-9349.
- Desaintes, C., C. Demeret, S. Goyat, M. Yaniv und F. Thierry (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *Embo J* 16, 504-14.
- Desaintes, C., S. Goyat, S. Garbay, M. Yaniv und F. Thierry (1999). Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* 18, 4538-45.
- Dong, X. P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler und H. Pfister (1994). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* 58, 803-8.
- Doorbar, J. (1998). Late stages of papillomavirus life cycle. *Papillomavirus report* 9, 119-126.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 110, 525-41.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean und L. Crawford (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-7.
- Dowhanick, J. J., A. A. McBride und P. M. Howley (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* 69, 7791-9.
- Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger und E. Harlow (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-7.
- Eckner, R., M.E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J.A. DeCaprio, J.B. Lawrence und D.M. Livingston (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes and Development* 8, 869-884.
- Edelman, D. B., R. Meech und F. S. Jones (2000). The homeodomain protein Barx2 contains activator and repressor domains and interacts with members of the CREB family. *J Biol Chem* 275, 21737-45.

- Einstein, M.H. und G.L. Goldberg (2002). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest.* 20, 1080-1085.
- Elbel, M., S. Carl, S. Spaderna und T. Iftner (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* 239, 132-49.
- Elenbaas, B., L. Spirio, F. Koerner, M. D. Fleming, D. B. Zimonjic, J. L. Donaher, N. C. Popescu, W. C. Hahn und R. A. Weinberg (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* 15, 50-65.
- Erickson, R. L., N. Hemati, S. E. Ross und O. A. MacDougald (2001). p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 276, 16348-55.
- Evander, M., I. H. Frazer, E. Payne, Y. M. Qi, K. Hengst und N. A. McMillan (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71, 2449-56.
- Favre, M., F. Breitburd, O. Croissant und G. Orth (1977). Chromatine-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* 21, 1205-1209.
- Friedl, F., I. Kimura, T. Osato und Y. Ito (1970). Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med* 135, 543-5.
- Fu, M., C. Wang, X. Zhang und R. G. Pestell (2004). Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 68, 1199-208.
- Fuchs, P. G. und H. Pfister (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* 37, 159-67.
- Fuchs, P. G., S. Horn, T. Iftner, M. May, F. Stubenrauch und H. Pfister. (1993). *Molecular biology of epidermodyplasia verruciformis-associated human papillomaviruses*. Virus strategies, Volum, Doerfler, W. & Böhm, P., Verlag Chemie, Weinheim.
- Fuchs, P.G. und H. Pfister. (1996). *Papillomaviruses in Epidermodyplasia verruciformis*. In *Papillomavirus reviews* (Lacey, C., ed.), Vol. Current research on papillomaviruses, pp. 253-261. Leeds University press.
- Gao, Q., A. Kumar, S. Srinivasan, L. Singh, H. Mukai, Y. Ono, D. E. Wazer und V. Band (2000). PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem* 275, 14824-30.
- Gardiol, D., C. Kuhne, B. Glaunsinger, S. S. Lee, R. Javier und L. Banks (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 18, 5487-96.
- Garland, S. M. (2002). Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology* 34, 213-24.
- Gewin, L., H. Myers, T. Kiyono und D.A. Galloway (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes and Development* 18, 2269-2282.
- Gey, G.O., W.D. Coffman und M.T. Kubicek (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 264-265.

- Giri, I. und M. Yaniv (1988). Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *Embo J* 7, 2823-9.
- Glahder, J. A., C. N. Hansen, J. Vinther, B. S. Madsen und B. Norrild (2003). A promoter within the E6 ORF of human papillomavirus type 16 contributes to the expression of the E7 oncoprotein from a monocistronic mRNA. *J Gen Virol* 84, 3429-41.
- Gloss, B. und H. U. Bernard (1990). The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J Virol* 64, 5577-84.
- Gloss, B., T. Chong und H. U. Bernard (1989). Numerous nuclear proteins bind the long control region of human papillomavirus type 16: a subset of 6 of 23 DNase I-protected segments coincides with the location of the cell-type-specific enhancer. *J Virol* 63, 1142-52.
- Gonzalez, S. L., M. Stremlau, X. He, J. R. Basile und K. Munger (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75, 7583-91.
- Goodman, R. H. und S. Smolik (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14, 1553-77.
- Grassmann, K., B. Rapp, H. Maschek, K. U. Petry und T. Iftner (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol* 70, 2339-49.
- Grm, H.S., P. Massimi, N. Gammoh und L. Banks (2005). Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* 24, 5149-5164.
- Grossman, S. R., R. Mora und L. A. Laimins (1989). Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *J Virol* 63, 366-74.
- Hadaschik, D., K. Hinterkeuser, M. Oldak, H. J. Pfister und S. Smola-Hess (2003). The Papillomavirus E2 protein binds to and synergizes with C/EBP factors involved in keratinocyte differentiation. *J Virol* 77, 5253-65.
- Hattori, T., N. Ohoka, Y. Inoue, H. Hayashi und K. Onozaki (2003). C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene* 22, 1273-80.
- Hebner, C. M., R. Wilson, J. Rader, M. Bidder und L. A. Laimins (2006). Human papillomaviruses target the double-stranded RNA protein kinase pathway. *J Gen Virol* 87, 3183-93.
- Hemati, N., S. E. Ross, R. L. Erickson, G. E. Groblewski und O. A. MacDougald (1997). Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Correlation with GLUT4 gene expression. *J Biol Chem* 272, 25913-9.
- Higgins, G. D., D. M. Uzelin, G. E. Phillips, P. McEvoy, R. Marin und C. J. Burrell (1992). Transcription patterns of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial neoplasia:

