

**Rolle des zellulären Transkriptionsfaktors YY1
bei der Kontrolle der Replikation und Transkription
des humanen Papillomvirus 8**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Maja Adam
aus Tübingen

Köln, 2001

Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Pfister
Prof. Dr. B. Kemper

Tag der mündlichen Prüfung:

7. Dezember 2001

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	5
3. MATERIAL	18
3.1. Bakterien	18
3.2. Eukaryonte Zellen	18
3.3. Medien	19
3.3.1. Medien für die Zellkultur	19
3.3.2. Medien für die Bakterienkultur	19
3.4. Antikörper	20
3.5. Enzyme	20
3.6. Chemikalien, Reagenzien	21
3.7. Reagenzsysteme	21
3.8. Radioisotope	22
3.9. Nukleinsäuren	22
3.9.1. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	22
3.9.2. Plasmide	23
3.9.2.1. Vektoren	23
3.9.2.2. Konstrukte	24
3.9.3. Längenstandards	28
4. METHODEN	29
4.1. Zellkultur	29
4.1.1. Langzeitlagerung von Zellen	29
4.1.2. Transfektion eukaryonter Zellen	29
4.1.2.1. Calcium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode	29
4.1.2.2. Transfektion mit LIPOFECTAMINE™-Reagenz	30
4.1.2.3. Transfektion mit FuGene™	30
4.1.3. Transienter Replikationstest	30
4.1.4. β -Galaktosidase- und Luciferase-Assay	31
4.1.4.1. Luciferase-Assay	32
4.1.4.2. β -Galaktosidase-Assay	32
4.1.5. Gewinnung von Kernextrakten aus eukaryonten Zelllinien	32

4.2. DNA-Methoden	33
4.2.1. DNA-Präparationen	33
4.2.2. Standardmethoden	33
4.2.3. Sequenzierung	33
4.2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
4.2.5. Ortsspezifische Mutagenese	34
4.2.6. Southern-Blot	35
4.2.6.1. Transfer der DNA	35
4.2.6.2. Markierung der DNA	35
4.2.6.3 Hybridisierung der Blot-Membran	35
4.2.6.4. Waschen der Membran und Detektion	36
4.3. Bakterienkultur	36
4.3.1. Herstellung und Transformation kompetenter <i>E.coli</i> DH5 α Bakterien	36
4.3.2. Transformation der <i>E. coli</i> Stämme XL1- und XL2-Blue sowie BL21	37
4.4. Expression und Isolierung von Proteinen	37
4.4.1. Expression und Reinigung des HIS-YY1-Fusionsproteins	37
4.4.2. Expression und Reinigung des HIS-p53-Fusionsproteins	38
4.4.3. Expression und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen	39
4.5. Nachweis der Proteine	39
4.5.1. Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	39
4.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration	40
4.5.3. Nachweis von Proteinen durch Western Blot Analyse	40
4.6. In vitro Protein-Analyse	41
4.6.1. Gel-Retardations-Experimente	41
4.6.1.1. „Oligo“-Hybridisierung	41
4.6.1.2. Radioaktive Markierung der doppelsträngigen DNA-Probe	42
4.6.1.3. Bindungsreaktion und Gelelektrophorese	42
4.6.2. <i>In vitro</i> Protein-Transkription und Translation	43
4.6.3. GST-Interaktionsassay	44
4.7. Immunhistochemische Analyse von YY1 in Gewebeschnitten	45
5. ERGEBNISSE	46
5.1. Analyse der Interaktion zwischen YY1 und HPV8 E2	46
5.1.1. Kartierung der YY1-Bindedomäne(n) im HPV8 E2-Protein	46
5.1.2. Einfluss von YY1 und HPV8 E2 auf die Promotoraktivität von HPV8	50
5.2. Interaktion von YY1 mit anderen HPV8 Proteinen	59
5.2.1. Funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen YY1 und HPV8 E7	60

5.3. Analyse der Interaktion zwischen YY1 und dem zellulären p53-Protein	61
5.3.1. Nachweis der YY1-p53 Interaktion <i>in vitro</i>	61
5.3.2. Kartierung der p53-Bindedomäne(n) im YY1-Protein	63
5.3.3. Einfluss von p53 und YY1 auf die Transkription von HPV8	65
5.3.4. Einfluss von p53 auf die Bindung von YY1 an seine Bindestellen in der HPV8 NCR	73
5.4. Einfluss von YY1 auf die Replikation von HPV8	78
5.4.1. Auswirkung der YY1-Überexpression auf die transiente Replikation von HPV8	78
5.4.2. Bedeutung der <i>ori</i> -nahen YY1-Bindestelle 1 bei der Repression der Replikation durch YY1	79
5.4.3. Bedeutung der E2-Bindestellen P0, P1, P2, P3 und P4 für die Repression der Replikation durch YY1	81
5.4.4. Einfluss der E2-Überexpression auf die Hemmung der Replikation durch YY1	82
5.4.5. Einfluss der E1-Überexpression auf die Hemmung der Replikation durch YY1	84
5.5. Nachweis der YY1-Expression in Gewebeschnitten gesunder Haut	85
6. DISKUSSION	86
7. LITERATUR	96
8. ABKÜRZUNGEN	108

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das humane Papillomvirus 8 (HPV8) gehört zu den onkogenen HPV-Typen, die bevorzugt mit Hauttumoren bei *Epidermodysplasia verruciformis*-Patienten assoziiert sind. Die HPV8 Genexpression wird durch die nicht-kodierende Region (NCR) kontrolliert, in der sich mehrere DNA-Bindestellen für zelluläre und virale Proteine befinden. Auch der zelluläre Transkriptionsfaktor Yin-Yang 1 (YY1) kann an mehrere Erkennungssequenzen in der NCR von HPV8 binden und dadurch den frühen Promotor von HPV8 sowohl positiv als auch negativ regulieren. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass YY1 mit dem E2-Protein von HPV8 interagiert, welches die HPV8 Transkription ebenfalls sowohl aktivieren als auch reprimieren kann.

Hier konnte mittels Protein-Affinitätschromatographie gezeigt werden, dass YY1 nicht nur an den für die DNA-Bindung notwendigen C-Terminus von HPV8 E2 binden kann, sondern auch an zwei Positionen innerhalb der variablen „Hinge“-Region in der Mitte des Proteins. Transiente Transfektionsstudien ergaben, dass YY1 und E2 synergistisch die Transkription von HPV8 aktivieren. Mutationsanalysen ergaben, dass hierfür eine Bindung der beiden Proteine an ihre Bindestellen in der NCR essentiell ist. Des Weiteren erwies sich die YY1-Bindedomäne im N-terminalen Bereich der „Hinge“-Region des HPV8 E2-Proteins und somit eine Interaktion der beiden Proteine miteinander als notwendig. Weitere Interaktionsstudien zur Wechselwirkung von YY1 mit anderen früh im Lebenszyklus von HPV8 exprimierten Proteinen ergaben eine starke Bindung von YY1 an das virale E7-Protein. In transienten Transfektionsexperimenten hatte diese Interaktion allerdings keinen Einfluss auf die Promotoraktivität von HPV8. Nur eine schwache Wechselwirkung konnte mit dem E6- und keine mit dem E1-Protein nachgewiesen werden.

In der NCR von HPV8 konnte in der Nähe der YY1-Bindestelle 1 eine Erkennungssequenz für das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 gefunden werden. Da dieses ebenso wie YY1 mit anderen Regulatorproteinen interagieren und die Transkription einer Vielzahl zellulärer und viraler Gene regulieren kann, wurde hier untersucht, ob diese beiden Proteine *in vitro* miteinander interagieren bzw. sich in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. In Protein-Affinitätschromatographien konnte ein stabiler YY1-p53 Komplex nachgewiesen werden, wobei im YY1-Protein mindestens drei p53-Bindedomänen charakterisiert werden konnten: eine in der repressorischen Domäne in der Mitte des Proteins sowie zwei weitere innerhalb der C-terminalen Zinkfinger motive.

In transienten Transfektionsexperimenten in verschiedenen Zelllinien konnte p53 die Promotoraktivität von HPV8 reprimieren und die YY1-vermittelte Aktivierung aufheben. Bei gleichzeitiger Überexpression von YY1 konnte die Repression der HPV8 Transkription durch p53 deutlich in der p53 positiven Cervixkarzinom-Zelllinie C33A, aber nur geringfügig in der p53 Nullzelllinie H1299 aufgehoben werden. Da die DNA-bindungsdefekten p53 Mutanten p53R248W und p53R273C, die auch in der Lage waren mit YY1 zu interagieren, in geringen Konzentrationen die Transkription nicht so effizient inhibieren konnten wie Wildtyp p53, scheint eine Bindung von p53 an die DNA für die Repression durch geringe p53 Mengen notwendig zu sein. In Gel-Retardations-Experimenten konnte beobachtet werden, dass p53 schon in geringen Konzentrationen an die in unmittelbarer Nähe zum späten Promotor lokalisierte YY1-Bindestelle 0 binden kann und dadurch YY1 von dieser verdrängt. Des Weiteren konnte p53 durch Bindung an seine Bindestelle im M29-Element YY1 von seiner nur wenige Basenpaare entfernt liegenden Bindestelle 1 verdrängen.

Eine Analyse im transienten Replikationstest ergab, dass YY1 nicht nur Einfluss auf die Transkription hat, sondern auch die Replikation von HPV8 hemmt. Für diesen repressorischen Effekt waren weder die YY1- noch die in der NCR kartierten E2-Bindestellen notwendig. Auch eine Überexpression der für die Replikation notwendigen viralen Proteine E1 und E2 konnte die Repression durch YY1 nicht aufheben.

Da der Lebenszyklus von Papillomviren eng an den Differenzierungszustand der Keratinozyten gekoppelt ist, wurde die Expression des YY1-Proteins in Gewebeschnitten gesunder Haut ermittelt. Durch immunhistochemische Analyse konnte nachgewiesen werden, dass YY1 in allen Zellschichten der Epidermis exprimiert wird. Während allerdings in den unteren Bereichen jede einzelne Zelle eine starke YY1-Expression aufwies, blieben in den oberen Schichten einige Zellen ungefärbt.

ABSTRACT

Human papillomavirus type 8 (HPV8) belongs to the group of oncogenic HPV types specifically associated with skin cancers of *epidermodysplasia verruciformis* patients. HPV 8 gene expression is regulated by the “non coding region” (NCR) encoding binding sites for cellular and virally encoded transcription factors. Among them is the cellular transcription factor Yin Yang 1 (YY1), which can activate as well as repress the HPV8 transcription.

This study demonstrates that the multifunctional cellular transcription factor Yin-Yang 1 (YY1) can interact with the C-terminal DNA binding domain and with at least two domains in the central “hinge”-region of the viral regulator protein E2. Transient transfection assays revealed that YY1 and HPV8 E2 can activate the HPV8 transcription synergistically. This required the binding of both, YY1 and E2, to their DNA recognition sites, present in the NCR as well as the N-terminal YY1 binding domain of the E2 “hinge”-region.

Furthermore, it could be demonstrated by GST-pull-down experiments that YY1 interacts with the cellular tumor suppressor protein p53. Three p53 binding domains were detected in the YY1 protein: one in the central repression domain and two in the C-terminal zincfinger motif. The functional relevance of this interaction was tested by transient transfection assays. Here, p53 could not only repress HPV8 transcription but also abolished YY1-mediated activation. Overexpression of YY1 was able to reverse this p53-mediated repression in the cervical carcinoma cell line C33A which could not be observed in the p53 negative cell line H1299. Small amounts of the p53 mutants R273C and R248W, both defective in DNA binding, but still interact with YY1, were less efficient in repressing the HPV8 transcription, suggesting that the repression mediated through small amounts of p53 requires the binding of p53 to the DNA. Sequence analysis showed that the YY1 binding site 0, close to the late promoter, corresponds to a perfect p53 DNA consensus sequence. Using gel retardation assays, it could be demonstrated that p53 not only binds to this YY1 binding site 0 but also displaces YY1 from it. p53 also binds to the M29-element within the HPV8 NCR, located only a few basepair 5' to the YY1 binding site 1, and was able to displace YY1 from this site. In conclusion the activating function of YY1 on HPV8 gene expression could be negatively regulated by p53.

Transient replication assays revealed that YY1 not only affects the HPV8 transcription but also influences the replication of HPV8. It could be demonstrated that YY1 represses HPV8 replication and that neither the YY1 nor the E2 binding sites were essential for this effect.

Also overexpression of the viral replication proteins E1 and E2 could not reverse the YY1-mediated repression, showing that this repression is not caused by interference of YY1 with E2 protein function.

To analyse the expression of YY1 in differentiating keratinocytes, which are required for the life cycle of HPVs, immunohistochemical analysis was performed. It could be demonstrated that YY1 is expressed in all cell layers of the epidermis but in contrast to the basal layers, where all cells were positive, in the upper layers some cells remained unstained.

2. EINLEITUNG

Klinische Bedeutung von Papillomviren

Papillomviren sind kleine, nicht-umhüllte DNA-Viren, die Epithelzellen der Haut und Schleimhäute vieler Wirbeltiere infizieren und dort zur lokalen Proliferation führen können. Hierbei weisen sie eine strenge Gewebe- und Wirtsspezifität auf (zur Hausen & de Villiers, 1994). Beim Menschen induzieren humane Papillomviren (HPVs) in den meisten Fällen benigne Tumoren des Epithels wie Warzen, Kondylome, Larynx- oder Konjunktivpapillome, die jedoch in bestimmten Fällen maligne entarten können, z. B. zu Hautkarzinomen bei Patienten mit *Epidermodysplasia verruciformis* (*Ev*) oder zu Gebärmutterhalskrebs. Die über 80 verschiedenen HPV Typen können grundsätzlich in zwei Gruppen aufgegliedert werden, die wiederum in „hoch“- und „niedrig-onkogene“ Vertreter unterteilt werden (Chow & Broker, 1997).

Die erste Gruppe stellt die kutanen, die Keratinozyten der Haut infizierenden, HPVs dar, die in der Regel mit gutartigen Warzen assoziiert sind (Shah & Howley, 1996). Zu dieser Gruppe gehören allerdings auch die „hoch-onkogenen“ Papillomvirus-Typen HPV5 und HPV8, die gehäuft in malignen Tumoren von *Ev*-Patienten vorkommen (Orth, 1987; Pfister, 1992). *Ev* war die erste Krankheit, bei der ein kausaler Zusammenhang zwischen Papillomviren und der Karzinogenese beim Menschen nachgewiesen wurde (Jablonska *et al.*, 1972). Sie stellt eine seltene, lebenslange, familiär gehäuft auftretende Hautkrankheit dar, die durch die Entwicklung zahlreicher Flachwarzen und makulösen Hautveränderungen am gesamten Körper gekennzeichnet ist. Nach 10 bis 30 Jahren kommt es oft zur Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen innerhalb der ursprünglich gutartigen Läsionen (Orth, 1987). Als Ursache der *Ev*-Erkrankung werden neben der HPV-Infektion genetische, immunologische und andere Faktoren wie UV-Strahlung beobachtet. Während man *Ev*-spezifische Hautläsionen bei gesunden Menschen so gut wie nie findet (Pfister, 1992), konnte man gelegentlich bei immunsupprimierten Nierentransplantatempfängern DNA von HPV5 und HPV8 sowie von anderen *Ev*-assoziierten HPVs nachweisen (Pfister & ter Schegget, 1997).

Die zweite HPV-Gruppe stellen genitale Papillomviren dar, die die Schleimhäute des Rachenraums und des Anogenitaltraktes infizieren und meist zu subklinischen Infektionen führen.

Eine Infektion mit den „hoch-onkogenen“ genitalen HPVs, meistens Typ 16 oder Typ 18, führt zur Entwicklung von flachen Kondylomen oder niedriggradigen cervikalen intraepithelialen Neoplasien. In etwa 80 % der Cervixkarzinome ist die DNA eines dieser beiden Virustypen nachweisbar (Shah & Howley, 1996).

Genomorganisation der Papillomviren

Das Genom der Papillomviren besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen, 7600 bis 8000 Basenpaare (bp) umfassenden DNA, die in ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 55 nm verpackt ist. Die virale DNA bildet zusammen mit zellulären Histonen eine chromatinähnliche Struktur aus (Pfister, 1984). Das Genom ist bei allen Papillomviren ähnlich aufgebaut und kann in einen kodierenden und einen nicht-kodierenden Bereich unterteilt werden. Die kodierende Region umfasst Leserahmen („open reading frames“, ORFs), die in der Regel für acht frühe regulatorische Proteine („early“, E) sowie für zwei Strukturproteine („late“, L) kodieren (Shah & Howley, 1996). Während die frühen Proteine die virale Transkription, die Replikation und die Pathogenese beeinflussen, bilden die späten Proteine das virale Kapsid. Die sich teilweise überlappenden Leserahmen liegen auf demselben DNA-Strang und nehmen trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Typen relativ zueinander entsprechende Positionen ein (Abb. 1).

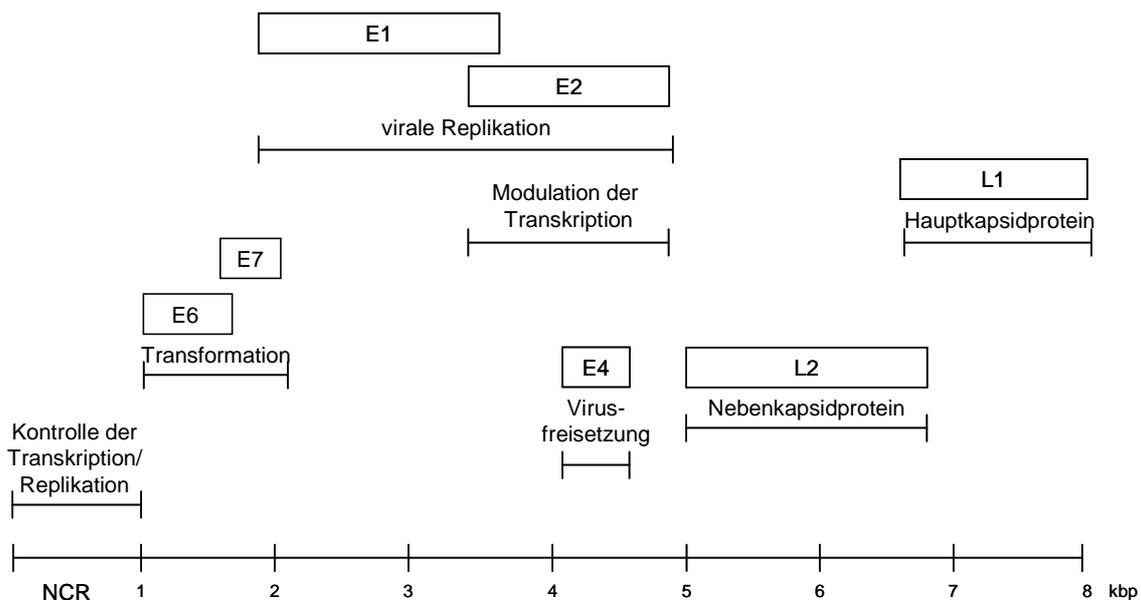


Abb. 1: **Schematische Darstellung des HPV8 Genoms**

Bei dieser Darstellung wurde das Genom an der Position 0/7654 geöffnet. Die früh (early = E) bzw. spät (late = L) im viralen Lebenszyklus exprimierte Leserahmen und ihre bekannten bzw. vermuteten Funktionen sind eingezeichnet; (modifiziert nach Pfister & Fuchs, 1987).

Zwischen den ORFs L1 und E6 befindet sich die regulatorische, nicht-kodierende Region („non coding region“, NCR oder „long control region“, LCR), die die wichtigsten *cis*-Kontrollelemente enthält, die essentiell für die Regulation der Transkription und Replikation des viralen Genoms sind. Die NCR nimmt ca. 7 bis 10 Prozent des HPV-Genoms in Anspruch und weist eine relativ geringe Sequenzhomologie zwischen verwandten Virustypen auf (Pfister & Fuchs, 1987).

Infektionszyklus und Replikation von Papillomviren

Papillomviren replizieren streng wirtsspezifisch und vermehren sich in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Haut (Fuchs & Pfister, 1997). Sie infizieren vermutlich zunächst undifferenzierte Zellen der Basalschicht des Epithels (*Stratum basale*, Abb. 2), die sie durch Mikroverletzungen der äußeren Schichten erreichen. Als ein möglicher Rezeptor konnte das $\alpha 6$ -Integrin identifiziert werden, das an der Oberfläche von epithelialen, endothelialen und neuronalen Zellen exprimiert wird (Evander *et al.*, 1997). Dieser Rezeptor scheint jedoch nach jüngsten Erkenntnissen zumindest für bovine mukotrope Papillomviren nicht obligatorisch zu sein (Sibbet *et al.*, 2000). Nach Aufnahme des Virus durch Endozytose, findet im Kern der undifferenzierten, proliferationskompetenten Basalzellen die Transkription der frühen, für die Replikation notwendigen Gene E1 und E2 statt. Das virale Genom wird danach synchron mit der zellulären DNA-Synthese repliziert. Die Zellen des *Stratum basale* teilen sich während des Erneuerungsprozesses der Haut zur Hautoberfläche hin, wobei es zu einer kontinuierlichen Differenzierung der basalen Keratinozyten kommt. Während der Differenzierung verändert sich das zelluläre Milieu, es werden andere Proteine in der Zelle exprimiert, die dann wahrscheinlich zur Verstärkung der viralen Transkription und vegetativen Replikation führen. Beginnend im *Stratum granulosum* wird die Replikation von der Expression viraler Strukturproteine und dem Zusammenbau neuer Viruspartikel begleitet. In den terminal ausdifferenzierten Zellen des *Stratum corneum* befinden sich die reifen Viruspartikel eingebettet in das Keratin. Die Freisetzung der infektiösen Viruspartikel erfolgt nicht durch Lyse der Wirtszelle, sondern durch das Absterben der obersten Zellschicht (Howley, 1996). Die Aufrechterhaltung einer schwachen Replikation bei latenten Infektionen ist in den basalen Schichten der Epidermis möglich, in denen das virale Genom synchron mit der zellulären DNA-Synthese repliziert (Gilbert & Cohen, 1987). Hierbei treten keine apparenten Epithelveränderungen auf. Dieser Zustand kann Monate oder Jahre andauern und danach wieder in einen produktiven Infektionszyklus übergehen.

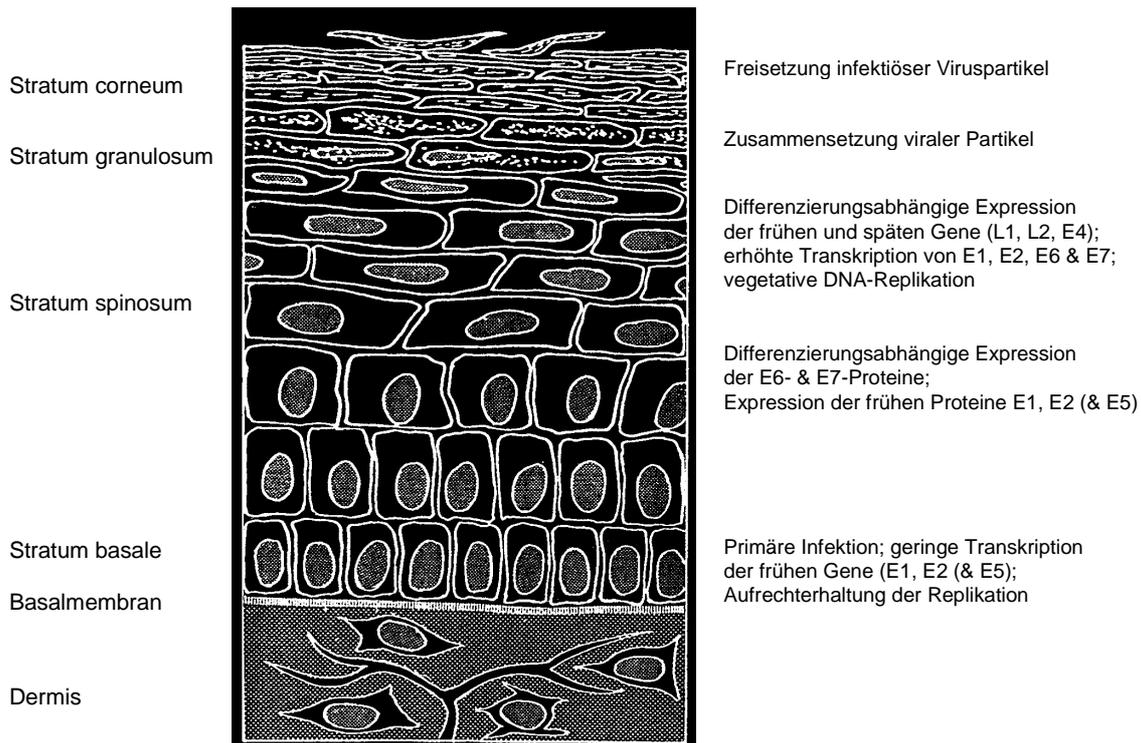


Abb. 2: **Verlauf einer produktiven Papillomvirusinfektion im Hautepithel**

Auf der linken Seite sind die unterschiedlichen Epithelschichten (*Strata*) genannt und auf der rechten Seite die differenzierungsabhängige virale Genexpression (modifiziert nach Chow & Broker, 1997).

Die Mechanismen, die die verschiedenen Replikationsstadien steuern, sind nur teilweise identifiziert. Man nimmt an, dass in den undifferenzierten Basalzellen, in denen das virale Genom unmittelbar nach der Infektion repliziert, am Replikationsursprungspunkt („origin of replication“, *ori*) eine Theta-(θ)-Struktur ausgebildet wird, die sich aus einer bidirektionalen Replikation der viralen DNA ergibt (Flores & Lambert, 1997). Hierbei entstehen zwei Replikationsgabeln, die sich in entgegengesetzter Richtung vom *ori* entfernen. In den differenzierten Keratinozyten, in denen die vegetative DNA Replikation stattfindet, könnte die virale DNA hingegen nach dem „rolling circle“ Mechanismus repliziert werden, wobei die Replikationsgabel um einen ringförmigen Matrizenstrang rotiert. Das Vorhandensein von zellulären Faktoren in differenzierten Zellen oder eine hohe Konzentration an den viralen Replikationsproteinen E1 und E2 könnten eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Replikation spielen.

Papillomviren steuern zum Replikationskomplex nur die Proteine E1 und E2 bei (Chiang *et al.*, 1992). Während E1 die Rolle des *ori* erkennenden Faktors ausübt, übernimmt E2 die Aufgabe, die Bindung von E1 an den *ori* zu stabilisieren. Eine Ausnahme stellt das kutane HPV1a dar, welches allein mit E1 repliziert werden kann (Gopalakrishnan & Khan, 1994). Alle anderen notwendigen Faktoren werden von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt.

E1 ist der längste und am höchsten konservierte Leserahmen im Genom von Papillomviren. Das 600-650 Aminosäuren lange E1-Protein ist eine kernlokalisierte, ATP bindende Helikase (Yang *et al.*, 1993), die als Oligomer an den *ori* binden kann (Holt *et al.*, 1994). E1 kann nur als Hexamer die Replikation einleiten (Sedman & Stenlund, 1998), indem es wahrscheinlich wie andere DNA-Helikasen eine Ringstruktur um einen DNA-Einzelstrang ausbildet und so den *ori* entwindet (Egelman *et al.*, 1995).

Die zweite virale Komponente des Replikationskomplexes stellt das 43-48 kDa große E2-Protein dar. Es bindet während der Initiation der Replikation sowohl an seine im *ori* enthaltene Bindestelle, als auch an E1 und stabilisiert dabei dessen Interaktion mit dem *ori* (Mohr *et al.*, 1990; Seo *et al.*, 1993).

Die funktionellen *ori* Elemente bei allen diesbezüglich untersuchten Papillomviren liegen im proximalen Bereich des E6-ORFs in der NCR, weisen einen hohen A/T-Gehalt auf und enthalten Bindestellen für die viralen E1- und E2-Proteine (z. B. Lee *et al.*, 1997).

Regulation der Genexpression bei Papillomviren

Die Kontrolle der viralen Genexpression erfolgt über die NCRs. Diese enthalten neben den Promotoren und einem CAAT-Box-Äquivalent Bindestellen für die viralen Proteine E2 und E1 sowie mehrere DNA-Bindemotive für positiv und negativ regulierende zelluläre Faktoren, wie z. B. NF1, TEF1, Oct1, SP1, C/EBP- β und YY1 (Yin-Yang 1) (O'Connor *et al.*, 1995). Diese Proteine können über direkte oder indirekte Protein-Protein Wechselwirkung mit Komponenten des basalen Preinitiationskomplexes die Transkription beeinflussen. Die NCRs verwandter Papillomviren gleichen sich zwar in ihrem Aufbau, es bestehen aber große Unterschiede zwischen nicht-verwandten HPVs (Howley, 1996). Am deutlichsten sind diese Differenzen bei *Ev*-assoziierten und genitalen Papillomviren. So ist die NCR von *Ev*-assoziierten HPVs mit 400 bp beispielsweise nur etwa halb so groß wie die der genitalen Vertreter (Fuchs *et al.*, 1993). In Abb. 3 ist der Aufbau der NCR des *Ev*-assoziierten HPV8 gezeigt. Sie enthält die für *Ev*-Viren typischen Sequenz-Motive wie z. B. das M33 Enhancer-Motiv, bestehend aus 33 konservierten Nukleotiden, gefolgt von einer Bindestelle für den AP1-Transkriptionsfaktor.

Ebenfalls typisch sind sowohl das aus 29 konservierten Basenpaaren bestehende M29-Element als auch eine A/T-reiche Sequenz stromaufwärts des E6 ORF. Außerdem befinden sich in der NCR und im angrenzenden L1 ORF fünf, im Hinblick auf ihre Position hoch konservierte Bindestellen für das virale E2-Protein (P0-P4). Bei HPV8 wurden bislang zwei Promotoren identifiziert, die den Positionen der mRNA-Cap-Stellen entsprechend P₁₇₅ und P₇₅₃₅ genannt werden (Fuchs *et al.*, 1993). P₁₇₅ stellt vermutlich den Promotor des E6-Onkogens dar, während P₇₅₃₅ wahrscheinlich die Expression von L1 und E2 steuert. Da P₇₅₃₅ selbst von E2 reguliert werden kann, könnte es sich hierbei um einen autoregulatorischen Kreislauf handeln (Stubenrauch *et al.*, 1992).

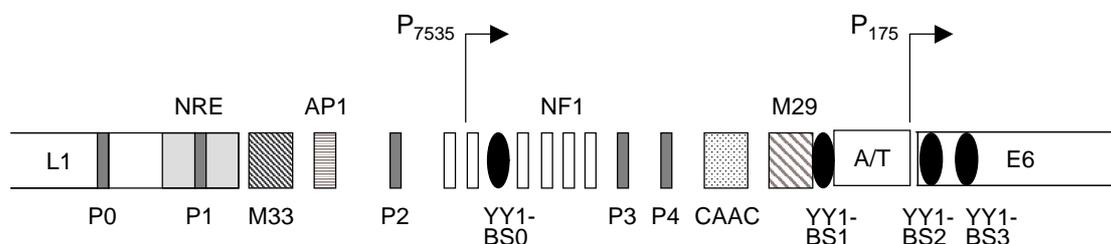


Abb. 3: **Schematische Darstellung der NCR von HPV8**

P0-P4: palindrome E2-Bindestellen; **M33, M29** und **A/T:** unter *Ev*-Viren hoch konservierte Sequenzelemente; **AP1:** Bindestelle für den zellulären Transkriptionsfaktor AP1; **NF1:** Bindestellen für den zellulären Transkriptionsfaktor NF1; **YY1-BS0-3:** Bindestellen für den zellulären Transkriptionsfaktor Yin-Yang 1 (YY1); **CAAC:** CAAT-Box Äquivalent; **NRE:** negativ regulatorisches Element; **P₇₅₃₅:** später HPV8 Promotor; **P₁₇₅:** früher HPV8 Promotor; (modifiziert nach May *et al.*, 1994b).

Das virale E2-Protein

Das E2-Protein der Papillomviren beeinflusst nicht nur die Replikation, sondern auch die Transkription und Segregation des Genoms bei der Zellteilung (McBride *et al.*, 1991; Skiadopoulos & McBride, 1998; Lehman & Botchan, 1998). Es bindet als Dimer an seine mehrfach in der NCR vorkommende, palindromische DNA-Erkennungssequenz 5'-ACCN₆GGT-3'. Zudem besitzt es einen für Transkriptionsfaktoren typischen Aufbau mit zwei konservierten Domänen: eine Aktivierungsdomäne, die im N-terminalen Bereich liegt und eine DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne am C-Terminus.

Diese Domänen werden durch eine nicht-konservierte Region variabler Länge voneinander getrennt, die als „Hinge“-Region bezeichnet wird (Mc Bride *et al.*, 1991). E2 kann die virale Transkription konzentrationsabhängig aktivieren oder reprimieren. In geringen Konzentrationen bindet E2 zuerst an seine hoch-affinen Bindestellen, wodurch es zu einer Aktivierung kommt, während bei steigenden E2 Mengen die niedrig-affinen Bindestellen besetzt werden, was zu einer Repression führt (Stubenrauch & Pfister, 1994; Steger & Corbach, 1997). Ob die E2-Bindestellen eher positiv oder negativ regulierend sind, hängt in erster Linie von ihrer Position relativ zu anderen *cis*-aktiven Promotorelementen ab (Steger *et al.*, 1993). Die meisten negativ regulierenden E2-Bindestellen überlappen mit oder befinden sich in unmittelbarer Nähe von DNA-Bindestellen für positiv wirkende zelluläre Transkriptionsfaktoren wie z. B. SP1, was dazu führt, dass diese nicht mehr binden und somit nicht mehr aktivieren können (Demeret *et al.*, 1994; Dong *et al.* 1994a; Tan *et al.* 1992, 1994). Die Aktivierung der Transkription durch E2 erfolgt vermutlich durch direkte Protein-Protein Wechselwirkung mit Faktoren des basalen Transkriptions-Initiations-Komplexes, z. B. TBP, TFIIB und TAF_{II}55 (Rank & Lambert, 1995; Enzenauer *et al.*, 1998) oder Transkriptionsfaktoren wie SP1, AP1 oder Oct-1 (Li *et al.*, 1991; Ushikai *et al.*, 1994).

Papillomviren und Tumorentstehung

In den meisten Cervixkarzinomen liegt das virale Genom integriert im Wirtschromosom vor, wobei bei der Öffnung des viralen Genoms häufig die ORFs E1 und E2 unterbrochen werden (Matsukura *et al.*, 1986). Der dadurch resultierende Verlust von E2 kann zumindest teilweise die erhöhte Onkogen-Expression erklären. Aufgrund dieser Befunde weist man der Integration der viralen DNA eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression zu (Schneider-Maunoury *et al.*, 1987). Allerdings kann dies nicht die alleinige Ursache der malignen Entartung sein, da in ca. 30 % der HPV16 positiven Cervixkarzinome das virale Genom extrachromosomal vorliegt und demnach der E2 ORF intakt ist (Choo *et al.*, 1987; Cullen *et al.*, 1991; Fuchs *et al.*, 1989). Zudem liegt das Genom der *Ev*-assoziierten Typen HPV5 und HPV8 in allen Tumoren episomal vor (Orth, 1987).

Die transformierende und immortalisierende Aktivität der „hoch-onkogenen“ genitalen HPV Typen 16 und 18 kann den viralen Proteinen E6 und E7 zugeschrieben werden, da beide für die Transformation und Immortalisierung von Zellen in Kultur notwendig und ausreichend sind (Münger *et al.*, 1989).

