

**Charakterisierung des zellulären Proteins
„Papillomavirus Binding Factor“
PBF**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von
Nadine Sichtig
aus Frechen

2006

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister
Prof. Dr. Reinhard Krämer
Vorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth
Beisitzer: Dr. Matthias Cramer

Tag der Disputation: 06.12.2006

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.

Aristoteles (384-322 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die PI3K/Akt Signaltransduktion	1
1.2	Die Familie der 14-3-3 Proteine	3
1.3	Genregulation über Chromatinmodulation	4
1.4	Das zelluläre Protein SAP30	4
1.5	Das zelluläre Protein PBF	5
1.6	Papillomviren	6
1.6.1	Kapsid- und Genomaufbau von HPV	7
1.6.2	Der Lebenszyklus von Papillomviren	8
1.6.3	Die Funktionen der viralen Genprodukte E6 und E7	9
1.6.4	Die virale Transkription	11
1.7	Das Ziel der vorliegenden Arbeit	12
2	Material	13
2.1	Bakterienstämme	13
2.2	Eukaryote Zellen	13
2.3	Nukleinsäuren	13
2.3.1	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	13
2.3.2	Expressionsvektoren	16
2.3.3	Reporterplasmide	17
2.3.4	Rekombinante Plasmide	17
2.3.5	DNA-Längenstandards	22
2.3.6	Sonstige Nukleinsäuren	22
2.4	Radioaktivität	22
2.5	Proteine	22
2.5.1	Enzyme	22
2.5.2	Größenstandards	22
2.5.3	Antiseren	23
2.5.4	Präzipitations-Reagenzien	23
2.6	Protease- und Phosphatase Inhibitoren	24
2.7	Medien	24
2.7.1	Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien	24
2.7.2	Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryonter Zellen	25
2.8	Reagenzien	25
2.8.1	Reagenziensysteme (Kits)	25
2.8.2	Puffer und Lösungen	26
2.8.3	Inhibitoren	30
2.8.4	Sonstige Chemikalien und Materialien	30
3	Methoden	31
3.1	Bakterienkultur	31
3.1.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	31
3.1.2	Transformation kompetenter Bakterien	31
3.1.3	Langzeitlagerung von Bakterien	31

3.2 Zellkulturmethoden	32
3.2.1 Kultivierung eukaryonter Zellen	32
3.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen	32
3.2.3 Zellzahlbestimmung	32
3.2.4 Transfektion von eukaryonten Zellen mit Plasmid-DNA	32
3.2.4.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation	33
3.2.4.2 Transiente Transfektion mittels „FuGENE“	33
3.2.4.3 Stabile Transfektion	33
3.2.5 Wachstums-Assay	33
3.2.6 Zellernte	34
3.2.6.1 Ernte durch physikalischen Zellaufschluss	34
3.2.6.2 Ernte durch chemischen Zellaufschluss	34
3.2.7 Luciferase-Test	34
3.2.8 β -Galaktosidase-Test	34
3.2.9 Immunfluoreszenzanalysen	35
3.3 DNA-Methoden	35
3.3.1 Kulturen zur Plasmidisolierung	35
3.3.2 Plasmidpräparationen	35
3.3.3 DNA-Sequenzierung	35
3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.3.5 In vitro Mutagenese	36
3.3.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	37
3.3.7 DNA-Standardmethoden	37
3.4 RNA-Methoden	38
3.4.1 RNA-Isolierung aus eukaryonten Zellen	38
3.4.2 Two-Step-RT-PCR	38
3.5 Proteinmethoden	39
3.5.1 Herstellung von Ganzzellextrakten	39
3.5.2 Herstellung von Cytoplasma- und Kernextrakten	39
3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung	39
3.5.4 Proteinaufreinigung	39
3.5.4.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	39
3.5.4.2 Aufreinigung von Proteinen mit Histidin-Epitopen	40
3.5.5 <i>In vitro</i> Translation	41
3.5.6 Protein-Protein Interaktionsanalysen	41
3.5.6.1 Interaktionen mit GST-Fusionsproteinen und <i>in vitro</i> translatierten Proteinen oder Zellextrakten	41
3.5.6.2 Koimmunpräzipitationen	42
3.5.7 Western-Blot	42
3.5.8 Gelretardierungsanalysen „ <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> “ (EMSA)	43
3.5.9 ChIP- (Chromatin Immunoprecipitation) Assay	43
3.5.10 Protein-Standardmethoden	44
4 Ergebnisse	45
4.1 PBF interagiert mit 14-3-3β	45
4.1.1 GST-14-3-3 β bindet PBF <i>in vitro</i>	45
4.1.2 14-3-3 β interagiert mit phosphoryliertem PBF	46
4.1.3 PBF und 14-3-3 β kolokalisieren im Cytoplasma	47
4.1.4 PBF interagiert mit 14-3-3 <i>in vivo</i>	48
4.1.5 14-3-3 β bindet hauptsächlich am C-Terminus von PBF	50
4.1.6 PBF besitzt zwei unabhängige 14-3-3-Bindestellen	51
4.1.7 Einfluss der 14-3-3 Interaktion auf die zelluläre Lokalisation von PBF	54
4.1.8 Die Akt Kinase ist beteiligt an der Regulation der Interaktion von PBF mit 14-3-3	55
4.1.9 Serum Entzug erzeugt nukleären Import von PBF	59
4.1.10 PBF inhibiert zelluläre Proliferation reguliert durch die Interaktion mit 14-3-3 und die Akt Kinase	61

4.2	PBF fungiert als Transkriptionsfaktor	63
4.2.1	PBF bindet DNA <i>in vivo</i>	63
4.2.2	PBF bindet DNA über zwei C-terminal lokalisierte konservierte CRAR-Regionen	64
4.2.3	PBF reguliert Transkription als Repressor	67
4.2.3.1	PBF vermittelt Repression abhängig von der DNA-Bindung	67
4.2.3.2	Herstellung einer Zelllinie mit verringerter endogener PBF-Konzentration	68
4.2.3.3	Promotorrepression durch PBF ist abhängig von der 14-3-3-Interaktion	69
4.2.4	Die DNA-Bindungsaktivität von PBF wird durch die Interaktion mit 14-3-3 nicht beeinflusst	72
4.3	PBF interagiert mit Komponenten von Histondeacetylase (HDAC)-Komplexen	73
4.3.1	PBF bindet SAP30 <i>in vitro</i>	73
4.3.2	PBF interagiert mit SAP30 <i>in vivo</i>	73
4.3.3	PBF und SAP30 binden HDAC1 <i>in vitro</i>	76
4.3.4	PBF, SAP30 und HDAC1 interagieren auch <i>in vivo</i>	76
4.3.5	Histondeacetylasen sind an PBF-vermittelter Repression beteiligt	78
4.4	PBF ist ein Zielprotein des Ubiquitin-Proteasom-Pathways	79
4.4.1	Die zelluläre PBF-Konzentration kann durch Proteasom-Inhibition erhöht werden	80
4.5	PBF interagiert mit HPV-E6-Proteinen	80
4.5.1	PBF bindet HPV8-E6 <i>in vitro</i>	81
4.5.2	PBF interagiert mit HPV8-E6 und HPV16-E6 <i>in vivo</i>	81
4.5.3	HPV8-E6 interagiert mit PBF über seinen N- und C-Terminus	83
4.5.4	HPV8-E6 hebt die PBF-vermittelte Inhibition der Zellproliferation auf	84
5	Diskussion	85
6	Literaturverzeichnis	93
7	Abkürzungsverzeichnis	105
8	Zusammenfassung	108
9	Abstract	109
10	Danksagung	110
11	Erklärung	111
12	Lebenslauf	112

1 Einleitung

Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Wachstum zum einen und Apoptose zum anderen ist häufig die Folge von onkogenen Aktivitäten, wodurch Proteine und Signalwege in ihren regulatorischen Funktionen, in Bezug auf Zellwachstum, Differenzierung und Entwicklung der Zelle, moduliert werden.

14-3-3 Proteine spielen bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Rolle. Sie regulieren die Aktivität und die Lokalisation vieler zellulärer Proteine über die Bindung an spezifische Phosphorylierungsstellen. Die Interaktionen von 14-3-3 mit Phosphoproteinen ist häufig abhängig von einer PI3K-aktivierten Akt Kinase und fördert in den meisten Fällen das Überleben der Zelle. In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass der Wachstumsfaktor-abhängige PI3K/Akt Signalweg in vielen humanen Krebsformen häufig gestört ist.

1.1 Die PI3K/Akt Signaltransduktion

Die Serin-/Threonin Protein Kinase B oder Akt (PKB/Akt) ist eine entscheidende Kinase im Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K)/Akt Signaltransduktionsweg. PKB/Akt wird in Zellen aktiviert, die verschiedenen Stimuli, wie Hormonen, Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrix Komponenten, ausgesetzt sind. Sie ist an der Regulation essentieller zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Glucose Metabolismus, beteiligt. Eine gestörte PKB/Akt Signaltransduktion kann zur Entwicklung von Krankheiten, wie z.B. Krebs oder Diabetes mellitus, beitragen (zusammengefasst in (KANDEL und HAY, 1999)).

Eine zentrale Rolle von PKB/Akt bei der Signaltransduktion wurde erst offensichtlich, als sie als Zielprotein der PI3K charakterisiert wurde (BURGERING und COFFER, 1995; FRANKE *et al.*, 1995). PI3K wird nach Stimulation von Rezeptor-Tyrosin Kinasen (RTKs) über Adaptormoleküle wie z.B. ras, an den Rezeptor rekrutiert, woraufhin Phosphorylierungsreaktionen induziert werden. PI3K ist in der Lage das lipide Substrat PIP₂ zu phosphorylieren und somit PIP₃ zu generieren. PIP₃ induziert die Translokation von PKB/Akt zur Plasmamembran, verbunden mit einer Konformationsänderung, sowie die Aktivierung der Phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 (PDK-1), welche PKB/Akt phosphoryliert (Abb. 1). Die Aktivierung der Akt Kinase kann allerdings auch PI3K-unabhängig erfolgen, z.B. über ILK1 (*integrin-linked kinase*) (YOGANATHAN *et al.* 2000). Als negativer Regulator der PKB/Akt Aktivierung wurde die Proteinphosphatase PTEN identifiziert, welche PIP₃ durch Dephosphorylierung wieder inaktivieren kann (WU *et al.*, 1998;

LI *et al.*, 1998). PTEN wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen identifiziert, welches in humanen Krebsformen häufig mutiert ist (MYERS und TONKS, 1997; CANTLEY und NEEL, 1999). Inaktivierende Mutationen oder der Verlust der PTEN Expression resultieren in einem Anstieg der PI3K Produkte in der Zelle. Dadurch wird die Aktivität der Akt Kinase verstärkt mit dem Ergebnis einer Zunahme der Zellzyklus Progression, der Apoptose Resistenz und der onkogenen Transformation (CANTLEY und NEEL, 1999).

Die meisten Zielproteine der Akt Kinase sind an der Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest beteiligt und werden durch das Phosphorylierungsereignis inaktiviert. In Magen-, Brust-, Ovarien- und Bauchspeicheldrüsen-Tumoren wurden häufig PKB/Akt Genamplifikationen gefunden, was Akt als potentielles Onkogen charakterisiert (STAAL, 1987; BELLACOSA *et al.*, 1995; CHENG *et al.*, 1996).

Die Akt Kinase fördert das Überleben der Zelle einerseits über direkte Phosphorylierung proapoptotischer Proteine, wie z.B. BAD oder Caspase 9, bzw. der Zellzyklusinhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} und andererseits über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (TF), die die Expression pro- und antiapoptotischer Gene kontrollieren, wie z.B. TF der Forkhead Familie (DEL PESO *et al.*, 1997; DATTA *et al.*, 1997; CARDONE *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 1999; RENA *et al.*, 1999; ZHENG *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung dieser Proteine induziert entweder ihre proteasomale Degradation oder ermöglicht die Bindung von 14-3-3, wodurch ihre subzelluläre Lokalisation verändert und ihre Funktionen blockiert werden (DEL PESO *et al.*, 1997; DATTA *et al.*, 1997; LIANG und SLINGERLAND, 2003; BRUNET *et al.*, 1999/2002; BIGGS *et al.*, 1999; DIJKERS *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2002; RAMASWAMY *et al.*, 2002; SCHMIDT *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung der Ubiquitin Ligase mdm2 (mouse double minute 2) oder seines humanen Homologs HDM2 erhöht seine Translokation in den Zellkern und somit auch die Degradation des Tumorsuppressorproteins p53 (MAYO und DONNER 2001) (Abb. 1).

Die Akt Kinase ist darüber hinaus noch an der Regulation vieler weiterer Faktoren, wie der Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und I- κ B phosphorylierender Kinasen (IKKs) beteiligt.

Diese Beispiele demonstrieren, dass die Akt Kinase maßgeblich in der Regulation der subzellulären Lokalisation von proapoptotischen und zellzyklusregulierenden Proteinen durch 14-3-3 Proteine involviert ist.

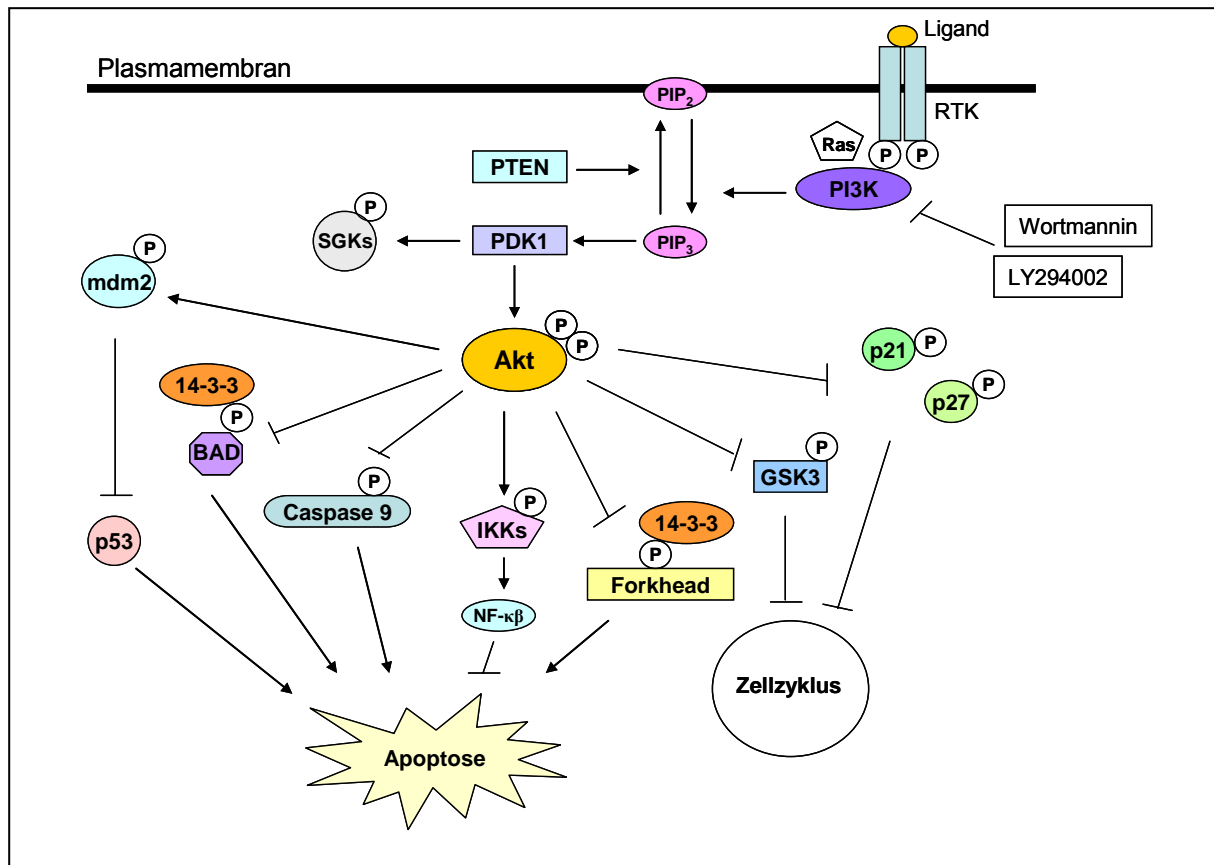


Abb. 1 Schematische Darstellung des PI3K/Akt Signalweges

Durch die Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) durch z.B. Wachstumsfaktoren, wird die PI3K zur Plasmamembran rekrutiert, wodurch über Phosphorylierungsreaktionen die PDK-1, welche die Akt Kinase phosphoryliert, aktiviert wird. Neben der Aktivierung von Akt ist PDK1 ebenfalls an der Aktivierung der Serum- und Glucocorticoid-regulierten Kinase (SGK) beteiligt. Aktivierte Akt phosphoryliert eine Vielzahl von Proteinen, wodurch Apoptose verhindert und der Zellzyklus aufrechterhalten wird. Durch Inhibition der PI3K mittels kompetitiver Inhibitoren, wie Wortmannin und LY294002, kann der Einfluss von Akt auf potentielle Zielproteine analysiert werden.

1.2 Die Familie der 14-3-3 Proteine

14-3-3 Proteine haben ein Molekulargewicht von 30 kDa und bilden eine hochkonservierte, ubiquitär exprimierte Proteinfamilie. In Säugetieren existieren sieben Isoformen (β , γ , ϵ , σ , ζ , τ , und η), die Homo- und Heterodimere ausbilden (JONES *et al.*, 1995; CHAUDHRI *et al.*, 2003). Durch die Bindung an Partner-Proteine haben sie eine wichtige Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Signaltransduktion, Apoptose, stressvermittelte Zellantwort, Cytoskelett Organisation, Transkription und maligne Transformation (zusammengefasst in (MACKINTOSH, 2004)).

Eine spezifische Phosphoserin/Phosphothreonin-Bindungsaktivität von 14-3-3 ermöglicht die Interaktion mit seinen Zielproteinen (MUSLIN *et al.*, 1996). Durch Analysen bekannter 14-3-3 Bindestellen (BS) konnten zwei hoch-affine, phosphorylierungsabhängige Bindemotive charakterisiert werden, RSXXpS/TXP (mode I) und RXXXpS/TXP (mode II), wobei pS/T ein Phosphoserin/Phosphothreonin und X eine beliebige Aminosäure (AS)

darstellt, die von allen 14-3-3-Isoformen erkannt werden (YAFFE *et al.*, 1997; RITTINGER *et al.*, 1999).

14-3-3 kann als Adaptormolekül Protein-Protein-Interaktionen stimulieren und Enzymaktivitäten regulieren (zusammengefasst in (VAN HEMERT *et al.*, 2001)). Die Funktion von 14-3-3 bei der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose basiert zum Teil auf der Interaktion mit zellulären Proteinen, wie BAD, YAP oder Miz1, die zuvor von der Akt Kinase phosphoryliert werden, was die Bindung von 14-3-3 erlaubt (DATTA *et al.*, 1997; DEL PESO *et al.*, 1997; BASU *et al.*, 2003; WANZEL *et al.*, 2005). Über den Mechanismus, wie 14-3-3 die Funktionen der Zielproteine moduliert ist erst wenig bekannt. Für einige Substrate, wie z.B. die FOXO Transkriptionsfaktoren, wurde gezeigt, dass 14-3-3 ihre subzelluläre Lokalisation reguliert (BIGGS *et al.*, 1999; BRUNET *et al.*, 1999; RENA *et al.*, 2001).

1.3 Genregulation über Chromatinmodulation

Die Kontrolle der Expression von Zellzyklus- oder Apoptose-regulierenden Genen unterliegt noch weiteren Regulationsmechanismen. Der Expressionsspiegel eines Gens ist abhängig von sequenzspezifischen, DNA-bindenden TF, die die Transkription entweder aktivieren oder reprimieren. Die Modulation der Chromatinstruktur über Histonacetylierung, bzw. Histondeacetylierung spielt dabei eine wichtige Rolle. Histonacetylasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) acetylieren, bzw. deacetylieren Lysin-Reste an den N-terminalen Enden von Histonen (AYER, 1999). Eine Hyperacetylierung von Histonen erzeugt eine Auflockerung des Chromatins (aktives Chromatin) und korreliert mit einer Aktivierung der Transkription, wohingegen eine Verdichtung der Chromatin Struktur (inaktives Chromatin) durch Hypoacetylierung von Histonen mit einer Repression der Transkription einhergeht (JONES und KADONAGA, 2000). HATs oder HDACs werden über Interaktion mit sequenzspezifischem TF an die jeweiligen Promotoren rekrutiert (HONG *et al.*, 1993; KINGSTON und NARLIKAR, 1999; KORNBERG und LORCH, 1999).

1.4 Das zelluläre Protein SAP30

SAP30 (Sin3-assoziiertes Polypeptid p30) ist ein nukleäres Sin3-assoziiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kDa. Es bildet zusammen mit mSin3, den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2, den Histon-Bindeproteinen RbAP46 und RbAP48, sowie mit weiteren Polypeptiden den humanen Histondeacetylase-Komplex mSin3-HDAC (HASSIG *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 1997, 1998; ALLAND *et al.*, 2002; FLEISCHER *et al.*, 2003; SHIIO *et al.*, 2006). Die mSin3 Proteine mSin3A und mSin3B sind große, multidomänen

Proteine und konnten als Korepressoren einer Reihe transkriptionaler Repressoren, wie MeCP2, Ikaros, Pf1, MNF β und Elk-1 charakterisiert werden (NAN *et al.*, 1998; KOIPALLY *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2001; YOCHUM und AYER, 2001). Die Deacetylase-Aktivität der mSin3-assoziierten HDACs wird für die mSin3-vermittelte transkriptionale Repression benötigt (HASSIG *et al.*, 1997). Eine Interaktion mit dem mSin3-HDAC-Komplex konnte bisher für eine Reihe von Faktoren, wie z.B. die Tumorsuppressorproteine p53 und pRB, gezeigt werden (MURPHY *et al.*, 1999; LAI *et al.*, 2001). SAP30 wurde als Brückenprotein identifiziert, welches über Interaktion mit zellulären Proteinen die Rekrutierung des mSin3-Korepressor-Komplexes an die DNA vermittelt (LAHERTY *et al.*, 1998). Die Inhibition des Zellwachstums durch das p53-Bindeprotein p33^{ING1} ist abhängig von der Assoziation mit dem mSin3-HDAC-Komplex vermittelt durch die direkte Interaktion mit SAP30 (KUZMICHEV *et al.*, 2001). Auch der Transkriptionsfaktor YY1 wurde als SAP30-Bindeprotein identifiziert (HUANG *et al.*, 2003).

1.5 Das zelluläre Protein PBF

Der *Papillomavirus Binding Factor* (PBF) wurde kürzlich über seine Bindung an regulatorische Sequenzen einiger Papillomvirus (PV)-Typen und des humanen Huntington's Disease (HD) Gens identifiziert und agiert vermutlich als TF (BOECKLE *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2004). PBF ist ein 513 AS großes, zelluläres Zinkfingerprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 56 kDa (Abb. 2). Es weist zwei funktionelle Kernlokalisationssequenzen (NLS, AS 156-162 und AS 267-273) und eine funktionelle Kernexportsequenz (NES, AS 165-174) auf, welche PBF als nukleo-cytoplasmatisches „shuttle“-Protein charakterisieren (TANAKA *et al.*, 2004). Die DNA-Bindung von PBF erfolgt über den C-Terminus (AS 447-513) (TANAKA *et al.*, 2004).

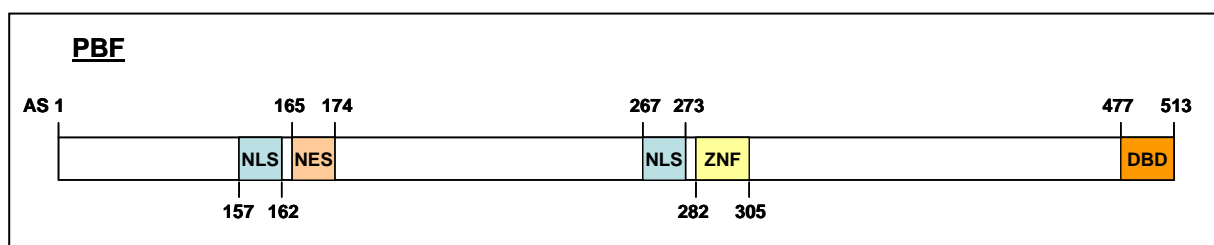


Abb. 2 Schematische Darstellung von PBF

Dargestellt ist das 513 Aminosäuren (AS) große PBF Protein mit seinem Zinkfingermotiv (ZNF), seiner C-terminalen DNA-Bindedomäne (DBD), und seinen funktionellen Kernlokalisations-(NLS) und Kernexportsequenzen (NES).

Der C-Terminus von PBF kodiert für zwei Regionen, welche bei bestimmten Isoformen der T-Zell-Faktoren TCF-1, TCF-3 und TCF-4 mit einem alternativen C-Terminus, dem sog. *E-tail*, hochkonserviert sind. Diese *E-tails* sind essentiell für die Aktivierung der

LEF-1 und *Cdx1* Promotoren durch β -Catenin/TCF Komplexe (ATCHA *et al.*, 2003; HECHT *et al.*, 2003). Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass PBF in der Zelle eine Funktion als Transkriptionsfaktor hat, über die bisher allerdings noch nichts bekannt ist. In Krebsgeweben, wie z.B. Sarkomen, war die Expression von PBF hochreguliert, verglichen mit einer relativ schwachen Expression in normalen Geweben, wie Bauchspeicheldrüse, Ovarien, Milz oder Leber. Während in den normalen Geweben PBF auf das Cytoplasma begrenzt war, konnte PBF in Osteosarkomen in hohen Konzentrationen im Zellkern detektiert werden (TSUKAHARA *et al.*, 2004). PBF scheint demnach in der Zelle eine wichtige Funktion zu haben, welche durch seine subzelluläre Lokalisation reguliert werden könnte.

Durch Mutationsanalysen wurde die DNA-Erkennungssequenz von PBF auf die Nukleotide CCGG eingegrenzt. Mutationen der PBF BS erzeugten eine Reduktion der basalen Aktivitäten des späten Promotors des humanen Papillomvirus (HPV) Typ8 (HPV8), der für die Expression der viralen Strukturproteine verantwortlich ist. Weiterhin bindet PBF an Promotor-regulatorische Sequenzen des bovinen PV Typ1 (BPV1) und von HPV16 (BOECKLE *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass PBF ein zellulärer Faktor ist, der bei der Regulation der Expression von viralen PV Genen eine Rolle spielen könnte.

1.6 Papillomviren

PV sind kleine DNA-Tumoviren mit einem doppelsträngigen Genom von ca. 8 kb. Bisher konnten über 100 verschiedene HPV-Typen durch DNA Sequenz Analysen identifiziert werden (BERNARD, 2005). Sie sind weltweit die häufigsten sexuell übertragenen Erreger (GARLAND, 2002). Die Infektionen resultieren in einem breiten Spektrum meist benigner Tumoren in Form von Warzen, Kondylomen und Papillomen, die in der Regel nur ein begrenztes Wachstum aufweisen und sich, vermutlich in Folge einer zellvermittelten Immunantwort, spontan zurückbilden (SHAH und HOWLEY, 1996). Infektionen mit bestimmten HPV bergen jedoch ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung (PFISTER, 1992).

PV infizieren die Basalzellen der Haut, wo sie eine verstärkte Proliferation des Epithels induzieren. Aufgrund ihres Tropismus werden sie in haut- und schleimhautinfizierende Typen, und bezüglich ihres onkogenen Potentials in Hoch- und Niedrigrisiko-Typen (*high* und *low risk*) unterteilt.

Die Ausbildung von zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN I bis CIN III), welche sich in 10-30% aller Fälle zu einem invasiven Zervixkarzinom, der zweithäufigsten Krebsform der Frau weltweit, entwickeln können, ist von großer klinischer Bedeutung (WALBOOMERS *et al.*, 1999, EINSTEIN und GOLDBERG, 2002). Studien belegen, dass 99% der invasiven Zervixkarzinome HPV-DNA enthalten. Als häufigste Vertreter wurden HPV16 gefolgt von HPV18 isoliert (MUNOZ, 2000; CLIFFORD *et al.*, 2003). Für einige genitale HPV-Typen wurde

bereits gezeigt, dass die viralen Onkoproteine E6 und E7 an der Immortalisierung und Transformation der Zelle beteiligt sind (ZUR HAUSEN, 2000).

Eine große Untergruppe der kutanen PV umfasst HPV-Typen, die mit der seltenen Hautkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis* (Ev) assoziiert sind (MYERS *et al.*, 1997). Bei Ev-Patienten führen die HPV-Infektionen zu lebenslang persistierenden Hautläsionen, wie flache Warzen und makulöse Läsionen. In 30-60% der Fälle können diese nach einer Persistenz von 10 bis 30 Jahren, meist an sonnenlichtexponierten Stellen, maligne entarten und zu Plattenepithelkarzinomen führen (FUCHS und PFISTER, 1996). In Ev-Karzinomen wird zu 90% HPV5 oder HPV8 DNA detektiert, was auf ein besonderes onkogenes Potential dieser kutanen HPV-Typen hindeutet (PFISTER, 1992).

Neben dem Menschen infizieren PV auch andere Säugetiere und Vögel (DE VILLIERS, 2001). BPV1 diente lange Zeit als Modellvirus zur Erforschung der PV-Biologie.

1.6.1 Kapsid- und Genomaufbau von HPV

Das HPV-Genom wird in einen kodierenden und einen nicht-kodierenden Bereich („non-coding region“, NCR oder „long control region“, LCR) unterteilt. Der kodierende Bereich umfasst mindestens fünf offene Leserahmen (ORF), die für regulatorische Proteine („early“, E) kodieren, welche an der Replikation, Transkription und Zelltransformation beteiligt sind und zwei ORFs für die Strukturproteine („late“, L). Die NCR bzw. LCR, welche die wichtigsten Elemente für die Regulation der Transkription und Replikation des viralen Genoms enthält, befindet sich mit einer Länge von ca. 500-1000bp zwischen den ORF L1 und E6. Die Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der Genomorganisation von HPV8 und HPV16. Für die Transkription der viralen Gene sind mindestens zwei Promotoren zuständig. Der Promotor, der die Transkripte der frühen Gene E6, E7, E1 und E2 erzeugt, wird demnach als früher Promotor (HPV8 (P₁₇₅); HPV16 (P₉₇)), und der Promotor, der die Expression der späten Gene L1 und L2 steuert, als später Promotor bezeichnet (HPV8 (P₇₅₃₅); HPV16 (P₆₇₀)) (STUBENRAUCH und LAIMINS, 1999).

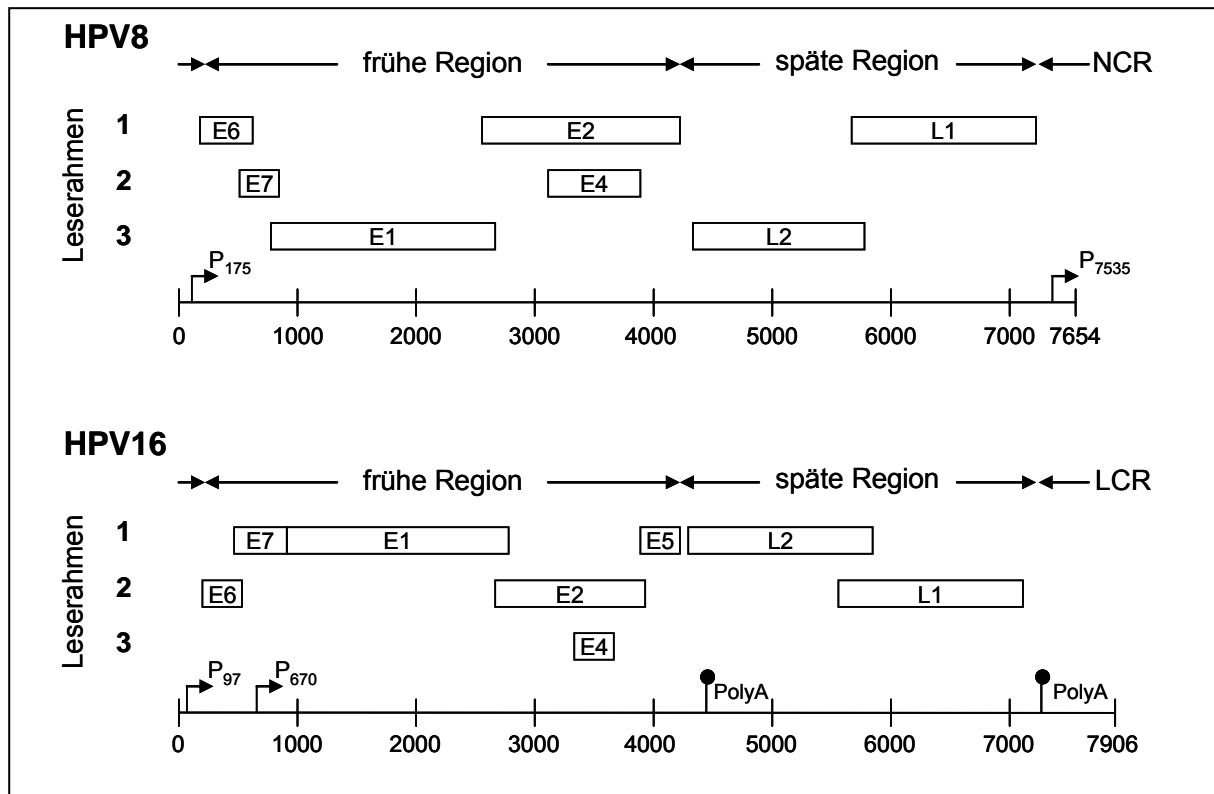


Abb. 3 Genomorganisation von HPV8 und HPV16

Das zirkuläre Genom von HPV, welches hier geöffnet dargestellt ist, unterteilt sich in die frühe, späte und nicht-kodierende Region (NCR/LCR). Die Lage der einzelnen ORFs in den drei Leserastern, sowie die Positionen der Promotoren und der Poly-Adenylierungssignale sind der Abbildung zu entnehmen.

1.6.2 Der Lebenszyklus von Papillomviren

Der produktive Infektionszyklus der PV ist eng an den Differenzierungsstatus des epithelialen Gewebes gebunden (Abb. 4). PV infizieren die Zellen der Basalschicht der Epidermis. Dort erfolgt die Replikation der viralen DNA synchron mit der Zellteilung (SKIADOPOULOS und MCBRIDE, 1998). Daher liegen die episomalen Genome hier nur in einer geringen Kopienzahl vor. Die frühen Gene E1, E2, E6 und E7 werden nur schwach exprimiert. Die Aktivität viraler Promotoren sowie die virale Replikation sind abhängig von der Expression zellulärer Transkriptions- und Replikationsfaktoren. In den Zellen des *Stratum spinosum* beginnt die vegetative Replikation und die Expression der regulatorischen Proteine nimmt zu. Über die Hochregulation der viralen Proteine E6 und E7 wird der Zellzyklusblock der in der G1-Phase arretierten Keratinozyten aufgehoben und die Zellen werden wieder in die S-Phase geführt (THOMAS *et al.*, 1998). Die Expression der Strukturproteine L1 und L2 beginnt in den obersten Zellen des *Stratum spinosum* und wird im *Stratum granulosum*, ebenso wie die vegetative Replikation, gesteigert. In den differenzierten Zellen der oberen Hautschicht kommt es dann zur Verpackung der Virusgenome in die Kapside, welche mit dem Absterben und der Abschuppung der Zellen des *Stratum corneum* freigesetzt werden (DOORBAR, 1998).

In Karzinomen wird in der Regel eine gesteigerte Expression der viralen Onkogene E6 und E7 beobachtet. Die Ursache hierfür ist eine ungerichtete Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom, assoziiert mit dem Verlust von negativen Transkriptions-Kontrollelementen (ZUR HAUSEN *et al.*, 1986; JEON *et al.*, 1995a/1995b).

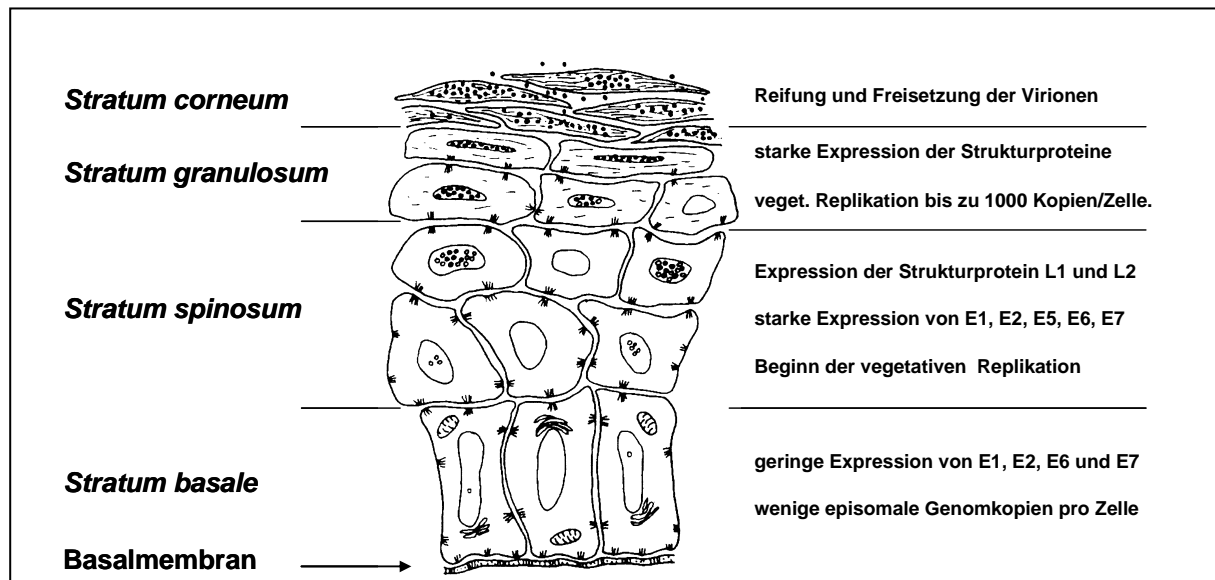


Abb. 4 Querschnitt der Epidermis und Lebenszyklus der PV

Der Querschnitt der Epidermis zeigt die einzelnen Schichten der Keratinozytendifferenzierung und die damit eng gekoppelten Prozesse des viralen Lebenszyklus.

1.6.3 Die Funktionen der viralen Genprodukte E6 und E7

Die **E6- und E7-Proteine** vermitteln ihre Funktionen über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Faktoren der Wirtszelle. Die E6- und E7-Proteine von genitalen „high risk“ HPV-Typen sind notwendig und hinreichend für die Immortalisierung primärer epithelialer Zellen (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1989). Des Weiteren sind E6 und E7 in der Lage, unabhängig voneinander immortalisierte Zellen zu transformieren (PHELBS *et al.*, 1988; HALBERT *et al.*, 1991; SEDMAN *et al.*, 1991). Bei in vitro Untersuchungen der E6- und E7-Proteine der Ev-assoziierten Typen 5, 8 und 47 in Nagetierzellen wies lediglich das E6-Protein ein transformierendes Potential auf, wohingegen das E7-Protein nur ein schwaches immortalisierendes Potential zeigte (IFTNER *et al.*, 1988; SCHMITT *et al.*, 1994).

Die **E7-Proteine** der „high risk“ HPV-Typen interagieren mit Mitgliedern der Retinoblastom-Familie, wie pRB, p107 und p130, und beschleunigen ihre Ubiquitin-abhängige Degradation, worauf das transformierende Potential von E7 maßgeblich zurückgeführt wird (JONES und MÜNGER, 1997; GONZALES, 2001). Durch die Bindung von E7 an pRB wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt, welcher die Expression zellulärer

Proteine für die DNA-Synthese und von Zellzyklusregulatoren, wie Cyklin A und E, transaktiviert (SCHULZE *et al.*, 1995; OHTANI *et al.*, 1995). Durch diese Ereignisse werden die differenzierenden Zellen in die S-Phase geleitet.

Die von E7 verursachte, unkontrollierte DNA-Replikation führt in gesunden Zellen zu p53-vermittelter Apoptose. p53 aktiviert normalerweise bei auftretenden DNA-Schäden als Transkriptionsfaktor die Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21CIP1, wodurch ein Zellzyklusblock erzeugt wird und die DNA-Schäden behoben werden können. Sind diese Schäden irreparabel, induziert p53 Apoptose. Diese wird durch das E6-Protein gehemmt. Das **E6-Protein** ist ein 16-18 kDa großes Phosphoprotein, welches hauptsächlich im Zellkern, aber auch in nicht nukleären Membranen lokalisiert ist (GROSSMAN *et al.*, 1989; GAO *et al.*, 2000). Es besitzt vier C-X-X-C Motive, die zwei Zinkfinger mit jeweils 29-30 Aminosäuren ausbilden. Die Hauptfunktion des genitalen „high risk“ E6-Proteins ist die Inhibition des Tumorsuppressorproteins p53, durch Induktion seiner Ubiquitin-abhängigen Degradation (WERNESSE *et al.*, 1990; SCHEFFNER *et al.*, 1990), wofür E6 die zelluläre Ubiquitinligase E6-AP (E6-associated protein) benötigt. Durch das Ausschalten von p53, und somit der p53-abhängigen Regulationswege, kommt es zu einer genetischen Instabilität mit erhöhtem Risiko einer Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (THOMAS und LAIMINS, 1998; SOMASUNDARAM, 2000). E6-Proteine der „low risk“ schleimhautassoziierten HPV-Typen binden ebenfalls p53, allerdings mit geringerer Affinität. Weiterhin sind sie nicht in der Lage p53 zu degradieren (ELBEL *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit von E6 p53 zu beeinflussen, ist die Repression seiner transkriptionalen Aktivität. p53 benötigt für die Aktivierung seiner Zielgene den Koaktivator CPB/p300. Durch die direkte Interaktion der „high risk“ E6-Proteine mit CBP/p300, wird dessen Aktivität gehemmt (PATEL *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999).

Die E6-Proteine der Ev-assoziierten HPVs besitzen ebenfalls onkogenes Potential. Der Mechanismus der Transformation unterscheidet sich jedoch zu dem von genitalen E6-Proteinen. Die E6-Proteine der kutanen HPV-Typen interagieren weder mit p53 noch mit E6-AP (STEGER und PFISTER, 1992; KIYONO *et al.*, 1994; ELBEL *et al.*, 1997). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, Zielproteine der UV-induzierten p53-Aktivierung zu inhibieren. Weiterhin wurde eine Inhibition der proapoptotischen Gene Fas, PUMA β , Apaf-1 und PIG3 beobachtet (GIAMPIERI *et al.*, 2004). E6 kann die UV-induzierte Apoptose auch unabhängig von p53 inhibieren, indem es das zelluläre proapoptotische Protein Bak zur proteolytischen Degradation führt (JACKSON *et al.*, 2000; JACKSON und STOREY, 2000).

1.6.4 Die virale Transkription

Die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 ist streng kontrolliert durch positiv und negativ wirkende zelluläre TF, die an verschiedenen *cis*-regulatorische Elemente innerhalb der LCR/NCR von PV binden (Abb. 5). Einige BS für zelluläre TF sind in allen PV-Typen vorhanden, wie die BS für AP1, NF1, Oct1, SP1 oder YY1 (APT *et al.*, 1993; BAUKNECHT *et al.*, 1992; CHONG *et al.*, 1991; KANAYA *et al.*, 1997; O'CONNOR und BERNARD 1995; OFFORD und BEARD 1990; THIERRY *et al.*, 1992). Dabei üben die Faktoren AP1, NF1, Oct1 und SP1 einen transaktivierenden Einfluss aus, während YY1 reprimierend wirkt (FUCHS und PFISTER 1994; DESAINTEs und DEMERET 1996; O'CONNOR *et al.*, 1996). Die meisten Untersuchungen der Rolle dieser Faktoren wurden in mukösen HPV durchgeführt. Die virale Genexpression wird weiterhin durch das virale E2-Protein reguliert. In den Basalzellen wird E2 für die Initiation der viralen DNA Replikation sowie die Genom Segregation benötigt. Als TF moduliert E2 über spezifische DNA-Bindung an die palindromische Konsensussequenz [AACCG(N4)CGGTT] die viralen Transkription (DELL *et al.*, 2003; STEGER *et al.*, 1996).