- evidence for promoter usage within the E7 open reading frame during epithelial differentiation. *J Gen Virol* 73 ( Pt 8), 2047-57.
- Huang, S. M. und D. J. McCance (2002). Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol* 76, 8710-21.
- Iftner, T., P. G. Fuchs und H. Pfister (1989). Two independently transforming functions of human papillomavirus 8. *Curr Top Microbiol Immunol* 144, 167-73.
- Johnson, P. F. (2005). Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J Cell Sci* 118, 2545-55.
- Kelley, M.L., K.E. Keiger, C.J. Lee und J.M. Huibregtse (2005). The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. *J Virol*. 79, 3737-3747.
- Kiyono, T., A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. Hayashi, T. Akiyama und M. Ishibashi (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, 11612-6.
- Krüppel, U. (2004). Die Interaktion des HPV16 E2-Proteins mit dem zellulären Ko-Aktivator p300 bei der HPV16-Genexpression. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Krüppel, U., A. Müller-Schiffmann, E. Baldus und G. Steger (2008). Cooperative activation of the human papillomavirus type 16 early promoter by E2 and the cellular coactivator p300 is repressed by the E6 oncoprotein. *zur Veröffentlichung eingereicht*
- Kuballa, P., K. Matentzoglou und M. Scheffner (2007). The role of the ubiquitin ligase E6-AP in human papillomavirus E6-mediated degradation of PDZ domain-containing proteins. *J Biol Chem* 282, 65-71.
- Kühne, C., D. Gardiol, C. Guarnaccia, H. Amenitsch und L. Banks (2000). Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6. *Oncogene* 19, 5884-91.
- Kukimoto, I. und T. Kanda (2001). Displacement of YY1 by differentiation-specific transcription factor hSkn-1a activates the P(670) promoter of human papillomavirus type 16. *J Virol* 75, 9302-11.
- Kukimoto, I., T. Takeuchi und T. Kanda (2006). CCAAT/enhancer binding protein beta binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16. *Virology* 346, 98-107.
- Kyo, S., M. Inoue, Y. Nishio, K. Nakanishi, S. Akira, H. Inoue, M. Yutsudo, O. Tanizawa und A. Hakura (1993). NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. *J Virol* 67, 1058-66.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, M. C., B. H. Teh und W. Y. Tarn (1999). A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J Biol Chem* 274, 11832-41.
- Lee, D., S.G. Hwang, J. Kim und J. Choe (2002). Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J. Bio. Chem.* 277, 6483-6489.

- Lee, D., B. Lee, J. Kim, D. W. Kim und J. Choe (2000). cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J Biol Chem* 275, 7045-51.
- Lekstrom-Himes, J. A. (2001). The role of C/EBP(epsilon) in the terminal stages of granulocyte differentiation. *Stem Cells* 19, 125-33.
- Liu, L., D. M. Scolnick, R. C. Trievel, H. B. Zhang, R. Marmorstein, T. D. Halazonetis und S. L. Berger (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-9.
- Liu, Y., J. J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. Hong, C. P. Mansur, V. Band und E. J. Androphy (1999). Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol* 73, 7297-307.
- Longworth, M. S. und L. A. Laimins (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 362-72.
- Loomis, K. D., S. Zhu, K. Yoon, P. F. Johnson und R. C. Smart (2007). Genetic ablation of CCAAT/enhancer binding protein alpha in epidermis reveals its role in suppression of epithelial tumorigenesis. *Cancer Res* 67, 6768-76.
- Lowy, D. R. und J. T. Schiller (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 116, 1167-73.
- Maitland, N. J., S. Conway, N. S. Wilkinson, J. Ramsdale, J. R. Morris, C. M. Sanders, J. E. Burns, P. L. Stern und M. Wells (1998). Expression patterns of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 in low- and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 186, 275-80.
- Maniatis, T., E. Fritsch und J. Sambrook (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.*, -.
- Martinez-Balbas, M. A., U. M. Bauer, S. J. Nielsen, A. Brehm und T. Kouzarides (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 19, 662-71.
- May, M., X. P. Dong, E. Beyer-Finkler, F. Stubenrauch, P. G. Fuchs und H. Pfister (1994). The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *Embo J* 13, 1460-6.
- Maytin, E. V. und J. F. Habener (1998). Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 110, 238-46.
- Maytin, E. V., J. C. Lin, R. Krishnamurthy, N. Batchvarova, D. Ron, P. J. Mitchell und J. F. Habener (1999). Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev Biol* 216, 164-81.
- Mc Bride, A.A. und G. Meyers (1996). The E2 Proteins. *Papillomavirus Colloquium III*, 15-31.
- McFie, P. J., G. L. Wang, N. A. Timchenko, H. L. Wilson, X. Hu und W. J. Roesler (2006). Identification of a co-repressor that inhibits the transcriptional and growth-arrest activities of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 281, 18069-80.