Zwar ist das entscheidende Protein hierbei E7, aber typischerweise ist eine Kooperation mit E6 notwendig, um Keratinozyten der Cervixschleimhaut zu immortalisieren bzw. ein verändertes Differenzierungsverhalten auszulösen (Hawley-Nelson *et al.*, 1989). Der Mechanismus der Zelltransformation beruht darauf, dass diese Proteine mit den zellulären, den Zellzyklus regulierenden Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb (Retinoblastomprotein) interagieren (Dyson *et al.*, 1989; Werness *et al.*, 1990; Münger *et al.*, 1992). Das nach der Mitose dephosphorylierte pRb-Protein bindet und inaktiviert den zellulären Transkriptionsfaktor E2F, was zur Hemmung der E2F-abhängigen Expression der Wirtsgene führt und verhindert dadurch den Eintritt der Zelle in die S-Phase (Abb. 4). Tritt das E7-Protein onkogener HPV Typen mit dem dephosphorylierten pRb-Protein in Wechselwirkung, wird dieser Regulationsmechanismus gestört, und zelluläre Gene, die E2F-Erkennungssequenzen in ihrer Promotorregion enthalten, werden aktiviert (Dyson *et al.*, 1989). Als Folge kommt es zu einem Eintritt der Zelle in die S-Phase. Die Wechselwirkung des E7-Onkoproteins mit dem zellulären pRb-Protein kann jedoch nicht alleine die Zelltransformation und Tumorprogression erklären, da E7 Mutanten bekannt sind, die, obwohl sie mit pRb interagieren können, ihre transformierende Aktivität verloren haben (Pfister, 1996). Auf der anderen Seite sind E7 Mutanten, die nicht mehr an pRb binden, noch in der Lage humane Keratinozyten zu immortalisieren (Chow & Broker, 1997).

Das E6-Protein der „hoch-onkogenen“ genitalen HPV Typen 16 und 18 interagiert mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 (Werness *et al.*, 1990), was zu einer Degradation des p53 Moleküls durch die ubiquitinabhängige Proteolyse führt (Scheffner *et al.*, 1990). p53 blockiert bei Schäden in der zellulären DNA den Zellzyklus in der G1-Phase und ermöglicht so deren Reparatur (Lane, 1992). Dies geschieht, indem es die Transkription des WAF1/CIP1 Gens stimuliert, dessen Genprodukt p21 an Cyclin abhängige Kinasen (CDKs) bindet und diese inaktiviert (El-Deiry *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1993; Abb. 4). Die Interaktion von E6 mit p53 hat zur Folge, dass die Zellen an p53 verarmen und frühzeitig, bevor die Reparatursysteme Schäden beseitigt haben, in die S-Phase des Zellzyklus eintreten. Bei irreparablen Schäden induziert p53 in diesen Zellen die Apoptose (Lowe *et al.*, 1993). p53 aktiviert nicht nur die Transkription des p21 Gens, sondern auch eine Vielzahl weiterer Gene, deren Produkte den Zellzyklus regulieren oder für die Reparatur notwendig sind (Ko & Prives, 1996). Beispiele hierfür sind die Gadd Gene (Kastan *et al.*, 1992), das mdm2 Gen (Wu *et al.*, 1993; Barak *et al.*, 1993), das bax Gen (Miyashita & Reed, 1995) u.a.

Für die Transkriptionsaktivierung durch p53 muss dieses als Tetramer sequenzspezifisch an das zweimal vorkommende DNA-Motiv 5'-PuPuPu C(A/T)(T/A)G PyPyPy-3' binden (El-Deiry *et al.*, 1992).

Es gibt auch eine Vielzahl zellulärer und viraler Promotoren, die durch p53 negativ reguliert werden (Ginsberg *et al.*, 1991; Subler *et al.*, 1992; Jackson *et al.*, 1993). Hierfür scheint jedoch ein anderer Mechanismus als für die Aktivierung verantwortlich zu sein, da den meisten Promotoren, auf die p53 einen negativen Einfluss hat, p53-Erkennungssequenzen fehlen (Donehower & Bradley, 1993).

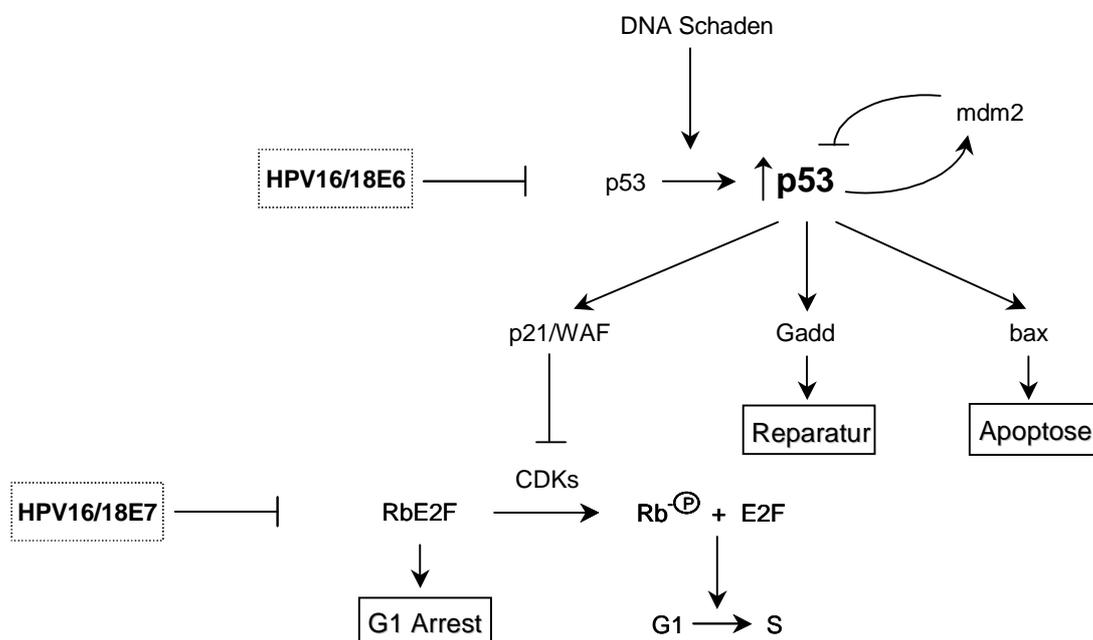


Abb. 4: **p53 Signalkaskade**

Eine durch DNA-Schaden erhöhte p53 Konzentration in der Zelle führt zur Transkriptionsaktivierung des den Zellzyklus regulierenden p21 Gens sowie der für die Reparatur (Gadd Gene) und Induktion von Apoptose (bax Gen) notwendigen Gene. Das mdm2 Genprodukt stellt eine Ubiquitin Ligase dar, die p53 spezifisch ubiquitiniert und so der Proteolyse zugänglich macht. Da p53 das mdm2 Gen aktiviert, handelt es sich um einen autoregulatorischen Feedback-Loop. Die E6- und E7-Proteine der „hoch-onkogenen“ HPV Typen 16 und 18 blockieren durch Interaktion mit p53 und Rb diesen Regulationsmechanismus (Erläuterungen s. Text); (modifiziert nach Ko & Prives, 1996).

p53 hat nicht nur Einfluss auf die Transkription und den Zellzyklus, sondern konnte auch als Repressor der HPV Replikation identifiziert werden (Lepik *et al.*, 1998). Man nimmt an, dass dieser Effekt durch die gezeigte Interaktion von p53 mit dem für die Replikation notwendigen E2-Protein zustandekommt (Massimi *et al.*, 1999).

Obwohl in mehr als der Hälfte menschlicher Tumoren das p53-Gen mutiert ist (Hollstein *et al.*, 1994), sind in Cervixkarzinomen p53 Mutationen relativ selten zu finden (Crook *et al.*, 1992). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Bindung von HPV16 und 18 E6 an p53 einen ähnlichen Effekt wie ein Verlust der physiologischen p53 Funktion durch Mutation haben kann. Die Interaktion von E6 mit p53 kann allerdings nur teilweise die transformierende Aktivität dieses Proteins erklären, da das E6-Onkoprotein von HPV8 *in vitro* nicht mit p53 interagieren kann (Steger & Pfister, 1992), obwohl es äußerst effizient Nagerfibroblasten transformiert (Iftner *et al.*, 1988).

Das zelluläre Yin-Yang 1 (YY1) Protein

Bei der Kontrolle der Genexpression von Papillomviren sowie bei der Tumorprogression spielt des weiteren der zelluläre Transkriptionsfaktor Yin-Yang 1 (YY1) eine zentrale Rolle.

YY1 ist ein 424 Aminosäuren (AS) großes, ubiquitär exprimiertes Zinkfinger-Protein, das durch Interaktion mit Enhancern, Promotoren und Initiatoren, abhängig vom Promotorkontext und Zellmilieu, die Transkription mehrerer zellulärer und viraler Gene aktivieren oder reprimieren kann (Hahn, 1992). Diese duale Funktion von YY1 kann teilweise mit seiner Proteinstruktur erklärt werden, denn im YY1-Protein konnten mehrere unterschiedliche Domänen charakterisiert werden: eine Aktivierungsdomäne am N-terminalen Ende, eine Glycin-Alanin-reiche Repressionsdomäne im zentralen Bereich und eine DNA-Binde- sowie eine zweite Repressionsdomäne am C-Terminus (Bushmeyer *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1995). YY1 bindet an eine sehr variable DNA-Erkennungssequenz, mit dem Kernelement 5'-CAT-3' (Shi *et al.*, 1997; Yant *et al.*, 1996).

Die Analyse von extrachromosomal vorliegenden HPV16 Genomen aus mehreren Cervixkarzinomen ergab, dass in der NCR mehrere YY1-Bindestellen fehlten oder mutiert waren (Dong *et al.*, 1994b; May *et al.*, 1994a). Da es als Folge dieser Mutationen zu einer verstärkten Expression der viralen Onkogene kommt, wurde YY1 als ein Repressor der HPV16 Genexpression charakterisiert. Fünf YY1-Bindestellen im Umfeld einer Promotor-nahen AP1-Bindestelle scheinen für diese Repression verantwortlich zu sein (O' Connor *et al.*, 1996).

Ziel scheint der in diesem Bereich bindende Faktor AP1 zu sein, und man nimmt an, dass die Komplexbildung von YY1 mit dem AP1 Coaktivator CBP (CREB-binding Protein) für die Repression verantwortlich sein könnte. Die Identifizierung einer Bindestelle für den zellulären Transkriptionsfaktor SP1, die mit der Promotor-proximalen YY1-Bindestelle in der NCR von HPV16 überlappt, stellt einen anderen Mechanismus der Repression durch YY1 dar, indem YY1 und SP1 um die Bindung an diese Bindestelle kompetieren (Dong & Pfister, 1999).

Während bei HPV18 in den meisten Zelllinien ebenfalls eine Repression der Transkription durch YY1 beobachtet werden konnte, kam es in HeLa-Zellen zu einer Aktivierung in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer sogenannten „switch-Region“ („Umschaltungs-region“) (Bauknecht *et al.*, 1992, 1995; Jundt *et al.*, 1995). Die Wechselwirkung zwischen YY1 und dem zelltypspezifischen C/EBP β -Transkriptionsfaktor, der an diese „switch-Region“ in der HPV18 NCR bindet, führt zu einer Aktivierung der E6/E7 Transkription (Bauknecht *et al.*, 1996). Da dieser C/EBP β /YY1 Komplex in vielen Zellen nicht existiert, handelt es sich hierbei um einen Zelltyp-spezifischen, YY1-abhängigen Regulationsmechanismus.

Auch im Bereich der NCR von HPV8 wurden vier YY1-Bindestellen charakterisiert, von denen sich drei in der Nähe des E6/E7-Promotors P₁₇₅ befinden (Widow, 1994, vgl. Abb. 3). YY1 reguliert über die verschiedenen Bindestellen sowohl reprimierend als auch aktivierend den frühen Promotor, in der Summe wird jedoch ein positiver Effekt auf die E6/E7 Transkription vermittelt (Pajunk *et al.*, 1997).

Neueste Daten zeigen, dass YY1 den HPV6 E1-Promotor nur in undifferenzierten, nicht aber in differenzierten Keratinozyten negativ reguliert, was darauf hindeutet, dass es sich bei YY1 um einen differenzierungsabhängigen Transkriptionsfaktor handelt (Ai *et al.*, 2000).

YY1 ist nicht nur an der Regulation der HPV Transkription beteiligt, sondern kann auch Einfluss auf die Replikation ausüben. Für HPV11 und HPV18 konnte gezeigt werden, dass YY1 möglicherweise durch Interferenz mit den E2-Protein Funktionen die Replikation hemmt (Lee *et al.*, 1998).

Auch bei vielen anderen Viren spielt YY1 eine wichtige regulatorische Rolle. So konnte eine YY1-vermittelte Repression der Transkription bei mehreren Viren beobachtet werden, die persistierende, latente Infektionen hervorrufen können, wie z. B. Adeno Assoziiertes Virus (AAV) (Shi *et al.*, 1991), Epstein-Barr Virus (EBV) (Montalvo *et al.*, 1995) und humanes Cytomegalovirus (CMV) (Liu *et al.*, 1994). Es ist dabei offensichtlich die Aufgabe von YY1 die Expression viraler Gene weitgehend zu unterdrücken, um so Schaden von der infizierten Zelle abzuwenden.

Diese negative Kontrolle kann durch bestimmte Faktoren aufgehoben werden, wodurch dem Virus der Eintritt in die vegetative Replikation ermöglicht wird. Bei AAV wird z. B. der P5 Promotor so lange durch YY1 reprimiert, bis durch eine Coinfektion mit Adenovirus in der Wirtszelle der adenovirale Transaktivator E1A anwesend ist. Die Wechselwirkung zwischen YY1 und E1A, vermittelt durch den Cofaktor p300, führt dazu, dass YY1 die Transkription nicht mehr reprimiert sondern aktiviert (Lee *et al.*, 1995).

YY1 kann die Genexpression durch verschiedene Mechanismen aktivieren oder reprimieren (Thomas & Seto, 1999). Im Allgemeinen findet eine Aktivierung der Transkription durch YY1 dann statt, wenn YY1 mit Proteinen des basalen Transkriptionskomplexes wie TBP, TFIIB, TAF_{II}55 (Usheva & Shenk, 1994; Chiang & Roeder, 1995; Austen *et al.*, 1997), oder mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. SP1 (Lee *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1993) oder C/EBP β interagiert (Bauknecht *et al.*, 1996). Eine Aktivierung durch YY1 kann auch durch Wechselwirkung mit Coaktivatoren wie z. B. CBP oder p300 erfolgen, die wiederum mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren bzw. diese modifizieren (Lee *et al.*, 1995; Austen *et al.*, 1997). Ein häufiger Mechanismus der YY1-vermittelten Repression stellt die Konkurrenz um überlappende DNA-Bindestellen zwischen YY1 und zellulären Transkriptionsaktivatoren dar. Beispiele hierfür sind der *Serum Response Faktor* (SRF) im α -Aktin Promotor (Lee *et al.*, 1992), NF- κ B im Serum Amyloid A1 Promotor (Lu *et al.*, 1994) sowie SP1 bei HPV16 (Dong & Pfister, 1999). Des Weiteren kann YY1 mit den Funktionen eines Aktivators interferieren und so die Transkription reprimieren. Dies erfolgt entweder durch direkte Protein-Protein Interaktion oder durch Konkurrenz um die Bindung an weitere Proteine (Galvin & Shi, 1997). Für den zellulären *c-fos* Promotor konnte eine Repression sowohl über direkte Protein-Protein Wechselwirkung von YY1 mit dem CRE (cAMP responsive element) bindenden Protein (CREB) nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 1995) als auch durch „DNA-Bending“ als Folge der Bindung von YY1 an die DNA (Natesan & Gilman, 1993). Einen anderen Mechanismus der negativen Regulation der Transkription durch Histon-Deacetylierung stellt die Kooperation von YY1 mit dem mRPD3-Corepressor dar, der zur menschlichen Histon-Deacetylase (HDAC1) homolog ist (Yang *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Interaktion wird der Corepressor in Promotor-Nähe gebracht, wo er die lokale Chromatinstruktur verändern und dadurch die Transkription reprimieren kann. Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass YY1 zusammen mit einem weiteren zellulären Faktor (LSF) über diesen Mechanismus die Transkription des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV1) reprimiert (Coull *et al.*, 2000).

YY1 kann die Transkription auch initiieren, indem es an Initiator Elemente (Inr) in Promotoren bindet (Seto *et al.*, 1991; Basu *et al.*, 1993; Usheva & Shenk, 1994). Möglicherweise funktioniert YY1 hier teilweise ähnlich wie TBP und leitet die RNA-Polymerase zum Initiationskomplex.

Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle von YY1 bei der Regulation der Transkription und Replikation des *Ev*-assoziierten HPV8 untersucht werden.

Der erste Teil beschäftigt sich mit der genauen Kartierung der YY1-Bindedomänen im HPV8 E2-Protein und mit dem Einfluss der Interaktion dieser beiden Proteine miteinander auf die Promotoraktivität von HPV8. Des Weiteren wurde YY1 auf eine mögliche Interaktion mit anderen früh im Infektionszyklus von HPV8 exprimierten Proteinen getestet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Wechselwirkung von YY1 mit dem zellulären p53-Protein *in vitro* analysiert und die p53-Bindedomänen im YY1-Protein charakterisiert. In transienten Transfektionsexperimenten sollte der Einfluss von p53 auf die Transkription von HPV8 sowie auf die Promotoraktivierung durch YY1 überprüft werden. Ob p53 die Bindung von YY1 an seine DNA-Bindestellen in der HPV8 NCR beeinflusst, wurde in Gel-Retardations-Experimenten untersucht.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob YY1 im transienten Test einen Einfluss auf die Replikation von HPV8 hat.

Im letzten Teil wurde das Expressionsprofil von YY1 in Gewebeschnitten gesunder Haut ermittelt.

3. MATERIAL

3.1. Bakterien

Die verwendeten Stämme von *E. coli* hatten folgende Genotypen:

DH5 α (GIBCO BRL): F⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻,m_K⁺)*phoA*supE44 λ ⁻*thi-1 gyrA96 relA1*.

Epicurian Coli[®] XL1-Blue (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*[F'*proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)].

Epicurian Coli[®] XL2-Blue Ultracompetent Cells (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*[F'*proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a.

Epicurian Coli[®] BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL (Stratagene): F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻m_B⁻) *dcm Tet^r gal* λ (DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW* Cam^r].

3.2. Eukaryonte Zellen

RTS3b

Humane, HPV-negative Keratinozyten, die aus einem Hautkarzinom eines Nierentransplantat-Empfängers etabliert wurden (Purdie *et al.*, 1993).

C33A

Humane, HPV-negative Cervixkarzinomzelllinie (Auersperg, 1969).

H1299

Humane Lungenepithelkarzinomzelllinie („non-small-cell lung cancer“), die endogen kein p53 exprimiert (Mitsudomi *et al.*, 1992).

3.3. Medien

3.3.1. Medien für die Zellkultur

DMEM-Glutamax (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium), **DMEM/F12 (1:1)-Glutamax** und **RPMI** wurden als Fertigmedien von der Fa. Gibco/BRL bezogen und mit 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung sowie 10 % FKS versetzt.

Keratinozyten-Medium

Das Medium für die Kultur von RTS3b Zellen wurde aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

50 %	DMEM-Glutmax
50 %	DMEM/F12 (1:1)-Glutamax
10 %	FKS
100 µg/ml	Gentamycin
0,4 g/ml	Hydrocortison
10 ⁻¹⁰ M	Choleratoxin
5 µg/ml	Transferrin
2 x 10 ⁻¹¹ M	Trijodothyronin
1,8 x 10 ⁻⁴	Adenin
5 µg/ml	Insulin
10 ng/ml	Epidermal growth factor

Einfriermedium für eukaryonte Zellen

10 % (v/v) DMSO in FKS.

3.3.2. Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (Lauria-Bertani-Medium), **2xYT-Medium**, **LB-Agar** wurden als Fertigmedien von der Fa. Gibco/BRL bezogen.

3.4. Antikörper

C-20 anti YY1 (Santa Cruz Biotechnology):

Ein polyklonaler Antikörper, der gegen das YY1-Protein in Kaninchen erzeugt wurde und spezifisch YY1 erkennt.

H-10 anti YY1 (Santa Cruz Biotechnology):

Ein monoklonaler Antikörper, der gegen das YY1-Protein in Mäusen erzeugt wurde und spezifisch YY1 erkennt.

DO-1 anti p53 (Santa Cruz Biotechnology):

Ein monoklonaler Antikörper, der gegen das p53-Protein in Mäusen erzeugt wurde und spezifisch p53 erkennt.

Anti-Kaninchen IgG (Dianova):

Ein polyklonaler Peroxidase gekoppelter Antikörper, der gegen das IgG (H&L) des Kaninchens in Ziegen erzeugt wurde.

Anti-Maus IgG (Santa Cruz Biotechnology):

Ein polyklonaler Peroxidase gekoppelter Antikörper, der gegen das IgG (H&L) der Maus in Ziegen erzeugt wurde

3.5. Enzyme

Alle für diese Arbeit notwendigen Enzyme wurden bei folgenden Firmen erworben:

Gibco/BRL (Eggenstein); Boehringer (Mannheim); New England Biolabs (Schwalbach); Stratagene (Heidelberg); Promega (Madison, USA).

3.6. Chemikalien, Reagenzien

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia (Freiburg); Applichem (Darmstadt); BIO-RAD (München); Dianova (Hamburg); Fresenius (Bad Homburg); Gibco/BRL (Eggenstein); ICN (Eschwege); J.T. Baker (Deventer, Holland); Merck (Darmstadt); New England Biolabs (Schwalbach); QIAGEN (Hilden); Roche Diagnostics (Mannheim); Roth (Karlsruhe); Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA); Satorius (Göttingen); Serva (Heidelberg); Sigma/Aldrich GmbH (Deisenhofen).

3.7. Reagenzsysteme

TNT-T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega (Madison, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAprep Maxi/Midi Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAprep 8 Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden)
GenElute™ Plasmid Maxiprep Kit	Sigma (Deisenhofen)
Nickel-Agarose	QIAGEN (Hilden)
Glutathion Sepharose® 4B	Amersham Pharmacia (Freiburg)
LIPOFECTAMINE™ Reagent	Gibco/BRL (Eggenstein)
FuGENE™ 6 Reagent	Boehringer (Mannheim)
ECL-Detektionsreagenz	Amersham Pharmacia (Freiburg)
DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II	Boehringer (Mannheim)
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg)
Vectastain Universal ABC Kit	Camon (Wiesbaden)

3.8. Radioisotope

Radioaktiv markierte Nukleotide [α - ^{32}P]-dATP, [γ - ^{32}P]-dATP und L- ^{35}S]-Methionine wurden bei der Fa. Amersham (Braunschweig) oder ICN Biomedicals GmbH (Eschwege) erworben.

3.9. Nukleinsäuren

3.9.1. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden von der Fa. Eurogentec (Seraing, Belgien) für PCR, ortsspezifische Mutagenese, Sequenzierungen und Gel-Retardations-Experimente von HPV8 bestellt. Ausnahmen sind die Nukleotide p53-K und p53+K, die als Kontrollen für die p53-Gel-Retardations-Experimente von der Fa. Santa Cruz bezogen wurden. Aufgeführt sind ausschließlich einzelsträngige Oligonukleotide von 5'- nach 3'-Richtung. Nukleotide, die von der Wildtypsequenz abweichen, sind fett dargestellt.

Name	Nukleotidsequenz in 5'→3'-Richtung	Position im HPV8 Genom
YY1-0mt	TAGTGCCAGAATAGAT TCT TGTTTCGTTCAAACATGC	7439-7573
YY1-1mt	CGTTTTTCGATCACACCA GGCG ATATATTAAT	102-133
YY1-2mt	AATTTTCCTAAGCAA GACA ACGGGCAGGACAAGG	181-214
YY1-3mt	GACGACAAGGCTTCA GGCG TAGACACTAATAAGG	205-238
P1mt	CGGAAAAATTAGATTGTA ACG TTTTTCGGTACAAAACC	7384-7420
P3mt	GGCATCTCCAACGGAT TT GTTAACGGTAAGTTTC	7635-13
P4mt	CAGTGTACCAGGTGCA AA TATGAAAATTTTC	16-44
YY1-0	GCCAGAATAGACCATGTTCGTTCAAACATGCTCGGATTA	7443-7581
YY1-1	CGTTTTTCGATCACACCATATTGTA	102-125
YY1-2	CCTAAGCAAATGGACGGGCAGGAC	187-210
YY1-3	GGACAAGGCTTCATATTTAGACAC	207-230
M29	CTATAGCATGTTTTTGCCTGTATCGTTTTTCGATCACACCATATTGTA	79-125

HPV8-1	ACCTACCCCTGATACTCC	7116-7133
HPV8-5	CACAGTATTCAAGGAATG	7432-7449
HPV8-7	GAAACCGACCGCACCCGG	7484-7501
HPV8-6	GAGCAAACCTGTGCTAGGC	460-479
HPV8-4	GCAAACCTGTGCTAGGCAG	462-481
HPV8-PE	GCAGCTAACTCTTTAATAGTAGAGGGTAGC	272-243
p53-K	TACAGAATCGCTCTAAGTCGCCTGGGG	
p53+K	TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGG	

3.9.2. Plasmide

3.9.2.1. Vektoren

pGEX2T:

Gluthathion-S-Transferase (GST)-Genfusionsvektor zur Expression fusionierter Proteine in *E.coli* (Amersham Pharmacia).

pXJ41, pXJ42:

Diese Expressionsvektoren enthalten den eukaryonten CMV und den prokaryonten T7 Promotor. Sie unterscheiden sich lediglich in der Orientierung ihrer multiplen Klonierungsstellen (Xiao *et al.*, 1991).

RSV- β Gal:

Ein eukaryonter Expressionsvektor mit dem bakteriellen LacZ Gen als Reporter unter der Kontrolle des RSV Enhancer Promotors (B. Bourachot, Paris).

pCMV- β Gal:

Ein eukaryonter Expressionsvektor für das LacZ Gen in dem Vektor pCB6 unter der Kontrolle des CMV Promotors.

pET14b:

Dieses Plasmid erlaubt unter der Kontrolle des T7 Promotors sowohl die *in vitro* Translation als auch die Expression von Proteinen in geeigneten *E.coli*-Stämmen, die N-terminal mit sechs Histidinresten versehen werden (Novagen).

pALuc:

Ein Promotor-Testplasmid mit dem Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis*. Das Vektor-Rückgrat aus pBLCAT6 wurde mit dem Luciferase/SV40 t-Intron und der SV40 Polyadenylierungs-Kassette aus p19Luc kombiniert (Dong *et al.*, 1994b).

pCB6:

Ein Plasmid, das die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des immediate-early CMV Promotors erlaubt und Terminationssignale des humanen Wachstumshormogens enthält (Stinsky, unveröffentlicht).

3.9.2.2. Konstrukte

pNCR8CAT:

Ein von pBLCAT3 (Luckow und Schütz, 1987) abgeleitetes Plasmid, welches das 1133 bp *EcoRI/EcoRV*-Fragment von HPV8 (Nukleotid 7078-550) mit der gesamten HPV8 NCR und Teilen der flankierenden L1 und E6 Gene umfasst (Stubenrauch *et al.* 1992).

p01234CAT:

In dem Vektor P012 (Stubenrauch & Pfister, 1994), welcher von pNCR8CAT abgeleitet ist und Mutationen in den E2-Bindestellen P0, P1 und P2 aufweist, wurde das *Eco47III/XhoI*-Fragment durch das entsprechende Fragment aus dem Plasmid P34 (Stubenrauch & Pfister, 1994) ersetzt, welches ebenfalls von pNCR8CAT abgeleitet ist und Mutationen in den E2-Bindestellen P3 und P4 aufweist (Akgül, 1999).

pLO8YY1mt:

In dem Plasmid pLO8, welches die HPV8-Sequenz von 7626 bis 188 in dem Vektor pUC8 enthält (Karle, 1995), wurde durch ortsspezifische Mutagenese mit dem Primer YY1-1mt die YY1-Bindestelle 1 mutiert.

pLO8P34mt:

In dem Plasmid pLO8, welches die HPV8-Sequenz von 7626 bis 188 in dem Vektor pUC8 enthält (Karle, 1995), wurden durch ortsspezifische Mutagenese mit den Primern P3mt und P4mt die E2-Bindestellen P3 und P4 mutiert.

pLO3:

Ein Plasmid, welches die HPV8-Sequenz von Position 13 bis 118 in dem Vektor pUC8 enthält (Karle, 1995).

pNCR8Luc:

Die HPV8 NCR und Teile der flankierenden L1- und E6-Leserahmen wurden als *HindIII/BglII*-Fragment aus dem Plasmid pNCR8CAT in die *HindIII/BamHI*-Schnittstellen des Plasmids pALuc kloniert (Lemme, 1998).

pNCR8YY1Luc, pNCR8Y01Luc, pNCR8Y23Luc:

In dem Konstrukt pNCR8Luc wurden durch ortsspezifische Mutagenese mit den Primern YY1-0mt, YY1-1mt, YY1-2mt und YY1-3mt alle YY1-Bindestellen (pNCR8YY1Luc), die YY1-Bindestellen 0 und 1 (pNCR8Y01Luc) bzw. die YY1-Bindestellen 2 und 3 (pNCR8Y23Luc) mutiert.

p01234Luc:

Die HPV8 NCR mit mutierten E2-Bindestellen P0-P4 und Teile der flankierenden L1- und E6-Leserahmen wurden als *HindIII/BglII*-Fragment aus dem Plasmid p01234CAT in die *HindIII/BamHI*-Schnittstellen des Plasmids pALuc kloniert.

pHIS-YY1:

Zur Konstruktion dieses prokaryonten HIS-YY1-Expressionsvektors wurde die cDNA des Transkriptionsfaktors YY1 in das Plasmid pDS56-6xHIS (Abate *et al.*, 1990) kloniert. Dadurch weist das exprimierte YY1-Protein 6 zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus auf (Shi *et al.*, 1991).

pXJYY1:

Dieses Plasmid enthält das humane YY1 Gen unter Kontrolle des eukaryonten CMV und des prokaryonten T7 Promotors in dem Vektor pXJ42 (Pajunk, 1999).

pXJYY1ΔC:

In dem Plasmid pXJYY1 wurde die C-terminale DNA-Bindedomäne deletiert (Pajunk, 1999).

GST-YY1, GST-YY1¹⁻²⁶⁰, GST-YY1¹⁻¹⁴², GST-YY1²⁶¹⁻⁴¹⁴, GST-YY1²⁶⁰⁻³³¹, GST-YY1²⁶⁰⁻²⁹⁸, GST-YY1²⁹⁸⁻³³¹, GST-YY1³³¹⁻⁴¹⁴, GST-YY1¹⁴²⁻²⁶², GST-YY1²⁰⁰⁻²⁶².

Die Wildtyp-Sequenz und die Deletionsmutanten von YY1 wurden in den pGEX2T Vektor kloniert, was die Expression von GST-YY1-Fusionsproteinen in *E. coli* erlaubt. Die Konstrukte 142-262 sowie 200-262 wurden von H. Pajunk und alle anderen von T. Shenk Princeton University, USA, freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Lewis *et al.*, 1995; Pajunk, 1999).

GST-8E2, GST-8E2N, GST-8E2H, GST-8E2C, GST-8E2H3', GST-8E2H5', GST-8E2ΔC:

Die HPV8 E2 Wildtyp-Sequenz sowie die entsprechenden Deletionsmutanten wurden in pGEX2T kloniert, was die Expression von GST-YY1-Fusionsproteinen in *E. coli* erlaubt. GST-8E2 Wildtyp sowie die Mutante ΔC wurden von M. May (Enzenauer *et al.*, 1998) und alle anderen Konstrukte von G. Steger (Schmidt, 1999) zur Verfügung gestellt.

GST-8E7, GST-8E6, GST-8E1:

Diese Plasmide enthalten das E7, E6 oder E1 Gen von HPV8 in dem Plasmid pGEX2T zur Expression von GST-Fusionsproteinen (Enzenauer *et al.*, 1998).

pXJE2:

Ein von pXJ42 abgeleiteter Expressionsvektor, welcher das HPV8 E2-Protein unter Kontrolle des eukaryonten CMV und des prokaryonten T7 Promotors enthält (G. Steger, persönliche Mitteilung).

pXJ8E2ΔHC, pXJ8E2ΔHN:

Aus den Plasmiden pCB68E2ΔH3' und pCB68E2ΔH5' (Schmidt, 1999) wurde jeweils das *KpnI/BamHI*-Fragment in den Vektor pXJ42 kloniert, was die Expression dieser E2-Deletionsmutanten in eukaryonten Zellen sowie in *E. coli* erlaubt.

pET8E2, pET8E2C, pET8E2H, pET8E2N:

Die Wildtyp-Sequenz sowie die Deletionsmutanten von HPV8 E2 wurden unter Kontrolle des prokaryonten T7 Promotors in den Vektor pET14b kloniert. Das Wildtyp-Konstrukt wurde von M. May (Enzenauer *et al.*, 1998) zur Verfügung gestellt, die verschiedenen Mutanten von G. Steger (Schmidt, 1999).

pCE2:

Ein eukaryonter Expressionsvektor, der den HPV8 E2-Leserahmen als *BclI/BgIII*-Fragment (HPV8 Position 2686-4222) in der *BgIII*-Schnittstelle des Plasmids pCB6 aufweist (Stubenrauch & Pfister, 1994).

pCE1:

Ein auf pCB6 basierender eukaryonter Expressionsvektor, der den HPV8 E1-Leserahmen als *BamHI/PvuII*-Fragment aus dem Vektor pI8E1 (Iftner *et al.*, 1988) in der *BgIII*-Schnittstelle inseriert hat.

pCDNA8E7:

Dieses Plasmid enthält den E7-Leserahmen von HPV8 in dem Vektor pCDNA3.1 (+) (Invitrogen) und erlaubt die Expression von HPV8 E7 in eukaryonten Zellen. Es wurde von S. Smola zur Verfügung gestellt.

pCMVp53:

Dieses Plasmid enthält das p53 Gen unter Kontrolle des CMV Promotors und erlaubt die Expression von p53 in eukaryonten Zellen (Hoppe-Seyler & Butz, 1993).

pCMVp53R248W:

Dieses Plasmid enthält das p53 Gen mit einer Mutation am Codon 248 (R→W) unter Kontrolle des CMV Promotors und erlaubt die Expression von p53 in eukaryonten Zellen (Hoppe-Seyler & Butz, 1993).

RcCMVp53R273C:

Das p53 Gen mit einer Mutation am Codon 273 (R→C) unter Kontrolle des eukaryonten CMV und des prokaryonten T7 Promotors in dem Vektor Rc/CMV (Invitrogen) wurde freundlicherweise von M. Scheffner, Universität Köln, zur Verfügung gestellt.

pXJp53R248W:

Das p53 Gen mit der Mutation R248W wurde mit *Bam*HI aus dem Plasmid pCMVp53R248W ausgeschnitten und in den Vektor pXJ41 kloniert, was die Expression in eukaryonten Zellen sowie die *in vitro* Translation unter Kontrolle des T7 Promotors erlaubt.

pGEX2Tp53:

Dieser Vektor enthält das p53 Gen in dem Plasmid pGEX2T und erlaubt die Expression eines GST-p53-Fusionsproteins in *E.coli* (Zimmermann *et al.*, 1999).

pSP65p53:

Das p53 Gen in dem Plasmid pSP65 (Promega, USA) erlaubt die *in vitro* Translation von p53 durch die SP6-Polymerase (Zimmermann *et al.*, 1999).

pQE31p53:

Dieser prokaryonte HIS-p53-Expressionsvektor enthält das p53 Gen in dem Vektor pQE31 (QIAGEN), wodurch das in *E. coli* exprimierte p53-Protein 6 zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus aufweist, und wurde freundlicherweise von H. Zimmermann, Bayer AG, zur Verfügung gestellt.