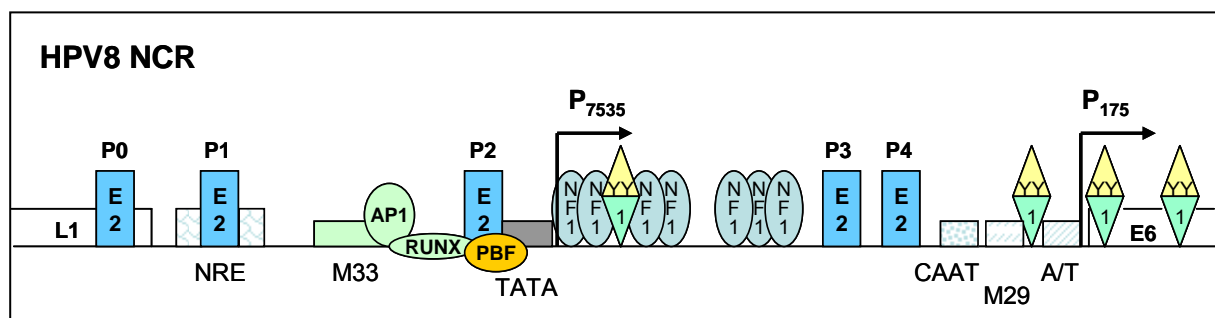


Abb. 5 Schematische Darstellung der NCR von HPV8

Dargestellt sind die konservierten E2 BS (P0-P4), die Sequenzmotive M33, welches in Verbindung mit der proximalen AP1 BS ein konstitutives Verstärkerelement des späten Promotors darstellt (HORN *et al.*, 1993), CAAT, M29 und die A/T-reiche Region, das negativ regulierende Element (NRE), sowie Bindestellen einiger zellulärer TF. Die Promotoren sind als Pfeile gekennzeichnet, wobei der Index der Promotorkennung der Nukleotidposition entspricht (nach FUCHS und PFISTER, 1996).

E2 kann nach Bindung an seine Erkennungssequenz sowohl aktivieren, als auch reprimieren. Die Position der E2 BS innerhalb der NCR/LCR relativ zu BS positiv wirkender zellulärer TF ist hierbei für den jeweiligen Effekt auf die Promotoren verantwortlich (STEGER *et al.*, 1993; THIERRY, 1993; GARRIDO-GUERRERO *et al.*, 1996). Variable Nukleotide innerhalb des E2 Palindroms führen zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, was dem E2-Protein eine dosisabhängige Regulation der Genexpression ermöglicht. HPV8-E2 aktiviert den späten Promotor durch Bindung an die hoch-affinen BS P0, P1, P3 und P4, wohingegen er bei hohen E2-Konzentrationen durch die Bindung an die hochkonservierte, niedrig-affine P2 BS reprimiert wird (STUBENRAUCH und PFISTER 1994). Eine Kooperation von E2 und

zellulären TF ist für die effiziente Aktivierung der PV-Genexpression essentiell (LI *et al.*, 1991, USHIKAI *et al.*, 1994, HAM *et al.*, 1994; STEGER *et al.*, 1995; MÜLLER *et al.*, 2002).

E2 reprimiert, wenn es mit positiv regulierenden, zellulären TF an überlappenden BS um DNA-Bindung kompetiert. Die Repression vermittelnde BS1 von BPV1 und P2 von HPV8 sind konserviert. Mutationen innerhalb dieser BS führen zu einer Reduktion der Basalaktivität der jeweiligen Promotoren. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die zellulären Transkriptionsfaktoren RUNX1 und PBF innerhalb dieser E2 BS binden, und dass im Fall von BPV1 beide Faktoren bei der Aktivierung des Promotors P₇₁₈₅ kooperieren (SCHMIDT *et al.*, 1997; BOECKLE *et al.*, 2002; BOECKLE, 2002). PBF könnte somit ein zellulärer Transkriptionsfaktor sein, der eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von PV-Genen hat.

1.7 Das Ziel der vorliegenden Arbeit

Um PBF näher zu charakterisieren wurde mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid Systems nach Interaktionspartnern gesucht. Dabei konnten 14-3-3 β und SAP30 als Bindeproteine identifiziert werden (BOECKLE, 2002). Diese Interaktionen sollten bestätigt und auf ihre Bedeutung für die Funktion von PBF untersucht werden.

2 Material

2.1 Bakterienstämme

- ***Epicurian coli* XL1-Blue**

Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, La Jolla, USA) - für Klonierungen

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

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

2.2 Eukaryonte Zellen

- **RTS3b**

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

- **C33A** (ATCC: HTB-31)

Humane Zervixkarzinom-Zelllinie ohne HPV-Genom mit epithelialer Morphologie (AUERSPERG, 1969; DEL VECCHIO, 1992).

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Operon (Köln) bezogen. Die Zahlenangaben beziehen sich jeweils auf die Positionen der Aminosäuren im Protein, bzw. der Nukleotidpositionen innerhalb der angegeben Sequenz. Enzymschnittstellen sowie die gegenüber der wt-Sequenz veränderten Nukleotide sind fett unterstrichen.

- Oligonukleotide für die Klonierung von PBF-Konstrukten:

Name	Sequenz
Klon 57-pET14b	GGGG <u>CTCGAG</u> AATTCTGTCTGCTGCAGGGTGGAGGAGGTGTGG
pACT2-3'	GTGAACTTGCGGGGTTTTTTCAGTATCTACG
PRF-1-5'/XhoI	CCCG <u>CTCGAG</u> GCGACTGTCCTGTCCCGACGCC
PRF-1-3'	CCATGATCAGTTTGGGGAGAACC
PRF-1/1133 down	GGG <u>CTCGAG</u> GCCGGAGGACTGGGCTTTGTG

PBF/669 XhoI-5'	CCC <u>CTCGAG</u> AGCAGTGGTGTCTCCACCCCC
PRF-1/788 UP	CCC <u>CTCGAG</u> CTGGACGAACCAGCTCCAC
PBF 3' 1878	GGGATC <u>CTCGAG</u> TCAGTCCAGAAAGCGCTGGCAGG
PBF 5' Pos. 1471	CCCATC <u>CTCGAG</u> CCAGAACATCCTGGCCCCGGAGTCC
PBF 5' Pos.1677	CCCATC <u>CTCGAG</u> CTAAGCTTCAGCGAGCCCCAGCAGCC
PBF 3' 1720	CCCATC <u>CTCGAG</u> TTTCATCGCAGGTGCTGGCTGC
PBF-564-3'	GGGATC <u>CTCGAG</u> CCCCGGGAGGACTCTGTACAACAGG
PBF 565-5' neu	CCCATC <u>CTCGAG</u> ACCGAGGCCAACTTCTCTGCTTCC
PRF-1/935 down	CCC <u>CTCGAG</u> AGAGTCCACTGTGTCCCCC
PRF-1 5'/BamHI	CG <u>GGATCC</u> ATGGCGAGTGTCTGTCCC
T7 prom. neg.	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
EcoRI/PRF1	CC <u>GAATTC</u> ATGGCGAGTGTCTGTCC
PRF-1/3'EndeXhoI	T <u>ACTCGAG</u> TCAGTCCAGAAAGCGCTGGC

- Oligonukleotide für die Klonierung von 14-3-3 β :

Name	Sequenz
14-3-3-5'-EcoRI	GGCCGC <u>GAATTC</u> GAATGACAATGGATAAAAGTGAGCTGG
ACT-Not-B	ATAAGAAT <u>GCGGCCGC</u> TTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACG
14-3-3 β BamHI-5'	GGCCGC <u>GGATCC</u> ATGACAATGGATAAAAGTGAGCTG
14-3-3 β HindIII-3'	CCCCTG <u>AAGCTT</u> TTAGTTCTCTCCCTCCCCAGCGTC

- Oligonukleotide für die Klonierung von HDAC1:

Name	Sequenz
HDAC1-EcoRI-5'	GGGATC <u>GAATTC</u> AAATGGCGCAGACGCAGGGC
HDAC1-XhoI-3'	GGGATC <u>CTCGAG</u> TCAGGCCAACTTGACCTC

- Oligonukleotide für *in vitro*-Mutagenesen:

Name	Sequenz
PBF-mtCR1-5'	CGAGGGGAGGCT <u>GTCGCCCTGGCCCT</u> GGTGTATGGCATCG
PBF-mtCR1-3'	CGATGCCATACACC <u>AGGGCCAGGGCGAC</u> AGCCACCCCACG
PBF-mtCR2-5'	GGTGCACGGCG <u>GTCGCCCTGGCCCT</u> GGCCTGCCAGCG
PBF-mtCR2-3'	CGCTGGCAGGCC <u>AGGGCCAGGGCGAC</u> CGCCGTGCACC
PBF5S447/449/451A	GTCCGGAGCCGG <u>GCG</u> GCTA <u>GCCTTCGCC</u> GAGCCCCAGCAGCC
PBF3S447/449/451A	GGCTGCTGGGGCTCG <u>GCG</u> GAAG <u>GC</u> TAGC <u>GC</u> CCGGCTCCGGAC

PBF-S394/396A-5'	CTCAGGGGCTCTC <u>GC</u> CAAG <u>G</u> CAGCTCCTGGCTCC
PBF-S394/396A-3'	GGACCCAGGAGCTG <u>C</u> CTT <u>G</u> CGAGAGCCCCTGAG
PBF-S275A	TCCACGAAAAAGAAAGAAC <u>G</u> CTGTGAAGGTGATGTAC
PBF-S275A-r	GTACATCACCTTCACAG <u>C</u> GTTCTTTCTTTTTCGTGGA
5'-PBFdel CR1	AAGTCGGACGCAGTGGAA^ACCGAGGCCAACTTCTCTGC
3'-PBFdel CR1	GCAGAGAAGTTGGCCTCGGT^TTCCACTGCGTCCGACTT

- Oligonukleotide für EMSA:

Name	Sequenz	Bemerkung
P2 TATA-A	AACCGACCGCACCCGGTACATAAAGGTGAGT	5': BS P2 von HPV8
P2 TATA-B	ACTCACCTTTATGTACCGGGTGCGGTCGGTT	3': BS P2 von HPV8
P105 TATA-A	TCGACGGTGATCCGTATATAAAGATGTGAGAAA	5': P105 von HPV18
P105 TATA-B	TGCATTTCTCACATCTTTTATATACGGATCACCG	3': P105 von HPV18

- Oligonukleotide für PBF-siRNAs:

Name	Sequenz	Verwendung
siRNA PBF 179 a	GATCCCGTCCTTAAGGCTCCCAGCATTCAAGAGATGC TGGGAGCCTTAAGGACTTTTTTGGAAA	5'-Pr., PBFsiRNA1
siRNA PBF 179 b	AGCTTTTCCAAAAAAGTCCTTAAGGCTCCCAGCATCTC TTGAATGCTGGGAGCCTTAAGGACGG	3'-Pr., PBFsiRNA1
siRNA PBF 841 a	GATCCCGTGCCTGTGGCCAACTGTTTCAAGAGAACA GTTTGGCCACAGGCACTTTTTTGGAAA	5'-Pr., PBFsiRNA2
siRNA PBF 841 b	AGCTTTTCCAAAAAAGTGCCTGTGGCCAACTGTTCT CTTGAAACAGTTTGGCCACAGGCACGG	3'-Pr., PBFsiRNA2
siRNA PBF 1450 a	GATCCCGAAGTGCCGCAAGGTGTATTTCAAGAGAATA CACCTTGCGGCACTTCTTTTTTGGAAA	5'-Pr., PBFsiRNA3
siRNA PBF 1450 b	AGCTTTTCCAAAAAAGAAGTGCCGCAAGGTGTATTCT CTTGAAATACACCTTGCGGCACTTCGG	3'-Pr., PBFsiRNA3

- Oligonucleotide für die PCR des ChIP-Assays:

Name	Sequenz	Verwendung
8NCR-Luc7302 for	GTTTCAAGCAGTTTGTCAACAGACGACCG	5'-Pr., für P2 PCR
8NCR-Luc7545back	GGCACTAACTGAGTCTGTTTTGG	3'-Pr., für P2 PCR

- Oligonuklotide für die RT-PCRs:

Name	Sequenz	Verwendung
PBF-808-5'	CGAAAAAGAAAGAACTCTGTG	5'-Pr., PBF, intronübergreifend
PBF-910-3'	CTGTGTCCCCCAGATGGAG	3'-Pr., PBF, intronübergreifend
Aktin-5'	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG	5'-Pr., Aktin, Produkt ~ 800 bp

Aktin-3'	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC	3'Pr., Aktin, Produkt ~ 800 bp
----------	----------------------------------	-----------------------------------

- Oligo (dT)₁₈ Primer

Falls nicht anders angegeben enthalten die im Folgenden aufgeführten Plasmide das β -Laktamasegen zur Selektion in Bakterien mittels Ampicillin.

2.3.2 Expressionsvektoren

- **pET14b** (4,7 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Epitop aus sechs Histidinresten fusioniert sind, unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Novagen, Madison, USA).
- **pET32c** (5,9 kb) ermöglicht die Expression von Proteinen fusioniert mit einem 109 AS Trx-Tag, einem His-Tag sowie einem S-Tag unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Novagen, Madison, USA).
- **pGEX2T, pGEX5x2** (4,9 kb) erlauben die Expression von Proteinen, die N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert sind, unter der Kontrolle eines tac-Promotors (IPTG induzierbar) (Amersham Biosciences, Freiburg).
- **pXJ41** (4,3 kb) ist ein von J.H. XIAO (1990) konstruierter Expressionsvektor mit einem CMV- und einem T7-Promotor sowie Ampicillin- und Tetracyclinresistenz.
- **pXJ41-HA** (4,3 kb) ist ein von J.H. XIAO (1990) konstruierter Expressionsvektor. Für die Expression von Proteinen mit einem N-terminal fusionierten Hämagglutinin-Epitop wurden die komplementären Oligonukleotide HA-EcoRI/BamHI-5' und HA-EcoRI/BamHI-3' über EcoRI und BamHI in den pXJ41-Vektor kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pcDNA 3.1+** (5,4 kb) erlaubt die Expression unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Er enthält außerdem einen SV40-Replikationsursprung und eine Neomycin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pcDNA3.1+-FLAG** (5,4 kb) exprimiert Proteine, die N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert sind unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Hierfür wurden die komplementären Oligonukleotide FLAG-HindIII/EcoRI-5' und FLAG-HindIII/EcoRI-3' über HindIII und EcoRI in pcDNA3.1+ kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pCMV-HA** (3,8 kb) erlaubt unter Kontrolle eines CMV-Promotors die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Hämagglutinin-Epitop fusioniert sind (BD Biosciences, Clontech, USA).
- **pCMV-Myc** (3,8 kb) ermöglicht unter Kontrolle eines CMV-Promotors die Expression von N-terminal fusionierten Proteinen mit einem Myc-Epitop (Clontech, Heidelberg).
- **pM** (3,5 kb) ermöglicht die Expression eines Proteins, das N-terminal an die Gal4-DBD fusioniert ist, unter der Kontrolle des SV40-Promotors (Clontech, Heidelberg).

- **pEGFP-C1** (4,7 kb) ist ein Expressionsplasmid unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Es ermöglicht die Expression von Proteinen mit N-terminal fusioniertem EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*). Weiterhin kodiert dieser Vektor für ein Kanamycin- und ein Neomycin-Resistenzgen (Clontech, Heidelberg).
- **pRSV- β -Gal** (7,3 kb) enthält das β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle des Rous-Sarkoma-Virus-Promotors (B.Bourachot, Paris).
- **pSilencer 3.0-H1** (2,8 kb) ermöglicht die Expression von siRNAs unter der Kontrolle des H1 RNA Polymerase III Promotors (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt).

2.3.3 Reporterplasmide

- **pALuc** (5,2 kb) ermöglicht den Einbau eines Promotors stromaufwärts des *firefly*-Luciferasegens (DONG *et al.*, 1994).
- **pHPV8-NCR-Luc**: Die NCR von HPV8 mit Teilen der flankierenden L1- und E6-Leserahmen (Position 7077-558) wurde als HindIII/BglIII-Fragment aus NCR8-CAT (STUBENRAUCH *et al.*, 1992) in die HindIII/BamHI-Schnittstellen von pALuc kloniert (LEMME, 1998).
- **pG5-Luc** (5,5 kb) enthält das EcoRI/BamHI-Fragment (138 bp) mit fünf Gal4-BS und dem Promotor P_{E1b TATA} aus pG5CAT (UAS_G 17mer x 5) vor dem Luciferasegen.
- **pG5 Δ -Luc** (5,5 kb) entspricht dem pG5-Luc-Vektor, bei dem die Gal4-BS über die Sall-Schnittstellen deletiert wurden.
- **BPV1-3xBS1-wt-Luc** kodiert vor dem Luciferasegen 3x die BS-1 von BPV1 vor dem MLP (major late promoter).

2.3.4 Rekombinante Plasmide

PBF-Konstrukte:

- **pET14b-PBF Δ N** kodiert eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-513). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *Klon57-pET14b* und *pACT2-3'* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (BOECKLE *et al.*, 2002).
- **pET14b-PBF** kodiert den ORF von PBF. Das 5'-Ende (AS 1-113) von PBF wurde über PCR mit den Oligonukleotiden *PRF-1-5'/XhoI* und *PRF-1-3'* amplifiziert und mit PBF Δ N (AS 114-513) über XhoI in pET14b kloniert (BOECKLE *et al.*, 2002).
- **pET14b-PBF Δ 5** kodiert eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-378). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *Klon57-pET14b* und *PRF-1/1133 down* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).

- **pET14b-FLAG-PBFΔ4** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 223-378). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PBF/669 XhoI-5'* und *PRF-1/1133 down* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pET14b-FLAG-PBFΔ9** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 263-513). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PRF-1/788 UP* und *PBF 3' 1878* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pET14b-PBFΔ10** kodiert eine Deletionsmutante von PBF (AS 379-513). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PBF 5' Pos.1471* und *PBF 3' 1878* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pET14b-PBFΔ11** kodiert eine Deletionsmutante von PBF (AS 447-513). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PBF 5' Pos.1677* und *PBF 3' 1878* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pET14b-PBFΔ12** kodiert eine Deletionsmutante von PBF (AS 379-461). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PBF 5' Pos.1471* und *PBF 3' 1720* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pET14b kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pET14b-PBFmtCR3a** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen (AS 484-488). Die Mutationen wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-mtCR1-5'* und *PBF-mtCR1-3'* in PBF eingebracht.
- **pET14b-PBFmtCR3b** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen (AS 502-506). Die Mutationen wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-mtCR2-5'* und *PBF-mtCR2-3'* in PBF eingebracht.
- **pET14b-PBFmtCR3** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen (AS 484-488 und AS 502-506). Die Mutationen von AS 502-506 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-mtCR2-5'* und *PBF-mtCR2-3'* in PBFmtCR3a eingebracht.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBF** kodiert für den ORF von PBF. PBF wurde aus pET14b isoliert und in pcDNA3.1-FLAG über XhoI kloniert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔN** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ5** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-378), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ6** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-188). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *Klon57-pET14b* und *PBF-564-3'* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ8** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 189-312). Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PBF 565-5' neu* und *PRF-1/935 down* amplifizierte Fragment wurde über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert.

- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ4** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 223-378), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ9** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 263-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ10** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 379-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ11** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 447-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔ12** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF (AS 379-461), die aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmt3** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Die Serine an den Positionen 447, 449 und 451 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF5S447/449/451A* und *PBF3S447/449/451A* in Alanine mutiert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmt4/5** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Die Serine an den Positionen 394 und 496 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-S394/396A-5'* und *PBF-S394/396A-3'* in Alanine mutiert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmt6** kodiert für den ORF von PBF mit einer Punktmutation. Das Serin an der Positionen 275 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-S275A* und *PBF-S275A-r* in ein Alanin mutiert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmt3/6** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Das Serin an der Positionen 275 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-S275A* und *PBF-S275A-r* in PBFmt3 in ein Alanin mutiert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmt3/4/5** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Die Serine an den Positionen 447, 449 und 451 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF5S447/449/451A* und *PBF3S447/449/451A* in PBFmt4/5 in Alanine mutiert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmt3/4/5/6** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Das Serin an der Positionen 275 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-S275A* und *PBF-S275A-r* in PBFmt3/4/5 in ein Alanin mutiert.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFmtCR3** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen (AS 484-488 und AS 502-506), der aus pET14b isoliert und über XhoI in pcDNA3.1-FLAG kloniert wurde.
- **pcDNA3.1-FLAG-PBFΔNES** kodiert für eine Deletionsmutante von PBF. Die Deletion von AS 165-188 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *5'-PBFdel CR1* und *3'-PBFdel CR1* in PBF eingebracht.

- **pGEX-2T-PBF** kodiert für den ORF von PBF. Das über PCR mit den Oligonukleotiden *PRF-1 5'/BamHI* und *T7 prom. neg.* amplifizierte Fragment wurde über BamHI in pGEX-2T kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pEGFP-C1-PBF** kodiert für den ORF von PBF. PBF wurde aus pGEX-2T isoliert und über BamHI in pEGFP-C1 kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pEGFP-C1-PBFmt4/5** kodiert für den ORF von PBF mit AS-Austauschen an den Positionen 394 und 396, der aus pcDNA3.1-FLAG über XhoI isoliert und in pEGFP-C1 über Sall kloniert wurde.
- **pEGFP-C1-PBFmt3/4/5** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Die Serine an den Positionen 447, 449 und 451 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF5S447/449/451A* und *PBFS447/449/451A* in PBFmt4/5 in Alanine mutiert.
- **pEGFP-C1-PBFmt3/4/5/6** kodiert für den ORF von PBF mit Punktmutationen. Das Serin an der Positionen 275 wurden über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PBF-S275A* und *PBF-S275A-r* in PBFmt3/4/5 in ein Alanin mutiert.
- **pXJ41ΔN** kodiert eine Deletionsmutante von PBF (AS 114-513), die aus pET14b isoliert und über XhoI und EcoRI in pXJ41 kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pXJ41-PBF** kodiert für den ORF von PBF. Das 5'-Ende (AS 1-113) von PBF wurde über PCR mit den Oligonukleotiden *PRF-1-5'/BamHI* und *PRF-1-3'* amplifiziert und mit PBFΔN (AS 114-513) über BamHI in pXJ41 kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pM-PBF** kodiert für den ORF von PBF. Das über PCR mit den Oligonukleotiden *EcoRI/PRF1* und *PRF-1/3'EndeXhoI* amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und Sall in pM kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pM-PBFmt3/4/5** kodiert den ORF für PBF mit AS-Austauschen an den Positionen 394, 396, 447, 449 und 451, der aus pcDNA3.1-FLAG isoliert und über XhoI und XbaI in pM kloniert wurde.

14-3-3β-Konstrukte:

- **pGEX-5x2-14-3-3β** kodiert den ORF von 14-3-3β. Das über PCR mit den Oligonukleotiden *14-3-3-5'-EcoRI* und *ACT-Not-B* amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und NotI in pGEX-5x2 kloniert (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pCMV-HA-14-3-3β** kodiert den ORF von 14-3-3β der aus pACT2 isoliert und über EcoRI und XhoI in pCMV-HA kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pXJ41-HA-14-3-3β** kodiert den ORF für 14-3-3β. Das über PCR mit den Oligonukleotiden *14-3-3β BamHI-5'* und *14-3-3β HindIII-3'* amplifizierte Fragment wurde über BamHI und HindIII in pXJ41-HA kloniert.

SAP30-Konstrukte:

- **pCMV-HA-SAP30** kodiert den ORF von SAP30 der aus pACT2 isoliert und über EcoRI und XhoI in pCMV-HA kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pGEX-5x2-SAP30** kodiert den ORF für SAP30, der aus pCMV-HA isoliert und über EcoRI und XhoI in pGEX-5x2 kloniert wurde.
- **pET32c-SAP30** kodiert den ORF für SAP30, der aus pCMV-HA isoliert und über EcoRI und XhoI in pGEX-5x2 kloniert wurde.

HDAC1-Konstrukte:

- **pGEX-5x2-HDAC1** kodiert den ORF für HDAC1. Das über PCR mit dem Template pOTB7-HDAC1 (RZPD) und den Oligonukleotiden *HDAC1-EcoRI-5'* und *HDAC1-XhoI-3'* amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und XhoI in pGEX-5x2 kloniert wurde.
- **pET32c-HDAC1** kodiert den ORF für HDAC1. Das über PCR mit dem Template pOTB7-HDAC1 (RZPD) und den Oligonukleotiden *HDAC1-EcoRI-5'* und *HDAC1-XhoI-3'* amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und XhoI in pET32c kloniert wurde.
- **pCMV-Myc-HDAC1** kodiert den ORF für HDAC1. Das über PCR mit dem Template pOTB7-HDAC1 (RZPD) und den Oligonukleotiden *HDAC1-EcoRI-5'* und *HDAC1-XhoI-3'* amplifizierte Fragment wurde über EcoRI und XhoI in pCMV-Myc kloniert wurde.

E6-Konstrukte

- **pGEX-2T-8E6** kodiert den ORF HPV8-E6, der über BamHI und EcoRI in pGEX-2T kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pXJ41-FLAG-8E6** kodiert den ORF HPV8-E6 mit N-terminalem FLAG-Epitop, der aus pcDNA3.1-FLAG isoliert und über HindIII und XhoI in pXJ41 kloniert wurde.
- **pXJ41-FLAG-8E6-N** kodiert eine Deletionsmutante von HPV8-E6 (AS 1-93) mit N-terminalem FLAG-Epitop, die aus pcDNA3.1-FLAG isoliert und über HindIII und XhoI in pXJ41 kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pXJ41-FLAG-8E6-C** kodiert eine Deletionsmutante von HPV8-E6 (AS 94-155) mit N-terminalem FLAG-Epitop, die aus pcDNA3.1-FLAG isoliert und über HindIII und XhoI in pXJ41 kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pXJ41-FLAG-16E6** kodiert den ORF HPV16-E6 mit N-terminalem FLAG-Epitop, der über HindIII und XhoI in pXJ41 kloniert wurde (STEGGER, pers. Mitteilung).

weitere Konstrukte:

- **pcDNA3.1-FLAG-Myr-Akt1** kodiert den ORF für Akt1 mit N-terminalem FLAG-Myr-Epitop, der aus pWZLneo (Martin Eilers, Universität Marburg) isoliert und über EcoRI in pcDNA3.1 kloniert wurde.

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

2.3.5 DNA-Längenstandards

- 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
- 1 kb-plus DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.3.6 Sonstige Nukleinsäuren

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

2.4 Radioaktivität

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

2.5 Proteine

2.5.1 Enzyme

- Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:
 - Invitrogen, Karlsruhe
 - MBI Fermentas, St.Leon-Rot
- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
- T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
- T4 Polynucleotidkinase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)
- Pwo DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNase A (Qiagen, Hilden)
- Proteinase K (Gibco BRL, Eggenstein)

2.5.2 Größenstandards

- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, niedermolekular, vorgefärbt (MBI Fermentas, St.Leon-Rot)

2.5.3 Antiseren

- **α -FLAG (M5)**: monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Epitop aus der Maus (Kodak, New Haven, USA).
- **α -PBF**: über Protein A/G affinitäts-gereinigtes polyklonales Antiserum gegen bakteriell exprimiertes PBF aus dem Kaninchen (BOECKLE *et al.*, 2002).
- **α -14-3-3 β (H-8)**: monoklonaler Antikörper gegen das humane 14-3-3 β aus der Maus (Santa Cruz, Heidelberg).
- **α -BPV1-E2**: polyklonaler Antikörper gegen das E2-Protein von BPV1 aus dem Kaninchen (DOSTATNI *et al.*, 1991).
- **α -HA**: monoklonaler Antikörper gegen das humane Hämagglutinin-Epitop aus der Ratte (Roche Diagnostics, Mannheim).
- **α -Myc**: monoklonaler Antikörper gegen das humane Myc-Epitop aus der Maus (BD Biosciences, Heidelberg).
- **α -Aktin (C-11)**: polyklonaler Antikörper gegen das humane Aktin aus der Ziege (Santa Cruz, Heidelberg).
- **α -His (Ni²⁺-NTA) HRP** : HRP-konjugierter Antikörper gegen His₆ (Qiagen, Hilden)
- **α -Maus/Kaninchen POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-IgG (Roche Diagnostics, Mannheim).
- **α -Maus POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG (dianova, Hamburg).
- **α -Maus POD (κ)**: POD-gekoppelter Antikörper gegen die leichte Kette des Maus-IgG (DPC Biermann, Bad Nauheim).
- **α -Kaninchen POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- **α -Ratte POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Ratten-IgG (Boehringer, Mannheim).
- **α -Ratte TRITC**: TRITC-gekoppelter Antikörper gegen Ratten-IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim).
- **α -Ziege POD**: POD-gekoppelter Antikörper gegen Ziegen-IgG (Sigma-Aldrich, Steinheim).

2.5.4 Präzipitations-Reagenzien

- **Protein G PLUS-Agarose** (Santa Cruz, Heidelberg)
- **ANTI-FLAG[®] M2 Agarose**: Agarose mit gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen das FLAG-Epitop (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Anti-Myc Agarose**: Protein A-Agarose mit gekoppelten monoklonalen Antikörpern gegen das humane Myc-Epitop (BD Biosciences, Heidelberg)
- **Glutathion-Sepharose[™] 4B** (Amersham, Freiburg)
- **Ni²⁺-NTA-Agarose** (Qiagen, Hilden)

2.6 Protease- und Phosphatase Inhibitoren

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

2.7 Medien

2.7.1 Medien und Antibiotika für die Kultivierung von Bakterien

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

Fertigmedium von AppliChem (Darmsatdt)

Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
(pH 7,2)	
→ 25g/l H ₂ O	

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

Fertigmedium von AppliChem (Darmsatdt)

Trypton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Bacto- Agar	15 g/l
(pH 7,2)	
→ 40 g/l H ₂ O	

Das Medium, bzw. der Agar wurden zur Selektion, abhängig vom Resistenzgen der Plasmide, mit 100µg/ml Ampicillin, oder mit 50µg/ml Kanamycin versetzt.

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stocklösung: 100mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 100µg/ml

Kanamycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stocklösung: 50mg/ml in H₂O

Endkonzentration: 50µg/ml

2.7.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryonter Zellen

- **Dulbecco's MEM** (modified Eagle Medium) für C33a-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)
mit Glutamax, 45000 mg Glucose, Pyridoxin, ohne Natriumpyruvat

Zusätze:

FCS	10%	(Gibco BRL, Eggenstein)
Streptomycinsulfat	100 mg/l	(Invitrogen, Karlsruhe)
Penicillin	100 mg/l	(Invitrogen, Karlsruhe)

- **E-Medium** für RTS3b-Zellen

Dulbecco's MEM	50%	
Dulbecco's Nut Mix F-12	50%	(beide Invitrogen, Karlsruhe)
Transferrin	5 µg/ml	
Triiodo-thyronin	2×10^{-11} M	
Adenin	$1,8 \times 10^{-4}$ M	
Insulin	5 µg/ml	
Hydrocortison	0,4 µg/ml	(alle Sigma-Aldrich, Steinheim)
Epinephrin	1 µg/ml	(Calbiochem, Schwalbach)
EGF	10 ng/ml	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
FCS	10%	
Streptomycinsulfat	100 mg/ml	
Penicillin	100 mg/ml	(alle Invitrogen, Karlsruhe)

- PBS
- Trypsin EDTA (beide Invitrogen, Karlsruhe)
- G418 für die Herstellung stabiler Zelllinien (Gibco BRL, Eggenstein)

- **Einfriermedium**

DMSO	10%
FCS	90%

2.8 Reagenzien

2.8.1 Reagenziensysteme (Kits)

- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep Spin /QIAprep 8 Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *Gel Extraction* Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *PCR Purification* Kit (Qiagen, Hilden)

- QuickChange™ *Site-directed Mutagenesis* Kit (Stratagene, La Jolla, USA)
- TNT *Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Madison, USA)
- BM *Chemiluminescence Western Blotting Kit* (Roche, Mannheim)
- ImmunoPure®(A/G) *IgG Purification Kit* (Pierce, Bonn)

2.8.2 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Kernextrakten:

Puffer A

HEPES pH 7,9	10 mM
KCL	10 mM
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Pepstatin	5 µg/ml

Puffer C

HEPES, pH 7,9	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Pepstatin	5 µg/ml

Für die Herstellung von Zellextrakten :

LSDB (*Low Salt Dilution Buffer*)

Glycerin	20%
Tris/Cl pH 7,9	50 mM
NP40	0,1%
KCL	100 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Aprotinin	5 µg/ml
Leupeptin	5 µg/ml
Pepstatin	5 µg/ml
Natriumorthovanadat	1 mM
Natriumfluorid	50 mM

Für Affinitätschromatographien :

HSLB (*High Salt Lysis Buffer*)

Glycin	10%
Tris/Cl pH 8,0	20 mM
NaCl	0,5 M
β-Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	10 µg/ml
Pepstatin	10 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml
Imidazol	5 mM

Puffer A_{x-y} (verschiedenen Puffer)

Glycerin	10%
Tris/Cl pH 8,0	20 mM
KCL (0-1000 mM)	x mM
Imidazol	y mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	1 mM

Für Proteingele :**SDS-Polyacrylamidgele (PAG)****Trenngel : 10-15%ig**

Acrylamid/Bisacrylamid	0,267-0,4%
4x Tris/Cl/SDS, pH 8,8	25%
Ammoniumpersulfat	0,03%
TEMED	0,1%

Sammelgel : 3,9%ig

Acrylamid/Bisacrylamid	0,1%
4x Tris/Cl/SDS, pH 6,8	25%
Ammoniumpersulfat	0,05%
TEMED	0,1%

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

Tris-Base	1,5 M
SDS	0,4%

(mit HCl auf pH 8,8 eingestellt)

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

Tris-Base	0,5 M
SDS	0,4%

(mit HCl auf pH 8,8 eingestellt)

2x SDS-Probenpuffer

Tris/Cl, pH 6,8	125 mM
Glycerin	20%
SDS	2%
β -Mercaptoethanol	2%
Bromphenol-Blau	15 μ M

(mit 1N HCl auf pH 6,8 eingestellt)

SDS-Elektrophorese-Puffer

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

Coomassie Färbelösung

Methanol	50%
Essigsäure	10%
<i>Coomassie brilliant blue</i>	0,05%

Entfärbelösung

Methanol	5%
Essigsäure	7%

Für Western Blots :**Transferpuffer**

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20%

TBST

Tris/Cl, pH 7,9	10mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05%

Abblock-Lösung/Antikörper-Verdünnungslösung

Milchpulver in TBST	4%
---------------------	----

Für EMSA :**Polyacrylamidgel : 4,5%ig**

Acrylamid/Bisacrylamid	0,222%
TBE	0,5x
Ammoniumpersulfat	0,04%
TEMED	0,2%

TBE-Puffer

Tris-Borat	45 mM
EDTA	1 mM

Bindungs-Puffer

HEPES, pH 7,9	12 mM
Glycerol	10%
MgCl ₂	4 mM
NaCl	200 mM
KCl	60 mM
EDTA	0,5 mM
NP40	0,1%
BSA	50 ng/μl
SSSDNA	50 ng/μl
DTT	4 mM
Spermidin	0,8 mM

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

K ₂ HPO ₄	915 mM
KH ₂ PO ₄	85 mM

Reportersol-Lyse-Puffer

KPO ₄ -Puffer, pH 7,8	100 mM
NP40	0,1%
DTT	1 mM

Luciferase-Reaktions-Puffer

KPO ₄ -Puffer, pH 7,8	100 mM
MgSO ₄	15 mM
ATP	5 mM

ATP-Stammlösung

ATP	100 mM
Tris/Cl, pH 7,9	200 mM

Luciferin-Stammlösung (100x)

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

Für β-Gal-Tests :**β-Gal-Puffer**

MgCl ₂	1 mM
β-Mercaptoethanol	45 mM
ONPG	0,67 mM
in PBS	

PBS

NaCl	137mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

ONPG-Lösung

ONPG 4 mg/ml (AppliChem, Darmstadt)
 in 0,1 M NaPO₄-Puffer, pH 7,0

Für Agarosegele :**TAE-Puffer**

Tris-Acetat 40 mM
 EDTA 1 mM

Farbmarker (6x)

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

Ethidiumbromidbad

Ethidiumbromid 1 µg/ml
 in H₂O

Für ChIP-Assay :**ChIP Dilution Buffer**

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

Low Salt Wash Buffer

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

High Salt Wash Buffer

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

LiCl Wash Buffer

Tris/Cl, pH 8,1 10 mM
 EDTA 1 mM
 Natrium-Deoxycholat 1%
 IGEPAL-CA630 1%
 LiCl 250 mM

SDS-Lyse-Puffer

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

sonstige Puffer :**2x HBS**

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
HEPES, pH 7,05	50 mM

TE-Puffer

Tris/Cl	10 mM
EDTA	1 mM

2.8.3 Inhibitoren

- **MG132** (Proteasom-Inhibitor) (Serva, Heidelberg)
- **Wortmannin** (irreversibler PI3K-Inhibitor) (Serva, Heidelberg)
- **LY294002** (reversibler PI3K-Inhibitor) (BIOMOL, Hamburg)
- **Trichostatin A** (TSA, Histondeacetylase-Inhibitor) (BIOMOL, Hamburg)

2.8.4 Sonstige Chemikalien und Materialien

- Agarose
- Albumin Fraktion V (AppliChem, Darmstadt)
- Amplifizierer (*Amplify Fluographic Reagent*) (Amersham, Freiburg)
- β -Mercaptoethanol (AppliChem, Darmstadt)
- D-Luciferin, freie Säure (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Formaldehyd (Merck AG, Darmstadt)
- Fötale Kälberserum (FCS) (Invitrogen, Karlsruhe)
- FuGENE6 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- GEMSA-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung) (MERCK, Darmstadt)
- Hyperfilme für ECL und Autoradiographie (Amersham, Freiburg)
- Imidazol (AppliChem, Darmstadt)
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:42:1) (Roth, Karlsruhe)
- Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad, München)
- Rifampicin (AppliChem, Darmstadt)
- RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Saponin (AppliChem, Darmstadt)
- Spermidin, freie Base (N-[3-Aminopropyl]-1,4-butandiamin) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethyldiamin) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Western Blot Membranen aus Nitrocellulose 0,45 μ m (Schleicher & Schuell, Dassel)

3 Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente XL1-Blue- und BL21-pLysS-Bakterien wurden nach der Methode von CHUNG und MILLER (1988) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml einer frischen Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Mit 20 ml dieser Kultur wurden nun weitere 100 ml LB-Medium angeimpft, welche wiederum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert wurde. Bei BL21-Bakterien wurde das Medium zur Selektion auf das pLysS-Plasmid zusätzlich mit 170 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Die Bakterien wurden dann für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 3000 g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml eiskaltem TSB resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Um die Effizienz der kompetenten Bakterien zu testen, wurden 100 µl der Bakterien mit 1 ng und 10 ng eines Testplasmids transformiert. Anhand der Anzahl der Kolonien konnte nun die Effizienz der Bakterien für 1 µg zu transformierender DNA berechnet werden. Die Effizienz lag in der Regel zwischen 5×10^5 bis 3×10^6 Kolonien/µg DNA.

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter XL1-Blue- und BL21-pLysS-Bakterien wurden ca. 1 ng DNA bzw. die DNA eines Ligationsansatzes mit 100 µl Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem 45 sekündigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Zugabe von 100 µl LB/10 mM Glukose erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C unter Schütteln, um das Resistenzgen zu exprimieren. Anschließend erfolgte die Selektion der transformierten Zellen auf einer ampicillin- bzw. kanamycinhaltigen LB-Agar Platte bei 37°C über Nacht.

3.1.3 Langzeitlagerung von Bakterien

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

3.2 Zellkulturmethoden

Die hier verwendeten adhärennten Zelllinien wurden bei 37°C, 6% CO₂ und 80-90% Luftfeuchtigkeit mit geeignetem Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Arbeiten mit den Zelllinien fanden unter einer Sterilbank statt.

3.2.1 Kultivierung eukaryonter Zellen

Die **C33A**- und **RTS3b**-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% subkultiviert, um Kontaktinhibition der adhärennten Zellen in den Zellkulturflaschen zu vermeiden. Zum Lösen der Zellen vom Boden, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA je nach Zelllinie für 2-6 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie bzw. erwünschtem Dichtegrad in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Für die Langzeit-Lagerung von Zellen wurden die in einer großen Gewebekulturflasche (150 cm²) zu 80-90% konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und anschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Danach wurden sie 5 min bei 250 g zentrifugiert, das Pellet in 4.5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1.5 ml in Einfriereröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl einer Suspension zu ermitteln, wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und eine Fläche von 0,002 m² verwendet. Nachdem sie mit einem Deckglas versehen wurde, konnte ihre Oberfläche mit einem Aliquot von der zuvor gut gemischten Zellsuspension versetzt werden. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Zellen in den vier Hauptquadraten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl der in einem Hauptquadrat gezählten Zellen multipliziert mit 10⁴ entspricht der Anzahl der Zellen in 1 ml der Suspension.

3.2.4 Transfektion von eukaryonten Zellen mit Plasmid-DNA

Transiente Transfektionsanalysen wurden mit RTS3b- und C33A-Zellen durchgeführt. Dabei wurden Transfektionsreagenzien verwendet, die mit der eingesetzten DNA Komplexe bilden, und somit in die Zellen aufgenommen werden. Die in die Zellen eingeschleuste DNA wird in der Regel nicht ins Zellgenom integriert und geht somit im Verlauf der Zellteilung wieder verloren. Die so transfizierten Zellen wurden etwa 48 h nach der Transfektion auf die Expression der Plasmide untersucht.

3.2.4.1 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Die Transfektionen von C33A-Zellen wurden mittels Calciumphosphat-Präzipitation nach (AUSUBEL *et al.*, 1992) durchgeführt. Dafür wurden in 10 cm Zellkulturschalen $3,16 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde die zu transfizierende DNA (bis zu 15 µg) mit H₂O auf ein Volumen von 430 µl aufgefüllt und mit 493 µl 2xHBS vermischt. Nach Zugabe von 63 µl 2M CaCl₂ wurden die Proben sofort 10 sec mit Hilfe eines Vortexers gemixt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat vorsichtig auf die Zellen pipettiert. 24 h vor der Ernte wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

3.2.4.2 Transiente Transfektion mittels „FuGENE“

Die Transfektion von RTS3b-Zellen wurde mit „FuGene“ durchgeführt. Dafür wurden die Zellen hauptsächlich in 12-Loch-Platten ausgesät. Die Anzahl der Zellen pro Loch betrug $0,3 \times 10^5$ Zellen in 1 ml Medium. Am folgenden Tag wurden 0,25-1 µg DNA pro Loch transfiziert. Hierfür wurde „FuGENE“ in einem Verhältnis von 1:2 eingesetzt. In einem Gesamtansatz wurden pro Probe 50 µl serumfreies Medium mit 0,5-2 µl „FuGENE“-Transfektionsreagenz für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl des Gemisches zu der DNA gegeben und zur Komplexbildung 15 min bei RT inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden daraufhin auf die Zellen pipettiert. Die Ernte erfolgte 48 h nach Transfektion.

3.2.4.3 Stabile Transfektion

Für die stabile Transfektion wurden RTS3b-Zellen mit dem Transfektionsreagenz „FuGENE“ in 6-Loch-Platten transfiziert. Hierfür wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1, welcher ein Neomycin-Resistenzgen trägt, eingesetzt. Zur Selektionskontrolle wurde ein Loch der Transfektion ohne DNA unterzogen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und in G418-haltiges Medium (800 µg/ml) überführt. Alle zwei Tage wurden sie mit frischem G418-haltigem (600-400 µg/ml) Medium gefüttert. Transfizierte Zellen waren gegenüber dem Zellantibiotikum G418 resistent und konnten innerhalb von 2-3 Wochen Zellkolonien bilden, welche ggf. weiter kultiviert wurden.

3.2.5 Wachstums-Assay

Für den Wachstums-Assay wurden RTS3b-Zellen wie unter 3.2.4.3 beschrieben stabil transfiziert. 11-14 Tage nach Selektion wurden die Zellkolonien zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend entweder trypsinisiert und zur Quantifizierung mittels FACS gezählt oder mit 1 ml 10% GIEMSA-Lösung in PBS 15 min fixiert. Die gefärbten und fixierten Kolonien wurden daraufhin dreimal 5 min mit Leitungswasser gewaschen und getrocknet.

3.2.6 Zellernte

3.2.6.1 Ernte durch physikalischen Zellaufschluss

Die C33A-Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen und in jeweils 5 ml PBS mit einem Gummischaber vom Boden abgekratzt, in ein 15 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 250 g pelletiert. Nach Resuspension des Zellpellets in 200-300 µl 0,1 M LSDB-Puffer wurden die Zellen 5x30 sec in Eiswasser sonifiziert, um die Zellmembranen zu zerstören. Der Zellextrakt wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 21000g von den Zelltrümmern getrennt und in ein neues Eppendorfgefäß auf Eis überführt. Dieser konnte dann bei -80°C gelagert werden oder direkt für Protein-Protein-Interaktionsanalysen eingesetzt werden.