- Menges, C. W., L. A. Baglia, R. Lapoint und D. J. McCance (2006). Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res* 66, 5555-9.
- Mink, S., B. Haenig und K.-H. Klemmner (1997). Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Molecular and cellular biology* Nov., 6609-6617.
- Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson und M. R. Botchan (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250, 1694-9.
- Müller, A., A. Ritzkowsky und G. Steger (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 76, 11042-53.
- Müller, A. (2003). Die Rolle der Interaktion des zellulären Koaktivators p300 mit den E2- und E6-Proteinen von Papillomviren bei der Regulation der viralen Genexpression. Dissertation, Universität zu Köln.
- Müller, A., A. Ritzkowsky und G. Steger (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 76, 11042-53.
- Müller-Schiffmann, A., J. Beckmann und G. Steger (2006). The E6 protein of the cutaneous human papillomavirus type 8 can stimulate the viral early and late promoters by distinct mechanisms. *J. Virol.* 80, 8718-8728.
- Mullis, K.B. und F.A. Faloon (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Münger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace und V. L. Zacny (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20, 7888-98.
- Munoz, N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19, 1-5.
- Nakagawa, S. und J. M. Huibregtse (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, 8244-53.
- Nepveu, A. (2001). Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270, 1-15.
- Nerlov, C. und E. B. Ziff (1994). Three levels of functional interaction determine the activity of CCAAT/enhancer binding protein-alpha on the serum albumin promoter. *Genes Dev* 8, 350-62.
- Nerlov, C. und E. B. Ziff (1995). CCAAT/enhancer binding protein-alpha amino acid motifs with dual TBP and TFIIB binding ability co-operate to activate transcription in both yeast and mammalian cells. *Embo J* 14, 4318-28.
- Nightingale, K. P., R. E. Wellinger, J. M. Sogo und P. B. Becker (1998). Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the Drosophila hsp26 gene in chromatin. *Embo J* 17, 2865-76.

- O'Connor, M. und H. U. Bernard (1995). Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* 207, 77-88.
- O'Connor, M. J., W. Stunkel, C. H. Koh, H. Zimmermann und H. U. Bernard (2000). The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J Virol* 74, 401-10.
- Oh, H.S. und R.C. Smart (1998). Expression of CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) is associated with squamous differentiation in epidermis and isolated primary keratinocytes and is altered in skin neoplasms. *J Invest Dermatol.* Jun;110(6): , 939-45.
- Ohshima, T., T. Suganuma und M. Ikeda (2001). A novel mutation lacking the bromodomain of the transcriptional coactivator p300 in the SiHa cervical carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 569-75.
- Partanen, A., J. Motoyama und C.C. Hui (1999). Developmentally regulated expression of the transcriptional cofactors/histone acetyltransferases CBP and p300 during mouse embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 487-494.
- Patel, D., S. M. Huang, L. A. Baglia und D. J. McCance (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J* 18, 5061-72.
- Pei, D. Q. und C. H. Shih (1991). An "attenuator domain" is sandwiched by two distinct transactivation domains in the transcription factor C/EBP. *Mol Cell Biol* 11, 1480-7.
- Pfister, H. (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99, 111-81.
- Pfister, H. (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin Cancer Biol* 3, 263-71.
- Pfister, H. und P.G. Fuchs. (1987). *Papillomaviruses: particles, genome organisation and proteins*. In *Papillomaviruses and human disease*. Syrjänen, K.; Gissmann, L.; Koss, L.G.
- Pfister, H. und P. G. Fuchs (1994). Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 37, 143-9.
- Pim, D., M. Thomas und L. Banks (2002). Chimaeric HPV E6 proteins allow dissection of the proteolytic pathways regulating different E6 cellular target proteins. *Oncogene* 21, 8140-8.
- Piwien-Pilipuk, G., O. MacDougald und J. Schwartz (2002). Dual regulation of phosphorylation and dephosphorylation of C/EBPbeta modulate its transcriptional activation and DNA binding in response to growth hormone. *J Biol Chem* 277, 44557-65.
- Purdie, K. J., C. J. Sexton, C. M. Proby, M. T. Glover, A. T. Williams, J. N. Stables und I. M. Leigh (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res* 53, 5328-33.
- Rank, N. M. und P. F. Lambert (1995). Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J Virol* 69, 6323-34.
- Ristriani, T., M. Masson, Y. Nomine, C. Laurent, J. F. Lefevre, E. Weiss und G. Trave (2000). HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions. *J Mol Biol* 296, 1189-203.