3.9.3. Längenstandards

Zur Bestimmung von Größe und Menge verwendeter DNA oder Proteinen wurden folgende Standards verwendet:

1 kb-DNA-Leiter	(Gibco/BRL, Eggenstein)
λ -DNA/ <i>Hind</i> III-Marker	(Gibco/BRL, Eggenstein)
Prestained SDS-PAGE standards, low range	(BIO-RAD, München)
Prestained precision protein standards, broad range	(BIO-RAD, München)
SDS-PAGE molecular weight standards, low range	(BIO-RAD, München)

4. METHODEN

4.1. Zellkultur

4.1.1. Langzeitlagerung von Zellen

Die Zellen wurden aus einer konfluenten 175 cm² Kulturflasche mit Trypsin abgelöst und 5 min bei Raumtemperatur (RT) und 1200 UpM zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FKS mit 10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und die Zellsuspension in Einfrierröhrchen überführt. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei –80°C.

Die zu reaktivierenden Zellen wurden nach schnellem Auftauen bei 37°C, Überführen in Kulturmedium, Zentrifugation (5 min, RT, 1200 UpM) und anschließendem Resuspendieren in entsprechendem Medium in einer 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Mediumwechsel.

4.1.2. Transfektion eukaryonter Zellen

4.1.2.1. Calcium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode

C33A Zellen ($6-8 \times 10^5$) wurden mit der Calcium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode in 6 cm Kulturschalen transient transfiziert. Ca. 24 h nach der Zellaussaat wurde das alte Medium durch 2 ml frisches ersetzt und für weitere 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit folgendem Reaktionsansatz:

3-5 µg DNA, aufgefüllt mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 153 µl
175 µl 2 x HBS (280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄ x 12 H₂O;
50 mM HEPES; pH 7,05)

Nach Zugabe von 22,5 µl 2 M CaCl₂ wurden die Proben 10 Sekunden intensiv gemischt, 17 min bei RT inkubiert und das Calciumphosphat/DNA-Präzipitat tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit 4 ml PBS (170 mM NaCl; 3,35 mM KCl; 4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 1,84 mM KH₂PO₄; pH 7,2) gewaschen und in 4 ml frischem Medium weitere 24 h inkubiert.

4.1.2.2. Transfektion mit LIPOFECTAMINE™-Reagenz

Die Transfektion von $2,5 \times 10^5$ H1299 Zellen, die am Tag zuvor in 6 cm Kulturschalen ausgesät worden waren, erfolgte mit LIPOFECTAMINE™-Reagenz nach Protokoll der Fa. Gibco/BRL. Für diese Zelllinie wurde das Transfektionsoptimum bei einem Verhältnis von DNA:LIPOFECTAMINE™ 1:2 ermittelt. Für die Transfektion wurden folgende Reaktionsansätze vorbereitet:

Röhrchen 1: 3-5 µg DNA in 300 µl serumfreien Medium

Röhrchen 2: 6-10 µl LIPOFECTAMINE™-Reagenz in 300 µl serumfreien Medium

Der Inhalt aus Röhrchen 1 wurde langsam in Röhrchen 2 getropft, beide Lösungen intensiv gemischt und anschließend bei RT 15-30 min inkubiert. Die Zellen wurden in der Zwischenzeit mit PBS gewaschen, und nach Zugabe von 2,5 ml serumfreien Medium wurden die DNA-LIPOFECTAMINE™-Ansätze tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4-6 h Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 4 ml frischem serumhaltigen Medium für weitere 42 h bei 37°C inkubiert.

4.1.2.3. Transfektion mit FuGene™

Die Transfektion von 4×10^5 RTS3b Zellen für den transienten Replikationstest erfolgte mit Hilfe des FuGene™-Reagenz von der Fa. Boehringer Mannheim in 10 cm Kulturschalen.

Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium von den Kulturschalen abgezogen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 20 ml frischem Medium überschichtet. 20 µl FuGene™-Reagenz wurden auf 800 µl mit serumfreiem Medium aufgefüllt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die zu transfizierende DNA gegeben. Das Gemisch wurde 15 min bei RT inkubiert und dann auf die Zellen gegeben.

4.1.3. Transienter Replikationstest

Der in dieser Arbeit angewandte Replikationstest wurde als Modifikation der Methode von Ustav & Stenlund (1991) etabliert.

Bei der Zellernte 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 2 ml PBS abgeschabt und 1 min bei 6000 UpM pelletiert. Zur Extraktion der episomalen DNA wurde das Zellpellet in 200 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris;

10 mM EDTA, pH 6) aufgenommen und die Zellen mit 400 µl frisch angesetztem Lysispuffer I (0,2 M NaOH; 1 % SDS) 3 min bei RT lysiert. Das Zellysate wurde in 300 µl Neutralisationspuffer (3M KAc, pH 4,8) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Um die Zellfragmente abzutrennen, wurde der Rohextrakt für 5 min bei 14000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 540 µl Isopropanol versetzt und anschließend nochmal für 15 min bei 14000 UpM zentrifugiert. Zur Entfernung der Proteinverunreinigungen wurde das Pellet in 200 µl Proteinase-K-haltigem Lysispuffer II (100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 µg/ml Proteinase K; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Hiernach folgte eine Phenolextraktion und Ethanol-fällung. Das Pellet wurde in 20 µl einer RNaseA-Lösung (0,0625 mg/ml in 10 mM Tris) aufgenommen und auf zwei gleiche Ansätze aufgeteilt. Während die Testplasmid-DNA in einem Ansatz mit einer nur einmal schneidenden Restriktionsendonuklease linearisiert wurde, wurde sie im anderen Ansatz zusätzlich mit einem Überschuss an *DpnI* gespalten. Dieses Enzym verdaut DNA, die am Adenosin im Motiv 5'-GATC-3' methyliert ist. Da die transfizierte DNA aus *dam*⁺-Bakterien isoliert wurde und entsprechend methyliert ist, wird sie in einer *DpnI*-Spaltung in kurze Fragmente gespalten und kann nach der elektrophoretischen Auftrennung leicht von der neu replizierten, nicht-methylierten DNA, die von *DpnI* nicht gespalten wird, unterschieden werden. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die DNA-Fragmente in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte dann mittels Southern Blot und Hybridisierung mit einer vektorspezifischen Sonde (vgl. 4.2.6.).

4.1.4. β-Galaktosidase- und Luciferase-Assay

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann 3 min bei RT in einer Tischzentrifuge pelletiert und das Pellet in 100 µl Extraktionspuffer (100 mM KPO₄, pH 7,8; 1 mM DTT) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in vier Zyklen aus je 2 min Trockeneis/Ethanol-Bad und 37°C-Wasserbad aufgebrochen, 5 min bei 4°C und 14000 UpM zentrifugiert und der Überstand mit den löslichen Proteinen in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt.

4.1.4.1. Luciferase-Assay

Der Luciferase-Test erfolgte im Luminometer der Fa. Berthold. 15-40 µl Zellextrakt und 100 µl Assay-Puffer (100 mM KPO₄, pH 7,8; 15 mM MgSO₄; 50 mM ATP) wurden in Röhren gegeben und in den Lumat gestellt. 300 µl Assay-Puffer, 1:100 mit D-Luciferin (Applichem) versetzt, wurden dann in die Maschine initiiert und die Aktivität des Luciferasegens (RLU) gemessen.

4.1.4.2. β-Galaktosidase-Assay

Der β-Galaktosidase-Assay wurde mit 40 µl Zellextrakt, 135 µl 0,1 M Na₂HPO₄ (pH 7,5), 1,5 µl 100 x Mg (0,1 M MgCl₂; 4,5 M β-Mercaptoethanol) und 33 µl ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-thiogalactosid; 4 mg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄, pH 7,5) durchgeführt. Die Proben wurden bei 37°C bis zur Gelbfärbung inkubiert (10 min bis zu 3 h). Nach Abstoppen der Reaktion mit 450 µl 1 M Na₂CO₃ wurde in Plastikkuvetten bei 420 nm die optische Dichte gemessen.

4.1.5. Gewinnung von Kernextrakten aus eukaryonten Zelllinien

Die Zellen wurden in 10 cm² Schalen kultiviert, bis sie eine 90 %ige Konfluenz erreichten. Sie wurden dann zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit 10 ml PBS überschichtet, mit einem Zellschaber von der Wand gelöst und in ein Röhren auf Eis überführt. Die Zellen wurden bei 1200 UpM und 4°C 5 min pelletiert, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 Sekunden abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 400 µl kaltem Puffer A (10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl einer 10 %igen NP40-Lösung wurde der Ansatz 10 Sekunden intensiv durchmischt. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert, vom Überstand, dem Cytoplasma und RNA enthielt, getrennt, in 50 µl kaltem Puffer B (20 mM HEPES, pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) resuspendiert und 15 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Der Extrakt wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 14000 UpM für 15 min von Kerntrümmern befreit und bei -80°C eingefroren (Schreiber *et al.* 1989).

4.2. DNA-Methoden

4.2.1. DNA-Präparationen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit fertigen Reagenzien der Fa. QIAGEN bzw. Sigma nach Protokollen der Hersteller durchgeführt.

4.2.2. Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis *et al.* (1989) durchgeführt:

- Ethanol-Präzipitation von DNA
- Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA
- DNA-Quantifizierung durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung von 5'-überhängenden Enden mit Klenow-Enzym
- Phosphorylierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

4.2.3. Sequenzierung

Jeweils 3-10 pmol Primer und ca. 200 ng Plasmid-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 6 µl auf einem ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems, Perkin Elmer) im Servicelabor des ZMMK sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Edit View Vers. 1.0.2 (Perkin Elmer).

4.2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der PCR-Methode können DNA-Genfragmente amplifiziert werden (Mullis & Fallona, 1984). Dafür werden zwei spezifische DNA-Primer benötigt, die die gewünschte Sequenz flankieren. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Pfu-Polymerase oder der Taq-Polymerase. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt:

0,1 pmol DNA-Template
 10 µl 10 x PCR-Puffer
 100 pmol Primer
 200 nM dNTPs
 2 U Polymerase

Die Amplifikationsreaktion wurde nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 2 min unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95°C 1 min
 55°C 1 min (Primer Hybridisierung)
 72°C 2 min (Elongation)
 72°C 5 min
 30 Zyklen

Je nach Einsatz der verschiedenen Polymerasen und unterschiedlicher Primer-Paare konnte dieses Grundprotokoll bezüglich Hybridisierungstemperatur und Hybridisierungsdauer, Elongationszeit, Magnesiumkonzentration und Zyklenzahl angepasst werden.

4.2.5. Ortsspezifische Mutagenese

Um einzelne Nukleotid-Austausche gezielt in ein Gen einzuführen, wurde das „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Fa. Stratagene nach beiliegendem Protokoll verwendet. Hierfür sind zwei Oligonukleotid-Primer erforderlich, die dieselbe Punktmutation besitzen und an je einen der komplementären Stränge des Plasmids binden, welches das zu verändernde Gen trägt. Die Primer sollten die Mutation auf jeder Seite um 10-15 Nukleotide überlappen und ihre Schmelztemperatur sollte über 78°C liegen. Für die Mutagenese-Reaktion wurden 20-50 ng Plasmid und 125 ng Primer eingesetzt.

4.2.6. Southern-Blot

4.2.6.1. Transfer der DNA

Um die DNA zu depurinieren wurde das zu blottende Agarosegel zunächst in 0,25 M HCl gelegt, daraufhin kurz mit Wasser gespült und zur Denaturierung der DNA in 0,4 M NaOH geschwenkt. Zum Transfer („Blotten“) der DNA auf die Nylonmembran (Amersham Pharmacia) wurde das Gel auf die Membran gelegt, unter der sich mehrere Schichten trockenes Saugpapier befanden. Über das Gel wurden einige Lagen mit 0,4 M NaOH getränktes 3 MM Whatman-Papier gelegt, die von einem langen Bogen Whatman-Papier bedeckt waren, welches in ein Pufferreservoir eintauchte. Dies sorgte für einen ständigen Flüssigkeitsstrom, der durch das Saugpapier aufrecht erhalten wurde.

4.2.6.2. Markierung der DNA

Der Nachweis der gesuchten DNA erfolgte über eine komplementäre Sonde, die mit dem nichtradioaktiven Digoxigenin markiert wurde. Die Markierung wurde nach der „Random Priming“ Methode mit dem Reagenssystem „*DIG High Prime DNA Labeling and Detection Kit II*“ (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

1 µg der zu markierenden DNA wurde mit Wasser auf ein Endvolumen von 16 µl aufgefüllt. Die DNA wurde denaturiert, indem sie 10 min in kochendem Wasser inkubiert und anschließend in einem Eis/Ethanol-Bad abgekühlt wurde. Es wurden 4 µl „*DIG High Prime*“ zugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl EDTA (0,2 M, pH 8) wurde die Reaktion abgestoppt.

4.2.6.3 Hybridisierung der Blot-Membran

Um alle freien DNA Bindestellen auf dem Filter abzusättigen, wurde zunächst prähybridisiert, damit bei der späteren Hybridisierung die DIG-markierte Sonde nicht unspezifisch an den Filter, sondern nur an die geblottete, denaturierte DNA binden konnte. Unter leichtem Schütteln wurde die Membran für eine Stunde in 20 ml/100 cm² „*DIG Easy Hyb*“ (Boehringer Mannheim) bei 68°C inkubiert.

Die DIG-markierte Sonde (20 ng/ml) wurde durch fünfminütiges Erhitzen und rasches Abkühlen in Eiswasser denaturiert und in vorgewärmtem „DIG Easy Hyb“ (2,5 ml/100 cm²) verdünnt. Die Prähybridisierungslösung wurde abgeschüttet und die Lösung mit der DIG-markierten Sonde zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C.

4.2.6.4. Waschen der Membran und Detektion

Um unspezifisch an die Membran gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran bei RT zweimal 10 min in Waschpuffer I (2 x SSC; 0,1 % SDS) und bei 68°C 20 min in Waschpuffer II (0,1 x SSC; 0,1 % SDS) gewaschen. Der Filter wurde 5 min in Waschpuffer III (0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % Tween; pH 7,5) gewaschen und anschließend eine Stunde in Blocklösung (100 ml/100 cm², Boehringer Mannheim) geschwenkt. Danach wurde die Antikörperlösung (1:10000 in Blockinglösung verdünnt) zugegeben (20 ml/100 cm²) und für 30 min bei RT inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde in zwei fünfzehnminütigen Waschschritten in Waschpuffer III entfernt. Nachdem die Membran in 20 ml/100 cm² Detektionspuffer (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5) für 5 min äquilibriert worden war, wurde sie mit CSPD-Substrat in Folie eingeschweißt und ca. 15 min bei 37°C inkubiert. Die Chemilumineszenzsignale konnten dann auf Röntgenfilmen festgehalten werden.

4.3. Bakterienkultur

4.3.1. Herstellung und Transformation kompetenter *E.coli* DH5 α Bakterien

Zur Herstellung von transformationskompetenten *E. coli* DH5 α Bakterien wurde das Protokoll von Chung *et al.* (1989) verwendet.

Um kompetente Bakterien zu transformieren, wurden diese auf Eis aufgetaut, 100 μ l davon mit der zu transformierenden DNA vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C wurde die Zellsuspension für weitere 5 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 900 μ l vorgewärmten LB-Medium (ohne Antibiotikum) für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Unterschiedliche Mengen dieser Ansätze wurden auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

4.3.2. Transformation der *E. coli* Stämme XL1- und XL2-Blue sowie BL21

Die Transformation der *E. coli* Stämme XL1- und XL2-Blue sowie BL21 erfolgte nach Protokoll der Fa. Stratagene.

4.4. Expression und Isolierung von Proteinen

4.4.1. Expression und Reinigung des HIS-YY1-Fusionsproteins

HIS-YY1 wurde als Fusionsprotein exprimiert, das an seinem N-terminalen Ende 6 zusätzliche Histidinreste enthält. Dies ermöglichte eine chromatographische Reinigung von HIS-YY1 über eine Nickel-Chelat-Matrix (QIAGEN).

Eine 5 ml LB Übernachtskultur mit 200 µg Ampicillin von *E. coli*, transformiert mit dem HIS-YY1 Plasmid (Shi *et al.* 1991), wurde 1:100 in ampicillinhaltiges (100 µg/ml) 2 x YT-Medium verdünnt und bei 30°C in einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 0,9 inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 2 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert und weitere 4-5 h inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation bei 4000 UpM, 10 min bei 4°C pelletiert. Nach Aufnahme des Pellets in 5 ml Puffer A (6 M Guanidinium-HCl; 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris; pH 8,0) wurden die Bakterien über Nacht unter Rühren bei 4°C lysiert und am nächsten Tag kurz sonifiziert (dreimal 50 W). Nach Entfernen der unlöslichen Zellbestandteile des Lysats durch Zentrifugation bei 12000 UpM für 15 min bei 0°C wurde eine leere Chromatographiesäule (BIO-RAD) mit 1 ml Nickel-Agarose (QIAGEN) beladen, zweimal mit 10 ml Wasser gewaschen und mit 10 ml Puffer A äquilibriert. Anschließend wurde das Lysat über die Säule gegeben und die Matrix mit je 5 ml Puffer A und Puffer B (6 M Guanidinium-HCl; 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris; pH 6,0) gewaschen. Das HIS-YY1-Fusionsprotein wurde schließlich mit 1,5 ml Puffer C (6 M Guanidinium-HCl; 100 mM Na₂HPO₄; 10 mM Tris; pH 5,0) eluiert. Zur Renaturierung des Fusionsproteins musste das Guanidinium-HCl durch schrittweise Dialyse entfernt werden. Zu diesem Zweck wurde das Eluat nacheinander für jeweils 1 h gegen Puffer D (3 M Guanidinium-HCl; 10 mM Tris; pH 8,0), Puffer E (1 M Guanidinium-HCl; 10 mM Tris; pH 8,0), Puffer F (0,1 M Guanidinium-HCl; 10 mM Tris, pH 8,0) und Puffer G (100 mM

KCl; 50 mM Tris, pH 8,0; 0,1 % NP40; 1 mM DTT; 10 % Glycerol; 1 mM MgCl₂; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM PMSF; 2,5 KIU/ml Aprotinin) dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat in einer Tischzentrifuge bei 4°C, 12000 UpM, 5 min von den unlöslichen Komponenten getrennt und der Überstand auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Qualität und Reinheit der Präparation wurde mit 12 %iger SDS-PAGE und durch Western Blot Analyse mit einem gegen YY1 gerichteten Antikörper überprüft (vgl. 4.5.1. und 4.5.3.).

4.4.2. Expression und Reinigung des HIS-p53-Fusionsproteins

Das p53-Protein wurde als HIS-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, welches an seinem N-terminalen Ende 6 zusätzliche Histidinreste enthält. Es wurde über eine Nickel-Chelat-Säule der Fa. Amersham Pharmacia aufgereinigt.

Eine 40 ml LB Übernachtskultur mit 200 µg Ampicillin von *E. coli*, transformiert mit dem HIS-p53 Plasmid pQE31p53, wurde 1:10 in ampicillinhaltiges (200 µg/ml) LB-Medium verdünnt und bei 37°C in einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und weitere 3 h inkubiert. Nachdem die Bakterienkultur bei 4000 UpM 15 min bei 4°C zentrifugiert worden war, wurde das Bakterienpellet in 10 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen (50 mM Tris-HCl, pH 8; 0,1 % Triton; 10 mM Imidazol; 1 mg/ml Lysozym; 1 mM PMSF; 1 x Protease Inhibitor Cocktail, EDTA frei (Boehringer Mannheim); in PBS), 10 min auf Eis inkubiert und zweimal kurz sonifiziert (je 50 W). Durch Zentrifugation bei 4°C und 15000 UpM für 30 min wurden die unlöslichen Zellbestandteile des Lysats entfernt. Währenddessen wurde eine leere His Trap™ Nickel-Chelat-Säule der Fa. Amersham Pharmacia mit 5 ml Wasser gewaschen, mit 0,5 ml 0,1 M NiSO₄ gefüllt, erneut mit 5 ml Wasser gespült und mit 10 ml 20 mM Start-Puffer äquilibriert (4 M NaCl; 80 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 80 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; pH 7,4; 20 mM Imidazol). Nachdem der Überstand mit dem löslichen Protein auf die Säule gegeben worden war, wurde diese erneut mit 10 ml Start-Puffer gewaschen. Das HIS-p53-Fusionsprotein wurde schließlich in jeweils 1,5 ml 150 mM sowie 300 mM Imidazolhaltigem Elutionspuffer eluiert (4 M NaCl; 80 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 80 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; pH 7,4; 150, bzw. 300 mM Imidazol) und in jeweils 500 µl Fraktionen aliquotiert, zu denen jeweils 20 % Glycerol zugegeben wurde. Ein Teil der Fraktionen wurde in einem SDS-Gel und durch Western Blot Analyse mit einem gegen p53 gerichteten Antikörper überprüft (vgl. 4.5.1. und 4.5.3.).

4.4.3. Expression und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Alle GST-Expressionsplasmide wurden zuerst in den *E. coli* BL21CodonPlus Bakterienstamm eingebracht. Eine Übernachtskultur in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB/Amp) wurde 1:100 in LB/Amp verdünnt und weitere 3 bis 4 h bei 37°C inkubiert bis die OD₆₀₀ 0,8 betrug. Zwei Stunden vor der Lyse wurde die Kultur mit 1 mM IPTG behandelt, um die Proteinexpression zu induzieren. Die Bakterienkultur wurde 5 min bei 4°C und 4000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen, der Bakterienniederschlag im kalten Puffer PA-K500 (50 mM Tris, pH 8,0; 0,1 % NP40; 1 mM DTT; 10 % Glycerol; 500 mM KCl) aufgenommen und mit Ultraschall (viermal 50 W) aufgebrochen. Die Trennung der Proteine von den Zelltrümmern erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 12000 UpM. Die Proteinextrakte wurden dann in ein frisches Röhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ein Aliquot des erhaltenen Zellextraktes wurde mit 100 µl Glutathion-S-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) 1 h bei 4°C inkubiert, nachdem diese zuvor je einmal mit H₂O und PA-K500 gewaschen worden war. Danach wurde die Sepharose-Matrix viermal mit 1 ml Puffer PA-K1000 (mit 1 M KCl) und dann zweimal mit 1 ml Puffer PA-K100 (mit 100 mM KCl) gewaschen. Die Überprüfung der GST-Proteinexpression und Bestimmung der Konzentration erfolgte über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (vgl. 4.5.1.).

4.5. Nachweis der Proteine

4.5.1. Denaturierende diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die Gelelektrophorese wurde in einer Minigelkammer der Fa. BIO-RAD nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Proteine wurde für das Trenngel die Konzentration der Acrylamid/Bisacrylamidlösung (19:1) (Rotiphorese Gel 30; Fa. ROTH) entsprechend variiert. Die Trenngellösung (z.B. 12 %ige Acrylamid/Bisacrylamidlösung (19:1); 1,5 M Tris/HCl, pH 8,6; 0,4 % SDS; 3 % Glycerol; 0,05 % APS; 0,005 % TEMED) wurde unmittelbar nach Zugabe des Polymerisationsstarters und des Katalysators zwischen zwei Glasplatten in Abstand von 1 mm gegossen und nach Polymerisation mit dem Sammelgel (3,5 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1); 0,5 M Tris/HCl,

pH 6,8; 0,4 % SDS; 0,1 % APS; 0,01 % TEMED) überschichtet. Ein Aliquot der zu untersuchenden Proteinlösung wurde im Volumenverhältnis 5:1 mit SDS-Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 3 mM EDTA; 20 % Glycerol; 9 % SDS; 0,05 % Bromphenolblau; 2 % β -Mercaptoethanol) verdünnt, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte im SDS-PAGE Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS) bei 30 mA für etwa 1 h.

Die Abschätzung der Molekulargewichte der Proben erfolgte mit dem Protein-Molekulargewichtsstandard der Fa. BIO-RAD, der zusammen mit den Proben auf das Gel aufgetragen wurde.

Zum Nachweis der Proteinbanden wurde das Gel in einer „Coomassie-Super-Stain“-Lösung (50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,15 % Coomassie Brilliant Blau R) für 10 bis 30 min unter leichtem Schütteln bei RT gefärbt und danach solange in der „Entfärber-Lösung“ (30 % Methanol; 10 % Essigsäure) inkubiert, bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht war. Zum Trocknen wurde das Gel auf zwei Lagen 3 MM Whatman-Papier gelegt, mit Klarsichtfolie bedeckt und 1 h bei 80°C auf einen Gelrockner gelegt.

4.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Hierzu wurden 1-3 μ l des Proteinextraktes mit 1 ml einer 1:5 verdünnten BioRad Protein Assay-Reagenzlösung gemischt. Anschließend wurde die relative Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dann mit Hilfe einer BSA-Eichkurve bestimmt.

4.5.3. Nachweis von Proteinen durch Western Blot Analyse

Die Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer (s.o.) 5 min bei 95°C erhitzt und durch SDS-PAGE getrennt. Der Elektrotransfer der Proteine auf einen Nitrozellulosefilter (Amersham Pharmacia) erfolgte über Nacht bei 30 mA mit Hilfe einer „Tankblot-Apparatur“ der Firma BIO-RAD im Transfer-Puffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % Methanol). Um unspezifische Bindung der Antikörper an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde als „Blocking“-Lösung für YY1 2 %ige Magermilch und 1 % BSA bzw. 5 %ige Magermilch für p53 in TBST (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20) eingesetzt.

Die Nitrozellulosemembran wurde für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in der „Blocking“-Lösung inkubiert. Der erste Antikörper wurde 1:1000 (YY1) bzw. 1:5000 (p53) verdünnt und mit der Membran 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min, wurde die Membran mit einer Lösung des zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 bedeckt und 30-60 min bei RT leicht geschüttelt. Danach wurden die nicht gebundenen sekundären Antikörper durch drei 10 minütige Waschschrte mit TBST entfernt. Der Filter wurde für 1 min mit 1-2 ml ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia) überschichtet und mit Klarsichtsfolie bedeckt. Die Protein-Antikörper-Komplexe konnten danach aufgrund von Chemolumineszenz als Banden auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

4.6. *In vitro* Protein-Analyse

4.6.1. Gel-Retardations-Experimente

Mit Hilfe dieser Methode können Protein-DNA Interaktionen *in vitro* untersucht werden. Sie basiert darauf, dass die DNA, an die ein Protein gebunden ist, in einem nicht-denaturierenden PAA-Gel langsamer wandert als ihre nicht gebundene Form.

4.6.1.1. „Oligo“-Hybridisierung

Je 10 µg zweier komplementärer einzelsträngiger Oligonukleotide wurden mit Annealing-Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl) auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt, 15 min bei 75°C inkubiert und über einen Zeitraum von 2 bis 3 h auf RT abgekühlt.

4.6.1.2. Radioaktive Markierung der doppelsträngigen DNA-Probe

Für die Markierung von 5'-Enden einer DNA-Probe wurde folgender Reaktionsansatz im Gesamtvolumen von 10 µl erstellt:

- 20 ng ds-Oligonukleotid
- 1 µl [γ -³²P] dATP (10 mCi/ml)
- 1 µl 10 x Polynukleotidkinase-Puffer
- 1 µl Polynukleotidkinase (10 U/µl)

Der Reaktionsansatz wurde zuerst 1 h bei 37°C, dann 10 min bei 65°C zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert und anschließend langsam über einen Zeitraum von 2 bis 3 h auf RT abgekühlt.

Eine Markierung von 5'-überhängenden Enden wurde in 10 µl Gesamtvolumen folgendermaßen durchgeführt:

- 20 ng ds-Oligonukleotid
- 1 µl [α -³²P] dATP (10 mCi/ml)
- 1 µl 10 x Klenow-Puffer
- 1 µl Klenow-Enzym (2 U/µl)
- 0,8 µl dNTP Mix, ohne ATP, 25 mM

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert.

Die markierte DNA wurde 1:8 in TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) verdünnt und davon 1 µl für die Bindungsreaktion eingesetzt.

4.6.1.3. Bindungsreaktion und Gelelektrophorese

Die Bindung sowohl des YY1- als auch des p53-Proteins fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter folgenden Reaktionsbedingungen statt:

- | | |
|-------|-------------------|
| 10 mM | HEPES, pH 7,9 |
| 2 mM | MgCl ₂ |
| 4 mM | Spermidin |
| 5 % | Glycerin |
| 50 M | KCl |

5 µg/µl	BSA
0,25 M	DTT
250 pg	radioaktive Probe

Zunächst wurden alle Komponenten der Bindungsreaktion, außer der radioaktiv markierten Probe, zusammen mit einem der beiden Proteine für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten DNA-Probe erfolgte eine Inkubation bei RT für 15 min bevor das zweite Protein bzw. im Falle eines „Supershifts“ der Antikörper zugegeben wurde. Nach einer erneuten zehnmütigen Inkubation bei RT konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden.

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 5 %igen nicht-denaturierenden PAA-Gel [Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1); 0,25 x TBE (12,5 mM Tris/HCl pH 8,0; 12,5 mM Borsäure; 0,25 mM EDTA)] bei 180 V für 1 h bei 4°C in 1 x TBE (0,025 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,025 M Borsäure; 0,5 mM EDTA) als Laufpuffer. Das Gel wurde dann auf 3 MM Whatman-Papier überführt, getrocknet und autoradiographisch untersucht.

4.6.2. *In vitro* Protein-Transkription und Translation

Die Synthese von Proteinen erfolgte *in vitro* mittels „*TNT[®]T7 Coupled Reticulocyte Lysate System*“ (Promega).

Für die Markierung der Proteine wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

25 µl	TNT-Rabbit-Reticulocyten-Lysat
2 µl	TNT-Reaktionspuffer
1 µl	TNT T7- oder SP65-Polymerase
1 µl	TNT-Aminosäuren-Mix (ohne Methionin)
4 µl	L-[S ³⁵]-Methionin
1 µl	Rnasin Inhibitor (10 U/µl) (Promega)
1-1,5 µg	Plasmid-DNA

Der Reaktionsansatz wurde mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und 90 min bei 30°C inkubiert. 1-5 µl der Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, das fertige Gel fixiert (10 % Methanol; 10 % Essigsäure), in „Amplify™“-Lösung (Amersham Pharmacia) gelegt, getrocknet und die Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.6.3. GST-Interaktionsassay

Die Untersuchung der Protein-Protein Wechselwirkung erfolgte mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen, die entweder mit HIS-Fusionsproteinen, mit *in vitro* translatierten, L-[S³⁵]-Methionin markierten Proteinen oder mit Kernextrakten inkubiert wurden.

Die GST-Fusionsproteine wurden mit 100 µl Glutathion-S-Sepharose-Matrix (Amersham Pharmacia) im Gesamtvolumen von 1,5 ml im Puffer PA-K500 (vgl. 3.4.3.; mit 500 mM KCl) 1 h bei 4°C inkubiert, nachdem die Matrix zuvor mit H₂O und PA-K500 gewaschen worden war. Nach dem Entfernen der nicht gebundenen Proteine durch mehrmaliges Waschen je 5 min mit Puffer PA-K1000 (mit 1 M KCl) und Puffer PA-K100 (mit 100 mM KCl) und Zentrifugation 1 min bei 3000 UpM, wurden zu den GST-Proteinen das HIS-Fusionsprotein, Kernextrakte oder radioaktiv markierte Proteine zugegeben. Die Inkubation erfolgte dann weitere 2 h bei 4°C. Die an Glutathion-Sepharose-Matrix gebundenen Protein-Protein-Komplexe wurden dann dreimal mit Puffer PA-K250 bzw. PA-K500 (mit 250 mM oder 500 mM KCl) und zweimal mit Puffer PA-K100 oder nur viermal mit Puffer PA-K100 gewaschen und 1 min bei 3000 UpM zentrifugiert. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer zu den Proben und Denaturierung bei 95°C wurden die Proben auf einer SDS-PAGE getrennt (vgl. 4.5.1.).

Wenn die GST-Fusionsproteine mit *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert wurden, wurde das Gel nach der Gelelektrophorese 20 min fixiert (10 % Methanol; 10 % Essigsäure) und 15 min in „Amplify™“-Lösung (Amersham Pharmacia) bei RT inkubiert. Nach dem Trocknen wurden die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch nachgewiesen. Im Falle der Inkubation von GST-Fusionsproteinen mit HIS-Fusionsproteinen oder Kernextrakten wurden die Protein-Protein-Komplexe auf einem SDS-PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer und Nachweis der Proteine erfolgte wie unter 4.5.3. beschrieben.

4.7. Immunhistochemische Analyse von YY1 in Gewebeschnitten

Die immunhistochemische Färbung von YY1 in Paraffin eingebettetem gesundem Mammagewebe erfolgte mit Hilfe des *Vectastain Universal ABC Kit* der Fa. Camon. Die Schnitte wurden nach Angabe des Herstellers behandelt und mit dem 1:200 verdünnten monoklonalen gegen YY1 gerichteten Antikörper inkubiert. Als Substrat wurde DAB (Diaminobenzidin) und zur Gegenfärbung Hämatoxylin nach Harris verwendet.

5. ERGEBNISSE

5.1. Analyse der Interaktion zwischen YY1 und HPV8 E2

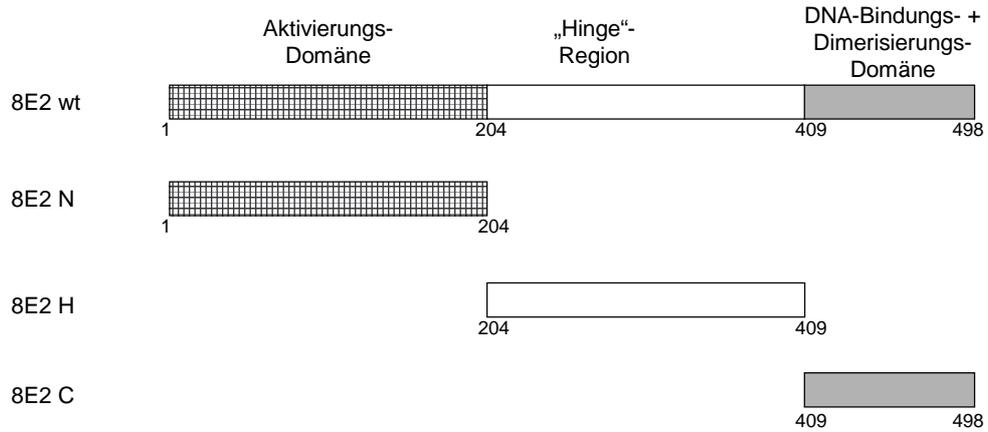
Bei der Kontrolle der Genexpression von Papillomviren wird dem zellulären YY1- und dem viralen E2-Protein eine wichtige Rolle zugeschrieben. Bereits in früheren Studien konnte ein stabiler YY1-E2 Komplex unabhängig von Virustyp, Wirts- und Gewebespezifität nachgewiesen werden (Pajunk, 1999). YY1 interagiert mit den E2-Proteinen der kutanen HPV Typen 5 und 8 und denen der genitalen HPV Typen 16 und 18 sowie des Rinderpapillomvirus Typ 1. Die HPV8 E2-Bindedomänen im YY1-Protein konnten in der zentralen Repressionsdomäne zwischen den Aminosäuren (AS) 142-200 sowie am C-terminalen Ende von AS 298-331 kartiert werden. Die Charakterisierung der YY1-Bindedomänen im HPV8 E2-Protein ergab eine Bindung von YY1 an den C-Terminus von E2, aber keine Bindung im N-terminalen Bereich. Die Untersuchung zur physiologischen Bedeutung von YY1 und E2 im Kontext der NCR des genitalen „hoch-onkogenen“ HPV18 zeigte, dass beide Proteine die Transkription der Onkogene E6/E7 synergistisch aktivieren.

Hier sollte überprüft werden, ob auch in der variablen „Hinge“-Region von HPV8 E2 eine YY1-Bindedomäne existiert. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Interaktion von YY1 und E2 einen Einfluss auf die Transkription des kutanen *Ev*-assoziierten HPV8 hat.