3.2.6.2 Ernte durch chemischen Zellaufschluss

Besonders fest am Boden von Gewebegefäßen haftende Zellen, wie RTS3b- Zellen, werden während des Abkratzens mit dem Gummischaber beschädigt. Dadurch geht ein Großteil des Extraktes verloren. Dies konnte durch einen chemischen Zellaufschluss mit NP40 verhindert werden. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, mit 150 µl Reportersol überschichtet und 5 min bei RT inkubiert. Der Überstand konnte nach Abzentrifugation von Zellresten direkt für die Luciferaseanalysen eingesetzt werden.

3.2.7 Luciferase-Test

Die Messung der Expression des Luciferase-Reportergens ist eine schnelle Methode zur Aktivitätsbestimmung von Promotorsequenzen (DE WET *et al.*, 1987), und erfolgte im Lumat LB9501 (Berthold, Wildbad). Hierfür wurde eine entsprechend der Anzahl der zu messenden Proben adäquate Menge an Luciferase-Reaktions-Puffer 1:100 mit D-Luciferin versetzt. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 10 sec mit einem Aliquot des Zellextrakts, je nach Aktivität des Reporterkonstrukts. Der ermittelte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der exprimierten Luciferase, welcher entweder zur Anzahl der Zellen (Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben), oder zur Anzahl transfizierter Zellen (β -Gal-Expression) relativiert wurde (RLU/Proteinkonzentration oder β -Gal).

3.2.8 β -Galaktosidase-Test

Die Messung der β -Galaktosidase (β -Gal)-Aktivität diente der Bestimmung der Transfektionseffizienz. 50 µl der isolierten Extrakte wurden mit 450 µl β -Gal-Puffer und 100 µl ONPG versetzt und bis zu einem gelben Farbumschlag bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (H₂O statt Extrakt) angesetzt, welche bei der Messung der Proben bei einer OD von 420 nm als Referenzwert diente.

3.2.9 Immunfluoreszenzanalysen

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden zunächst $0,2 \times 10^5$ RTS3b-Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit 200 ng der DNA, die für die zu untersuchenden Proteine kodiert, mittels „FuGENE“ transfiziert. Nach 24 h bzw. 48 h wurden sie nach zwei PBS-Waschschritten mit 500 μ l 2% Formaldehyd 10 min bei RT fixiert. Es folgten drei Waschschritte mit 1 ml PBS für je 5 min. Die Zellen wurden daraufhin mit 500 μ l PBS/10% FCS für 20 min blockiert. Der 1. Antikörper wurde nach Protokoll 1:25 in PBS/10% FCS/0,1% Saponin verdünnt. Von der Antikörperverdünnung wurden je 200 μ l auf die Zellen gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal mit 1 ml PBS/ 10% FCS gewaschen. Der TRITC-konjugierte 2. Antikörper wurde 1:32 verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit 1 ml PBS/ 10% FCS gewaschen und dann mit 500 μ l PBS überschichtet. Die Zellen konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica CTR 6000) betrachtet werden.

3.3 DNA-Methoden

3.3.1 Kulturen zur Plasmidisolierung

Für die Plasmidisolierung wurde LB-Medium mit geeigneten Selektionsmarkern (100 μ g/ml Ampicillin bzw. 50 μ g/ml Kanamycin) mit Bakterien aus Vorkulturen oder von einer LB-Agar-Platte angeimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht wachsen gelassen. Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (Sarstedt) und für eine präparative Plasmidisolierung bis zu einem Volumen von 200 ml in einem sterilen 1 L Erlenmeyer-Kolben angeimpft.

3.3.2 Plasmidpräparationen

Analytische und präparative Plasmidisolierungen als auch DNA-Fragment-Aufreinigungen wurden mit Reagenziensysteme (Kits) der Firma QIAGEN (Hilden) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt (QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep, Plasmid Midi- und Maxiprep, *Gel Extraction* und *PCR Purification* Kit). Sie basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach BIRNBOIM und DOLY (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzgel). Der DNA-Gehalt wurde spektralphotometrisch bei einer OD von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt.

3.3.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden im Servicelabor des ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin) der Universität zu Köln durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5-10 pmol Primer und

ca. 300 ng Plasmid in einem Gesamtvolumen von 6 µl eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über das Programm Edit View Vers. 1.0.2 (Perkin Elmer).

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Amplifikationen für präparative Zwecke wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Hierfür wurden 50 ng Plasmid-DNA und jeweils 0,5 µg beider Primer eingesetzt. Alle Reaktionen wurden mit einer Mg^{2+} -Konzentration von 1-2 mM und je 25 µM der vier Desoxynukleotide durchgeführt. Nach Zugabe von 2,5 Units (U) Pwo- bzw. Taq-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt. Die Temperaturzyklen wurden nach folgendem Basisschema gestartet:

1 x	94°C	2 min	(Prä-Denaturierung)
30 x	94°C	15 sec	(Denaturierung)
	57°C	30 sec	(Hybridisierung)
	72°C	1-3 min	(Polymerisierung)
1 x	72°C	5 min	

Je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Bereiches wurden die Temperaturen und Zeiten der Hybridisierung und/oder der Extension variiert. Die Größe und Menge des PCR-Produktes und somit die Spezifität der Oligonukleotide und der PCR-Bedingungen wurden anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.3.5 In vitro Mutagenese

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

5 µl Reaktionspuffer
1 µl Plasmid (50 ng/µl)
1 µl Oligonukleotid A (125 ng/µl)
1 µl Oligonukleotid B (125 ng/µl)
1 µl dNTP-Mix
1 µl *Pfu Turbo* DNA-Polymerase
ad 50 µl H₂O

PCR-Bedingungen: 1 x 95°C 30 sec
18 x { 95°C 30 sec
55°C 1 min
68°C 2 min/kb der zu amplifizierenden DNA-Länge
1 x 68°C 10 min

Der Mutagenese-Ansatz wurde nach Beendigung der PCR 1 h bei 37 °C, nach Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym DpnI, inkubiert. Durch das Enzym wurde die parentale methylierte Plasmid-DNA, welche nicht die gewünschte Mutation trägt, in kleine DNA-Fragmente zerschnitten. Für die Transformation in *E.coli* wurden jeweils 1-4 µl des Restriktionsansatzes und 50 µl XL1-Blue-Bakterien verwendet. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung auf die Anwesenheit der Mutation überprüft.

3.3.6 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden wurde mit der Polynukleotidkinase (PNK) des Bakteriophagen T4 durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert den Transfer des Gamma-Phosphats von ATP an das 5'-OH-Ende der DNA. Für die radioaktive Markierung von 20 ng doppelsträngiger Oligonukleotide wurden 5 µCi ³²P-Gamma-ATP (5000 Ci/mmol) und 10 U PNK eingesetzt und in geeignetem Kinasepuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 10 min bei 70°C erhitzt, und langsam auf RT abgekühlt.

3.3.7 DNA-Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von MANIATIS *et al.*, (1989), AUSUBEL *et al.*, (1997) oder nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

- Ethanol- und Phenolfällung von DNA
- DNA-Konzentrationsbestimmung
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Phosphorylierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase

- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase
- Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Polymerase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren in Agarosegelen
- Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Gelextraktion

3.4 RNA-Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung aus eukaryonten Zellen

Für die Isolierung von RNA aus eukaryonten Zellen wurden Reagenziensysteme der Firma Qiagen verwendet (QIAshredder und RNeasy Mini Kit). Die RNA wurde säulenchromatographisch durch Adsorption an eine Silica-Gel-basierte Membran isoliert. Hierzu wurden die Zellen in Gegenwart eines Guanidin Isothiocyanat (GITC)-haltigem Puffers lysiert und mittels QIAshredder homogenisiert. Die Isolierung und Aufreinigung wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der RNA-Gehalt wurde spektralphotometrisch bei einer OD von 260 nm bestimmt.

3.4.2 Two-Step-RT-PCR

Bei der zweistufigen RT-PCR werden die Reverse-Transkriptase-Reaktion und die anschließende PCR sequenziell in zwei separaten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass die PCR optimiert werden kann, ohne dass die Reverse Transkription beeinflusst wird.

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit der Omniscript Reversen Transkriptase von QIAGEN nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden 1 µg Template-RNA, welche zuvor mit DNase I behandelt wurde, und 10 µM Oligo-(dT)₁₈-Primer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Zur Aufrechterhaltung der RNase-freien Bedingungen wurde zusätzlich ein RNase-Inhibitor beigesetzt. Nach Inaktivierung der Reversen Transkriptase durch Erhitzen wurde ein Aliquot der synthetisierten cDNA für die PCR eingesetzt.

3.5 Proteinmethoden

3.5.1 Herstellung von Ganzzellextrakten

Ganzzellextrakte wurden durch physikalischen Zellaufschluss, wie unter 2.3.6.1 beschrieben, hergestellt.

3.5.2 Herstellung von Cytoplasma- und Kernextrakten

Kernextrakte wurden nach SCHREIBER *et al.* (1989) hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend unter PBS mit einem Gummischaber abgekratzt. Nach Pelletierung der Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 250g, wurden sie in 400 µl Puffer A resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Unmittelbar nach der Zugabe von 25 µl 10% NP40 wurde die Zellsuspension sofort 10 sec auf dem Vortexer gemixt und anschließend 30 sec bei 21000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält den Cytoplasmaextrakt. Zur Gewinnung des Kernextrakts wurde das Pellet in 50 µl Puffer C aufgenommen und 45 min bei 4°C geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 21000 g konnte der Überstand mit enthaltenem Kernextrakt für Experimente eingesetzt werden. Die Langzeitlagerung der Extrakte erfolgte bei -80°C.

3.5.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt. Hierfür wurde in eine 96-Loch-Platte eine BSA-Verdünnungsreihe (0-10 µg) als Eichkurve und 1-2 µl der proteinhaltigen Lösung als Doppelansatz pipettiert. Die Proben wurden mit 150 µl einer 1:5 Verdünnung des *Protein Assay Reagents* (BioRad) versetzt. Anschließend wurde die OD₆₂₀ in einem Spektralphotometer (Spectra, Tecan, Crailsheim) gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

3.5.4 Proteinaufreinigung

3.5.4.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden in BL21-pLysS Bakterien exprimiert. Für die Isolierung der Fusionsproteine wurden 200 ml LB-Medium 1:40 mit einer dichten Vorkultur der Bakterien angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 inkubiert. Zur Selektion wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin beigesetzt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 2 h bei 28°C. Anschließend wurden die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 3000g pelletiert und in 5 ml 0,5 M LSDB aufgenommen. Nach der Lyse der Bakterien durch viermaliges sonifizieren der

Suspension für je 20 sec bei 100 Watt auf Eis wurden die Zelltrümmer zweimal 10 min bei 4°C und 21000 g abzentrifugiert. Der im Überstand befindliche Zellextrakt wurde aliquotiert bei -80°C gelagert.

Die im Zellextrakt befindlichen GST-Fusionsproteine wurden über Glutathion-Sepharose (Amersham, Freiburg) aufgereinigt. Hierbei wird das an der Oberfläche der Sepharose exponierte Glutathion sehr effizient und spezifisch von dem GST-Fusionsanteil gebunden. Pro Ansatz wurden 15 µl der Sepharose mit 1 ml H₂O und anschließend mit 1 ml 0,5 M LSDB gewaschen und equilibriert. Bei jedem Waschschrift wurden die Sepharosekügelchen in den Eppendorfgefäßen 6 bis 8 mal invertiert und anschließend 1 min bei 1000 g pelletiert.

Für eine Testaufreinigung wurden 50 und 250 µl Zellextrakt auf die equilibrierte Sepharose-Matrix gegeben und eine Stunde bei 4°C im Rollinkubator inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde anschließend insgesamt viermal mit 1 M LSDB und zweimal mit 0,1 M LSDB gewaschen. Die aufgereinigten Proteine wurden dann durch Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-minütige Inkubation bei 95°C von den Sepharosekügelchen gelöst und über ein SDS-PAG aufgetrennt. Zur Visualisierung erfolgte nach der Auftrennung der Proteine eine 30-minütige Inkubation des Gels in *Coomassie brilliant blue*.

3.5.4.2 Aufreinigung von Proteinen mit Histidin-Epitopen

Die Expression von Proteinen mit einem Epitop aus sechs Histidinresten erfolgte in BL21-pLysS Bakterien. Für die Expression der His-Proteine wurden 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium 1:40 mit einer Vorkultur entsprechend transformierter Bakterien angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,9 bei 37°C inkubiert. Die Expression erfolgte bei 30°C über die in den BL21-Zellen enthaltene T7-Polymerase, deren Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Um die Aktivität der bakteriellen Polymerasen zu inhibieren, wurde 1 h nach IPTG-Induktion 1 mM Rifampicin beigesetzt. Nach 2 h wurden die Bakterien 10 min bei 3000 g und 4°C pelletiert und in 5 ml HSLB resuspendiert. Die Bakterien wurden durch viermaliges Sonifizieren für je 20 sek bei 100 Watt auf Eis lysiert, sodass der Zellextrakt nach Pelletierung der Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C zur His-Protein-Aufreinigung zur Verfügung stand.

Die Reinigung der His-Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Agarose. Bei 4° wurden 500 µl Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension (Säulenvolumen (SV) = 250 µl) auf die Matrix einer verschlossenen Säule gegeben. Nach Sedimentation der Agarose wurde die Säule geöffnet, zweimal mit 10 ml kaltem und sterilem H₂O gewaschen und anschließend mit 10 SV HSLB equilibriert.

Daraufhin wurde der Zellextrakt insgesamt 2x auf die equilibrierte Säule gegeben, indem der Durchfluss aufgefangen wurde und erneut auf die Säule gegeben wurde. Um den Rest der Zellextrakte aus der Säule zu entfernen, wurde anschließend 1 SV HSLB auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit 2 SV A_{1000-0} und 24 SV A_{300-20} gewaschen, bevor die Proteine mit insgesamt 4 SV $A_{180-400}$ eluiert wurden. Die Tropfgeschwindigkeit von 1 Tropfen pro Minute wurde mit den letzten Waschschrritten eingestellt. Das Eluat wurde in insgesamt 10 Fraktionen zu je 2 Tropfen (~ 100 µl) aufgefangen. Um den Gehalt des aufgereinigten Proteins in jeder Fraktion zu überprüfen, wurden 5 µl jeder Fraktion in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine über ein SDS-PAG aufgetrennt. Die Identifikation des Proteins erfolgte über einen Western Blot mit einem gegen das Histidin-Epitop gerichteten Antikörper. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C .

3.5.5 *In vitro* Translation

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

3.5.6 Protein-Protein Interaktionsanalysen

3.5.6.1 Interaktionen mit GST-Fusionsproteinen und *in vitro* translatierten Proteinen oder Zellextrakten

Die GST-Fusionsproteine wurden, wie unter 3.5.4.1 beschrieben, aufgereinigt und mit 100 µl 0,1 M LSDB versetzt. Hierzu wurden nun entweder 10 µl des *in vitro*-Translationsansatzes mit dem exprimierten und ^{35}S -markierten Protein oder 50 µg Cytoplasma- bzw. Kernextrakt gegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Um unspezifische Interaktionen zu minimieren, wurde der Ansatz anschließend vier- bis sechsmal mit 0,1 -0,3 M LSDB gewaschen, der letzte Waschschrtritt erfolgte mit 0,1 M LSDB. Anschließend wurden die Sepharose-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Die im Probenpuffer denaturierten Proteine wurden über ein SDS-PAG aufgetrennt.

Für den Nachweis gebundener *in vitro* translaterter Proteine wurde das Gel 30 min in Fixierlösung geschwenkt, anschließend zur Verstärkung des Signals 10-30 min in Amplifizierer inkubiert und zuletzt eine Stunde im Geltrockner getrocknet. Der Nachweis der radioaktiv markierten, gebundenen Proteine erfolgte über Autoradiographie.

Der Nachweis gebundener Proteine aus den Zellextrakten erfolgte mittels Western Blot mit gegen die Proteine gerichteten Antikörpern.

3.5.6.2 Koimmunpräzitationen

Für die Koimmunpräzitation wurden pro Ansatz zwei bis vier 10 cm Zellkulturschalen C33A-Zellen mit Expressionsvektoren für die entsprechenden Proteine transfiziert und nach etwa 48 h Zellextrakte hergestellt. Es wurden 0,25 bis 2 mg Extrakt für 2 bis 5 h mit 15 µl FLAG- oder Myc-Antikörper-gekoppelter oder mit 20 µl PBF-Antikörper-gekoppelter Sepharose bei 4°C im Rollinkubator inkubiert, gefolgt von 3-6 Waschschritten mit 0,1-0,3 M LSDB. Wurde mit hoher Salzkonzentration gewaschen folgte ein letzter Waschschriff mit 0,1 M LSDB. Zur Denaturierung der Proteine wurden 20 µl 2x SDS-Probenpuffer zugefügt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine im SDS-PAG aufgetrennt und im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

3.5.7 Western-Blot

Für Western-Blot-Analysen wurden die über ein SDS-PAG aufgetrennten Proteine in einer Blotkammer auf eine Nitrocellulose-Membran (BioRad, München; Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen. Ein Transfer über Nacht erfolgte bei einer Spannung von 35 Volt, ein Transfer über Tag erfolgte 2 h bei 80 Volt.

Eine Detektion Markerproteinbanden erfolgte über eine Anfärbung der Proteine mit einer Ponceau-Rot-Lösung. In TBST wurde die Membran wieder vollständig entfärbt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen der Membran zu verhindern, wurde sie eine Stunde in Abblocklösung auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einer entsprechenden Menge an in Antikörper-Verdünnungslösung verdünntem 1. Antikörper überschichtet und 2 h bei RT inkubiert. Es folgten drei 10-minütige Waschschriffe mit TBST und eine einstündige Inkubation mit verdünntem Peroxidase (POD)-gekoppelten 2. Antikörper. Wurde der Ni²⁺-NTA-Antikörper verwendet, war eine Inkubation mit einem 2. Antikörper nicht notwendig, da dieser bereits mit einer POD gekoppelt war. Anschließend wurde die Membran 4x10 min in TBST gewaschen und 1 min mit 0.5-1.5 ml „*BM Chemiluminescent Blotting Substrate*“ (Roche, Mannheim), überschichtet. Das in der Lösung enthaltene Luminol wurde nun von der Peroxidase des 2. Antikörpers in einer Oxidationsreaktion unter Lichtemission umgesetzt. Bei einem schwachen Signal wurde die Membran in einer Expositions-Kassette einem ECL-Hyperfilm ausgesetzt, welcher nach verschieden langen Expositionszeiten entwickelt wurde. Ein starkes Signal konnte die Chemilumineszenz in einer Geldokumentationsanlage (BioRad) detektieren.

3.5.8 Gelretardierungsanalysen „*Electrophoretic Mobility Shift Assay*“ (EMSA)

Der EMSA dient der Analyse der Bindungsfähigkeit eines Proteins an DNA *in vitro*. Für Bindungsstudien mit Cytoplasma- und Kernextrakten wurden 7.5 µg Extrakt (add 9 µl mit Puffer C nach SCHREIBER *et al.* (1989)) sowie 10 µl entsprechender Salzlösung eingesetzt. EMSAs mit aufgereinigten His-Proteinen enthielten 1-2 µl Protein und 9-10 µl 2x Bindungspuffer. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten sind im Kapitel Material unter 2.8.2 angegeben. Die Menge an eingesetztem Kompetitor ist in den jeweiligen Abbildungen angegeben. Die Ansätze wurden 20 min auf Eis inkubiert, bevor 250 pg des radioaktiv markierten Oligonukleotids dazugegeben wurde. Es folgte eine weitere Inkubation von 20 min bei RT. Nachdem die Proben auf ein 4,5%iges PA-Gel aufgetragen wurden, wurde die Elektrophorese bei 160V für ca. 1.5 h durchgeführt. Daraufhin wurde das Gel 2 h getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.5.9 ChIP- (Chromatin Immunoprecipitation) Assay

Der ChIP-Assay wurde hier zum Nachweis einer Protein-DNA-Bindung *in vivo* eingesetzt. Das Prinzip dieser Methode ist die Präzipitation von DNA durch gebundene Proteine. Hierfür wurden 1×10^6 RTS3b-Zellen mit einem Reporterplasmid, welches für die zu untersuchende DNA-Region kodiert, und einem Protein-Expressionsvektor kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 10 min bei 37°C mit 1% Formaldehyd in Medium inkubiert, sodass zwischen der DNA und den gebundenen Proteinen eine chemische Kreuzvernetzung erzeugt wurde. Nach zwei Waschschrritten mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit einem Gummischaber abgekratzt und 4 min bei 4°C und 250 g pelletiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 200 µl SDS-Lysis-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Um die Zellen aufzubrechen und die DNA mit ihren gebundenen Proteinen in kleine Fragmente zu zerstückeln wurde das Lysat 10 x 30 sec in Eiswasser sonifiziert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 21000 g und 4°C wurde der Zellüberstand 10-fach mit *ChIP Dilution Buffer* verdünnt. Zum Abgleich der DNA-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen, wurden von den verdünnten Zellüberständen 20 µl Aliquots als Input-Proben entnommen.

Zur Reduktion unspezifischer Proteinpräzipitation wurde der verdünnte Zellüberstand mit 75 µl ssDNA/Protein A Agarose versetzt und 30 min bei 4°C im Rollinkubator inkubiert. Nach Pelletierung der Agarose bei 4°C und 200 g wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der immunpräzipitierende Antikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Rollinkubator. Zur Immobilisierung der Antikörper wurden 60 µl ssDNA/Protein A Agarose hinzugegeben und eine weitere Stunde bei 4°C im Rollinkubator inkubiert. Es folgte ein Waschschrtritt mit dem *Low Salt*, mit dem *High Salt* und mit dem *LiCl Immune Complex Wash Buffer* und zwei Waschrritte mit TE Puffer. Das

Waschen der Nukleoprotein-Komplexe erfolgte jeweils 5 min bei RT im Rollinkubator. Die gekoppelten Protein A Agarose Kügelchen wurden schließlich zur Hälfte für die weitere Protein- bzw. DNA Extraktion aufgeteilt.

Zum Nachweis der gebundenen Proteine wurden zu 30 μ l der Agarosekügelchen 30 μ l 2x SDS-Probenpuffer gegeben und 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-PAG wurde ein Western Blot mit geeigneten Antikörpern durchgeführt.

Zur Amplifikation der präzipitierten DNA Regionen wurden die Nukleoproteinkomplexe zunächst vom Antikörper eluiert. Dafür wurde der Agarose 2x 250 μ l Elutions-Puffer beigesetzt, vorsichtig gevortext und 15 min bei RT im Rollinkubator geschwenkt. Nach Zentrifugation konnte das Eluat (~ 500 μ l) in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Um die Kreuzvernetzung zwischen DNA und den gebundenen Proteinen zu revertieren, wurde dem Eluat 20 μ l 5 M NaCl beigesetzt und 4 h bei 65°C inkubiert. Die zuvor entnommenen Input-Proben wurden ebenfalls dieser Inkubation unterzogen. Vor der Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation der DNA wurden die Eluate mit 10 μ l 0,5 M EDTA, 20 μ l 1 M Tris-HCL, pH 6,5 und 2 μ l 10 mg/ml Proteinase K 1 h bei 45°C inkubiert. Zur Visualisierung der DNA Pellets nach der Fällung wurden zuvor 20 μ g Hefe tRNA als Trägersubstanz beigesetzt. Die DNA Pellets wurden in 50 μ l ml TE-Puffer aufgenommen.

Die PCRs der präzipitierten DNAs wurden mit Primern für die zu untersuchende DNA Region durchgeführt. Zur Quantifizierung wurden die DNA Mengen mit den Input-Proben abgeglichen.

3.5.10 Protein-Standardmethoden

- Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (LAEMMLI, 1970)
- Coomassie-Färbung von PA-Gelen (BRAMHALL *et al.*, 1969)

4 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Funktionen von PBF in der Zelle sowie bei der Regulation des HPV-Lebenszyklus wurde in Vorarbeiten mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid Systems nach Interaktionspartnern gesucht. Dabei wurden 14-3-3 β und SAP30 als Bindeproteine identifiziert (BOECKLE, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diese Wechselwirkungen bestätigt und ihre Bedeutung für die Funktion von PBF untersucht werden.

4.1 PBF interagiert mit 14-3-3 β

4.1.1 GST-14-3-3 β bindet PBF *in vitro*

Die Interaktion von PBF mit 14-3-3 β *in vitro* wurde zunächst im GST-Pulldown Experiment untersucht. Die Abbildung 6 zeigt, dass *in vitro* translatiertes PBF (IVT-PBF) von GST-14-3-3 β gebunden wurde (Spur 2), wohingegen GST alleine nur ein Hintergrundsignal lieferte (Spur 1). Allerdings wurde diese Interaktion mit bakteriell exprimierten GST-PBF und *in vitro* translatiertem 14-3-3 β nicht bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Ursache hierfür könnte die fehlende Phosphorylierung von PBF nach bakterieller Expression sein, da die Interaktion von 14-3-3-Proteinen mit seinen Substraten vorwiegend eine Phosphorylierung von Serinen oder Threoninen benötigt (TZIVION und AVRUCH, 2002). Das eukaryonte Retikulozyten Lysat *in vitro* Translationssystem hingegen erlaubt posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung (GLASS und POLLARD, 1990).

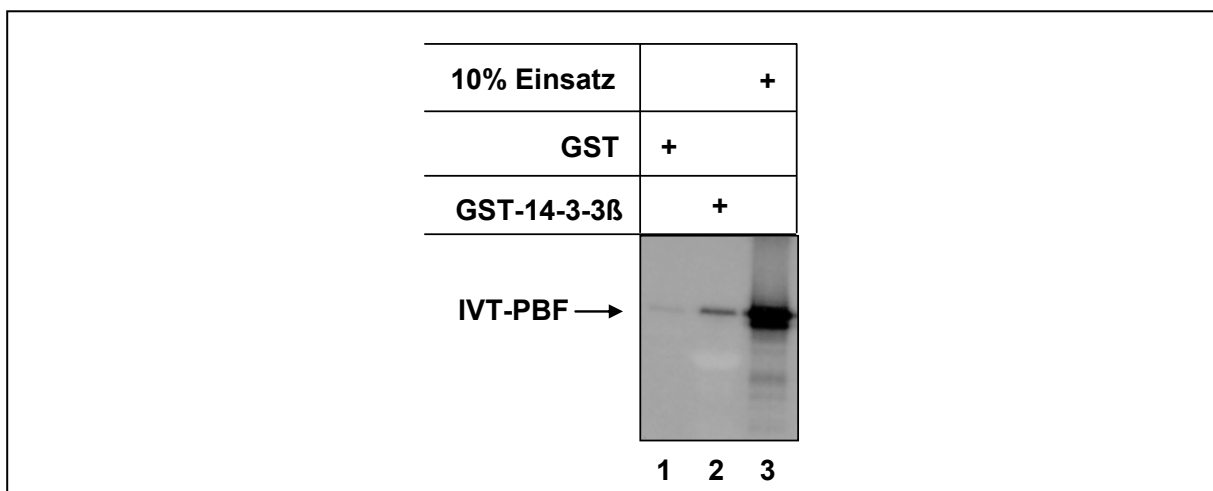


Abb. 6 GST-14-3-3 β bindet *in vitro* translatiertes, radioaktiv markiertes PBF.

GST-Pulldown. Je 2 μ g GST-14-3-3 β und GST alleine wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 μ l *in vitro* translatiertem (IVT) und 35 S-markiertem PBF inkubiert und viermal mit 0,1 M LSDB gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (Spuren 1 und 2). 10% des eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes (IVT-PBF) wurde in Spur 3 aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

4.1.2 14-3-3 β interagiert mit phosphoryliertem PBF

Um zu überprüfen, ob nur phosphoryliertes PBF mit 14-3-3 β interagieren kann, wurde eine Interaktionsstudie mit Phosphatase-behandelten Extrakten durchgeführt. Hierfür wurden C33A Zellen mit einem Expressionsvektor für FLAG-PBF transfiziert, um davon Cytoplasma (CE)- sowie Kernextrakte (NE) zu isolieren. Die CE wurden unbehandelt bzw. nach Inkubation mit Alkalischer Phosphatase (CIP) im GST-Pulldown Experiment mit aufgereinigtem, bakteriell exprimiertem GST-14-3-3 β eingesetzt, wohingegen die NE nur unbehandelt in der Interaktionsanalyse verwendet wurden. Gebundene Proteine wurden im Western Blot (WB) mit einem aus Kaninchen isolierten, gereinigten polyklonalen Antiserum gegen bakteriell exprimiertes PBF nachgewiesen (PBF-Antikörper) (BOECKLE *et al.*, 2002). GST-14-3-3 β war nur in der Lage cytoplasmatisches PBF zu präzipitieren, wenn die Extrakte nicht mit Phosphatase behandelt wurden (Abb. 7, Spuren 3 und 6). In den Spuren 1 und 4 wurden 10% der für die Interaktion eingesetzten Extrakte aufgetragen, welche zeigen, dass die Dephosphorylierung keinen Einfluss auf die Stabilität von PBF hatte. Ein Vergleich der Expression von PBF in den Cytoplasmaextrakten (Spuren 1 und 4) und den Kernextrakten (Spur 7) verdeutlicht die vorwiegend cytoplasmatische Lokalisation von PBF, in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (TANAKA *et al.*, 2004). Auch nukleäres PBF wurde, entsprechend der PBF-Menge im Kern, durch GST-14-3-3 β präzipitiert (Spur 9). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass PBF vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist und 14-3-3 β nur im phosphoryliertem Zustand binden kann.

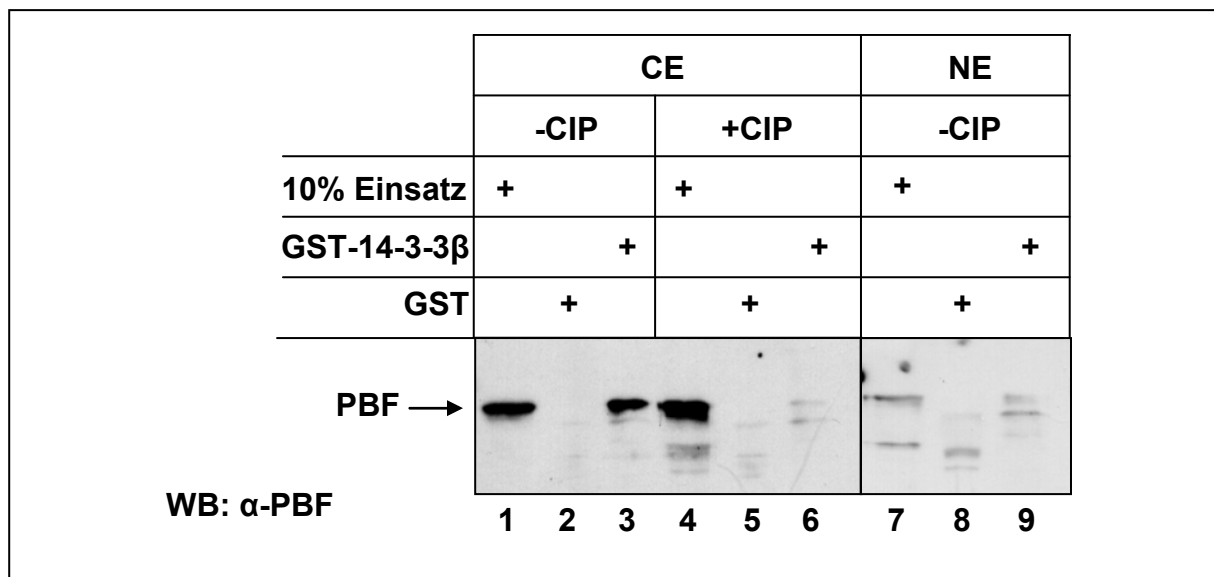


Abb. 7 14-3-3 β interagiert mit phosphoryliertem PBF.

GST-Pulldown. GST-14-3-3 β (Spuren 3, 6 und 9) und GST (Spuren 2, 5 und 8) wurden entweder mit 50 μ g Cytoplasmaextrakt (CE) (Spuren 1 bis 6) oder 50 μ g Kernextrakt (NE) (Spuren 7 bis 9) von C33A Zellen inkubiert, welche zuvor mit dem Expressionsplasmid für FLAG-PBF transient transfiziert wurden. Zur Expressionskontrolle wurden 10% der für die Interaktion eingesetzten Extrakte aufgetragen (Spuren 1, 4 und 7). In den Spuren 4 bis 6 wurden die CE zuvor 45 min bei 30°C mit Alkalischer Phosphatase inkubiert (CIP). Gebundenes PBF wurde im Western Blot (WB) mit dem PBF-Antikörper nachgewiesen.

4.1.3 PBF und 14-3-3 β kolokalisieren im Cytoplasma

Die Voraussetzung für eine Interaktion von PBF mit 14-3-3 *in vivo* ist eine Kolokalisation in der Zelle. Dies wurde in einer Immunfluoreszenzanalyse in RTS3b Zellen untersucht. Für Fluoreszenzanalysen wurde die RTS3b Zelllinie verwendet, da diese Zellen, im Vergleich zu C33A Zellen, größer sind, und so die subzelluläre Lokalisation der Proteine besser beobachtet werden konnte. Für die Untersuchung einer Kolokalisation wurden Expressionsvektoren für Hämagglutinin (HA)-getaggttes 14-3-3 β und EGFP-fusioniertes PBF transient transfiziert. Die Lokalisation von EGFP-PBF konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie direkt beobachtet werden (grüne Fluoreszenz), wohingegen HA-14-3-3 β über den HA-Antikörper und einem TRITC-gekoppelten Antikörper, welcher eine rote Fluoreszenz erzeugt, nachgewiesen wurde. Sowohl 14-3-3 β als auch PBF lagen vorwiegend im Cytoplasma vor (Abb. 8). Eine Überlagerung der Fluoreszenzen deutet auf eine Kolokalisation beider Proteine hin, welche eine Interaktion *in vivo* begünstigt. In wenigen Zellen wurde auch eine nukleäre Lokalisation von PBF beobachtet, welche, wie erwartet, keine Kolokalisation mit 14-3-3 β aufwies.

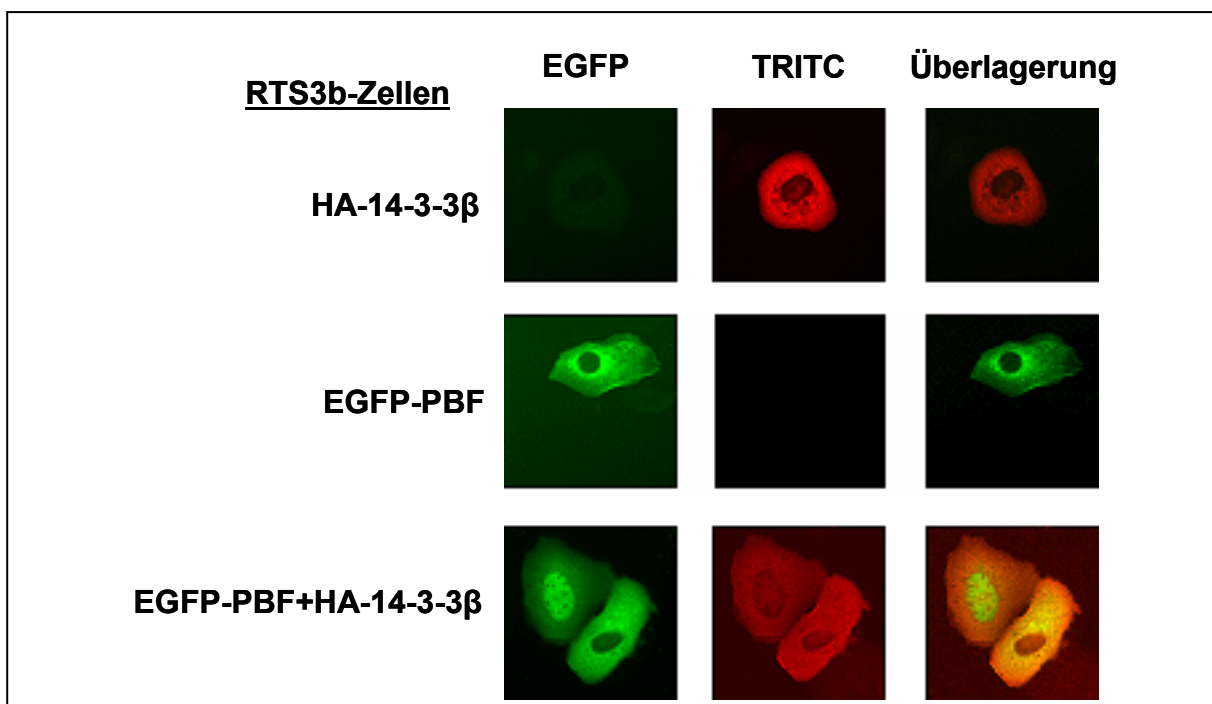


Abb. 8 PBF und 14-3-3 β zeigen Kolokalisation im Cytoplasma.

Immunfluoreszenzanalyse. RTS3b Zellen wurden in 24-Loch Platten mit 400 ng der Expressionsvektoren für PBF fusioniert an EGFP und für HA-getaggttes 14-3-3 β alleine oder in Kombination transient transfiziert. Zu Detektion von HA-14-3-3 β wurden die Zellen zunächst mit einem HA-Antikörper, dann mit einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper (rote Fluoreszenz) inkubiert. EGFP-PBF konnte durch Fluoreszenzmikroskopie direkt sichtbar gemacht werden (grüne Fluoreszenz). Die Überlagerung der Fluoreszenzen erfolgte mit geeigneter Computersoftware.

4.1.4 PBF interagiert mit 14-3-3 *in vivo*

Zum Nachweis der Interaktion der zellulären Proteine PBF und 14-3-3β *in vivo*, wurde zunächst eine Koimmunpräzipitation mit exogen überexprimierten Faktoren durchgeführt. C33A Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für FLAG-PBF und HA-14-3-3β sowie mit entsprechenden Leervektoren allein und in Kombination transient transfiziert. Im oberen WB sieht man sehr deutlich die Kopräzipitation von HA-14-3-3β durch FLAG-PBF (Abb. 9, Spur 4), wohingegen die Extrakte der Zellen, die alleine mit HA-14-3-3β oder FLAG-PBF, bzw. mit Leervektoren transfiziert wurden (Spuren 1 bis 3) keine Signale lieferten. Der mittleren WB, der mit dem FLAG-Antikörper entwickelt wurde, belegt die Expression von FLAG-PBF. Die Expression von HA-14-3-3β wurde im unteren WB mittels des HA-Antikörpers nachgewiesen (Spuren 2 und 4).

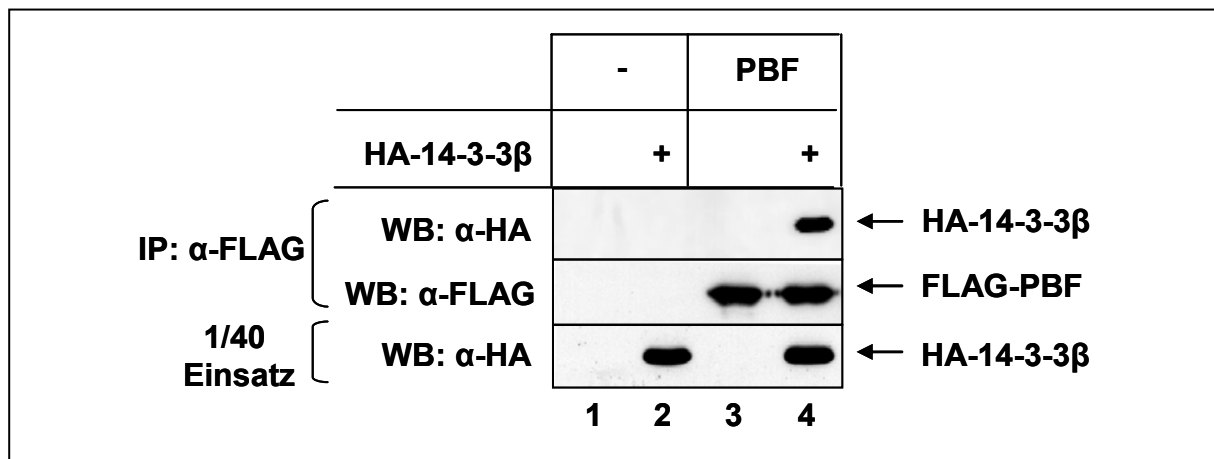


Abb. 9 FLAG-PBF präzipitiert HA-14-3-3β.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit jeweils 12,5 µg pcDNA3.1-FLAG-PBF (Spuren 3 und 4), pCMV-HA-14-3-3β (Spuren 2 und 4) und entsprechenden Leervektoren transient transfiziert. 400 µg entsprechender Ganzzellextrakte wurde mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose für 2 h inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 0,3 M LSDB wurden die Proteine über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und im anschließenden Western Blot (WB) mit dem HA-Antikörper detektiert (oberer WB). Im unteren WB, ebenfalls mit HA-Antikörper inkubiert, wurde 1/40 der für die Immunpräzipitation (IP) eingesetzten Extrakte aufgetragen. Die Expression von FLAG-PBF wurde nach Reinkubation des IP-WB mit FLAG-Antikörper nachgewiesen (mittlerer Blot).

Die Wechselwirkung beider Proteine sollte unter physiologischen Konzentrationen überprüft werden. Da bis zu diesem Zeitpunkt der Nachweis von endogenem PBF in C33A Zellen nicht gelang, wurde zunächst die Interaktion von überexprimierten FLAG-PBF mit endogenem 14-3-3 untersucht. Dafür wurden C33A Zellen mit einem Expressionsvektor für FLAG-PBF und mit entsprechendem Leervektor transfiziert. Der obere WB in Abbildung 10 belegt, dass überexprimiertes FLAG-PBF in der Lage war, endogenes 14-3-3 zu präzipitieren (Spur 4). Extrakt der Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden, zeigte hingegen kein Signal (Spur 3). Diese Daten bestätigen die Interaktion von PBF mit 14-3-3 *in vivo*.

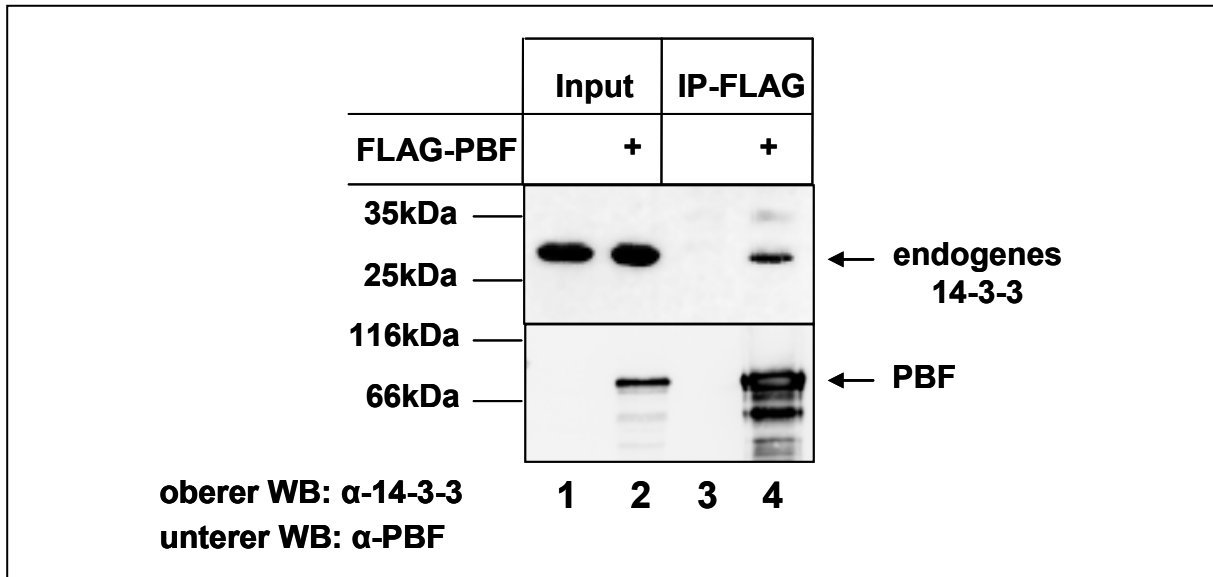


Abb. 10 Überexprimiertes FLAG-PBF präzipitiert endogenes 14-3-3.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit jeweils 15 µg pcDNA3.1-FLAG-PBF (Spuren 2 und 4) bzw. mit entsprechendem Leervektor (Spuren 1 und 3) transient transfiziert. 1 mg der Ganzzellextrakte wurde mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose für 4 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M LSDB wurden die gebundenen Proteine über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und im WB mit einem 14-3-3-Antikörper detektiert (oberer WB). Die Spuren 1 und 2 zeigen 1/100 der Extrakte. Die Expression von FLAG-PBF wurde mit einem gegen PBF gerichteten Antikörper nachgewiesen (unterer WB).