- Roesler, W. J. (2001). The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression. *Annu Rev Nutr* 21, 141-65.
- Rosenstierne, M. W., J. Vinther, C. N. Hansen, M. Prydsoe und B. Norrild (2003). Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 84, 2909-20.
- Ross, S. E., R. L. Erickson, N. Hemati und O. A. MacDougald (1999). Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBPalpha kinase. *Mol Cell Biol* 19, 8433-41.
- Sato, Y., K. Miyake, H. Kaneoka und S. Iijima (2006). Sumoylation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha and its functional roles in hepatocyte differentiation. *J Biol Chem* 281, 21629-39.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse und P. M. Howley (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, 8797-801.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine und P. M. Howley (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-36.
- Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Müller und W. Schaffner (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucl. Acid. Res.* 17, 6419.
- Schwartz, C., K. Beck, S. Mink, M. Schmolke, B. Budde, D. Wenning und K. H. Klempnauer (2003). Recruitment of p300 by C/EBPbeta triggers phosphorylation of p300 and modulates coactivator activity. *Embo J* 22, 882-92.
- Schweiger, M. R., J. You und P. M. Howley (2006). Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol* 80, 4276-85.
- Schweiger, M. R., M. Ottinger, J. You und P. M. Howley (2007). Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. *J Virol* 81, 9612-22.
- Selinka, H. C., T. Giroglou und M. Sapp (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* 299, 279-287.
- Shafti-Keramat, S., A. Handisurya, E. Kriehuber, G. Meneguzzi, K. Slupetzky und R. Kirnbauer (2003). Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 77, 13125-35.
- Shah, K. und P.M. Howley. (1996). *Papillomaviruses*. In *Fields, Virology*, Vol. Third edition.
- Shim, M., K. L. Powers, S. J. Ewing, S. Zhu und R. C. Smart (2005). Diminished expression of C/EBPalpha in skin carcinomas is linked to oncogenic Ras and reexpression of C/EBPalpha in carcinoma cells inhibits proliferation. *Cancer Res* 65, 861-7.
- Simonson, S.J.S., M.J. Difilippantini und P. F. Lambert (2005). Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Res.* 65, 8266-8273.
- Skiadopoulos, M. H. und A. A. McBride (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol* 72, 2079-88.

- Smola-Hess, S. und H. Pfister. (2002). *Interaction of papillomaviral oncoproteins with cellular factors*. Structure-function relationships of human pathogenesis viruses, Volum, Luvver Academis/Plenum Publishers, New York, London, Dodrecht, Boston, Moscow.
- Steger, G. und H. Pfister (1992). In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol* 125, 355-60.
- Steger, G. und S. Corbach (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* 71, 50-8.
- Steger, G., J. Ham und M. Yaniv (1996). E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol* 274, 173-85.
- Steger, G., C. Schnabel und H. M. Schmidt (2002). The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21(WAF1/CIP1) promoter via interaction with Sp1. *J Gen Virol* 83, 503-10.
- Steger, G., J. Ham, Thierry, F. und M. Yaniv. (1993). *The E2 proteins of papillomaviruses as transcription and replication factors*. In *Virus strategies* (Doerfler, W.; Böhm, P., ed.), pp. 263-278. VCH, Weinheim.
- Stevenson, M., L. C. Hudson, J. E. Burns, R. L. Stewart, M. Wells und N. J. Maitland (2000). Inverse relationship between the expression of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 and virus DNA copy number during the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Gen Virol* 81, 1825-32.
- Struyk, L., E. van der Meijden, R. Minnaar, V. Fontaine, I. Meijer und J. ter Schegget (2000). Transcriptional regulation of human papillomavirus type 16 LCR by different C/EBPbeta isoforms. *Mol Carcinog* 28, 42-50.
- Stubenrauch, F. und L. A. Laimins (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* 9, 379-86.
- Tan, S.H., B. Gloss und H.-U. Bernard (1992). During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.* 20, 251-256.
- Thierry, F. (1993). Proteins involved in the control of HPV transcription. *Papillomavirus report*, 27-32.
- Thomas, M. und L. Banks (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17, 2943-54.
- Thomas, M., R. Laura, K. Hepner, E. Guccione, C. Sawyers, L. Lasky und L. Banks (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene* 21, 5088-96.
- Thomas, M.C. und C.-M. Chiang (2005). E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independent of inducing p53 degradation. *Mol. Cell.* 17, 251-264.
- Timchenko, N. A., T. E. Harris, M. Wilde, T. A. Bilyeu, B. L. Burgess-Beusse, M. J. Finegold und G. J. Darlington (1997). CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol* 17, 7353-61.