5.1.1. Kartierung der YY1-Bindedomäne(n) im HPV8 E2-Protein

Zur vollständigen Kartierung der YY1-Bindedomänen im E2-Protein wurde GST-fusioniertes YY1-Protein mit verschiedenen *in vitro* translatierten [³⁵S]-markierten HPV8 E2-Deletionsmutanten (Abb. 5A) inkubiert. Nach Entfernen der nicht oder unspezifisch an YY1 gebundenen Proteine durch mehrmaliges Waschen mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration (100 mM bzw. 250 mM KCl) wurden die Protein-Protein Komplexe durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

A)



B)

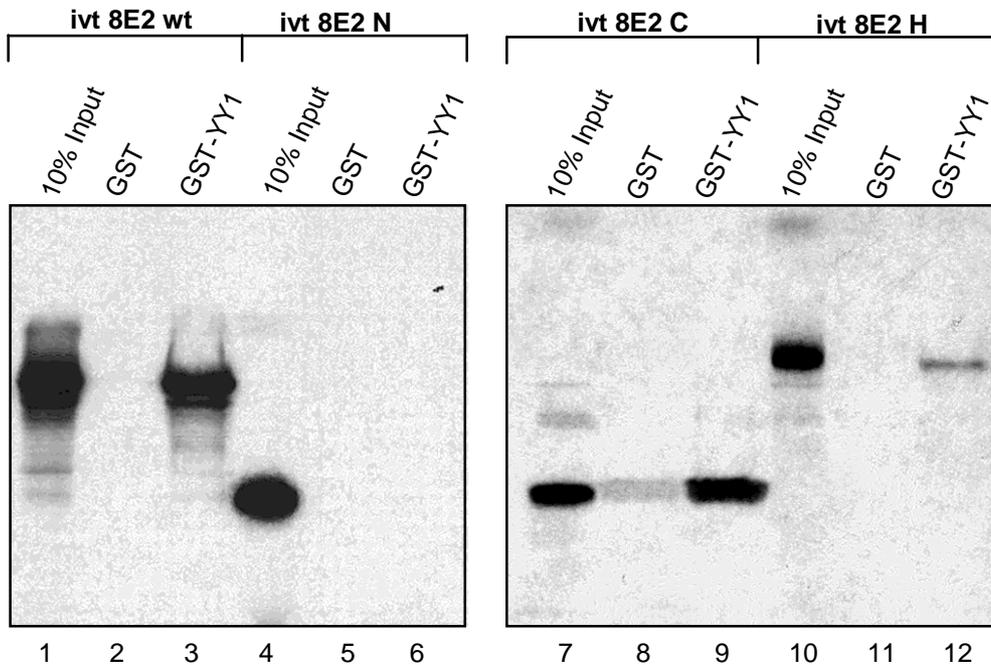
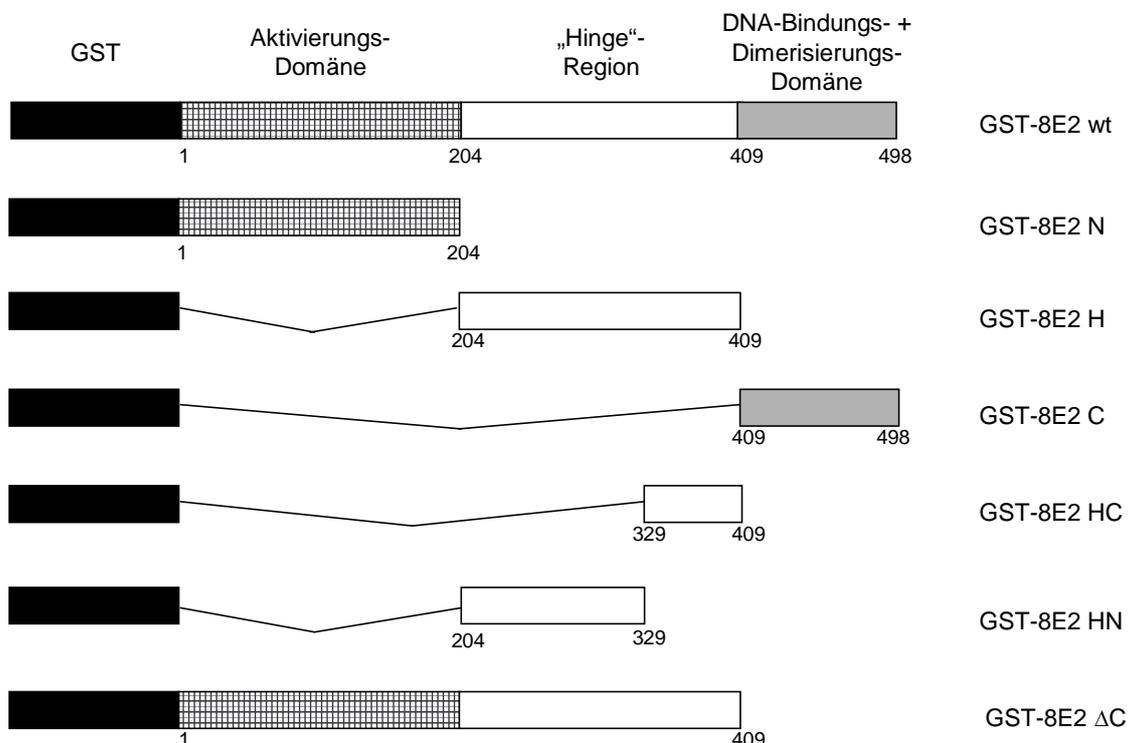


Abb. 5: **Interaktion von YY1 mit verschiedenen *in vitro* translatierten HPV8 E2-Mutanten**

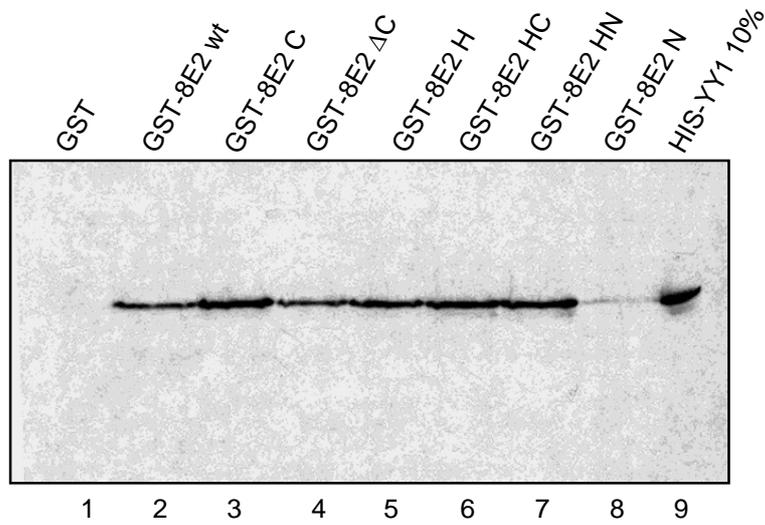
A) Darstellung der für die *in vitro* Translation (ivt) eingesetzten E2-Mutanten. Die funktionellen Domänen des E2-Proteins sind eingezeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuren im E2-Protein. **B)** *In vitro* Protein-Affinitätschromatographie der [³⁵S]-markierten, unter 1A dargestellten E2-Deletionsmutanten mit GST-YY1. Die YY1- und E2-Proteinkomplexe wurden mit 100 mM KCl gewaschen und auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und das E2-Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. 10 % der in den Experimenten verwendeten *in vitro* translatierten E2-Varianten wurden als Positiv-Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen.

Wie erwartet wurden sowohl das komplette E2-Protein (Abb. 5B, Spur 3) als auch der C-Terminus von HPV8 E2 (Spur 9) durch das an die Sepharose gebundene GST-YY1-Fusionsprotein zurückgehalten, nicht jedoch durch gebundenes GST alleine, das als Negativ-Kontrolle verwendet worden war (Spuren 2 und 8). Außerdem konnte, im Gegensatz zum N-Terminus (Spur 6), die „Hinge“-Region von HPV8 E2 mit YY1 interagieren (Spur 12). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich mindestens zwei unabhängige YY1-Bindemotive im HPV8 E2-Protein befinden, eines im C-terminalen Bereich und eines in der „Hinge“-Region. Das Ergebnis wurde durch Analyse der Bindung von rekombinantem HIS-YY1 an GST-fusionierte E2-Deletionsmutanten überprüft und bestätigt. Hierfür wurden verschiedene in Bakterien exprimierte GST-Fusionsproteine von HPV8 E2 (Abb. 6A) mit gereinigtem HIS-YY1 inkubiert und die Stabilität der Interaktion durch Waschen mit 100 bzw. 250 mM KCl überprüft. Die Protein-Protein Komplexe wurden in einem Western Blot mittels eines polyklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörpers nachgewiesen.

A)



B)



C)

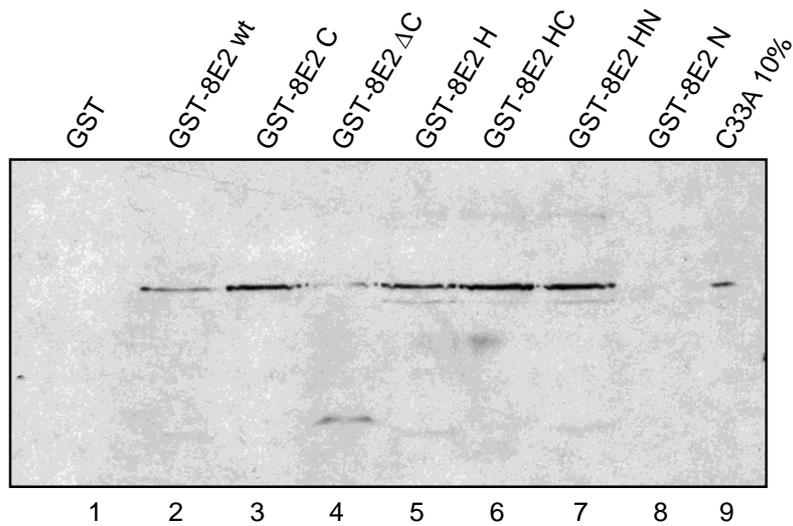


Abb. 6: **Interaktion von YY1 mit verschiedenen GST-fusionierten HPV8 E2-Mutanten**

A) Darstellung der GST-HPV8E2-Mutanten. Der GST-Anteil und die funktionellen Domänen von E2 sind eingezeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuren im E2-Protein. Die in A) dargestellten GST-E2-Fusionsproteine wurden **B)** mit rekombinantem HIS-YY1 bzw. **C)** mit C33A Kernextrakten inkubiert, die Proteinkomplexe mit 250 mM (B) bzw. 100 mM KCl (C) gewaschen und die Interaktion durch Western Blot Analyse mit einem polyklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörper untersucht. 10 % des in den Experimenten verwendeten HIS-YY1 bzw. C33A Kernextraktes wurden als Positiv-Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen.

Wie in Abbildung 6B zu erkennen ist, konnte auch in diesem Experiment das HIS-YY1-Fusionsprotein sowohl an den C-Terminus des GST-E2-Proteins binden (Spur 3) als auch an die „Hinge“-Region (Spur 5), was durch die Bindung von YY1 an das Konstrukt E2ΔC bestätigt wurde (Spur 4). Eine weitere Unterteilung der „Hinge“-Region in einen C- und N-terminalen Bereich ergab zudem, dass YY1 mit beiden interagieren konnte (Spuren 6 und 7). Demzufolge befinden sich YY1-Bindedomänen nicht nur im C-Terminus des HPV8 E2-Proteins sondern auch in mindestens zwei Bereichen der „Hinge“-Region. Um zu überprüfen, ob diese Domänen des E2-Proteins auch mit *in vivo* synthetisiertem YY1 interagieren, wurden die GST-E2-Deletionsmutanten mit Kernextrakten der Cervixkarzinom-Zelllinie C33A inkubiert, die endogen YY1 exprimiert (Pajunk, 1999). Wie man in Abb. 6C erkennen kann, konnten die mit HIS-YY1 erzielten Ergebnisse bestätigt werden, wenngleich bei Verwendung von Kernextrakten die Bindung an das Konstrukt GST-E2ΔC sehr schwach war (Spur 4). Es wäre denkbar, dass aus Konformationsgründen für eine effiziente Bindung von endogenem YY1 an die „Hinge“-Region von E2 auch dessen C-Terminus vorhanden sein muss. Dies scheint auch für *in vitro* translatiertes E2 zuzutreffen, da im Experiment mit GST-YY1 und *in vitro* translatierten E2-Deletionsmutanten die isolierte „Hinge“-Region, verglichen mit dem C-Terminus, relativ schwach an GST-YY1 band (Abb. 5B, Spur 12). Für gereinigtes HIS-YY1 scheint dies nicht der Fall zu sein, da eine deutliche Bindung an das Konstrukt GST-E2ΔC detektiert werden konnte (Abb. 6B, Spur 4).

Es konnte demnach in GST-Interaktionsstudien gezeigt werden, dass YY1 an mehrere Stellen im HPV8 E2-Protein bindet, und zwar an zwei Positionen innerhalb der „Hinge“-Region und an den C-Terminus, jedoch nicht an die N-terminale Aktivierungsdomäne.

5.1.2. Einfluss von YY1 und HPV8 E2 auf die Promotoraktivität von HPV8

Um eine mögliche funktionelle Bedeutung der Interaktion von YY1 mit dem HPV8 E2-Protein für die Promotoraktivität von HPV8 zu untersuchen, wurden transiente Transfektionsexperimente durchgeführt.

Hierfür wurde die HPV8 NCR stromaufwärts zum Luciferase-Gen in den Vektor pALuc kloniert (pNCR8Luc) und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Expressionsplasmiden für Wildtyp HPV8 E2 (pXJE2) und YY1 (pXJYY1) in C33A Zellen transient transfiziert.

Für die folgenden Transfektionsexperimente wurden jeweils 2 µg Reporterkonstrukt eingesetzt, und die endgültige Menge an Expressionsvektor mit CMV-Promotor wurde mit „leerem“ Expressionsvektor konstant gehalten. Die relative Luciferase-Aktivität wurde, sofern nicht anders erwähnt, nach 48 Stunden gemessen.

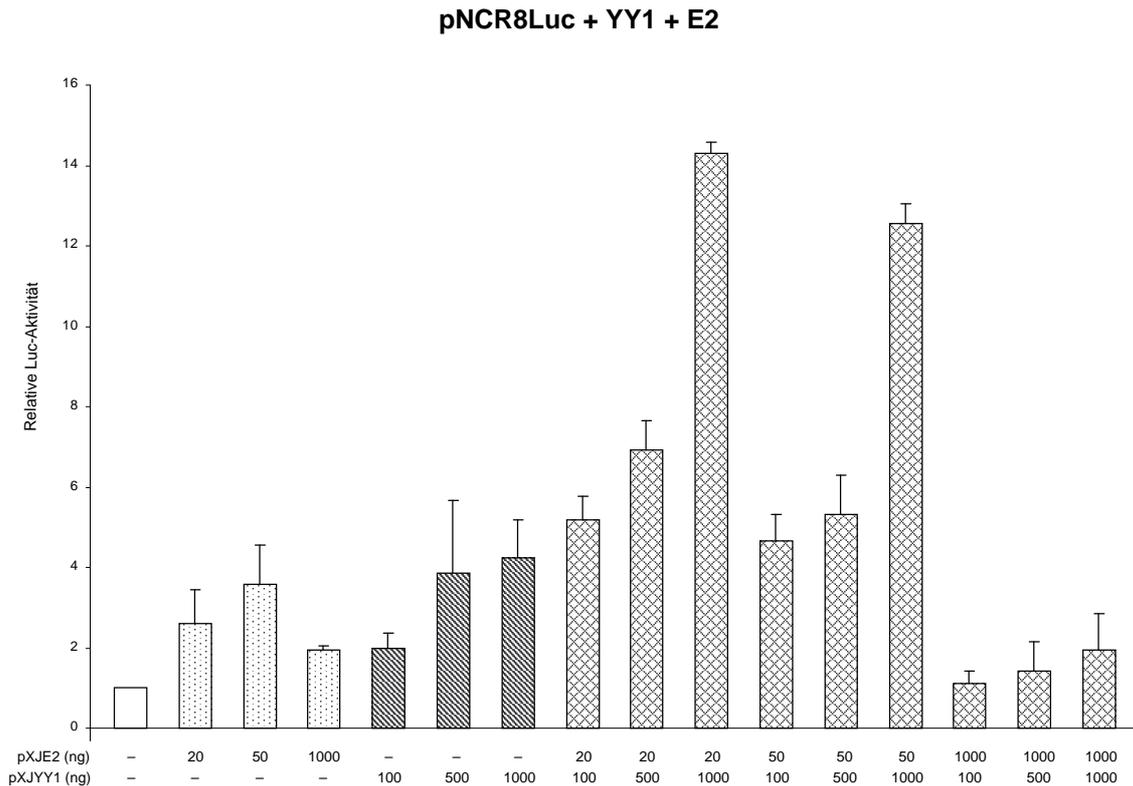


Abb. 7: Einfluss von YY1 und HPV8 E2 auf die Transkription von HPV8

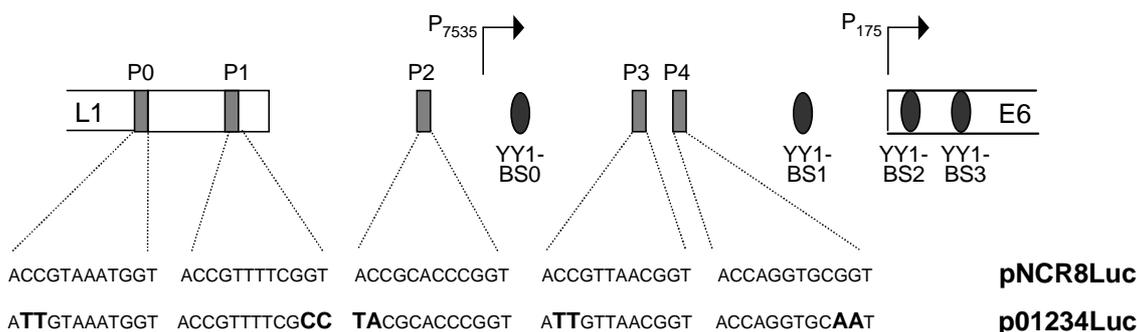
C33A Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc, sowie mit unterschiedlichen Mengen der Expressionsplasmide für HPV8 E2 (pXJE2) und YY1 (pXJYY1) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferase-Aktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E2 und YY1 gleich eins gesetzt.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, aktivierte E2 alleine bei niedrigen Konzentrationen 2,6- bis 3,6-fach die Transkription, YY1 alleine 2- bis 4-fach. Bei hohen E2-Konzentrationen nahm nicht nur, wie bereits beschrieben, die Aktivierung der Transkription ab (Stubenrauch & Pfister, 1994), sondern es kam bei Cotransfektion von YY1 auch zu einer Aufhebung der Transkriptionsaktivierung durch YY1. Bei niedrigeren Mengen E2 führte eine Cotransfektion beider Proteine zu einem additiven Effekt, der der Summe der einzelnen YY1 und E2 Effekte entsprach, und bei hohen YY1-Konzentrationen sogar zu einer synergistischen Aktivierung

der Transkription um das 12- bis 14-fache im Vergleich zum Referenzwert. Der additive Effekt aus der Summe der einzelnen YY1 und E2 Werte wäre in diesem Fall 7- bis 8-fach verglichen mit der Referenz.

Nach Mutation der E2-Bindestellen P0, P1, P2, P3 und P4 in dem Reporterplasmid pNCR8Luc (p01234Luc, Abb. 8A), war bei Cotransfektion von YY1 und E2 nur noch ein additiver bzw. sehr schwach synergistischer Effekt zu erkennen (Abb. 8B).

A)



B)

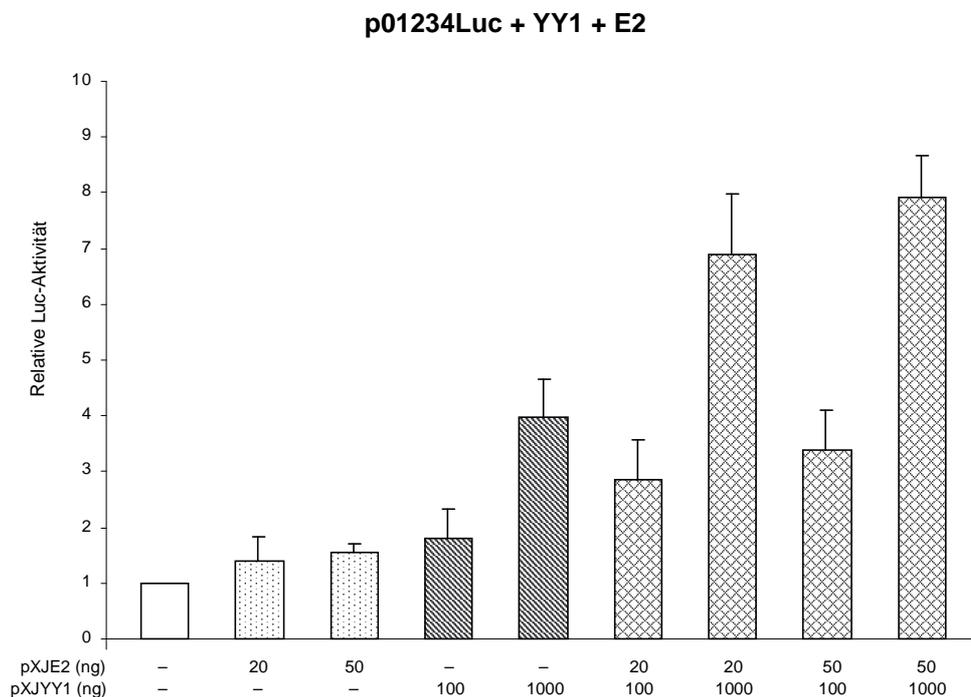


Abb. 8: **Bedeutung der E2-Bindestellen P0, P1, P2, P3 und P4 für den synergistischen Effekt von E2 und YY1 auf die Promotoraktivität von HPV8**

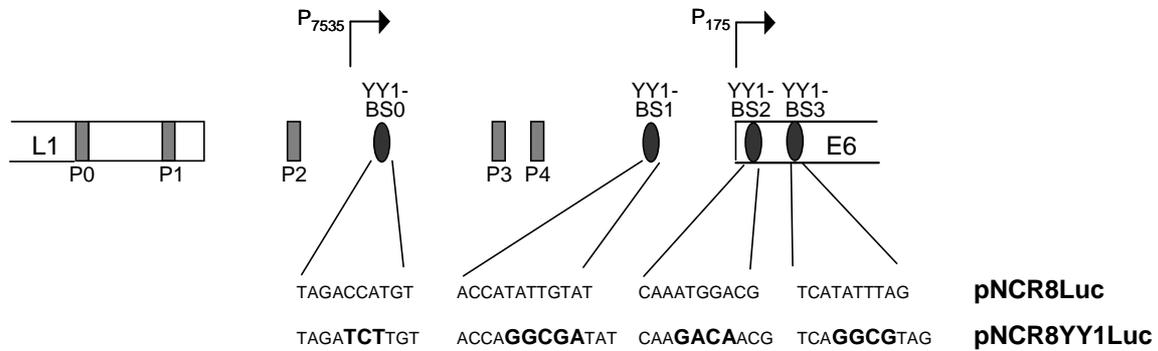
A) Schematische Darstellung der Mutationen in den E2-Bindestellen P0-P4 in der NCR von HPV8. **B)** C33A Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt p01234Luc sowie den Expressionsvektoren für HPV8 E2 (pXJE2) und YY1 (pXJYY1) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E2 und YY1 gleich eins gesetzt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für eine effiziente synergistische Aktivierung der Transkription von HPV8 durch YY1 und E2 eine Bindung von E2 an diese Bindestellen notwendig ist. Dass durch E2 nach Mutation der Bindestellen dennoch eine schwache Aktivierung der Transkription und bei Cotransfektion mit YY1 ein z. T. mehr als additiver Effekt zu beobachten war, könnte möglicherweise auf die erst kürzlich gezeigte Bindung von E2 an das M29-Element in der NCR von HPV8 zurückzuführen sein (Akgül, persönliche Mitteilung).

Im weiteren sollte untersucht werden, welche Rolle die YY1-Bindestellen in dem Konstrukt pNCR8Luc für den synergistischen Effekt von YY1 und E2 auf die Promotoraktivität von HPV8 haben. Hierzu wurden in dem Plasmid pNCR8Luc die YY1-Bindestellen mutiert (pNCR8YY1Luc, Abb. 9A) und C33A Zellen mit diesem Konstrukt sowie den Expressionsvektoren für YY1 und E2 transient transfiziert.

Wie man in Abb. 9B erkennen kann, konnte bei Cotransfektion von YY1 und E2, wenn überhaupt, nur noch ein additiver und kein synergistischer Effekt mehr beobachtet werden. Zusätzliche Kontrollexperimente mit der YY1-Expressionsvektormutante pXJYY1 Δ C, die eine Deletion des für die DNA-Bindung notwendigen C-Terminus aufweist, konnten bestätigen, dass eine Bindung von YY1 an die DNA für die synergistische Aktivierung durch YY1 und E2 notwendig ist (Abb. 10).

A)



B)

pNCR8YY1Luc + YY1 + E2

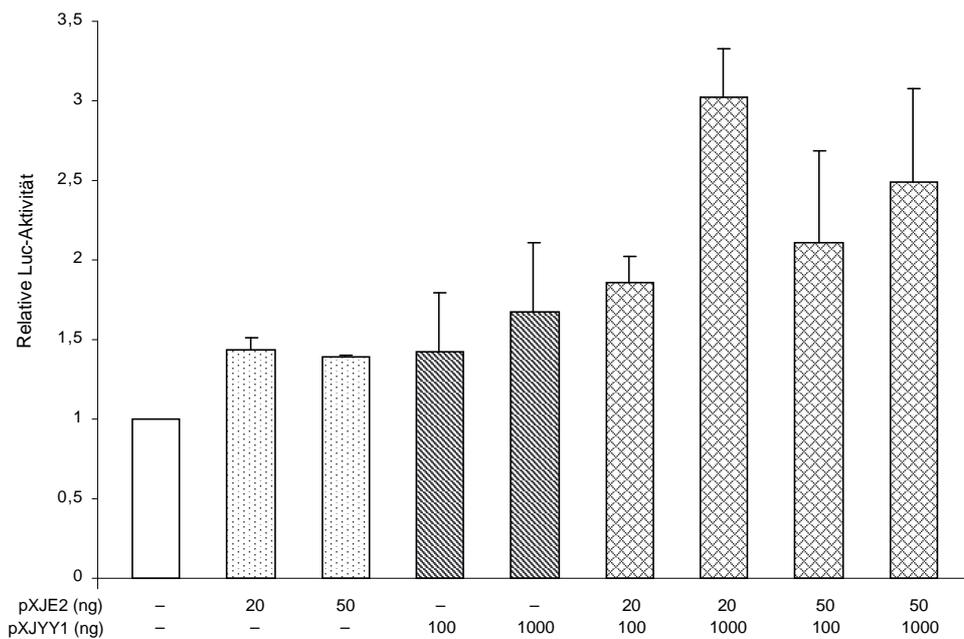


Abb. 9: **Bedeutung der YY1-Bindestellen für den synergistischen Effekt von YY1 und E2 auf die Promotoraktivität von HPV8**

A) Schematische Darstellung der Mutationen in den YY1-Bindestellen. **B)** C33A Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8YY1Luc sowie den Expressionsvektoren für E2 (pXJE2) und YY1 (pXJYY1) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E2 und YY1 gleich eins gesetzt.

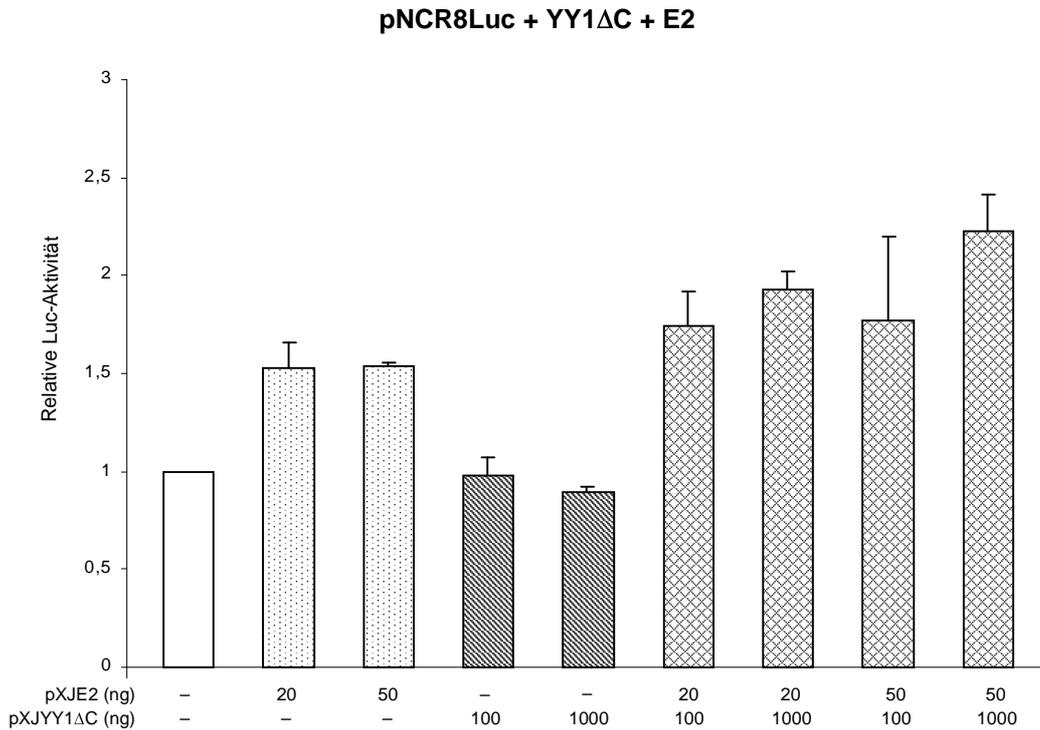


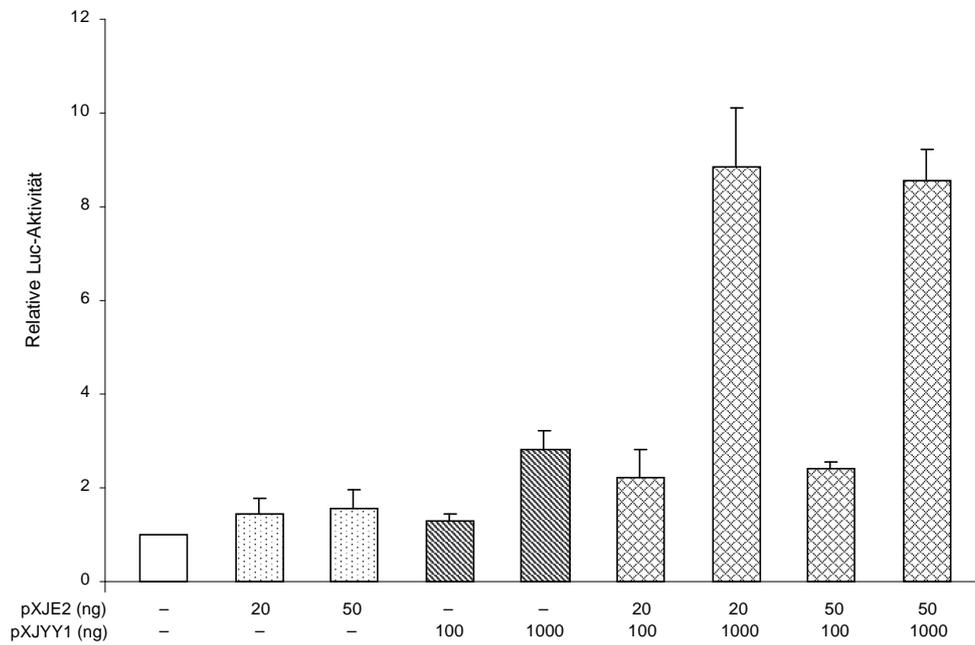
Abb. 10: Bedeutung der Bindung von YY1 an die DNA für den synergistischen Effekt von YY1 und E2 auf die Promotoraktivität von HPV8

C33A Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc sowie einem Expressionsvektor für E2 (pXJE2) und einem im C-terminalen, für die DNA-Bindung notwendigen Bereich deletierten Expressionsvektor für YY1 (pXJYY1 Δ C) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E2 und YY1 gleich eins gesetzt.

Wurden allerdings in dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc analog zu den dargestellten Mutationen in Abb. 5A entweder die YY1-Bindestellen 0 und 1 innerhalb der NCR (pNCR8Y01) oder die Bindestellen 2 und 3 am Beginn des E6-Leserahmens (pNCR8Y23) mutiert, konnte bei Cotransfektion von YY1 und E2 in jedem Fall ein synergistischer Effekt von YY1 und E2 auf die Promotoraktivität beobachtet werden (Abb. 11A und B). Dies bedeutet, dass zwei der vier vorhandenen YY1-Bindestellen für eine synergistische Aktivierung der Transkription von HPV8 durch YY1 und E2 ausreichend sind und es nicht von Bedeutung ist, ob es sich hierbei um die beiden YY1-Bindestellen innerhalb der NCR (YY1-Bindestellen 0 und 1) oder um die beiden am Beginn des E6-Leserahmens (YY1-Bindestellen 2 und 3) handelt.

A)

pNCR8Y01Luc + YY1 + E2



B)

pNCR8Y23Luc + YY1 + E2

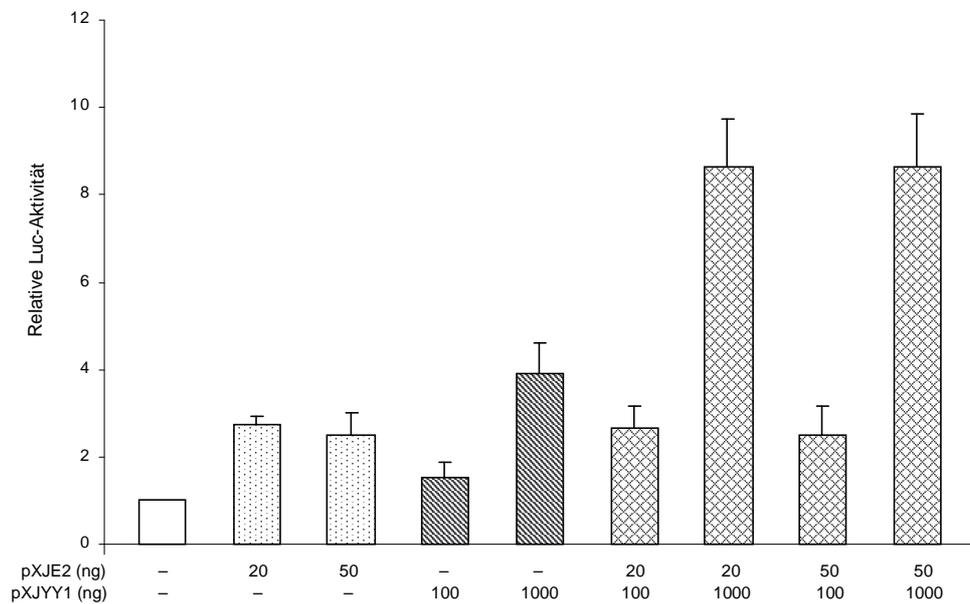


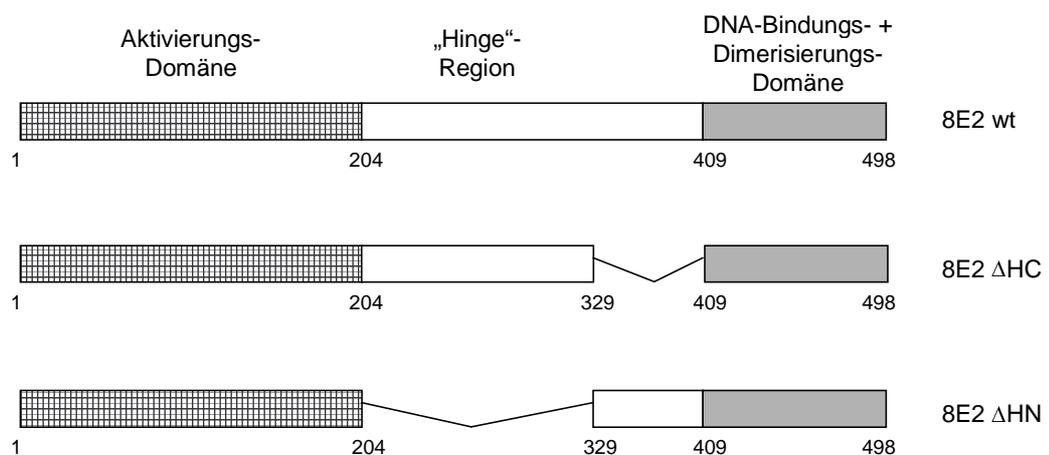
Abb. 11: **Bedeutung der YY1-Bindestellen 0 und 1 sowie 2 und 3 für den synergistischen Effekt von YY1 und E2 auf die Promotoraktivität von HPV8**

C33A Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten **A)** pNCR8Y01Luc bzw. **B)** pNCR8Y23Luc sowie mit den Expressionsvektoren für E2 (pXJE2) und YY1 (pXJYY1) transfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E2 und YY1 gleich eins gesetzt.