In Folgeversuchen wurde festgestellt, dass endogenes PBF nach Transfektion von Leervektoren mit dem PBF-Antikörper präzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies erlaubte den Nachweis der Interaktion von endogenem PBF mit endogenem 14-3-3. Für diesen Versuch wurden C33A Zellen mit dem pcDNA3.1-FLAG Leervektor transfiziert. Die Kopräzipitation von endogenem 14-3-3 mit endogenem PBF ist in Abbildung 11, Spur 3 dargestellt. Zur Kontrolle wurden die gleichen Extrakte mit einem Antiserum gegen das E2 Protein von BPV1 inkubiert (DOSTATNI *et al.*, 1991), das im Vergleich nur ein sehr schwaches Hintergrundsignal lieferte (Spur 2).

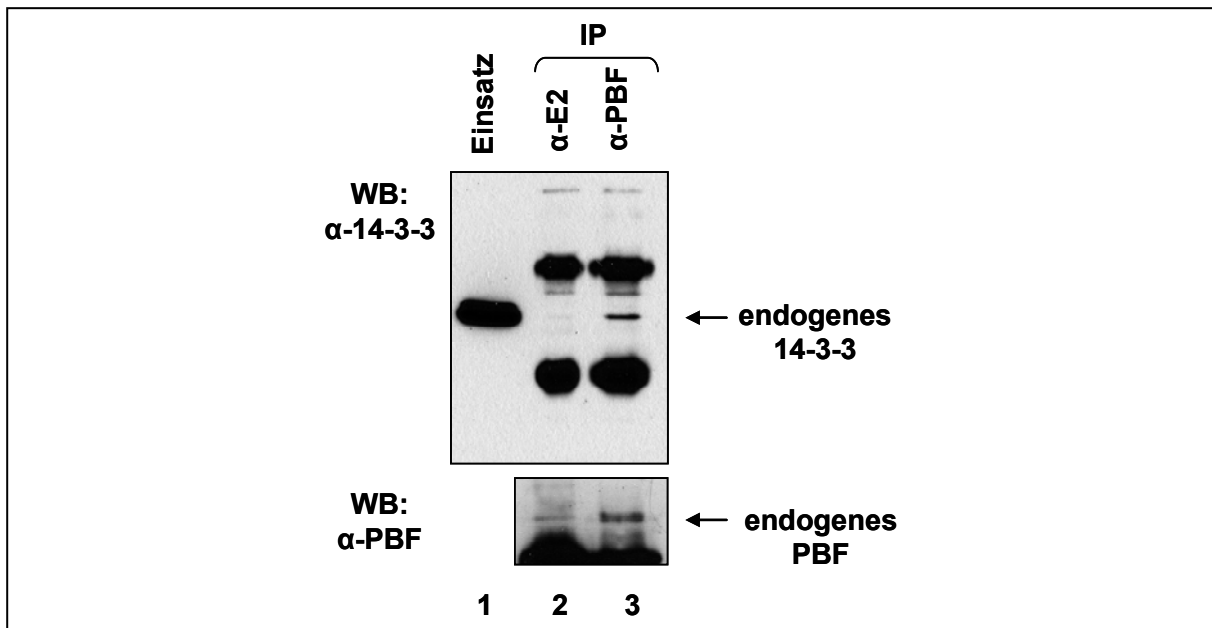


Abb. 11 Endogenes PBF präzipitiert endogenes 14-3-3.

Koimmunpräzipitation. Nach Transfektion von C33A Zellen mit dem pcDNA3.1-Leervektor wurden 48 h nach Transfektion Ganzzelllextrakte hergestellt, von denen je 2 mg mit dem PBF-Antikörper (Spur 3) bzw. mit dem BPV1 E2 Antiserum (Spur 2) und Protein G Agarose für 5 h inkubiert wurden. Nach drei Waschschriffen mit 0,1 M LSDB wurden die gebundenen Proteine über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und im WB mit dem 14-3-3- (oberer WB) bzw. mit dem PBF-Antikörper (unterer WB) detektiert. In der Spur 1 wurde 1/200 des Extraktes aufgetragen.

4.1.5 14-3-3 β bindet hauptsächlich am C-Terminus von PBF

Um den Einfluss der Wechselwirkung von PBF mit 14-3-3 in der Zelle auf die Funktionen von PBF zu analysieren, sollten die Domänen innerhalb PBF, welche die Interaktion mit 14-3-3 vermitteln, lokalisiert werden, mit dem Ziel, eine 14-3-3-bindungsdefekte PBF-Punktmutante zu erzeugen. Mittels PCR wurden zunächst Deletionsmutanten von PBF hergestellt, die teilweise auch überlappen (Abb. 12A). Für eine Koimmunpräzipitation mit den Deletionsmutanten PBF Δ 5, PBF Δ 4 und PBF Δ 10 und 14-3-3 β (Abb. 12B, Spuren 1 bis 8), wurden C33A Zellen mit Expressionsvektoren für die FLAG-getaggtten PBF-Deletionsmutanten (Spuren 3 bis 8) und HA-14-3-3 β (Spuren 2, 4, 6 und 8) bzw. mit entsprechenden Leervektoren (Spuren 1, 2, 3, 5 und 7) kotransfiziert. PBF Δ 10, das den C-Terminus von PBF kodiert (AS 379-513), konnte 14-3-3 β am stärksten präzipitieren (oberer WB, Spur 8). Eine schwache Interaktion war auch mit PBF Δ 5 (AS 114-378, Spur 4) beobachtbar. Da PBF Δ 4 (AS 223-378) keine Interaktion mit 14-3-3 β zeigte, konnte die Binderegion auf die AS 114-223 beschränkt werden. Allerdings kodiert der C-Terminus anscheinend für die stärkere Interaktionsdomäne. Um diese weiter einzugrenzen, wurde eine Koimmunpräzipitation mit den PBF-Deletionsmutanten PBF Δ 11 und PBF Δ 12 durchgeführt (Spuren 9-12). In diesem Experiment war nur PBF Δ 12 in der Lage, 14-3-3 β zu präzipitieren (oberer WB, Spur 12), wodurch die Binderegion für 14-3-3 in PBF auf die Aminosäuren 379-461 eingegrenzt werden konnte.

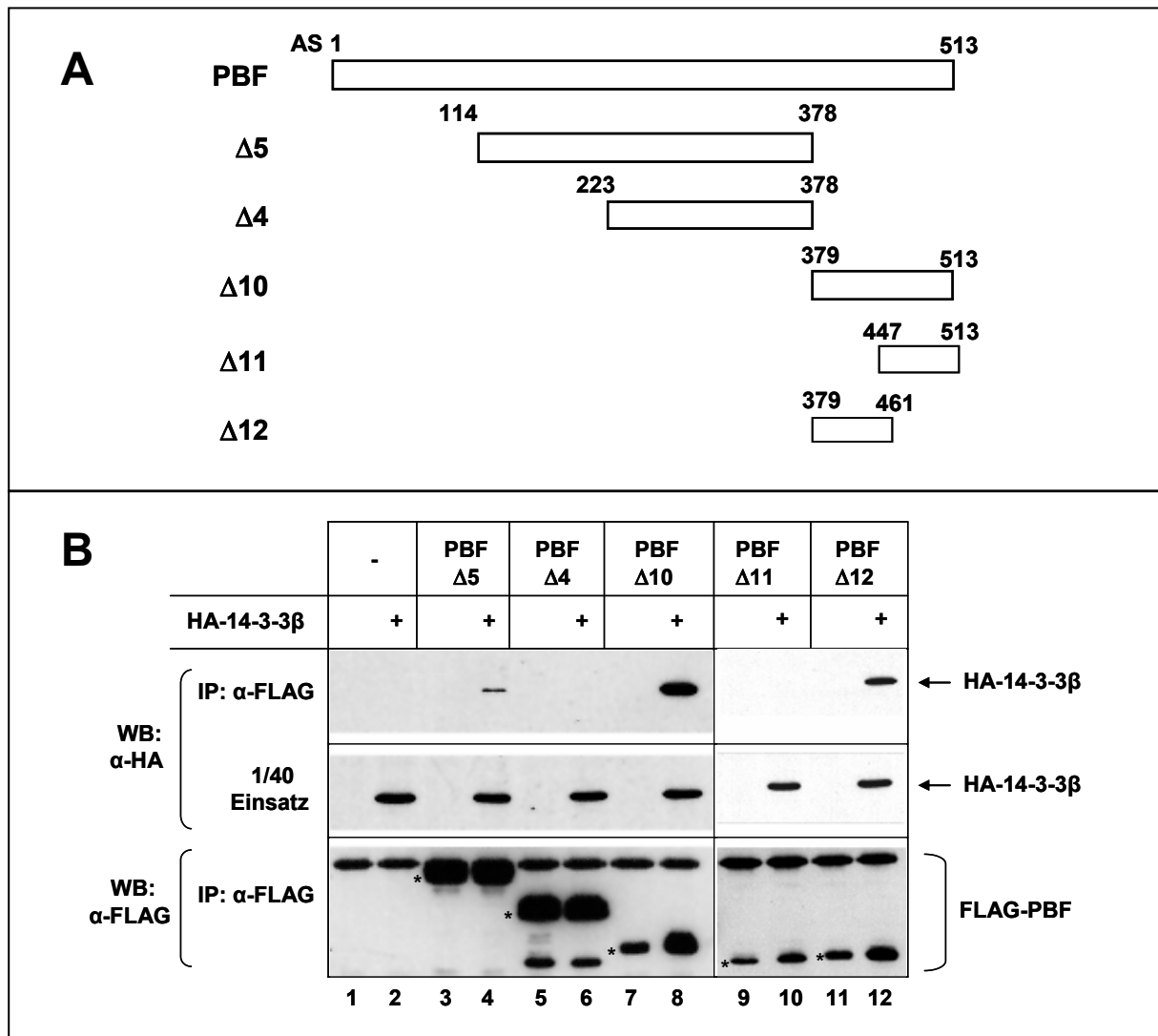


Abb. 12 Die 14-3-3-Binderegion in PBF befindet sich im C-Terminus .

(A) Schematische Darstellung der PBF-Deletionsmutanten. (AS = Aminosäure). (B) Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit je 15 µg der Expressionsvektoren für FLAG-PBFΔ5, -PBFΔ4, -PBFΔ10, -PBFΔ11, -PBFΔ12 (Spuren 3 bis 12), pCMV-HA-14-3-3β (Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12) und entsprechenden Leervektoren transfiziert. 400 µg der nach 48 h isolierten Zellextrakte wurden mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose für 2 h inkubiert. Gebundene Proteine wurden nach vier Waschschritten mit 0,3 M LSDB über 15%ige SDS-PAGs aufgetrennt und in den anschließenden WB mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (obere WB) bzw. nach Reinkubation mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop (untere WBs) detektiert. Die FLAG-PBF-Deletionsmutanten wurden in den unteren Blots mit einem Sternchen markiert. Bei den mittleren WB wurde 1/40 des Einsatzes aufgetragen und mit dem HA-Antikörper inkubiert.

4.1.6 PBF besitzt zwei unabhängige 14-3-3-Bindestellen

Wie bereits beschrieben, binden 14-3-3 Proteine ihre Substrate als Dimer über Phosphoserine bzw. Phosphothreonine. Die Spezifität der Bindung ist dabei abhängig von der Sequenzumgebung. Die zwei häufigsten Konsensus-Sequenzen sind RSXpSXP (mode I) und RXXXpSXP (mode II) (RITTINGER *et al.*, 1999; YAFFE *et al.*, 1997). In den Koimmunpräzipitationen stellte sich heraus, dass PBFΔ12 (AS 379-461) für die Interaktion mit 14-3-3 verantwortlich ist. Nach Analyse konnten innerhalb dieser Sequenz zwei potentielle 14-3-3 Bindestellen detektiert werden, von AS 446-453 (RSLSFSEP) und von AS

393-398 (LSKSAP). Beide Motive können dem „mode I“-Motiv zugeordnet werden, obwohl sie von der Konsensus Sequenz abweichen. Um die Rolle der beiden Motive bei der 14-3-3 Bindung zu untersuchen, wurden die potentiellen Phosphoserine, die in der genannten AS-Sequenz unterstrichen sind, in Alanine mutiert, sodass keine Phosphorylierung mehr stattfinden kann (Abb. 13). Die PBF-Mutante mit den AS-Austauschen an den Positionen 447/449/451 wurde als PBFmt3 und die Mutante mit den AS-Austauschen an den Positionen 394/396 wurde als PBFmt4/5 bezeichnet. In PBFmt3/4/5 sind alle fünf genannten Serine mutiert.

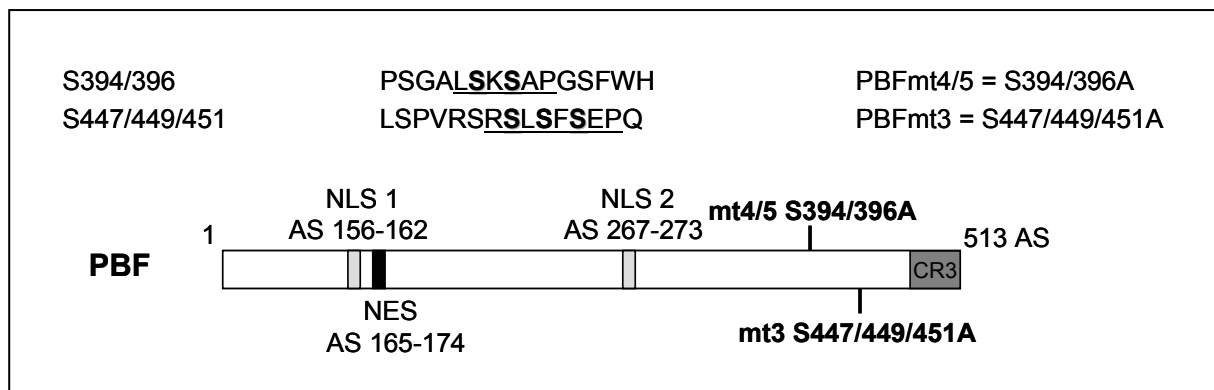


Abb. 13 Schematische Darstellung der potentiellen 14-3-3 Bindemotive in PBF sowie ihre Mutationen.

Die schematische Darstellung von PBF beinhaltet die Positionen der Kernlokalisierungssignale (NLS 1 und 2), des Kernexportsignals (NES), sowie der C-terminalen konservierten Region 3 (CR3) (TANAKA *et al.*, 2004). Die unterstrichenen Aminosäuren (AS) 393-398 und AS 446-453 repräsentieren die beiden potentiellen 14-3-3 Bindestellen. Die Serine, die in Alanine mutiert wurden, sind in fett dargestellt. PBF mit Mutationen an den Positionen 394 und 396 wurden als PBFmt4/5 und mit Mutationen an den Positionen 447, 449 und 451 als PBFmt3 bezeichnet.

In einer Koimmunpräzipitation wurden die oben beschriebenen PBF-Mutanten auf ihre Fähigkeit an 14-3-3 zu binden mit Extrakten aus entsprechend transient transfizierten C33A Zellen getestet (Abb. 14). Die Mutation der Serine an den Positionen 447, 449 und 451 in PBFmt3 hatte nur eine schwache Reduktion der 14-3-3 Assoziation (oberer WB, Spur 6), verglichen mit Wildtyp (wt)-PBF (Spur 4) zur Folge. Die Mutation der Serine an den Positionen 394 und 396 in PBFmt4/5 konnte hingegen die Interaktion um circa 80% reduzieren. Eine Interaktion von 14-3-3 β und PBFmt3/4/5, in dem fünf Serine in Alanine mutiert wurden, war kaum nachweisbar (Spur 10). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass sowohl die Serine an den Positionen 394 und 396, als auch die Serine an den Positionen 447, 449 und 451 die Interaktion von PBF mit 14-3-3 vermitteln.

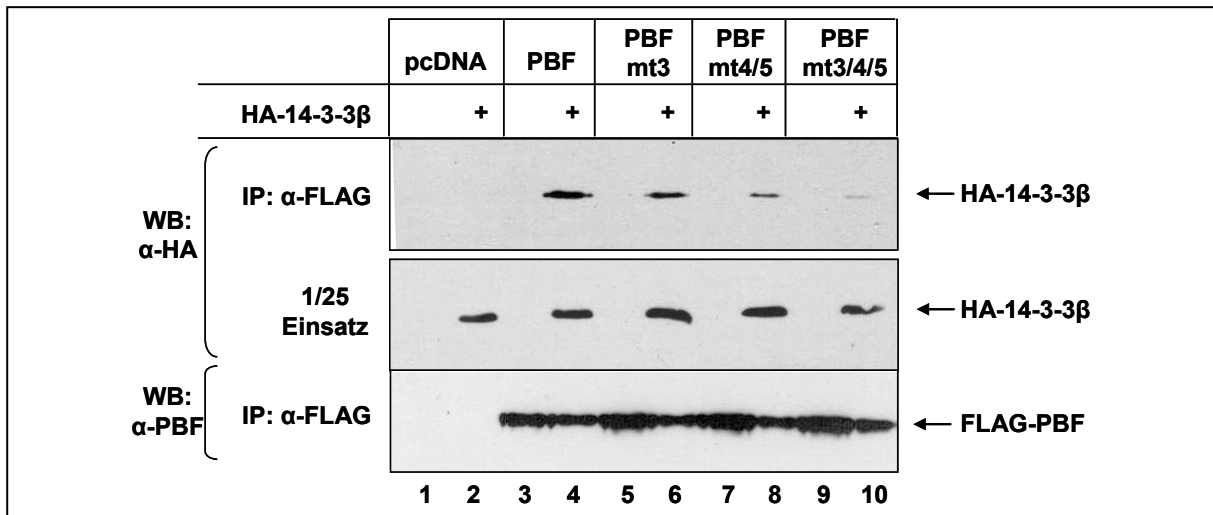


Abb. 14 PBF besitzt C-terminal zwei 14-3-3-Bindemotive.

Koimmunpräzipitation. Expressionsvektoren für FLAG-PBF bzw. für die FLAG-getaggten Punktmutanten von PBF (Spuren 3-8), wie in Abb. 13 abgebildet, wurden zusammen mit dem Vektor für HA-14-3-3 β (Spuren 2, 4, 6 und 8) bzw. mit dem entsprechenden Leervektor (Spuren 1, 3, 5 und 7) in C33A Zellen transfiziert. 250 μ g der 48 h später isolierten Extrakte wurden für 2 h mit α -FLAG Sepharose inkubiert und sechsmal mit 0,3 M LSDB gewaschen. In einem 10%igen SDS-PAG wurden die gebundenen Proteine aufgetrennt und im WB mit dem HA- (obere beiden WB) bzw. PBF-Antikörper (unterer WB) nachgewiesen. Neben der IP wurde 1/25 der eingesetzten Extrakte aufgetragen.

Diese Ergebnisse deuten auf zwei funktionelle 14-3-3 BS innerhalb der AS 393-398 und der AS 446-453 hin. Ihre Beteiligung an der Bindung von PBF an endogenes 14-3-3 wurde bestätigt (Abb. 15). Auch hier zeigte PBFmt4/5 nur noch eine schwache Interaktion mit 14-3-3 (Spur 4), welche durch mt3 aufgehoben wurde (Spur 5).

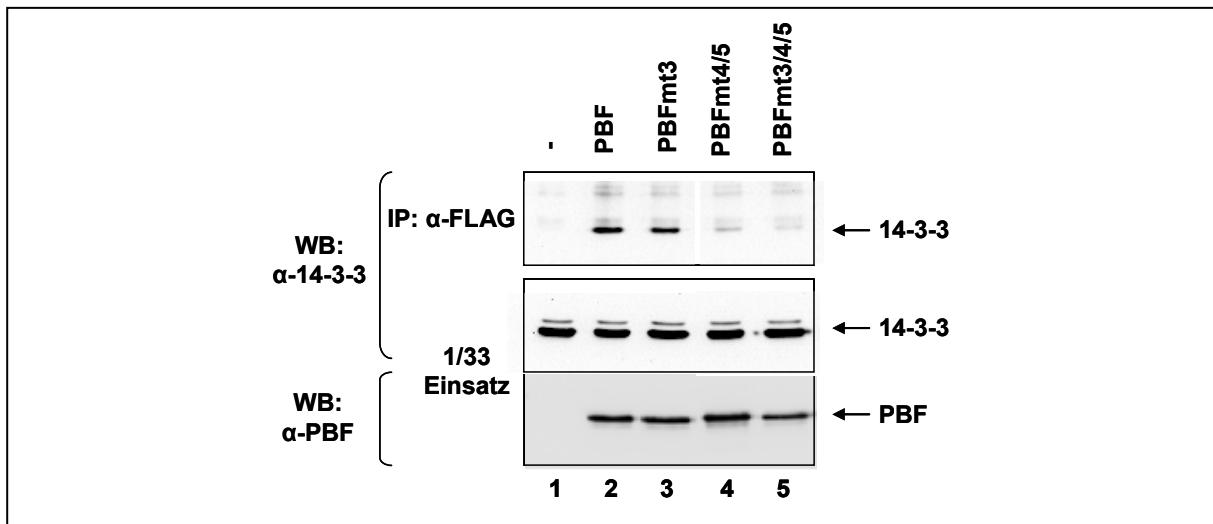


Abb. 15 Mutationen innerhalb der zwei 14-3-3-Bindemotive von PBF verhindern die Interaktion mit endogenem 14-3-3.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3, -PBFmt4/5 und -PBFmt3/4/5 transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde aus den transfizierten Zellen Ganzzelextrakte gewonnen, von denen 250 μ g über FLAG-Antikörper-gekoppelte Sepharose aufgereinigt wurden. Nach drei Waschschritten mit 0,1 M LSDB wurden die gebundenen Proteine über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt. Im WB wurden die präzipitierten 14-3-3 Proteine über den 14-3-3-Antikörper detektiert (oberer WB). Die endogene Expression von 14-3-3 (mittlerer WB), bzw. die Expression von PBF (unterer WB) wurde in den WB mit 1/33 des Einsatzes mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen.

4.1.7 Einfluss der 14-3-3 Interaktion auf die zelluläre Lokalisation von PBF

Wie unter 4.1.3 beschrieben, wurde eine Kolo­kalisierung von PBF und 14-3-3 im Cytoplasma beobachtet. Um den Einfluss der Interaktion auf die subzelluläre Lokalisation von PBF zu analysieren, wurde die 14-3-3-bindungsreduzierte (PBFmt4/5), bzw. die -bindungsdefekte PBF-Mutante (PBFmt3/4/5) in einen Expressionsvektor kloniert, welcher die Proteine fusioniert mit EGFP exprimiert, sodass ihre zelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden konnte. Die PBF-Mutanten PBFmt4/5 und PBFmt3/4/5, zeigten keine wesentliche Veränderung der vorwiegend cytoplasmatischen Expression, verglichen zu Wildtyp (wt)-PBF (Abb. 16 und 22).

Bei der Überexpression von PBF traten regelmäßig fluoreszierende Flecken im Cytoplasma auf, welche vermutlich Cluster fehlgefalteter Proteine darstellen. Nach Koexpression von 14-3-3 β wurde diese Clusterbildung nicht mehr beobachtet. Die Überexpression der PBF-Mutanten erzeugte eine Zunahme der Cluster im Cytoplasma, welche auf die reduzierte Interaktion mit endogenem 14-3-3 zurückgeführt werden könnte. Die Koexpression von exogenem 14-3-3 konnte keine Reduktion der Cluster induzieren (Abb. 16). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion von PBF mit 14-3-3 eine Rolle bei der Induktion bzw. Aufrechterhaltung der richtigen Proteinfaltung spielt.

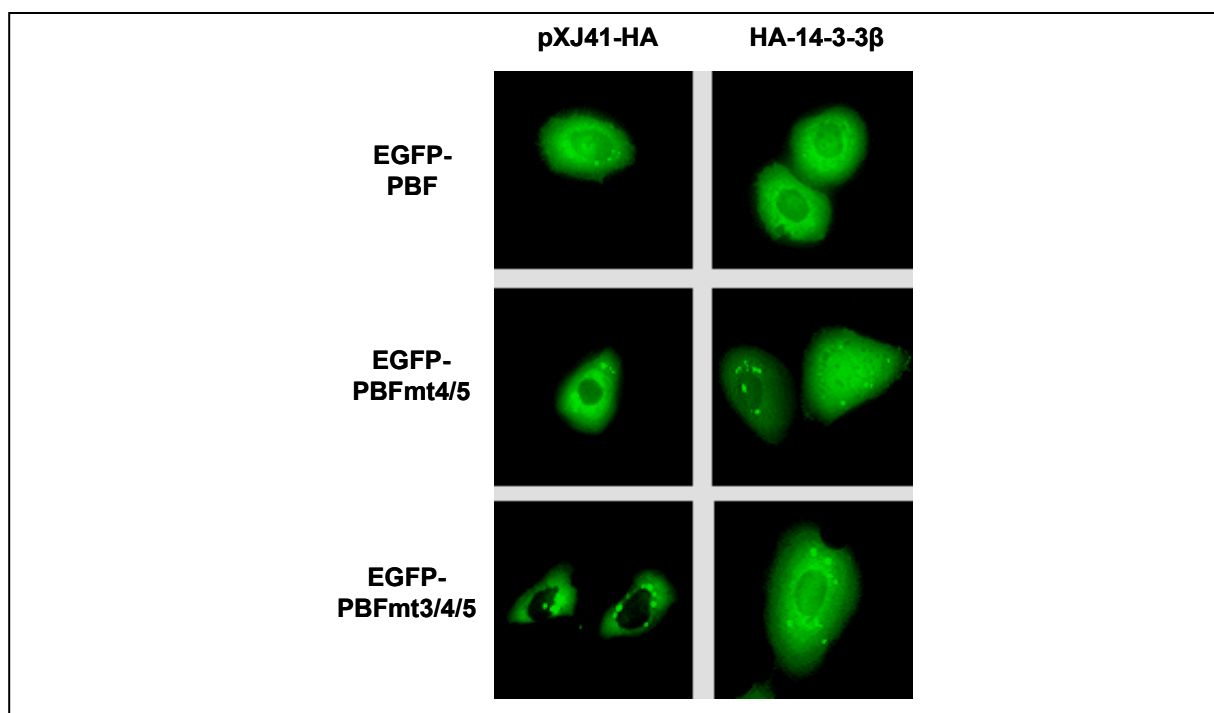


Abb. 16 Einfluss der 14-3-3 Interaktion auf die subzelluläre Lokalisation von PBF.

Fluoreszenzanalyse. RTS3b Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für EGFP-PBF, -PBFmt4/5, -PBFmt3/4/5 und für HA-14-3-3 β , bzw. mit entsprechendem Leervektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Expression der PBF-Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

4.1.8 Die Akt Kinase ist beteiligt an der Regulation der Interaktion von PBF mit 14-3-3

Um herauszufinden, welche Kinase an der Regulation der Interaktion von PBF mit 14-3-3 beteiligt ist, wurde die Sequenz von PBF nach bekannten Phosphorylierungssequenzen untersucht. Dabei wurden zwei potentielle Akt-Konsensusmotive identifiziert. Die Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch die Akt Kinase ist RXRXX(S/T) Φ , wobei Φ eine große, hydrophobe Aminosäure (AS) darstellt. Das erste Akt-Phosphorylierungs-Konsensusmotiv (Akt I) von AS 270-275 überlappt mit der Kernlokalisationssequenz 2 (NLS 2, Abb. 13), und die zweite von AS 444-449 (Akt II) mit der schwächeren 14-3-3-Bindestelle (BS) von Position 446-453 (Abb. 17).

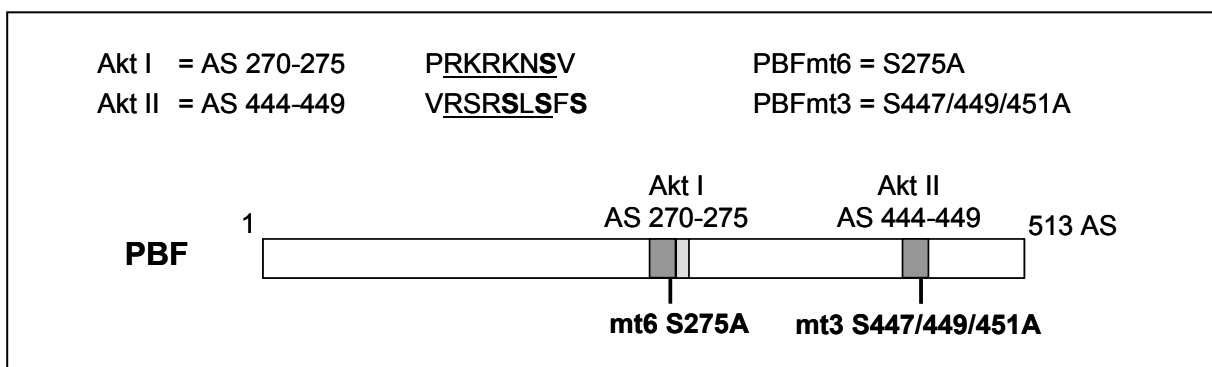


Abb. 17 Schematische Darstellung der potentiellen Akt-Phosphorylierungssequenzen in PBF sowie ihre Mutationen.

Die schematische Darstellung von PBF beinhaltet die Positionen der potentiellen Akt Konsensussequenzen Akt I und Akt II. Die unterstrichenen Aminosäuren (AS) 270-275 repräsentieren die erste, und die AS 444-449 die zweite Akt Konsensussequenz. Die Serine, die in Alanine mutiert wurden, sind in fett dargestellt. Die Mutation an der Positionen 275 wurde als PBFmt6 und die Mutationen an den Positionen 447, 449 und 451 wurde als PBFmt3 bezeichnet.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Aktivierung der Akt Kinase abhängig von Wachstumsfaktoren. Um festzustellen, ob die Akt Kinase bei der Regulation der Interaktion von PBF mit 14-3-3 eine Rolle spielt, wurde zunächst eine Koimmunpräzipitation mit Extrakten aus Zellen durchgeführt, die unter Entzug von Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. C33A Zellen, die mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3 und -PBFmt4/5 transient transfiziert wurden, wurden in serumhaltigem, bzw. serumfreiem Medium kultiviert. Nach Serum Entzug war die Interaktion von PBF und PBFmt3 mit 14-3-3 deutlich reduziert (Abb. 18, Spuren 4 und 6). Die schwache Assoziation zwischen PBFmt4/5 und 14-3-3 wurde vollständig aufgehoben (Spur 8). Der geringe Unterschied der Intensität der Interaktion von PBF und PBFmt3 mit 14-3-3 unter 10% Serum (oberer WB, Spuren 3 und 5), könnte durch die erhöhte Expression von PBFmt3 bedingt sein (unterer WB, Spur 5). Dieses Ergebnis belegt, dass die Phosphorylierung der 14-3-3 BS von Wachstumsfaktoren-abhängigen Kinasen gesteuert wird. Die Mutation des Serins an Position 275 innerhalb des Akt-Konsensusmotivs 1, zeigte in keiner der durchgeführten Koimmun-präzipitationen einen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen PBF und 14-3-3 (Daten nicht gezeigt).

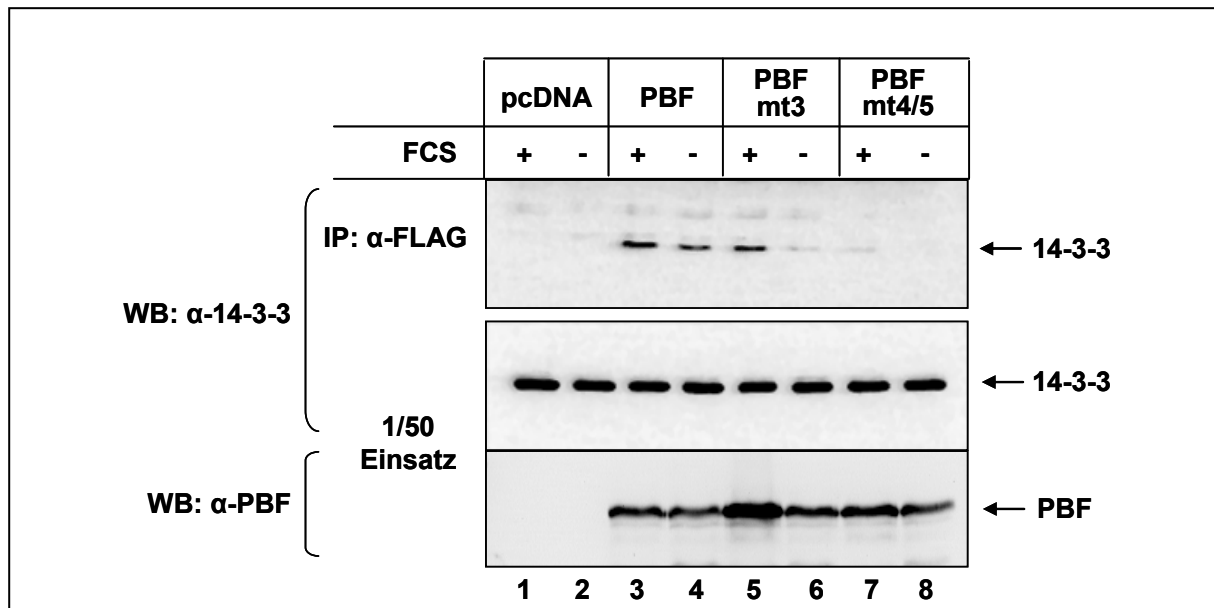


Abb. 18 Serum Entzug reduziert PBF-14-3-3 Interaktion.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3, -PBFmt4/5 und mit entsprechendem Leervektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24h in serumfreiem bzw. serumhaltigem Medium kultiviert. 1mg der Extrakte wurden für 4 h mit α-FLAG Sepharose inkubiert, dreimal mit 0,1 M LSDB gewaschen und die gebundenen Proteine in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. Die präzipitierten 14-3-3-Proteine wurden im oberen WB mit dem 14-3-3-Antikörper detektiert. In den unteren beiden WB wurde 1/50 des Einsatzes aufgetragen und zur Expressionskontrolle mit dem 14-3-3-, bzw. PBF-Antikörper inkubiert.

Zur Überprüfung der Beteiligung der Akt Kinase an der phosphorylierungsabhängigen Interaktion von PBF mit 14-3-3, wurde der Effekt von Wortmannin (WM), einem Inhibitor der Akt-aktivierenden Kinase PI3K, auf die Bindung von 14-3-3 an PBF untersucht. Zu diesem Zweck wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3 und -PBFmt4/5 transfizierte C33A Zellen mit Wortmannin behandelt. Dies führte zu einer verringerten Assoziation von PBF mit endogenem 14-3-3, wie die Immunpräzipitation in Abbildung 19 belegt (oberer WB, Spur 4). Da die Expression von PBF in diesem Ansatz, verglichen zum Ansatz ohne WM, sogar leicht erhöht war (unterer WB, Spuren 3 und 4), wird dieser Effekt nochmals bestärkt. Die Interaktion von PBFmt4/5 mit endogenem 14-3-3 wurde durch den Inhibitor komplett verhindert (oberer WB, Spur 8). Dies deutet darauf hin, dass die 14-3-3-Bindung um Position 446-453 abhängig von der Aktivität der Akt Kinase sein könnte. Obwohl die 14-3-3 BS um Position 393-398 nicht der Akt-Konsensussequenz entspricht, wurde die Interaktion von PBFmt3, bei der die 14-3-3 Bindung über diese BS vermittelt wird, durch WM auch deutlich abgeschwächt (oberer WB, Spur 6). Dies könnte zum Teil mit der verringerten PBF Konzentration in diesem Ansatz zusammenhängen (unterer WB, Spur 6). Allerdings scheint es, dass die Phosphorylierung der Serine 394/396 durch eine Kinase erfolgt, welche ebenfalls durch Wortmannin negativ beeinflusst wird.

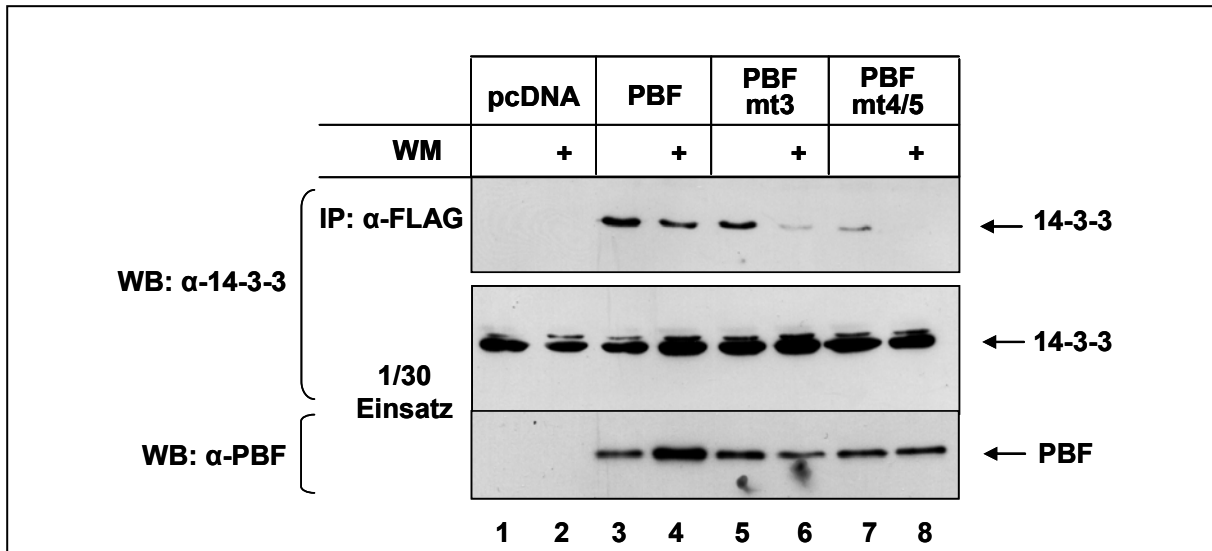


Abb. 19 Wortmannin reduziert die Bindung von 14-3-3.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3, -PBFmt4/5 und mit entsprechendem Leervektor transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen 1,5 h in serumfreien Medium mit 2 μ M Wortmannin bzw. Methanol inkubiert. Nach Isolation der Zellextrakte wurden 300 μ g, wie in Abb. 18 beschrieben, mit α -FLAG Sepharose inkubiert, gewaschen und in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. Die gebundenen Proteine wurden im WB mit dem 14-3-3-Antikörper detektiert (oberer WB). In den unteren WB wurde 1/30 des Einsatzes aufgetragen und die Expression der Proteine mit dem 14-3-3-, bzw. PBF-Antikörper nachgewiesen.

Um die Auswirkung der Hemmung der PI3K auf die Interaktion von PBF und 14-3-3 zu bestätigen, wurde LY294002 (LY), ein im Gegensatz zu WM reversibler und spezifischerer PI3K-Inhibitor, eingesetzt.

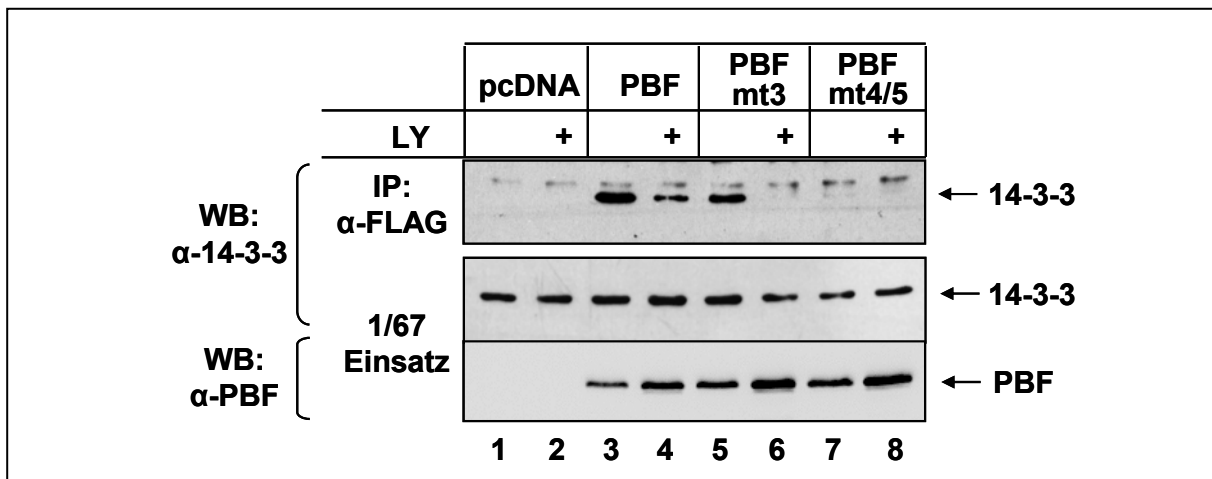


Abb. 20 LY294002 reduziert die Bindung von 14-3-3.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3, -PBFmt4/5 und mit entsprechendem Leervektor transfiziert. 16 h vor der Ernte wurden die Zellen mit 25 μ M LY294002, bzw. DMSO inkubiert. Nach Isolation der Extrakte wurden sie, wie in Abb. 18 beschrieben, mit α -FLAG Sepharose inkubiert, gewaschen und in einem 10%igen SDS-PAG aufgetrennt. Die gebundenen Proteine wurden im WB mit dem 14-3-3-Antikörper nachgewiesen (oberer WB). In den unteren WB wurde 1/67 des Einsatzes aufgetragen und die Expression der Proteine mit dem 14-3-3-, bzw. PBF-Antikörper zu überprüfen.

Wie im oberen WB in Spur 4 zu sehen ist (Abb. 20), war in Gegenwart von LY ebenfalls die Interaktion von PBF und 14-3-3 reduziert. Die Wechselwirkung der 14-3-3-bindungsreduzierten PBF-Mutanten PBFmt3 und PBFmt4/5 wurde durch diesen Inhibitor vollständig unterbunden (Spuren 6 und 8). Somit konnte die Interaktion von PBFmt3 mit 14-3-3, die über die BS 394/396 vermittelt wird, durch beide Inhibitoren der PI3K verringert werden. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Interaktion von PBF mit 14-3-3 über Kinasen gesteuert wird, welche über die PI3K reguliert werden. Da die BS um Position 394 und 396 nicht einer Akt-Phosphorylierungssequenz entspricht, scheint eine weitere PI3K-abhängige Kinase beteiligt zu sein.

Um eine Rolle von Akt als Kinase bei der Phosphorylierung innerhalb der 14-3-3 BS von PBF zu bestätigen, wurde der Einfluss der Überexpression einer aktiven Akt Kinase auf die Bindung an 14-3-3 ermittelt. Ist die Akt Kinase an der Phosphorylierung beteiligt, sollte eine Überexpression zu einer Verstärkung der PBF-14-3-3 Interaktion führen. Um dies zu untersuchen, wurden C33A Zellen mit Vektoren für FLAG-PBF, die 14-3-3-bindungsreduzierten-PBF-Mutanten PBFmt3 und PBFmt4/5, bzw. die 14-3-3-bindungsdefekte PBF-Mutante PBFmt3/4/5 und einem Expressionsplasmid für eine konstitutiv aktive Akt1 Kinase kotransfiziert. Dies erzeugte mit wt-PBF eine leichte Verstärkung der Interaktion von PBF mit endogenem 14-3-3 (Abb. 21, Spuren 3 und 4). Die Wechselwirkung von endogenem 14-3-3 mit PBFmt4/5 (Spuren 7 und 8) wurde, im Gegensatz zur Interaktion mit PBFmt3 (Spuren 5 und 6), durch die Koexpression einer rekombinanten Akt Kinase signifikant verstärkt.