- Tomita, A., M. Towatari, S. Tsuzuki, F. Hayakawa, H. Kosugi, K. Tamai, T. Miyazaki, T. Kinoshita und H. Saito (2000). c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* 19, 444-51.
- Töpffer, S., A. Muller-Schiffmann, K. Matentzoglou, M. Scheffner und G. Steger (2007). Protein tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of high-risk genital human papillomaviruses. *J Gen Virol* 88, 2956-65.
- Trautwein, C., D. L. Walker, J. Plumpe und M. P. Manns (1995). Transactivation of LAP/NF-IL6 is mediated by an acidic domain in the N-terminal part of the protein. *J Biol Chem* 270, 15130-6.
- Trivedi, A. K., D. Bararia, M. Christopeit, A. A. Peerzada, S. M. Singh, A. Kieser, W. Hiddemann, H. M. Behre und G. Behre (2007). Proteomic identification of C/EBP-DBD multiprotein complex: JNK1 activates stem cell regulator C/EBPalpha by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene* 26, 1789-801.
- Tse, C., T. Sera, A. P. Wolffe und J. C. Hansen (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18, 4629-38.
- Ustav, M., E. Ustav, P. Szymanski und A. Stenlund (1991). Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *Embo J* 10, 4321-9.
- Vinson, C. R., T. Hai und S. M. Boyd (1993). Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev* 7, 1047-58.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer und N. Munoz (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-9.
- Wang, C., X. Chen, Y. Wang, J. Gong und G. Hu (2007). C/EBPalpha30 plays transcriptional regulatory roles distinct from C/EBPalpha42. *Cell Res* 17, 374-83.
- Wang, H., T. Goode, P. Iakova, J. H. Albrecht und N. A. Timchenko (2002). C/EBPalpha triggers proteasome-dependent degradation of cdk4 during growth arrest. *Embo J* 21, 930-41.
- Wang, H., K. Liu, F. Yuan, L. Berdichevsky, L. B. Taichman und K. Auborn (1996). C/EBPbeta is a negative regulator of human papillomavirus type 11 in keratinocytes. *J Virol* 70, 4839-44.
- Wang, H., P. Iakova, M. Wilde, A. Welm, T. Goode, W. J. Roesler und N. A. Timchenko (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell* 8, 817-28.
- Webster, K., J. Parish, M. Pandya, P. L. Stern, A. R. Clarke und K. Gaston (2000). The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 87-94.
- Wells, S. I., D. A. Francis, A. Y. Karpova, J. J. Dowhanick, J. D. Benson und P. M. Howley (2000). Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *Embo J* 19, 5762-71.