Um zu überprüfen, ob neben der Bindung der beiden Proteine an die DNA auch die Protein-Protein Interaktion von YY1 und E2 für den Synergismus eine Rolle spielt, wurden für die Transfektionsexperimente E2-Expressionsvektoren eingesetzt, in denen die YY1-Bindedomänen deletiert waren. Da eine Deletion des C-Terminus zu einem Verlust der Transaktivierungsfähigkeit des E2-Proteins führt, wurden für die Transfektionen nur Deletionsmutanten der YY1-Bindedomänen in der „Hinge“-Region eingesetzt (pXJE2ΔHC und pXJE2ΔHN; Abb. 12A).

Während die Deletion des C-terminalen Bereichs der „Hinge“-Region von HPV8 E2 (E2ΔHC) keine Auswirkungen auf den synergistischen Effekt von E2 und YY1 auf die Promotoraktivität hatte, kam es bei Deletion des N-terminalen Bereichs von E2 (E2ΔHN) zu einem vollständigen Verlust des Synergismus (Abb. 12B). Da E2 in höheren Konzentrationen reprimierend auf die HPV8 Transkription wirkt (Stubenrauch & Pfister, 1994), sollte ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten Mengen der E2ΔHN-Mutante außerhalb der Aktivierungskonzentration liegen. Dazu wurde das Experiment mit weiteren Konzentrationen der Mutante wiederholt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl niedrigere als auch höhere Konzentrationen der E2ΔHN-Mutante nicht in der Lage waren, die Promotoraktivität von HPV8 zusammen mit YY1 synergistisch zu aktivieren, d.h. dass die in Abb. 12B eingesetzten Konzentrationen im Optimumbereich liegen (Daten nicht gezeigt).

A)



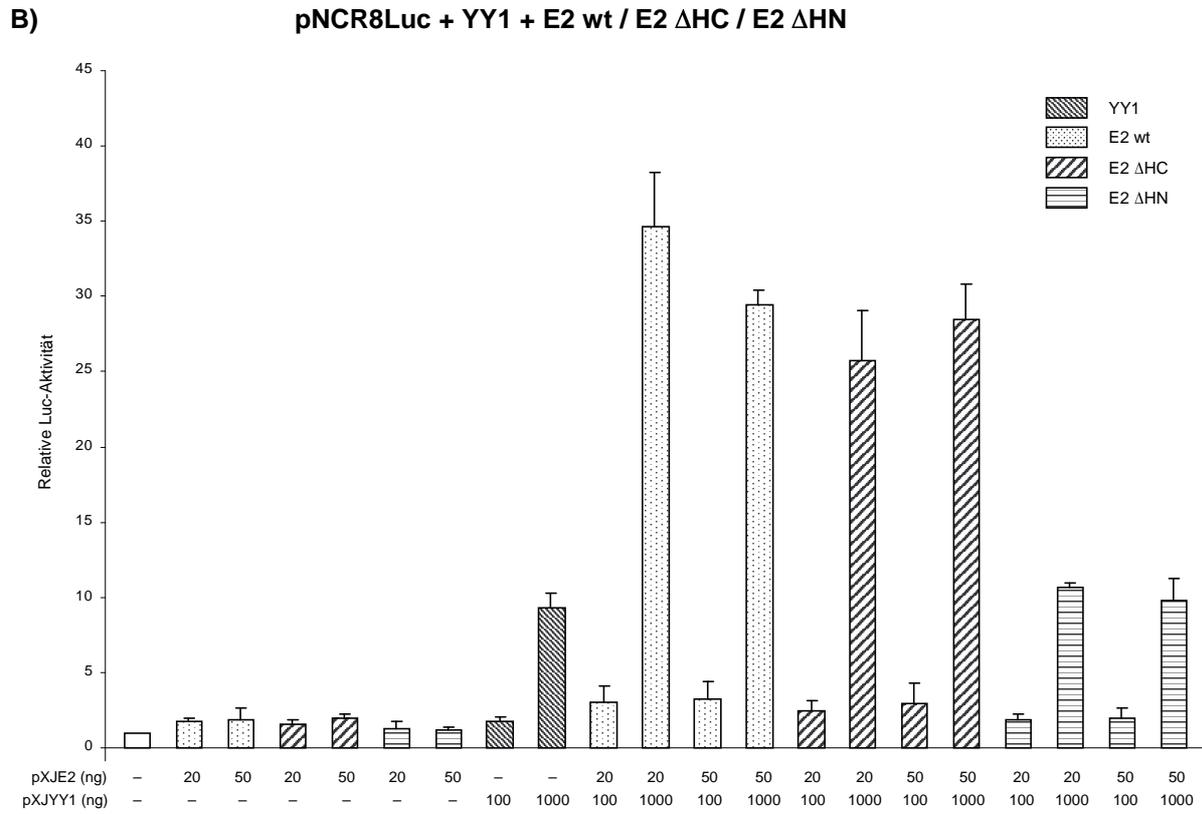


Abb. 12: Bedeutung der YY1-Bindedomänen im C- und N-terminalen Bereich der „Hinge“-Region von HPV8 E2 für den synergistischen Effekt von YY1 und E2 auf die Promotoraktivität von HPV8

A) Darstellung der für die Transfektion eingesetzten HPV8 E2-Deletionsmutanten, die jeweils unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wurden (pXJE2ΔHC und pXJE2ΔHN). **B)** Das Wildtyp-Reporterkonstrukt pNCR8Luc wurde mit dem Expressionsvektor für YY1 (pXJYY1) sowie den oben gezeigten E2-Expressionsvektoren in C33A Zellen cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E2 und YY1 gleich eins gesetzt.

Zusammenfassend weisen diese Transfektionsexperimente darauf hin, dass neben der Bindung von E2 und YY1 an die DNA auch die YY1-Bindedomäne im N-terminalen Bereich der „Hinge“-Region des HPV8 E2-Proteins und demnach eine Interaktion der beiden Proteine über diese Bindedomäne für die synergistische Promotoraktivierung von HPV8 verantwortlich ist.

5.2. Interaktion von YY1 mit anderen HPV8 Proteinen

Außer der Interaktion mit E2 wurden für YY1 bisher keine weiteren Wechselwirkungen mit anderen Papillomvirus Proteinen beschrieben. Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion der frühen HPV8 Proteine E1, E6 und E7 mit YY1, wurden diese als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, mit gereinigtem HIS-YY1 inkubiert und eine mögliche Interaktion im Western Blot mit einem gegen YY1 gerichteten Antikörper nachgewiesen.

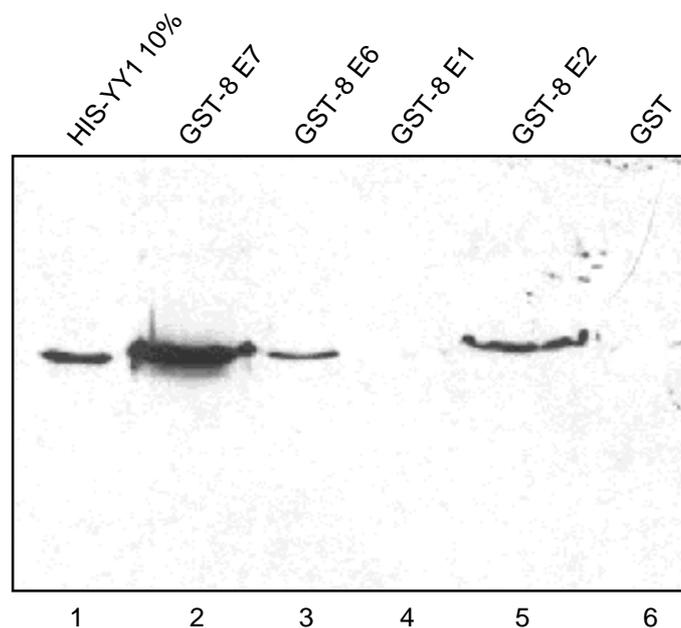


Abb. 13: **Interaktion von YY1 mit HPV8 E7, E6, E1 und E2**

E1, E2, E6 und E7 von HPV8 wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert, mit rekombinantem HIS-YY1 inkubiert, die Proteinkomplexe mit 250 mM KCl gewaschen, auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörper inkubiert. 10 % der in den Experimenten eingesetzten HIS-YY1 Menge wurden als Positiv-Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen.

Während HIS-YY1 bekanntermaßen durch das GST-E2-Fusionsprotein zurückgehalten werden konnte (Abb. 13, Spur 5), konnte keine Bindung an GST8-E1 (Spur 4) detektiert werden. Des weiteren wurde eine schwache Bindung an das GST8-E6-Fusionsprotein (Spur 3) und eine sehr starke Bindung an GST8-E7 (Spur 2) gefunden.

Da dem E7-Protein des „hoch-onkogenen“ Papillomvirustyp 18 (HPV18), im Gegensatz zu HPV8 E7, stark immortalisierende Eigenschaften zugeschrieben wird (Münger *et al.*, 1989; Yamashita *et al.*, 1993), wurde des weiteren untersucht, ob sich die E7-Proteine dieser beiden Papillomvirustypen auch in ihrer Fähigkeit, YY1 zu binden, unterscheiden. Es konnte allerdings auch eine Interaktion von YY1 mit dem HPV18 E7-Protein gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

5.2.1. Funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen YY1 und HPV8 E7

Aufgrund der starken Interaktion zwischen YY1 und dem E7-Protein von HPV8 sollte in transienten Transfektionsexperimenten untersucht werden, ob E7 einen Einfluss auf die Promotoraktivität von HPV8, bzw. auf die Aktivierung der Transkription durch YY1 hat. Hierfür wurden C33A Zellen mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc (vgl. 5.1.2.) sowie den Expressionsvektoren für YY1 (pXJYY1) und E7 (pCDNA8E7) transfiziert.

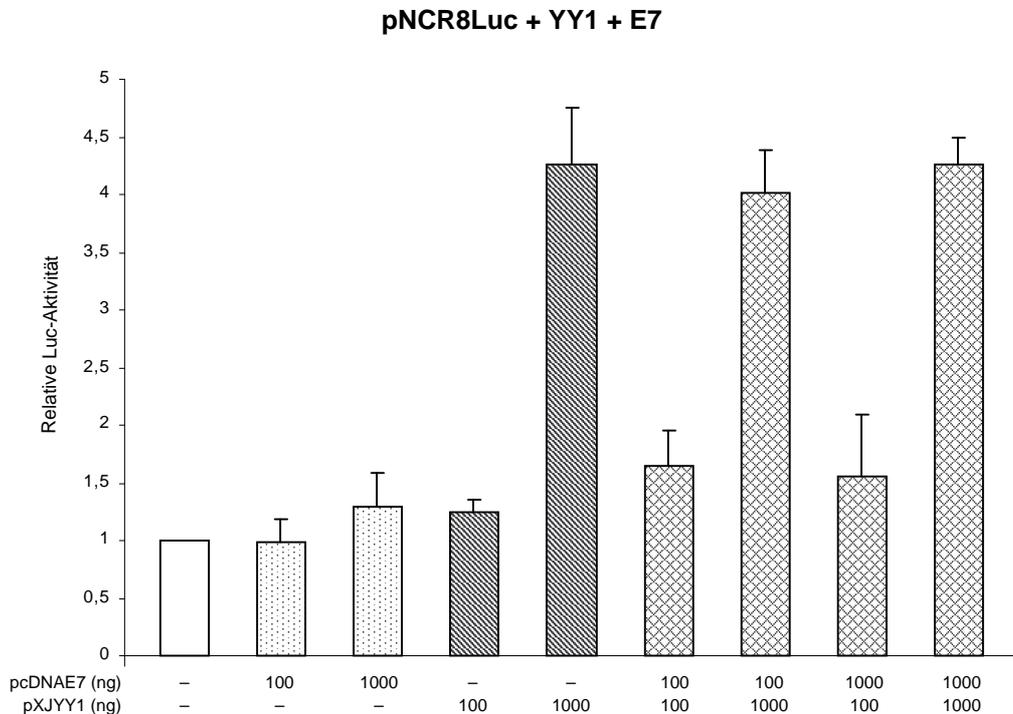


Abb. 14: Einfluss von HPV8 E7 auf die Aktivierung der HPV8 Transkription durch YY1
 C33A Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc sowie den Expressionsvektoren für YY1 (pXJYY1) und HPV8 E7 (pCDNA8E7) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von E7 und YY1 gleich eins gesetzt.

Wie man in Abbildung 14 erkennen kann, konnte E7 weder die Promotoraktivität von HPV8 noch die Aktivierung der Transkription durch YY1 beeinflussen, was bedeutet, dass die Protein-Protein Interaktion von YY1 und E7 keine funktionelle Bedeutung für die Transkription von HPV8 hat.

5.3. Analyse der Interaktion zwischen YY1 und dem zellulären p53-Protein

In der NCR von HPV8 konnte in der Nähe der YY1-Bindestelle 1 im M29-Element eine Bindestelle für das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 kartiert werden (Haigis, 1998). Sowohl YY1 als auch p53 regulieren durch Bindung an ihre Erkennungssequenzen in Promotoren die Transkription vieler zellulärer und viraler Gene und können mit anderen wichtigen Regulatorproteinen Wechselwirkungen eingehen, was häufig in einer Modulation ihrer eigentlichen Funktion resultiert (Shi *et al.*, 1997; Ko & Prives, 1996). Daher sollte untersucht werden, ob auch YY1 und p53 *in vitro* miteinander interagieren bzw. sich in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen.

5.3.1. Nachweis der YY1-p53 Interaktion *in vitro*

Das GST-YY1-Fusionsprotein wurde in Bakterien exprimiert, an Glutathion-S-Sepharose gebunden und mit *in vitro* translatiertem [³⁵S]-Methionin markiertem p53 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Protein-Protein Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt und das p53-Protein autoradiographisch nachgewiesen. Wie in Abb. 15A zu erkennen ist, konnte das p53-Protein nach Inkubation mit GST-YY1 (Spur 3), nicht jedoch nach Inkubation mit GST alleine (Spur 2), detektiert werden. Die Stabilität der Bindung zwischen GST-YY1 und dem *in vitro* translatierten p53 wurde durch Waschen mit steigender Puffer-Salzkonzentration (100 mM bzw. 250 mM KCl) überprüft. Auch unter stringenteren Bedingungen (250 mM KCl) konnte das *in vitro* translatierte p53-Protein durch Sepharose gebundenes GST-YY1 zurückgehalten werden, was bedeutet, dass der YY1-p53 Komplex unter hohen Salzkonzentrationen stabil bleibt. Die Interaktion von YY1 und p53 wurde durch Analyse der Bindung von rekombinantem HIS-YY1 an GST-p53-Fusionsprotein überprüft und bestätigt (Abb. 15B).

Dass YY1 auch mit *in vivo* synthetisiertem p53 interagiert, wurde durch Interaktionsstudien mit GST-YY1 und C33A Kernextrakten deutlich (Abb. 15C). Auch hier konnte nach mehrmaligem Waschen und Analyse im Western Blot mit einem gegen p53 gerichteten Antikörper eine Interaktion von YY1 und p53 gezeigt werden, wenngleich man bedenken muß, dass das in C33A Zellen endogen exprimierte p53 am Codon 273 (R273C) mutiert ist.

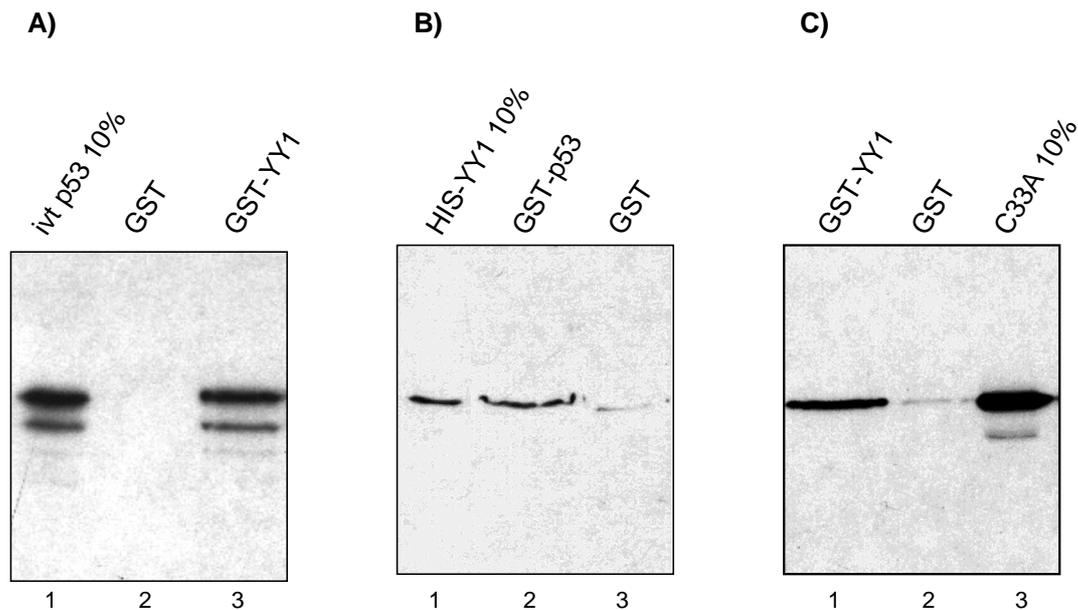


Abb. 15: **Interaktion von YY1 mit p53**

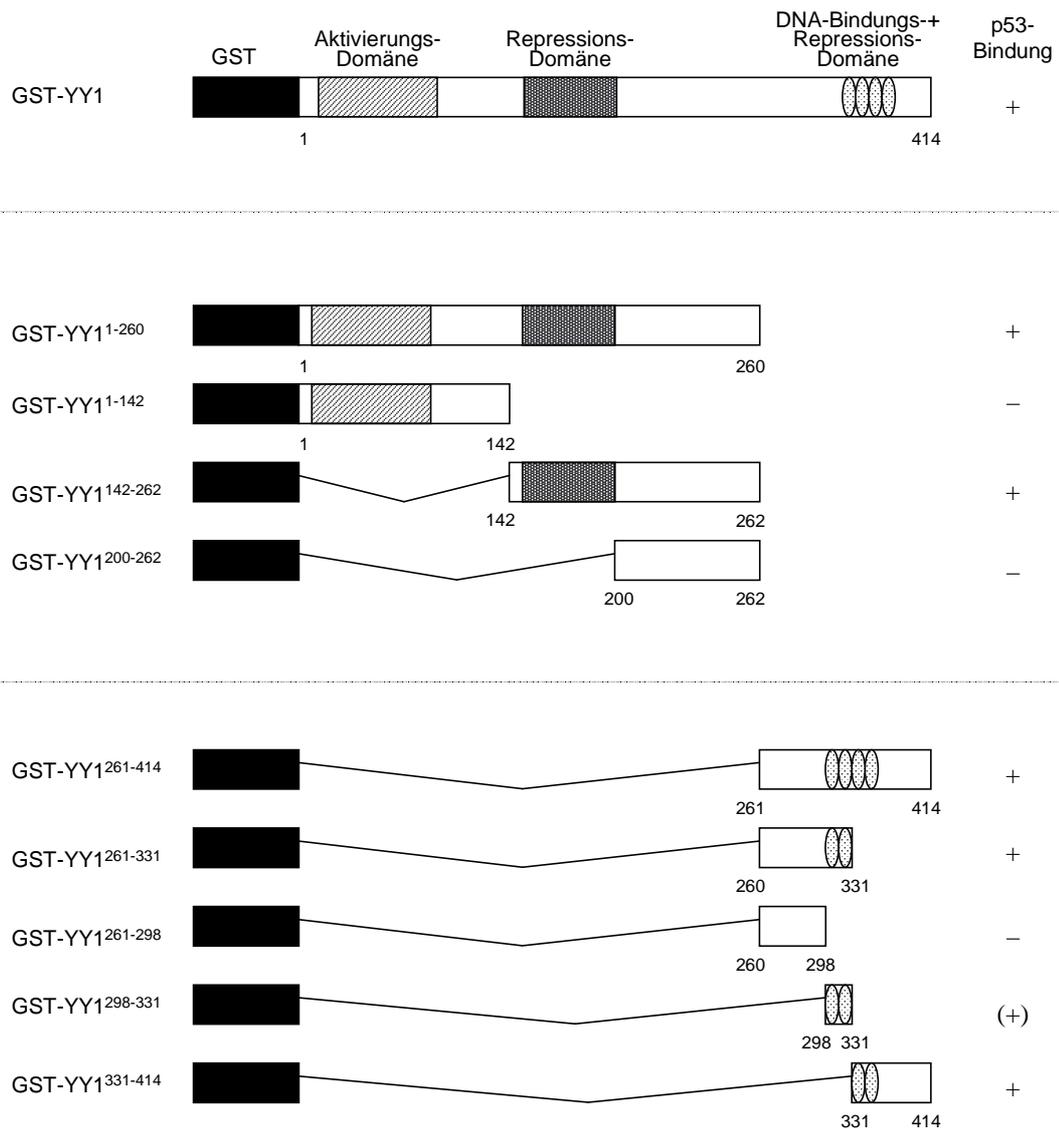
A) *In vitro* translatiertes und mit [³⁵S]-markiertes p53 wurde mit GST-YY1 inkubiert, die Proteinkomplexe mit 100 mM KCl gewaschen, auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und das p53-Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. **B)** Rekombinantes HIS-YY1 wurde mit GST-p53 inkubiert, die Proteinkomplexe mit 250 mM KCl gewaschen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mittels eines polyklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörpers nachgewiesen. **C)** GST-YY1 wurde mit C33A Kernextrakten inkubiert, die Proteinkomplexe mit 100 mM KCl gewaschen, auf einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem monoklonalen, gegen p53 gerichteten Antikörper inkubiert. 10 % des in den Experimenten verwendeten **A)** *in vitro* translatierten p53 bzw. **B)** HIS-YY1 oder **C)** C33A Kernextrakten wurden als Positiv-Kontrollen mit auf das Gel aufgetragen.

Mittels Protein-Affinitätschromatographie konnte somit eine stabile und direkte Wechselwirkung zwischen YY1 und p53 nachgewiesen werden.

5.3.2. Kartierung der p53-Bindedomäne(n) im YY1-Protein

Mit den in Abb. 16A dargestellten GST-fusionierten YY1-Deletionsmutanten sollten mögliche p53-Bindedomänen im YY1-Protein charakterisiert werden. Hierbei wurden die GST-YY1-Fusionsproteine mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem p53 inkubiert.

A)



B)

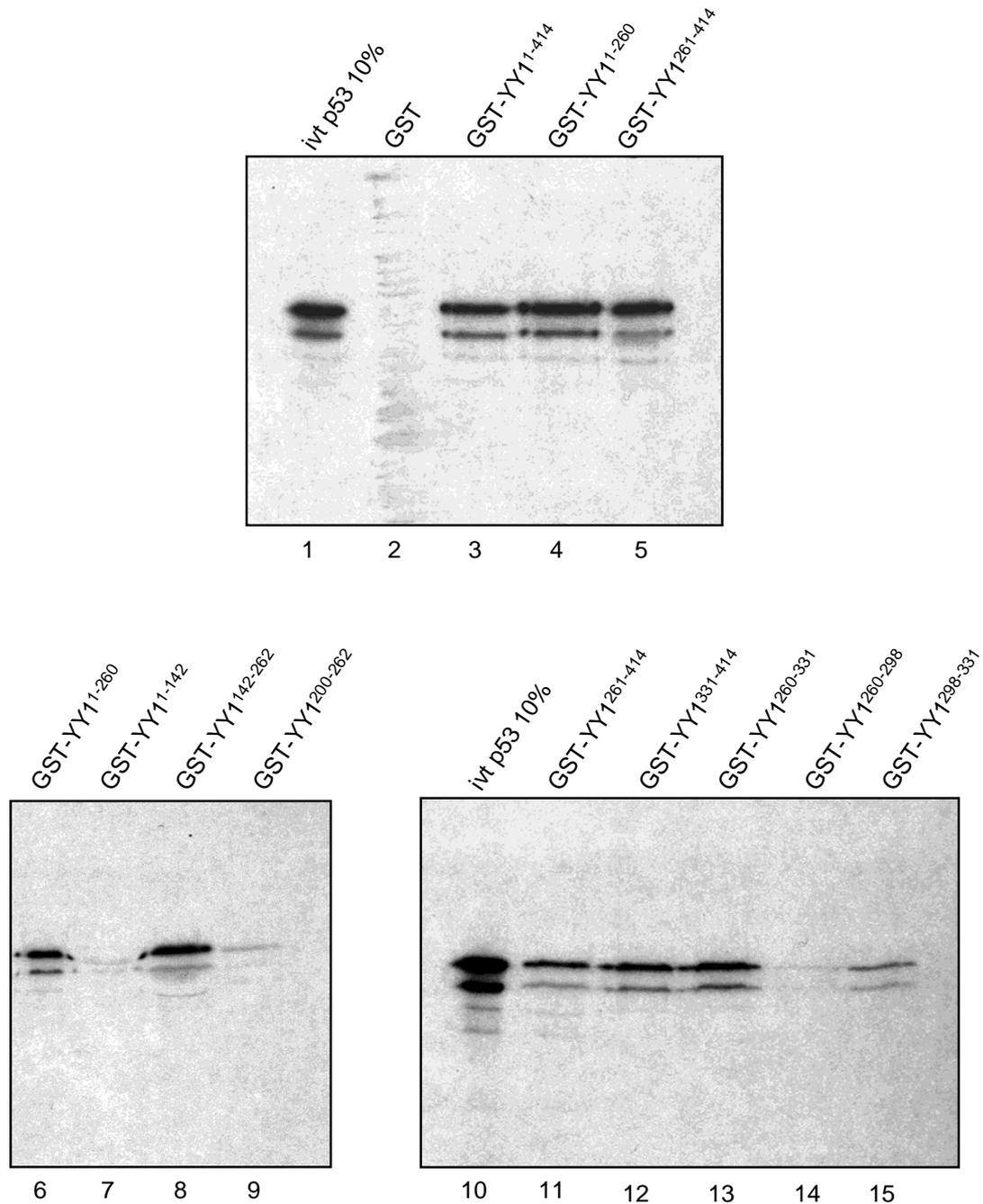


Abb. 16: **Charakterisierung der p53-Bindedomänen im YY1-Protein**

A) Darstellung der GST-YY1-Deletionsmutanten. Der GST-Anteil sowie die funktionellen Domänen von YY1 sind eingezeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuren im YY1-Protein. Mit + bzw. – wurde die Interaktion zwischen p53 und YY1 rechts dargestellt. **B)** *In vitro* Protein-Affinitätschromatographie von ^{35}S -markiertem p53 mit den verschiedenen GST-YY1-Deletionsmutanten. Die YY1-p53-Proteinkomplexe wurden mit 100 mM KCl gewaschen, auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und das p53-Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. 10 % des in den Experimenten verwendeten *in vitro* translatierten p53 wurden als Positiv-Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen.

Eine erste Unterteilung des YY1-Proteins in den C-terminalen Bereich (AS 261-414) bzw. die zentrale Repressionsdomäne und den N-Terminus (AS 1-260) ergab, dass *in vitro* translatiertes p53 sowohl an GST-YY1¹⁻²⁶⁰ (Abb. 16B, Spur 4) als auch an GST-YY1²⁶¹⁻⁴¹⁴ (Spur 5) binden konnte. Dies bedeutet, dass sich mindestens zwei unabhängige p53-Bindemotive im YY1-Protein befinden, eines zwischen den AS 261 und 414 im C-terminalen Bereich und eines zwischen den AS 1 und 260 am N-Terminus und/oder der zentralen Repressionsdomäne.

Mittels einer detaillierteren Analyse der YY1 Region von AS 1-260 konnte gezeigt werden, dass p53 durch GST-YY1¹⁴²⁻²⁶² (Spur 8), nicht jedoch durch GST-YY1¹⁻¹⁴² und GST-YY1²⁰⁰⁻²⁶² (Spuren 7 und 9) gebunden wurde. Dies bedeutet, dass eine p53-Bindedomäne zwischen den AS 142 und 262 in der zentralen Repressionsdomäne lokalisiert ist. Die weitere Charakterisierung der p53-Bindedomäne im C-terminalen Bereich von YY1 ergab eine Bindung an GST-YY1³³¹⁻⁴¹⁴ sowie GST-YY1²⁶⁰⁻³³¹ (Spuren 12 und 13) und keine an GST-YY1²⁶⁰⁻²⁹⁸ (Spur 14). Da nur eine schwache Bindung von p53 an GST-YY1²⁹⁸⁻³³¹ (Spur 15) detektiert werden konnte, liegen die p53-Bindedomänen im C-terminalen Bereich von YY1 zwischen den AS 260 und 331 sowie den AS 331 und 414.

Zusammenfassend konnte also mittels Protein-Affinitätschromatographie gezeigt werden, dass es mindestens drei p53-Bindedomänen im YY1-Protein gibt. Eine innerhalb der zentralen Repressionsdomäne zwischen den AS 142 und 262 sowie zwei weitere innerhalb der C-terminalen Zinkfinger motive zwischen den AS 331 und 414 bzw. den AS 260 und 331.

5.3.3. Einfluss von p53 und YY1 auf die Transkription von HPV8

Ob die Interaktion von YY1 und p53 funktionelle Konsequenzen auf die Promotoraktivität von HPV8 hat, wurde in transienten Transfektionsexperimenten untersucht, in denen C33A Zellen mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc (vgl. 5.1.2.) sowie den Expressionsvektoren für p53 (pCMVp53) und YY1 (pXJYY1) transfiziert wurden.

In Abbildung 17 kann man erkennen, dass p53 schon in niedrigen Konzentrationen die Transkription von HPV8 hemmen konnte. Bei Cotransfektion von p53 und YY1 kam es zu einem vollständigen Verlust der Transkriptionsaktivierung durch YY1. Allein große Mengen YY1 konnten die Hemmung durch geringe Mengen p53 komplett aufheben und die Transkription nahezu in gleichem Maße aktivieren wie ohne p53.

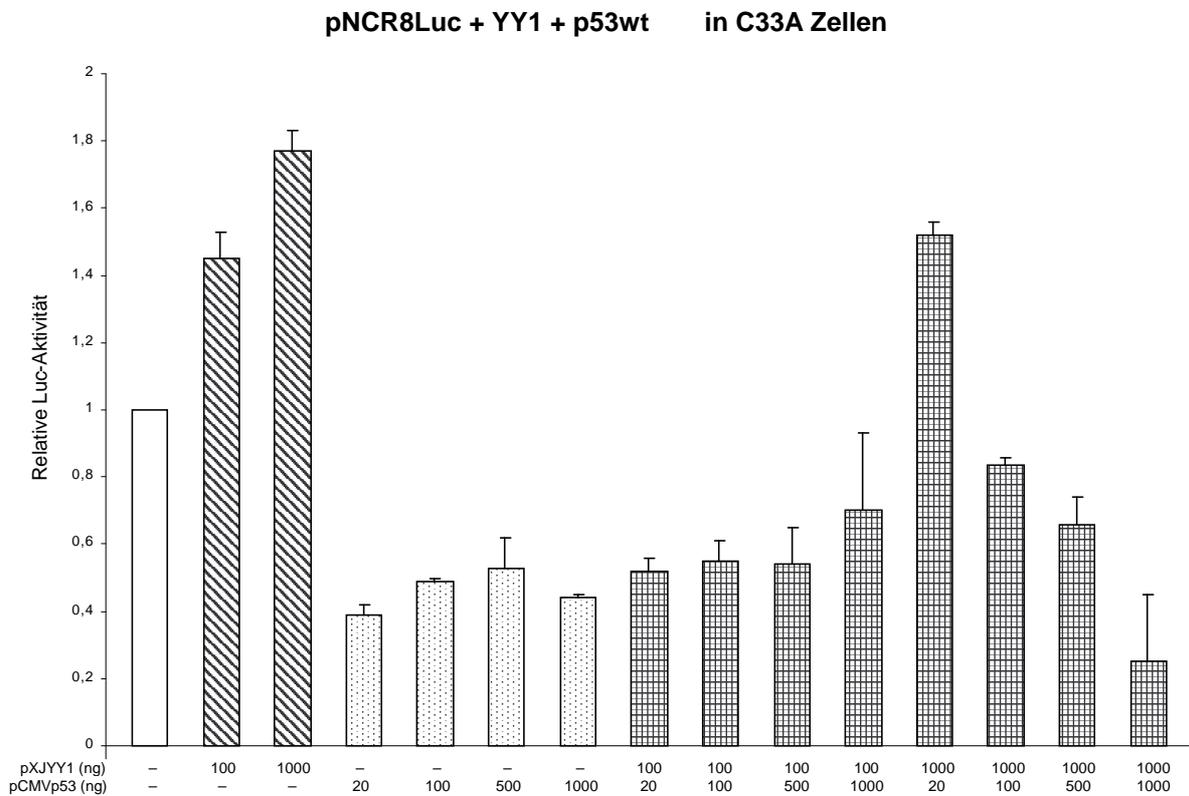


Abb. 17: Einfluss von p53 und YY1 auf die Transkription von HPV8 in C33A Zellen

C33A Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc sowie den Expressionsvektoren für YY1 (pXJYY1) und p53 (pCMVp53) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von p53 und YY1 gleich eins gesetzt.

Um zu überprüfen, wie stark YY1 und p53 in dieser Zelllinie exprimiert werden, wurden C33A Zellen mit 100 ng bzw. 1 µg pXJYY1 oder pCMVp53 transfiziert und Kernextrakte hergestellt. In einer Western Blot Analyse mit einem gegen YY1 bzw. gegen p53 gerichteten Antikörper wurde die Stärke der Proteinexpression ermittelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in C33A Zellen YY1, besonders nach Transfektion größerer Mengen an Expressionsvektor (1 µg), stärker exprimiert wurde als p53 (Abb. 18).