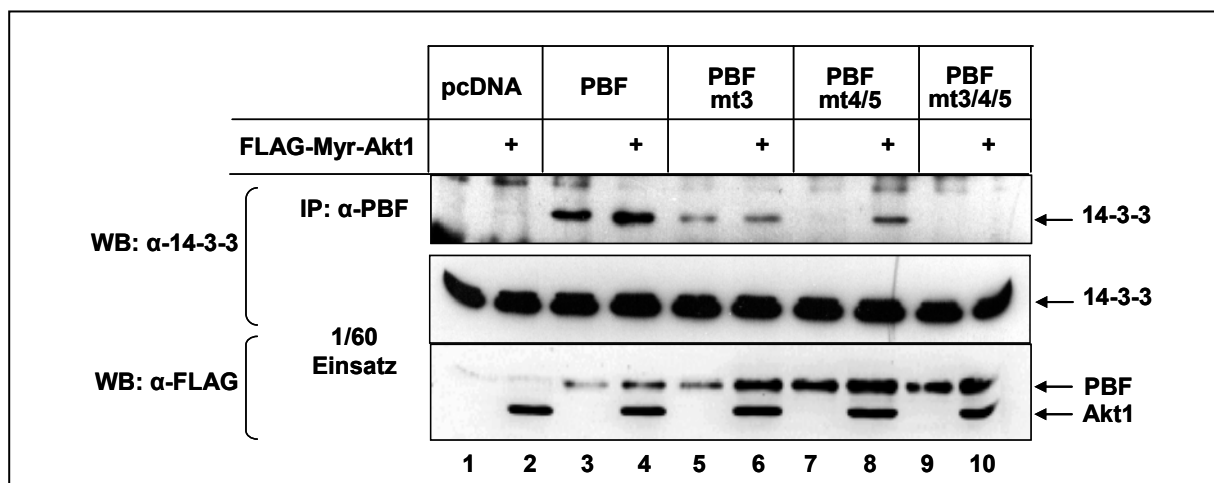


Abb. 21 Die Akt Kinase reguliert die Interaktion von PBF und 14-3-3 über Phosphorylierung der Serine an den Positionen 447, 449 und 451.

Koimmunpräzipitation. Die Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFmt3, -PBFmt4/5, -PBFmt3/4/5 und der entsprechende Leervektor wurden mit dem Plasmid für FLAG-Myr-Akt1, welches eine konstitutiv aktive Akt Kinase kodiert, kotransfiziert (Spuren 2, 4, 6, 8 und 10). Die Extrakte wurden über PBF-Antikörper-gekoppelte Sepharose aufgereinigt. Präzipitiertes 14-3-3 wurde im WB mit dem 14-3-3-Antikörper nachgewiesen. Die endogene 14-3-3 Expression, sowie die Expression der PBF Proteine und die der rekombinanten Akt Kinase wurde in den beiden unteren WB nach Auftragen von 1/60 des Einsatzes mit dem 14-3-3-, bzw. dem FLAG-Antikörper detektiert.

Dies bestätigt, dass die 14-3-3-Bindung um Position 446-453 über die Akt-Phosphorylierung reguliert wird. PBFmt3/4/5 zeigte unabhängig von der Akt Koexpression keine Interaktion mit endogenem 14-3-3 (Spuren 9 und 10).

4.1.9 Serum Entzug erzeugt nukleären Import von PBF

Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die subzelluläre Lokalisation von PBF zu untersuchen, wurden RTS3b Zellen mit Expressionsvektoren für EGFP-PBF, für die 14-3-3-bindungsdefekte Mutante EGFP-PBFmt3/4/5, sowie für EGFP-PBFmt3/4/5/6, bei dem zusätzlich das Serin an Position 275 der Akt I-Sequenz mutiert wurde, transfiziert. Nach Inkubation der Zellen in Medium, mit 10% Serum, wurden die Zellen für weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die cytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation der Proteine wurde über Fluoreszenzmikroskopie ermittelt (Abb. 22A). 24 h nach der Transfektion wurde wt-PBF in 92% und PBFmt3/4/5 in 83% der transfizierten Zellen ausschließlich im Cytoplasma detektiert (Abb. 22B). Auch PBFmt3/4/5/6 befand sich unter serumhaltigem Medium zu 92% im Cytoplasma. Die Lokalisation von PBF in der Zelle scheint demnach weitgehend von dem Kernexportsignal (NES) von Position 165-174 abhängig zu sein. Eine Deletion dieser Region resultierte in ausschließlich nukleärem PBF (Daten nicht gezeigt). Wie der Abbildung 22B zu entnehmen ist, war wt-PBF nach Entzug der Wachstumsfaktoren in 62% der transfizierten Zellen vermehrt im Kern. In 36% der PBF-exprimierenden Zellen wurde PBF in beiden Kompartimenten detektiert. Eine cytoplasmatische Expression war nur noch bei 2% der Zellen zu beobachten. PBFmt3/4/5 befand sich sogar bei 80% der Zellen im Kern und nur bei 20% war eine Expression im Cytoplasma und im Zellkern nachweisbar. Die Quantifizierung der Lokalisation von PBFmt3/4/5/6 nach Serum Entzug war kaum möglich, da der Großteil der transfizierten Zellen starb (s. Pfeile in Abb. 22A), und somit kaum noch fluoreszierende Zellen detektiert werden konnten. Noch lebende Zellen exprimierten PBFmt3/4/5/6 jedoch im Zellkern. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass der Entzug von Wachstumsfaktoren eine Translokation von PBF in den Zellkern ermöglicht, bzw. seinen Export verhindert. Die cytoplasmatische Lokalisation von PBF scheint teilweise über die Interaktion mit 14-3-3 reguliert zu werden, da die bindungsdefekte PBF-Mutante nach Serum Entzug verstärkt im Kern nachweisbar war. Eine Rolle des Serins an Position 275 der Akt I-Konsensussequenz bei der Lokalisation konnte hier aus Zeitgründen nicht analysiert werden. Allerdings scheint deren Mutation nicht mit dem Überleben der Zellen unter Wachstumsfaktor Mangel vereinbar zu sein.

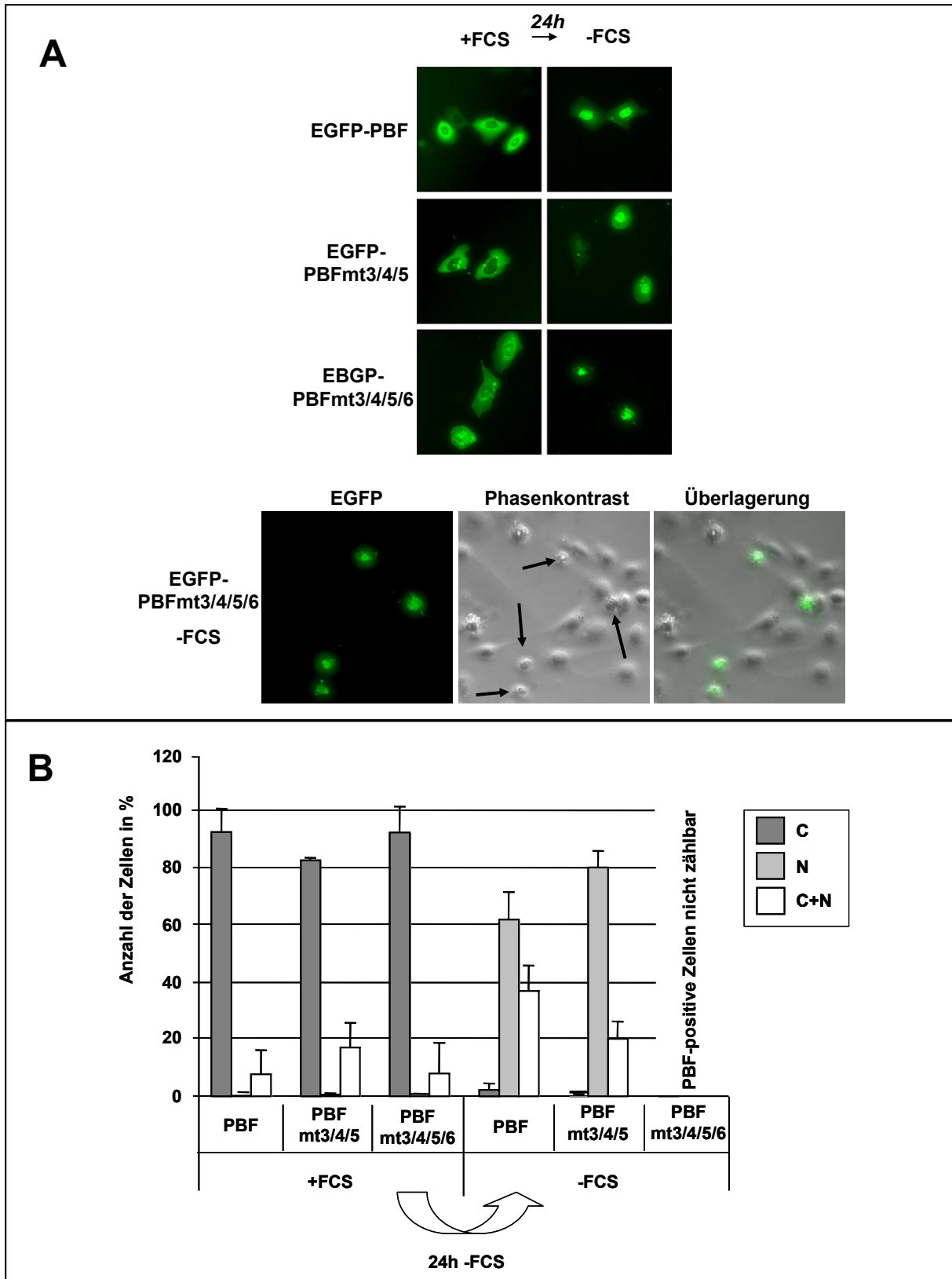


Abb. 22 Serum Entzug erhöht nukleäre Lokalisation von PBF.

(A) Fluoreszenzanalyse. Cytoplasmatisches PBF verlagert sich unter Entzug von Serum in den Zellkern. RTS3b Zellen wurden mit Expressionsvektoren für EGFP-PBF, -PBFmt3/4/5 und -PBFmt3/4/5/6 transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen weitere 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Lokalisation der Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt. (B) Quantifizierung der subzellulären Lokalisation von PBF. Hierfür wurde das gleiche Experiment wie unter (A) beschrieben durchgeführt. Die zelluläre Lokalisation von PBF wurde durch Zählen der Zellen mit nukleärer und/oder cytoplasmatischer Expression quantifiziert. Die Ergebnisse stammen von vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind in der Abbildung verzeichnet.

4.1.10 PBF inhibiert zelluläre Proliferation reguliert durch die Interaktion mit 14-3-3 und die Akt Kinase

Versuche eine stabile Zelllinie herzustellen, welche PBF überexprimiert, erwiesen sich als äußerst schwierig, da die meisten Zellen die Selektion nicht überlebten. Mutationen innerhalb des Akt-Konsensusmotivs und der 14-3-3 BS in PBFmt3/4/5/6 führten zu einem PBF-Protein, das effizient Zellen unter Wachstumsfaktor Entzug tötete (vgl. 4.1.9). Um die Rolle der 14-3-3 Bindung und der Phosphorylierung durch die Akt Kinase auf die negative Regulation des Zellwachstums durch PBF zu bestätigen, wurde ein Wachstums-Assay durchgeführt. RTS3b Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für PBF, PBFmt3, PBFmt6, PBFmt3/6, PBFmt4/5, PBFmt3/4/5 und PBFmt3/4/5/6 transfiziert. Der entsprechende Leervektor diente als Negativkontrolle. 48 h später wurden die transfizierten Zellen unter G418-haltigem Medium für elf Tage selektioniert. Zur Ermittlung der Wachstumsinhibition wurden die Zellen entweder mit einer GIEMSA-Lösung fixiert (Abb. 23A) oder trypsinisiert und via FACS gezählt (Abb. 23B). Wie in der Abbildung 23A zu erkennen ist, konnten die Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, nahezu konfluent wachsen. Die Anzahl der G418 resistenten Zellen sank auf 50% nach Transfektion des PBF-Expressionsvektors (Abb. 23B). Die Kolonienanzahl wurde mit der Überexpression der 14-3-3-Bindungsmutanten PBFmt3 (24%), PBFmt4/5 (21%) und PBFmt3/4/5 (12%) noch weiter reduziert. Auch die Akt-Mutanten PBFmt6 (26%) und PBFmt3/6 (16%) erzeugten eine vergleichbare Reduktion. Nach Überexpression von PBFmt3/4/5/6 überlebten nur noch 2% der Zellen, was die Beobachtung in der Fluoreszenz nach Überexpression von PBFmt3/4/5/6 bestätigt (Abb. 22A, B). Diese Reduktion der stabil transfizierten Zellen veranschaulicht das Potential von PBF das Wachstum der Zellen zu inhibieren. Dieser Effekt stieg zum einen mit Verlust der Bindung an 14-3-3 und zum anderen durch fehlende Phosphorylierung des Serins an Position 275. Eine Bindung von 14-3-3 an PBF im Cytoplasma, sowie die Phosphorylierung der Akt I-Sequenz reduziert somit die PBF-vermittelte Inhibition des Zellwachstums. Die Zunahme der Wachstumsinhibition durch Mutation der Serine, die für die 14-3-3-Interaktion und für die Phosphorylierung durch Akt notwendig sind, ist ein Hinweis, dass eine mögliche verstärkte nukleäre Lokalisation dafür verantwortlich ist.

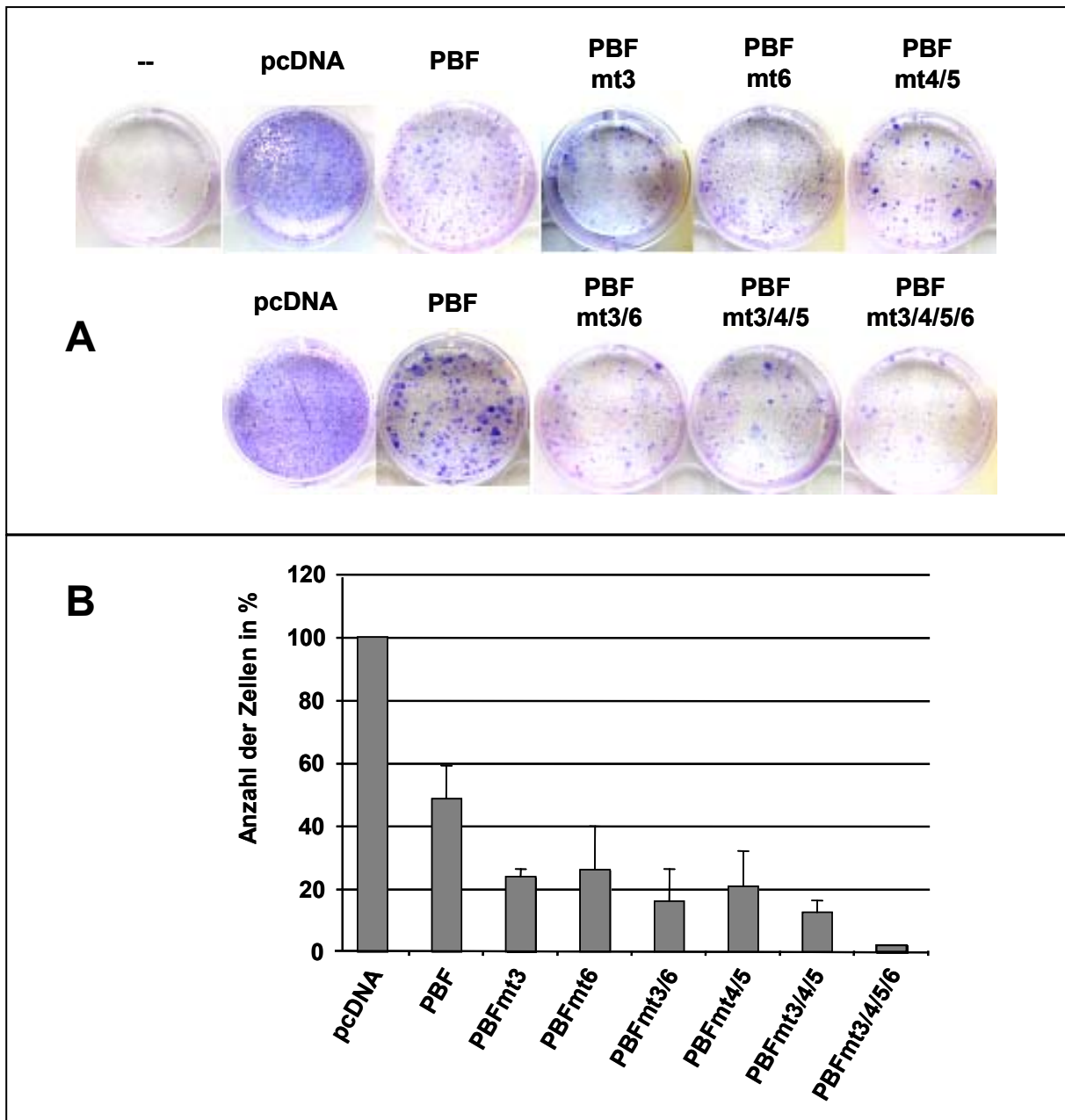


Abb. 23 PBF erzeugt Wachstumsinhibition reguliert über die Phosphorylierung durch die Akt Kinase und die Interaktion mit 14-3-3.

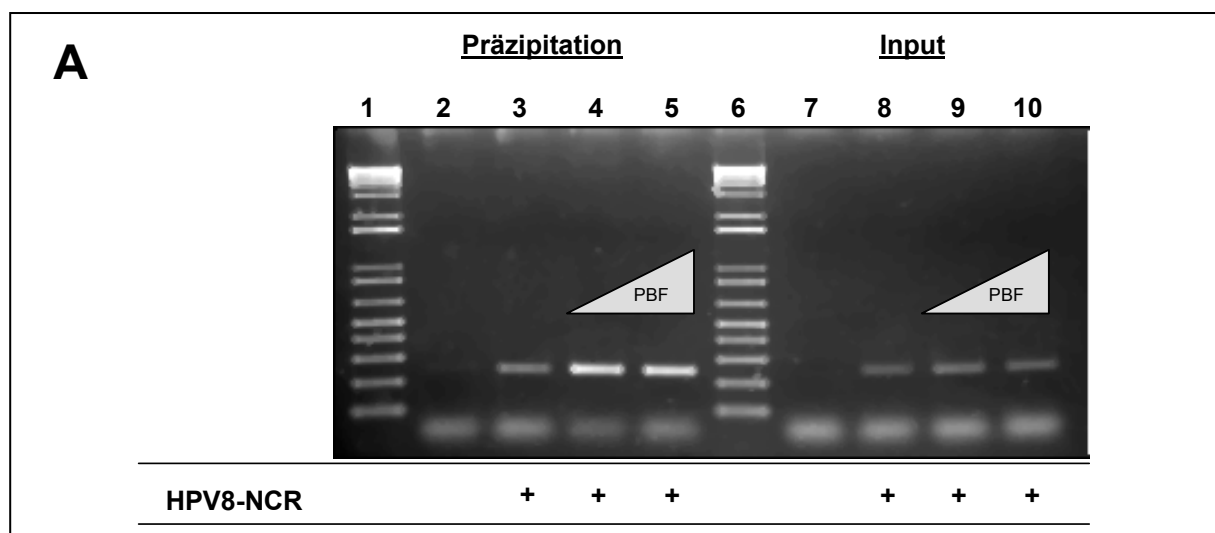
Wachstums-Assay. RTS3b Zellen wurden mit 375 ng der FLAG-Expressionsplasmide für PBF, PBFmt3, PBFmt6, PBFmt4/5, PBFmt3/6, PBFmt3/4/5, PBFmt3/4/5/6 und mit entsprechender Menge des Leervektors transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen über einen Zeitraum von elf Tagen unter G418-haltigem Medium selektioniert. Daraufhin wurden sie entweder mit GIEMSA fixiert (A) oder via FACS quantifiziert (B). Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.2 PBF fungiert als Transkriptionsfaktor

4.2.1 PBF bindet DNA *in vivo*

PBF bindet *in vitro* DNA über GC-reiche Erkennungssequenzen (BOECKLE *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2004). Eine Bindung von rekombinantem, gereinigtem PBF an seine, mit der E2 BS P2 überlappende BS in HPV8, wurde bereits gezeigt (BOECKLE *et al.*, 2002).

Um zunächst die DNA-Bindung von PBF an seine Erkennungssequenz *in vivo* zu überprüfen, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt. Dafür wurde ein Reporterkonstrukt, welches für die NCR von HPV8 (8NCR) kodiert zusammen mit zwei unterschiedlichen Mengen eines Expressionsplasmids für PBF transient in RTS3b Zellen transfiziert. Nach Präzipitation und Elution der von PBF gebundenen DNA, erfolgte die Quantifizierung über PCR mit Primern, welche die E2 BS P2 von HPV8 eingrenzen (Abb. 24A, Spuren 2 bis 5). Zum Abgleich der Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden die PCRs auch mit gereinigten DNAs der für die IP eingesetzten Extrakte durchgeführt (Spuren 7 bis 10). Wie die DNA-Bande in Spur 3 zeigt, band ein geringer Anteil des HPV8-Segmentes auch unspezifisch an die Sepharosekügelchen. Dennoch wurde durch Koexpression von PBF HPV8-P2-DNA vermehrt präzipitiert (Spuren 4 und 5). Eine Quantifizierung veranschaulicht den Anstieg der präzipitierten HPV8 DNA mit zunehmenden Mengen PBF (Abb. 24B). Diese Daten belegen, dass PBF auch *in vivo* an die P2 BS von HPV8 bindet.



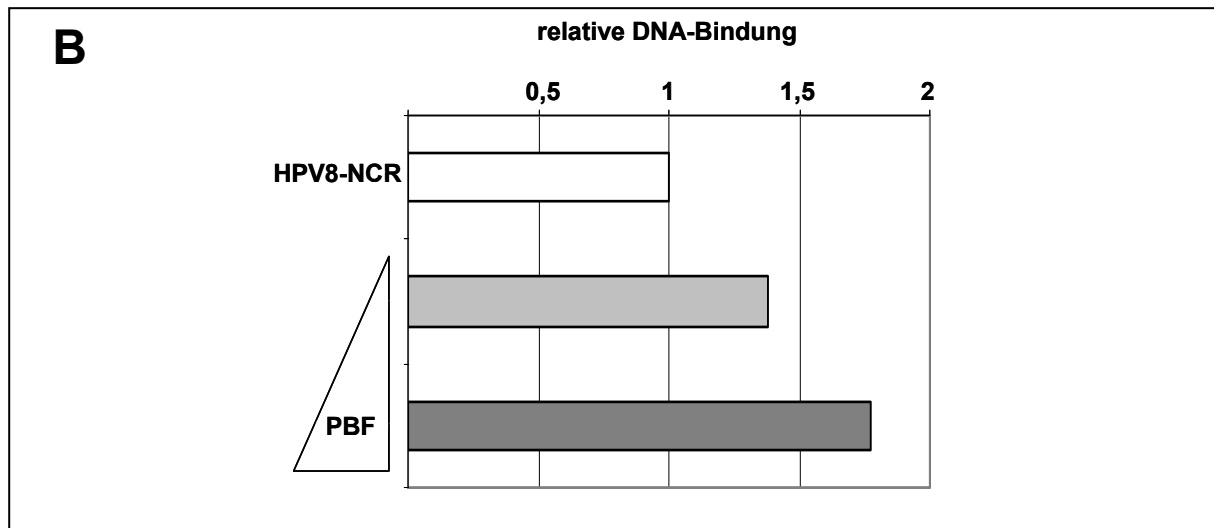


Abb. 24 PBF bindet an die P2 BS der HPV8-NCR *in vivo*.

ChIP-Assay. RTS3b Zellen wurden mit einem HPV8-NCR-Reporterkonstrukt und zwei Konzentrationen eines Expressionsvektors für PBF transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden Protein-DNA-Komplexe über chemischen „cross link“ fixiert, die Zellextrakte isoliert, sonifiziert und über PBF-Antikörper-gekoppelte Sepharose präzipitiert. Die gebundene DNA wurde über PCR mit Primern, welche die E2 Bindestelle (BS) P2 von HPV8 eingrenzen, amplifiziert und in einem Agarosegel aufgetragen (A, Spuren 2 bis 5). Die PCR Produkte des Inputs wurden in den Spuren 8 bis 10 aufgetragen. Die Quantifizierung der präzipitierten DNA nach Abgleich mit dem Input ist in (B) dargestellt.

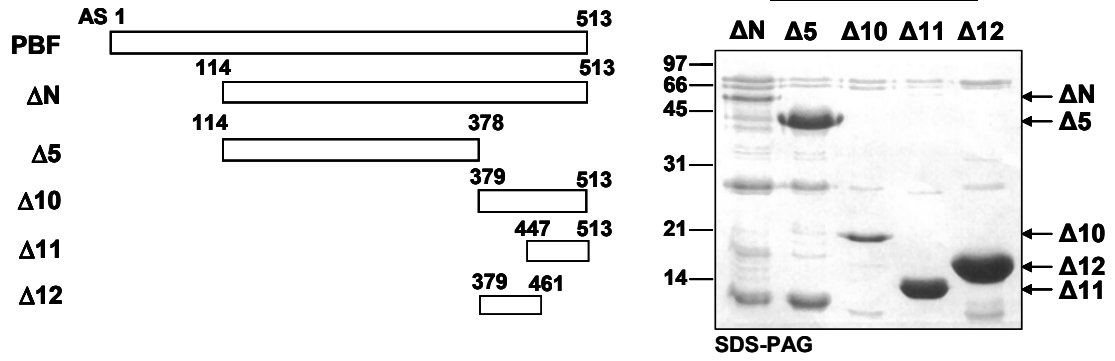
4.2.2 PBF bindet DNA über zwei C-terminal lokalisierte konservierte CRAR-Regionen

Inwiefern sich die DNA-Bindung von PBF auf die Promotoraktivitäten ausübt, sollte in transienten Transfektionsanalysen ermittelt werden. Zur Herstellung einer DNA-Bindungsdefekten PBF-Mutante, wurde zunächst die DNA-Bindedomäne von PBF identifiziert. TANAKA *et al.* konnten bereits zeigen, dass der C-Terminus von PBF die DNA-Bindung vermittelt. Dies wurde zunächst mit Deletionsmutanten von PBF in einem EMSA überprüft. Das doppelsträngige Oligonukleotid P2TATA (Abb. 25A) wurde radioaktiv markiert und mit den bakteriell exprimierten und über Histidin-Epitop aufgereinigten Deletionsmutanten PBF Δ N, PBF Δ 5 und PBF Δ 10 (Abb. 25B) inkubiert (Abb. 25C, Spuren 2 bis 4). Um die Spezifität der Protein-DNA-Bindung zu überprüfen, wurden die Proteine mit einem 1000-fachen Überschuss an homologen und heterologen Kompetitoren inkubiert (Spuren 5 bis 10). PBF Δ 5 von AS 114-178 war nicht in der Lage, an die DNA zu binden (Abb. 25C, Spur 3). PBF Δ N und PBF Δ 10, welche beide den C-Terminus von AS 379-513 beinhalten, zeigten beide eine DNA-Bindung. Dieses Experiment bestätigt, dass sich die DNA-Bindedomäne von PBF im C-Terminus befindet.

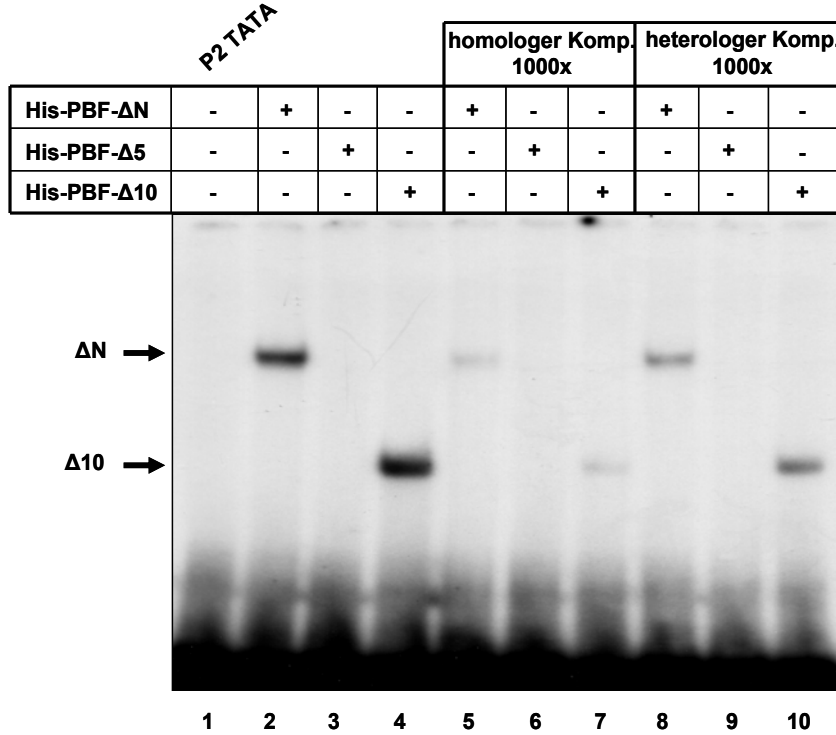
Um diese weiter einzugrenzen wurden die PBF-Deletionsmutanten PBF Δ 11 und PBF Δ 12 (Abb. 25B), welche Subfragmente von PBF Δ 10 darstellen, verwendet (Abb. 25D). Es zeigte sich, dass nur PBF Δ 11 von AS 447-513 in der Lage war, eine DNA-Bindung einzugehen (Spur 3). Demnach wurde die DNA-Bindedomäne von PBF auf eine Sequenz von 66 AS von AS 447-513 eingegrenzt.

A P2TATA 5' – AACCGACCGCACCCGGTACATAAAGGTGAGT – 3'

B



C



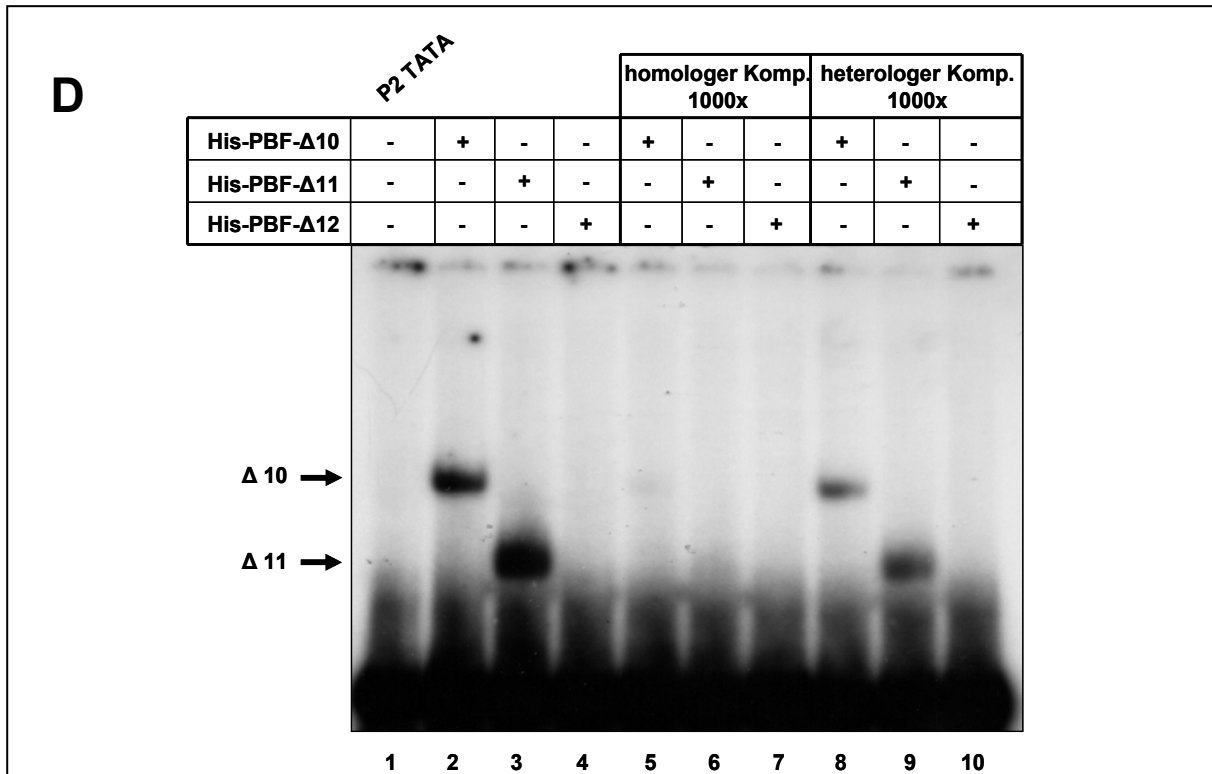


Abb. 25 PBF bindet DNA über den C-Terminus.

EMSA. 250 pg radioaktiv markiertes P2TATA Oligonukleotid, dessen Sequenz in (A) gegeben ist, wurde mit ca. 250 pg der bakteriell exprimierten und aufgereinigten His-Proteine PBF Δ N, PBF Δ 5, PBF Δ 10, PBF Δ 11 und PBF Δ 12 wie in (B) schematisch und im SDS-PAG dargestellt, inkubiert (C und D, Spuren 2 bis 4). In den Spuren 5-7 erfolgte die Inkubation in Gegenwart eines 1000-fachen Überschusses an homologem Kompetitor und in den Spuren 8-10 in Gegenwart eines 1000-fachen Überschusses an heterologem Kompetitor. Die Pfeile markieren die jeweils entstandenen Komplexe, welche nach Auftrennung über ein 4,5%iges Polyacrylamidgel (PAG) und anschließender Autoradiographie sichtbar wurden.

Der äußerste C-Terminus von PBF (CR3, AS 477-513) kodiert zwei, zu bestimmten Isoformen von T-Zell-Faktoren, den „E“-Varianten, hochkonservierte und möglicherweise an der DNA-Bindung beteiligte Regionen, die sog. CRAR-Region (ATCHA *et al.*, 2003; VAN NOORT *et al.*, 2002). Da die DNA-Bindedomäne von PBF bereits auf die CR3 eingegrenzt werden konnte (Abb. 25), wurde die Beteiligung der CRAR-Regionen an der DNA-Bindung von PBF durch Mutationsanalyse untersucht. Fünf AS innerhalb beider CRAR-Regionen wurden durch die Sequenz VALAL ersetzt (PBFmtCR3a und PBFmtCR3b, Abb. 26A). In PBFmtCR3 sind beide CRAR-Regionen mutiert. Sie Sequenz VALAL wurde gewählt, um die Proteinfaltung so wenig wie möglich zu beeinflussen. VALAL ist sehr ähnlich zu der VAHAL-Sequenz, welche abhängig von der Umgebungssequenz sowohl eine β -Faltblatt, als auch eine α -helikale Strukturbildung erlaubt (KABSCH und SANDER, 1984). Entsprechende bakteriell exprimierte und gereinigte PBF-Mutanten wurden auf ihre DNA-Bindfähigkeit im EMSA untersucht (Abb. 26B). Die DNA-Bindung von PBF wurde schon unterbunden, sobald eine der beiden CRAR-Regionen mutiert war (Spuren 3 und 4). Diese Ergebnisse demonstrieren die Notwendigkeit beider CRAR-Regionen für die DNA-Bindung von PBF.

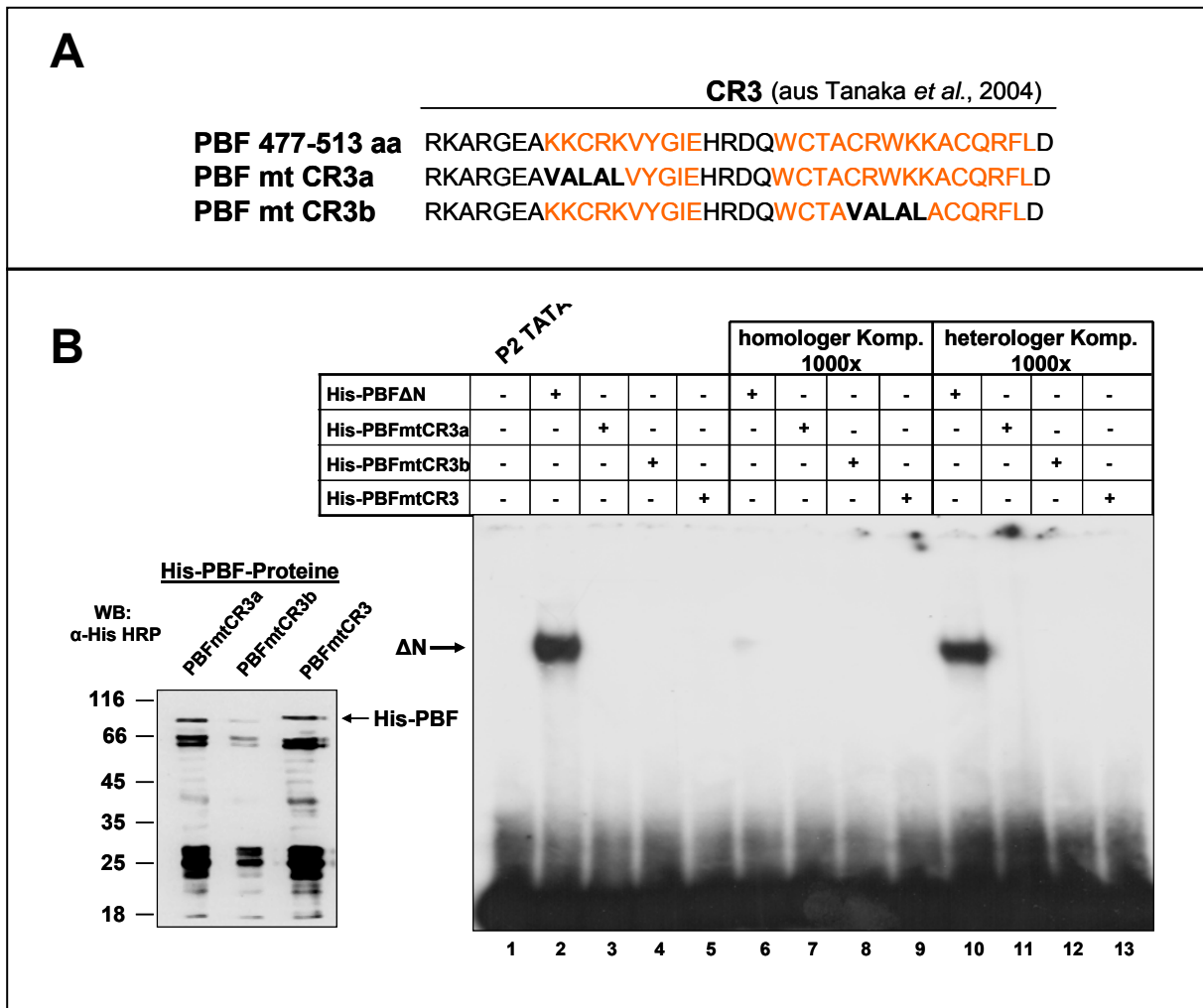


Abb. 26 DNA-Bindung von PBF wird über die C-terminalen CRAR-Regionen vermittelt.

EMSA. 250 pg radioaktiv markiertes P2TATA Oligonukleotid (Abb. 25A) wurde mit ca. 250 pg der bakteriell exprimierten und aufgereinigten His-Proteine PBFΔN, PBFmtCR3a, PBFmtCR3b und PBFmtCR3 (B, WB: α-His HRP), deren Sequenzen in (A) gegeben sind, inkubiert (B, Spuren 2 bis 5). In den Spuren 6-9 erfolgte die Inkubation in Gegenwart eines 1000-fachen Überschusses an homologem Kompetitor und in den Spuren 10-13 in Gegenwart eines 1000-fachen Überschusses an heterologem Kompetitor. Nach Auftrennung der Komplexe (mit Pfeil markiert) über in 4,5%iges PAG konnten sie über Autoradiographie detektiert werden.

4.2.3 PBF reguliert Transkription als Repressor

Die Funktion von PBF als Transkriptionsfaktor wurde in transienten Transfektionsstudien mit verschiedenen Reporterkonstrukten, welche PBF-Erkennungssequenzen aufweisen, untersucht.

4.2.3.1 PBF vermittelt Repression abhängig von der DNA-Bindung

Zunächst wurde eine transiente Transfektion durchgeführt. RTS3b Zellen wurden dafür mit einem Expressionsplasmid für PBF und dem synthetischen Reporterkonstrukt BPV1-3xBS1-wt-Luc, welches vor dem Luciferasegen und dem Adenovirus MLP (major late promoter) drei Kopien der PBF Bindestelle von BPV1 kodiert, transfiziert (Abb. 27A). PBF erzeugte dosisabhängig eine Reduktion der Promotoraktivität (Abb. 27B). Die Expression von PBFmtCR3 mit mutierter DNA-Bindedomäne zeigte hingegen keinen Einfluss auf die

Aktivität des Promotors. Demnach vermittelt PBF Repression abhängig von der DNA-Bindung.

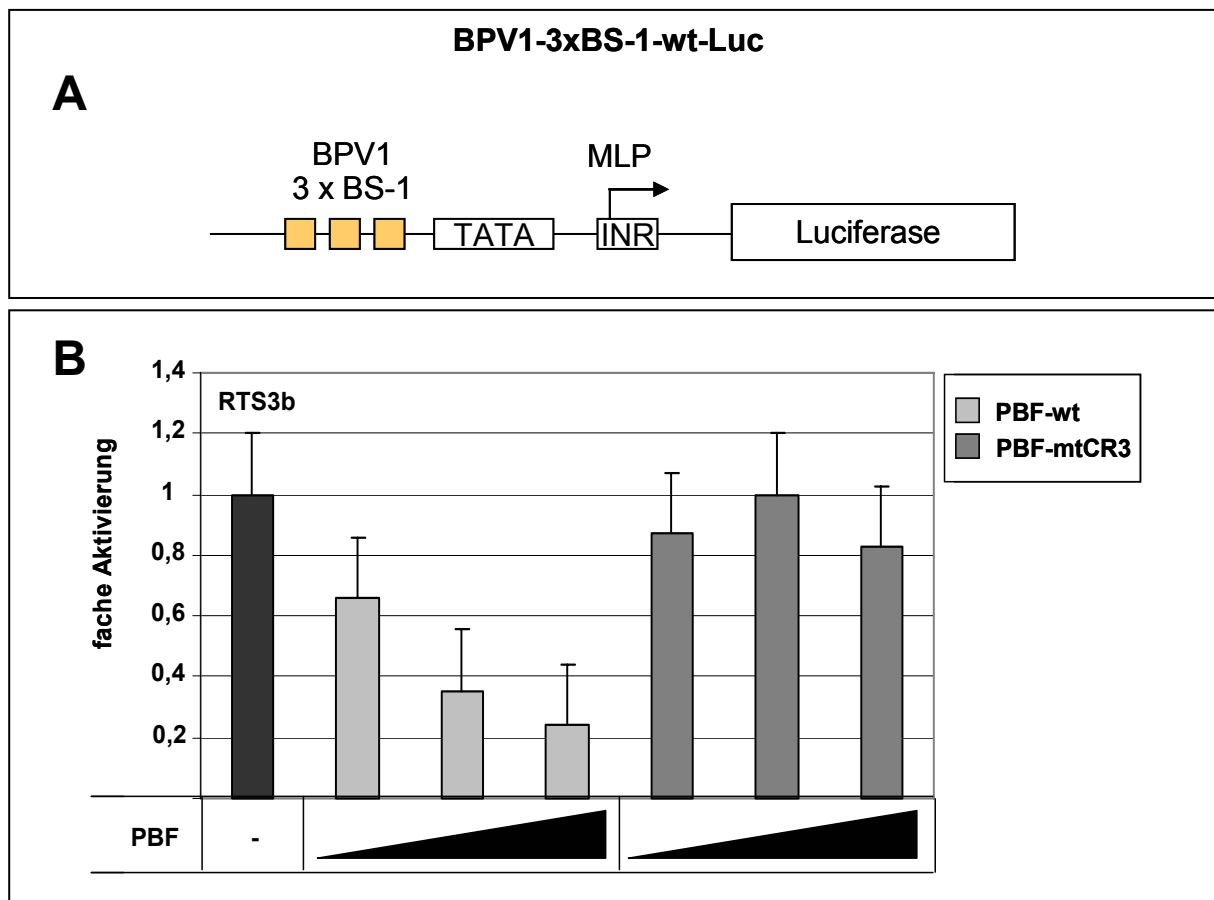


Abb. 27 PBF vermittelt dosisabhängig Promotorrepression.

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts BPV1-3xBS-1-wt-Luc. Angegeben sind die drei BS-1 von BPV1 sowie der Promotor (MLP, major late promoter). (B) Transiente Transfektionsanalyse. In RTS3b Zellen wurden 200 ng des Reporterkonstrukts (A) mit 2, 10 und 20 ng der PBF-Expressionsvektoren pcDNA3.1-FLAG-PBF, bzw. -PBFmtCR3 kotransfiziert. Die verschiedenen DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Levektor ausgeglichen. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.2.3.2 Herstellung einer Zelllinie mit verringerter endogener PBF-Konzentration

Da die endogene PBF-Konzentration in RTS3b Zellen nicht bekannt war, sollte der mögliche Einfluss des endogenen PBF Proteins auf die Transkription reduziert werden. Dafür wurde mittels siRNA-Technologie eine stabile Zelllinie hergestellt, bei der die endogene PBF-Konzentration herunterreguliert wird.