- Welm, A. L., N. A. Timchenko und G. J. Darlington (1999). C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol Cell Biol* 19, 1695-704.
- Welm, A. L., N. A. Timchenko, Y. Ono, H. Sorimachi, H. S. Radomska, D. G. Tenen, J. Lekstrom-Himes und G. J. Darlington (2002). C/EBPalpha is required for proteolytic cleavage of cyclin A by calpain 3 in myeloid precursor cells. *J Biol Chem* 277, 33848-56.
- Williams, S. C., C. A. Cantwell und P. F. Johnson (1991). A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev* 5, 1553-67.
- Williams, S. C., M. Baer, A. J. Dillner und P. F. Johnson (1995). CRP2 (C/EBP beta) contains a bipartite regulatory domain that controls transcriptional activation, DNA binding and cell specificity. *Embo J* 14, 3170-83.
- Yao, J. M., D. E. Breiding und E. J. Androphy (1998). Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J Virol* 72, 1013-9.
- Yao, T. P., G. Ku, N. Zhou, R. Scully und D. M. Livingston (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10626-31.
- Yao, T.-P., S.P. Oh, M. Fuchs, N.-D. Zhou, L.-E. Chang, D. Newsome, R.T. Bronson, E. Li, D.M. Livingston und R. Eckner (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93, 361-372.
- Zanier, K., S. Charbonnier, M. Baltzinger, Y. Nomine, D. Altschuh und G. Trave (2005). Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6AP using surface plasmon resonance. *J. Mol. Biol.* 349, 401-412.
- Zeng, L. und M. M. Zhou (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513, 124-8.
- Zhao, W., L. T. Chow und T. R. Broker (1999). A distal element in the HPV-11 upstream regulatory region contributes to promoter repression in basal keratinocytes in squamous epithelium. *Virology* 253, 219-29.
- Zhu, S., H. S. Oh, M. Shim, E. Sterneck, P. F. Johnson und R. C. Smart (1999). C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19, 7181-90.
- Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard und M. J. O'Connor (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol* 73, 6209-19.
- Zou, N., B. Y. Lin, F. Duan, K. Y. Lee, G. Jin, R. Guan, G. Yao, E. J. Lefkowitz, T. R. Broker und L. T. Chow (2000). The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association. *J Virol* 74, 3761-70.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events of carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: , 690-698.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|        |   |
|--------|---|
| Abb.   | Abbildung   |
| ad     | auffüllen auf   |
| AD     | Aktivierungsdomäne  |
| AP-1   | <i>Activator protein 1</i>  |
| As.    | Aminosäure  |
| ATP    | Adenosintriphosphat   |
| Bak    | <i>BRM-activated killer</i>                                       |
| Brd4   | <i>bromodomain protein 4</i>                                      |
| bp     | Basenpaar   |
| BPV    | Bovines Papillomvirus   |
| BS     | Bindestelle   |
| BSA    | Bovines Serumalbumin  |
| CBP    | <i>CREB binding protein</i>                                       |
| CDK    | Zyclin-abhängige Kinase   |
| CDP    | <i>CCAAT displacement protein</i>                                 |
| C/EBP  | CCAAT/Enhancer binding protein                                    |
| C/H    | cystein-/histidinreiche Region                                    |
| CIN    | zervikale intraepitheliale Neoplasie                              |
| CMV    | Cytomegalovirus   |
| CREB   | <i>cAMP response element binding protein</i>                      |
| DBD    | DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne                               |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid  |
| DNTPs  | Desoxyribonukleotide  |
| DTT    | Dithiothreitol  |
| E6-AP  | <i>E6 associated protein</i>                                      |
| ECL    | <i>enhanced chemiluminescence</i>                                 |
| EDTA   | Ethylendiamintetraacetat  |
| EGF    | <i>epidermal growth factor</i>                                    |
| EGTA   | Ethylen-Glycol-bis( $\beta$ -aminoethyether)                      |
| EMSA   | Electrophoretic mobility shift assay (Gelretardierungsexperiment) |
| et al. | und andere  |
| Ev     | <i>Epidermodysplasia verruciformis</i>                            |
| FCS    | Fötales Kälberserum   |
| GST    | Glutathion-S-Transferase  |
| GZE    | Ganzzellextrakte  |
| h      | human   |
| HA     | Hämagglutinin   |
| HAT    | Histon-Acetyltransferase  |
| HBS    | <i>Hepes buffered saline</i>                                      |
| HDAC   | Histon Deacetylase  |
| hDlg   | (humanes) Homolog zu <i>Drosophila discs large suppressor</i>     |
| HEPES  | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure                   |
| HFK    | <i>human foreskin keratinocytes</i>                               |
| HPLC   | High pressure liquid chromatography                               |
| HPV    | humanes Papillomvirus   |
| HRP    | Meerrettich-Peroxidase  |
| hScrib | (humanes) Homolog zu <i>Drosophila scribble</i>                   |
| IPTG   | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid                        |
| IVT    | <i>in vitro</i> translatiert                                      |
| kb     | Kilobasen   |
| kDa    | Kilodalton  |
| LB     | Luria-Bertani   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|              |   |
|--------------|---|
| LCR          | Long Control Region   |
| LSDB         | <i>Low salt dilution buffer</i>                                       |
| Luc          | Luciferase  |
| MAGI         | <i>Membrane associated guanylate kinase with inverted orientation</i> |
| MAGUK        | <i>Membrane associated guanylate kinase</i>                           |
| MCM7         | <i>Minichromosome maintenance protein</i>                             |
| MUPP1        | <i>Multi-PDZ domain protein 1</i>                                     |
| mRNA         | <i>messenger RNA</i>  |
| mt           | mutiert   |
| NAP          | <i>Nukleosome assembly protein</i>                                    |
| NCR          | nicht-kodierende Region   |
| NF-1         | <i>Nuclear factor-1</i>   |
| NHEK         | Neonatale humane epidermale Keratinozyten                             |
| NP40         | Nonidet P40   |
| Nt.          | Nukleotid   |
| Nukl. Rez.   | Nukleäre Rezeptoren   |
| Oct1         | <i>Organic cation transporter</i>                                     |
| OD           | Optische Dichte   |
| ORF          | offener Leserahmen  |
| PAG          | Polyacrylamidgel  |
| PAGE         | Polyacrylamidamidelektrophorese                                       |
| PBF          | <i>Papillomavirus binding factor</i>                                  |
| PBS          | <i>Phosphate buffered saline</i>                                      |
| p/CAF        | <i>p300/CBP associated factor</i>                                     |
| PCR          | Polymerase Kettenreaktion   |
| PDZ          | PSD-95, Dlg, Zo-1   |
| PEG          | Polyethylenglykol   |
| PIK          | Präinitiationskomplex   |
| PI3K         | Phosphoinositid-3-Kinase  |
| PK(X)        | Proteinkinase (X)   |
| PMSF         | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| POD          | Peroxidase  |
| pRb          | Retinoblastom-Protein   |
| PV           | Papillomvirus   |
| Rez.         | Rezeptor  |
| RLU          | relative Lichteinheit   |
| RNA          | Ribonukleinsäure  |
| rpA          | <i>replication protein A</i>  |
| RT           | Raumtemperatur  |
| shRNA        | <i>small hairpin RNA</i>  |
| siRNA        | <i>small interfering RNA</i>  |
| Sp1          | <i>Specific protein 1</i>   |
| SDS          | Sodium-Dodecyl-Sulfat   |
| SRC-1        | <i>Steroid receptor coactivator 1</i>                                 |
| TAF          | <i>TBP associated factor</i>  |
| TBE          | <i>Tris-borate electrophoresis buffer</i>                             |
| TBP          | <i>TATA binding protein</i>   |
| TBST         | <i>Tris buffered saline + Tween20</i>                                 |
| TEMED        | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                                    |
| TFII(x)      | <i>Transcription factor II (x)</i>                                    |
| TNF $\alpha$ | Tumor Nekrose Faktor $\alpha$   |
| TNS          | <i>Trypsin neutralization solution</i>                                |
| TSB          | <i>Transformation and storage buffer</i>                              |
| TRAM         | <i>transcriptional adapter motif</i>                                  |
| Wt           | Wildtyp   |
| YY1          | Yin Yang 1  |