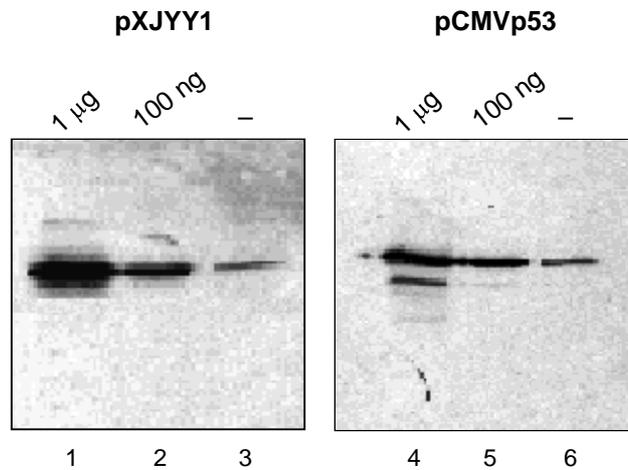


Abb. 18: Untersuchung der YY1- und p53-Expression nach Transfektion unterschiedlicher Mengen der Expressionsplasmide in C33A Zellen

C33A Zellen wurden mit jeweils 100 ng bzw. 1 µg pXJYY1 oder pCMVp53 transfiziert. Jeweils 20 µg Gesamt-Proteinextrakt wurde in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und YY1 bzw. p53 mittels Western Blot Analyse mit einem gegen YY1 bzw. p53 gerichteten Antikörper nachgewiesen.

Da, wie bereits erwähnt, C33A Zellen endogen mutiertes p53 enthalten, sollte das Experiment in der p53 negativen Lungenepithelkarzinom-Zelllinie H1299 wiederholt werden.

In Vorbereitung dieser Versuche wurde zuerst der endogene YY1-Status dieser Zelllinie untersucht. Als Positivkontrolle dienten C33A Zellen, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie endogen YY1 exprimieren (Pajunk, 1999). Gesamtzellextrakte von H1299 und C33A Zellen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und das endogene YY1 in einer Western Blot Analyse mit einem polyklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörper nachgewiesen.

Es konnte auch bei der p53 Nullzelllinie H1299 eine Bande entsprechend einem Protein mit dem Molekulargewicht von 68 kDa, wie für YY1 erwartet, identifiziert werden (Abb. 19, Spur 1). Die YY1-Expression in dieser Zelllinie scheint zudem sehr viel stärker zu sein als in C33A Zellen.

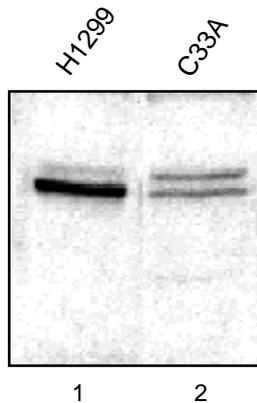


Abb. 19: Nachweis der endogenen YY1-Expression in der Lungenepithelkarzinom-Zelllinie H1299

Jeweils 30 µg Gesamt-Proteinextrakte aus den Zelllinien H1299 und C33A wurden in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und auf ein Nitrozellulosefilter transferiert. Mittels Western Blot Analyse mit einem polyklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörper wurde YY1 mit dem ECL-System nachgewiesen.

Die transienten Transfektionsexperimente in den p53 negativen H1299 Zellen zeigten ebenfalls eine Repression der Transkription durch p53, auch bei gleichzeitiger Überexpression von YY1 (Abb. 20). Während aber in C33A Zellen schon niedrige p53-Konzentrationen zu einer deutlichen Repression führen konnten, die durch ansteigende Mengen p53 nicht weiter verstärkt wurde (vgl. Abb. 17), kam es in H1299 Zellen zu einer stetigen Zunahme der Repression bei Erhöhung der p53-Expression. Nach Transfektion von YY1 ohne p53 konnte in H1299 Zellen im Unterschied zu C33A Zellen erst bei starker Überexpression eine Aktivierung durch YY1 nachgewiesen werden. Auch nach Cotransfektion beider Proteine war in den untersuchten Zelllinien ein Unterschied zu erkennen. In H1299 konnte die Überexpression von YY1 zwar den repressorischen Effekt durch kleine Mengen p53 so weit aufheben, dass die Promotoraktivität dem Referenzwert entsprach, in C33A Zellen hingegen konnte diese eine vergleichbare Aktivierung erzielen wie ohne p53 (vgl. Abb. 17).

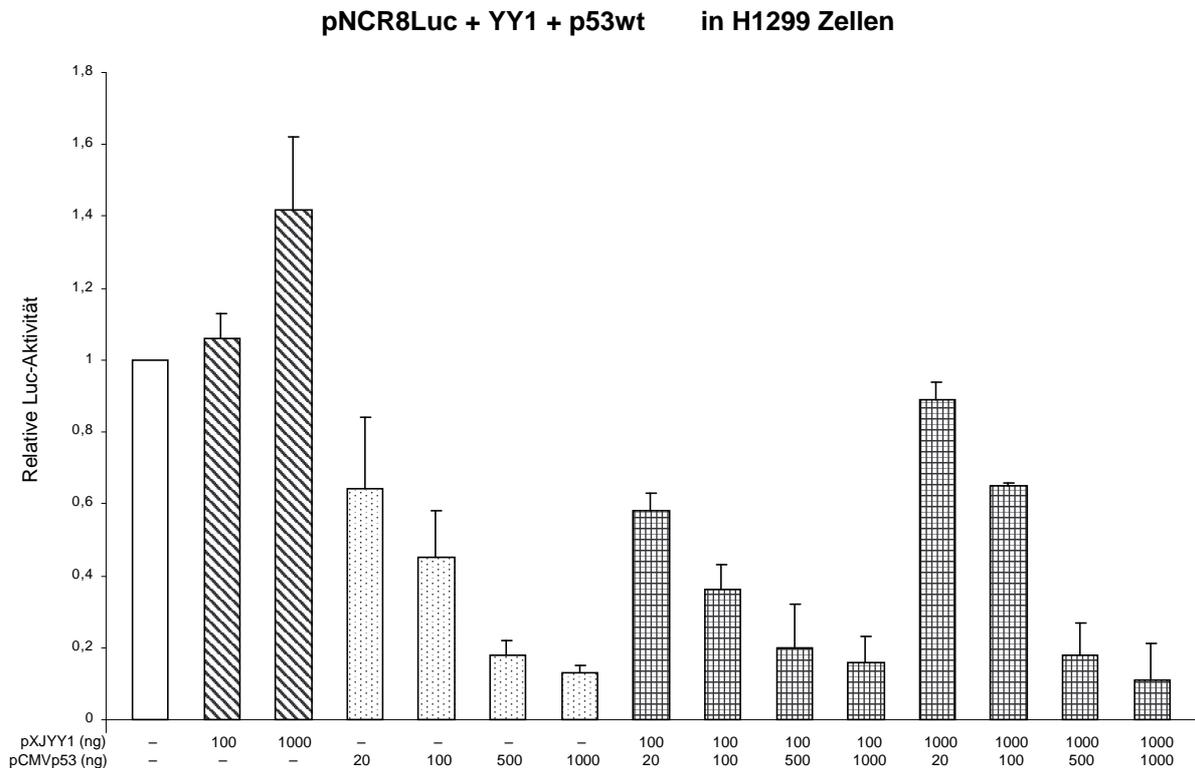


Abb. 20: Einfluss von p53 und YY1 auf die HPV8-Transkription in H1299 Zellen

H1299 Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc sowie den Expressionsvektoren für YY1 (pXJYY1) und p53 (pCMVp53) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von YY1 und p53 gleich eins gesetzt.

Um auch in dieser Zelllinie zu überprüfen, wie stark YY1 und p53 exprimiert werden, wurden H1299 Zellen mit 100 ng bzw. 1 µg pXJYY1 oder pCMVp53 transfiziert, Kernextrakte hergestellt und mittels Western Blot Analyse die Stärke der Proteinexpression ermittelt. Beide Proteine wurden in H1299 Zellen gleich stark exprimiert (Abb. 21).

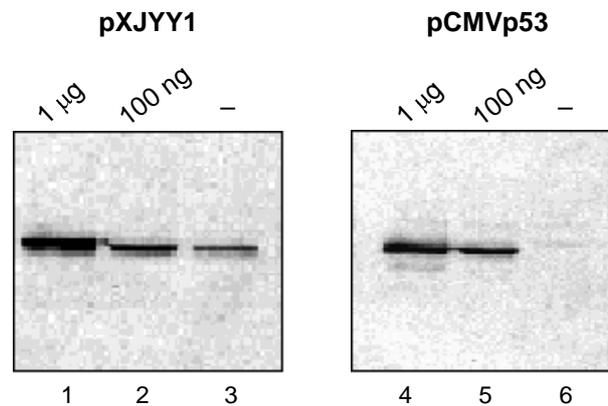


Abb. 21: Untersuchung der YY1- und p53-Expression nach Transfektion unterschiedlicher Mengen der Expressionsplasmide in H1299 Zellen

H1299 Zellen wurden mit jeweils 100 ng bzw. 1 µg pXJYY1 oder pCMVp53 transfiziert. Jeweils 20 µg Gesamt-Proteinextrakt wurde in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und YY1 bzw. p53 mittels Western Blot Analyse mit einem gegen YY1 bzw. p53 gerichteten Antikörper nachgewiesen.

Während über den Mechanismus der Transkriptionsaktivierung durch p53 viel bekannt ist, weiß man über die Repression der Transkription durch p53 relativ wenig. Daher sollte untersucht werden, ob für die beobachtete Hemmung der Transkription von HPV8 und für die Aufhebung der durch YY1-Überexpression vermittelten Transkriptionsaktivierung die Bindung von p53 an die DNA notwendig ist. Hierfür wurden p53-Expressionsvektoren eingesetzt, die DNA-bindungsdefekte p53 Mutanten exprimieren, die häufig in menschlichen Tumoren gefunden wurden (Hollstein *et al.*, 1994; Levine, 1997). Während die p53 Mutante R248W am Codon 248 mutiert ist, was zu einem Austausch von Arginin zu Tryptophan führt, entspricht die p53 Mutante R273C dem in C33A Zellen endogen vorhandenen p53 und enthält am Codon 273 anstelle eines Arginins ein Cystein. Um störende Effekte von endogenem p53 zu verhindern, wurden diese Transfektionen ausschließlich in p53 negativen H1299 Zellen durchgeführt.

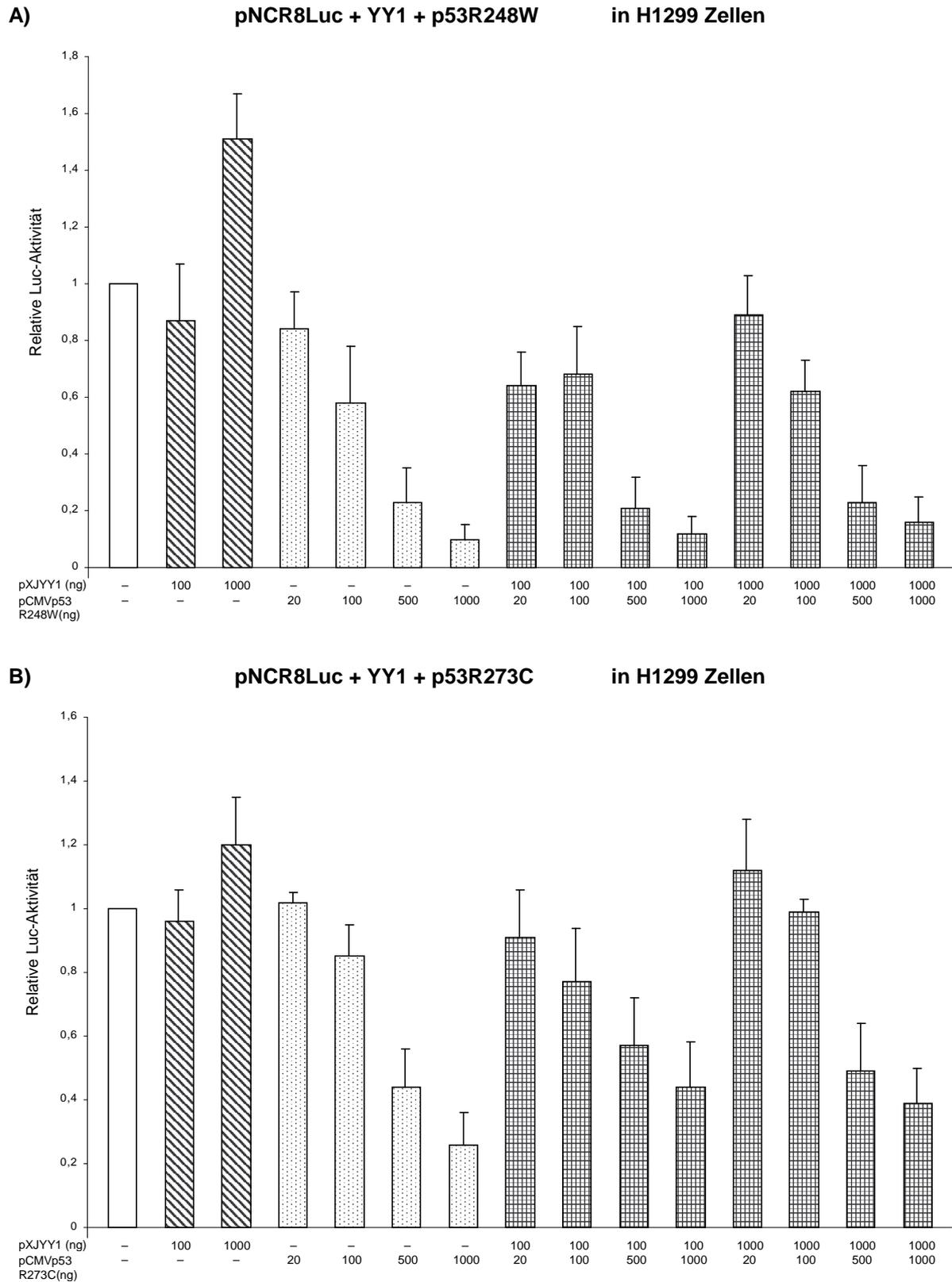


Abb. 22: Bedeutung der DNA-Bindung von p53 für die Repression der HPV8 Transkription
 Die p53 Mutanten **A)** R248W bzw. **B)** R273C wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8Luc sowie den Expressionsvektoren für YY1 (pXJYY1) in H1299 Zellen cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion von YY1 und p53 gleich eins gesetzt.

Wie in Abb. 22 zu erkennen ist, konnten geringe Mengen der DNA-bindungsdefekten p53 Mutanten R248W und R273C die HPV8 Transkription nicht so effizient reprimieren wie p53 Wildtyp. Erst höhere Konzentrationen der Mutanten waren in der Lage, die Transkription in gleichem Maße zu reprimieren wie das Wildtyp Protein. Da von der p53 Mutante R248W bekannt ist, dass sie in H1299 Zellen keine Apoptose induziert (Friedlander *et al.*, 1996), kann der durch Überexpression von p53 erzielte repressorische Effekt auf die Transkription von HPV8 nicht auf Induktion von Apoptose zurückzuführen sein.

Um zu überprüfen, welche Rolle die Interaktion von p53 mit YY1 für die Repression durch p53 spielt, wurden die p53 Mutanten R248W und R273C sowie Wildtyp p53 als Positivkontrolle *in vitro* translatiert und auf eine mögliche Interaktion mit GST-YY1 hin untersucht.

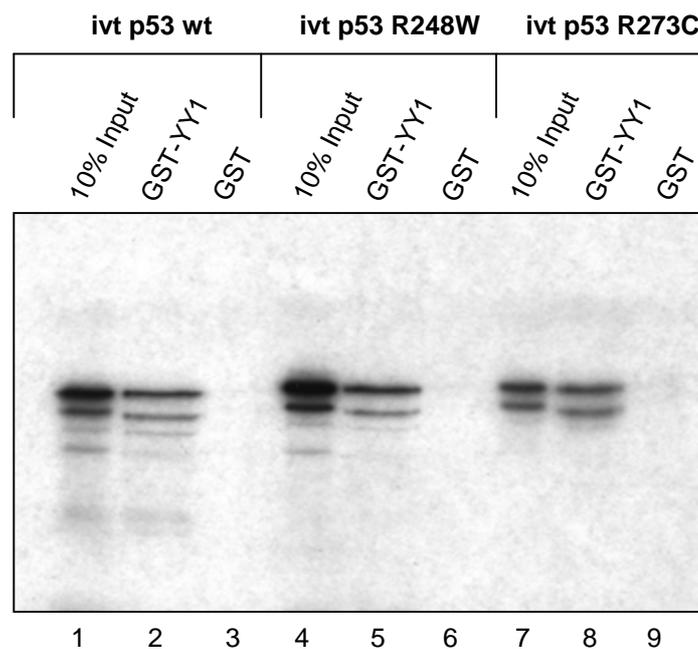


Abb. 23: Interaktion von YY1 mit den p53 Mutanten R248W und R273C

Die p53 Mutanten R248W und R273C sowie Wildtyp p53 wurden *in vitro* translatiert (ivt) und mit GST-YY1 inkubiert, die Proteinkomplexe mit 100 mM KCl gewaschen, auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und das p53-Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. 10 % der in den Experimenten verwendeten *in vitro* translatierten p53-Proteine wurden als Positiv-Kontrolle mit auf das Gel aufgetragen.

In Abb. 23 kann man erkennen, dass beide Mutanten in gleichem Maße wie das Wildtyp-Protein durch das an die Sepharose gebundene GST-YY1-Fusionsprotein (Spuren 2, 5 und 8), zurückgehalten wurden. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Interaktion von YY1 mit p53 eine Rolle bei der durch Überexpression von p53-vermittelten Repression durch p53 spielt.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass p53 die Transkription von HPV8 reprimiert und es bei Cotransfektion von p53 und YY1 zu einem Verlust der durch YY1-Überexpression vermittelten Aktivierung kommt. Mutanten, die nicht mehr an die DNA binden, allerdings nach wie vor mit YY1 interagieren können, hemmen in niedrigen Konzentrationen nicht mehr so effizient die Transkription von HPV8 wie das Wildtyp Protein. Dies bedeutet, dass der repressorische Effekt von p53 auf die Transkription von HPV8 bei niedrigen p53-Konzentrationen DNA-bindungsabhängig ist und bei höheren p53-Konzentrationen möglicherweise auf der Interaktion mit YY1 oder anderen Faktoren beruht.

5.3.4. Einfluss von p53 auf die Bindung von YY1 an seine Bindestellen in der HPV8 NCR

Wie bereits erwähnt, liegt die p53-Bindestelle im M29-Element der HPV8 NCR nur wenige Basenpaare entfernt von der YY1-Bindestelle 1 (Abb. 24). Vergleicht man die Kernelemente der DNA-Bindestellen-Konsensussequenzen für p53 und YY1 können gewisse Homologien beobachtet werden, da beide die Basenabfolge 5'-CATN-3' umfassen (El-Deiry *et al.*, 1992; Yant *et al.*, 1996). Betrachtet man unter diesem Aspekt die YY1-Bindestellen in der NCR von HPV8, kann man erkennen, dass die YY1-Bindestelle 0, nahe dem späten Promotor P₇₅₃₅, einer kompletten p53-Bindestellen-Konsensussequenz entspricht (Abb. 24).

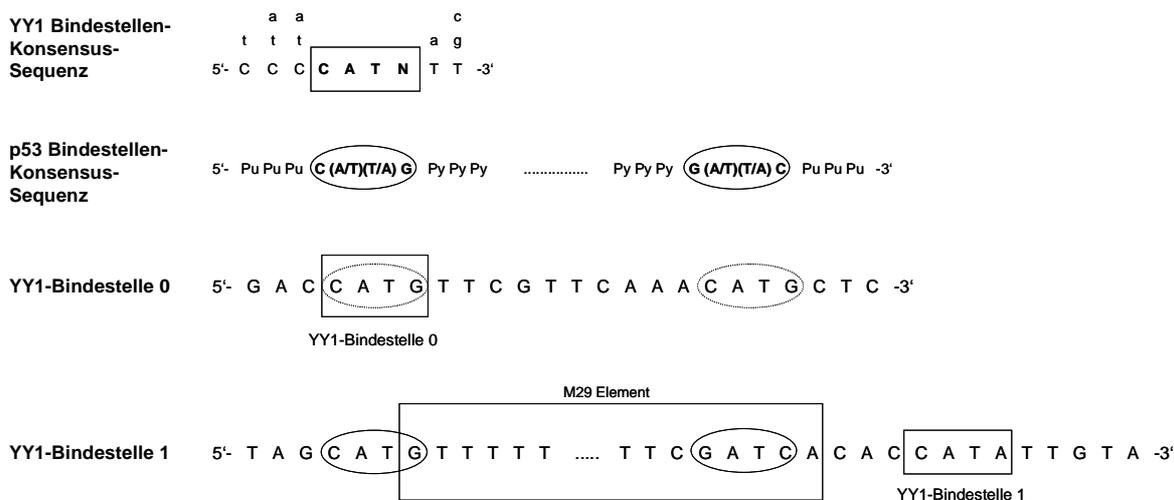


Abb. 24: Vergleich der YY1- und p53-Konsensus-Sequenzen in Bezug auf die YY1-Bindestellen 0 und 1 in der HPV8 NCR

Dargestellt sind die YY1- und p53- Bindestellen-Konsensussequenzen sowie die YY1-Bindestellen 1 und 0 in der NCR von HPV8. Das Kernelement der YY1-Erkennungssequenz ist mit einem Rechteck gekennzeichnet, das der p53-Erkennungssequenz mit einer Ellipse.

Aufgrund dieser Beobachtung sollte in Gel-Retardations-Experimenten untersucht werden, ob p53 an die YY1-Bindestelle 0 bindet und einen Einfluss auf die Bindung von YY1 an diese Bindestelle hat. Des weiteren sollte getestet werden, ob die Bindung von p53 an das M29-Element Auswirkungen auf die Bindung von YY1 an seine Bindestelle 1 hat.

Hierzu wurden [γ - ^{32}P]-markierte doppelsträngige (ds) DNA-Proben, die die YY1-Bindestelle 0 von HPV8 bzw. die YY1-Bindestelle 1 und das M29-Element enthalten, mit HIS-YY1 und/oder HIS-p53 inkubiert. Die Spezifität des YY1-DNA Komplexes konnte durch homologe Konkurrenz mit einem Oligonukleotid der YY1-Bindestelle 0 von HPV8, sowie durch fehlende Konkurrenz bei Verwendung eines Oligonukleotids, das eine mutierte YY1-Bindestelle von HPV8 enthält, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Spezifität des p53-DNA Komplexes konnte nach Zugabe eines gegen p53 gerichteten monoklonalen Antikörpers durch Entstehung eines „Supershifts“ gezeigt werden (Abb. 25A, Spur 11).

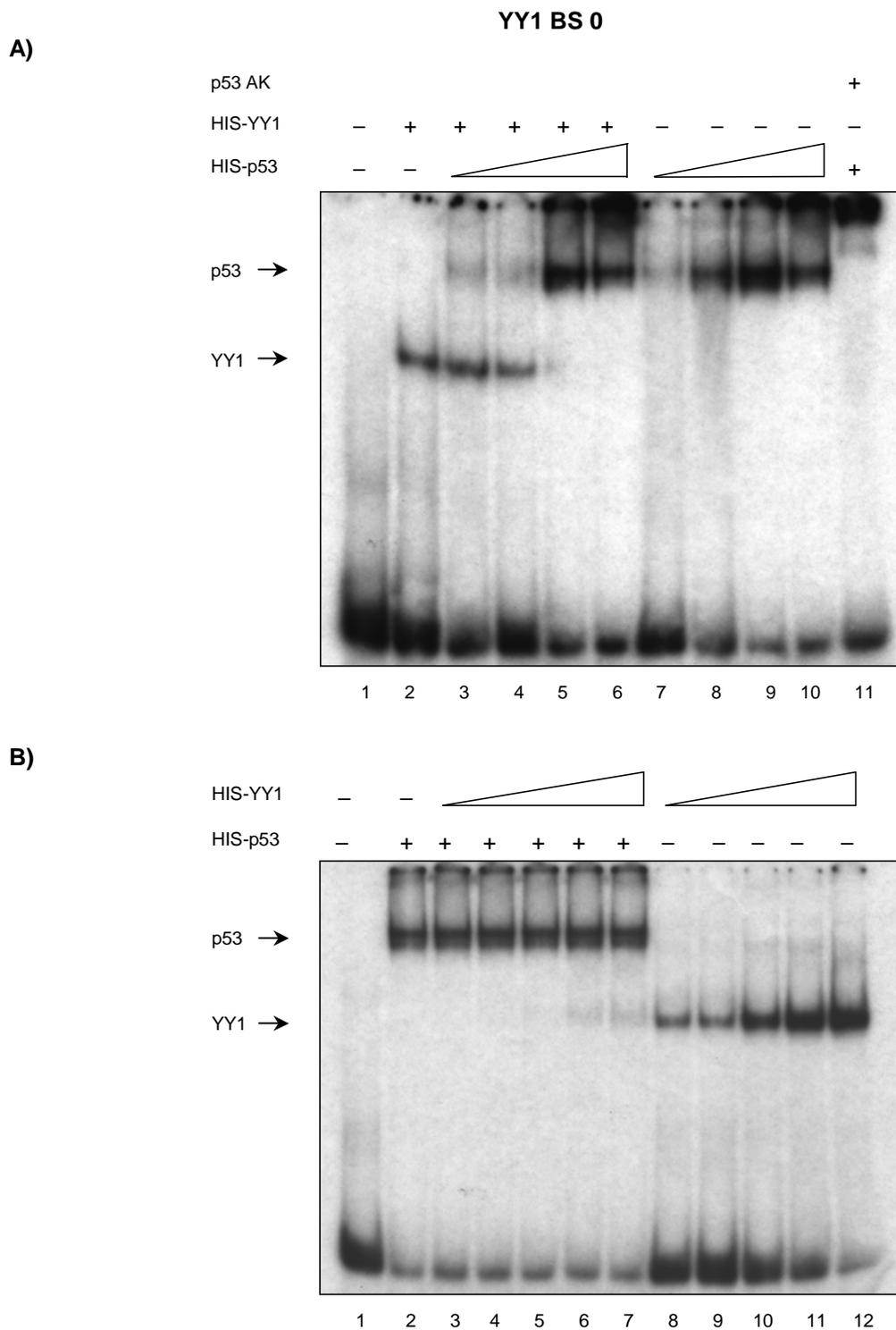


Abb. 25: Einfluss von p53 auf die Bindung von YY1 an seine Bindestelle 0
 250 pg einer [γ - 32 P]-markierten DNA-Probe, die die YY1-Bindestelle 0 (YY1-BS 0) von HPV8 enthält, wurden mit HIS-YY1 und/oder HIS-p53 inkubiert. Das Symbol + bzw. - bedeutet eine bzw. keine Zugabe der angegebenen Proteine. **A)** Die Menge an HIS-YY1 wurde konstant gehalten (Spuren 2-6), und die Menge an HIS-p53 wurde erhöht (Spuren 3-6 und 7-10). Zugabe eines gegen p53 gerichteten monoklonalen Antikörpers (AK) (Spur 11). **B)** Die Menge an HIS-p53 wurde konstant gehalten (Spuren 2-7), und die Menge an HIS-YY1 wurde erhöht (Spuren 3-7 und 8-12). DNA-Probe ohne Proteinzugabe (Spur 1). Die Position des YY1-DNA- bzw. des p53-DNA-Komplexes ist mit Pfeilen markiert.

Wie man in Abb. 25 erkennt, konnte neben der bekannten Bindung von YY1 an seine Bindestelle 0 in der NCR von HPV8 auch eine Bindung von p53 an diese Bindestelle gefunden werden (Abb. 25A, Spuren 7-10). Bei Zugabe beider Proteine konnte kein ternärer, langsamer laufender Komplex nachgewiesen werden, der auf eine Interaktion zwischen p53, YY1 und der DNA zurückgeführt werden könnte. Stattdessen konnte bei ansteigender p53-Konzentration eine deutliche Reduktion der YY1-Bindung beobachtet werden, was bedeutet, dass p53 YY1 von seiner Bindestelle 0 verdrängen kann (Abb. 25A, Spuren 5 und 6). Auch bei ansteigender YY1-Konzentration konnte diese Verdrängung von YY1 durch p53 nicht aufgehoben werden (Abb. 25B, Spuren 3-7).

Weitere Gel-Retardations-Experimente bezüglich der nur wenige Basenpaare vom M29-Element entfernt liegenden YY1-Bindestelle 1 ergaben, dass bei Einsetzen ungefähr gleicher Mengen YY1 und p53 beide Proteine an jeweils einen Teil der freien Oligonukleotide binden (Abb. 26A, Spur 6). Es konnte allerdings keine Bindung von YY1 und p53 an dasselbe Oligonukleotid gefunden werden. Bei Erhöhung der p53-Konzentration konnte YY1 nicht mehr an seine Bindestelle 1 binden, was bedeutet, dass p53 YY1 auch von dieser Bindestelle verdrängen kann (Spuren 7 und 8). Nach Erhöhung der YY1-Konzentration wurde zwar eine Bindung von YY1 an die noch freien Oligonukleotide beobachtet, aber p53 konnte nicht von seiner Bindestelle im M29-Element verdrängt werden (Abb. 26B, Spuren 7 und 8).

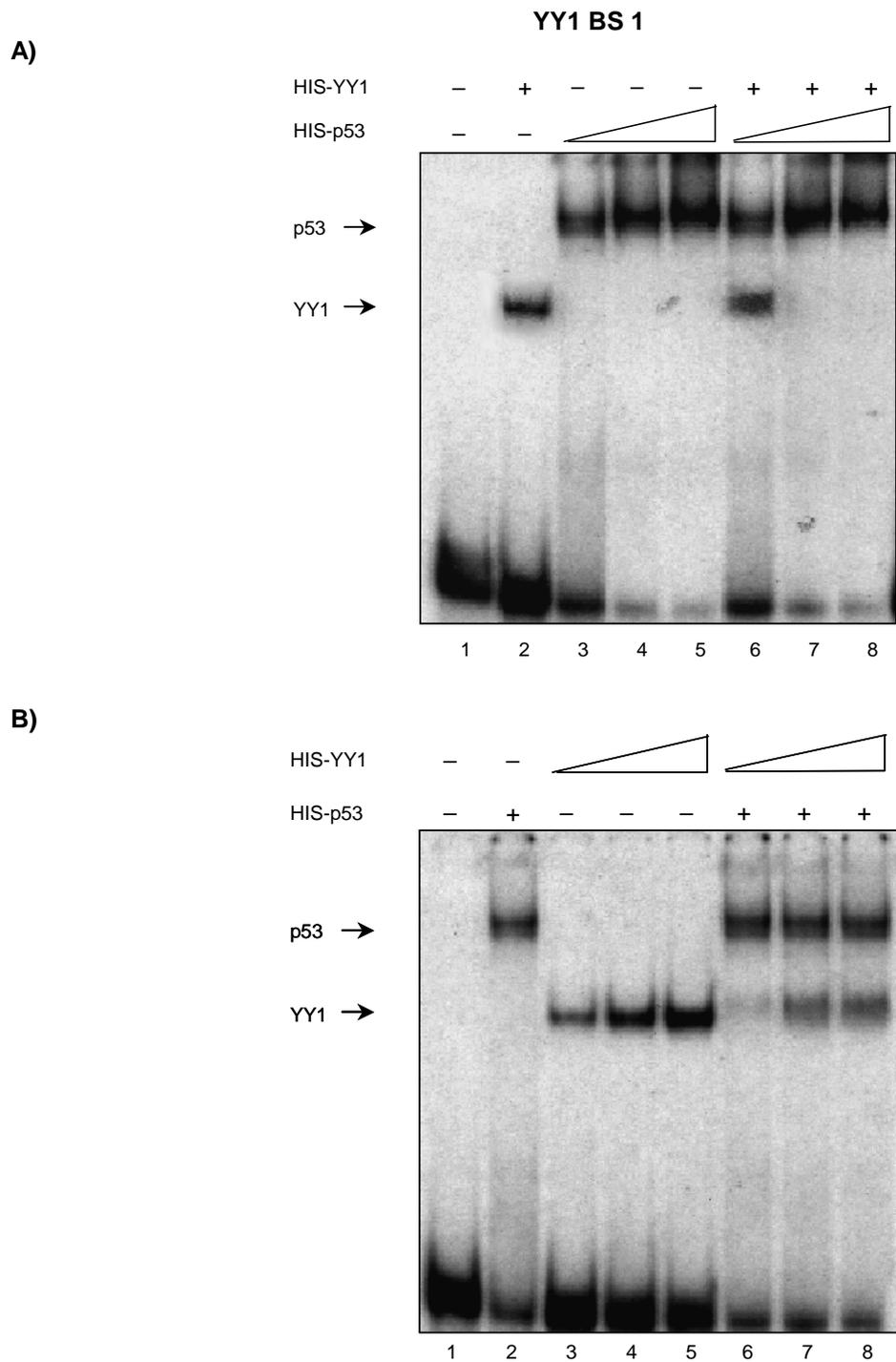


Abb. 26: Einfluss von p53 auf die Bindung von YY1 an seine Bindestelle 1
 250 pg einer [γ - 32 P]-markierten DNA-Probe, die das M29-Element und die YY1-Bindestelle 1 (YY1-BS 1) von HPV8 enthält, wurden mit HIS-YY1 und/oder HIS-p53 inkubiert. Das Symbol + bzw. - bedeutet eine bzw. keine Zugabe der angegebenen Proteine. **A)** Die Menge an HIS-YY1 wurde konstant gehalten (Spuren 6-8), und die Menge an HIS-p53 wurde erhöht (Spuren 3-5 und 6-8). **B)** Die Menge an HIS-p53 wurde konstant gehalten (Spuren 6-8), und die Menge an HIS-YY1 wurde erhöht (Spuren 3-5 und 6-8).
 DNA-Probe ohne Proteinzugabe (Spur 1). Die Position des YY1-DNA- bzw. des p53-DNA-Komplexes ist mit Pfeilen markiert.

5.4. Einfluss von YY1 auf die Replikation von HPV8

Der DNA-Replikationsursprungspunkt (origin of replication, *ori*) von HPV8 konnte wie bei allen diesbezüglich untersuchten Papillomviren innerhalb der NCR des viralen Genoms kartiert werden. Der minimale *ori* besteht aus dem Sequenzmotiv CAAC, welches die DNA-Bindestelle für das virale Hauptreplikationsprotein E1 darstellt, und aus dem M29-Element. Des Weiteren ist in *trans* neben der viralen Helikase E1 das Regulatorprotein E2 für die Replikation absolut notwendig (Karle, 1995; Akgül, 1999).

5.4.1. Auswirkung der YY1-Überexpression auf die transiente Replikation von HPV8

Aufgrund der Interaktion von YY1 mit dem für die Replikation notwendigen HPV8 E2-Protein und der Tatsache, dass eine YY1-Bindestelle in der NCR von HPV8 in unmittelbarer Nähe des *ori* lokalisiert ist, sollte im transienten Replikationstest in RTS3b Zellen überprüft werden, ob eine Überexpression von YY1 Einfluss auf die Replikation von HPV8 hat.

RTS3b Zellen wurden mit dem HPV8 Testkonstrukt pNCR8CAT, welches die gesamte NCR und Teile der benachbarten Leserahmen L1 und E6 enthält, sowie den Expressionsvektoren für HPV8 E1 (pCE1) und E2 (pCE2) cotransfiziert. Um den Einfluss von YY1 auf die Replikation zu untersuchen, erfolgte zudem eine Cotransfektion unterschiedlicher Mengen des YY1-Expressionsvektors (pXJYY1). Für die folgenden transienten Replikationstests wurden, wenn nicht anders erwähnt, jeweils 1 pmol des Replikationstestplasmids und jeweils 2 µg der E1- und E2-Expressionsvektoren eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Überexpression von YY1 die transiente Replikation von HPV8 gehemmt wird (Abb. 27).