Für die Herstellung dieser Zelllinie wurden drei verschiedenen siRNAs für PBF in einer „Hairpin“-Struktur entworfen (siRNA1, 2 und 3). Die entsprechenden Oligonukleotide wurden dann in den Vektor pSilencer3.0 kloniert. Dieser Vektor ermöglicht neben der Expression der siRNAs eine Selektion stabil transfizierter Zellen. Zur Ermittlung der zellulären PBF-Menge unter Koexpression der siRNAs, wurde die PBF-mRNA in den drei

verschiedenen Zelllinien über RT-PCR quantifiziert (Abb. 28, oberes und mittleres Gel). Für die PCR wurden Intron-übergreifende Oligonukleotide gewählt, um eine Amplifikation von PBF durch DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Wie die Abbildung 28 (mittleres Gel, Spur 9) veranschaulicht, konnte nach stabiler Transfektion des Expressionsplasmids für die siRNA2 die endogene PBF-Expression um 90% reduziert werden. Nach transients Transfektion wurde dieser Effekt nicht beobachtet (oberes Gel).

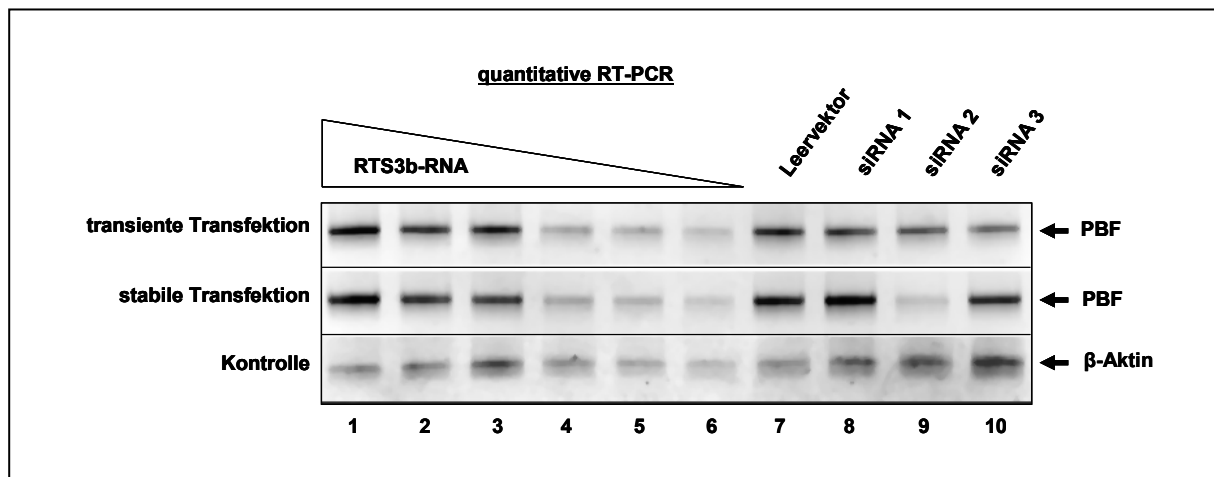


Abb. 28 PBF-siRNA2 erzeugt PBF⁻-Zelllinie.

RT-PCR. Expressionsvektoren für die PBF-siRNAs 1, 2, 3 und der entsprechende Leervektor wurden transient oder stabil in RTS3b Zellen transfiziert. Nach Isolation der RNAs wurden diese revers transkribiert und über PCR mit Intron-übergreifenden Oligonukleotiden für PBF amplifiziert (oberes und mittleres Gel, Spuren 7-10). Die Quantifizierung erfolgte über RT-PCR verschiedener RNA-Mengen (1 µg, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng und 31,25 ng) untransfizierter RTS3b Zellen (Spuren 1-6). Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen wurden die RNAs der stabil transfizierten, bzw. die der untransfizierten Zellen nach der reversen Transkription (RT) in cDNAs in einer β-Aktin-PCR eingesetzt (unteres Gel).

4.2.3.3 Promotorrepression durch PBF ist abhängig von der 14-3-3-Interaktion

Wie unter 4.1.10 beschreiben, induzierte PBF eine Inhibition der zellulären Proliferation, welche durch Reduktion und Verlust der Interaktion mit 14-3-3 anstieg. Weiterhin wurde PBF als negativ regulierender Transkriptionsfaktor charakterisiert (vgl. 4.2.3.1/2). Diese Informationen lassen vermuten, dass PBF die Wachstumsinhibition über die transkriptionelle Regulation bestimmter Zielgene kontrolliert. Um den Einfluss der 14-3-3-Interaktion auf die PBF-vermittelte Promotorrepression zu untersuchen, wurden transiente Transfektionsanalysen mit PBF und der 14-3-3-bindungsdefekten PBF-Mutante PBFmt3/4/5 in der RTS3b-PBF⁻-Zelllinie durchgeführt. Expressionsvektoren für PBF und PBFmt3/4/5 wurden in zunehmenden Konzentrationen mit dem synthetischen Reporterkonstrukt BPV1-3xBS1-wt-Luc (vgl. Abb. 27A) kotransfiziert. Um negative Effekte von PBF und der Mutante auf das Zellwachstum als Ursache der verringerten Promotoraktivität auszuschließen, wurde als interne Kontrolle der Vektor RSV-β-Gal kotransfiziert. Durch Messung der β-Gal-Aktivitäten wurde die Zahl der transfizierten Zellen ermittelt, womit die Luciferase-Werte

abgeglichen wurden. Während ansteigende Mengen wt-PBF eine Repression von 3-fach erzeugten, war PBFmt3/4/5 in der Lage, 5-fach zu reprimieren (Abb. 29). Der Verlust der Interaktion mit 14-3-3 verstärkt demnach die Promotorrepression durch PBF.

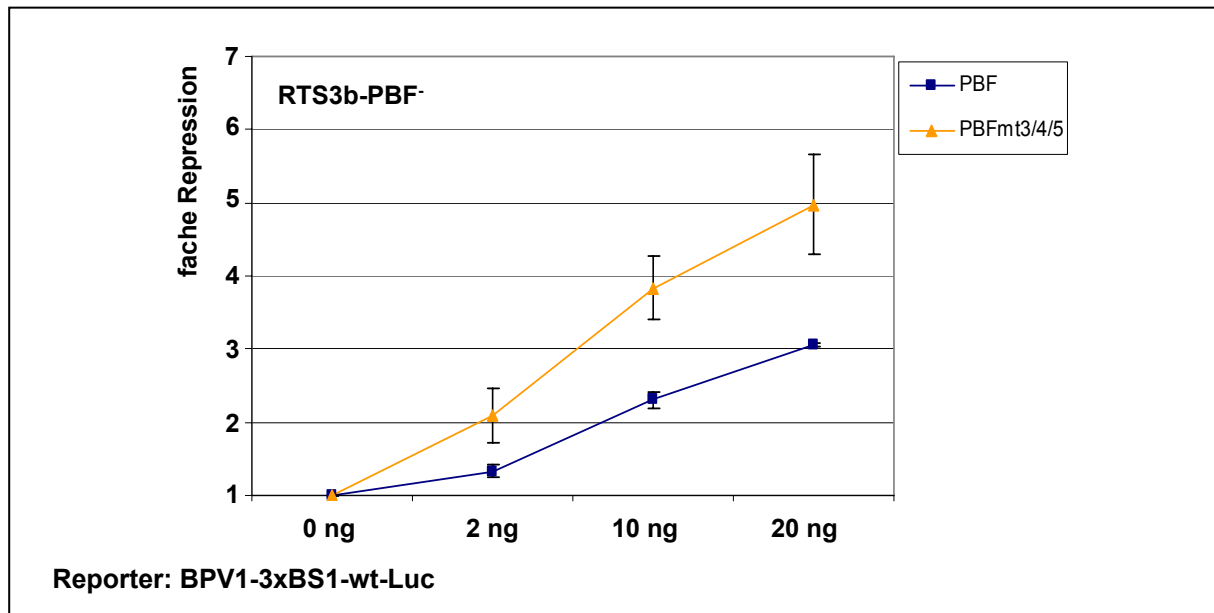


Abb. 29 PBF-vermittelte Repression wird durch Verlust der 14-3-3-Interaktion verstärkt.

Transiente Transfektionsanalyse. RTS3b-PBF-Zellen wurden mit 2, 10 und 20 ng der Expressionsvektoren für PBF, PBFmt3/4/5 und entsprechendem Leervektor, 200 ng des Reporterkonstrukts BPV1-3xBS1-wt-Luc und 200 ng des RSV- β -Gal-Vektors kotransfiziert. Dargestellt ist die fache Repression. Die basale Aktivität des Reporters wurde als 1 definiert. Die eingezeichneten Standardabweichungen stammen von drei unabhängigen Transfektionen.

Um die Rolle der spezifischen DNA-Bindung bei der Repression durch PBF zu bestätigen, wurde das GAL4-System genutzt. Hierfür wurden die ORFs für PBF und PBFmt3/4/5 jeweils in den pM-Vektor kloniert, um die beiden Proteine fusioniert mit der DNA-Bindedomäne (DBD) für Gal4 zu exprimieren. Für transiente Transfektionsanalysen wurden diese Expressionsplasmide mit dem Luciferase-Reporterkonstrukt pG5-Luc, welches vor dem E1b-Promotor fünf Gal4-Bindestellen (BS) besitzt (Abb. 30A), kotransfiziert. Um den Effekt der Proteine auf die Promotoraktivitäten unabhängig von der DNA-Bindung zu analysieren, wurde in dieser Transfektionsstudie zusätzlich das Reporterkonstrukt pG5 Δ -Luc, mit deletierten Gal4-BS, eingesetzt (Abb. 30A). Wie in der Abbildung 30B zu sehen ist, erzeugte PBF durch spezifische DNA-Bindung an die Gal4-BS eine bis zu 6-fache Repression, welche durch Mutation der 14-3-3-BS auf 8-fach gesteigert wurde. Die Deletion der Gal4-BS erlaubte PBF nur noch eine 2-fache und PBFmt3/4/5 eine 3-fache Repression. Der Anstieg der PBF-vermittelte Repression durch Verlust der 14-3-3 Interaktion wurde bestätigt. Die signifikante Reduktion der Promotorrepression nach Deletion der Gal4-BS zeigt, dass der Großteil der PBF-vermittelten Repression durch spezifische DNA-Bindung induziert wird.

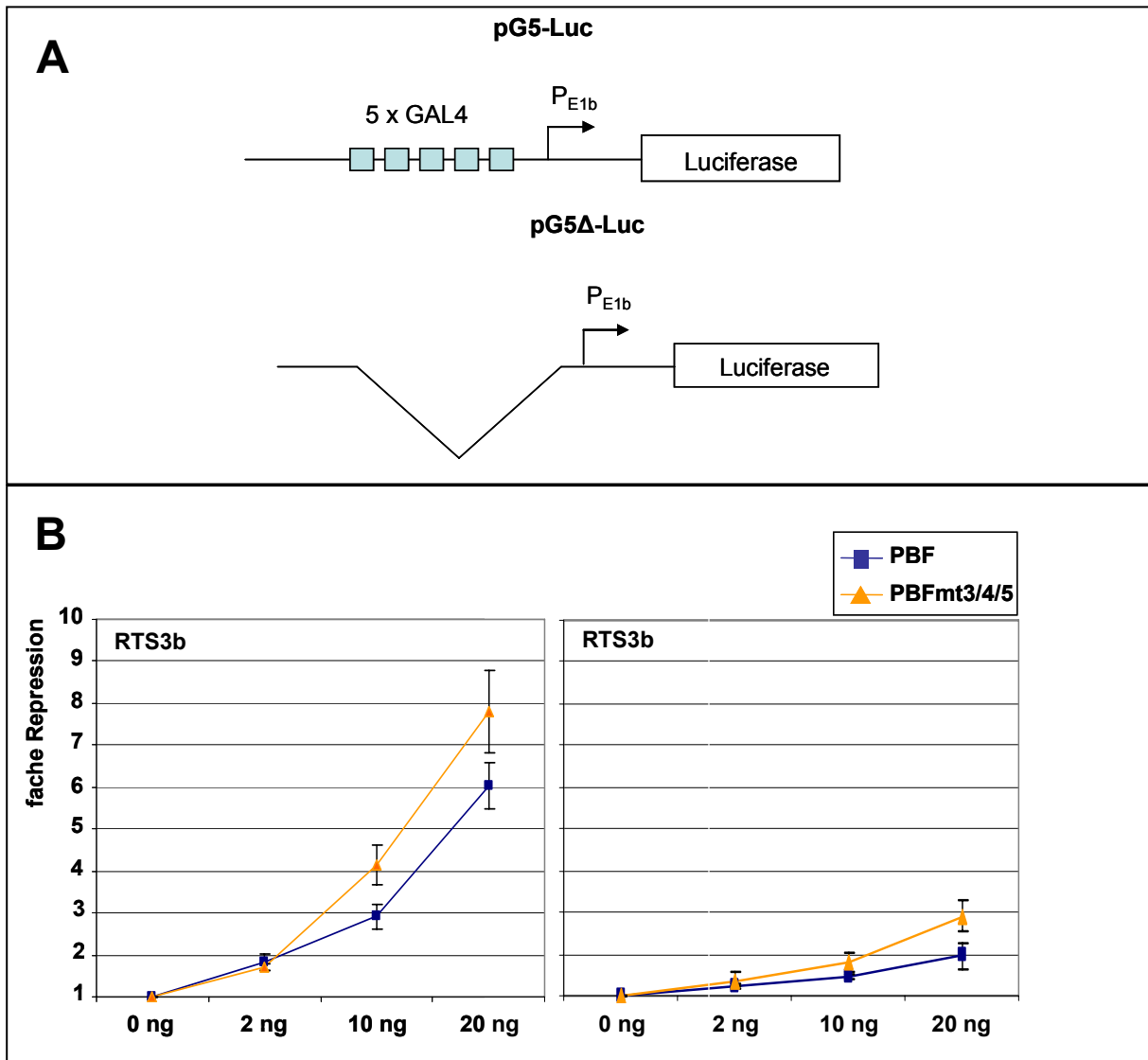


Abb. 30 PBF vermittelt Repression abhängig von der 14-3-3-Interaktion durch spezifische DNA-Bindung.

(A) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte pG5-Luc, mit dem E1b-Promotor und den fünf vorgeschalteten Gal4-Bindestellen (BS), und pG5Δ-Luc, mit deletierten Gal4-BS. (B) Transiente Transfektionsanalyse. RTS3b-Zellen wurden mit 200 ng des Luciferase-Reporterkonstrukts pG5-Luc oder pG5Δ-Luc (A), und 2, 10 und 20 ng der Expressionsvektoren für Gal4-DBD-fusioniertes PBF und PBFmt3/4/5 kotransfiziert. Unterschiede der DNA-Mengen wurden mit entsprechendem Leervektor ausgeglichen. Dargestellt ist die fache Repression. Die Grundaktivität des Reporters wurde als 1 definiert. Die eingezeichneten Standardabweichungen resultieren aus drei unabhängigen Transfektionsansätzen.

Die in diesem Kapitel dargestellten transienten Transfektionsanalysen belegen die Funktion von PBF als transkriptionaler Repressor, welche zum Teil über die Interaktion mit 14-3-3 im Cytoplasma kontrolliert wird.

4.2.4 Die DNA-Bindungsaktivität von PBF wird durch die Interaktion mit 14-3-3 nicht beeinflusst

Für den Transkriptionsfaktor Miz1 wurde gezeigt, dass seine DNA-Bindung durch Phosphorylierung und 14-3-3-Bindung inhibiert wird (WANZEL *et al.*, 2005). Um auszuschließen, dass dies die Ursache der verstärkten Promotorrepression durch PBF nach Mutation der 14-3-3 BS ist, wurde PBF auf seine DNA-Bindungsfähigkeit unter Koexpression von 14-3-3 β untersucht (Abb. 31). Die erhöhte Menge von PBF im Cytoplasma bei Koexpression von 14-3-3 β deutet darauf hin, dass 14-3-3 die Lokalisation von PBF im Cytoplasma nicht nur aufrechterhält, sondern zusätzlich die Stabilität von PBF beeinflusst (Spur 4). Die Expression von PBF im Zellkern wurde durch 14-3-3 β nicht sichtlich beeinflusst (Spur 7). Die unterschiedlichen Intensitäten der PBF-DNA-Komplexbildung in der DNA-Bindungsstudie (EMSA), korrelieren mit den verschiedenen Expressionslevel von PBF in den beiden Kompartimenten (WB: α -PBF). Demnach scheint die DNA-Bindungsaktivität von PBF von der 14-3-3-Interaktion nicht beeinflusst zu werden.

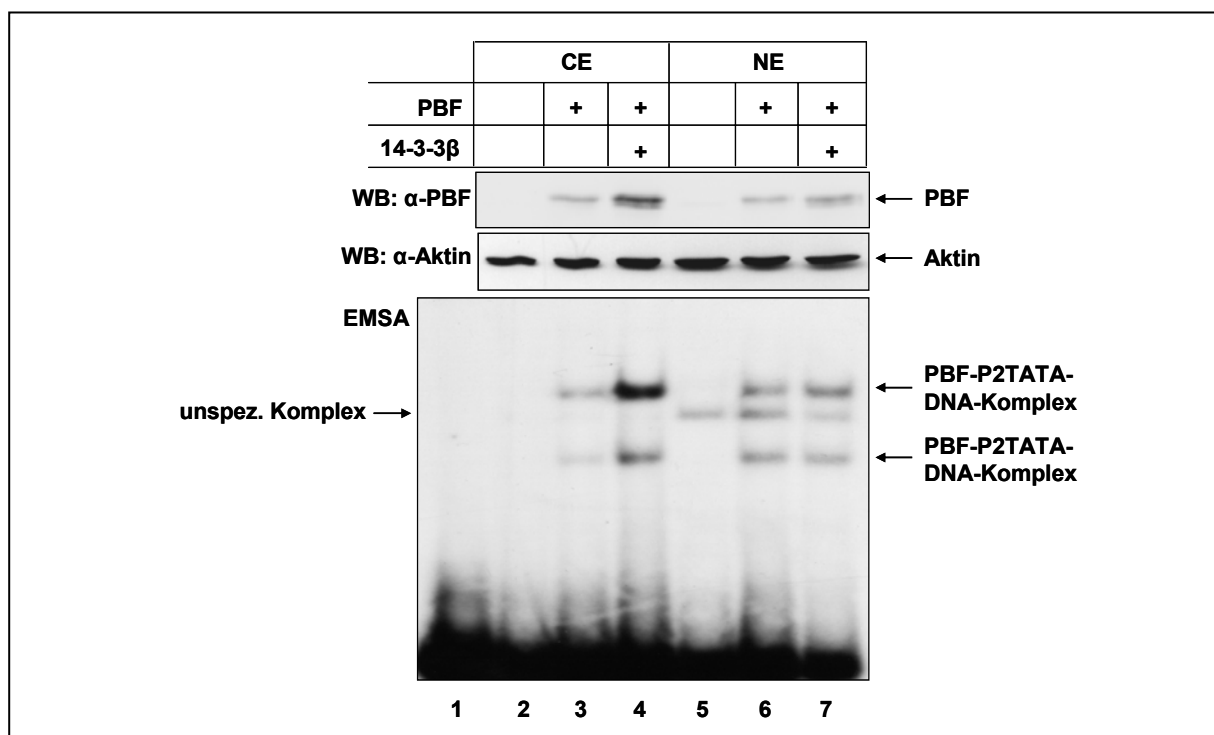


Abb. 31 DNA-Bindung von PBF wird durch 14-3-3 Interaktion nicht beeinflusst.

Expressions- und DNA-Bindungsstudie. RTS3b Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spuren 3, 4, 6 und 7), HA-14-3-3 β (Spuren 4 und 7) und entsprechenden Leervektoren transfiziert. Nach 48 h wurde aus diesen Cytoplasma-(CE) und Kernextrakte (NE) isoliert, von denen jeweils 10 μ g in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die PBF-Expression wurde im WB mit dem PBF-Antikörper detektiert. Der Aktin-Nachweis erfolgte durch Reinkubation des WB mit dem Aktin-Antikörper. Im EMSA wurden die Extrakte mit 250 pg radioaktiv markiertem P2TATA Oligonukleotid (Abb. 25A) inkubiert und über ein 4,5%iges PAGE aufgetrennt. Die Identität der Komplexe (mit Pfeilen markiert) wurde bereits nachgewiesen (BOECKLE *et al.*, 2002).

4.3 PBF interagiert mit Komponenten von Histondeacetylase (HDAC)-Komplexen

Das SAP30 Protein wurde im Hefe-Two-Hybrid System als weiterer Interaktionspartner von PBF identifiziert. SAP30 ist ein Bestandteil des humanen Histondeacetylase-Komplexes mSin3-HDAC (vgl. 1.9). Es vermittelt über die Interaktion mit zellulären TF die Rekrutierung des mSin3-Korepressor-Komplexes an die DNA, der über die Deacetylase-Aktivität der HDACs Promotoren reprimiert (HASSIG *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 2003; LAHERTY, *et al.*, 1998). Eine Interaktion von PBF und SAP30 könnte daraufhin weisen, dass die Repression vermittelt durch PBF über den mSin3-HDAC-Komplex induziert wird.

4.3.1 PBF bindet SAP30 *in vitro*

Die Interaktion von PBF mit SAP30 wurde zunächst in einer *in vitro* Interaktionsstudie bestätigt. Dafür wurde der ORF für SAP30 in einen Vektor kloniert, um SAP30 als GST-Fusionsprotein zu exprimieren und mit radioaktiv markiertem PBF zu inkubieren. Die Abbildung 34 belegt eine Interaktion von PBF mit GST-SAP30 *in vitro* (Spur 3).

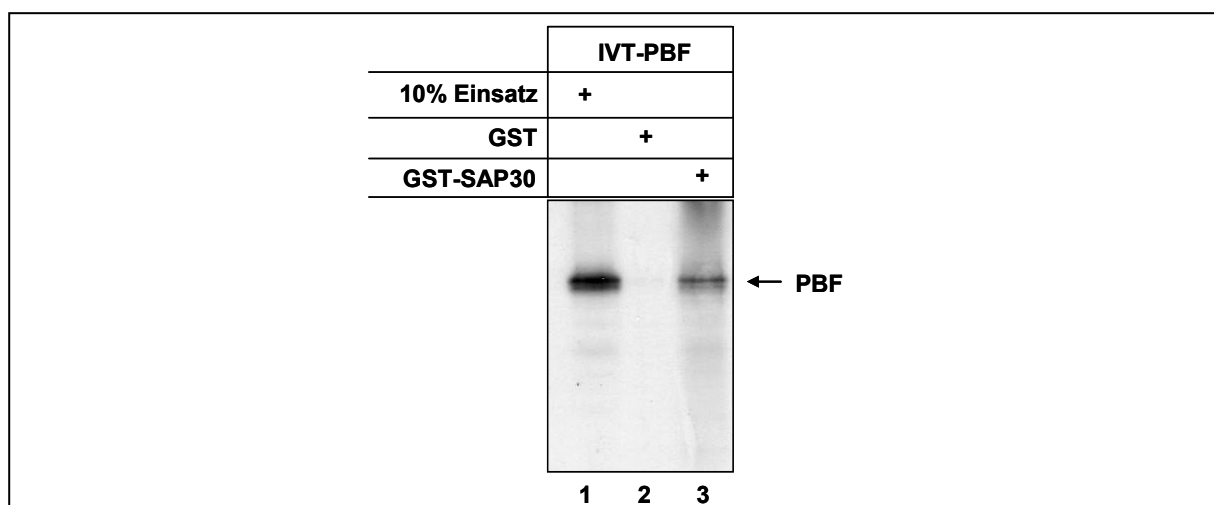


Abb. 32 PBF bindet SAP30 *in vitro*.

GST-Pulldown. Je 2 µg GST-SAP30 und GST alleine wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl *in vitro* translatierten und ³⁵S-markiertem PBF inkubiert und viermal mit 0,1 M LSDB gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen (Spuren 2 und 3). 10% des eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes (IVT-PBF) wurde in Spur 1 aufgetragen. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

4.3.2 PBF interagiert mit SAP30 *in vivo*

Weiterhin wurde untersucht, ob die Interaktion von PBF und SAP30 auch *in vivo* in humanen eukaryonten Zellen stattfindet. Für eine Koimmunpräzipitation wurde der ORF für SAP30 in einen eukaryonten Expressionsvektor kloniert, um SAP30 mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop zu exprimieren. Dieser wurde alleine oder zusammen mit einem Expressionsplasmid für FLAG-PBF in C33A Zellen transfiziert, deren Extrakte in einer

Koimmunpräzipitation eingesetzt wurden (Abb. 33). Wie in Spur 4 im oberen WB zu sehen ist, wurde SAP30 durch PBF kopräzipitiert. Extrakte aus Zellen, die entweder mit beiden Leervektoren oder nur mit einem der beiden Expressionsvektoren transfiziert wurden, lieferten kein Signal (Spuren 1 bis 3). Des Weiteren war im WB ein stärkeres PBF-spezifisches Signal vorhanden, wenn SAP30 koexprimiert wurde (unterer WB, Spur 4). Die Expression von SAP30 blieb durch Koexpression von PBF unbeeinflusst (mittlerer WB, Spur 4). Diese Ergebnisse liefern den Nachweis einer Interaktion von PBF und SAP30 *in vivo*.

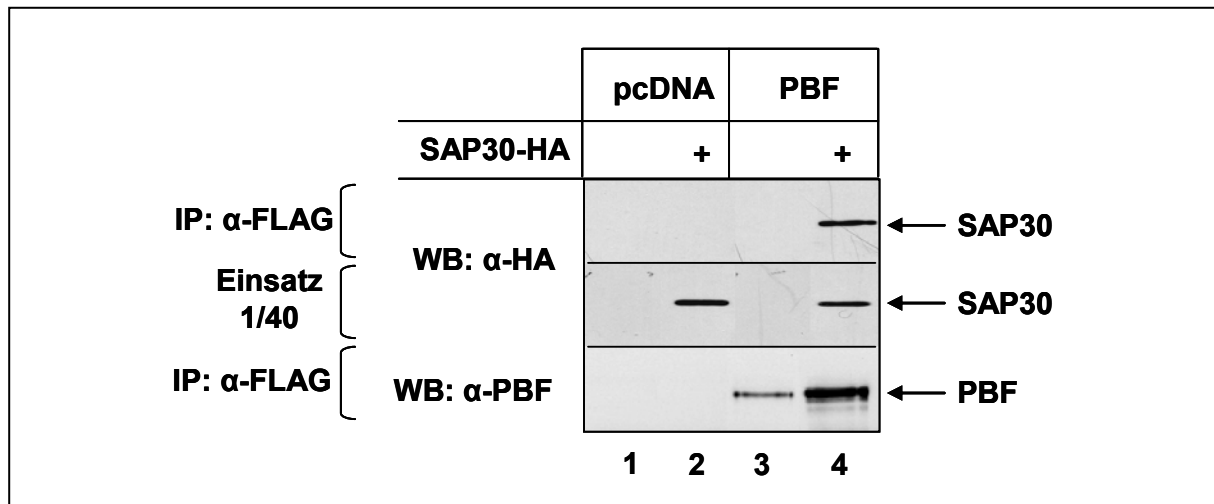


Abb. 33 PBF bindet SAP30 *in vivo*.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit je 15 μ g der Expressionsvektoren für FLAG-PBF (Spuren 3 und 4), pCMV-HA-SAP30 (Spuren 2, und 4) und entsprechenden Leervektoren transfiziert. 400 μ g der nach 48 h isolierten Zellextrakte wurden mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose für 2 h inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 0,2 M LSDB wurden die Proteine über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und im anschließenden WB mit Antikörpern gegen das HA-Epitop (oberer WB) bzw. nach Reinkubation mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop (unterer WB) detektiert. Der mittleren WB bei dem 1/40 des Einsatzes aufgetragen wurde, wurde mit dem HA-Antikörper inkubiert.

Um die SAP30-Bindedomäne in PBF einzugrenzen, wurden Koimmunpräzipitationen mit SAP30 und Deletionsmutanten von PBF durchgeführt (Abb. 34A). Hierfür wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in C33A Zellen kotransfiziert. In der Koimmunpräzipitation in Abbildung 34B, war nur PBF Δ 9 von Aminosäure (AS) 263-513 in der Lage, SAP30 zu präzipitieren (Spur 4), im Gegensatz zu PBF Δ 10 von AS 379-513 (Spur 6). Außer PBF Δ 6 von AS 114-188 (Spur 4) präzipitierten auch die Deletionsmutanten PBF Δ 5, Δ 4 und Δ 8 das SAP30-Protein (Abb. 34C). Da PBF Δ 6 schwächer exprimiert wurde (unterer WB, Spur 4), kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eine potentielle Interaktion vorliegt.

Durch diese Experimente konnte eine SAP30-Bindedomäne in PBF auf 49 AS von AS 263-312 eingegrenzt werden (eingezeichnet in (A)). Darüber hinaus könnte PBF N- oder C-terminal dieser 49 AS, innerhalb von PBF Δ 8 und PBF Δ 4, weitere SAP30-Bindestellen kodieren.

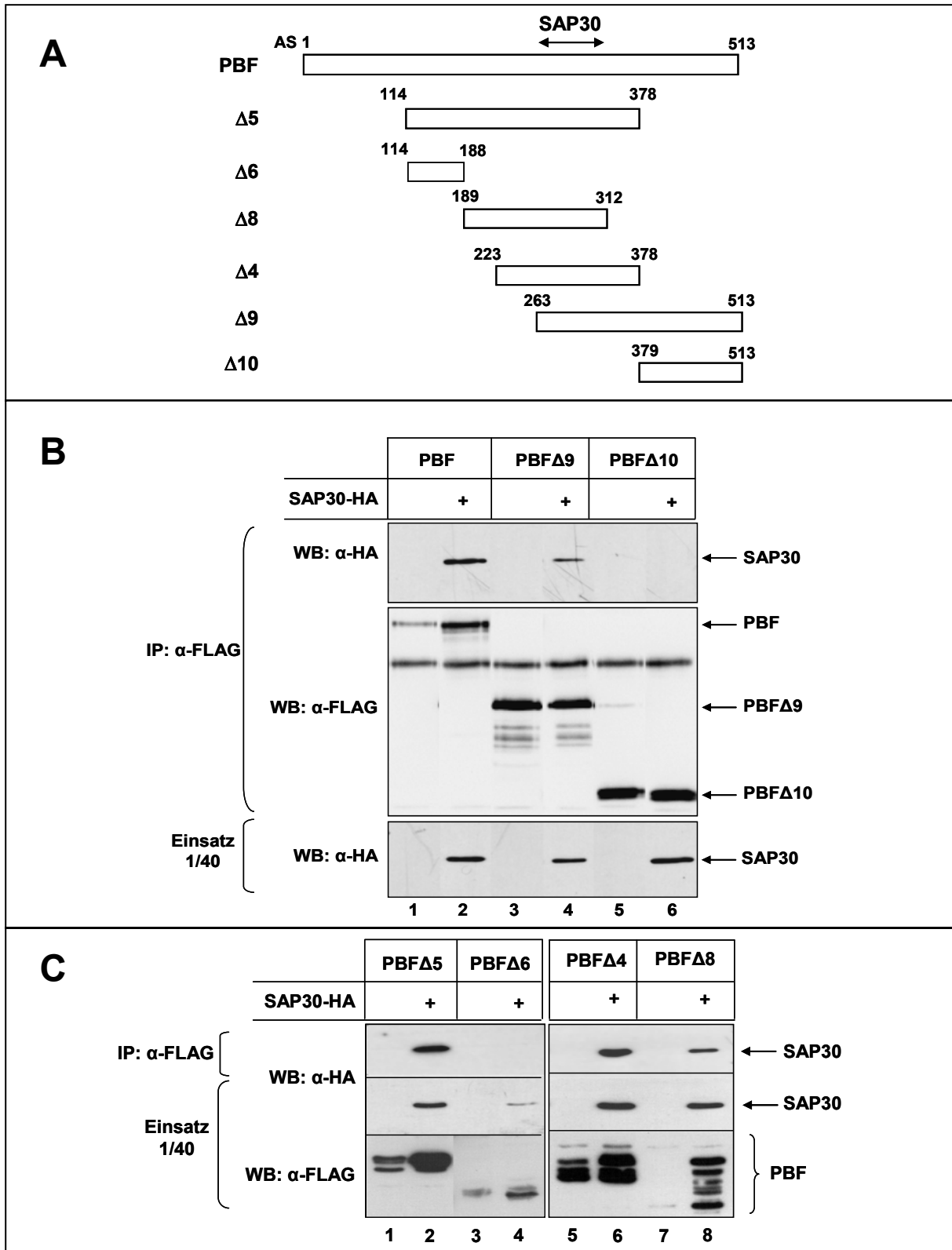


Abb. 34 SAP30-Bindedomäne in PBF befindet sich innerhalb der AS 263-312.

(A) Schematische Darstellung der PBF-Deletionsmutanten. (AS = Aminosäure). (B) Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit je 15 µg der Expressionsvektoren für FLAG-PBF, -PBFΔ9 und -PBFΔ10 (Spuren 1 bis 6), pCMV-HA-SAP30 (Spuren 2, 4, und 6) und entsprechenden Leervektoren transfiziert. 400 µg der Extrakte wurden mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose für 2 h inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 0,2 M LSDB wurden die präzipitierten Proteine über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und im anschließenden WB mit HA-, bzw. FLAG-Antikörper detektiert. Der Nachweis der SAP30-Expression erfolgte über einen HA-WB, bei dem 1/40 des Einsatzes aufgetrennt wurde. (C) Koimmunpräzipitation. Hier wurde das gleiche Experiment, wie unter (B) beschrieben, nur mit anderen Deletionsmutanten von PBF, durchgeführt. Die eingesetzten Deletionsmutanten sind in der Abbildung verzeichnet.

4.3.3 PBF und SAP30 binden HDAC1 *in vitro*

Die Bestätigung der PBF-SAP30 Interaktion unterstützt die Hypothese, dass PBF im Komplex mit SAP30 und HDAC1 vorliegt. Um dies zu untersuchen, wurde vorerst ein GST-Pulldown Experiment durchgeführt, bei dem HDAC1 als GST-Fusionsprotein exprimiert und mit *in vitro* translatiertem (IVT) und ³⁵S-markiertem SAP30, bzw. PBF inkubiert wurde. Die bereits gezeigte Interaktion von SAP30 und HDAC1 (ZHANG *et al.*, 1998) wurde hier bestätigt (Abb. 35, Spur 3). Weiterhin konnte eine Wechselwirkung von HDAC1 und PBF beobachtet werden (Spur 6). Beim Vergleich der Bandenintensitäten der Einsätze mit der nach Präzipitation, lässt sich eine stärkere Interaktion von HDAC1 und SAP30 verzeichnen. PBF wird verhältnismäßig schwach von HDAC1 gebunden.

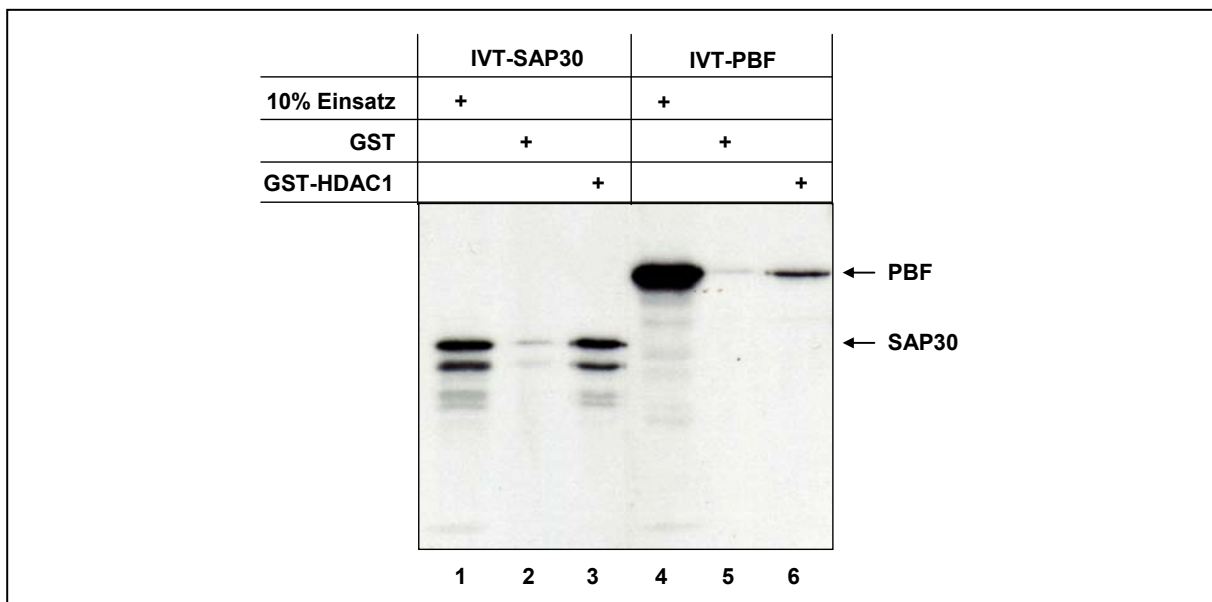


Abb. 35 GST-HDAC1 bindet SAP30 und PBF *in vitro*

GST-Pulldown. Je 2 µg GST-HDAC1 und GST alleine wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem und radioaktiv-markiertem SAP30, bzw. PBF inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 0,1 M LSDB wurden die Proteinkomplexe über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert (Spuren 2, 3, 5 und 6). 10% der für die Interaktionen eingesetzten *in vitro* Translationsprodukte (IVT-SAP30 und IVT-PBF) wurde in den Spuren 1 und 4 aufgetragen.

4.3.4 PBF, SAP30 und HDAC1 interagieren auch *in vivo*

Zum Nachweis der Interaktion zwischen PBF, SAP30 und HDAC1 *in vivo*, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Expressionsvektoren verwendet, welche jedes Protein mit einem anderen Epitop exprimieren, pcDNA3.1-FLAG-PBF, pCMV-HA-SAP30 und pCMV-Myc-HDAC1. Diese Expressionsvektoren wurden alleine oder in Kombination in C33A Zellen transfiziert. Die daraus hergestellten Extrakte wurden mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose inkubiert, um die an PBF gebundenen Proteine mit Antikörpern gegen das HA-, bzw. Myc-Epitop nachzuweisen (Abb. 36). Wie in den Spuren 5, 6 und 7 im IP-WB zu sehen ist, war PBF in der Lage, SAP30 und HDAC1 zu präzipitieren.

Die Präzipitation erfolgte sowohl wenn SAP30 und HDAC1 alleine mit PBF koexprimiert wurden (Spuren 5 und 6) als auch wenn beide Proteine gemeinsam vorlagen (Spur 7). PBF ist somit in der Lage beide Proteine zu binden.

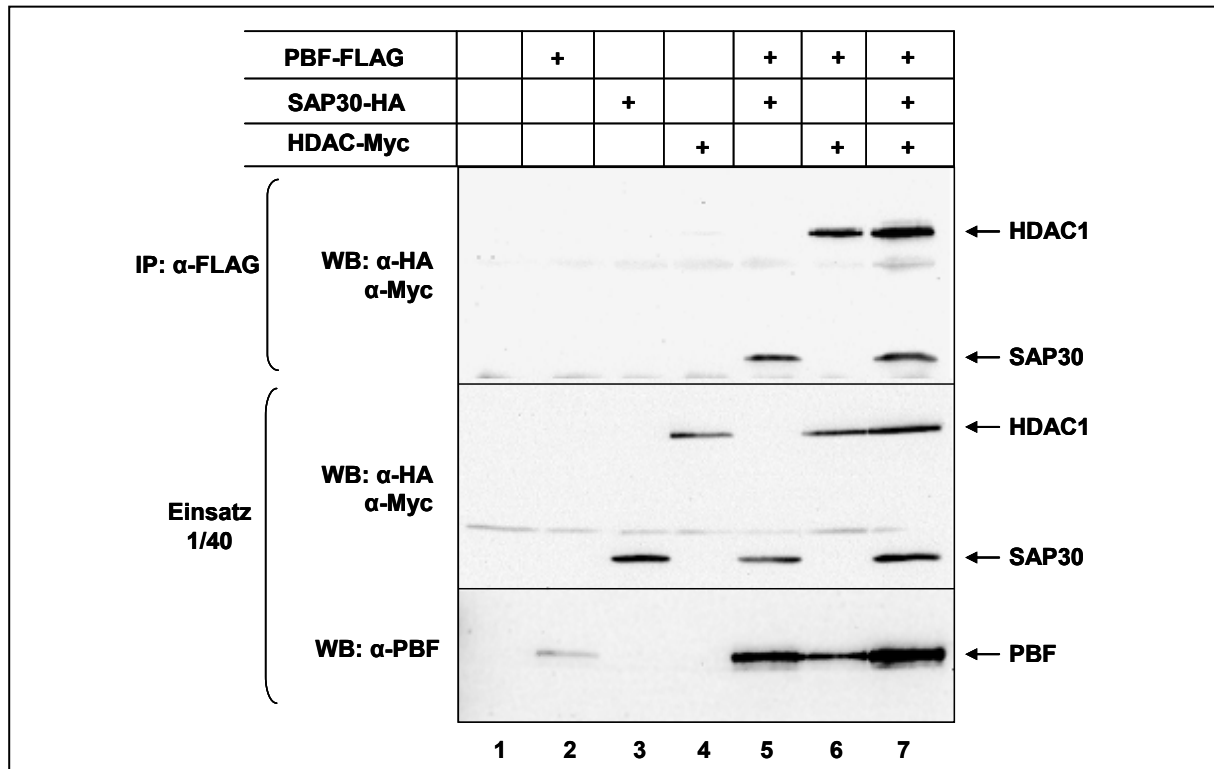


Abb. 36 PBF interagiert mit SAP30 und HDAC1 *in vivo*.

Koimmunpräzipitation. Je 10 µg der Expressionsvektoren für FLAG-PBF, HA-SAP30, Myc-HDAC1 und die entsprechenden Leervektoren wurden alleine und in Kombination in C33A Zellen transfiziert. Die daraus hergestellten Extrakte wurden über FLAG-Antikörper-gekoppelte Sepharose aufgereinigt. Die präzipitierten Proteine wurden über ein 10%iges SDS-PAGE aufgetrennt und im WB mit dem HA-, bzw. Myc-Antikörper detektiert (oberer WB). Die Expression der Proteine wurde in den beiden unteren WB nach Auftragen von 1/40 der Extrakte mit denen in der Abbildung angegebenen Antikörpern überprüft.

Die Assoziation von PBF, SAP30 und HDAC1 *in vivo* deutet auf einen Komplex dieser Proteine hin, worüber PBF seine Promotorrepression vermittelt. Zur weiteren Bestätigung der Wechselwirkung dieser drei Proteine *in vivo*, wurde eine Koimmunpräzipitation über Myc-HDAC1-Präzipitation durchgeführt (Abb. 37). Wie dem IP-WB zu entnehmen ist, konnte sowohl die Interaktion von HDAC1 und SAP30 (WB: α-HA, Spuren 5 und 7) als auch die Bindung von HDAC1 und PBF (WB: α-FLAG, Spuren 6 und 7) bestätigt werden.

Auffallend war, dass die Menge an PBF deutlich erhöht war, wenn HDAC1 oder SAP30 und HDAC1 koexprimiert wurden (Spuren 6 und 7, Einsatz-WB: α-FLAG). Ähnliches wurde bereits bei den Koimmunpräzipitationen in den Abbildung 33 und 36 bei Koexpression von SAP30 beobachtet.