### 8 Zusammenfassung

Die Abhängigkeit des Lebenszyklus der Papillomviren (PV) von differenzierenden Keratinozyten der Haut oder der Schleimhaut, wird auf Ebene der Transkription determiniert. Neben Keratinozyten-spezifischen und ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktoren wird die Genexpression auch vom viral kodierten Transkriptionsfaktor E2 kontrolliert. Die Hauptfunktion von E2 bei humanen PV (HPV), die die Mukosa infizieren, scheint eine Repression der Expression der viralen Onkogene E6 und E7 zu sein. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass geringe E2-Mengen den frühen HPV16 Promotor ( $P_{97}$ ) deutlich aktivieren, wenn der zellulärer Ko-Aktivator p300 überexprimiert wird. Dies erfordert die Bindung von E2 an mindestens zwei seiner vier Bindestellen (BS) innerhalb der LCR sowie Sequenzen 3' des  $P_{97}$  bis Nt. 523. In dieser Arbeit wurde eine Bindung des zellulären Transkriptionsfaktors C/EBP $\alpha$  *in vitro* und *in vivo* an die Sequenz von Nt. 469-488 nachgewiesen. Diese neu identifizierte BS ist notwendige Voraussetzung für eine kooperative Aktivierung durch E2 und p300. Gleichzeitig wird durch die Bindung von C/EBP $\alpha$  an diese BS ein weiterer, nicht näher charakterisierter, Promotor reprimiert. C/EBP $\alpha$  und p300 kooperieren bei der Aktivierung des  $P_{97}$ . Dies erfordert neben der sequenzspezifischen Bindung von C/EBP $\alpha$  an die BS 469 auch die Histon-Acetyltransferase-Domäne von p300. Die Stimulation des  $P_{97}$  durch p300, E2 und/oder C/EBP $\alpha$  führt zu einer vermehrten Expression der Onkogene E6 und E7. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 16E6 im Bereich des  $P_{97}$  gebunden vorliegt und in der Lage ist, den frühen Promotor auf Ebene der Transkription zu reprimieren. Im Rahmen der Aktivierung der Transkription induziert C/EBP $\alpha$  eine Phosphorylierung des C-Terminus seines Ko-Aktivators p300. Die Menge an phosphoryliertem p300 war in Gegenwart von 16E6 reduziert. Die Verwendung spezifischer Inhibitoren ergab, dass eine Staurosporine-inhibierbare Kinase und ein Faktor, der proteasomal abgebaut wird, daran beteiligt sind. Die transkriptionelle Repression wird zusätzlich durch zwei voneinander unabhängig agierende Domänen des E6-Proteins vermittelt: zum Einen durch die N-terminale Hälfte von 16E6 (As. 1-84) in Verbindung mit Domänen im C-Terminus, zum Anderen durch das C-terminale, unter mukosalen Hochrisiko-HPV-Typen konservierte PDZ-Bindemotiv. Die Deletion dieser Motive führte zu keiner verminderten Menge an phosphoryliertem p300. Experimente mit HPV-positiven Zervixkarzinomzelllinien, in denen das HPV-Genom integriert vorliegt, lieferten keine Hinweise auf eine Autoregulation durch E6. 16E6, exprimiert von episomalem HPV-Genom, trägt hingegen zur Kontrolle seiner eigenen Expression bei, so dass E6 die Vollendung des viralen Lebenszyklus unterstützen und das Risiko einer Transformation verringern könnte. Dieser Mechanismus ist möglicherweise im Verlauf der Karzinogenese verloren gegangen.