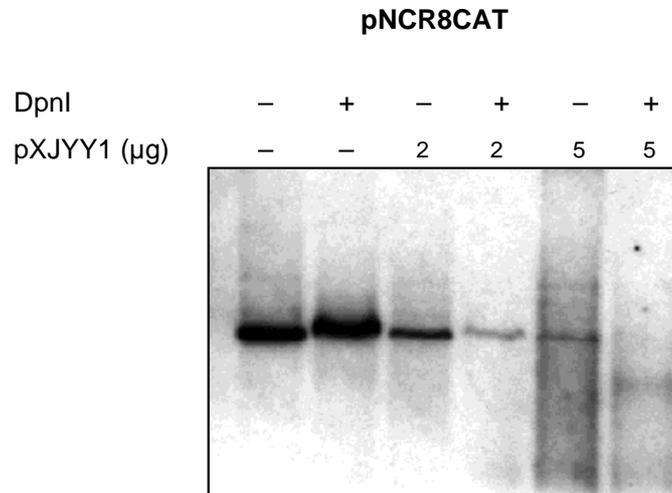


Abb. 27: **Einfluss der YY1-Überexpression auf die transiente Replikation von HPV8**

Transienter Replikationstest des Konstruktes pNCR8CAT in RTS3b Zellen bei Cotransfektion unterschiedlicher Mengen des YY1-Expressionsvektors pXJYY1. Die Replikationsfähigkeit des Konstruktes zeigt sich durch das Auftreten einer Bande nach Zugabe des Restriktionsenzym *Dpnl*.

5.4.2. Bedeutung der *ori*-nahen YY1-Bindestelle 1 bei der Repression der Replikation durch YY1

In der NCR von HPV8 wurde die YY1-Bindestelle 1 zwischen dem M29-Element und der A/T-Box kartiert (Widow, 1994) und grenzt demnach direkt an den Replikationsursprung. Aufgrund dieser Überlappung wäre es denkbar, dass YY1 durch Bindung an diese Bindestelle die Replikation von HPV8 hemmt. Daher wurde im weiteren die Bedeutung dieser YY1-Bindestelle auf die Repression der Replikation durch YY1 untersucht. Hierfür wurde in dem Konstrukt pLO8, welches die NCR von der E2-Bindestelle P3 bis zur A/T-Box umfasst, die YY1-Bindestelle 1 mutiert (Abb. 28A). Des weiteren sollte das Konstrukt pLO3 auf seine Replikationsfähigkeit untersucht werden, welches neben der E2-Bindestelle P4, die CAAC-Box sowie des M29-Element, aber keine YY1-Bindestelle besitzt. (Abb. 28A).

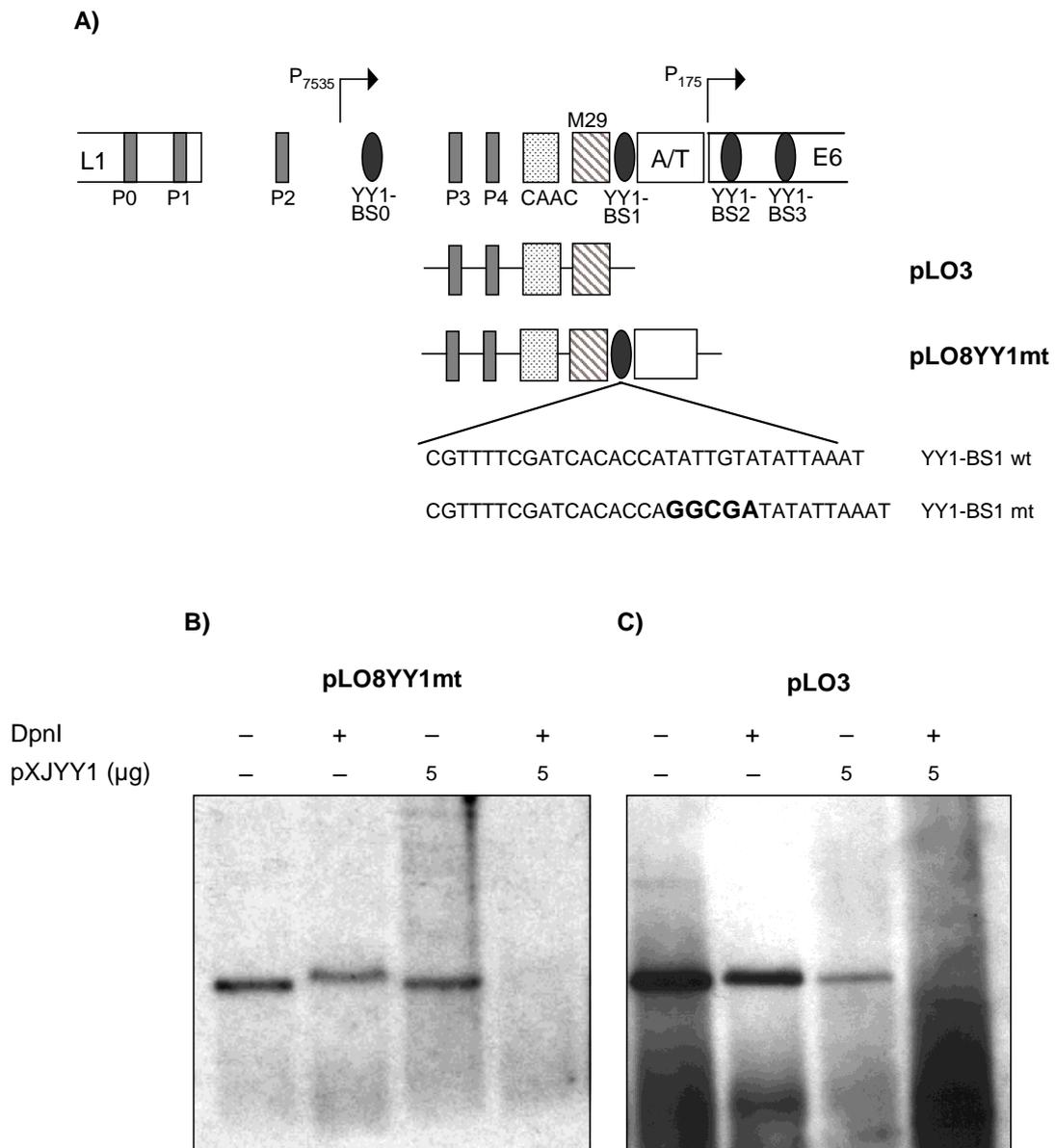


Abb. 28: **Bedeutung der *ori*-nahen YY1-Bindestelle 1 für die Repression der HPV8 Replikation durch YY1**

A) Darstellung der kompletten NCR von HPV8 sowie der verwendeten Testkonstrukte pLO3 und pLO8YY1mt. **B) + C)** Transienter Replikationstest der Konstrukte **B)** pLO8YY1mt und **C)** pLO3 bei Cotransfektion des YY1-Expressionsvektors pXJYY1.

Im transienten Replikationstest konnte gezeigt werden, dass YY1 auch dann in der Lage war die Replikation von HPV8 zu hemmen, wenn die *ori*-nahe YY1-Bindestelle 1 mutiert (Abb. 28B) bzw. nicht vorhanden war (Abb. 28C). Mit diesen Experimenten konnte demnach nachgewiesen werden, dass für die Repression der HPV8 Replikation durch YY1 die DNA-Bindung nicht notwendig ist.

5.4.3. Bedeutung der E2-Bindestellen P0, P1, P2, P3 und P4 für die Repression der Replikation durch YY1

Das virale E2-Protein wurde neben dem E1-Protein in allen bisher untersuchten Studien zur transienten Replikation von Papillomviren, mit Ausnahme des kutanen HPV1a (Gopalakrishnan & Khan, 1994), als notwendiger Faktor in *trans* identifiziert (Chiang *et al.*, 1992). Auch bei HPV8 ist das Vorhandensein des E2-Proteins sowie die Bindung von E2 an die DNA für die Replikation essentiell (Karle, 1995; Akgül, 1999).

Da YY1 die Replikation von HPV8 nicht durch direkte Bindung an die DNA hemmt, wäre es aufgrund der gezeigten Interaktion von YY1 mit dem E2-Protein denkbar, dass YY1 durch Bindung an E2 in *ori* Nähe gebracht wird. Um dies zu klären, wurde der Einfluss von YY1 auf die Replikation des Konstruktes p01234CAT untersucht, welches von pNCR8CAT abgeleitet ist und die bereits in Kapitel 5.1.2. (Abb. 8A) dargestellten Mutationen in den E2-Bindestellen aufweist. Des Weiteren wurden in dem Konstrukt pLO8, analog zu den Mutationen in p01234CAT, die vorhandenen E2-Bindestellen P3 und P4 mutiert und auch dieses bei Überexpression von YY1 auf seine Replikationsfähigkeit untersucht.

Die Analyse im transienten Replikationstest ergab, dass beide Konstrukte normal replizieren und durch YY1 in ihrer Replikation gehemmt werden konnten (Abb. 29A und B). Dies zeigt, dass die in der NCR kartierten E2-Bindestellen weder bei der Hemmung der Replikation durch YY1 eine Rolle spielen noch bei einer effizienten transienten Replikation. Vermutlich bindet E2 hierfür an das M29-Element (Akgül, persönliche Mitteilung).

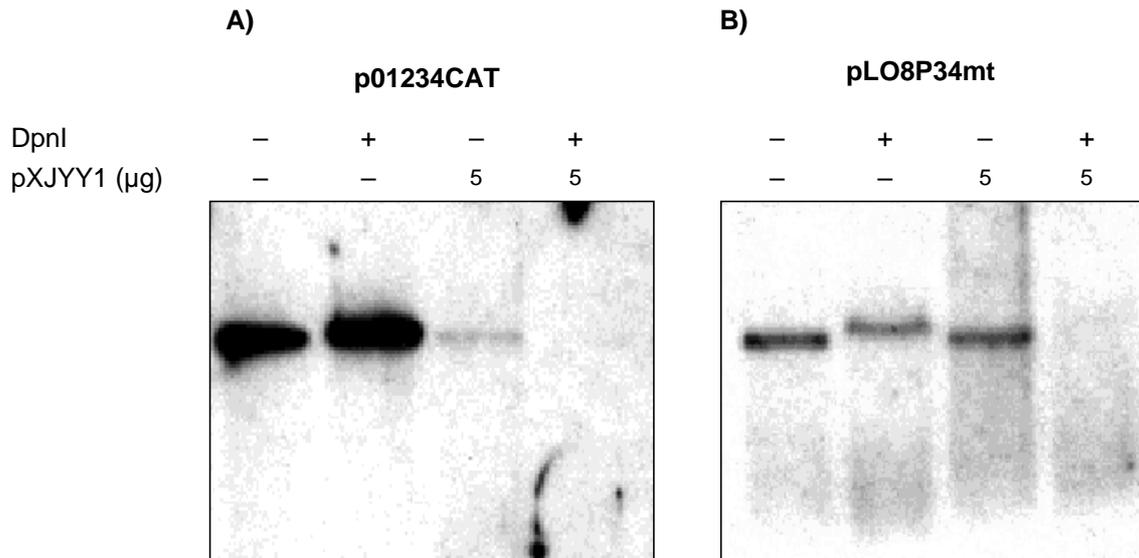


Abb. 29: **Bedeutung der in der HPV8 NCR kartierten E2-Bindestellen P0-P4 für die Hemmung der Replikation durch YY1**

Transienter Replikationstest der Testkonstrukte **A)** p01234CAT bzw. **B)** pLO8P34mt bei Cotransfektion des YY1-Expressionsvektors pXJYY1.

5.4.4. Einfluss der E2-Überexpression auf die Hemmung der Replikation durch YY1

Lee *et al.* (1998) konnten zeigen, dass YY1 die Replikation von HPV11 und 18 vermutlich durch Interferenz mit den E2-Protein Funktionen hemmt, da die Repression im zellfreien Replikationstest durch Erhöhung der E2-Konzentration (10-fache Menge) aufgehoben werden konnte. Um zu testen, ob dies auch bei HPV8 der Fall ist, wurde die E2-Konzentration bei konstanter Menge des YY1-Expressionsvektors pXJYY1 im transienten Replikationstest des Konstruktes pNCR8CAT erhöht. Hierfür wurde anstelle von pCE2 der E2-Expressionsvektor pXJE2 verwendet, da in diesem Vektor das E2-Protein stärker exprimiert wird und dadurch die Menge der zu transfizierenden DNA niedriger gehalten werden konnte.

Auch bei einem 50-fachen Überschuss an E2-Expressionsvektor konnte nach wie vor eine Hemmung der Replikation durch YY1 beobachtet werden (Abb. 30). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass YY1 die transiente Replikation von HPV8 durch einen anderen Mechanismus hemmt als bei den genitalen HPV Typen 11 und 18.

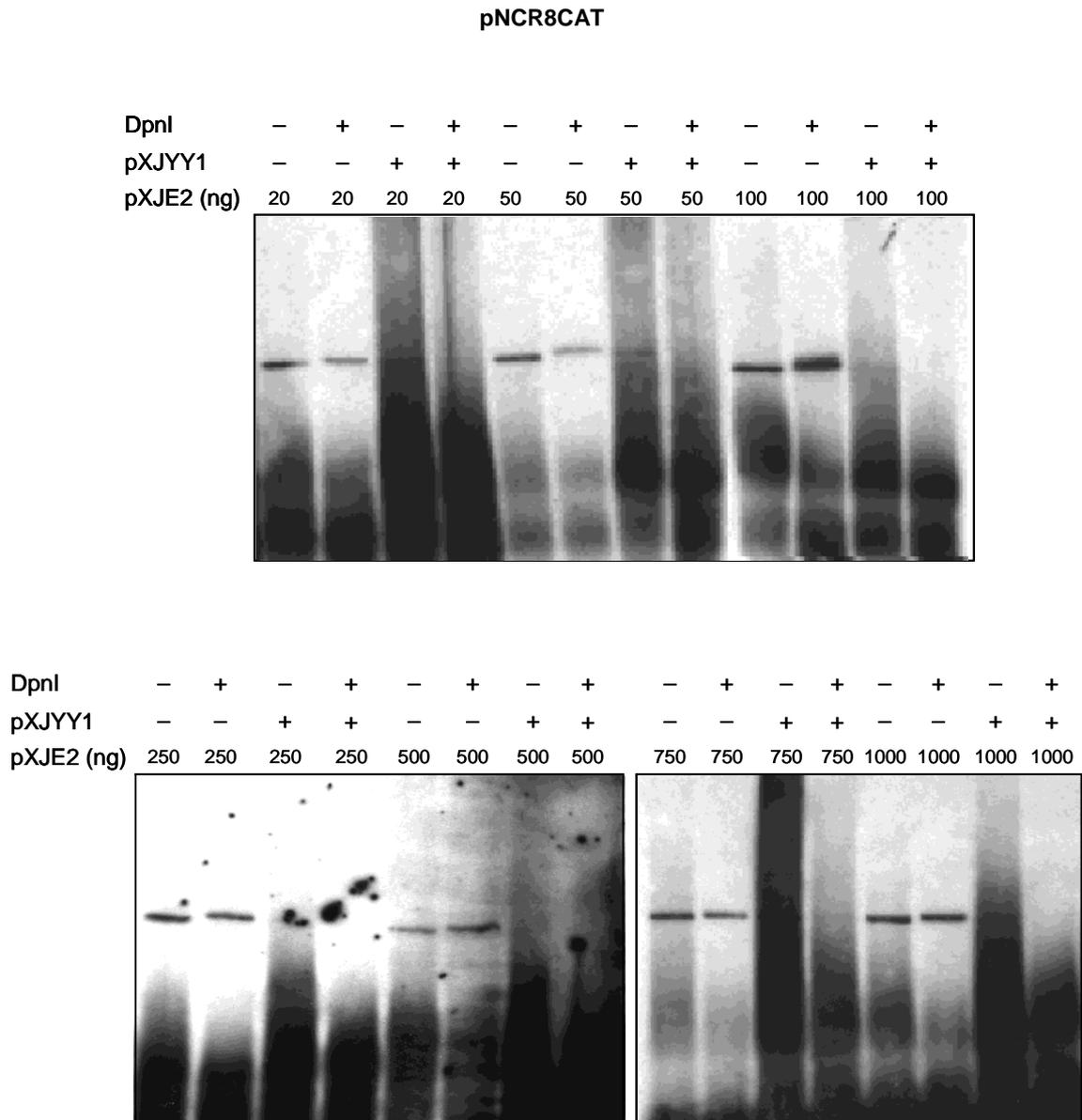


Abb. 30: **Einfluss der E2-Überexpression auf die Repression der HPV8 Replikation durch YY1**
 Transienter Replikationstest des Testkonstruktes pNCR8CAT bei Cotransfektion konstanter Mengen pXJYY1 (5 µg) sowie unterschiedlicher Mengen des E2-Expressionsvektors pXJE2 (in ng Mengen angegeben).

5.5. Nachweis der YY1-Expression in Gewebeschnitten gesunder Haut

YY1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in einer Vielzahl verschiedener Zellen gefunden wurde. Einige Daten sprechen zwar dafür, dass YY1 ein differenzierungsabhängiger Transkriptionsfaktor ist (Lee *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994; Ai *et al.*, 2000), aber es war bislang unklar, ob die Expression des YY1-Proteins ebenso vom Differenzierungszustand der Keratinozyten abhängt wie der Lebenszyklus von Papillomviren. Um dies zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte gesunder Haut (Mammagewebe) immunhistochemisch auf ihre YY1-Expression untersucht. Wie man in Abb. 32 erkennen kann, wird YY1 in allen Zellschichten der Epidermis exprimiert (Braunfärbung). Während allerdings in den unteren Bereichen jede einzelne Zelle eine starke YY1-Expression aufwies, blieben in den oberen Schichten einige Zellen ungefärbt (Blaufärbung).

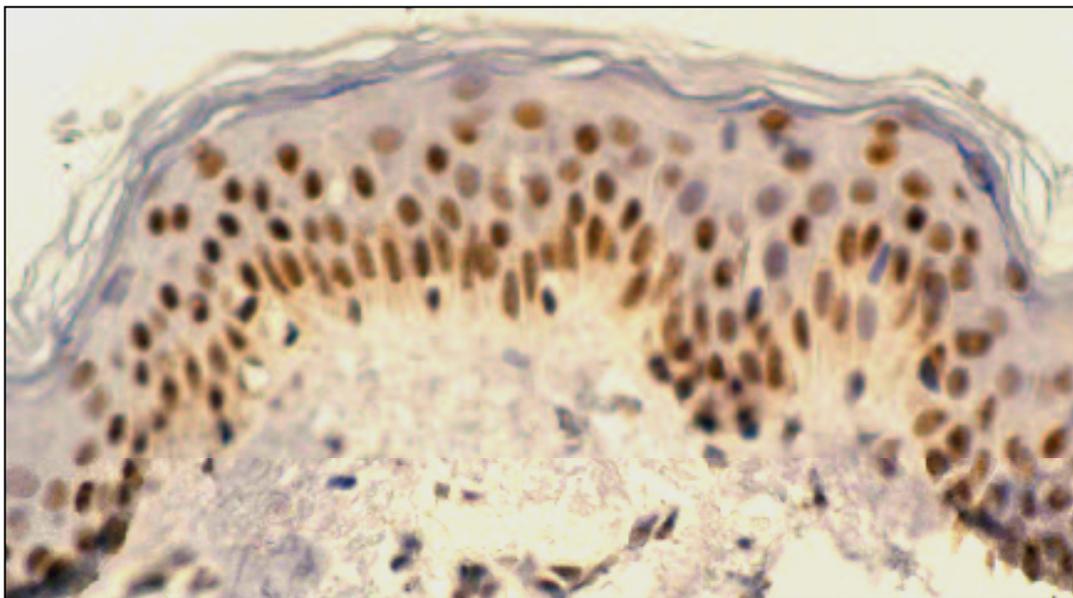


Abb. 32: **Immunhistochemischer Nachweis von YY1 in gesunder Haut**

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte gesunder Haut (Mammagewebe) wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen, gegen YY1 gerichteten Antikörper inkubiert und mit DAB (Diaminobenzidin; Braunfärbung) als Substrat gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Harris Hämalaun (Blaufärbung); (400x).

6. DISKUSSION

Der zelluläre Transkriptionsfaktor YY1 kontrolliert durch Bindung an seine Erkennungssequenzen in Promotorregionen die Genexpression mehrerer Viren, die persistierende, latente Infektionen hervorrufen können (Shi *et al.*, 1997). Auch im Bereich der NCR des *Ev*-assoziierten humanen Papillomvirus Typ 8 (HPV8) wurden YY1-Bindestellen charakterisiert (Widow, 1994), die unterschiedlichen Einfluss auf den frühen Onkogenpromotor P₁₇₅ ausüben, aber in der Summe einen positiven Effekt auf die E6/E7 Transkription vermitteln (Pajunk *et al.*, 1997). YY1 kann nicht nur mit zahlreichen zellulären Proteinen interagieren (z. B. TBP, TFIIB, c-myc, Sp1) (Usheva & Shenk, 1994; Shrivastava *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1993), sondern auch mit viralen wie z. B. dem adenoviralen E1A (Lewis *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995) sowie dem Hauptregulatorprotein E2 der Papillomviren 16, 18, 5 und 8 (Pajunk, 1999). Während die Charakterisierung der YY1-Bindestellen im HPV8 E2-Protein eine Bindung von YY1 an den C-Terminus von E2 ergab, konnte keine Bindung im N-terminalen Bereich des E2-Proteins detektiert werden. Die variable „Hinge“-Region des HPV8 E2-Proteins wurde bisher nicht weiter auf eine Interaktion mit YY1 untersucht. Über sie interagiert beispielsweise der Transkriptionsfaktor Sp1 mit dem E2-Protein von HPV8 (Schmidt, 1999). Mittels Protein-Affinitätschromatographie konnte nachgewiesen werden, dass YY1 mit zwei Bereichen in der „Hinge“-Region von HPV8 E2 interagiert. Bei Verwendung von GST-YY1 und *in vitro* translatierter „Hinge“-Region von E2 konnte allerdings eine deutlich schwächere Interaktion beobachtet werden als bei Verwendung von GST-fusionierter E2 „Hinge“-Region mit HIS-YY1. Dies deutet, verglichen mit dem GST-Fusionsprotein, auf eine andere Konformation des *in vitro* translatierten Proteins hin. Oftmals kann es durch Interaktion von YY1 mit anderen Proteinen zu einer Modifikation der YY1 Aktivität (Lee *et al.*, 1995) oder zu einer kooperativen Stimulierung der Transkription kommen (Lee *et al.*, 1993). So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass YY1 und E1A den p53 Promotor synergistisch aktivieren (Furlong *et al.*, 1996). Auch die E2-Proteine von Papillomviren können die Transkription zusammen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP1, Oct1 oder Sp1 synergistisch aktivieren (Ushikai *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1991). Für HPV18 konnte gezeigt werden, dass YY1 und E2 die Promotoraktivität kooperativ beeinflussen und den HPV18 P₅₆ Promotor sogar synergistisch aktivieren (Pajunk, 1999).

In transienten Transfektionsexperimenten wurde untersucht, ob die Interaktion von YY1 mit dem HPV8 E2-Protein eine funktionelle Bedeutung für die Promotoraktivität von HPV8 hat. Sowohl E2 als auch YY1 konnten die Transkription aktivieren, bei Cotransfektion beider Proteine konnte ein synergistischer Effekt auf die Promotoraktivität von HPV8 beobachtet werden. Mutationsanalysen ergaben, dass hierfür die in der NCR von HPV8 kartierten E2-Bindestellen P0-P4 notwendig sind. Dennoch konnte auch bei inaktivierten Bindestellen ein additiver Effekt sowie eine leichte Aktivierung durch E2 alleine beobachtet werden. Möglicherweise ist hierfür die erst kürzlich gezeigte Bindung von E2 an das M29-Element in der NCR von HPV8 verantwortlich (Akgül, persönliche Mitteilung). Auch die YY1-Bindestellen und somit die Bindung von YY1 an die DNA erwiesen sich notwendig für den durch YY1 und E2 vermittelten synergistischen Effekt. Hierfür reichten allerdings zwei der vier vorhandenen YY1-Bindestellen aus, wobei es nicht von Bedeutung war, ob es sich um die beiden YY1-Bindestellen innerhalb der NCR oder um die beiden am Beginn des E6-Leserahmens handelte. Da die Deletion des N-terminalen Bereichs der „Hinge“-Region im E2-Expressionsvektor zu einem Verlust der synergistischen Aktivierung führte, scheint neben der Bindung von YY1 und E2 an die DNA auch eine Interaktion der beiden Proteine miteinander über die YY1-Bindedomäne in diesem Bereich des E2-Proteins notwendig zu sein. Auch für YY1 und E1A konnte beobachtet werden, dass für eine synergistische Aktivierung des p53 Promotors eine Wechselwirkung der beiden Proteine notwendig ist (Furlong *et al.*, 1996).

Unklar war bislang, ob YY1 noch mit weiteren früh im Infektionszyklus von HPV8 exprimierten Proteinen interagiert. Während mittels Protein-Affinitätschromatographien nur eine schwache Wechselwirkung mit dem E6- und keine Wechselwirkung mit dem E1-Protein nachgewiesen werden konnte, war eine sehr starke Interaktion mit dem E7-Protein von HPV8 zu beobachten. YY1 konnte auch mit dem E7-Protein des „hoch-onkogenen“ Papillomvirus Typ 18 (HPV18) interagieren, welchem im Gegensatz zu HPV8 E7 stark immortalisierende Eigenschaften zugeschrieben werden (Yamashita *et al.*, 1993; Münger *et al.*, 1989). In transienten Transfektionen konnte E7 weder die Promotoraktivität von HPV8 noch die Aktivierung der Transkription durch YY1 beeinflussen, was den Schluss zulässt, dass die Interaktion von YY1 und E7 keine funktionelle Bedeutung für die HPV8 Transkription hat. Aus diesem Grund wurde hier nicht weiter auf die Komplexbildung von YY1 mit E7 eingegangen.

Das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 ist ein wichtiger Zellzyklus-Regulator, der bei Schäden in der zellulären DNA den Zellzyklus in der G1-Phase blockiert, um so die Reparatur zu ermöglichen (Lane, 1992). Der Degradation des p53-Proteins, beispielsweise durch Interaktion mit dem E6-Protein der „hoch-onkogenen“ HPV Typen 16 und 18, wird bei der Tumorprogression eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Werness *et al.*, 1990; Scheffner *et al.*, 1990). p53 kann ähnlich wie YY1 mit einer Vielzahl zellulärer und viraler Proteine interagieren sowie die Transkription vieler Gene durch Bindung an seine Erkennungssequenzen in der Promotorregion aktivieren (Ko & Prives, 1996). Auch im M29-Element und somit in unmittelbarer Nähe der YY1-Bindestelle 1 in der NCR von HPV8 konnte eine Bindestelle für p53 kartiert werden (Haigis, 1998). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob YY1 und p53 *in vitro* miteinander interagieren können bzw. sich in ihrer Aktivität gegenseitig beeinflussen. Es konnte in Protein-Affinitätschromatographie nachgewiesen werden, dass YY1 sowohl mit rekombinantem HIS-p53 als auch mit endogen vorhandenem p53 interagiert. p53 bindet an drei unabhängige Proteinbereiche, die im zentralen und C-terminalen Teil des YY1-Proteins liegen. Die erste p53-Bindedomäne, die sich zwischen den Aminosäuren (AS) 142 und 200 befindet, liegt innerhalb einer Repressionsdomäne des YY1-Proteins. Dieser Bereich dient als Zielsequenz für viele andere YY1-Interaktionspartner (Abb. 33) wie beispielsweise die Histon-Deacetylasen (HDAC) 1-3, welche die repressorische Funktion von YY1 unterstützen (Yang *et al.*, 1996, 1997). Zwei weitere p53-Bindedomänen konnten im C-terminalen Bereich innerhalb der Zinkfinger motive zwischen den AS 260 und 331 bzw. den AS 331 und 414 identifiziert werden. Auch diese Proteinregion wurde als spezifische Bindedomäne vieler anderer Proteine charakterisiert (Abb. 33), wie z.B. für den zellulären Transkriptionsfaktor Sp1 (Lee *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1993). Die meisten Proteine, die mit YY1 interagieren, binden allerdings genau wie p53 sowohl an die zentrale Repressionsdomäne als auch an den C-Terminus. Beispiele hierfür sind TBP, CBP/p300, TFIIB (Austen *et al.*, 1997), E1A (Lewis *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995), c-myc (Austen *et al.*, 1998), sowie das HPV8 E2-Protein (Pajunk, 1999). Bemerkenswert ist, dass viele der genannten Proteine auch mit p53 interagieren und es infolgedessen zu einer Konkurrenz um die Bindung an YY1 kommen könnte.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass YY1 über seinen C-Terminus mit einem weiteren wichtigen Zellzyklus regulierenden Protein, dem Retinoblastomprotein (Rb), interagiert (Petkova *et al.*, 2001). Da diese YY1/Rb Komplexbildung in der G0/G1 Phase stärker ist als in der S-Phase des Zellzyklus, handelt es sich um eine Zellzyklus abhängige Interaktion, die die Bindung von YY1 an die DNA blockiert.

YY1 induziert in einigen ruhenden Zellen den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus, und es wird spekuliert, dass dies durch das Rb-Protein reguliert wird. Aufgrund der gezeigten Interaktion von YY1 mit p53 wäre es denkbar, dass hierbei auch p53 eine entscheidende Rolle spielt.

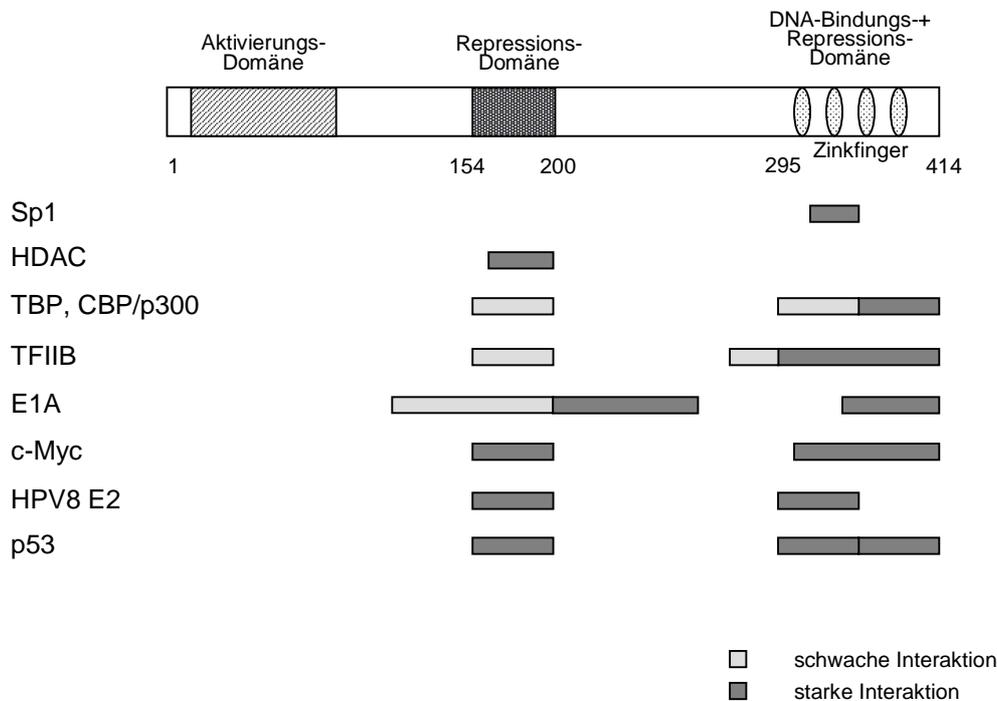


Abb. 33: **Lokalisation der Bindedomänen für virale und zelluläre Proteine im YY1-Protein**
Die Struktur des YY1-Proteins mit seinen funktionellen Domänen ist schematisch dargestellt. Die mit den verschiedenen Proteinen interagierenden Bereiche sind eingezeichnet. Die Nummern entsprechen der Aminosäure-Position im YY1-Protein; (modifiziert nach Thomas & Seto, 1999).

Wie bereits erwähnt, resultiert die Interaktion von YY1 mit anderen Proteinen häufig entweder in einer kooperativen Stimulierung der Promotoraktivität (Lee *et al.*, 1993; Furlong *et al.*, 1996) oder in einer Modifikation der YY1 Aktivität. So führt z.B. die Wechselwirkung mit dem adenoviralen E1A-Protein, vermittelt durch den Cofaktor p300, dazu, dass YY1 die Transkription des AAV P5 Promotors nicht mehr reprimiert sondern aktiviert (Lee *et al.*, 1995). Ob die Wechselwirkung von YY1 mit p53 Auswirkung auf die HPV8 Transkription bzw. die YY1-vermittelte Promotoraktivierung hat, wurde in transienten Transfektionsexperimenten überprüft. Sowohl in der p53 negativen Zelllinie H1299 als auch in der p53 positiven Cervixkarzinom-Zelllinie C33A konnte p53 die Promotoraktivität von HPV8 reprimieren sowie die durch YY1-Überexpression vermittelte Aktivierung der Transkription aufheben.

In C33A Zellen konnten bereits geringe Mengen p53 zu einer Repression der HPV8 Transkription führen, die durch Erhöhung der p53-Konzentration nicht verstärkt wurde. In H1299 Zellen nahm hingegen die Repression proportional zur p53 Menge ab. Hierfür könnte einerseits die endogene YY1 Menge und andererseits das Vorhandensein bzw. das Fehlen von endogenem p53 in den unterschiedlichen Zelllinien verantwortlich sein. H1299 Zellen exprimieren endogen deutlich mehr YY1 als C33A Zellen. Versuche zur Stärke der YY1- und p53-Expression nach Transfektion unterschiedlicher Mengen der jeweiligen Expressionsvektoren konnten zeigen, dass in C33A Zellen mit 100 ng YY1-Expressionsvektor eine vergleichbare YY1-Expression erzielt werden konnte wie endogen in H1299 Zellen exprimiert wird. Zudem enthalten H1299 Zellen im Gegensatz zu C33A Zellen kein endogenes p53. Beides könnte erklären, dass in H1299 Zellen exogen mehr p53 zugegeben werden muss als in C33A Zellen.

Die Beobachtungen, dass eine YY1-Überexpression den repressorischen Effekt durch geringe p53 Mengen deutlich in C33A Zellen und nur geringfügig in H1299 Zellen aufheben konnte, sowie die Tatsache, dass YY1 in H1299 Zellen erst bei deutlicher Überexpression die Transkription aktivieren konnte, sind möglicherweise ebenfalls durch die unterschiedliche endogene YY1 Menge zu erklären. Die starke endogene Expression von YY1 in H1299 Zellen führt vermutlich zu einer Erhöhung der basalen Transkriptionsaktivität.

Welche Rolle die Bindung von p53 an die DNA für die Repression spielt, wurde mit Hilfe der DNA-bindungsdefekten p53 Mutanten p53R248W und p53R273C überprüft. Mittels Protein-Affinitätschromatographien konnte nachgewiesen werden, dass YY1 ebenso effizient an die p53 Mutanten bindet wie an das Wildtyp Protein. In transienten Transfektionsstudien konnte beobachtet werden, dass beide Mutanten in geringer Konzentration die HPV8 Transkription nicht so effizient reprimieren wie das Wildtyp Protein. Erst größere Mengen der Mutanten waren hierzu in der Lage. Auch bei einer Vielzahl anderer zellulärer und viraler Promotoren, die durch Wildtyp p53 reprimiert werden, konnte keine Repression durch am Codon 248 und 273 mutiertes p53 nachgewiesen werden (Subler *et al.*, 1992; Deb *et al.*, 1992). Dass bei Erhöhung der p53-Konzentration auch die Mutanten reprimierend auf die HPV8 Transkription wirkten, lässt vermuten, dass mindestens zwei verschiedene von der p53-Konzentration abhängige Mechanismen die Hemmung der Transkription durch p53 bewirken. Während für eine Repression durch geringe p53 Mengen die Bindung von p53 an die DNA notwendig ist, scheinen größere Mengen p53 die Transkription DNA-bindungsunabhängig zu reprimieren.

Ein Vergleich der DNA-Erkennungssequenzen für YY1 und p53 zeigt, dass die Kernelemente in beiden Fällen die Basenabfolge 5'-CATN-3' aufweisen (El-Deiry *et al.*, 1992; Yant *et al.*, 1996). Betrachtet man unter diesem Aspekt die YY1-Bindestellen in der NCR von HPV8, so kann man erkennen, dass die YY1-Bindestelle 0, nahe des späten Promotors P₇₅₃₅ einer kompletten p53-Erkennungssequenz entspricht. In Gel-Retardations-Experimenten konnte beobachtet werden, dass p53 an die in unmittelbarer Nähe zum späten Promotor P₇₅₃₅ lokalisierte YY1-Bindestelle 0 in der NCR von HPV8 bindet und dass p53 in bereits geringen Konzentrationen YY1 von dieser Bindestelle verdrängt. Die YY1-Bindestelle 1 in der NCR von HPV8 liegt nur wenige Basenpaare entfernt von dem M29-Element, welches eine Bindestelle für p53 darstellt (Haigis, 1998). Bei Einsetzen gleicher Mengen YY1 und p53 konnte in Gel-Retardations-Experimenten keine Bindung beider Proteine an dasselbe Oligonukleotid gefunden werden. Bei Erhöhung der p53 Konzentration wurde YY1 ebenso von seiner Bindestelle 1 verdrängt wie von der Bindestelle 0. Nach Erhöhung der YY1-Konzentration konnte YY1 zwar an die noch freien Oligonukleotide binden, aber p53 nicht von seiner Bindestelle im M29-Element verdrängen. Die Konkurrenz um Bindestellen spielt bei der Regulation von Promotoren häufig eine zentrale Rolle. So konnte beobachtet werden, dass YY1 und SRF (serum response factor) um die Bindung an das Serum Response Element (SRE) im *c-fos* Promotor kompetieren und eine Überexpression von SRF die YY1-vermittelte Repression aufheben kann (Gualberto *et al.*, 1992). Es kann demnach spekuliert werden, dass die Verdrängung von YY1 durch p53 bei der Repression der HPV8 Transkription durch niedrige p53-Konzentrationen eine entscheidende Rolle spielt.

Da bei Überexpression von p53 für die Repression der HPV8 Transkription allerdings keine Bindung von p53 an die DNA notwendig ist, muss noch ein weiterer Repressionsmechanismus existieren. Bei Promotoren, die keine p53-Bindestellen aufweisen und die demnach durch p53 DNA-bindungsunabhängig reprimiert werden, wird angenommen, dass die Inhibition durch Interaktion von p53 mit TBP oder verschiedenen TAFs zustande kommt (Ragimov *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1992; Farmer *et al.*, 1996). Dass dies allerdings nicht den alleinigen Mechanismus der p53-bedingten Repression darstellt, wurde am Beispiel des Hitzeschockprotein 70 (*hsp 70*) Promotors gezeigt, der durch Interaktion von p53 mit dem CCAAT-bindenden Faktor (CBF), einem Aktivator des *hsp 70* Promotors, reprimiert wird (Agoff *et al.*, 1993).

Demnach könnte die durch Überexpression von p53 vermittelte DNA-bindungsunabhängige Repression der HPV8 Transkription durch die Interaktion von p53 sowohl mit TBP oder anderen Proteinen des basalen Transkriptionsinitiationskomplexes, als auch mit YY1 oder einem anderen wichtigen Regulatorprotein zustande kommen. Ähnliche antagonistische Effekte durch p53 und YY1 wurden mit dem PTPA Gen (Phosphotyrosyl Phosphatase Aktivator) Promotor beobachtet (Janssens *et al.*, 2000). Auch hier konnte p53 die Transkription inhibieren, und nur eine starke Überexpression von YY1 konnte diese Repression aufheben. Da keine Bindung von p53 an seine Erkennungssequenz innerhalb dieses Promotors gefunden werden konnte, wird angenommen, dass p53 weder durch Bindung an die DNA reprimiert, noch dass es zu einer Konkurrenz von YY1 und p53 um überlappende Bindestellen kommt. Allerdings konnte von Janssens *et al.* keine direkte Interaktion von YY1 und p53 detektiert werden, weswegen spekuliert wurde, dass ein drittes Protein involviert ist, beispielsweise die Coaktivatoren p300 und CBP. Diese Daten deuten darauf hin, dass ähnliche Effekte von p53 und YY1 durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden können, die sich allerdings nicht gegenseitig ausschließen müssen. So könnte bei der Repression der HPV8 Transkription durch p53 auch noch ein zusätzlicher dritter Faktor involviert sein, der zelltypspezifisch nicht in H1299 Zellen aber in C33A Zellen vorhanden ist und in diesen die Transkriptionsaktivierung durch YY1 verstärkt. Dies könnte sowohl die stärkere YY1-vermittelte Aktivierung in C33A Zellen erklären als auch die Aufhebung der p53 Repression bei Überexpression von YY1. Eine zelltypspezifische Regulation durch YY1 ist nicht ungewöhnlich und konnte z.B. auch bei HPV18 beobachtet werden (Bauknecht *et al.*, 1996; Jundt *et al.*, 1995). YY1 aktiviert die Expression von E6/E7 in Anwesenheit des C/EBP β -Transkriptionsfaktors, der in HeLa Zellen exprimiert wird, während in Zelllinien, die bezüglich C/EBP β negativ sind, Repression stattfindet.

Der Effekt der Transkriptionshemmung bei Überexpression von p53 hätte auch durch Apoptoseinduktion zustande kommen können, da p53 bekanntermaßen in verschiedenen Zellen Apoptose induzieren kann (Oren, 1994). Von der p53 Mutante R248W ist allerdings bekannt, dass sie nicht mehr in der Lage ist, in H1299 Zellen Apoptose zu induzieren (Friedlander *et al.*, 1996). Daher kann ausgeschlossen werden, dass der repressorische Effekt auf die Transkription von HPV8 bei Überexpression von p53 auf programmierten Zelltod zurückzuführen ist.

Da in der NCR von HPV8 Erkennungssequenzen für E2, p53 und YY1 dicht beisammen liegen und nicht nur YY1 und E2 bzw. YY1 und p53 miteinander interagieren, sondern auch p53 und E2 (Massimi *et al.*, 1999), könnte die physikalische Wechselwirkung dieser drei Proteine für die virale Genregulation von Bedeutung sein. Da YY1 zudem den p53 Promotor aktiviert (Furlong *et al.*, 1996), wird deutlich, wie komplex die Regulation durch diese Proteine ist.

Der DNA-Replikationsursprungspunkt (origin of replication, *ori*) von HPV8 wurde innerhalb des CAAC-Motivs und des M29-Elements kartiert (Karle, 1995; Akgül, 1999) und liegt demnach in unmittelbarer Nähe der YY1-Bindestelle 1 in der NCR von HPV8. Da YY1 des Weiteren mit dem für die Replikation notwendigen E2-Protein interagiert (Pajunk, 1999), wurde im transienten Test untersucht, ob YY1 einen Einfluss auf die Replikation von HPV8 hat. Es konnte gezeigt werden, dass YY1 die transiente Replikation von HPV8 inhibiert. Da diese Repression unabhängig vom Vorhandensein einer YY1-Bindestelle war, ist hierfür keine Bindung von YY1 an die DNA nötig. Auch die Mutation der E2-Bindestellen P0-P4 hatte keine Auswirkung auf die Repression durch YY1. Für HPV11 und 18 konnte gezeigt werden, dass YY1 vermutlich durch Interferenz mit den E2-Protein Funktionen die Replikation im zellfreien Test hemmt, da eine Erhöhung der E2-Konzentration den repressorischen Effekt durch YY1 aufheben konnte (Lee *et al.*, 1998). Auch hier war die Bindung von YY1 an die DNA nicht notwendig. Eine Überexpression von E2 im transienten Test konnte allerdings die YY1-vermittelte Repression der HPV8 Replikation nicht aufheben, was darauf hindeutet, dass YY1 die Replikation des kutanen HPV8 durch einen anderen Mechanismus hemmt als die der genitalen Papillomviren Typ 11 und 18. Dieser Unterschied könnte aber auch auf die verschiedenen Methoden zurückzuführen sein, da im transienten Replikationstest die Erhöhung der E2-Konzentration zu sehr unphysiologischen Bedingungen in der Zelle führt. Auch eine Überexpression des Hauptreplikationsproteins E1 konnte die YY1-vermittelte Repression der HPV8 Replikation im transienten Test nicht aufheben. Da zudem keine Interaktion von YY1 mit E1 nachgewiesen werden konnte, ist auszuschließen, dass die Inhibition durch Interferenz mit den E1-Protein Funktionen zustande kommt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass E2 an das M29-Element in der NCR von HPV8 bindet und dass die Mutation dieser E2-Bindestelle im Minimal-*ori* Konstrukt, bestehend aus dem CAAC-Motiv sowie dem M29-Element, zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit führt (Akgül, persönliche Mitteilung).

Daher wäre es denkbar, dass YY1 die Funktion des an das M29-Element gebundenen E2 durch Protein-Protein Interaktion bei der Replikation hemmt. Aufgrund der Wechselwirkung von YY1 mit vielen zellulären Proteinen, wäre es ebenso denkbar, dass die Inhibition durch Wechselwirkung von YY1 mit anderen für die Replikation von HPV8 notwendigen zellulären Proteinen wie z.B. der Topoisomerase I, dem Replikationsprotein A (RPA) oder der DNA-Polymerase α Primase zustande kommt. Allerdings wurde bisher keine Interaktion von YY1 mit einem dieser Proteine beschrieben. Auch p53 konnte als ein Suppressor der Papillomvirus Replikation identifiziert werden, der vermutlich durch Bindung an E2 die Replikation inhibiert (Lepik *et al.*, 1998; Massimi *et al.*, 1999). Dies macht erneut deutlich, dass das Zusammenspiel der drei Regulatorproteine YY1, p53 und E2 möglicherweise nicht nur wichtig für die Regulation der Transkription, sondern auch der Replikation ist.

YY1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das in einer Vielzahl verschiedener Zellen gefunden wurde. Einige Daten sprechen dafür, dass YY1 ein differenzierungsabhängiger Transkriptionsfaktor ist, da seine DNA-Bindungs Kapazität während der Differenzierung von menschlichen Teratocarcinomzellen und Myoblasten abnimmt (Lee *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1994). Des Weiteren konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass YY1 in undifferenzierten, aber nicht in differenzierten Keratinozyten die Transkription des HPV6 E1 Promotors negativ reguliert. Dies deutet darauf hin, dass YY1 zumindest bei dem „niedrig-onkogenen“ Papillomvirus Typ 6 eine regulatorische Rolle in undifferenzierten, aber nicht in differenzierten Keratinozyten spielt (Ai *et al.*, 2000). Da bislang unklar war, wie das Expressionsmuster von YY1 in der Epidermis aussieht, wurden Gewebeschnitte der Haut immunhistochemisch auf ihre YY1-Expression hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass YY1 zwar in allen Zellschichten der Epidermis exprimiert wird, in den oberen Bereichen jedoch vereinzelte Zellen ungefärbt blieben. Die Zellen im *Stratum basale* zeigten hingegen alle eine starke YY1-Expression. Diese Daten deuten darauf hin, dass es im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung in der Epidermis zu einer leichten Abnahme der Stärke der YY1-Expression kommt.

Eine p53-Expression konnte entweder in den Basalzellen oder in den granulären Schichten der Epidermis gefunden werden (Helander *et al.*, 1993; Spandau, 1994). Dies war abhängig von der Verwendung unterschiedlicher Antikörper, was den Schluss zulässt, dass p53 in den verschiedenen Zellschichten in unterschiedlichen Konformationen vorliegt.

Dies bedeutet, dass die unterschiedliche Stärke der YY1- und p53-Expression in den verschiedenen Zellschichten der Epidermis für die in dieser Arbeit gezeigten, von der

Konzentration dieser beiden Proteine abhängigen Regulation der HPV8 Genexpression entscheidend sein kann. Durch die Interaktion der drei wichtigen Regulatorproteine YY1, p53 und E2 miteinander, die hier erstmalig für YY1 und p53 nachgewiesen werden konnte, und durch das Zusammen- bzw. Gegenspiel dieser drei Proteine wird der Lebenszyklus von HPV8 mit zellulären Prozessen kontrolliert.

7. LITERATUR

Abate, C., Luk, D., Gentz, R., Rauscher, F. J. & Curran, T. (1990). Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of fos and jun: both fos and jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1032-1036.

Agoff, S. N., Hou, J. H., Linzer, D. I. H. & Wu, B. (1993). Regulation of the human hsp 70 promoter by p53. *Science* **259**: 84-87.

Ai, W., Narahari, J. & Roman, A. (2000). Yin Yang 1 negatively regulates the differentiation-specific E1 promoter of human papillomavirus type 6. *J. Virol.* **74**: 5198-5205.

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

Auersperg, N. (1969). Histogenetic behaviour of tumors. I. Morphologic variation in vitro and in vivo of two related human carcinoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* **43**: 151-173.

Austen, M., Luscher, B. & Luscher-Firzlaff, J. M. (1997). Characterization of the transcriptional regulator YY1. The bipartite transactivation domain is independent of interaction with the TATA box-binding protein, transcription factor IIB, TAFII55, or cAMP-responsive element-binding protein (CBP)-binding protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 1709-1717.

Austen, M., Cerni, C., Luscher-Firzlaff, J. M. & Luscher, B. (1998). YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation domain nor direct interaction with c-Myc. *Oncogene* **17**: 511-520.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. & Oren, M. (1993). Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**: 461-468.

Basu, A., Park, K., Atchison, M. L., Carter, R. S. & Avadhani, N. G. (1993). Identification of a transcriptional initiator element in the cytochrome c oxidase subunit Vb promoter which binds to transcription factors NF-E1 (YY1-1, delta) and Sp1. *J Biol. Chem.* **268**: 4188-4196.

Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.-D. & zur Hausen, H. (1992). Identification of a negative regulatory domain in the human papillomavirus type 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* **11**: 4607-4617.

Bauknecht, T., Jundt, F., Herr, I., Oehler, T., Delius, H., Shi, Y., Angel, P. & zur Hausen, H. (1995). A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promoter. *J. Virol.* **69**: 1-12.

- Bauknecht, T., See, R. H. & Shi, Y.** (1996). A novel C/EBP β -YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.* **70**: 7695-7705.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bushmeyer, S., Park, K. & Atchison, M. L.** (1995). Characterization of functional domains within the multifunctional transcription factor YY1. *J. Biol. Chem.* **270**: 30213-30220.
- Chiang, C.-M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. & Chow, L.** (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomavirus origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5799-5803.
- Chiang, C.-M. & Roeder, R. G.** (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* **267**: 531-536.
- Choo, K.-B., Pan, C.-C., Liu, M.-S., Ng, H.-T., Chen, C.-P., Lee, C.-P., Chao, C.-L., Meng, C.-L., Yeh, M.-Y. & Han, S.-H.** (1987). Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J. Med. Virol.* **21**: 101-107.
- Chow, L. T. & Broker, T. R.** (1997). Small DNA tumor viruses. In: *Viral Pathogenesis*. Nathanson, N. *et al.* (eds); Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 267-301.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172-2175.
- Coull, J. J., Romerio, F., Sun, J.-M., Volker, J. L., Galvin, K. M., Davie, J. R., Shi, Y., Hansen, U. & Margolis, D. M.** (2000). The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J. Virol.* **74**: 6790-6799.
- Crook, T., Wrede, D., Tidy, J. A., Mason, W. P., Evans, D. J. & Vousden, K. H.** (1992). Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet* **339**: 1070-1073.
- Cullen, A. P., Reid, R., Champion, M. & Lörincz, A. T.** (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNA in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* **65**: 606-612.
- Deb, S., Jackson, C. T., Subler, M. A. & Martin, D. W.** (1992). Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J. Virol.* **66**: 6164-6170.
- Demeret, C., Yaniv, M. & Thierry, F.** (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for SP1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J. Virol.* **68**: 7075-7082.

- Donehower, L. A. & Bradley, A.** (1993). The tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**: 181-205.
- Dong, G., Broker, R. & Chow, L.** (1994a). Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J. Virol.* **68**: 1115-1127.
- Dong, X.-P., Stubenrauch, F., Beyer-Finkler, E. & Pfister, H.** (1994b). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* **58**: 803-808.
- Dong, X.-P. & Pfister, H.** (1999). Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **80**: 2097-2101.
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. & Harlow, E.** (1989). The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**: 934-937.
- Egelman, E. H., Yu, X., Wild, R., Hingorani, M. M. & Patel, S.** (1995). Bacteriophage T7 helicase / primase proteins form rings around single-stranded DNA that suggests a general structure for hexameric helicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3869-3873.
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler K. W. & Vogelstein, B.** (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics* **1**: 45-49.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.
- Enzenauer, C., Mengus, G., Lavigne, A.-C., Davidson, I., Pfister, H. & May, M.** (1998). Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirology* **41**: 80-90.
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. & McMillan, A. J.** (1997). Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.
- Farmer, G., Friedlander, P., Colgan, J., Manley, J. L. & Prives, C.** (1996). Transcriptional repression by p53 involves molecular interactions distinct from those with the TATA box binding protein. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4281-4288.
- Flores, E. R. & Lambert, P. F.** (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol.* **71**: 7167-7179.
- Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C. & Oren, M.** (1996). A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4961-4971.

Fuchs, P. G., Girardi, F. & Pfister, H. (1989). Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancer and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastasis. *Int. J. Cancer* **43**: 42-44.

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

Fuchs, P. G. & Pfister, H. (1997). Molecular biology of HPV and mechanisms of keratinocyte transformation in : Human Papillomavirus infections in dermatovenereology. Gross, G. & von Krogh, G. (eds) (CRC Press): 15-46.

Furlong, E. E. M., Rein, T. & Martin, F. (1996). YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5933-5945.

Galvin, K. M. & Shi, Y. (1997). Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3723-3732.

Gilbert, D. M. & Cohen, S. N. (1987). Bovine papillomavirus plasmids replicate randomly in mouse fibroblasts throughout S phase of the cell cycle. *Cell* **50**: 59-68.

Ginsberg, D., Mehta, F., Yaniv, M. & Oren, M. (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9979-9983.

Gopalakrishnan, V. & Khan, S. (1994). E1 protein of human papillomavirus type 1a is sufficient for initiation of viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9597-9601.

Gu, Y., Turck, C. W. & Morgan, D. O. (1993). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* **366**: 707-710.

Gualberto, A., LePage, D., Pons, G., Mader, S. L., Park, K., Atchison, M. L. & Walsh, K. (1992). Functional antagonism between YY1 and the serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4209-4214.

Hahn, S. (1992). The Yin Yang of mammalian transcription. *Curr. Biol.* **2**: 152-154.

Haigis, H. (1998). Identifikation zellulärer Proteine, welche an Promotor-proximale Sequenzen des humanen Papillomvirus Typ 8 binden. Diplomarbeit, Institut für Virologie, Köln.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (1989). HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize primary human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**: 3905-3910.

Helander, S. D., Peters, M. S. & Pittelkow, M. R. (1993). Expression of p53 protein in benigne and malignant epidermal pathologic conditions. *J. Am. Acad. Dermatol.* **29**: 741-748.

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

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

Hoppe-Seyler, F. & Butz, K. (1993). Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by human papillomavirus type 16 E6, human mdm-2 and mutant p53. *J. Virol.* **67**: 3111-3117.

Howley, P. M. (1996). Papillomaviridae: The viruses and their replication in: Fields Virology, 3rd edition. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (eds) (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia): 2045-2076.

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

Jablonska, S., Dabrowski, J. & Jakubowicz, K. (1972). Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papova viruses in oncogenesis. *Cancer Res.* **32**: 583-589.

Jackson, P., Bos, E. & Braithwaite, A. W. (1993). Wild-type mouse p53 down-regulates transcription from different virus enhancer/promoters. *Oncogene* **8**: 589-597.

Janssens, V., Van Hoof, C., De Baere, I., Merlevede, W. & Goris, J. (2000). The phosphotyrosyl phosphatase activator gene is a novel p53 target gene. *J. Biol. Chem.* **275**: 20488-20495.

Jundt, F., Herr, I., Angel, P., zur Hausen, H. & Bauknecht, T. (1995). Transcriptional control of human papillomavirus type 18 oncogene expression in different cell lines: role of transcription factor YY1. *Virus Genes* **11**: 53-58.

Karle, P. (1995). Kartierung und Charakterisierung des Replikationsursprungs des humanen Papillomvirus Typ 8. Diplomarbeit, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen.

Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. & Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**: 587-597.

Ko, L. J. & Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**: 1054-1072.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lee, T. C., Shi, Y. & Schwartz, R. J. (1992). Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9814-9818.

Lee, J.-S., Galvin, K. M. & Shi, Y. (1993). Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and SP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4154-6149.

Lee, J.-S., Galvin, K. M., See, R. H., Eckner, R., Livingston, D., Moran, E. & Shi, Y. (1995). Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes Dev.* **9**: 1188-1198.

Lee, D., Kim, H., Lee, Y. & Choe, J. (1997). Identification of sequence requirement for the origin of DNA replication in human papillomavirus type 18. *Virus Res.* **52**: 97-108.

Lee, K.-Y., Broker, T. R. & Chow, L. T. (1998). Transcription factor YY1 represses cellfree replication from human papillomavirus origins. *J. Virol.* **72**: 4911-4917.

Lehman, C. W. & Botchan, M. R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4338-4343.

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

Lepik, D., Ilves, I., Kristjuhan, A., Maimets, T. & Ustav, M. (1998). p53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplificational replication. *J. Virol.* **72**: 6822-6831.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.

Lewis, B. A., Tullis, G., Seto, E., Horikoshi, N., Weinmann, R. & Shenk, T. (1995). Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *J. Virol.* **69**: 1628-1636.

Li, R., Knight, J. D., Jackson, S. P., Tijan, R. & Botchan, M. R. (1991). Direct interaction between SP1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* **65**: 493-505.

Liu, R., Baillie, J., Sissons, J. G. & Sinclair, J. H. (1994). The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2453-2459.

Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A. & Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**: 847-852.

Lu, S. Y., Rodrigues, M. & Liao, W. S. (1994). YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and its antagonized by NF- κ B during acute-phase response. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6253-6262.

- Luckow, B. & Schütz, G.** (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5490.
- Maniatis, T., Sambrook, J. & Fritsch, E. F.** (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Massimi, P., Pim, D., Bertoli, C., Bouvard, V. & Banks, L.** (1999). Interaction between the HPV-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* **18**: 7748-7754.
- Matsukura, T., Kanda, T., Furuno, A., Yoshikawa, H., Kawana, T. & Yoshiike, K.** (1986). Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J. Virol.* **58**: 979-982.
- May, M., Dong, X.-P., Beyer-Finkler, E., Stubenrauch, F., Fuchs, P. G. & Pfister, H.** (1994a). 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**: 1460-1466.
- May, M., Grassmann, K., Pfister, H. & Fuchs, P. G.** (1994b). Transcriptional silencer of the human papillomavirus type 8 late promoter interacts alternatively with the viral transactivator E2 or with a cellular protein. *J. Virol.* **68**: 3612-3619.
- McBride, A. A., Romanczuk, H. & Howley, P. M.** (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 18411-18414.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. J., Mulshine, J. L., Minna, J. D. & Gazdar, A. F.** (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**: 171-180.
- Miyashita, T. & Reed, J. C.** (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-299.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P. & Botchan, M. R.** (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**: 1694-1699.
- Montalvo, E. A., Cottam, M., Hill, S. & Wang, Y.-C. J.** (1995). YY1 binds to and regulates cis-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J. Virol.* **69**: 4158-4165.
- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. & Schlegel, R.** (1989). The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**: 4417-4421.
- Münger, K., Scheffner, M., Huibregtse, J. M. & Howley, P. M.** (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumor suppressor gene products. *Cancer Surveys* **12**: 197-217.

- Mullis, K. B. & Fallona, F. A.** (1984). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzym.* **155**: 335-350.
- Natesan, S. & Gilman, M.** (1993). DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes Dev.* **7**: 2497-2509.
- O'Connor, M., Chan, S.-Y. & Bernard, H.-U.** (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. In: Human Papillomaviruses. Maters, G., Bernard, H.-U., Delius, H., Icenogel, J., Baker, C., Halpern, A. & Wheeler, C. (eds) (Los Alamos National Laboratory) NM 21-40.
- O'Connor, M., Tan, S.-H., Tan, C.-H. & Bernard, H.-U.** (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J. Virol.* **70**: 6529-6539.
- Oren, M.** (1994). Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Seminars in Cancer Biology* **5**: 221-227.
- Orth, G.** (1987). Epidermodysplasia verruciformis. In: Salzmann, N. P. & Howley, P.M (eds.). The papovaviridae, vol. 2, the papillomaviruses. Plenum Press, New York: 199-244.
- Pajunk, H. S., May, C., Pfister, H. & Fuchs, P. G.** (1997). Regulatory interactions of transcription factor YY1 with control sequences of the E6 promoter of human papillomavirus type 8. *J. Gen. Virol.* **78**: 3287-3295.
- Pajunk, H.** (1999). Regulation der Transkription bei genitalen und kutanen humanen Papillomviren durch den zellulären Transkriptionsfaktor YY1. Diss., Institut für Virologie, Köln.
- Petkova, V., Romanowski, M. J., Suljoadikusumo, I., Rohne, D., Kang, P., Shenk, T. & Usheva, A.** (2001). Interaction between YY1 and the retinoblastoma protein: regulation of cell cycle progression in differentiated cell. *J. Biol. Chem.* **276**: 7932-7936.
- Pfister, H.** (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **99**: 111-181.
- Pfister, H. und Fuchs, P. G.** (1987). Papillomaviruses: Particles, genome, organization, and proteins. In: Syrjänen, K., Gissmann, L. & Koss, L. G. (eds.). Papillomaviruses and human disease. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 1-18.
- Pfister, H.** (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Seminars in Cancer Biology* **3**: 263-271.
- Pfister, H.** (1996). The role of human papillomavirus in anogenital cancer. In: Obstetrics and gynecology clinics of North America. Masse, S. & Smith Donley, S. (eds) (W.B. Saunders Company) **23**: 579-595.
- Pfister, H. & ter Schegget, J.** (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clinics in Dermatology* **15**: 335-347.

- Purdie, K. J., Sexton, C. J., Proby, C. M., Glover, M. T., Williams, A. T., Stables, J. N. und Leigh, I. M.** (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: A role for human papillomavirus. *Cancer Res.* **53**: 5328-5333.
- Ragimov, N., Krauskopf, A., Navot, N., Rotter, V., Oren, M. & Aloni, Y.** (1993). Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation in vitro by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. *Oncogene* **8**: 1183-1193.
- Rank, N. M. & Lambert, P. F.** (1995). Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors TFIID and TFIIB. *J. Virol.* **69**: 6323-6334.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M.** (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136.
- Schmidt, H.-M.** (1999). Wechselwirkungen der E2-Proteine von Papillomviren mit zellulären Faktoren. Diss., Institut für Virologie, Köln.
- Schneider-Manoury, S., Croissant, O. & Orth, G.** (1987). Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: A possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.* **61**: 3295-3298.
- Schreiber, E., Matthias, M., Müller, M. & Schaffner, W.** (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with „mini-extracts“, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **9**: 6419-6420.
- Sedman, J. & Stenlund, A.** (1998). The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. *J. Virol.* **72**: 6893-6897.
- Seo, Y. S., Müller, F., Lusky, M., Gibbs, E., Kim, H.-Y., Phillips, B. & Hurwitz, J.** (1993). Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2865-2869.
- Seto, E., Shi, Y. & Shenk, T.** (1991). YY1 is an initiator sequence-binding protein that directs and activates transcription in vitro. *Nature* **354**: 241-245.
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J. & Shenk, T.** (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 12028-12032.
- Seto, E., Lewis, B. & Shenk, T.** (1993). Interaction between transcription factors Sp1 and YY1. *Nature* **365**: 462-464.
- Shah, K. V. & Howley, P. M.** (1996). Papillomaviruses. In: Fields Virology, 3rd edition. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (eds) (Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia): 2077-2109.

- Shi, Y., Seto, E., Chang, L.-S. & Shenk, T.** (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**: 377-388.
- Shi, Y., Lee, J.-S. & Galvin, K. M.** (1997). Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim. Biophys. Acta* **1332**: 49-66.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G. V., Artandi, S., Goff, S. P. & Calame, K.** (1993). Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* **262**: 1889-1892.
- Sibbet, G., Romero-Graillet, C., Meneguzzi, G. & Campo, M. S.** (2000). $\alpha 6$ integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J. Gen. Virol.* **81**: 327-334.
- Skiadopoulos, M. H. & McBride, A. A.** (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol.* **72**: 2079-2088.
- Spandau, D. F.** (1994). Distinct conformations of p53 are observed at different stages of keratinocyte differentiation. *Oncogene* **9**: 1861-1868.
- Steger, G. & Pfister, H.** (1992). In vitro expressed HPV8 E6 protein does not bind p53. *Arch. Virol.* **125**: 355-360.
- Steger, G., Ham, J., Thierry, F. & Yaniv, M.** (1993). The E2 proteins of papillomaviruses as transcription and replication factors. In: Virus strategies. Doerfler, W. & Böhm, P. (eds) (Verlag Chemie, Weinheim): 263-278.
- Steger, G. & Corbach, S.** (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* **71**: 50-58.
- Stubenrauch, F., Malejczyk, J., Fuchs, P. G. & Pfister, H.** (1992). Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation. *J. Virol.* **66**: 3485-3493.
- Stubenrauch, F. & Pfister, H.** (1994). Low-affinity E2-binding site mediates downmodulation of E2 transactivation of the human papillomavirus type 8 late promoter. *J. Virol.* **68**: 6959-6966.
- Subler, M. A., Martin, D. W. & Deb, S.** (1992). Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J. Virol.* **66**: 4757-4762.
- Tan, S.-H., Gloss, B. & Bernard, H.-U.** (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.
- Tan, S.-H., Louis, E.-C., Walker, P. A. & Bernard, H.-U.** (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factors binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E2 promoter through displacement of SP1 and TFIID. *J Virol.* **68**: 6411-6420.

- Thomas, M. J. & Seto, E.** (1999). Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**: 197-208.
- Usheva, A. & Shenk, T.** (1994). TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription of supercoiled template DNA. *Cell* **76**: 1115-1121.
- Ushikai, M., Lacey, M. J., Yamakawa, Y., Kono, M., Anson, J., Ishiji, T., Parkkinen, S., Wicker, N., Valentine, M. E., Davidson, I., Turek, L. P. & Haugen, T. H.** (1994). Trans activation by the full-length E2 proteins of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1 in vitro and in vivo: cooperation with activation domains of cellular transcription factors. *J. Virol.* **68**: 6655-6666.
- Ustav, M. & Stenlund, A.** (1991). Transient replication of BPV1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* **10**: 449-457.
- Werness, B. A., Levine, A. J. & Howley, P. M.** (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**: 76-79.
- Widow, C.** (1994). Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von YY1-Bindestellen in der regulatorischen Region des humanen Papillomavirus 8. Diplomarbeit, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D. & Levine, A. J.** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & Dev.* **7**: 1126-1132.
- Xiao, J. H., Davidson, L., Garnier, J. M. & Chambon, P.** (1991). Cloning, expression and transcriptional properties of human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**: 551-568.
- Yamashita, T., Segawa, K., Fujinaga, Y., Nishikawa, T. & Fujinaga, K.** (1993). Biological and biochemical activity of E7 genes of the cutaneous human papillomavirus type 5 and 8. *Oncogene* **8**: 2433-2441.
- Yang, L., Mohr, I., Clark, R. & Botchan, M.** (1993). The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5086-5090.
- Yang, W. M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D. & Seto, E.** (1996). Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12845-12850.
- Yang, W. M., Yao, Y. L., Sun, J. M., Davie, J. R. & Seto, E.** (1997). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J. Biol. Chem.* **272**: 28001-28007.
- Yant, S. R., Thu, W., Millinoff, D., Slightom, J. L., Goodman, M. & Gumucio, D. L.** (1996). High affinity YY1 binding motifs: identification of two core types (ACAT and CCAT) and distribution of potential binding sites within the human beta globin cluster. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4353-4362.

Zhou, Q., Gedrich, R. W. & Engel, D. A. (1995). Transcriptional repression of the c-fos gene by YY1 is mediated by direct interaction with ATF/CREB. *J. Virol.* **69**: 4323-4330.

Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.-U. & O' Connor M. J. (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.

zur Hausen, H. & de Villiers, E. M. (1994). Human Papillomaviruses. *Annual Review of Microbiology* **48**: 427-447.

8. ABKÜRZUNGEN

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPV	Rinderpapillomvirus (Bovines Papillomvirus)
BSA	Bovines Serum Albumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CBP	CREB bindendes Protein
CDK	Cyclin abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	“counts per minute”
CRE	cAMP responsive element
CREB	CRE bindendes Protein
CSPD	Disodium.-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1.3,7]decan}-4-yl)-phenylphosphat
DAB	Diaminobenzidin
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E	early
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
<i>Ev</i>	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FKS	Fötales Kälberserum

ABKÜRZUNGEN

GST	Glutathion-S-Transferase
HDAC	Histon Deacetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIS	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPV	Humanes Papillomvirus
Inr	Initiator Element
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	late
LB Medium	Luria Bertani Medium
LCR	long control region
mA	Milliampere
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NCR	nicht-kodierende Region (non coding region)
nm	Nanometer
NRE	negativ regulierendes Element
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-thiogalactoside
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Ursprungspunkt der DNA-Replikation (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rb	Retinoblastom Protein
RLU	relative lights units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRF	serum response factor
ss	einzelsträngig
SSC	standard saline citrate
SV 40	Simian Virus 40

ABKÜRZUNGEN

TBP	TATA-Box bindendes Protein
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
YY1	Yin-Yang 1
x-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. H. Pfister für die Themenstellung, die Betreuung der Arbeit, sowie die Diskussionsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. B. Kemper danke ich für seine Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonderer Dank gilt meinem Kollegen Baki Akgül für die vielen Diskussionsstunden, die ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ulla Warthorst danke ich für die netten Tee-Pausen, das Zuhören in „schweren“ Zeiten sowie die Unterstützung bei manchen Experimenten. Meiner Ex-Kollegin Henia Pajunk möchte ich für die Vorarbeiten zu YY1 danken und für die vielen Tipps und Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Dr. med. K. Sotlar vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen für die Bereitstellung der Paraffingewebe und die Diskussionsbereitschaft bei der immunhistochemischen Analyse von Gewebeschnitten.

Antal und meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die Geduld, die Rücksichtnahme, die Unterstützung, die vielen aufmunternden Worte und das stetige Interesse an meiner Arbeit.

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 angegeben Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Herbert Pfister betreut worden.

Köln, den 10.09.2001

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Adam, Maja
Geboren am/in: 05.03.1972 in Tübingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1978 - 1982 Grundschole Winkelwiese Tübingen
1982 - 1991 Uhland-Gymnasium Tübingen
06/1991 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1991 - 1997 Studium der Biologie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/1994 - 07/1994 Auslandsstudium (DAAD-Stipendium) in Finnland an den Universitäten Turku und Oulu
1996 - 1997 Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. Dr. P. Fuchs
Thema: „Untersuchung der zelldifferenzierungsabhängigen Aktivität des späten Promotors P₇₅₃₅ des humanen Papillomvirus 8 in organotypischen Kulturen“
12/1997 Diplom in Biologie
01/1998 - 12/2001 Dissertation am Institut für Virologie der Universität zu Köln unter Anleitung von Prof. H. Pfister
Thema: „Rolle des zellulären Transkriptionsfaktors Yin-Yang 1 (YY1) bei der Kontrolle der Replikation und Transkription des humanen Papillomvirus 8“