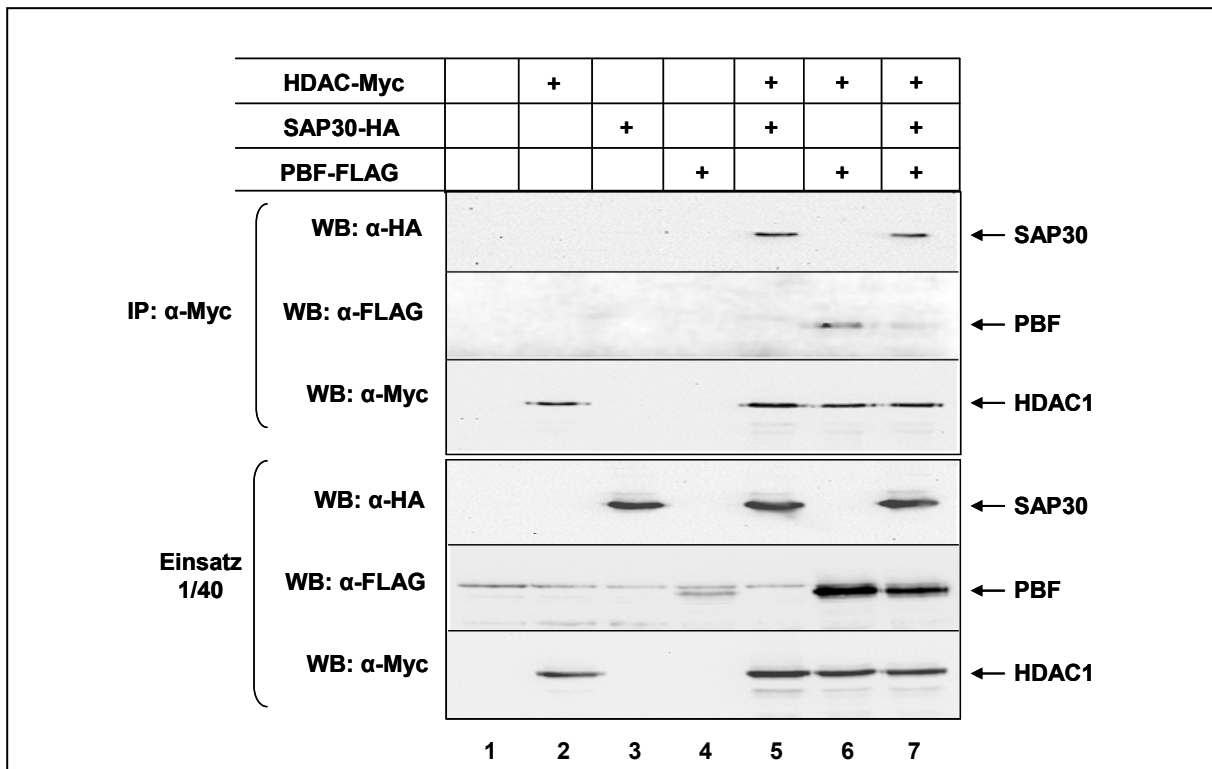


Abb. 37 HDAC1 bindet SAP30 und HDAC1 *in vivo*.

Koimmunpräzipitation. Je 10 μ g der Expressionsvektoren für FLAG-PBF, HA-SAP30, Myc-HDAC1 und die entsprechenden Leervektoren wurden alleine und in Kombination in C33A Zellen kotransfiziert. Die daraus extrahierten Extrakte wurden über Myc-Antikörper-gekoppelte Sepharose aufgereinigt. Die präzipitierten Proteine wurden über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt und im WB mit dem FLAG-, HA-, bzw. Myc-Antikörper detektiert (obere drei WBs). Die Expression der getaggen Proteine wurde mit den gleichen Antikörpern in den drei unteren WBs nach Auftragen von 1/40 des IP-Einsatzes nachgewiesen.

4.3.5 Histondeacetylasen sind an PBF-vermittelter Repression beteiligt

Wie im Kapitel 4.3.4 veranschaulicht wurde, interagiert PBF mit Komponenten von HDAC-Komplexen. Um zu untersuchen, ob PBF über diese Interaktionen seine Promotorrepression vermittelt, wurden transiente Transfektionsanalysen unter Trichostatin A (TSA), einem Histondeacetylase-Inhibitor, durchgeführt. TSA verhindert die Deacetylierung acetylierter Histone, sodass die Nukleosomenstruktur aufgelockert bleibt. Hierfür wurden RTS3b Zellen mit zwei Konzentrationen eines Expressionsplasmids für PBF und dem Reporterkonstrukt HPV8-NCR-Luc (Abb. 38A) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit TSA, bzw. DMSO inkubiert. Die PBF-vermittelte Repression konnte durch TSA vollständig aufgehoben werden (Abb. 38B). Die transkriptionale Aktivität von PBF wird demnach über die Interaktion mit HDAC-Komplexen reguliert.

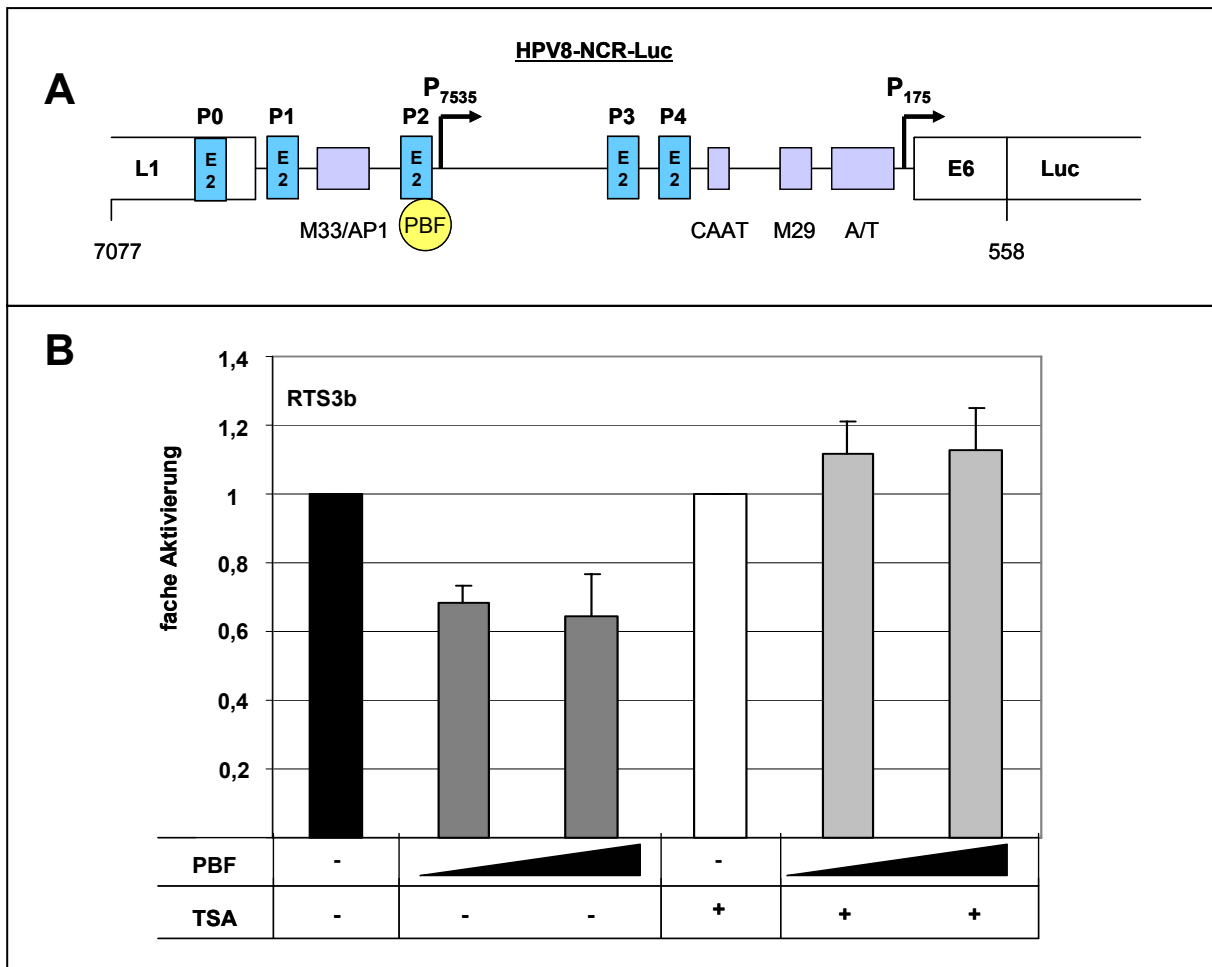


Abb. 38 Die Inhibition von HDACs verhindert eine PBF-vermittelte Repression.

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts HPV8-NCR-Luc. Angegeben sind die unter *Ev*-assoziierten HPV konservierten E2-Bindestellen (BS) P0-P4, inklusive der PBF-BS innerhalb der P2, die Sequenzmotive M33/AP1, CAAT, M29, die A/T-reiche Region, sowie der späte (P_{7535}) und der frühe (P_{175}) Promotor. (B) Transiente Transfektionsanalyse. In RTS3b Zellen wurden 200 ng des Reporterkonstrukts HPV8-NCR-Luc mit 10 und 20 ng des PBF-Expressionsvektors pcDNA3.1-FLAG-PBF kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen weitere 24 h mit 100 nM Trichostatin A (TSA) bzw. DMSO inkubiert. Die basale Luciferase-Aktivität wurde als 1 definiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.4 PBF ist ein Zielprotein des Ubiquitin-Proteasom-Pathways

Proteasome spielen in der Zelle eine wichtige Rolle bei der schnellen Elimination von regulatorischen Proteinen, wie Zellzyklus Proteinen (Cycline) oder Transkriptionsaktivatoren (I κ B-NF κ B-Komplex, c-Jun, p53) (COUX *et al.*, 1996). In den meisten Fällen werden die Zielproteine für die Proteolyse mit Ubiquitin-Molekülen markiert. Die Ligation von Ubiquitin erfolgt über eine Serie enzymatischer Prozesse. Nach mehreren Zyklen entstehen somit multimer Ubiquitin-Ketten. Diese multi-ubiquitinierten Proteine werden dann von der regulatorischen 19S Untereinheit des Proteasoms erkannt und in kurze Peptide degradiert (JENTSCH, 1992).

4.4.1 Die zelluläre PBF-Konzentration kann durch Proteasom-Inhibition erhöht werden

Durch Koexpression von SAP30, bzw. HDAC1 wurde PBF im WB verstärkt detektiert (Abb. 33, 36 und 37). Die Interaktion von PBF mit den beiden Proteinen scheint demnach das Protein, möglicherweise durch Maskierung einer Ubiquitinierungsstelle, zu stabilisieren. Um herauszufinden, ob die zelluläre PBF-Konzentration proteasomal reguliert wird, wurden die mit Expressionsvektoren für PBF transfizierten C33A Zellen unter dem Proteasom-Inhibitor MG132 kultiviert (Abb. 39). Die zelluläre PBF-Konzentration wurde durch Proteasom-Inhibition um ein Vielfaches erhöht. PBF kann somit als Zielprotein des Ubiquitin-Proteasom-Pathways charakterisiert werden. Ein Nachweis der Ubiquitinierung, sowie die Ermittlung ihrer Position innerhalb von PBF, stehen noch aus.

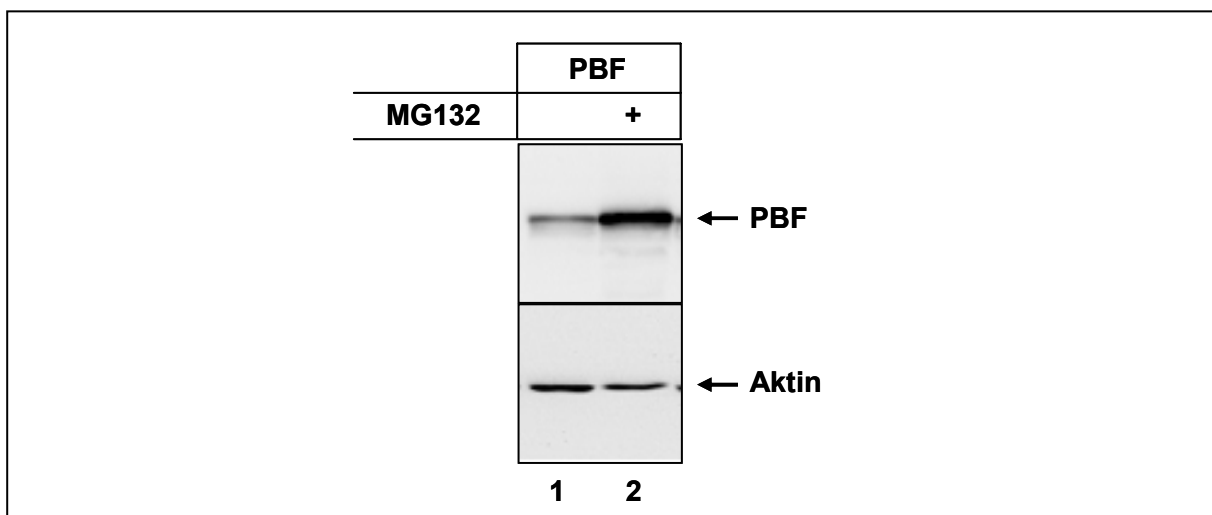


Abb. 39 Proteasom-Inhibition erhöht zelluläre PBF-Konzentration.

Expressionsnachweis. PBF-transfizierte C33A Zellen wurden 16 h vor Ernte in Medium mit 25 µM MG132 (Spur 2), bzw. mit DMSO (Spur 1) inkubiert. Nach Isolation der Zellextrakte wurden jeweils 10 µg über ein 10%iges SDS-PAG aufgetrennt. Im WB erfolgte die Detektion von PBF mit dem PBF-Antikörper. Aktin wurde nach Reinkubation des WB mit dem Aktin-Antikörper nachgewiesen.

4.5 PBF interagiert mit HPV-E6-Proteinen

PBF wurde ursprünglich als Faktor gefunden, der an P2 von HPV8 bindet. Die hier gezeigten Daten demonstrieren, dass PBF als Transkriptionsfaktor die HPV8-Genexpression reprimiert und des Weiteren die Zellproliferation inhibiert. Für einen erfolgreichen Lebenszyklus von HPV muss allerdings die frühe und späte Genexpression aktiviert und Zellproliferation induziert werden, um für die DNA-Replikation notwendige Faktoren zu produzieren.

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, ist HPV8 E6 in der Lage Zellen zu transformieren. Es stellte sich die Frage, ob eine Wechselwirkung zwischen 8E6 und PBF besteht, um spezielle Funktionen von PBF auszuschalten.

4.5.1 PBF bindet HPV8-E6 *in vitro*

Zunächst wurde untersucht, ob E6 in der Lage ist, PBF in einem GST-Pulldown zu binden. Die in Abbildung 40 dargestellten Ergebnisse liefern den Nachweis einer Interaktion von *in vitro* translatiertem PBF mit GST-8E6 (Spur 3).

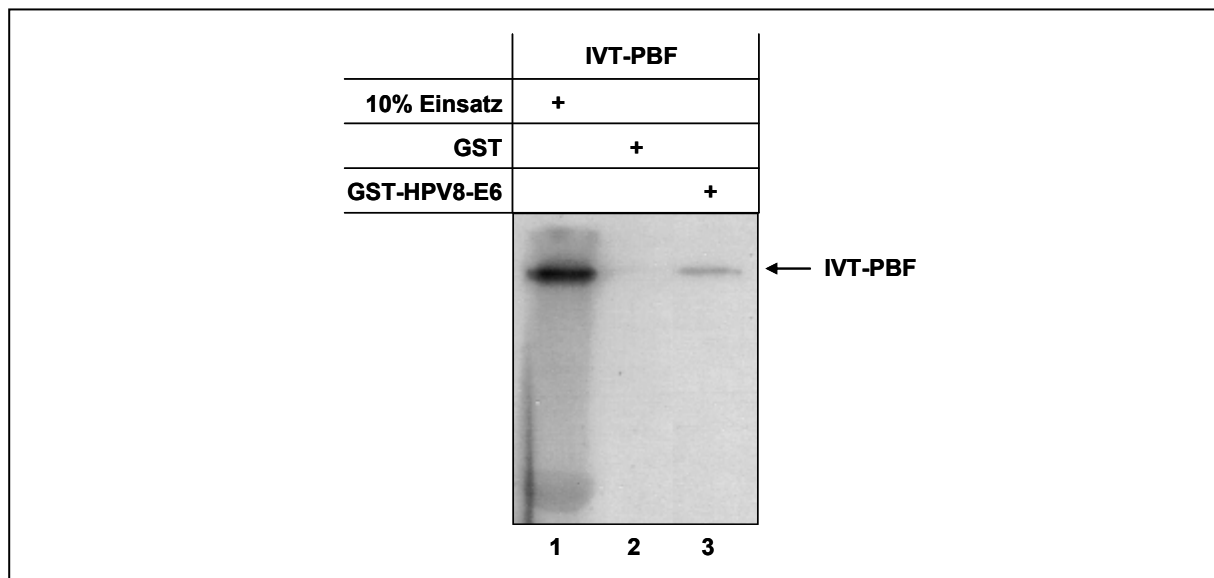


Abb. 40 GST-HPV8-E6 bindet PBF *in vitro*.

GST-Pulldown. 2 µg GST-HPV8-E6 sowie GST alleine wurden nach Aufreinigung über Glutathion-Sepharose mit jeweils 10 µl *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem PBF inkubiert und anschließend viermal mit 0,1 M LSDB gewaschen. Die Proteinkomplexe wurden über ein 15%iges SDS-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert (Spuren 2 und 3). 10% des für die Interaktionen eingesetzten *in vitro* Translationsproduktes (IVT-PBF) wurde in der Spur 1 aufgetragen.

4.5.2 PBF interagiert mit HPV8-E6 und HPV16-E6 *in vivo*.

Weiterhin wurde überprüft, ob PBF und 8E6 auch *in vivo* in humanen eukaryonten Zellen interagieren. Für eine Koimmunpräzipitation wurden die Expressionsvektoren für PBF, FLAG-getaggtetes 8E6 und die entsprechenden Leervektoren alleine und in Kombination in C33A Zellen transfiziert. Die Spur 4 in Abb. 41 zeigt die Präzipitation von PBF durch FLAG-8E6. Extrakte aus Zellen, die entweder nur mit den Leervektoren (Spur 1) oder mit einem der beiden Expressionsvektoren für PBF oder 8E6 transfiziert wurden (Spuren 2 und 3), lieferten kein Signal. Dieses Ergebnis bestätigt eine Wechselwirkung von PBF und 8E6 *in vivo*.

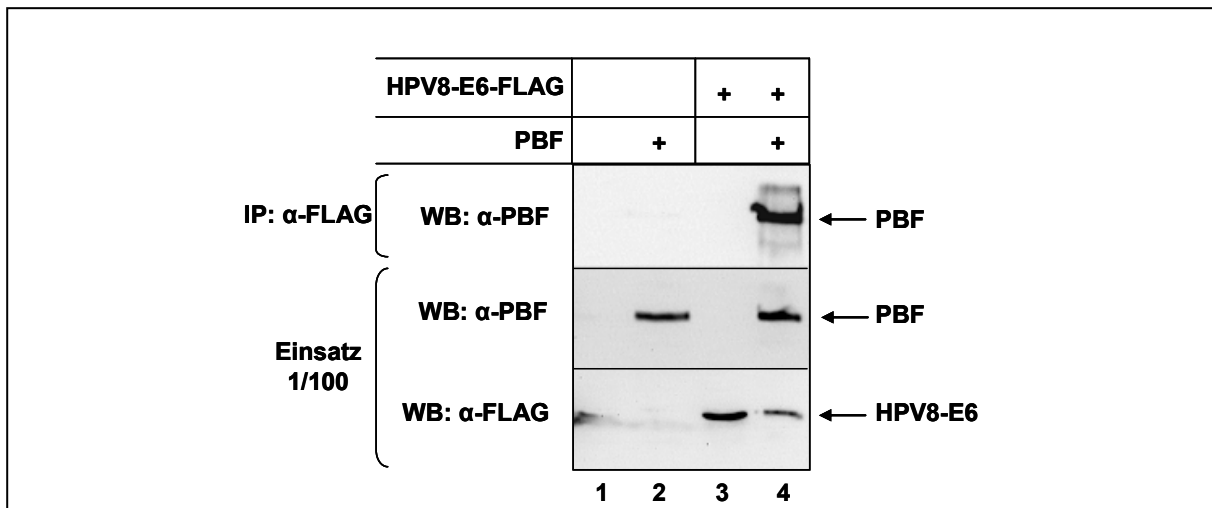


Abb. 41 HPV8-E6 interagiert mit PBF *in vivo*.

Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pXJ41-PBF (Spuren 2 und 4), pXJ41-FLAG-HPV8-E6 (Spuren 3 und 4) und dem entsprechenden Leervektor transient transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden 1 mg der Extrakte mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose für 2 h inkubiert. Nach vier Waschschriffen mit 0,1 M LSDB wurden die Proteine über ein 15%iges SDS-PAG aufgetrennt und im anschließenden WB mit dem PBF-Antikörper detektiert (oberer WB). Im mittleren WB, ebenfalls mit dem PBF-Antikörper inkubiert, wurde 1/100 des für die IP eingesetzten Extrakts aufgetragen. Der Nachweis der Expression von FLAG-8E6 erfolgte nach Reinkubation des WB mit dem FLAG-Antikörper (unterer WB).

Innerhalb der Familie der PV ist die Struktur der E6-Proteine konserviert, dennoch gibt es Unterschiede in ihren Aminosäuresequenzen, vor allem zwischen den E6-Proteinen der Haut- und Schleimhaut-assoziierten HPV (zusammengefasst in: SMOLA-HESS und PFISTER, 2002). Um festzustellen, ob die Interaktion von PBF und E6 auf den kutanen HPV-Typ 8 beschränkt ist, oder auch Wechselwirkungen mit E6-Proteinen anderer HPV-Typen stattfinden, wurde eine entsprechende Koimmunpräzipitation mit HPV16-E6 durchgeführt (Abb. 42).

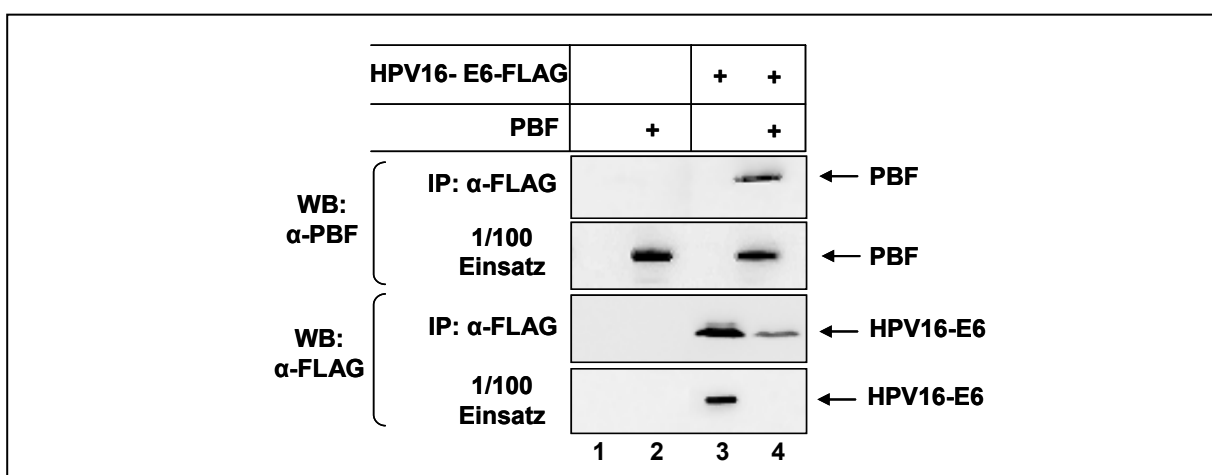


Abb. 42 HPV16-E6 präzipitiert PBF.

Koimmunpräzipitation. Nach Transfektion von C33A Zellen mit den Expressionsvektoren pXJ41-PBF (Spuren 2 und 4), pXJ41-FLAG-16E6 (Spuren 3 und 4) und dem entsprechenden Leervektor und nach Extraktion der Zellextrakte 48 h nach Transfektion, wurden 1 mg dieser Extrakte für 2 h mit FLAG-Antikörper-gekoppelter Sepharose inkubiert. Nach vier Waschschriffen mit 0,1 M LSDB wurden die Proteine über ein 15%iges SDS-PAG aufgetrennt und im anschließenden WB mit Antikörpern gegen PBF, (IP-WB: α-PBF) bzw. nach Reinkubation mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop (IP-WB: α-FLAG) detektiert. Das Vorliegen von PBF und FLAG-16E6 wurde in WB mit 1/100 des Einsatzes überprüft.

Auch hier konnte eine Interaktion mit PBF nachgewiesen werden (oberer WB, Spur 4). Die Koexpression von PBF resultierte in einer verringerten Expression von 16E6 (WB: α -FLAG, Spuren 3 und 4). Die Expression von PBF blieb hingegen unbeeinflusst (WB: α -PBF, Spuren 2 und 4). Eine Reproduktion dieses Experiments bestätigte dies (Daten nicht gezeigt). Aus zeitlichen Gründen konnte jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit die Interaktion von 16E6 mit PBF und ein möglicher Effekt von PBF auf die Menge von E6 nicht weiter untersucht werden.

4.5.3 HPV8-E6 interagiert mit PBF über seinen N- und C-Terminus

Das E6-Protein besitzt zwei potentielle Zinkfinger-Strukturen, die das Protein in zwei funktionelle Domänen unterteilen, den N-Terminus von AS 1-93 und den C-Terminus von AS 94-155 (Abb. 44A). Um die PBF-interagierende Domäne von 8E6 zu identifizieren, wurde die PBF-Bindungsfähigkeit dieser 8E6-Fragmente in einer Koimmunpräzipitation analysiert. Es wurde sowohl eine Präzipitation von PBF durch den N-, als auch durch den C-Terminus von 8E6 nachgewiesen (Abb. 44B, oberer WB). Demnach sind beide E6-Domänen an der Interaktion mit PBF beteiligt.

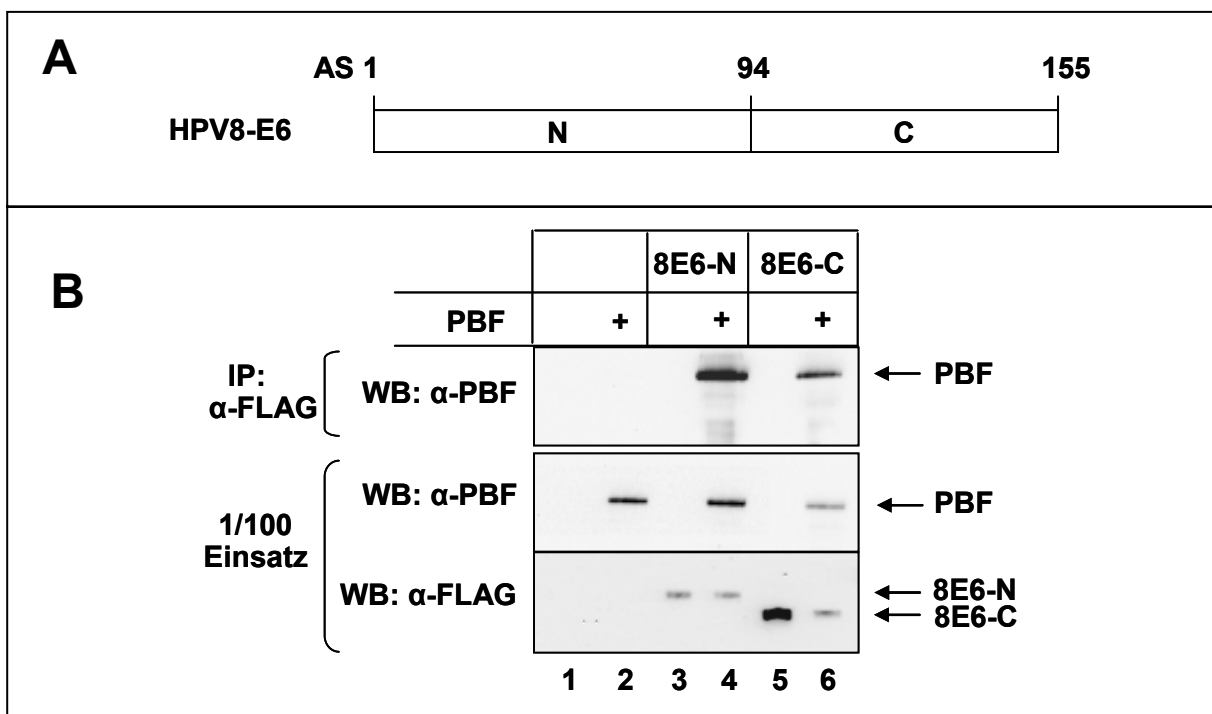


Abb. 43 HPV8-E6 bindet mit seinem N- und C-Terminus an PBF.

(A) Schematische Darstellung des HPV8-E6-Proteins. Eingezeichnet sind der N-Terminus (N) von Aminosäure (AS) 1-93 und der C-Terminus (C) von AS 94-155. (B) Koimmunpräzipitation. C33A Zellen wurden mit Expressionsvektoren für FLAG-8E6-N, -8E6-C und PBF kotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurde aus den transfizierten Zellen Ganzzellextrakte gewonnen, von denen 1 mg über FLAG-Antikörper-gekoppelte Sepharose aufgereinigt wurde. Nach vier Waschschritten mit 0,1 M LSDB wurden die gebundenen Proteine über ein 15%iges SDS-PAGE aufgetrennt. Im WB wurde präzipitiertes PBF über den PBF-Antikörper detektiert (oberer WB). Die Expression von FLAG-8E6-N, und -8E6-C (unterer WB), sowie die Expression von PBF (mittlerer WB) wurde mit 1/100 des Einsatzes nachgewiesen.

4.5.4 HPV8-E6 hebt die PBF-vermittelte Inhibition der Zellproliferation auf

In einem Wachstums-Assay wurde der Einfluss der Interaktion von PBF und 8E6 auf die PBF-vermittelte Wachstumsinhibition unter Koexpression von PBF und 8E6 ermittelt. Hierfür wurden RTS3b Zellen mit den Expressionsvektoren pcDNA-FLAG-PBF, pXJ41-FLAG-8E6 und entsprechenden Leervektoren transfiziert. Da nur der pcDNA-Vektor ein G418-Resistenzgen enthält, erfolgte die Selektion nur über PBF-positive, bzw. mit dessen Leervektor transfizierte Zellen. Die Selektion der transfizierten Zellen, sowie ihre Quantifizierung wurden wie in Kapitel 4.1.10 beschrieben durchgeführt. Die Zellzahlbestimmung in Abbildung 44 demonstriert, dass die PBF-induzierte Inhibition der Zellproliferation dosisabhängig von 8E6 aufgehoben wurde (Abb. 44). HPV8-E6 wirkt somit der PBF-vermittelten Wachstumsinhibition entgegen.

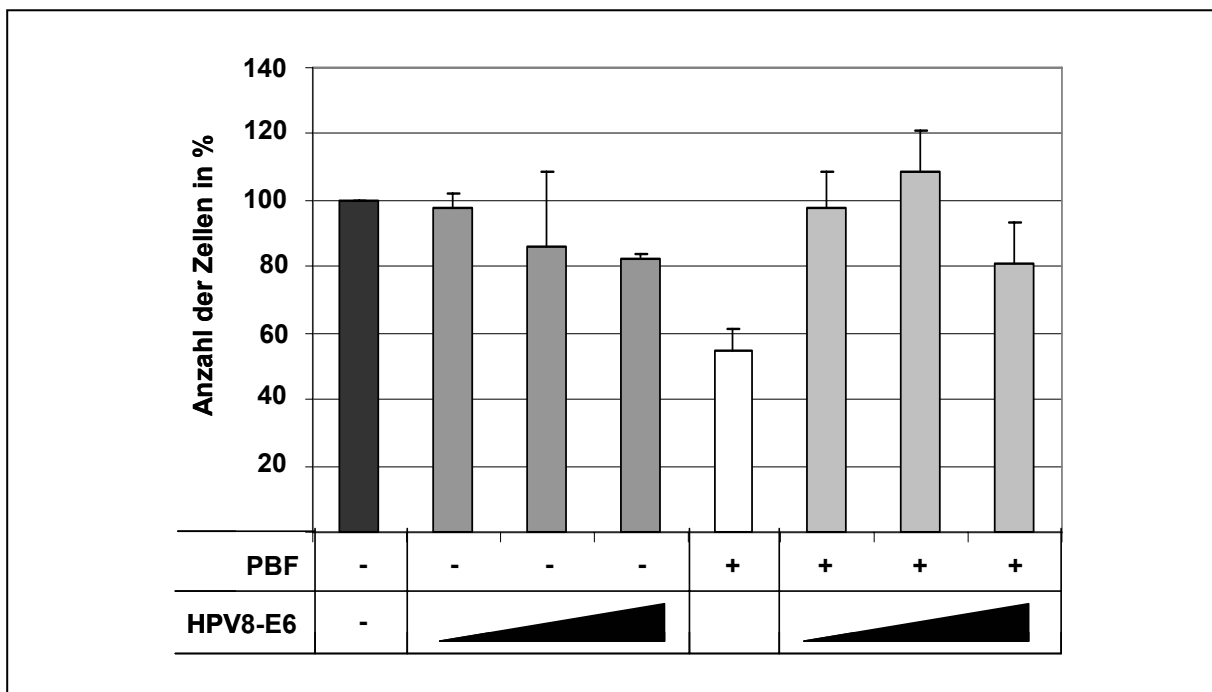


Abb. 44 PBF-induzierte Wachstumsinhibition wird durch HPV8-E6 aufgehoben.

Wachstums-Assay. RTS3b Zellen wurden mit 50 ng des Expressionsplasmids pcDNA3.1-FLAG-PBF und 5, 50 und 250 ng des Expressionsplasmids pXJ41-FLAG-8E6, ohne G418-Selektionsmarker, kotransfiziert. Die Konzentrationsunterschiede wurden mit dem entsprechenden Leervektor ausgeglichen. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen über einen Zeitraum von elf Tagen unter G418-haltigem Medium selektioniert und via FACS quantifiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

5 Diskussion

Um mehr über PBF zu lernen, wurde vor Beginn dieser Arbeit nach zellulären Faktoren gesucht, die an PBF binden. Die Charakterisierung dieser Wechselwirkungen sollten Hinweise auf Funktionen von PBF in der Zelle und im Lebenszyklus von HPV liefern. In Vorarbeiten wurde PBF als DNA-bindender Faktor identifiziert, der möglicherweise an der Regulation der PV-Genexpression beteiligt ist (BOECKLE *et al.*, 2002). Weitere Berichte untermauerten eine wichtige Rolle von PBF in der Zelle. In Krebsgeweben konnte eine Veränderung seiner subzellulären Lokalisation, sowie eine Hochregulation seiner Expression beobachtet werden (TSUKAHARA *et al.*, 2004), was impliziert, dass PBF als nukleocytoplasmatisches „shuttle“-Protein fungiert.

Die im Hefe-Two-Hybrid System identifizierte Interaktion von PBF mit 14-3-3 β wurde sowohl *in vitro* im GST-Pulldown Experiment, als auch *in vivo* in humanen eukaryonten Zellen durch Koimmunpräzipitationen bestätigt. Wie bei vielen anderen Interaktionspartnern, ist auch die Phosphorylierung von PBF eine Voraussetzung als Zielprotein von 14-3-3 zu fungieren. Die Beobachtung, dass die Interaktion im GST-Pulldown Experiment durch Phosphatase-Behandlung aufgehoben werden konnte, und bakteriell exprimiertes PBF nicht in der Lage war, *in vitro* translatiertes 14-3-3 zu präzipitieren (Daten nicht gezeigt), belegen dies. Nach Fraktionierung der Zellextrakte wurde die Assoziation von 14-3-3 mit PBF im GST-Pulldown Experiment vorwiegend im Cytoplasma detektiert. Dies wurde in der Immunfluoreszenzanalyse durch den Nachweis einer Kolo-kalisation beider Proteine in diesem Kompartiment bestätigt. Darüber hinaus konnte die Wechselwirkung von PBF und 14-3-3 nicht nur mit rekombinanten, sondern auch mit endogenen Proteinen gezeigt werden. Die hohen Expressionsspiegel von endogenem 14-3-3 begünstigten seine Präzipitation durch rekombinantes PBF. Endogenes PBF war nur nachweisbar, wenn Zellen transfiziert waren. Eine Präzipitation von endogenem 14-3-3 durch endogenes PBF war demnach nur erfolgreich, wenn Extrakte transfizierter Zellen eingesetzt wurden. Dies könnte bedeuten, dass die Expression von PBF nach DNA-Schäden, wie z.B. nach Transfektion oder auch Virusinfektion, induziert wird.

Durch Interaktionsanalysen mit Deletions- und Punktmutanten von PBF wurden zwei unabhängige 14-3-3-Bindemotive von AS 393-398 und von AS 446-453 identifiziert. Beide 14-3-3-Bindemotive konnten dem „mode I“-Motif (RSXpSXP) zugeordnet werden. Die Existenz von zwei oder mehreren 14-3-3 BS wurde auch bei einer Vielzahl weiterer zellulärer Zielproteine von 14-3-3, wie Bad, Raf-1 und Cbl, beobachtet (YAFFE *et al.*, 1997). Die Interaktion über zwei BS wird durch die dimere Struktur von 14-3-3 ermöglicht (OBSIL *et al.*,

2001). Die Untersuchungen der zwei 14-3-3-Bindemotive in PBF zeigten, dass beide mit unterschiedlichen Affinitäten die Interaktion mit 14-3-3 vermitteln. Die Mutation der Serine an den Positionen 394 und 396 (PBFmt4/5) induzierte eine Reduktion der Interaktion um 80%, wohingegen die Mutationen der Serine an den Positionen 447, 449 und 451 (PBFmt3) die Bindung nur schwach beeinflussten. Auch bei anderen 14-3-3-Interaktionspartnern konnten ein hoch- und ein niedrig-affines Bindemotiv identifiziert werden. Die hoch-affine BS dient der Rekrutierung des 14-3-3-Dimers. Nach Bindung eines 14-3-3 Monomers an die hoch-affine BS kann ein zweites Monomer über die niedrig-affine BS in den Komplex gebracht werden, wodurch dieser stabilisiert wird (Yaffe, 2002). Phosphopeptide mit zwei Motiven binden 14-3-3 mit bis zu 30-fach höherer Affinität als Phosphopeptide, die nur ein Bindemotiv aufweisen (YAFFE, 2002). Eine genauere Analyse der hoch-affinen 14-3-3 BS zeigte, dass sowohl das Serin an Position 396 (PBFmt4), als auch das Serin an Position 394 (PBFmt5) für die Ausbildung eines hoch-affinen 14-3-3 Bindemotivs notwendig sind (Daten nicht gezeigt). Für die Proteine p53 und Cdc25C wurden auch zusätzliche Phosphorylierungen an der Position -2 relativ zum Binde-Phosphoserin innerhalb der 14-3-3 BS detektiert. Im Gegensatz zu PBF, bei dem beide Phosphoserine für die Ausbildung einer hoch-affinen BS notwendig sind, wird bei p53 und Cdc25C durch die Phosphorylierung der Aminosäurereste an Position -2 die Interaktion mit 14-3-3 verhindert (BULAVIN *et al.*, 2003; WATERMAN *et al.*, 1998). Die Interaktionsstudien mit überexprimiertem 14-3-3 zeigten zusätzlich noch eine schwache Interaktion mit dem PBF-Fragment $\Delta 5$ von AS 114-378. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass PBF eine weitere niedrig-affine BS aufweist. In Koimmunpräzipitationen des endogenen 14-3-3 wurde diese Bindung jedoch nicht bestätigt, da die Mutationen der Serine an den Positionen 394 und 396 sowie der Serine an den Positionen 447, 449 und 451 (PBFmt3/4/5) die Interaktion mit endogenem 14-3-3 bereits vollständig aufheben konnten.

Immunfluoreszenzanalysen deuten darauf hin, dass die Bindung von 14-3-3 an PBF vermutlich eine Chaperon-Funktion übernimmt, wodurch sowohl die Struktur, als auch die Verteilung von PBF im Cytoplasma reguliert wird. Der Verlust der Interaktion von PBF mit 14-3-3 führte zu keiner auffälligen Veränderung in der subzellulären Lokalisation von PBF. Sowohl die Mutanten mit reduzierter 14-3-3-Bindung als auch die 14-3-3-bindungsdefekte PBF-Mutante lagen weiterhin vorwiegend im Cytoplasma vor. Nach Überexpression von EGFP-PBF-wt war die Bildung von stark fluoreszierenden Aggregaten (Cluster) im Cytoplasma beobachtbar. Bei Koexpression von 14-3-3 traten diese nicht auf. Die Mutationen der 14-3-3 BS in PBF resultierten wiederum in einer Zunahme der Cluster, welche auch nach 14-3-3-Koexpression nicht reduziert werden konnte. Die vermehrte Clusterbildung der PBF-Mutanten kann nicht auf unterschiedliche Expressionslevel zurückgeführt werden, da entsprechende WB eine vergleichbare Expression der Proteine

belegten. Die Bindung von 14-3-3 könnte zur Stabilisierung der PBF-Konformation beitragen. Möglicherweise kontrolliert 14-3-3 auch die Lokalisation von PBF innerhalb des Cytoplasmas. Für Bad wurde gezeigt, dass seine Phosphorylierung an Serin 136, welche die Assoziation mit 14-3-3 ermöglicht, eine Translokation von der mitochondrialen Membran ins Cytoplasma induziert, wodurch Apoptose verhindert wird (zusammengefasst in: FRANKE und CANTLEY, 1997).

Die hier gezeigten Daten belegen, dass die Akt Kinase an der Regulation der Interaktion zwischen PBF und 14-3-3 beteiligt ist. Die Akt Kinase wird über den PI3K-Signaltransduktionsweg aktiviert, welcher über Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) durch Wachstumsfaktoren induziert wird. Der Entzug von Wachstumsfaktoren, bzw. die Inhibition der PI3K durch die Inhibitoren Wortmannin oder LY294002 resultierten in einer Reduktion der Interaktion von PBF und 14-3-3. Die Beobachtung, dass die Assoziation von wt-PBF mit 14-3-3 nicht vollständig aufgehoben wurde, veranschaulicht die Stabilität des PBF-14-3-3-Komplexes vermittelt durch die Interaktion über zwei Bindestellen. Durch Serum Entzug, bzw. durch die PI3K-Inhibitoren wurde die Wechselwirkung von 14-3-3 und PBFmt4/5, mit intakter niedrig-affiner 14-3-3 BS von PBF, die mit einer Akt-Konsensussequenz überlappt, verhindert. Die Interaktion von 14-3-3 mit PBFmt3, mit Mutationen in dieser Akt-Konsensussequenz, wurde jedoch auch reduziert. Dies zeigt zum einen, dass beide 14-3-3-Motive bei der Bindung an 14-3-3 kooperieren. Zum anderen wird anscheinend auch die Interaktion über das hoch-affine Bindemotiv durch den PI3K-Signalweg reguliert, obwohl die umgebende Sequenz keine Ähnlichkeit zu einer Akt-Konsensussequenz aufweist. Die Regulation der Phosphorylierung der niedrig-affinen 14-3-3 BS durch die Akt Kinase wurde durch Koexpression einer konstitutiv aktiven Akt1 bestätigt. Die Wechselwirkung von 14-3-3 und PBFmt4/5 konnte durch Überexpression von Akt1 verstärkt werden, wohingegen die Interaktion mit PBFmt3 unbeeinflusst blieb. Diese Daten demonstrieren, dass die Phosphorylierung der hoch-affinen 14-3-3 BS unabhängig von der Akt Kinase reguliert wird, was auf die Beteiligung einer weiteren PI3K-abhängigen Kinase hindeutet. Die PI3K-abhängige Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK-1) aktiviert, neben den verschiedenen Isoformen der Akt Kinase, auch weitere Proteinkinasen der AGC-Familie, wie die p70 ribosomale S6 Kinase (S6K), die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase (SGK) und atypische Isoformen der Proteinkinase C (PKC) (BRAZIL und HEMMINGS, 2001; AVRUCH *et al.*, 2001; LANG *et al.*, 2001; NEWTON, 2003). Die Reduktion der Interaktion von PBFmt3 und 14-3-3 nach Inhibition der PI3K kann somit auf fehlende Aktivierung einer der o.g. Proteinkinasen zurückgeführt werden. Die Identifizierung dieser Kinase konnte jedoch aus zeitlichen Gründen noch nicht erfolgen.