## 9 Abstract

The life cycle of papillomaviruses (PV) depends on the differentiating keratinocytes of the skin or mucosa and is determined at the level of transcription. Gene expression is controlled by keratinocyte-specific and ubiquitously expressed transcription factors as well as the virally encoded E2 protein. It seems that the main function of the E2 protein of human PV (HPV) that infect the mucosa is repression of the expression of the E6 and E7 oncogenes. Previous work revealed that low amounts of E2 can activate the HPV16 early promoter ( $P_{97}$ ) when its co-activator p300 is overexpressed. This requires E2 binding to at least two of four binding sites (BS) localized in the LCR as well as sequences up to position 523. This work demonstrates that the cellular transcription factor C/EBP $\alpha$  binds to the sequence at pos. 469-488 *in vitro* and *in vivo*. This newly identified BS is a prerequisite for cooperative activation of  $P_{97}$  by E2 and p300. The binding of C/EBP $\alpha$  to this site represses another yet unidentified HPV16 promoter. C/EBP $\alpha$  and p300 cooperate to activate the  $P_{97}$ . In addition to a sequence-specific binding of C/EBP $\alpha$  to BS 469, activation requires the histone acetyltransferase domain of p300. The stimulation of the  $P_{97}$  by p300 and E2 and/or C/EBP $\alpha$  leads to increased expression of the E6 and E7 oncogenes. This work shows, that the 16E6 protein is present near the promoter region and is able to repress its own transcription. During activation of transcription, C/EBP $\alpha$  induces phosphorylation of the C-terminal part of its co-activator p300. The amount of phosphorylated p300 is reduced in the presence of 16E6. This 16E6 effect was alleviated by kinase- and proteosomal inhibitors. The results identified the involvement of a staurosporine-dependent kinase and a factor, that is degraded via the proteasome. In addition, transcriptional repression was mediated by two other independently acting domains, which are the E6 N-terminal moiety (aa.1-84) in combination with C-terminal parts and a C-terminal PDZ-binding motif, which is conserved among high risk mucosal E6 proteins. The deletion of these motifs did not reduce the amount of phosphorylated p300. Experiments with HPV-positive cervical carcinoma cell lines, which harbour integrated HPV genomes, revealed no hints of this kind of autoregulation by E6. These data suggest that E6 expressed from episomal genomes contributes to regulation of its own expression. Such regulation might support the completion of the viral life cycle and reduce the risk of transformation. This mechanism may be lost during the course of carcinogenesis.

### **10 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Gertrud Steger, die mir ermöglicht hat, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Ihre Diskussionsbereitschaft, ihre fachliche Kompetenz und hilfreichen Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Pfister bedanke ich mich für die Betreuung meiner Promotion und die kritischen und anregenden Diskussionen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen und Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein für ihre Bereitschaft die vorliegende Promotion vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten.

Mein Dank gilt außerdem Frau Prof. Dr. Sigrun Smola-Hess für das stetige Interesse an meiner Arbeit und die freundliche Bereitstellung der Zervixschnitte.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Laborkollegen bedanken, die eine unvergessliche Arbeitsatmosphäre geschaffen haben, die ich sehr vermissen werde: Allen voran Andreas Müller-Schiffmann, der mir auch nach Verlassen des Instituts weiterhin mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank an Nadine Sichtig, Nadine Körfer, Darko Jordanovski und Stephanie Töpffer.

Bei Melanie Balduin, Martin Hufbauer, David Müller und Jenny Pahne möchte ich mich ganz herzlich für fachliche und vor allem freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für ihre Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken und ihre vielen aufmunternden Worte. Ihnen widme ich diese Arbeit. Im Zuge dessen möchte ich mich auch ganz herzlich bei Jürgen bedanken, der mich vor allem in der Endphase immer erfolgreich motivieren konnte und mich moralisch unterstützt hat.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## 11 Erklärung

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

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

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

Krüppel, U., A. Müller-Schiffmann, S. E. Baldus and G. Steger (2008)

Cooperative activation of the human papillomavirus type 16 early promoter by E2 and the cellular co-activator p300 is repressed by the E6 oncoprotein

Köln, den 11.12.2007

---

Ulla Krüppel

## 12 Lebenslauf

### Zur Person:

Name Ulla Krüppel  
Anschrift Nonnenwerthstr. 7, 50937 Köln  
Geburtsdatum 15.01.1979  
Geburtsort Heinsberg  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand ledig

### Schulbildung:

1985-1989 Gemeinschaftsgrundschule Heinsberg/Schafhausen  
1989- Mai 1998 Kreismnasium Heinsberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

Okt. 1998 – Februar 2004 Hochschulstudium an der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln  
Studiengang: Diplom-Biologie  
Hauptfach: Genetik  
Nebenfächer: Biochemie und Pharmakologie  
Abschluss: Diplom

Seit Okt. 2004 Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Universität zu Köln  
Experimentelle Arbeit am Institut für Virologie,  
Klinikum der Universität zu Köln  
Arbeitsgruppe: Dr. G. Steger  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Pfister

Seit Okt. 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Virologie  
Klinikum der Universität zu Köln

Seit Mai 2006 Dozentin für Immunologie und Chemie  
Staatl. anerkannte Lehranstalt für Medizinisch Technische  
Radiologische AssistentInnen (MTRA),  
Centrum für Therapie und Diagnostik, Köln