Der Entzug von Wachstumsfaktoren, welcher in einer Reduktion der Wechselwirkung zwischen PBF und 14-3-3 resultierte, korreliert mit einem Anstieg der nukleären Lokalisation von PBF. Nach Serum Entzug wurde bei der 14-3-3-bindungsdefizienten Mutante PBFmt3/4/5 ein gesteigerter nukleärer Import (80%) im Vergleich zu wt-PBF (62%) beobachtet. Dies deutet auf eine Beteiligung von 14-3-3 bei der Aufrechterhaltung der cytoplasmatischen Lokalisation von PBF hin. Da PBFmt3/4/5 unter serumfreien Bedingungen nicht ausschließlich im Kern lokalisiert war, kontrollieren wohl weitere Komponenten die cytoplasmatische Lokalisation von PBF. Für den Forkhead Transkriptionsfaktor FKHR wurde gezeigt, dass sowohl der Import als auch der Export über Phosphorylierungen durch Wachstumsfaktor-abhängige Kinasen reguliert werden. Die Akt Kinase phosphoryliert FKHR an drei Positionen, dem Threonin an Position 24 und den Serinen an den Positionen 256 und 319. Die FKHR-Phosphorylierung des Threonins an Position 24 induziert die Interaktion mit 14-3-3, wodurch eine Translokation ins Cytoplasma sowie die Aufrechterhaltung der cytoplasmatischen Lokalisation induziert wird (BIGGS *et al.*, 1999; BRUNET *et al.*, 1999; RENA *et al.*, 2001). Der Export von FKHR wird des Weiteren über die Interaktion mit einem Ran-enthaltenden Protein-Komplex vermittelt. Die Serin-Phosphorylierung an Position 319 induziert die Wachstumsfaktoren-abhängige Phosphorylierung der Serine an den benachbarten Positionen 322, 325 und 329. Diese Multiphosphorylierung stimuliert die Assoziation mit dem Ran-enthaltenden Protein-Komplex, wodurch der nukleäre Export beschleunigt wird (RENA *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung des Serins an Position 256 inhibiert den nukleären Import durch Maskierung des Kernlokalisierungssignals (GUO *et al.*, 1999; BROWNAWELL *et al.*, 2001; RENA *et al.*, 2001). Auch bei PBF überlappt das Kernlokalisierungssignal 2 (NLS2) (TANAKA *et al.*, 2004) mit einer Akt-Konsensussequenz um Position 275. Eine Mutation des Phosphoserins dieser Akt-Phosphorylierungssequenz (PBFmt6) hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit 14-3-3. Auch wurde in Gegenwart von Wachstumsfaktoren wurde keine signifikante Auswirkung dieser Mutation auf die cytoplasmatische Lokalisation von PBF ermittelt. Allerdings können weniger ausgeprägte Verlagerungen von PBF vom Cytoplasma in den Kern mit der hier angewandten Methode, Zählen von Zellen mit überwiegend cytoplasmatischer, bzw. nukleärer Fluoreszenz, nicht erkannt werden. Die gezeigten Daten belegen dennoch, dass diese Phosphorylierung in der Nähe des NLS2 wohl eine Rolle bei der Regulation der Funktionen von PBF spielt, da PBFmt6, verglichen zu wt-PBF, eine verstärkte Wachstumshemmung induzierte. Die Phosphorylierung durch Akt maskiert möglicherweise das NLS2, wodurch der Import in den Zellkern in Korrelation mit der Inhibition des Zellwachstums unterbunden wird. Die Auswirkung der Mutation auf die subzelluläre Lokalisation von PBF unter Wachstumsfaktor Entzug wurde allerdings nicht untersucht. Die zusätzliche Mutation (mt6) in der 14-3-3-bindungsdefekten PBF-Mutante PBFmt3/4/5, führte zu einem Protein, das unter Entzug von

Wachstumsfaktoren die Zellen effizient tötete. Unter normalen Serum-Bedingungen war dieses Protein jedoch auch vorwiegend im Cytoplasma exprimiert. Der nukleäre Export von PBF wird demnach durch andere Motive in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren reguliert.

In einem Wachstums-Assay wurde eine PBF-vermittelte Inhibition der Zellproliferation ermittelt. Nach PBF-Überexpression sank die Anzahl der überlebenden Zellen auf 50%. Obwohl die niedrig-affine 14-3-3 BS, welche durch die Akt Kinase reguliert wird, nur schwach an der Interaktion mit 14-3-3 beteiligt ist, scheint sie dennoch von funktioneller Relevanz zu sein, da die entsprechende Mutation in PBF (PBFmt3) die Anzahl der überlebenden Zellen in gleichem Maße reduzierte (24%) , wie nach Mutation der hoch-affinen BS (PBFmt4/5) (21%). Der vollständige Verlust der Interaktion mit 14-3-3 resultierte in einer 5-fach gesteigerten PBF-vermittelten Wachstumsinhibition (12%). Diese Daten belegen, dass der Einfluss von PBF auf das Wachstumsverhalten der Zellen zum Teil über die Interaktion mit 14-3-3 reguliert wird. Obwohl eine gesteigerte Kernlokalisierung der 14-3-3-Bindungsmutanten von PBF mit der hier angewandten Methode nur unter serumfreien Bedingungen beobachtet werden konnte, da nach Serum Entzug anscheinend auch der nukleäre Export von PBF unterbunden wurde, schließt dies nicht aus, dass auch unter Einfluss von Wachstumsfaktoren die nukleäre Importrate von PBF nach Mutation der 14-3-3 BS erhöht ist. Demnach könnte die Effizienz der PBF-vermittelten Inhibition des Zellwachstums in Abhängigkeit seiner subzellulären Lokalisation reguliert werden. Es scheint, dass erhöhter nukleärer Import zu verstärkter Wachstumsinhibition führt, obwohl nicht untersucht wurde, ob auch PBFmt6 seine Lokalisation beeinflusst. Zukünftige Experimente sollen zeigen, ob dieser Effekt durch Induktion von Apoptose oder von Zellzyklus-Arrest verursacht wird.

Die hier demonstrierte wachstumsinhibitorische Funktion von PBF ist im Widerspruch zu der Beobachtung, dass PBF in humanen Krebsgeweben verstärkt exprimiert wird (TSUKAHARA *et al.*, 2004). Nach diesen Daten wird eher eine Funktion von PBF vermutet, die sich positiv auf das Proliferationsverhalten der Zellen auswirkt. Eine vergleichbare Beobachtung wurde für das, zur Familie der RBP1 Proteine gehörende, Brustkarzinom assoziierte Antigen BCAA gemacht. BCAA wurde zunächst transformierendes Potential zugeschrieben, da es in Brustkrebszellen als überexprimiertes Protein identifiziert wurde. In einem Wachstums-Assay induzierte überexprimiertes wt-BCAA hingegen einen inhibitorischen Effekt auf die zelluläre Proliferation. Eine Deletion in der AS-Sequenz im BCAA Protein, das in Brustkrebszellen überexprimiert wird, scheint für den Verlust der wachstumsinhibitorischen Aktivität verantwortlich zu sein (BINDA *et al.*, 2006). Es müsste demnach untersucht werden, ob das überexprimierte PBF Protein in den Krebsgeweben der wt-Form entspricht oder ob es ebenfalls Veränderungen in seiner Sequenz aufweist.

Die bisher in dieser Arbeit präsentierten Daten charakterisieren PBF als Zielprotein der Akt Kinase. Es scheint, dass die wachstumshemmende Funktion von PBF vorwiegend über seine subzelluläre Lokalisation reguliert wird und der Kontrolle einer aktiven Akt Kinase unterliegt. Die Phosphorylierung durch Akt ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der cytoplasmatischen Lokalisation von PBF beteiligt. Sie ermöglicht die Interaktion mit 14-3-3 im Cytoplasma und maskiert möglicherweise das NLS2.

Die wachstumshemmende Funktion von PBF könnte über Regulation der Expression von Zielgenen, die ein PBF-Bindemotiv in ihrer regulatorischen Region kodieren, erfolgen. Neben einer DNA-Bindung *in vitro* (BOECKLE *et al.*, 2002), konnte in dieser Arbeit auch eine Bindung von PBF an die P2 BS der NCR von HPV8 mittels ChIP-Assay *in vivo* gezeigt werden.

Die DNA-Bindung von PBF wird über zwei C-terminale CRAR-Regionen vermittelt. Eine Mutation dieser Motive im vollständigen PBF-Protein (PBFmtCR3) resultierte in Gelretardierungs-Experimenten in einem Verlust der DNA-Bindeaktivität von PBF. Die Mutation eines beider Motive reichte bereits für die Hemmung der DNA-Bindung aus. Demnach kooperieren beide CRAR-Regionen, um eine Bindung von PBF an DNA zu ermöglichen.

Die hier gezeigten Ergebnisse demonstrieren, dass PBF-vermittelte Repression in Abhängigkeit von der DNA-Bindung erfolgt, da die DNA-bindungsdefekte PBF-Mutante (PBFmtCR3) keinen Einfluss auf die Promotoraktivität zeigte. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass die PBF-vermittelte Inhibition des Zellwachstums über die Regulation der Expression Apoptose-, bzw. Zellzyklus-regulierender Gene induziert wird. Auch die Proteine der RBP1 Familie, RBP1 und BCAA, konnten als potente Inhibitoren der zellulären Proliferation identifiziert werden. Da beide Proteine in der Lage sind transkriptionelle Repression zu induzieren, wird angenommen, dass diese von funktioneller Bedeutung für die RBP1-, bzw. BCAA-vermittelte Regulation der zellulären Proliferation ist (BINDA *et al.*, 2006).

Die Bindung an 14-3-3 trägt zur Regulation der PBF-vermittelten Promotorrepression bei. Transiente Transfektionen mit der 14-3-3-bindungsdefekten PBF-Mutante (PBFmt3/4/5) zeigten im Vergleich zu wt-PBF eine gesteigerte Repression. Obwohl in den Fluoreszenzanalysen nur ein geringer Anstieg der Kernlokalisierung von PBFmt3/4/5 beobachtet wurde, kann die gesteigerte Repression nur darauf zurückgeführt werden, da die 14-3-3-Bindung selber in Gelretardierungs-Experimenten die DNA-Bindeaktivität von PBF

nicht beeinflusste. Die Verwendung des Gal4-Systems in transienten Transfektionsanalysen bestätigte, dass PBF größtenteils über spezifische DNA-Bindung Promotorrepression induziert. Nach Deletion der Gal4-BS innerhalb des Reporterkonstrukts verblieb jedoch eine schwache Reduktion der Promotoraktivität, was dafür spricht, dass PBF zu einem geringen Anteil auch unabhängig von der direkten DNA-Bindung Promotoraktivitäten negativ beeinflussen kann. Da PBF mit Mutationen innerhalb der CRAR-Regionen (PBFmtCR3) hingegen keine Promotorrepression mehr induzierte, könnten diese Aminosäuren nicht nur für die DNA-Bindung verantwortlich sein, sondern weitere regulatorische Eigenschaften aufweisen, die eine DNA-bindungsunabhängige Repression ermöglichen. Bei dem T-Zell-Faktor TCF4E wurde die CRAR-Region als Promotor-spezifische Aktivierungsdomäne identifiziert, welche die Interaktion mit dem transkriptionalen Koaktivator p300 vermittelt (HECHT *et al.*, 2003). Diese Region könnte im Fall von PBF ebenfalls an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein und so eine Rolle bei der PBF-vermittelten Modulation der Transkription haben. Da PBF auch mit p300 interagiert (Daten nicht gezeigt), ist nicht auszuschließen, dass PBF unter bestimmten Bedingungen und in speziellem Promotor Kontext auch als Aktivator der Transkription fungieren könnte (Boeckle, 2002).

Der Mechanismus, über den PBF seine Promotorrepression vermittelt, konnte über die Interaktion mit SAP30 identifiziert werden. SAP30 ist Bestandteil des mSin3-HDAC-Komplexes, welcher über seine Deacetylase-Aktivität Repression der Transkription induziert (ZHANG *et al.*, 1998, AYER, 1999). Die Rekrutierung dieses Korepressor-Komplexes an die DNA erfolgt über die Interaktion von SAP30 mit sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren (LAI *et al.*, 2001; LAHERTY *et al.*, 1998). In Koimmunpräzipitationen wurden die *in vitro* nachgewiesenen Interaktionen von PBF, SAP30 und HDAC1 bestätigt. PBF war in der Lage, sowohl SAP30 und HDAC1 alleine als auch beide Proteine gleichzeitig zu präzipitieren. Eine Präzipitation über HDAC1 zeigte das gleiche Ergebnis. Diese Daten geben allerdings keinen Hinweis darüber, ob die Interaktionen direkt oder indirekt über weitere im Komplex befindliche Proteine, wie z.B. mSin3, erfolgen. Für SAP30 und HDAC1 wurde bereits eine direkte Bindung nachgewiesen (ZHANG *et al.*, 1998). Die Beteiligung von HDACs bei der PBF-vermittelten Repression wurde in transienten Transfektionsanalysen bestätigt. Durch die Inhibition ihrer Deacetylase-Aktivitäten konnte die Promotorrepression durch PBF verhindert werden. Diese Ergebnisse implizieren, dass PBF die Expression von Zielgenen über Modulation der Chromatinstruktur reguliert.

Die zelluläre PBF-Konzentration wird zum Teil über proteasomalen Abbau reguliert. Proteasominhibition, bzw. Koexpression von PBF und seinen Interaktionspartnern SAP30 und HDAC1 resultierten in einer Zunahme von PBF in der Zelle. Diese Daten deuten darauf

hin, dass PBF durch die Interaktion mit Faktoren vor dem proteasomalen Abbau geschützt wird. Für das Tumor-Suppressor Protein p53 konnte eine Regulation der proteasomalen Degradation über Protein-Protein-Wechselwirkung gezeigt werden. Durch die Interaktion von p53 mit dem aktivierenden Transkriptionsfaktor 3 (ATF3), welcher unter genotoxischem Stress verstärkt exprimiert wird, wird die mdm2-vermittelte Degradation von p53 verhindert. ATF3 bindet an den C-Terminus von p53, wodurch die Ubiquitinierung und der nukleäre Export reduziert werden. Die Stabilisierung von p53 durch ATF3 resultiert in einer nukleären Akkumulation und einem Schutz vor Zelltransformation (YAN *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die wachstumshemmende Funktion von PBF möglicherweise über dessen subzelluläre Lokalisation reguliert wird. Wachstumsfaktor-abhängige Signalwege, teilweise kontrolliert über die Phosphorylierung durch die Akt Kinase und der daraus resultierenden Interaktion mit 14-3-3, sind daran beteiligt. Im Kern agiert PBF als Transkriptionsfaktor, der über Rekrutierung von HDAC-Komplexen Promotorrepression induziert. Die beschriebenen Aktivitäten von PBF wirken sich jedoch ungünstig auf die Vollendung des Lebenszyklus von PV aus. Die Funktionen von PBF sollten über virale Mechanismen blockiert werden, um die zelluläre Proliferation aufrecht zu erhalten. Da die E6-Proteine von HPV in der Lage sind Zellen zu transformieren, wurde ihre Wechselwirkung mit PBF untersucht. In Koimmunpräzipitationen konnte sowohl eine Interaktion von PBF mit HPV8-E6, als auch mit HPV16-E6 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Interaktion von PBF mit E6-Proteinen zwischen den verschiedenen HPV-Typen konserviert ist. 8E6 wirkte der PBF-vermittelten Inhibition des Zellwachstums entgegen. Diese Daten belegen, dass 8E6, möglicherweise über die direkte Interaktion, die Funktionen von PBF moduliert, sodass die Blockade der zellulären Proliferation überwunden wird. In transienten Transfektionen wurde hingegen kein Einfluss von 8E6 auf die PBF-induzierte Promotorrepression beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Inhibition der transkriptionalen Aktivität von PBF könnte über das E2-Protein reguliert werden, da E2 durch die Bindung an eine überlappende BS mit PBF um die DNA-Bindung kompetiert (BOECKLE *et al.*, 2002).

6 Literaturverzeichnis

- Aitken, A.** (2002). Functional specificity in 14-3-3 isoform interactions through dimer formation and phosphorylation. Chromosome location of mammalian isoforms and variants. *Plant Mol Biol* 50, 993-1010.
- Alland, L., David, G., Shen-Li, H., Potes, J., Muhle, R., Lee, H.C., Hou, H., Jr., Chen, K., and DePinho, R.A.** (2002). Identification of mammalian Sds3 as an integral component of the Sin3/histone deacetylase corepressor complex. *Mol Cell Biol* 22, 2743-2750.
- Apt, D., Chong, T., Liu, Y., and Bernard, H.U.** (1993). Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol* 67, 4455-4463.
- Atcha, F.A., Munguia, J.E., Li, T.W., Hovanes, K., and Waterman, M.L.** (2003). A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *J Biol Chem* 278, 16169-16175.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** (1992). *Short Protocols in Molecular Biology*. (New York: Greene and Wiley-Interscience).
- Avruch, J., Belham, C., Weng, Q., Hara, K., and Yonezawa, K.** (2001). The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Prog Mol Subcell Biol* 26, 115-154.
- Ayer, D.E.** (1999). Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol* 9, 193-198.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J.** (2003). Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* 11, 11-23.
- Bauknecht, T., Angel, P., Royer, H.D., and 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.
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti Panici, P., Mancuso, S., Neri, G., and Testa, J.R.** (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 64, 280-285.
- Bernard, H.U.** (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32 Suppl 1, S1-6.
- Biggs, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., and Arden, K.C.** (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7421-7426.
- Binda, O., Roy, J.S., and Branton, P.E.** (2006). RBP1 family proteins exhibit SUMOylation-dependent transcriptional repression and induce cell growth inhibition reminiscent of senescence. *Mol Cell Biol* 26, 1917-1931.
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 6, 1513-1523.

- Boeckle, S.** (2002). Untersuchung des zellulären Proteins PBF (Papillomavirus Binding Factor) und dessen Rolle bei der Regulation der Transkription von Papillomviren (Dissertation, Institut für Virologie, Universität zu Köln.).
- Boeckle, S., Pfister, H., and Steger, G.** (2002). A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2. *Virology* 293, 103-117.
- 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.
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M., and Loewenberg, J.R.** (1969). A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal Biochem* 31, 146-148.
- Brazil, D.P., and Hemmings, B.A.** (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26, 657-664.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z., and Hemmings, B.A.** (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29, 233-242.
- Brownawell, A.M., Kops, G.J., Macara, I.G., and Burgering, B.M.** (2001). Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol* 21, 3534-3546.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., and Yaffe, M.B.** (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* 156, 817-828.
- Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Demidenko, Z.N., Meek, S., Graves, P., Phillips, C., Zhao, H., Moody, S.A., Appella, E., Piwnica-Worms, H., and Fornace, A.J., Jr.** (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat Cell Biol* 5, 545-551.
- Burgering, B.M., and Coffey, P.J.** (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.
- Cantley, L.C. and Neel, B.G.** (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4240-4245.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Chaudhri, M., Scarabel, M., and Aitken, A.** (2003). Mammalian and yeast 14-3-3 isoforms form distinct patterns of dimers in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 679-685.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R.** (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3636-3641.

- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M., and Bernard, H.U.** (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* 65, 5933-5943.
- Chung, C.T., and Miller, R.H.** (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* 16, 3580.
- Clifford, G.M., Smith, J.S., Plummer, M., Munoz, N., and Franceschi, S.** (2003). Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 88, 63-73.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L.** (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E.** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S.** (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7, 725-737.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G.** (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Dell, G., Wilkinson, K.W., Tranter, R., Parish, J., Leo Brady, R., and Gaston, K.** (2003). Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol* 334, 979-991.
- Desaintes, C., and Demeret, C.** (1996). Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 7, 339-347.
- De Villiers, E.M.** (2001). Taxonomic classification of papillomaviruses. Review. *Papillomavirus Report* 12, 57-63.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., and Coffey, P.J.** (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* 10, 1201-1204.
- Doorbar, J.** (1998). Late stages of papillomavirus life cycle. In *Papillomavirus Report*, 9, pp. 119-126.
- Dostatni, N., Lambert, P.F., Sousa, R., Ham, J., Howley, P.M. and Yaniv, M.** (1991). The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 5, 1657-1671.
- Duensing, S., and Munger, K.** (2002). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 62, 7075-7082.
- Einstein, M.H., and Goldberg, G.L.** (2002). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest* 20, 1080-1085.
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S., and Iftner, T.** (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* 239, 132-149.

- Fleischer, T.C., Yun, U.J., and Ayer, D.E.** (2003). Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol Cell Biol* 23, 3456-3467.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., and Tsichlis, P.N.** (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
- Franke, T.F., and Cantley, L.C.** (1997). Apoptosis. A Bad kinase makes good. *Nature* 390, 116-117.
- Fuchs, P.G., and Pfister, H.** (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* 37, 159-167.
- Fuchs, P.G., Pfister, H.** (1996). Papillomaviruses in Epidermodysplasia verruciformis. In *Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses.*, C. Lacey, ed (Leeds: Leeds university press.), pp. 253-261.
- Fujii, T., Masumoto, N., Saito, M., Hirao, N., Niimi, S., Mukai, M., Ono, A., Hayashi, S., Kubushiro, K., Sakai, E., Tsukazaki, K., and Nozawa, S.** (2005). Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14, 103-108.
- Gao, Q., Kumar, A., Srinivasan, S., Singh, L., Mukai, H., Ono, Y., Wazer, D.E., and Band, V.** (2000). PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J Biol Chem* 275, 14824-14830.
- Garland, S.M.** (2002). Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology* 34, 213-224.
- Garrido-Guerrero, E., Carrillo, E., Guido, M., Zamorano, R., Garcia-Carranca, A., and Gariglio, P.** (1996). Different arrangement of human papillomavirus E2 binding sites distinguishes cutaneous types from those associated with mucosal lesions. *Arch Med Res* 27, 389-394.
- Giampieri, S., Garcia-Escudero, R., Green, J., and Storey, A.** (2004). Human papillomavirus type 77 E6 protein selectively inhibits p53-dependent transcription of proapoptotic genes following UV-B irradiation. *Oncogene* 23, 5864-5870.
- Glass, C.A. and Pollard, K.M.** (1990). Post-translational isoprenylation of human lamin B in the Reticulocyte Lysate In Vitro Translation System. *Promega Notes* 26, 6-10.
- Gonzalez, S.L., Stremlau, M., He, X., Basile, J.R., and Munger, K.** (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol* 75, 7583-7591.
- Grossman, S.R., Mora, R., and Laimins, L.A.** (1989). Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *J Virol* 63, 366-374.
- Guo, S., Rena, G., Cichy, S., He, X., Cohen, P., and Unterman, T.** (1999). Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 274, 17184-17192.

- Halbert, C.L., Demers, G.W., and Galloway, D.A.** (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 65, 473-478.
- Ham, J., Steger, G., and Yaniv, M.** (1994). Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *Embo J* 13, 147-157.
- Hassig, C.A., Fleischer, T.C., Billin, A.N., Schreiber, S.L., and Ayer, D.E.** (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 89, 341-347.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T.** (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J* 8, 3905-3910.
- Hecht, A., and Stemmler, M.P.** (2003). Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J Biol Chem* 278, 3776-3785.
- Hengstermann, A., Linares, L.K., Ciechanover, A., Whitaker, N.J., and Scheffner, M.** (2001). Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1218-1223.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., and Bradbury, E.M.** (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 268, 305-314.
- Horn, S., Pfister, H., and Fuchs, P.G.** (1993). Constitutive transcriptional activator of Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8. *Virology* 196, 674-681.
- Huang, N.E., Lin, C.H., Lin, Y.S., and Yu, W.C.** (2003). Modulation of YY1 activity by SAP30. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 267-275.
- Iftner, T., Bierfelder, S., Csapo, Z. and Pfister, H.** (1989). Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J Virol* 62, 3655-3661.
- Jablonska, S., and Majewski, S.** (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 186, 157-175.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., and Storey, A.** (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14, 3065-3073.
- Jackson, S., and Storey, A.** (2000). E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene* 19, 592-598.
- Jentsch, S.** (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 26, 179-207.
- Jeon, S., and Lambert, P.F.** (1995a). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1654-1658.

- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B.L., and Lambert, P.F.** (1995b). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69, 2989-2997.
- Jones, D.H., Ley, S., and Aitken, A.** (1995). Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins. *FEBS Lett* 368, 55-58.
- Jones, D.L., and Munger, K.** (1997). Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 71, 2905-2912.
- Jones, K.A., and Kadonaga, J.T.** (2000). Exploring the transcription-chromatin interface. *Genes Dev* 14, 1992-1996.
- Kabsch, W., and Sander, C.** (1984). On the use of sequence homologies to predict protein structure: identical pentapeptides can have completely different conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1075-1078.
- Kanaya, T., Kyo, S., and Laimins, L.A.** (1997). The 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region acts as an enhancer which augments viral early expression through the action of YY1. *Virology* 237, 159-169.
- Kandel, E.S., and Hay, N.** (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253, 210-229.
- Kim, S., Rimm, D., Carter, D., Khan, A., Parisot, N., Franco, M.A., Bale, A., and Haffty, B.G.** (2003). BRCA status, molecular markers, and clinical variables in early, conservatively managed breast cancer. *Breast J* 9, 167-174.
- Kingston, R.E., and Narlikar, G.J.** (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-2352.
- Kiyono, T., Hiraiwa, A., Ishii, S., Takahashi, T., and Ishibashi, M.** (1994). Inhibition of p53-mediated transactivation by E6 of type 1, but not type 5, 8, or 47, human papillomavirus of cutaneous origin. *J Virol* 68, 4656-4661.
- Klaes, R., Woerner, S.M., Ridder, R., Wentzensen, N., Duerst, M., Schneider, A., Lotz, B., Melsheimer, P., and von Knebel Doeberitz, M.** (1999). Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res* 59, 6132-6136.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K.** (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J* 18, 3090-3100.
- Kornberg, R.D., and Lorch, Y.** (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.
- Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D.** (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 22, 835-848.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Laherty, C.D., Billin, A.N., Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Ayer, D.E., and Eisenman, R.N.** (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell* 2, 33-42.
- Lai, A., Kennedy, B.K., Barbie, D.A., Bertos, N.R., Yang, X.J., Theberge, M.C., Tsai, S.C., Seto, E., Zhang, Y., Kuzmichev, A., Lane, W.S., Reinberg, D., Harlow, E., and Branton, P.E.** (2001). RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Mol Cell Biol* 21, 2918-2932.
- Lang, F., and Cohen, P.** (2001). Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE* 2001, RE17.
- Li, R., Knight, J.D., Jackson, S.P., Tjian, R., and Botchan, M.R.** (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic activation of transcription. *Cell* 65, 493-505.
- Li, J., Simpson, L., Takahashi, M., Miliareisis, C., Myers, M.P., Tonks, N., and Parsons, R.** (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene. *Cancer Res* 58, 5667-5672.
- Li, T.T., Zhao, L.N., Liu, Z.G., Han, Y., and Fan, D.M.** (2005). Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J Gastroenterol* 11, 931-937.
- Mackintosh, C.** (2004). Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* 381, 329-342.
- Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.E.** (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B.** (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.
- Müller, A., Ritzkowsky, A., and Steger, G.** (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J Virol* 76, 11042-11053.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A.** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.
- Munoz, N.** (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19, 1-5.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J., and George, D.L.** (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13, 2490-2501.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., and Shaw, A.S.** (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84, 889-897.
- Myers, M.P. and Tonks, N.K.** (1997). PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *Am J Hum Genet* 61, 1234-1238.

- Myers, G., Sverdrup, F., Baker, C., Mc Bride, A., Münger, K., Bernard, H.U.** (1997). Human Papillomaviruses. (Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.).
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A.** (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- Newton, A.C.** (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* 370, 361-371.
- Nishimura, A., Ono, T., Ishimoto, A., Dowhanick, J.J., Frizzell, M.A., Howley, P.M., and Sakai, H.** (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J Virol* 74, 3752-3760.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D.C., Ganguly, S., and Dyda, F.** (2001). Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105, 257-267.
- O'Connor, M., and Bernard, H.U.** (1995). Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* 207, 77-88.
- O'Connor, M.J., Tan, S.H., Tan, C.H., and Bernard, H.U.** (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J Virol* 70, 6529-6539.
- Offord, E.A., and Beard, P.** (1990). A member of the activator protein 1 family found in keratinocytes but not in fibroblasts required for transcription from a human papillomavirus type 18 promoter. *J Virol* 64, 4792-4798.
- Ohtani, K., DeGregori, J., and Nevins, J.R.** (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12146-12150.
- Patel, D., Huang, S.M., Baglia, L.A., and McCance, D.J.** (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *Embo J* 18, 5061-5072.
- Pfister, H.** (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin Cancer Biol* 3, 263-271.
- Phelps, W.C., Yee, C.L., Munger, K., and Howley, P.M.** (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53, 539-547.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Sansal, I., Bergeron, L., and Sellers, W.R.** (2002). A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2, 81-91.
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G., and Cohen, P.** (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* 274, 17179-17183.
- Rena, G., Prescott, A.R., Guo, S., Cohen, P., and Unterman, T.G.** (2001). Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J* 354, 605-612.

Rena, G., Woods, Y.L., Prescott, A.R., Peggie, M., Unterman, T.G., Williams, M.R., and Cohen, P. (2002). Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *Embo J* 21, 2263-2271.

Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., and Yaffe, M.B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* 4, 153-166.

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

Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G.J., Lam, E.W., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 22, 7842-7852.

Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17, 6419.

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

Sedman, S.A., Barbosa, M.S., Vass, W.C., Hubbert, N.L., Haas, J.A., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* 65, 4860-4866.

Shiio, Y., Rose, D.W., Aur, R., Donohoe, S., Aebersold, R., and Eisenman, R.N. (2006). Identification and characterization of SAP25, a novel component of the mSin3 corepressor complex. *Mol Cell Biol* 26, 1386-1397.

Skiadopoulos, M.H., and 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.

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

Somasundaram, K. (2000). Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci* 5, D424-437.

Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *J Immunol* 168, 5024-5031.

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

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

- Steger, G., Ham, J., Lefebvre, O., and Yaniv, M.** (1995). The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *Embo J* 14, 329-340.
- Steger, G., Ham, J., and Yaniv, M.** (1996). E2 proteins: modulators of papillomavirus transcription and replication. *Methods Enzymol* 274, 173-185.
- Stubenrauch, F., and Pfister, H.** (1994). Low-affinity E2-binding site mediates downmodulation of E2 transactivation of the human papillomavirus type 8 late promoter. *J Virol* 68, 6959-6966.
- Tanaka, K., Shouguchi-Miyata, J., Miyamoto, N., and Ikeda, J.E.** (2004). Novel nuclear shuttle proteins, HDBP1 and HDBP2, bind to neuronal cell-specific cis-regulatory element in the promoter for the human Huntington's disease gene. *J Biol Chem* 279, 7275-7286.
- Thierry, F.** (1993). Proteins involved in the control of HPV transcription. In *Papillomavirus Report*, pp. 27-32.
- Thomas, J.T., and Laimins, L.A.** (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol* 72, 1131-1137.
- Tsukahara, T., Nabeta, Y., Kawaguchi, S., Ikeda, H., Sato, Y., Shimosawa, K., Ida, K., Asanuma, H., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Hiraga, H., Nagoya, S., Wada, T., Yamashita, T., and Sato, N.** (2004). Identification of human autologous cytotoxic T-lymphocyte-defined osteosarcoma gene that encodes a transcriptional regulator, papillomavirus binding factor. *Cancer Res* 64, 5442-5448.
- Ushikai, M., Lace, M.J., Yamakawa, Y., Kono, M., Anson, J., Ishiji, T., Parkkinen, S., Wicker, N., Valentine, M.E., Davidson, I., and *et al.*** (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.
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., and van Heusden, G.P.** (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* 23, 936-946.
- van Noort, M., and Clevers, H.** (2002). TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol* 244, 1-8.
- Villiers de, E.M.** (2001). Taxonomic classification of papillomaviruses. In *Papillomavirus Rep.*, pp. 57-63.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and Munoz, N.** (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-19.
- Wanzel, M., Kleine-Kohlbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B., and Eilers, M.** (2005). Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol* 7, 30-41.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L., and Halazonetis, T.D.** (1998). ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 19, 175-178.
- Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M.** (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.

- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M.S., Whang, Y.E., and Sawyers, C.L.** (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15587-15591.
- Wu, K.L., Khan, S., Lakhe-Reddy, S., Jarad, G., Mukherjee, A., Obejero-Paz, C.A., Konieczkowski, M., Sedor, J.R., and Schelling, J.R.** (2004). The NHE1 Na⁺/H⁺ exchanger recruits ezrin/radixin/moesin proteins to regulate Akt-dependent cell survival. *J Biol Chem* 279, 26280-26286.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C.** (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.
- Yaffe, M.B.** (2002). How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 513, 53-57.
- Yan, C., Lu, D., Hai, T., and Boyd, D.D.** (2005). Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *Embo J* 24, 2425-2435.
- Yang, Q., Kong, Y., Rothermel, B., Garry, D.J., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S.** (2000). The winged-helix/forkhead protein myocyte nuclear factor beta (MNF-beta) forms a co-repressor complex with mammalian sin3B. *Biochem J* 345 Pt 2, 335-343.
- Yang, S.H., Vickers, E., Brehm, A., Kouzarides, T., and Sharrocks, A.D.** (2001). Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. *Mol Cell Biol* 21, 2802-2814.
- Yochum, G.S., and Ayer, D.E.** (2001). Pf1, a novel PHD zinc finger protein that links the TLE corepressor to the mSin3A-histone deacetylase complex. *Mol Cell Biol* 21, 4110-4118.
- Yoganathan, T.N., Costello, P., Chen, X., Jabali, M., Yan, J., Leung, D., Zhang, Z., Yee, A., Dedhar, S., and Sanghera, J.** (2000). Integrin-linked kinase (ILK): a "hot" therapeutic target. *Biochem Pharmacol* 60, 1115-1119.
- Yu, T., Ferber, M.J., Cheung, T.H., Chung, T.K., Wong, Y.F., and Smith, D.I.** (2005). The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 158, 27-34.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D.** (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89, 357-364.
- Zhang, Y., Sun, Z.W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M., and Reinberg, D.** (1998). SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell* 1, 1021-1031.
- Zheng, W.H., Kar, S., and Quirion, R.** (2000). Insulin-like growth factor-1-induced phosphorylation of the forkhead family transcription factor FKHL1 is mediated by Akt kinase in PC12 cells. *J Biol Chem* 275, 39152-39158.
- Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernard, H.U., and 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, 6209-6219.

zur Hausen, H. (1986). Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* 2, 489-491.

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

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ak	Antikörper
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	<i>Breast Carcinoma Associated Antigen</i>
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CMV	Cytomegalovirus
CR	konservierte Region
DA	Dalton
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i>
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β-aminoethyl Ether)
et al.	und andere
Ev	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FCS	Fötale Kälberserum
fl	full length
g	Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>

ggf.	gegebenenfalls
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBS	HEPES gepufferte PBS Lösung
HDAC	Histon-Deacetylase
HDM2	<i>human double minute 2</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSLB	<i>High Salt Lysis Buffer</i>
IKK	I- κ B phosphorylierende Kinase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> translatiert
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long Control Region</i>
LSDB	<i>Low Salt Dilution Buffer</i>
Luc	Luciferase
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mdm2	<i>mouse double minute 2</i>
MeOH	Methanol
mt	mutiert
NaF	Natruimfluotid
NAP	<i>Nucleosome Assembly Protein</i>
NCR	<i>Non Coding Region</i>
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotid
o.g.	oben genannt
Oct-1	<i>Organic cation transporter 1</i>
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ORF	<i>Open Reading frame</i>
PAG	Polyacrylamidgel
PBF	<i>Papillomavirus Binding Factor</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCI	Phenil/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PDZ	PSD-96, Dlg, Zo-1
PI	Proteaseinhibitoren
PKB	Proteinkinase B
PML	<i>promyelocytic leukaemia</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
pRB	Retinoblastom-Protein
PV	Papillomvirus
RBP1	<i>Retinoblastoma Binding Protein 1</i>
RLU	Relative Lumineszenz-Einheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSV	<i>Rous Sarkoma Virus</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin Kinase
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
s.	siehe
SAP30	Sin3-assoziiertes Polypeptid p30
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SGK	Serum- und Glucocorticoid-regulierende Kinase
Sp1	<i>Specific protein 1</i>
SV	Säulenvolumen
TBST	<i>Tris Buffered Saline</i> + Tween20
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(-hydroxymethyl-)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin 5-(und 6)-Isothiocyanat
Trx	Thioredoxin Protein
TSA	Trichostatin A
u.a.	unter anderen
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WM	Wortmannin
wt	Wildtyp
YY1	Ying Yang 1
z.B.	zum Beispiel

8 Zusammenfassung

Die Regulation der Papillomvirus (PV)-Genexpression erfolgt über die Bindung von viralen und zellulären Proteinen an verschiedene *cis*-regulatorische Elemente innerhalb der nicht-kodierenden Region (NCR). Das bisher unbekannt zelluläre Protein PBF (Papillomavirus Binding Faktor) wurde über die Bindung an die Repression vermittelnden E2-Bindestellen (BS) P2 des humanen PV Typ8 (HPV8) und BS1 des bovinen PV Typ1 identifiziert. Darüber hinaus bindet es auch an regulatorische Sequenzen innerhalb des Huntigton's Disease Gens. In Tumorgewebe wurde, im Vergleich zu normalen PBF-exprimierenden Geweben, eine gesteigerte Expression von PBF beobachtet. In Vorarbeiten konnten mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid Systems die Proteine 14-3-3 β und Sin3-assoziiertes Polypeptid p30 (SAP30) als Interaktionspartner von PBF charakterisiert werden. Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung der Wechselwirkungen von 14-3-3 β und SAP30 mit PBF zu untersuchen und dadurch mehr über seine Funktion in der Zelle sowie im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion zu erfahren.

Die Interaktionen von PBF mit 14-3-3 und SAP30 wurden sowohl *in vitro* in GST-Pulldown-Experimenten als auch *in vivo* durch Koimmunpräzipitationen bestätigt. Die Assoziation von PBF und 14-3-3, die auf das Cytoplasma begrenzt ist, erfolgt über eine hoch- und eine niedrig-affine BS. Die Bindung erfordert Phosphorylierungen der beiden BS, vermittelt durch die Akt Kinase und eine weitere PI3K-abhängige Kinase. Unter Serum Entzug wurde eine Translokation von PBF in den Zellkern beobachtet. Da eine 14-3-3-bindungsdefiziente PBF-Mutante effizienter in den Kern wanderte, trägt die Interaktion mit 14-3-3 zur Kontrolle der subzellulären Lokalisation von PBF bei. Zusätzlich spielen jedoch weitere Wachstumsfaktor-abhängige Regulationsmechanismen eine Rolle. Eine Überexpression von PBF resultierte in einer Inhibition des Zellwachstums, welche durch Reduktion bzw. Verlust der 14-3-3 Interaktion gesteigert wurde. In transienten Transfektionsanalysen wurde durch Überexpression von PBF eine Repression der Transkription beobachtet, die größtenteils von spezifischer DNA-Bindung abhängt und nach Verlust der 14-3-3-Bindung verstärkt war. Diese PBF-induzierte Promotorrepression wird vermutlich über die Interaktion mit SAP30 und der daraus resultierenden Assoziation mit dem mSin3-HDAC-Komplex vermittelt, da eine Inhibition von Deacetylase-Aktivitäten die Repression aufhob. Die DNA-Bindung von PBF, welche *in vivo* durch einen ChIP-Assay bestätigt wurde, erfolgt über zwei konservierte CRAR-Regionen. Diese Ergebnisse unterstützen das Modell, dass der nukleäre Import von PBF, teilweise reguliert über die Phosphorylierung durch die Akt Kinase und die Interaktion mit 14-3-3, eine Repression der Expression von Zellwachstum-regulierenden Zielgenen zur Folge hat und somit einen Wachstumsstopp induziert. In Koimmunpräzipitationen wurde weiterhin eine Interaktion von PBF mit E6-Proteinen von HPV nachgewiesen. HPV8-E6 hob die PBF-vermittelte Wachstumsinhibition auf. Im Rahmen einer HPV-Infektion könnte somit das Onkoprotein E6 der wachstumshemmenden Funktion von PBF entgegenwirken, um einen erfolgreichen HPV-Lebenszyklus zu ermöglichen.

9 Abstract

The papillomavirus (PV) gene expression is regulated by the binding of viral and cellular proteins to their *cis*-regulatory elements within the non-coding region (NCR). The so far unknown cellular protein PBF (Papillomavirus Binding Factor) was identified by the ability to bind to the repression mediating E2-binding sites (BS) of the human PV type 8 (HPV8) and the BS1 of the bovine PV type 1 and by the binding to regulatory sequences within the Huntington' Disease gene. Cancer tissues revealed higher expression levels of PBF in comparison to normal PBF expressing tissues. Previous work identified the proteins 14-3-3 β and Sin3-associated polypeptide p30 (SAP30) as interaction partners of PBF using the Yeast-Two-Hybrid system. The aim of this work was to study the relevance of the interactions of 14-3-3 β and SAP30 with PBF, respectively, with the aim to learn more about the function within the cell and in the course of the HPV infection.

The interactions of PBF with 14-3-3 and SAP30 were confirmed *in vitro* in GST-pulldown experiments as well as *in vivo* by coimmunoprecipitations, respectively. The association of PBF with 14-3-3 was restricted to the cytoplasm and mediated by a high- and a low-affinity BS. The binding requires phosphorylation of both BS by the Akt kinase and another PI3K dependent kinase. Serum starvation led to translocation of PBF to the nucleus. Since the 14-3-3-binding-deficient PBF mutant was shifted to the nucleus more efficiently, the interaction with 14-3-3 may contribute to the control of the subcellular localisation of PBF. However, in addition, other growth factor regulated pathways may be involved. Over-expression of PBF resulted in an inhibition of cell growth, which was increased by reduction or loss of 14-3-3 interaction. Transient transfection studies revealed that PBF repressed transcription, which was dependent on sequence-specific DNA-binding and enhanced after loss of 14-3-3 binding. The inhibition of deacetylase activities abolished promoter repression by PBF, indicating that the PBF-induced promoter repression seems to be mediated by the interaction with SAP30, which is associated with the mSin3-HDAC complex. The sequence-specific binding of PBF to DNA was confirmed *in vivo* by a ChIP assay, and required two conserved CRAR-regions. These results are in line with the model, that the nuclear import of PBF is partly regulated via the interaction with 14-3-3, which requires previous phosphorylation by the Akt kinase. Nuclear PBF possibly represses the expression of cell growth regulating genes and leading to a stop of cell growth. Moreover, an interaction of PBF with E6 proteins of HPV was detected. HPV-8E6 abrogated the PBF-mediated growth inhibition. Thus, the oncoprotein E6 may counteract the growth inhibitory function of PBF to support a successful HPV life cycle.

10 Danksagung

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Gertrud Steger für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchgeführt haben zu können. Ihre hervorragende Betreuung durch anregende Diskussionen und unterstützende Ratschläge haben ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister bedanke ich mich für die Betreuung meiner Promotion, die kritische und hilfreiche Diskussion meiner Arbeit und die ständige Unterstützung in allen Belangen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer und Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth für ihre Bereitschaft die vorliegende Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu vertreten.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meinen derzeitigen und ehemaligen Laborkollegen Andreas Müller-Schiffmann, Ulla Krüppel, Steffi Töpffer, Nadine Körfer, Manuela Rehtanz und Ulla Warthorst für die einzigartige Arbeitsatmosphäre bedanken. Ihre ständige Motivation und Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Belangen waren immer eine große Hilfe.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Bei meiner Familie, meinen Freunden und besonders bei Mathias möchte ich mich für die besondere moralische Unterstützung während meiner Promotionszeit, besonders während der Endphase meiner Arbeit, bedanken.

Ein Dankeschön auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung dieses Projekts.

11 Erklärung

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

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

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

Sichtig, N., Silling, S. und Steger, G. (2006)

Papillomavirus binding factor (PBF) – mediated repression of transcription and inhibition of cell growth is regulated by 14-3-3 β .

Köln, den 27.09.2006

Nadine Sichtig

12 Lebenslauf

Zur Person

Name	Nadine Sichtig
Anschrift	Domkapitelweg 5, 50259 Pulheim
Geburtsdatum	05.08.1976
Geburtsort	Frechen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

Aug. 1983 – Juli 1987	Pater-Delp-Grundschule, Köln-Widdersdorf
Aug. 1987 – Juli 1996	Liebfrauenschule, Köln
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Beruf

Okt. 1996 – Nov. 2002	Hochschulstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Studiengang: Diplom-Biologie Hauptfach: Genetik 1. Nebenfach: Entwicklungsbiologie 2. Nebenfach: Pharmakologie Abschluss: Diplom
Seit Dez. 2002	Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Experimentelle Arbeit im Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln, Arbeitsgruppe Dr. Gertrud Steger Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister
Seit Dez. 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln

Praktika

April 2000 – Juni 2000	Biologiepraktikum in der Pharma Product Development Toxikologie Abteilung Forschungstoxikologie der Firma Bayer, Wuppertal
August 2000	Praktikum im Fachbereich Biochemie am Deutschen Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf