

**Charakterisierung der Interaktion der E6-
Onkoproteine humaner Papillomviren mit der
Protein-Tyrosin-Phosphatase H1 (PTPH1)**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Stephanie Töpffer
aus Köln

2008

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister

Prof. Dr. Helmut W. Klein

Vorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth

Beisitzerin: Dr. Rolf Kaiser

Tag der Disputation: 26.11.2008

**Für meine Eltern, Björn
und die Menschen, die mich begleiten.**

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die Papillomviren	1
1.2	Der Vermehrungszyklus von HPV	2
1.3	Pathogenese	3
1.4	Kapsid- und Genomaufbau	5
1.5	Die viralen Onkoproteine E6 und E7	8
1.5.1	Das HPV E7-Onkoprotein	8
1.5.2	Die HPV E6-Onkoproteine	9
1.5.3	Das genitale HPV16 E6 Protein	9
1.5.4	Das kutane HPV8 E6-Protein	12
1.6	Die Protein-Tyrosin-Phosphatase H1 (PTPH1)	13
1.7	Ziele dieser Arbeit	14
2	Material	15
2.1	Bakterienstämme	15
2.2	Eukaryote Zellen	15
2.3	Nukleinsäuren	18
2.3.1	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	18
2.3.2	Prokaryote Expressionsvektoren	19
2.3.3	Eukaryote Expressionsvektoren	20
2.3.4	Retrovirale Expressionsvektoren	21
2.3.5	Rekombinante Plasmide	21
2.3.6	DNA-Längenstandards	26
2.3.7	Sonstige Nukleinsäuren	27
2.4	Proteine	27
2.4.1	Enzyme	27
2.4.2	Antiseren	27
2.4.3	Größenstandards	28
2.4.4	Phosphopeptide	29
2.4.5	Präzipitationsreagenzien	29
2.5	Protease Inhibitoren	29
2.6	Radioaktivität	29
2.7	Medien	30
2.7.1	Medien und Antibiotika für die Bakterienkultivierung	30
2.7.2	Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen	31
2.7.3	Antibiotika für die Zellkultur	32
2.8	Reagenzien	33
2.8.1	Puffer und Lösungen	33
2.8.2	Sonstige Chemikalien und Materialien	35
2.8.3	Reagenziensysteme (Kits)	36

3	Methoden	37
3.1	Bakterienkultur	37
3.1.1	Kulturen zur Plasmidisolierung	37
3.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	37
3.1.3	Transformation kompetenter Bakterien	38
3.1.4	Langzeitlagerung von Bakterien	38
3.2	Zellkulturen	38
3.2.1	Kultivierung eukaryoter RTS3b-, SiHa-, HaCat-, Hela, pT67, C127i, NIH3T3 und C33a-Zellen	38
3.2.2	Einfrieren und Lagerung von Zellen	38
3.2.3	Pervanadat-Behandlung von Zellen	39
3.2.4	Zellzahlbestimmung	39
3.2.5	Transfektion von Zellen	39
3.2.5.1	Transfektion mit „FuGENE“	40
3.2.5.2	Transfektion mit CaPO ₄	40
3.2.6	Ernte der transfizierten Zellen	41
3.2.6.1	Ernte durch physikalischen Zellaufschluss und Herstellung von Ganzzellextrakten	41
3.2.6.2	Ernte durch chemischen Zellaufschluss	41
3.2.7	Luciferase-Assay	41
3.2.8	Herstellung einer stabilen Zelllinien	42
3.2.8.1	pTER ⁺ siRNAmPTPH1-C127i	42
3.2.9	Retrovirale Infektion von Zellen	42
3.2.9.1	Beschreibung des RetroX-Systems	42
3.2.9.2	Herstellung von rekombinanten Retroviren	43
3.2.10	Herstellung von retroviral infizierten, stabilen Zelllinien	44
3.2.10.1	Retrovirale Infektion von RTS3b-Zellen mit pLXSN-E6-Konstrukten	44
3.2.10.2	Retrovirale Infektion von C127i-Zellen mit rekombinanten Retroviren für verschiedene 8E6 Protein	44
3.2.11	Wachstumsassay im reduzierten E-Medium	45
3.2.12	Soft-Agar-Assay	45
3.3	DNA-Methoden	46
3.3.1	DNA-Standardmethoden	46
3.3.2	Plasmidpräparation	46
3.3.3	DNA-Sequenzierung	46
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
3.3.5	<i>In vitro</i> Mutagenese	48
3.4	RNA-Methoden	48
3.4.1	RNA-Isolierung aus Zellen	48
3.4.2	One-Step-RT-PCR	49
3.4.3	siRNA-Design	50

3.4.3.1	Annealing der siRNAs -----	50
3.5	Proteinmethoden -----	51
3.5.1	Quantitative Proteinbestimmung -----	51
3.5.1.1	Bradford-Protein-Konzentrationsbestimmung -----	51
3.5.1.2	BCA-Assay -----	51
3.5.2	Aufreinigung prokaryoter GST-Fusionsproteine -----	51
3.5.3	Aufreinigung von eukaryonten GST-Fusionsproteinen -----	52
3.5.4	Western Blot -----	53
3.5.5	<i>In vitro</i> Translation -----	54
3.5.6	<i>in vitro</i> Degradationsassay -----	54
3.5.7	<i>in vivo</i> Degradationsassay -----	54
3.5.8	Protein-Protein Interaktionsanalysen -----	54
3.5.8.1	Interaktionen mit <i>in vitro</i> translatierten Proteinen (GST-Pull-Down-Assay) -----	54
3.5.8.2	Koimmunpräzipitationen -----	55
3.5.9	Substrat-Trapping-Assay -----	55
3.5.10	Phosphatase-Assay -----	56
4	Ergebnisse -----	58
4.1	PTPH1 interagiert mit dem PDZ-Bindemotiv von 16E6 <i>in vitro</i> -----	58
4.2	16E6 bindet auch <i>in vivo</i> an PTPH1 -----	60
4.3	Die PDZ-Domäne ist essentiell für die Interaktion von 16E6 und PTPH1 -----	61
4.4	GST-16E6-C bindet endogenes PTPH1 aus primären Keratinozyten -----	62
4.5	16E6 degradiert PTPH1 <i>in vitro</i> -----	63
4.6	16E6 degradiert PTPH1 auch <i>in vivo</i> , was mit der Bindung an PTPH1 und E6-AP korreliert -----	65
4.7	Der Proteasom-Inhibitor MG132 stabilisiert PTPH1 in Gegenwart von 16E6 -----	68
4.8	Das Exon 12 von PTPH1 hat keinen Einfluss auf die Degradation von PTPH1 durch 16E6 -----	69
4.9	Das Targeting von PTPH1 ist bei HPV 18E6 konserviert -----	71
4.10	Die endogenen Mengen von PTPH1 sind in HPV-positiven Zelllinien reduziert -----	72
4.11	Reduktion der intrazellulären E6-Menge korreliert mit einer Erhöhung der endogenen PTPH1-Konzentration in SiHa-Zellen -----	73
4.12	Herstellung einer stabilen C127i-Zelllinie mit PTPH1- <i>Knock-Down</i> -----	74
4.13	Die Reduktion der endogenen Menge an PTPH1 führt zur morphologischen Transformation der Mausfibroblasten-Zelllinie C127i -----	76
4.14	Die Reduktion der intrazellulären PTPH1-Konzentration in C127i-Zellen führt zum Wachstum im Soft-Agar -----	77
4.15	PTPH1 interagiert mit dem HPV 8E6 Protein <i>in vitro</i> -----	78
4.16	PTPH1 interagiert mit dem HPV 8E6 Protein <i>in vivo</i> -----	79
4.17	Die PDZ-Domäne von PTPH1 ist nicht essentiell für die Interaktion mit 8E6 -----	80

4.18 Die AS Valin an der Position 68 innerhalb der N-terminalen Domäne des HPV 8E6-Proteins moduliert die Interaktion mit PTPH1-----	81
4.19 8E6 degradiert PTPH1 weder <i>in vivo</i> noch <i>in vitro</i> -----	84
4.20 Phosphatase Assay -----	86
4.21 8E6V69P und 16E6 infizierte RTS3b-Zellen wachsen im reduzierten E-Medium -----	89
4.22 Substrat-Trapping-Assay-----	92
5 Diskussion -----	97
6 Literaturverzeichnis -----	106
7 Abkürzungsverzeichnis -----	120
8 Zusammenfassung-----	123
9 Abstract-----	124
10 Danksagung -----	125
11 Erklärung -----	126
12 Lebenslauf -----	127

1 EINLEITUNG

1.1 Die Papillomviren

Papillomviren (PV) sind DNA-Tumorviren und bilden die Familie der Papillomaviridae. Humane Papillomviren (HPV) infizieren die Basalzellen der Haut bzw. Schleimhaut, woraufhin es zu einer erhöhten Proliferation des Epithels kommt. In der Regel induzieren HPV primär benigne Tumore (Warzen, Papillome, Kondylome), die sich häufig, wahrscheinlich infolge einer zellvermittelten Immunreaktion, spontan zurückbilden. Manche HPV-Typen können jedoch nach einer Primärinfektion jahrelang persistieren. In diesen Fällen können sie zur malignen Progression der epithelialen Tumoren im Bereich des Anogenitaltraktes, des Respirationstraktes und der Haut beitragen. So belegen epidemiologische Studien, dass eine Infektion mit so genannten genitalen Hoch-Risiko-HPV-Typen, wie z.B. HPV16 und 18, mit dem Zervixkarzinom assoziiert ist, das weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau gehört (WALBOOMERS *et al.*, 1999; EINSTEIN UND GOLDBERG, 2002). Die Verbindung zwischen HPV und nicht melanozytärem Hautkrebs (NMSC) wurde erstmals bei Patienten mit der seltenen Erbkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis (Ev)* nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die kutanen HPV-Typen 5 und 8 mit den Plattenepithelkarzinomen (PEK) von *Ev*-Patienten assoziiert sind.

PV zeichnen sich durch eine hohe Diversität aus. Bisher wurden mehr als 100 HPV-Typen vollständig sequenziert (BERNARD, 2005). Des Weiteren existieren ca. 120 partielle DNA-Sequenzen (HOU *et al.*, 2002, ZUR HAUSEN 2000 und 2002), die wahrscheinlich neue Typen darstellen. Liegt die Nukleotidsequenzhomologie im Bereich des konservierten Hauptstrukturproteingens L1 unter 90% wird ein neuer PV-Typ definiert. Subtypen und Varianten eines HPV-Typs unterscheiden sich in der Regel in weniger als 5% ihrer L1-Sequenz. HPV können in fünf Genera unterteilt werden (Alpha, Beta, Gamma, Mu und Nu). Die zwei größten Gruppen sind die Alpha und Beta Papillomviren, die insgesamt 90% der bisher identifizierten PVs beinhalten. Alpha Papillomviren werden aufgrund ihres Tropismus als schleimhautinfizierende (muköse) Typen und die Beta Papillomviren als hautinfizierende (kutane) Typen bezeichnet.

1.2 Der Vermehrungszyklus von HPV

Der Vermehrungszyklus der HPV ist eng an die Keratinozytendifferenzierung gekoppelt. Die menschliche Haut wird von innen nach außen in die Subcutis (Unterhaut), Dermis (Lederhaut) und Epidermis (Oberhaut) unterteilt, wobei die Epidermis wiederum in das *Stratum Basale*, das *Stratum Spinosum*, das *Stratum Granulosum* und das *Stratum Corneum* aufgeteilt ist (Abb. 1).

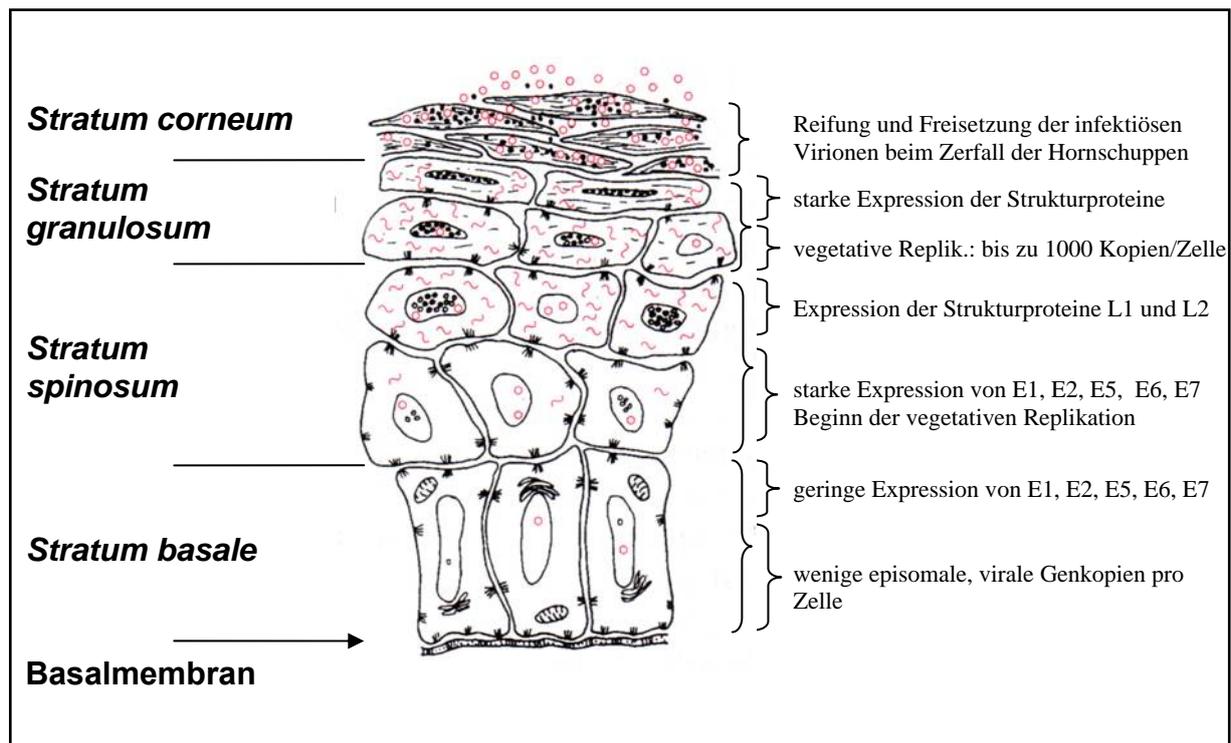


Abb. 1: Querschnitt der Epidermis und Lebenszyklus der PV

Der Querschnitt der Epidermis zeigt die einzelnen Schichten (linke Seite) und die Abhängigkeit der Virusreifung vom Differenzierungsgrad der Epithelzellen (rechte Seite). Die virale DNA ist kreisförmig die virale mRNA schlangenförmig dargestellt.

Die Virusvermehrung läuft vermutlich nach folgendem Schema ab: HPV gelangen über Mikrotraumata der Haut bzw. Schleimhaut zu den Zellen der Basalschicht der Epidermis und infizieren diese. Der erste Virus-Zell-Kontakt erfolgt entweder über den $\alpha 6\beta 4$ -Integrin-Rezeptor (EVANDER *et al.*, 1997) oder über die Bindung des L1-Kapsidproteins an das auf der Wirtszelle exponierte Heparin (JOYCE *et al.*, 1999; GIROGLOU *et al.*, 2001) und leitet die endosomale Internalisierung ein (SELINKA *et al.*, 2002). Das Virusgenom wird anschließend über einen noch unbekanntem Mechanismus in den Zellkern transportiert. Die Etablierung des Virus in den normalerweise ruhenden Keratinozyten wird durch die Wundheilung und die Aktivität der frühen, viralen Gene

unterstützt. Das Virus verbleibt in geringer Kopienzahl als Episom in den Basalzellen und es werden nur die frühen Gene (E, *early genes*) exprimiert. Während der Mitose der Basalzellen erfolgt, vermutlich über die Kopplung an die Chromosomen (SKIADOPOULOS UND MCBRIDE, 1998), die Verteilung der viralen DNA auf die Tochterzellen. Daraufhin löst sich die Tochterzelle von der Basalmembran und deren Differenzierung beginnt. Da die Virusreifung auf differenzierende Zellen beschränkt ist, erfolgt keine Schädigung der in der Basalschicht verbleibenden Keratinozyten durch die Virusprodukte. Auf diese Weise kann das Virus lange in den Basalzellen persistieren (STUBENRAUCH UND LAIMINS, 1999).

Im *Stratum spinosum* nimmt die Expression der regulatorischen, viralen Proteine zu und die vegetative Replikation der viralen DNA beginnt (Abb. 1). Hierfür sind neben den viralen Proteinen E1 und E2 zelluläre Replikationsfaktoren notwendig, die in den ruhenden, suprabasalen Zellen nicht mehr exprimiert werden. Die Expression des E7-Proteins führt zur Aufhebung des Zellzyklusblocks der in der G1-Phase arretierten Keratinozyten, welche daraufhin in die S-Phase eintreten (THOMAS *et al.*, 1998). Eine verstärkte Proliferation führt in normalem Gewebe zur vorzeitigen Apoptose, die p53 abhängig ist. Dieser frühzeitigen Apoptose wirkt das E6-Protein durch das Ausschalten von p53 entgegen. Dadurch werden geeignete Bedingungen für die Amplifikation der viralen Genome geschaffen. In den obersten Schichten des *Stratum spinosum* kommt es zur Induktion der Expression der Strukturproteine L1 und L2 (L, *late genes*), die im *Stratum granulosum* begleitet wird von der Reifung der Virionen. Der Zerfall der Schuppen des *Stratum corneum* ermöglicht schließlich die Freisetzung der infektiösen, reifen Viren.

1.3 Pathogenese

Durch die Expression der E6 und E7 Proteine in den differenzierenden Keratinozyten des *Stratum spinosum* und *granulosum* kommt es zu einer verzögerten Differenzierung und einer Hyperproliferation der infizierten Keratinozyten, was zu einer lokalen, vertikalen Ausdehnung des Gewebes führt, das sich im klinischen Bild der Warzen, Papillome und Kondylome äußert (CHOW UND BROKER, 1994; ZUR HAUSEN UND DE VILLIERS, 1994; HOWLEY UND LOWY, 2001). Viele HPV-Typen induzieren ein solches klinisches Bild. In der Regel sind diese Tumore benigne und weisen eine intakte, basale Epithelschicht auf. Eine persistierende Infektion mit einem genitalen

Hochrisiko-HPV-Typ ist jedoch der Hauptrisikofaktor zur Entstehung eines genitalen, malignen Tumors.

Die genitalen HPV-Typen werden aufgrund ihres unterschiedlichen, onkogenen Potentials in Niedrig-Risiko-Typen (*low-risk*) und Hoch-Risiko-Typen (*high-risk*) eingeteilt. So haben spitze Kondylome, die mit Niedrig-Risiko-Typen, wie HPV6 und 11 assoziiert sind, ein geringes Risiko, maligne zu entarten. Im Verlauf einer malignen Entartung bei persistierenden Hoch-Risiko-HPV-Infektionen kommt es bei Infektionen der *Zervix uteri* zum fortschreitenden Verlust der normalen Differenzierung, was zur Ausbildung zervikaler, intraepithelialer Neoplasien (CIN I-III) führt. Der Schweregrad der Neoplasien variiert von mild (CIN I) über moderat (CIN II) zu schwer (CIN III). In 10-30% der Fälle entwickelt sich daraus das invasive Zervixkarzinom. Da in fast 100% der Zervixkarzinome DNA der PV-Hoch-Risiko-Typen, wie HPV16 (46-68%) und 18 (10-14%), nachweisbar ist (MUNOZ, 2000; CLIFFORD *et al.*, 2003), stellt die Infektion mit PV eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung des Zervixkarzinoms dar. Seit Oktober 2006 können Mädchen zwischen 12-17 Jahren mit einem Impfstoff auf der Basis von „*Virus like particles*“ (VLP) geimpft werden. Diese DNA-freien, nicht infektiösen Viruskapside bestehen aus dem Hauptstrukturprotein L1 und werden gentechnisch in Hefe oder Insektenkulturen hergestellt (LOWY UND SCHILLER, 2006). In den Ländern der EU sind zwei Impfstoffe zugelassen, die L1 VLP von HPV16, 18, 6 und 11, bzw. nur VLP von HPV16 und 18 enthalten, die vor einer Infektion mit den vom Impfstoff abgedeckten HPV-Typen schützen.

Auch die Haut infizierenden HPV können in Hoch- und Niedrig-Risiko-Typen unterschieden werden (MYERS *et al.*, 1997). So weisen Hautwarzen, die durch HPV1, 2 und 3 verursacht werden, eine hohe Tendenz zur Selbstheilung auf und entarten selbst bei langer Persistenz praktisch nie. Anders verhalten sich Beta-HPV, die mit der seltenen, autosomal rezessiv vererbten Hauterkrankung *Epidermodysplasia verruciformis* assoziiert sind. *Ev* äußert sich in persistierenden, gutartigen Hautveränderungen, wie Warzen und makulösen Läsionen (JABLONSKA UND MAJEWSKI, 1994). Diese können in 30-60% der Fälle innerhalb eines Zeitraums von 10-30 Jahren, meist an Sonnenlicht exponierten Stellen, maligne entarten. Während eine große Vielzahl verschiedener *Ev*-assoziierter HPV-Typen in den gutartigen Läsionen vorzufinden sind, lassen sich in 90% der Plattenepithelkarzinome (PEK) HPV5 oder 8 nachweisen (FUCHS UND PFISTER, 1996), was auf ein erhöhtes, onkogenes Potential

dieser Viren hinweist. Die Rolle von HPV bei der Entstehung von NMSC ist, abgesehen von dem *Ev*-Syndrom, noch unklar. Jedoch wird DNA von *Ev*-HPV auch in NMSC der allgemeinen Bevölkerung gefunden und kann in einem hohen Maß in PEKs von immunsupprimierten Organtransplantatempfängern nachgewiesen werden, die aufgrund ihrer Immunsuppression ein 100x erhöhtes Risiko aufweisen, PEKs zu entwickeln (HARWOOD *et al.*, 2000; BERKHOUT *et al.*, 2000; PFISTER 2003).

1.4 Kapsid- und Genomaufbau

PV sind kleine, ikosaedrische, nicht umhüllte DNA-Viren, deren Durchmesser etwa 55nm beträgt. Sie besitzen ein aus 72 Kapsomeren zusammengesetztes Kapsid. Ihr 7000-8000bp großes Genom (PFISTER, 1984) besteht aus einer kovalent geschlossenen, zirkulären, doppelsträngigen DNA und liegt in einer nukleosomenähnlichen Struktur mit zellulären Histonen assoziiert vor (FAVRE *et al.*, 1977).

Das Genom lässt sich in zwei funktionelle Bereiche, die kodierende und die nicht kodierende Region (*non coding region* NCR bei *Ev*-HPV, bzw. *long control region* bei genitalen HPV), einteilen. Der kodierende Bereich umfasst mindestens sieben offene Leserahmen (ORF), deren Produkte entsprechend ihrer Expression im viralen Lebenszyklus benannt werden. Die so genannten frühen (E, *early*) Proteine sind an der Regulation, der Replikation, der Transkription und der Zelltransformation beteiligt. Die späten Gene (L, *late*) kodieren für die Strukturproteine L1 und L2, die das Kapsid bilden (Abb.2).

Die Transkription der polycistronischen mRNA erfolgt über mindestens zwei Promotoren (BAKER, 1993). Der frühe Promotor erzeugt Transkripte, die für E1, E2, E5, E6 und E7 kodieren, während der späte Promotor die Expression von L1 und L2, aber auch von E1, E2 und E4 steuert (STUBENRAUCH UND LAIMINS, 1999; STUBENRAUCH *et al.*, 1992). Die ORFs liegen alle auf dem gleichen DNA-Strang. Ihre Größe, Funktion und Anordnung ist trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Typen innerhalb der PV gut konserviert (PFISTER UND FUCHS, 1987), wie am Beispiel von HPV8 und 16 in Abbildung 2 gezeigt.

Die NCR/LCR beinhaltet essentielle „cis“-regulatorischen Kontrollelemente zur Steuerung der viralen Genexpression und Replikation, wie Replikationsursprung, Promotoren und einen Keratinozyten-spezifischen Enhancer. Die NCR/LCR liegt

zwischen dem L1- und E6-Leserahmen und zeigt eine große Ähnlichkeit bei eng verwandten PV und größere Unterschiede zu Vertretern anderer Genera. So ist die NCR von *Ev*-assoziierten HPV mit ca. 400bp nur etwa halb so groß wie die LCR von mukösen Typen (FUCHS *et al.*, 1986; KRUBKE *et al.*, 1987; FUCHS *et al.*, 1993).

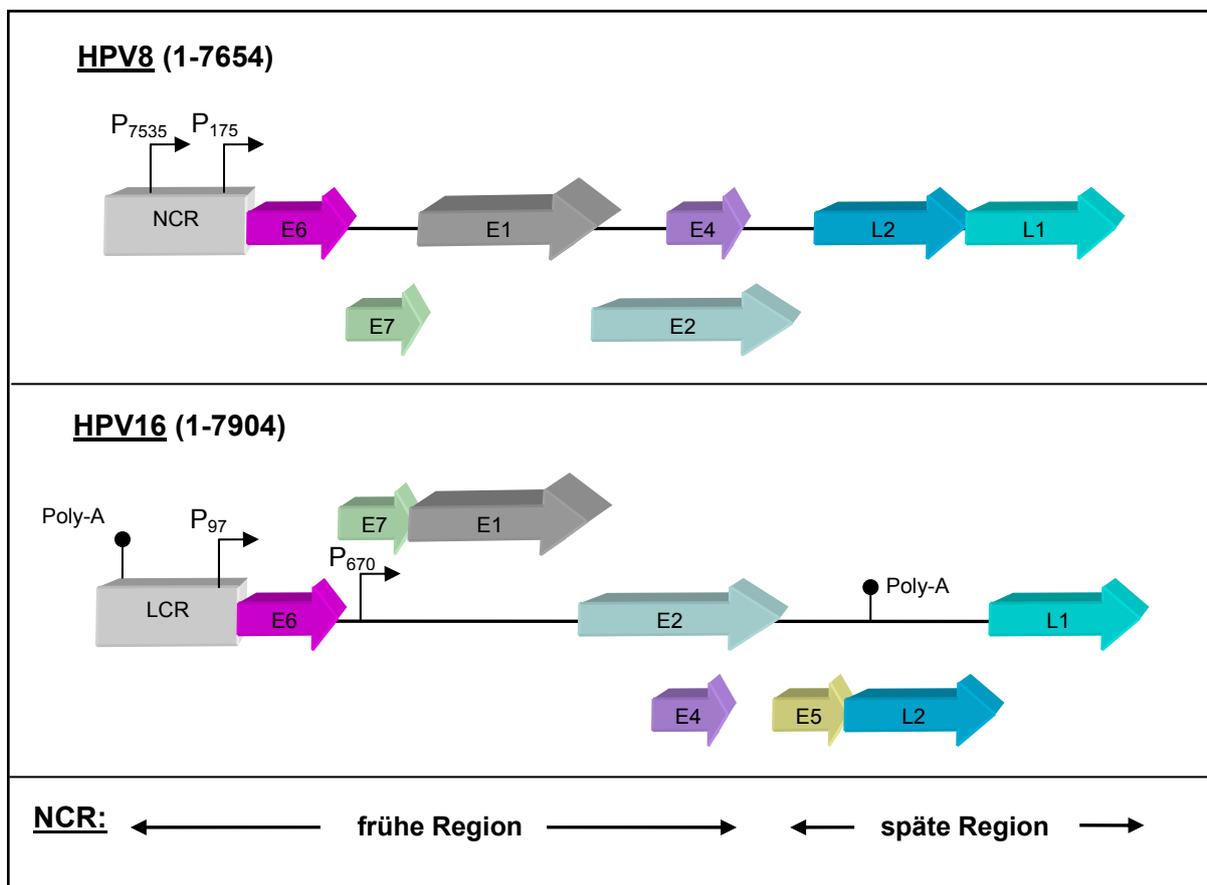


Abb. 2: Die Genomorganisation von HPV8 und HPV16.

Das Genom der PV wird zusätzlich zur NCR bei HPV8 bzw. der LCR bei HPV16 in die frühe und späte Region unterteilt und wurde für die Darstellung hinter dem L1-Gen geöffnet. Die einzelnen ORFs, deren Lage zueinander, die Promotoren und das Polyadenylierungssignal (HPV16) sind dargestellt (modifiziert nach PFISTER UND FUCHS 1987).

Am 3'-Ende der NCR/LCR unmittelbar vor dem E6-ORF ist der frühe Promotor lokalisiert. Der späte Promotor besitzt keine konservierte Lage. Bei den meisten genitalen PV liegt er im E7-Leserahmen (HPV16 = P₆₇₀), während er bei HPV8 zentral innerhalb der NCR lokalisiert ist (P₇₅₃₅).

Die meisten Studien zur Regulation dieser Promotoren wurden in den mukösen HPV durchgeführt (DESAINTEs UND DEMERET, 1996; O'CONNOR, 1996; FUCHS UND PFISTER 1994 und 1996). Der im Zentrum der LCR liegende Keratinozyten-spezifische Enhancer enthält Bindestellen für eine Reihe von ubiquitär und keratinozytenspezifisch exprimierten Transkriptionsfaktoren und ist verantwortlich für die Zelltypspezifität der Viren. Neben den zellulären Faktoren Sp1 und Ap1, die als Aktivatoren agieren, binden das virale

Protein E2 und der zelluläre Faktor YY1 hauptsächlich im Promotor-proximalen Bereich der LCR und reprimieren den frühen Promotor (FUCHS UND PFISTER 1994; DESAINTEs UND DEMERET 1996; O'CONNOR *et al.*, 1996). Das E2-Protein ist aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (AD), der Hinge-Domäne (H) und einer C-terminalen DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne (DBD) aufgebaut. Mit der DBD kann E2 an die palindromische Konsensussequenz ACC(N₆)GGT binden, die mehrfach im viralen Genom vorhanden ist (STEGER *et al.*, 1996). Innerhalb der LCR liegen vier E2 Bindestellen (BS) an konservierten Positionen. E2 kontrolliert die Expression der E6/E7-Proteine konzentrationsabhängig. Bei geringen E2-Mengen bindet E2 an die BS-1, was zur Promotoraktivierung führt. Die niedrig affinen Promotor-proximalen BS 3 und 4 überlappen mit der BS für den zellulären Faktor SP1 und der TATA-Box des P₉₇. In hohen Mengen verdrängt E2 Sp1 und TBP, was zur Promotor-Repression führt (TAN *et al.*, 1992; DEMERET *et al.*, 1994; DONG *et al.*, 1994), mit der Folge der Reduktion der Menge der Onkogene E6 und E7. Dadurch übt E2 einen negativen Effekt auf die Zellproliferation aus und ist in der Lage, die Zellen in der G2-Phase zu arretieren (FOURNIER *et al.*, 1999; FRATTINI *et al.*, 1997). Die Integration der HPV-DNA in das Wirtsgenom ist ein wichtiger Schritt bei der zervikalen, neoplastischen Progression. Sie führt in der Regel zum Verlust des E2-Proteins, indem es zu einer Deletion oder Unterbrechung des E2-ORFs kommt. Die daraus resultierende Deregulation der Expression der E6/E7 RNAs führt zu einer verstärkten Proliferation der Zellen (LONGWORTH UND LAIMINS, 2004; MÜNGER *et al.*, 2004).

Der späte Promotor wird erst im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung induziert. Die dafür verantwortlichen Sequenzelemente liegen im Bereich der ORFs E6 und E7 und werden wahrscheinlich von Transkriptionsfaktoren gebunden, deren Aktivität im Verlauf der Keratinozytendifferenzierung zunimmt.

Die HPV8 NCR enthält fünf E2 BS (P0-P4), sowie die innerhalb der Ev-assoziierten HPV hoch konservierten Sequenzmotive M29 und M33, die aus 29 bzw. 33 Nukleotiden bestehen, eine CAAT-Box und eine 50bp lange A/T-reiche Region (FUCHS UND PFISTER, 1996). Ein 38bp großes, negativ regulierendes Element (NRE) befindet sich stromaufwärts des späten Promotors, überlappt mit der E2 BS-1 und reprimiert den späten Promotor (MAY *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass das M33-Motiv in Verbindung mit der proximalen AP-1-BS einen konstitutiven Enhancer des späten Promotors darstellt (HORN *et al.*, 1993). Weiterhin wirken M29 und, nach der Bindung

von E2, auch das P2-Pallindrom negativ auf den späten Promotor (STUBENRAUCH UND PFISTER, 1994).

1.5 Die viralen Onkoproteine E6 und E7

Die E6- und E7-Proteine sind Onkogene, die über keine intrinsische Enzymaktivität verfügen. Sie üben ihre Funktion über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren aus, u.a. Tumorsuppressorproteinen der Wirtszelle, und induzieren dadurch eine Aufhebung des G₁-Zyklusblocks in differenzierenden Keratinozyten (SMOLA-HESS UND PFISTER, 2002). Der Eintritt der suprabasalen Zellen in die S-Phase schafft die Voraussetzung für die virale Replikation. Die mittels *in situ* Hybridisierung untersuchte mRNA-Expression von E6 und E7 zeigte, dass die Expression in allen Zellschichten von HPV-Tumoren im Vergleich zu gutartigen Kontrollen verstärkt ist (HIGGINS *et al.*, 1992; IFTNER *et al.*, 1992; STOLER *et al.*, 1992; HALLER *et al.*, 1995). Diese erhöhte Expression wird als eine der Ursachen für die Entartung der Tumore bei einer HPV-Infektion gesehen (CHOW UND BROKER, 1997).

Die E6- und E7-Proteine von genitalen Hoch-Risiko-HPV sind notwendig und ausreichend für die effiziente Immortalisierung primärer, epithelialer Zellen (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1989). Beide Proteine sind in der Lage unabhängig voneinander immortalisierte Zellen zu transformieren (SEDMAN *et al.*, 1991; PHELPS *et al.*, 1988).

1.5.1 Das HPV E7-Onkoprotein

Das E7-Protein ist ein ca. 11 kDa großes Protein mit einem Zinkfingermotiv. Es fungiert als Onkogen der genitalen Hoch-Risiko-HPV und kann primäre Vorhautkeratinozyten immortalisieren (HALBERT *et al.*, 1991). Die Bindung an das Retinoblastomprotein pRb (DYSON *et al.*, 1989) und die Induktion der ubiquitin-abhängigen Degradation von pRb (BEREZUTSKAYA UND BAGCHI, 1997) macht den Großteil des transformierenden Potentials von E7 aus. Die kompetitive Bindung von E7 an pRb und dessen Degradation führen zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. E2F liegt in der G₁-Phase inaktiv in einem Komplex mit pRb vor und kann nach seiner Freisetzung die Expression von Genen, die wichtig für die DNA-Synthese und für die Zellzyklusregulation sind, induzieren. Zusätzlich kann E7 an die Inhibitoren der

Zyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) p21^{CIP1/WAF1} und p27^{Kip} binden und ihre Funktion inhibieren (TUREK 1994; SCHULZE *et al.*, 1995; OHTANI *et al.*, 1995; zusammengefasst in: MÜNGER *et al.*, 2001). Beide Eigenschaften führen zum Eintritt in die S-Phase und ermöglichen die virale Replikation. Die E7-Proteine der Niedrig-Risiko-Typen und der *Ev*-HPV binden deutlich schwächer an pRb (IFTNER *et al.*, 1988; KIYONO *et al.*, 1989; SCHMITT *et al.*, 1994). In organotypischen Kulturen der Haut konnte 8E7 eine Invasion der Keratinozyten in die Dermis induzieren, was eine direkte Beteiligung von E7 an der Onkogenese der kutanen HPV-Typen impliziert (AKGÜL *et al.*, 2006).

1.5.2 Die HPV E6-Onkoproteine

Die E6-Proteine von HPV sind 18 kDa große Phosphoproteine, die im Nukleus und in nicht nukleären Membranen vorkommen (GROSSMANN *et al.*, 1989; GAO *et al.*, 2000). Sie verfügen über zwei Zinkfinger-Domänen, die jeweils 29-30 Aminosäuren (AS) groß sind und eine Rolle bei der Proteininstabilität und –aktivität spielen (SMOLA-HESS UND PFISTER, 2002).

1.5.3 Das genitale HPV16 E6 Protein

Eine Hauptfunktion des genitalen HPV16 E6-Proteins ist die Inhibition der Apoptose durch die Inaktivierung von p53 (SCHEFFNER *et al.*, 1990). Hierfür bildet das E6-Protein einen Komplex mit p53 und dem zellulären E6-AP, einer Ubiquitinligase (WERNESSE *et al.*, 1990). Das Heranführen von E6AP an p53 durch E6 induziert die Ubiquitinierung von p53, gefolgt vom proteolytischen Abbau durch das Proteasom (SCHEFFNER *et al.*, 1993). Das Tumorsuppressorprotein p53 wird in der Regel nach DNA-Schäden als Transkriptionsfaktor aktiv und führt durch die Aktivierung von p21 zu einem Zellzyklusstopp oder induziert bei irreparablen DNA-Schäden die Apoptose. Die Eliminierung von p53 hat eine Erhöhung der genetischen Instabilität mit dem Risiko der Anhäufung von Mutationen zur Folge (zusammengefasst in: (ROBLES UND HARRIS, 2001)). Daraus kann eine Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung weiterer Tumorsuppressorgene resultieren (THOMAS UND LAIMINS, 1998; SOMASUNDARAM, 2000). Zusätzlich hemmen E6-Proteine der genitalen HPV-Typen die Transkriptionsfunktion von p53 und einer Reihe anderer Aktivatoren durch die Bindung an den zellulären Ko-Aktivatoren CBP (*CREB-binding protein*) und sein Homolog p300 (PATEL *et al.*, 1999;

ZIMMERMANN *et al.*, 1999). Obwohl die Inaktivierung von p53 eine wichtige Funktion der E6-Proteine darstellt, ist sie nicht notwendig für die Immortalisierungsfunktion von E6 (KIYONO *et al.*, 1997). Hierfür ist die E6-vermittelte Steigerung der Telomeraseaktivität (KLINGELHUTZ *et al.*, 1996), sowie die Wechselwirkung von E6 mit PDZ-Domänen Proteinen relevant (RILEY *et al.*, 2003; SHAI *et al.*, 2007).

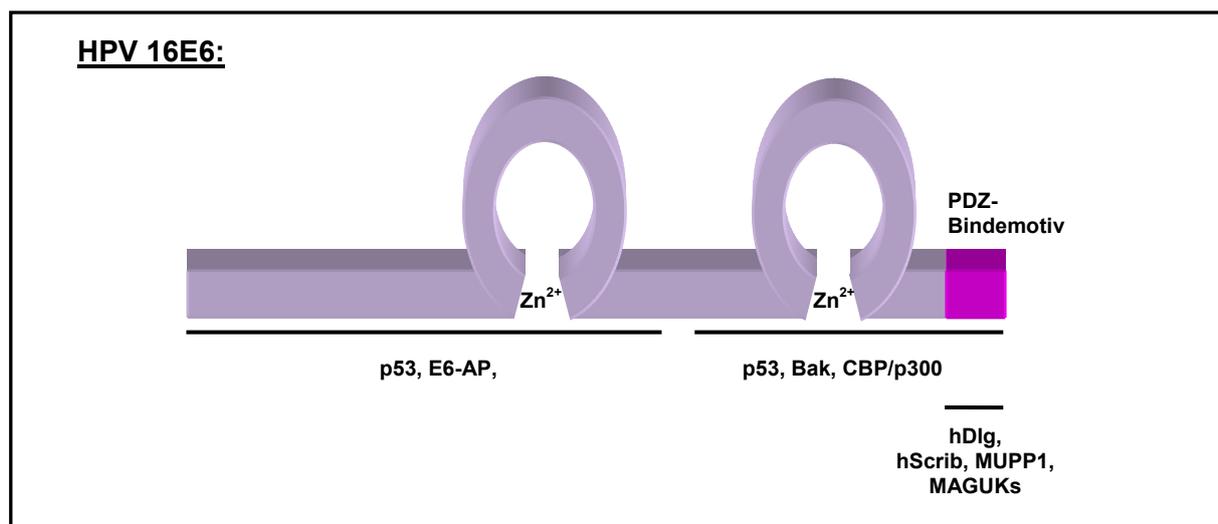


Abb. 3: Schematische Darstellung von HPV 16E6

Die Darstellung zeigt das E6-Protein mit seinen zwei Zinkfingern und dem PDZ-Bindemotiv (nur bei Hochrisiko-E6-Proteinen), sowie eine Auswahl an Interaktionspartnern von 16E6 mit ihren Bindedomänen (verändert nach SMOLA-HESS und PFISTER, 2002).

Die Interaktion mit PDZ-Domänen Proteinen erfolgt über die vier C-terminalen AS von genitalen Hoch-Risiko E6 (ETQL), die für ein PDZ-Bindemotiv kodieren. Das PDZ-Bindemotiv ist unter den E6-Proteinen von HPV-Typen, die mit dem Zervixkarzinom assoziiert sind, konserviert (Abb. 3). Es ist essentiell für die Transformation von etablierten Nagerzelllinien, wie bspw. NIH3T3-Zellen. In transgenen Mäusen, die ein 16E6 exprimierten, dem das PDZ-Bindemotiv fehlte, entwickelten sich zudem keine epidermalen Hyperplasien, wie sie häufig mit Wildtyp 16E6 beobachtet wurden (NGUYEN *et al.*, 2003). PDZ-Domänen werden häufig in Proteinen gefunden, die an Bereichen des Zell-Zell-Kontaktes lokalisiert sind. Sie sind charakterisiert durch 80-90 AS, die mit hoher Affinität von der spezifischen Sequenz XT/SXV gebunden wird. Das PDZ-Bindemotiv ist gewöhnlich im äußersten C-terminalen Bereich des Zielproteins lokalisiert. Die Bindung der E6-Proteine von HPV16 und 18 an die PDZ-Familienmitglieder MAGI1-3, MUPP1, hDlg und hScrib induziert in der Regel deren Ubiquitin-abhängige Degradation (Abb. 4), die in den meisten Fällen über die Ubiquitinligase E6-AP vermittelt wird (GARDIOL *et al.*, 1999; NAKAGAWA UND HUIBREGTSE, 2000; LEE *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2002).

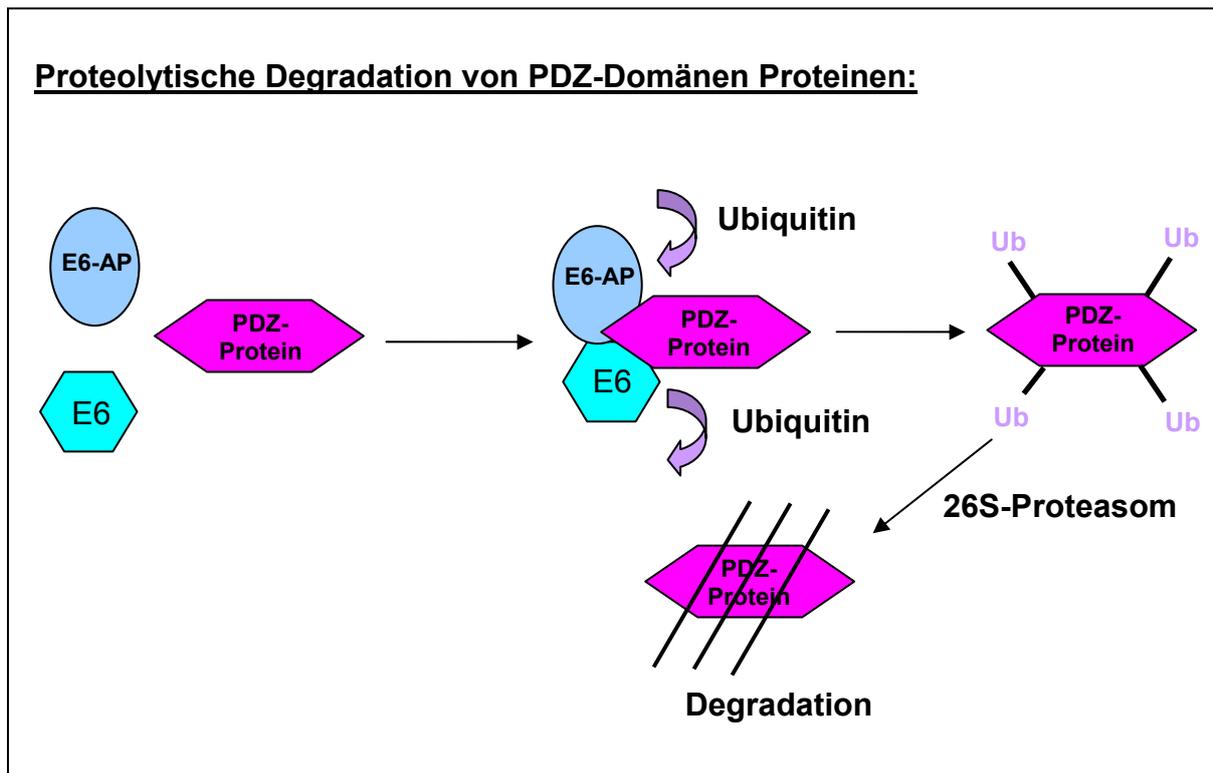


Abb. 4: Proteolytische Degradation von PDZ-Domänen Proteinen durch 16E6 und E6-AP.
 Dargestellt ist die Bildung des ternären Komplexes von E6-AP, E6 und des PDZ-Proteins. Die Ubiquitinligase E6-AP ubiquitiniert das PDZ-Protein, was zu einer proteolytischen Degradation des PDZ-Proteins durch das 26S-Proteasom führt.

Es sind aber auch Ausnahmen beschrieben (HAMPSON *et al.*, 2004; KÜHNE UND BANKS, 1999; THOMAS *et al.*, 2001). Es werden nicht alle PDZ-Domänen von Hochrisiko-E6-Proteinen gebunden, wobei die Grundlagen der Spezifität nicht geklärt sind (THOMAS *et al.*, 2001). Ferner ist nicht bekannt, welche Signalwege durch die Bindung von 16E6 an die PDZ-Domänen-haltigen Proteine beeinflusst werden bzw. welches der PDZ-Domänen Proteine für die Transformation durch E6 gebunden werden muss. Wie bereits erwähnt, ist die Interaktion mit PDZ-Domänen Proteinen wichtig für das onkogene Potential von 16E6. Um neue PDZ-Domänen Proteine zu identifizieren, die mit dem PDZ-Bindemotiv von 16E6 interagieren, wurde in meiner Diplomarbeit ein Hefe-Two-Hybrid-System durchgeführt (TÖPFFER, 2005). Hierfür wurden die 12 C-terminalen Aminosäuren von 16E6, die sowohl das PDZ-Bindemotiv von 16E6 als auch einige benachbarte Aminosäuren beinhalten, als Köderprotein zum Screening einer HaCat-cDNA-Expressions-Library verwendet. Neben den bereits bekannten Interaktionspartnern hDlg und hScrib (KIYONO *et al.*, 1997; NAKAGAWA UND HUIBREGSTE, 2000; PIM *et al.*, 2000; MANTOVANI *et al.*, 2001; STERLINKO GRM UND BANKS, 2004), konnten 24 cDNAs, die für die Protein-Tyrosin-Phosphatase kodieren, identifiziert werden. Da PTPH1 eine Rolle als mögliches Tumorsuppressorprotein zugeschrieben

wird (WANG *et al.*, 2004), könnte die Bindung von 16E6 an PTPH1 das onkogene Potential von 16E6 unterstreichen.

1.5.4 Das kutane HPV8 E6-Protein

Die kutanen E6-Proteine interagieren weder mit p53 oder E6-AP noch degradieren sie p53 (STEGGER UND PFISTER, 1992; ELBEL *et al.*, 1997). Obwohl in einer neueren Publikation eine schwache Interaktion von 8E6 mit E6-AP beschrieben wurde, bleibt die biologische Relevanz dieser Bindung unklar (BEDARD *et al.*, 2008). Dennoch weisen die E6-Proteine der mit *Ev*-assoziierten HPV ein onkogenes Potential auf. Die Transformation durch die kutanen E6-Proteine unterscheidet sich demnach von der der genitalen E6-Proteine. Bei HPV8 scheint das E6-Protein das dominante Onkogen in Nagerzellen zu sein. Es ist in der Lage, morphologische Transformation und Wachstum in Soft-Agar zu induzieren (IFTNER *et al.*, 1988). Kürzlich konnte in einem HPV8-transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass die epitheliale Expression von HPV-8E6 unter der Kontrolle des K14-Promotors zur spontanen Papillom- und auch Karzinomentstehung führt (SCHAPER *et al.*, 2005; MARCUZZI, 2006).

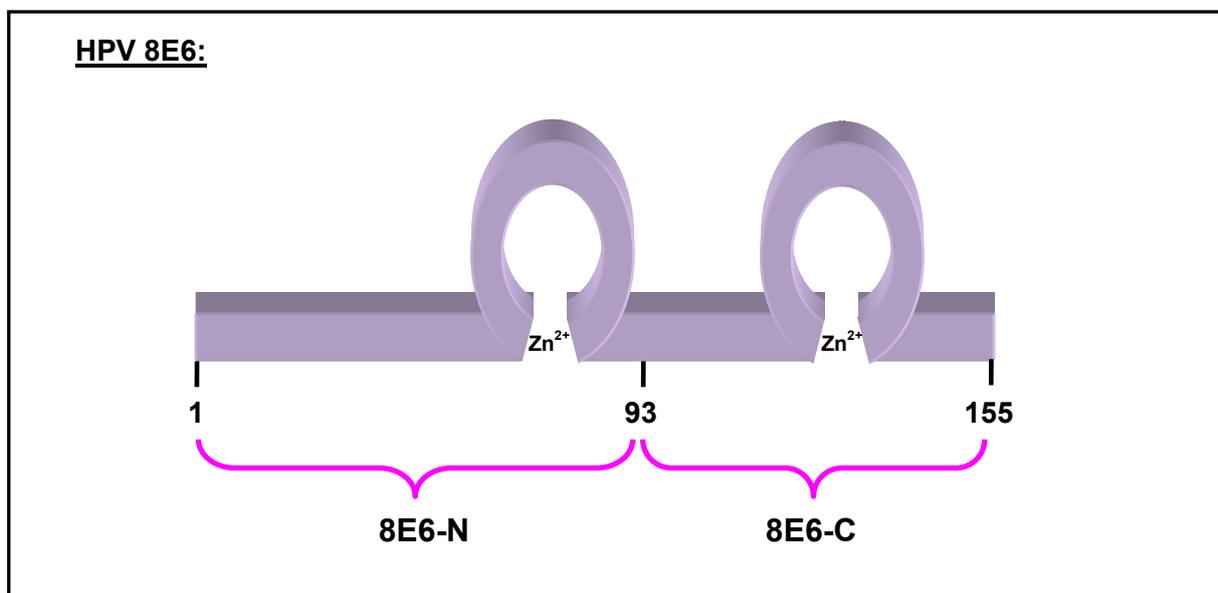


Abb. 5: Schematische Darstellung von HPV 8E6.
 Dargestellt ist das HPV8 E6-Protein mit seinen zwei Zinkfinger-Domänen. Zusätzlich sind die AS-Positionen des N-Terminus (AS 1-93) und des C-Terminus (94-155) definiert.

Es ist auch bekannt, dass die E6-Proteine von *Ev*-assoziierten HPV-Typen in der Lage sind, die UV-induzierte Apoptose zu inhibieren. Das erfolgt unter anderem über die Ubiquitin-abhängige Proteolyse des proapoptotischen Bak-Proteins (JACKSON

et al., 2000), wodurch proapoptotische Proteine nicht freigesetzt werden und die Apoptose der Zelle blockiert wird (LEVERRIER *et al.*, 2007). Des Weiteren können die E6- und E7-Proteine von HPV38 durch die Aktivierung einer p73-Isoform die Repression von p53 induzieren und somit die p53-abhängige Genexpression inhibieren (ACCARDI *et al.*, 2006). Diese HPV-vermittelte Inhibition der Apoptose erlaubt die Proliferation von Keratinozyten mit somatischen Mutationen. Ferner sind die E6-Proteine von Beta-PV in der Lage, das DNA-Reparatursystem, welches als Antwort auf mutagene UV-Strahlung von der Zelle aktiviert wird, zu stören. So kann das HPV5 E6-Protein die Reparatur UVB-induzierter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere beeinträchtigen (GIAMPIERI UND STOREY, 2004) und das HPV 8E6-Protein durch die Bindung an das zelluläre XRCC₁-Protein die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen stören (IFTNER *et al.*, 2002). Diese nicht behobenen DNA-Einzelstrangbrüche begünstigen bei der Replikation DNA-Doppelstrangbrüche, was zu einer chromosomalen Instabilität führt. In Verbindung mit der Inhibition der Apoptose können diese Aktivitäten kutaner HPV die genetische Stabilität der infizierten Keratinozyten empfindlich stören. Allerdings ist das karzinogene Potential von E6 bezüglich dieser Mechanismen bisher noch nicht *in vivo* gezeigt.

Im Gegensatz zu den genitalen Hoch-Risiko E6-Proteinen kodieren die kutanen E6-Proteine für kein PDZ-Bindemotiv (Abb. 5).

1.6 Die Protein-Tyrosin-Phosphatase H1 (PTPH1)

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase H1 (PTPH1, auch PTPN3 genannt) ist eine ca. 100 kDa große Phosphatase und gehört zu der Familie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP). Durch die Dephosphorylierung von phosphorylierten Tyrosinresten sind PTPs an grundlegenden, zellulären Prozessen, wie Zellzyklus-Kontrolle, Wachstum, Differenzierung, Apoptose und onkogener Transformation beteiligt (TONKS 2006; OSTMAN *et al.*, 2006).

PTPH1 verfügt N-terminal über eine Sequenz mit Homologie zur Band 4.1-Domäne (Abb. 6), die für eine zytoskelettale Assoziation verantwortlich ist, eine C-terminale-Phosphatase-Domäne (PTPc), die die Phosphataseaktivität von PTPH1 beinhaltet und eine zentrale PDZ-Domäne, mit der eine Interaktion mit PDZ-Bindemotiven möglich ist (YANG AND TONKS, 1991; ARIMURA *et al.*, 1992; ITOH *et al.*, 1993).

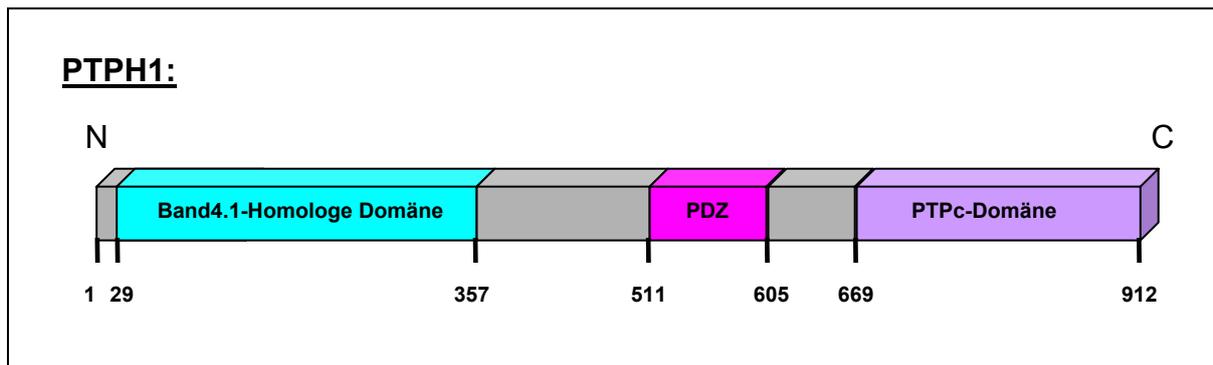


Abb. 6: Aufbau von PTPH1

Dargestellt sind die N-terminale Band 4.1-Homologe Domäne, die zentrale PDZ-Domäne und die C-terminale katalytische Domäne (PTPc-Domäne) von PTPH1.

Die Funktionen von PTPH1 sind bisher nicht ausführlich untersucht. Bekannt ist, dass PTPH1 zu 20-80% in einem Komplex mit 14-3-3 β vorliegen kann (ZHANG *et al.*, 1997). Des Weiteren kann PTPH1 durch die Dephosphorylierung eines Tyrosins von VCP (*Valosin-containing protein*, p97, CDC48) einen Wachstumsstopp induzieren (ZHANG *et al.*, 1999). Die T-Zell Rezeptor α -Untereinheit sowie die *tumor necrosis factor α -convertase* (TACE), die eine Rolle bei der Regulation von Metalloproteasen spielt, wurden bisher als weitere Zielproteine von PTPH1 identifiziert (SOZIO *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2002). Neuere Daten zeigen, dass PTPH1 durch die Sekretion des *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) den *Growth Hormone Receptor* (GHR) und das systemische Wachstum kontrolliert (PILECKA *et al.*, 2007). Eine Mutationsanalyse der PTP-Familienmitglieder in menschlichen Karzinomen ergab, dass in 6 der 83 untersuchten PTPs somatische Mutationen vorlagen, wobei 26% der kolorektalen Karzinome und ein kleinerer Teil der Lungen-, Brust- und Magenkarzinome betroffen waren. Die Mutationen resultierten in verkürzten Proteinen, denen die Phosphataseaktivität fehlte. Unter diesen mutierten PTPs befand sich auch PTPH1. Diese Studie deutet daraufhin, dass PTPH1 ein Tumorsuppressor-Protein ist (WANG *et al.*, 2004).

1.7 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Interaktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase H1 mit dem HPV16-E6-Onkoprotein bestätigt und deren Auswirkung auf die Funktion von PTPH1 sowie die HPV 16E6-vermittelte Transformation von Zellen analysiert werden. Ferner sollte untersucht werden, ob PTPH1 auch eine Rolle bei der Transformation durch 8E6 spielt.

2 MATERIAL

2.1 Bakterienstämme

- ***Epicurian coli*® XL1-Blue**

Genotyp: recA1, end A1, gyr96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac^qZΔAM15 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 Eukaryote Zellen

- **C33a (ATCC: HTB-31)**

Spontan immortalisierte humane Zervixkarzinom-Zelllinie ohne HPV-Genom und mit epithelialer Morphologie (AUERSPERG, 1969; DEL VECCHIO, 1992).

- **RTS3b**

Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus einer *Ev*-ähnlichen Läsion eines Nierentransplantatempfängers; ursprünglich HPV5 und 8 positiv, nach mehreren Passagen HPV-negativ (PURDIE, *et al.*, 1993).

- **SiHa (ATCC: HTB-35TM)**

Humane Zervixkarzinom-Zelllinie aus einem zervikalen Plattenepithelkarzinom eines japanischen Patienten entnommen und mit epithelialer Morphologie. HPV 16 positiv (FRIEDEL *et al.*, 1970).

- **Caski (CRL-1550TM)**

Humane epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie aus einem epidermoiden Tumor entnommen. HPV 16 positiv.

- **HaCat**

Eine spontan immortalisierte, aneuploide humane, epitheliale Zelllinie aus menschlicher Haut, die die Eigenschaft der Differenzierung beibehalten hat. Sie zeigt einen transformierten Phänotyp, ist jedoch nicht tumorigen (BOUKAMP *et al.*, 1988).

- **HeLa (ATCC: CCL-2)**
Humane epitheliale Zelllinie aus einem zervikalen Adenokarzinom, aneuploid, HPV18-positiv (GEY *et al.*, 1952).
- **NIH3T3 (CRL-1658™)**
Embryonale Mausfibroblasten.
- **C127i (CRL-1616™)**
Aus einem „mammary gland“ isolierte epitheliale Mausezelllinie. Können durch BPV-Virus-DNA-Plasmide transformiert werden.
(J. Virol 1978;26:291 Virology 1980; 103:369; Mol. Cell Biol. 1981;1:486)
- **NHEK-neo**
Normale humane epitheliale Keratinozyten-neonatal: „gepoolte“ primäre Keratinozyten der 1. Passage bezogen von der Firma Lonza (Walkersville, USA).
- **pTER⁺-LV-C127i**
Diese stabile, monoklonale C127i-Zelllinie ist mit dem pTER⁺-Leervektor transfiziert. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in 50 µg/ml Zeocin-DMEM.
(vorliegende Arbeit)
- **pTER⁺-siRNAmPTPH1-A-C127i**
Eine stabile, monoklonale C127i-Zelllinie, die durch Expression der siRNAmPTPH1-A zu einem Knock-down von Maus PTPH1 führt. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in 50 µg/ml Zeocin-DMEM. (vorliegende Arbeit)
- **pTER⁺-siRNAmPTPH1-B-C127i**
Diese stabile, monoklonale C127i-Zelllinie exprimiert die siRNAmPTPH1-B. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in 50 µg/ml Zeocin-DMEM.
(vorliegende Arbeit)
- **pLXSN-LV-C127i**
Eine C127i-Zelllinie, die mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-LV infiziert wurde. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 100 µg/ml G418-DMEM.
(vorliegende Arbeit)
- **pLXSN-8E6-C127i**
Eine C127i-Zelllinie, die mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-8E6 infiziert wurde und das 8E6-Protein exprimiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 100 µg/ml G418-DMEM.
(vorliegende Arbeit)

- **pLXSN-8E6-V68P-C127i**

Diese stabile C127i-Zelllinie, die mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-8E6-V68p infiziert wurde, exprimiert das 8E6-V68p-Protein. (vorliegende Arbeit)

- **pLXSN-LV-RTS3b**

Eine RTS3b-Zelllinie, die mit rekombinanten Retroviren für den pLXSN-Leervektor infiziert wurde. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in 100 µg/ml G418-E-Medium. (vorliegende Arbeit)

- **pLXSN-8E6-RTS3b**

Diese mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-8E6 infizierte RTS3b-Zelllinie, exprimiert das 8E6-Protein. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 100 µg/ml G418-E-Medium. (vorliegende Arbeit)

- **pLXSN-8E6V68P-RTS3b**

Eine mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-8E6-V68P infizierte RTS3b-Zelllinie, die das 8E6-V68P-Protein exprimiert. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte in 100 µg/ml G418-E-Medium. (vorliegende Arbeit)

- **pLXSN-16E6-RTS3b**

Diese stabil mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-16E6 infizierte RTS3b-Zelllinie exprimiert das 16E6-Protein. Diese Zellen wurden in 100 µg/ml G418-E-Medium kultiviert. (vorliegende Arbeit)

- **RetroPack™PT67-Verpackungs-Zelllinie**

Diese Zelllinie basiert auf der NIH/3T3 Linie und exprimiert die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* des *Moloney* Mäusleukämievirus Typ 10A1. Mit Hilfe dieser Verpackungszelllinien kann provirale DNA in infektiöse Partikel verpackt werden. Hierfür wird ein retroviraler Vektor mit dem gewünschten Gen und einem RNA-Verpackungssignal ψ^+ in die PT67-Zellen transfiziert und anschließend zur Viruspartikelproduktion über 24h bei 30°C und 10%CO₂ inkubiert. Die so gewonnen replikationsunfähigen Retroviren können verschiedene Zelltypen über die Erkennung spezifische Rezeptoren infizieren.

(Clontech, Heidelberg)

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma Operon (Köln) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Zahlenangaben entsprechenden den Positionen der Aminosäuren im Protein. Enzymschnittstellen sowie Punktmutationen sind fett dargestellt. Die Start- und Stopcodons wurden unterstrichen.

- **Oligonukleotide für HPV 16E6-Klonierungen**

Name	Sequenz
pEBGHPV16E6BamH1up5'	GGT GGT GGA TTC <u>ATG</u> TTT CAG GAC CCA CAG
16E6-EcoRI-5'	GGT CGT GGA ATT <u>CAA</u> <u>TGT</u> TTC AGG ACC CAC AGG AG
16E6-EcoRI-3'	CAT CCG GAA TTC <u>TTA</u> CAC CTG GGT TTC CTC TAC GTG TTC
HPV 16E6 BamH1 up	GGT CGT GGA TCC GAT GTT TCA GGA CCC ACA GGA G
HPV 16E6 BamH1 down	GGA CGA GGA TCC <u>TTA</u> <u>CAG</u> CTG GGT TTC TCT ACG
HPV16LCR-nt512-KpnI	GGC CTC GGT ACC GCA ACA AGA CAT ACA TCG ACC GG
16E6-C-Bam-up	CGG ATC GGA TCC GGG AAC AAC ATT AGA ACA GCA ATA CAA C

- **Oligonukleotide für *in vitro* Mutagenese von HPV 16E6**

Name	Sequenz
16E6 mtF47R-5'	GAC GTG AGG TAT ATG ACT TTG CTC GTC GGG ATT TAT GCA TAG
16E6 mt F47R-3'	CTA TGC ATA AAT CCC GAC GAG CAA AGT CAT ATA CCT CAC GTC
16E6 P59V-5'	ATA GTA TAT AGA GAT GGG AAT GTA TAT GCT GTA TGT GAT AAA TGT
16E6 P59V-3'	ACA TTT ATC ACA TAC AGC ATA TAC ATT CCC ATC TCT ATA TAC TAT

- **Oligonukleotide für die PTPH1-Klonierungen**

Name	Sequenz
PTPH1 5' XhoI	GGT CGT GCT CGA GCT <u>ATG</u> ACC TCC CGG TTA CGT GCG
PTPH1 3' KpnI	GGT CGT GGT ACC TTA ACT AGG ATC CAG CAT TTG
PTPH1Δband4.1BglII 5'	GGT CGT GAG ATC TTG AGT GGT AGG GAT CTG CAC AAT TTA GAC
PTPH1Δband4.1NotI 3'	CTG ACA CGC GGC CGC <u>TTA</u> ACT AGG ATC CAG CAT TTG GAC
PTPH1ΔPTPc BglII 5'	GGT CGT GAG ATC TTG <u>ATG</u> ACC TCC CGG TTA CGT GCG
PTPH1ΔPTPc NotI 3'	CTG ACA CGC GGC CGC GAT CAG CAC CGT CCC GCT TTC
PTPH1Δband4.1StartBglII5'	GGT CGT AGA TCT ATG AGT GGT AGG GAT CTG CAC AAT TTA
PTPH1 NotI Start-5'	GCT CTA TGC GGC CGC ATG ACC TCC CGG TTA CGT GCG
PTPH1 PmeI Stop-3'	GAT CCT GTT TAA ACA <u>TTA</u> ACT AGG ATC CAG CAT TTG
mPTPH1Seq.860-3'	AAG ATC GGT AAT TCA GCA ATG
PTPc-BamH1-5'	GCT AGC GGA TCC <u>GAT</u> <u>GGT</u> GCT GAT CCA GTT TG
PTPH1ΔPTPc-KpnI-3'	GGT CGT GGT ACC TTA GAT CAG CAC CGT CCC GCT TTC
PTPH1dBd Start BglII-5'	GGT CGT AGA TCT ATG AGT GGT AGG GAT CTG CAC AAT TTA

• Oligonukleotide für die *in vitro* Mutagenese von PTPH1

Name	Sequenz
PTPH1 Δ223-649 -5'	GAC TTC TAT GGA GTA GAA CTG CAC TTT GAG CAA CTC TAC AGA AAA AAG
PTPH1 Δ223-649 -3'	CTT TTT TCT GTA GAG TTG CTC AAA GTG CAG TTC TAC TCC ATA GAA GTC
PTPH1ΔPDZ-5'	TAC TGT GAC AAG AAT GAT AAT GTC CGC TCA TTT GCT GAC TTC
PTPH1ΔPDZ-5'-r	GAA GTC AGC AAA TGA GCG GAC ATT ATC ATT CTT GTC ACA GTA
PTPH1 Y676F-5'	CAA AAT TTG GAC AAA AAC CGA TTT AAA GAT GTG CTG CCT TAT GAC
PTPH1 Y676F-3'	GTC ATA AGG CAG CAC ATC TTT AAA TCG GTT TTT GTC CAA ATT TTG

• Oligonukleotide für die HPV 8E6-Klonierungen

Name	Sequenz
8E6 5' EcoRI	GGT CGT CTG AAT TCG ATG GAC GGG CAG GAC AAG
8E6 3' BamH1	GGT CGT GGA TCC TTA ACT GAA AGG GAC GGC CTC
pEBGHPV8E6BamH1up-5'	GGT GGT GGA TTC ATG GAC GGG CAG GAC AAG
8E6+ETQL-Eco-Do	CGG ATC GAA TTC TTA CAG CTG GGT TTC CCA ATC ATG ATA CAA ATG CTT ACA AAG CC
HPV8E6pET3'	CCG GAT CCT TAC CAA TCA TGA TAC AAA TGC TTA C
HPV8E6pET5'	CCG GAT CCG ATG GAC GGG CAG GAC AAG GCT TC

• Oligonukleotide für siRNAs

Name	Sequenz
siRNA mPTPH1a-5'BamH1	GAT CCG ACC GAG GAT GTG TTC TAT ATT CAA GAG ATA TAG AAC ACA TCC TCG GTT TTT TTG GAA A
siRNA mPTPH1a3' HindIII	AGC TTT TCC AAA AAA ACC GAG GAT GTG TTC TAT ATC TCT TGA ATA TAG AAC ACA TCC TCG GTG G
siRNAmPTPH1b-5' BamH1	GAT CCG GAT TTG GCT TTA ACC TTA ATT CAA GAG ATT AAG GTT AAA GCC AAA TCT TTT TTG GAA A
siRNA mPTPH1b-3' HindIII	AGC TTT TCC AAA AAA GAT TTG GCT TTA ACC TTA ATC TCT TGA ATT AAG GTT AAA GCC AAA TCG G
pSuperior Seq-5'	GGA AGC CTT GGC TTT TG

2.3.2 Prokaryote Expressionsvektoren

- **pGEX2T** (4.9 kb) ermöglicht die Expression eines Proteins, das N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert ist, unter der Kontrolle des *tac*-Promotors (IPTG-induzierbar). Er verfügt über ein Ampicillin-Resistenzgen. (Amersham Bioscience, Freiburg)
- **pGEX 5X-2** (4974 bp) erlaubt unter der Kontrolle des Tac-Promotors die Expression eines Proteins, das N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert ist. Zusätzlich verfügt er über ein Ampicillin-Resistenzgen. (Amersham Bioscience, Freiburg)

2.3.3 Eukaryote Expressionsvektoren

- **pCDNA 3.1+** (5.4 kb) erlaubt die Expression unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Der Vektor S verfügt sowohl über ein Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle von SV40-Regulationselementen. (Invitrogen, Karlsruhe)
- **pCDNA FLAG 3.1 +** (5.4 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert sind, unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Für diesen Vektor wurden die komplementären Oligonukleotide *FLAG-Hind/Bam5'* und *FLAG-Hind/Bam3'* in pCDNA3.1-Vektor kloniert (MÜLLER et al., 2002). Der Vektor vermittelt eine Neomycin-Resistenz.
- **pCDNA-FLAG-1** (5.4 kb) exprimiert Proteine, die N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert sind, unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Hierfür wurde das FLAG-Epitop in den pCDNA3.1-Vektor kloniert (pers. Mitteilung, G. STEGER). Der Vektor verfügt über ein Neomycin-Resistenzgen Resistenz.
- **pCMV-Myc** (3.8 kb) exprimiert Proteine, die N-terminal mit einem Myc-Epitop fusioniert sind, unter der Kontrolle des CMV-Promotors. (BD Biosciences, California)
- **pCMV-HA** (3.8 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert sind, unter der Kontrolle des CMV-Promotors. (BD Biosciences, California)
- **pXJ41** (4269 bp) ein von J.H. XIAO (1990) konstruierter Vektor, der die Expression von Proteinen unter dem T7- und dem CMV-Promotor erlaubt.
- **pCDNA3** (5.4 kb) exprimiert Proteine unter Kontrolle des T7-, des Sp6- und des CMV-Promotors. Der Vektor enthält einen SV40-Replikationsursprung und eine Neomycin-Resistenz. (Invitrogen, Karlsruhe)
- **pEBG** (5.0 kb) entstammt ursprünglich aus dem eukaryonten pEF-BOS (MIZUSHIMA AND NAGATA, 1990), der die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des EF-1 α -Promotors erlaubt. pEBG entstand durch die Insertion der GST-Sequenz und einer MCS (SANCHEZ et al., 1994; TANAKA et al., 1995). Das ermöglicht die Expression von Proteinen, die N-terminal mit GST fusioniert sind.

2.3.4 Retrovirale Expressionsvektoren

- **pLXSN (5.9Kb)** ein Retroviraler Expressionsvektor, der in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden kann und dort rekombinante Retroviren produzieren, die in den Überstand abgeben werden. Dieser Überstand mit den rekombinanten Retroviren wird anschließend abgenommen und wird für die effiziente Transduktion von Zellen. Das gewünschte Gen wird unter der Kontrolle des 5'-LTR-Promotors exprimiert. Der Vektor verfügt über ein Neomycin-Resistenzgen, das zur Selektion verwendet werden kann.

(Clontech, Heidelberg)

- **pSUPERIOR.retro.puro (7296 bp)** erlaubt die intrazelluläre Expression von siRNA-Transkripten unter dem Polymerase III-H1-RNA-Promotor. Über das Ausschneiden des Stuffers über BglII/HindIII können die gewünschten siRNA-kodierenden Oligos in den Vektor eingefügt werden. Der Vektor beinhaltet eine 5'-LTR, die die Expression der gewünschten siRNA in einer Verpackungszelllinie ermöglicht und somit zur Herstellung rekombinanter Retroviren verwendet werden kann. Des Weiteren kodiert der Vektor für ein Puromycin-Resistenzgen, für, welches die Selektion von stabilen Zelllinien ermöglicht.

(Oligoengine, Seattle, USA)

2.3.5 Rekombinante Plasmide

16E6-Konstrukte:

- **pCDNA-FLAG-1-16E6** kodiert für den gesamten ORF von 16E6 und ist N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert. Ein mit den Oligonukleotiden *HPV16E6Bamup* und *HPV16E6do* amplifiziertes PCR-Fragment, wurde über BamH1 in pCDNA-FLAG-1 kloniert (MÜLLER *et al.*, 2002).
- **pCDNA-FLAG-1-16E6-N** exprimiert die N-terminalen AS 1-84 von 16E6 und ist N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert. Ein PCR-Fragment, das mit den Oligonukleotiden *HPV16E6Bamup* und *16E6NdoEco* amplifiziert wurde, wurde über BamH1/EcoRI in pCDNA-FLAG kloniert (MÜLLER, 2003).
- **pCDNA-FLAG-1-16E6-C** kodiert für die C-terminalen AS 85-151 von 16E6 und ist N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert. Ein mit den

Oligonukleotiden *16E6CupBam* und *HPV16E6Bamdo* amplifiziertes PCR-Fragment wurde über BamH1 in pCDNA-FLAG-1 kloniert (MÜLLER, 2003).

- **pCDNA-FLAG-1-16E6Δ123-126** exprimiert ein 16E6-Protein, bei dem die AS 123-126 mit den Oligonukleotiden *16E6Δ123-126A* und *16E6 Δ123-126B* mittels *in vitro* Mutagenese deletiert wurden. Es ist N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert. (MÜLLER, 2003).
- **pCDNA-FLAG-1-16E6ΔETQL** kodiert für eine N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusionierte Deletionsmutante von 16E6, bei der die letzten vier AS von 16E6, das PDZ-Bindemotiv (ETQL), mittels *in vitro* Mutagenese deletiert wurden (MÜLLER, 2003).
- **pCDNA-FLAG-1-16E6Δ26-29** kodiert für eine N-terminale FLAG-getaggte E2-bindungsdefekte Mutante von 16E6 (GRM *et al.*, 2005), bei der die AS 26-29 über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *16EΔ26-29-5'* und *16EΔ26-29-3'* deletiert wurden (MÜLLER, 2003).
- **pCDNA-FLAG-1-16E6-F47R** Über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *16E6F47R5'* und *16E6F47R3'* wurde die AS Phenylalanin an Position 47 von pCDNA 16E6 gegen ein Arginin ausgetauscht. Das Konstrukt ist N-Terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert (vorliegende Arbeit).
- **pCDNA-FLAG-1-16E6 ETQV** kodiert für eine N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusionierte Punktmutante von 16E6, die das PDZ-Bindemotiv von 18E6 exprimiert. Mittels *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *16E63'EcoRI* und *HPV16E6BamH1up* wurde die AS Leucin gegen ein Valin ausgetauscht (vorliegende Arbeit).
- **pxJ41-FLAG-16E6** kodiert für den ORF von 16E6 mit einem N-terminal fusionierten FLAG-Epitop (STEGGER, persönliche Mitteilung).
- **pGEX2T-16E6-C** Der prokaryonte Expressionsvektor kodiert für die C-terminalen AS 85-151 von 16E6 fusioniert mit GST.
- **pGEX2T-16E6-N** Der prokaryonte Expressionsvektor kodiert für die N-terminalen AS 1-84 von 16E6, der N-terminal mit GST fusioniert ist.
- **pEBG-16E6** Ein eukaryonter Expressionsvektor für ein GST-Fusionsprotein aus 16E6. Das über PCR mit den Oligonukleotiden *pEBG16E6BamH1-5'* und *HPV16E6-Bamdown* amplifiziertes Fragment wurde über BamH1 in pEBG kloniert (vorliegende Arbeit).

- **pLXSN-16E6** Ein Retroviraler Vektor zur Expression für die Expression des 16E6-Proteins und ermöglicht die Herstellung von rekombinanten Retroviren nach Transfektion in pT67-Zellen. Aus dem Vektor pVE34 (STEGGER *et al.*, 1990) wurde 16E6 isoliert und über EcoRI/BamH1 in den pLXSN-Vektor kloniert (ROTH, 2000).
- **pLXSN-16E6-P59V** kodiert für eine Deletionsmutante von 16E6-Protein. Über *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *16E6 P59V-5'* und *16E6 P59V-3'* wurde die AS Prolin an Position 59 gegen ein Valin ausgetauscht. Ermöglicht die Herstellung von rekombinanten Retroviren nach der Transfektion in pT67-Zellen (vorliegende Arbeit).
- **pCDNA-FLAGII-18E6** kodiert für den ORF von 18E6 N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert. Aus pCDNA3.1-18E6 wurde 18E6 über EcoRI/XhoI isoliert und in pCDNA-FLAGII kloniert (vorliegende Arbeit).

8E6-Konstrukte:

- **pCDNA-FLAG1-8E6** kodiert für ein N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniertes 8E6. Mittels PCR wurde der ORF für 8E6 mit den Oligonukleotiden *HPV8E6pET5'* und *HPV8E6pET3'* amplifiziert und über BamH1 in pCDNA3.1FLAG-1 kloniert (MÜLLER *et al.*, 2002).
- **pCDNA-FLAG1-8E6-C** Für die Expression der C-terminalen AS 94-155 von 8E6, das N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert ist. Ein mit den Oligonukleotiden *8E6CupBam* und *HPV8E6pET3'* amplifiziertes PCR-Produkt wurde über BamH1 in pCDNA3.1+-FLAG1 kloniert (MÜLLER, 2003).
- **pCDNA-FLAG1-8E6-N** exprimiert die N-terminalen AS 1-93 von 8E6 mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop. Über BamH1/EcoRI wurde ein PCR Fragment, das mit den Oligonukleotiden *HPV8E6pET5'* und *8E6-Ndo-Eco* amplifiziert wurde, in den Vektor pCDNA3.1+-FLAG kloniert (MÜLLER, 2003).
- **pCDNA-FLAG-1-8E6-V68P** kodiert für eine Deletionsmutante von 8E6 mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop. Über *in vitro* Mutagenese mit spezifischen Oligonukleotiden *8E6V68P-5'* und *8E6V68P-r-3'* wurde die AS Valin an Position 68 gegen ein Prolin ausgetauscht (STEGGER, pers. Mitteilung).
- **pCDNA-FLAG-1-8E6-L36S-N40V-G43K** kodiert für eine Deletionsmutante von 8E6 mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop. Über *in vitro* Mutagenese

mit den Primern *8E6N40V+G43K-5'* und *8E6N40V+G43K-3'* wurden das Leucin 36 gegen ein Serin, das Asparagin 40 gegen ein Valin und das Glycin 43 gegen ein Lysin ausgetauscht (STEGGER, pers. Mitteilung).

- **pCDNA-FLAG-1-8E6-V68P+ETQL** exprimiert die Deletionsmutante 8E6V68P fusioniert mit dem ETQL-Motiv von HPV16E6. Das Konstrukt wurde durch die Klonierung eines PCR-Fragment, das mit den Oligonukleotiden *8E6+ETQL-Eco-Do* und *HPV8E6pET5'* amplifiziert wurde, hergestellt. Das Protein ist N-terminal mit dem FLAG-Epitop fusioniert (vorliegende Arbeit).
- **pGEX2T-8E6** kodiert für den gesamten ORF von 8E6, das N-terminal mit dem GST-Protein fusioniert ist (STEGGER, persönliche Mitteilung).
- **pEBG-8E6** Ein eukaryonter Expressionsvektor, der 8E6 mit N-terminal fusionierten GST-Tagg kodiert. Das über PCR mit den Oligonukleotiden *pEBG-8E6BamH1-5'* und *HPV 8E6-3'* amplifizierte 8E6-Fragment wurde über BamH1 in pEBG kloniert (vorliegende Arbeit).
- **pLXSN-8E6** kodiert für das 8E6-Protein und ermöglicht die Herstellung von rekombinanten Viren in pT67-Zellen. Aus pVE34-8E6-Konstrukt (STEGGER *et al.*, 1990) wurde 8E6 über EcoRI/BamH1 ausgeschnitten und in den pLXSN-Vektor kloniert (ROTH, 2000).
- **pLXSN-8E6-V68P** kodiert für ein 8E6-Protein, bei dem die AS Valin an Position 68 gegen ein Prolin ausgetauscht wurde. Aus pCDNA-FLAG-8E6-V68P wurde 8E6-V68P über BamH1 in den pLXSN-Vektor einkloniert. Ermöglicht die Herstellung rekombinanter Retroviren (vorliegende Arbeit).
- **pxJ41-FLAG-8E6** kodiert für 8E6 mit N-terminal fusionierten FLAG-Epitop. Aus pCDNA-FLAG-8E6 wurde der ORF für FLAG-8E6 über HindIII/XhoI isoliert und pxJ41 kloniert (STEGGER, persönliche Mitteilung).

E2-Konstrukte:

- **pCDNA-FLAGII-16E2** exprimiert den gesamten ORF von 16E2 und ist N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert. Hierfür wurde 16E2 aus pET14b ausgeschnitten und über XhoI in pCDNA-FLAGII kloniert (vorliegende Arbeit).

PTPH1-Konstrukte:

- **pACT2-PTPH1** kodiert für den ORF von PTPH1 ohne Exon 12. Ist über EcoRI/XhoI in pACT2 Vektor kloniert (TÖPFFER, 2005).
- **pCDNA-FLAG-1-PTPH1** kodiert für den ORF von PTPH1 ohne Exon 12, mit N-terminal fusionierten FLAG-Epitop. Aus pACT2-PTPH1 wurde PTPH1 über EcoRI isoliert und in pCDNA-FLAG-1 kloniert (vorliegende Arbeit).
- **pCMV-Myc-PTPH1** kodiert für PTPH1 ohne das Exon 12, das N-terminal mit dem Myc-Epitop fusioniert ist. Aus pACT2-PTPH1 wurde PTPH1 über EcoRI isoliert und in pCMV-Myc kloniert (vorliegende Arbeit).
- **pGEX5x-2-PTPH1** kodiert für ein N-terminal mit dem GST-Protein fusioniertes PTPH1 ohne Exon 12. Aus pACT2-PTPH1 wurde PTPH1 über EcoRI isoliert und in pGEX5x-2 kloniert (vorliegende Arbeit).
- **pCDNA-FLAG-1-PTPH1 Δ 504-598** exprimiert eine Deletionsmutante von PTPH1, bei der die PDZ-Domäne (AS 504-598) über *in vitro* Mutagenese mit den spezifischen Primern *PTPH1 Δ PDZ-5'* und *PTPH1 Δ PDZ-3'* deletiert wurde, mit N-terminal fusionierten FLAG-Epitop (vorliegende Arbeit).
- **pCMV-Myc-PTPH1 Δ 504-598** exprimiert N-terminal mit dem Myc-Epitop fusioniertes PTPH1 und der PDZ-Domäne (AS 504-598). PTPH1 Δ 504-598 wurde aus pCDNA-FLAG1-PTPH1 Δ 504-598 über EcoRI ausgeschnitten und in pCMV-Myc kloniert (vorliegende Arbeit).
- **pCDNA3-HA-PTPH1+Ex** exprimiert den ORF von PTPH1, das N-terminal mit dem HA-Epitop fusioniert ist, inklusive des Exon 12. (ZHANG *et al.*, 1999).
- **pEBG-PTPH1+Ex** kodiert für PTPH1 inklusive Exon 12, das N-terminal mit dem GST-Protein fusioniert ist (ZHANG *et al.*, 1999).
- **pEBG-PTPH1 D811A** exprimiert eine GST-fusionierte Deletionsmutante von PTPH1, bei der die AS Aspartat an Position 811 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (ZHANG *et al.*, 1999).
- **pEBG-PTPH1 Y676F** kodiert für eine GST-fusionierte Deletionsmutante von PTPH1, bei der mittels *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PTPH1-Y676F-5'* und *PTPH1-Y676F-3'* das Tyrosin an Pos. 676 in pEBG-PTPH1+Ex gegen ein Phenylalanin ausgetauscht wurde (vorliegende Arbeit).

- **pEBG-PTPH1 D811A/Y676F** kodiert für eine GST-fusionierte Deletionsmutante von PTPH1, bei der mittels *in vitro* Mutagenese mit den Oligonukleotiden *PTPH1-Y676F-5'* und *PTPH1-Y676F-3'* das Tyrosin an Position 676 im pEBG-PTPH1-D811A-Konstrukt gegen ein Phenylalanin ausgetauscht wurde (vorliegende Arbeit).

p53-Konstrukte:

- **pCDNA-FLAG1-p53** kodiert für p53 mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop. Aus pBS-FLAG-p53 wurde p53 über NotI isoliert und in pCDNA-FLAG-1 kloniert (STEGGER, persönliche Mitteilung).

siRNA-Konstrukte:

- **pTER⁺-LV** beinhaltet einen H1-Promotor und einen Tet-Operator, die in den Basis-Vektor pCDNA3-Zeo kloniert wurden. Er verfügt über einen 750bp großen Stuffer, der über BglII und HindIII ausgeschnitten werden kann und durch eine siRNA-Sequenz ersetzt werden kann. Dieser Vektor ermöglicht die Expression von siRNAs, die bei Ko-Transfektion mit einem Tet-Repressor durch die Zugabe von Doxzyklin reguliert werden kann (VAN DE WETERLING *et al.*, 2003).
- **pSUPERIOR.retro.puro-LV** (Beschreibung siehe Retrovirale Vektoren).
- **pTER⁺siRNA mPTPH1A** exprimiert eine Maus-PTPH1-A-siRNA. Die Oligonukleotide *siRNAmPTPH1-A-5'* und *siRNAmPTPH1-A-3'* wurden über BamH1/HindIII in pTER⁺ kloniert (vorliegende Arbeit).
- **pTER⁺siRNA mPTPH1B** exprimiert eine Maus-PTPH1-B-siRNA. Die Oligonukleotide *siRNAmPTPH1-B-5'* und *siRNAmPTPH1-B-3'* wurden über BamH1/HindIII in pTER⁺ kloniert (vorliegende Arbeit).

2.3.6 DNA-Längenstandards

- 1kb DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
- 1kb plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
- 100bp Ladder (MBI Fermentas)

2.3.7 Sonstige Nukleinsäuren

- Desoxyribonukleotide (dNTP's) (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.4 Proteine

2.4.1 Enzyme

- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Accu-Pol-DNA-Polymerase (Biomol, Hamburg)
- Taq-Polymerase (Biomol, Hamburg)
- RNAse A (Invitrogen, Karlsruhe)
- T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- RNAse Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- RNAse freie DNase (Qiagen, Hilden)
- Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen bezogen:
 - MBI-Fermentas (St. Leon-Rot)
 - Invitrogen (Karlsruhe)
 - New England BioLabs GmbH (Schwalbach)
 - Roche Diagnostics (Mannheim)

2.4.2 Antiseren

- **α -PTPH1** monoklonaler Maus Antikörper, der mit in Sf9 Zellen gereinigten full-length PTPH1 als Antigen hergestellt wurde. (ZHANG *et al.*, 1997)
- **α -p53 (DO1)**: monoklonaler Maus Antikörper, der gegen die Aminosäuren 11-25 des humanen p53 gerichtet ist und der Wildtyp und mutiertes humanes und murines p53 detektiert. (Santa Cruz, California)
- **α -c-Myc**: ein monoklonaler Maus Antikörper(9E10), der mit den Aminosäuren 408-439 des humanen c-Myc-Epitop reagiert. (Roche, Indianapolis)
- **α -HA**: monoklonaler Antikörper, der in der Ratte hergestellt wurde und der das Hämagglutinin-Epitop des Influenza-Virus erkennt. (Roche, Indianapolis)

- **α -FLAG (M5):** monoklonaler Maus-Antikörper, der an N-terminale Met-FLAG-Fusionsproteine bindet, die in Säuger- oder Drosophila-Zellen exprimiert werden. (Sigma, Saint Louis)
- **α -Aktin (C-11):** ein polyklonaler Ziege-Antikörper, der gegen ein Peptid am C-Terminus von humanen Aktin gerichtet ist. (Santa Cruz, California)
- **α -Py-20:** ein monoklonaler Maus-Antikörper, der unabhängig von der Spezies mit phospho-tyrosin-haltigen Proteinen und auch mit Phosphotyrosin als freie Aminosäure reagiert. (Biomol, Hamburg)
- **α -VCP:** polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der die C-terminalen Aminosäuren 687-806 des humanen, Maus und Ratten Vorläufer und nicht gereiftes VCP erkennt. (Santa Cruz, California)
- **α -8E6:** polyklonaler Meerschwein-Antikörper, der humanes 8E6 erkennt. (persönliche Mitteilung: Janet Brandsma)
- **α -Maus/Kaninchen POD:** POD gekoppelter Antikörper gegen Maus und Kaninchen IgG. (Roche, Indianapolis)
- **α -Maus POD (κ):** POD gekoppelter Antikörper, der die leichte Kette des Maus IgG erkennt. (DPC, Biermann, Bad Nauheim)
- **α -Maus POD (whole molecule):** POD gekoppelter Antikörper gegen Maus IgG. (Dianova, Hamburg)
- **α -Ratte POD:** POD gekoppelter Antikörper gegen Ratten IgG (Roche, Indianapolis).
- **α -Goat IgG:** POD gekoppelter Antikörper gegen Ziegen IgG. (Sigma, St. Louis)
- **α -Guinea-pig POD:** POD gekoppelter Antikörper gegen Meerschwein IgG. (persönliche Mitteilung: Janet Brandsma)

2.4.3 Größenstandards

- **Mass Weight Protein Marker:** Mischung von sechs Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20 bis 120 kDa. (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- **Prestained Mass Weight Protein Marker:** Mischung von sechs Proteinen mit einem Molekulargewicht von 20 bis 120 kDa, die kovalent an ein blaues Chromophor gebunden sind. (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

2.4.4 Phosphopeptide

- Tyrosin-Phosphopeptid (RRLIEDAE(pY)AARG) (Upstate, New York, USA)
- *Growth Hormone Receptor*-Phosphopeptide (NFLMDNA(pY)FCEADAKK)
(PanTecs, Tübingen)

2.4.5 Präzipitationsreagenzien

- Protein G-PLUS-Agarose (Santa Cruz, St. Leon-Rot)
- Protein A-Agarose (Santa Cruz, St. Leon-Rot)
- ANTI-FLAG[®] M2-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- ANTI-c-Myc *Agarose Conjugate* (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glutathion-Sepharose[™]4B (Amersham, Freiburg)

2.5 Protease Inhibitoren

- **Aprotinin:** Serin-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Kallikrein und Chymotrypsin. (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Leupeptin:** Serin-, Thiol-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Plasmin, Proteinase K, Papain, Kallikrein, Thrombin, Cathepsin A und B. (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Pepstatin:** Aspartat-Protease-Inhibitor, inhibiert: Pepsin, Renin, Cathespin D und mikrobische Säureproteasen. (AppliChem, Darmstadt)
- **PMSF:** Serin-, Cystein-Protease-Inhibitor, inhibiert: Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin und Papain. (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Natriumorthovanadat:** Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- **Pervanadat:** Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor. Hiefür wurde Na-Orthovanadat mit Hydrogen-Peroxid versetzt.

2.6 Radioaktivität

- ³⁵S-Methionin (Amersham Biosciences, Freiburg)
- ³⁵S-Cystein (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.7 Medien

2.7.1 Medien und Antibiotika für die Bakterienkultivierung

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

Fertigmedium von AppliChem (Darmstadt)

Trypton 10g/l

Hefe-Extrakt 5g/l

NaCl 10g/l

(pH-Wert: 7.2)

25g/l H₂O

20 min. bei 121°C autoklaviert und anschließend bei 4°C gelagert. Zur Selektion wurden entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin hinzugegeben.

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stocklösung: 100 mg/ml wurden in H₂O gelöst und steril filtriert.

SOC-Medium

SOB-Medium 250 ml

40% Glucose 1ml

Das SOB-Medium wurde bei 121°C für 20 min. autoklaviert und anschließend die Glucose dazugegeben.

Kanamycin

Stocklösung: 100 mg/ml wurden in H₂O gelöst und steril filtriert.

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

Fertigmedium von AppliChem (Darmstadt)

Trypton 10 g/l

Hefe-Extrakt 5 g/l

Agar 15g/l

NaCl 10g/l

(pH-Wert: 7.2)

40g/l H₂O

20 min. bei 121°C autoklaviert. Der Agar wurde auf ca. 50°C abgekühlt und in eine Petrischale gegossen, welche anschließend bei 4°C gelagert wurden. Zur Selektion wurden entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin hinzugegeben.

2.7.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung eukaryoter Zellen

- **Dulbecco's MEM** (*Modified Eagle Medium*) (Invitrogen, Karlsruhe)
mit Glutamax™, 4500 mg/l Glucose, ohne Natriumpyruvat

Zusätze:

FCS	10%	
Streptomycinsulfat	100mg/ml	
Penicillin	100mg/ml	(alles Invitrogen, Karlsruhe)

- **E-Medium** (für RTS3b-Zellen)

Dulbecco's MEM	50%	
DMEM/F12	50%	(beides Invitrogen, Karlsruhe)
Transferin	5 µg/ml	
Triiod-tyronin	$2 \times 10^{-11} \text{M}$	
Adenin	$1.8 \times 10^{-4} \text{M}$	
Insulin	5 µg/ml	
Hydrocortison	0.4 µg/ml	(alle Sigma-Aldrich, Steinheim)
Epinephrin	1 µg/ml	(Calbiochem, Schwalbach)
EGF	10ng/ml	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
FCS	10%	
Streptomycinsulfat	100 mg/ml	
Penicillin	100 mg/ml	(alle Invitrogen, Karlsruhe)

- **Trypsin/EDTA**

- **PBS** (beide Invitrogen, Karlsruhe)

- **Einfriermedeium:**

DMSO	10%
FCS	90%

2.7.3 Antibiotika für die Zellkultur

- **Blasticidin S HCl:** Nukleosidisches Antibiotika aus *Streptomyces grieseochromogenes* verhindert die Proteinsynthese, durch die Inhibition der Ausbildung von Peptid-Verbindungen in der ribosomalen Maschinerie, in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen. Eine Resistenz wird entweder durch die Expression des Blasticidin S Deaminase Gens *bsd* aus *Aspergillus terreus* oder *bsr* aus *Bacillus cereus* vermittelt. Diese Deaminasen verwandeln Blasticidin S in ein nicht toxisches Deaminohydroxy-Derivat.
(Invitrogen, Karlsruhe)
- **Zeocin:** Gehört zu der Familie der Bleomycin/Phleomycin Antibiotika, die aus *Streptomyces* isoliert wurden. Es zeigt eine starke Toxizität gegen Bakterien, Pilze, Hefen, Pflanzen und gegen Säugerzelllinien. Das Zeocin-Resistenzprotein, das das Produkt des *Sh ble* Gens (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin Gen) ist, bindet stöchiometrisch an Zeocin und inhibiert seine DNA-Spaltungs-Aktivität. Die Expression dieses Proteins in Eukaryonten, Prokaryonten und in Hefen führt zu einer Resistenz gegen Zeocin und kann somit für die Selektion positiver Organismen genutzt werden.
(Invitrogen, Karlsruhe)
- **Puromycin:** Puromycin ist ein aminonucleosidisches Antibiotikum, das aus *Streptomyces alboniger* isoliert wurde, und spezifisch den Peptidyl-Transfer auf eukaryonten und prokaryonten Ribosomem inhibiert. Es inhibiert sowohl das Wachstum von gram positiven Bakterien als auch von verschiedenen Insekten- und Tierzellen und wird für die Selektion von Säugerzellen, die ein Gen, das für die Puromycin-N-Acetyl-Transferase (*pac*) kodiert, exprimieren.
(PAA, Pasching, Österreich)
- **G418-Sulfat:** G418-Sulfat ist ein Aminoglykosid-Antibiotika, das aus *Micromonospora rhodorangea* isoliert wurde, und blockt die Polypeptid-Synthese in eukaryonten und prokaryonten Zellen durch die irreversible Bindung an das 80S-Ribosom und die Inhibition der Elongation. Es wird als Selektionsmarker in der Zellbiologie eingesetzt werden, da Zellen, die das Neomycin-Gen exprimieren, eine Resistenz gegenüber aufweisen.
(PAA, Pasching, Österreich)

2.8 Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendet Laborchemikalien wurden von AppliChem (Freiburg), BioRad (München), Sigma-Aldrich (Steineim), Invitrogen (Karlsruhe) und Roth (Karlsruhe) bezogen und besaßen den Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“ (zur Analyse).

2.8.1 Puffer und Lösungen

Für Proteingele:

SDS-Polyacrylamidgel (PAG)

Trenngel:

Acrylamid	8-15%
Tris/Cl/SDS, pH 8.8	25%
10% Ammoniumpersulfat	0.33%
TEMED	0.1%

Sammelgel:

Acrylamid	3.9%
Tris/Cl/SDS, pH 6.8	25%
10% Ammoniumpersulfat	0.33%
TEMED	0.1%

2x SDS-Probenpuffer

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

Entfärberlösung

Methanol	5%
Essigsäure	7%

4x Tris/Cl/SDS, pH 8.8

Tris-Base	1.5 M
SDS	0.4%
(mit 1N HCl auf pH 8.8 eingestellt)	

4xTris/Cl/SDS, pH 6.8

Tris-Base	0.5 M
SDS	0.4%
(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%

Für Western Blots:**Transferpuffer**

Tris-Base	25 mM
Glycerin	192 mM
Methanol	20%

TBST

TrisCl, pH 8.0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0.05%

Abblock-Lösung

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

Antikörper-Verdünnungslösung

Milchpulver in TBST	2%
------------------------	----

Für die Herstellung von Ganzzelextrakten:**LSDB (Low Salt Dilution Buffer)**

Glycerin	20%
Tris/Cl pH 7.9	50 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
NP40	0.1%
KCl	0-100 mM

Als Lysispuffer wurde der LSDB mit Protease-Inhibitoren (PI) versetzt (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin je 0.1 mM und Na-Orthovanadat 1 mM).

RIPA-Buffer

Tris/Cl pH. 7.6	25 mM
NaCl	150 mM
NP40	1%
Na-Deoxycholat	1%
0.1%	SDS

Als Lysispuffer wurde der RIPA-Buffer mit Protease-Inhibitoren (PI) versetzt (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin je 0.1 mM und Na-Orthovanadat 1 mM).

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

Tris-Acetat	2 M
EDTA	50 mM

Ethidiumbromidbad

Ethidiumbromid in H ₂ O	0.5 µg/ml
---------------------------------------	-----------

Farbmarker (6x)

Glycerin	30%
Bromphenolblaulösung	0.25%
Xylen-Cyanol-Lösung	0.25%
Tris pH 7.5	10 mM
EDTA	1 mM

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

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

2x HBS

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.5 mM
HEPES pH 7.05	50 mM

TE-Puffer (pH 7.9)

Tris/Cl	10 mM
EDTA	

Pervanadat-Stocklösung:

Na-Orthovanadat	30 mM
Hydrogen-Peroxid in PBS	0.18%
In PBS gelöst.	
Endkonzentration: 1 mM	

2.8.2 Sonstige Chemikalien und Materialien

- Agarose („low EEO“) (AppliChem, Darmstadt)
- Albumin Fraktion V (AppliChem, Darmstadt)
- Amplifizierer („Amplify Fluographic Reagent) (Amersham, Freiburg)
- BCA™ Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA)
- β-Mercaptoethanol (AppliChem, Darmstadt)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (AppliChem, Darmstadt)
- Formaldehyd (Merck AG, Darmstadt)
- FuGene6 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- GIEMSA-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung) (Merck AG, Darmstadt)
- Hyperfilm für ECL und Autoradiographie (Pierce, Rockford, USA)
- IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- MG132-Inhibitor (Proteasom-Inhibitor) (Serva, Heidelberg)
- Ponceau-S-Rot (AppliChem, Darmstadt)
- *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (BioRad, München)
- RNase-Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- Saponin (AppliChem, Darmstadt)
- *Sequabrene* (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin) (AppliChem, Darmstadt)
- Western Blot Membranen (Nitrocellulose, 0.45µm) (Schleicher & Schüll, Dassel)

2.8.3 Reagenziensysteme (Kits)

- QIAprep Spin/Qiaprep 8 Miniprep Kit (Qiagen, Heidelberg)
- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Heidelberg)
- Invitrogen Filter-Maxi-Prep (Invitrogen, Karlsruhe)
- QIAquick *Gel Extraction* Kit (Qiagen, Heidelberg)
- QIAquick *PCR Purification* Kit (Qiagen, Heidelberg)
- QIAGEN *OneStep* RT-PCR Kit (Qiagen, Heidelberg)
- Quick ChangeTM *Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg)
- TNT *Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promgega, Madison, USA)
- Protein-Tyrosin-Phosphatase-Assay Kit 1 (Upstate, New York, USA)
- QIAGEN RNeasy Mini Kit (Qiagen, Heidelberg)
- QIAshredder (Qiagen, Heidelberg)

3 METHODEN

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Kulturen zur Plasmidisolierung

Da alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide über ein Ampicillin- bzw. ein Kanamycin-Resistenzgen verfügen, konnte mit der Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin sowohl im Flüssigmedium als auch auf Agarplatten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden. Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml-PE-Röhrchen (Sarstedt) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rotationsinkubator geschüttelt. Für die präparative Plasmidisolierung wurden die Kulturen in einem Volumen von bis zu 200 ml LB-Medium in einem sterilen Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht bei 37°C im Bakterien-Schüttler inkubiert.

3.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Die kompetenten E.coli XL1-Blue Bakterien wurden nach der Methode von CHUNG UND MILLER (1988) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden in einem sterilen ein Liter Erlenmeyerkolben mit 2.5 ml einer frischen Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,5 inkubiert. Mit 20 ml dieser Kultur wurde eine zweite Kultur von 100 ml LB-Medium angeimpft, welche wiederum bis zu einer Absorption von 0,5 inkubiert wurde. Der Kolben mit den Bakterien wurde dann für 10 min auf Eis gestellt und die Bakterien anschließend 10 min bei 4°C und 3000 g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 5ml eiskalten TSB resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu je 500 µl aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei - 80°C

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

3.1.3 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation von kompetenten XL1-Bakterien wurde die zu transformierende DNA mit 100 µl Bakterien vermischt und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach weiteren 3 min auf Eis erfolgte die Selektion der transformierten Zellen auf einer ampicillin- oder kanamycinhaltigen LB-Agar-Platte über Nacht bei 37°C.

3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien

Einer dichten Bakterienvorkultur wurden 1000 µl entnommen und mit 500 µl 50% Glycerin vermischt. Dieser Glycerolstock wurde auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2 Zellkulturen

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

3.2.1 Kultivierung eukaryoter RTS3b-, SiHa-, HaCat-, Hela, pT67, C127i, NIH3T3 und C33a-Zellen

Da strikt adhärennte Zelllinien kontaktinhibiert sind, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen passagiert. Dabei wurden die Monolayer bei einer Konfluenz von höchstens 90% mit PBS gewaschen und mit einer entsprechenden Menge an Trypsin versetzt, die den gesamten Zellrasen gerade bedeckte. Nachdem sich die Zellen gelöst hatten, wurden sie im frischen Medium resuspendiert und je nach erwünschten Dichtegrad und Bedarf in ein neues Gewebekulturgefäß ausgesät.

3.2.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Für die Lagerung von Zellen wurden die in einer Gewebekulturflasche (150 cm²) zu 80-90% konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen, mit 5 ml

Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und in 9 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie 5 min bei 300 g pelletiert und das Pellet in 4.5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1.5 ml in Einfrierröhrchen (Nunc) aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.3 Pervanadat-Behandlung von Zellen

Um Tyrosin-phosphorylierte Proteine zu stabilisieren wurden HaCat-Zellen in einer 30mM Pervanadat-Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden aus diesen Zellen Ganzzellextrakte gewonnen, die für einen „*Substrat-Trapping-Assay*“ eingesetzt wurden.

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl in einer Suspension zu ermitteln, wurde eine Neubauer-Zählkammer, auf die ein Deckglas gelegt wurde, verwendet. Sie ist in neun große zu einem Quadrat angeordnete Hauptfelder unterteilt, hat eine Tiefe von 0.1 mm und eine Fläche von 0.002 m². Mit einer Pasteur-Pipette wurde von der zuvor gut gemischten Suspension ein Aliquot an den Deckglasrand auf der Zählkammer gegeben. Das Zellgemisch wurde dann mit Hilfe der Kohäsionskräfte unter das auf der Neubauer-Kammer haftende Deckglas gesogen. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Zellen in den vier Hauptfeldern der Ecken gezählt und der Mittelwert gebildet. Die Anzahl in einem Hauptfeld gezählten Zellen multipliziert mit 10⁴ entsprach der Anzahl der Zellen in einem ml der Suspension.

3.2.5 Transfektion von Zellen

Mit den C33a- und den RTS3b-Zellen wurden transiente Transfektionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden Transfektionsreagenzien verwendet, deren Prinzip darauf beruht, dass die eingesetzte DNA mit dem Reagenz eine Komplexbildung eingeht. Diese Komplexe können von den Zellen aufgenommen werden, wobei die dabei eingeschleuste DNA in der Regel nicht in das Genom der Zelle integriert wird und somit im Verlauf der Zellteilung wieder verloren geht. Die so

transfizierten Zellen wurden nach 24-48h nach der Transfektion auf die Expression der jeweiligen Proteine untersucht.

3.2.5.1 Transfektion mit „FuGENE“

Für die Transfektion mit „FuGENE“ wurden 0.9×10^5 RTS3b-Zellen pro six-well ausgesät und anschließend bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden pro Probe 100 μl serumfreies Medium und 2 μl „FuGENE“-Transfektionsreagenz pro μg zu transfizierende DNA für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, jeweils 100 μl des Gemisches auf die DNA geträufelt und zur Komplexbildung 15 min bei RT inkubiert. Das DNA-„FuGENE“-Gemisch wurde anschließend in das Medium, der in der 6-well-Platte ausgesäten RTS3b-Zellen, pipettiert, die Platten leicht geschwenkt und bis zur Ernte für 24-48h bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

3.2.5.2 Transfektion mit CaPO_4

Für die Calciumphosphat-Präzipitation (nach AUSUBEL *et al.*, 1992) wurden pro 15 cm Zellkulturschalen wurden 6.25×10^6 C33a-Zellen in 20 ml Medium verdünnt und diese dann über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Am darauf folgenden Tag wurde unter der Sterilbank die zu transfizierende DNA (bis zu 30 μg) mit 650 μl H_2O und 750 μl 2x HBS vermischt. Nach Zugabe von 100 μl 2 M CaCl_2 wurden die Proben sofort für 10 sec mit Hilfe eines Vortexers gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat vorsichtig in das Medium der Zellen geträufelt, die Schalen geschwenkt und über Nacht im Brutschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen im frischen Medium eine weitere Nacht bei 37°C inkubiert, bevor sie am nächsten Tag geerntet wurden. NIH3T3- und C127i-Zellen wurden ebenso transfiziert, allerdings wurden sie in six-wells in einer Konzentration von 1.5×10^5 ausgesät. Die Konzentration von H_2O , 2x HBS und 2M CaCl_2 wurde auf die Größe der Wells angepasst.

3.2.6 Ernte der transfizierten Zellen

3.2.6.1 Ernte durch physikalischen Zellaufschluss und Herstellung von Ganzzellextrakten

C33a-Zellen in 15 cm Zellkulturschalen wurden zweimal mit 10 ml 1 x PBS gewaschen und in 150 µl 0,1 M LSDB-Puffer + Protease-Inhibitoren bzw. RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren (für den Nachweis von endogenem PTPH1) mit einem Gummischaber vom Boden abgeschabt, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min im Biorupter (Dianova) sonifiziert. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile des Überstandes durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 21.000 g pelletiert. Der im Überstand enthaltene Zellextrakt wurde in ein neues Gefäß überführt und für Experimente wie bspw. Koimmunopräzipitationen oder einen Phosphatase-Assay eingesetzt.

3.2.6.2 Ernte durch chemischen Zellaufschluss

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

3.2.7 Luciferase-Assay

Für den Luciferasetest wurde pro Probe 300µl an Luciferase-Reaktionspuffer 1:100 mit D-Luciferin versetzt. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte im Lumat LB9501 (Berthold, Wildbach). Nach drei Waschschritten des Gerätes mit diesem Luciferinpuffer wurden jeweils 100 µl Zellextrakt in ein Messröhrchen gegeben und diese unmittelbar danach in den Lumat gestellt. Nach Injektion von 300 µl luciferinhaltigen Puffer wurde die Lichtemission im Lumat über einen Zeitraum von 10 sec gemessen. Der ermittelte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der

exprimierten Luciferase, die zur Anzahl der Zellen (Proteinkonzentrationsbestimmung) relativiert wurde (RLU/Proteinkonzentration).

3.2.8 Herstellung einer stabilen Zelllinien

Für die Herstellung von stabilen Zelllinien wurden die jeweiligen Zellen in einem six-well ausgesät, nach 24h mit einer geringen Menge des gewünschten Konstrukts, das für eine Antibiotikaresistenz kodiert, mit einer der oben genannten Methoden transfiziert und anschließend die positiven Zellen über die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums zum Medium selektioniert. Die Expression der stabil transfizierten DNA wurde anhand eines Luciferase-Assays oder einer RT-PCR überprüft. Die stabilen Zelllinien wurden immer in Gegenwart des jeweiligen Antibiotikums kultiviert.

3.2.8.1 pTER⁺siRNAmPTPH1-C127i

Für die Herstellung dieser stabilen Zelllinie wurden 1.5×10^5 -C127i-Zellen in einem six-well ausgesät und nach 24h mit 2 bzw. 5 μg des pTER⁺siRNAmPTPH1-A bzw. B-Konstrukts und dem pTER⁺-LV mittels der CaPO₄-Methode transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin selektioniert. Die Expression der siRNA wurde mittels RT-PCR überprüft.

3.2.9 Retrovirale Infektion von Zellen

3.2.9.1 Beschreibung des RetroX-Systems

Mit Hilfe des RetroX-Systems der Firma Clontech (Heidelberg) können infektiöse, rekombinante aber replikationsunfähige Retroviren hergestellt werden, die es erlauben, ein gewünschtes Gen in eine Vielzahl von Säugerzellen einzubringen und stabil in das Wirtsgenom zu integrieren.

Für die Produktion der rekombinanten Retroviren sind zwei Komponenten notwendig: Zum einem die Verpackungszelllinie pT67 und der retrovirale Vektor pLXSN. Die Zelllinie pT67 basiert auf der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3 und exprimiert die viralen Strukturgene *env*, *gag* und *pol* des *Moloneys Mausleukämievirus Typ 10A1*,

die notwendig für die Partikelformation und die Replikation sind. Allerdings exprimieren sie nicht das ψ^+ -RNA-Verpackungssignal. Das virale *env* 10A1-Gen kodiert für die Oberflächenproteine, die über zwei unterschiedliche Rezeptoren, dem amorphen Retrovirus Rezeptor und dem GALV-Rezeptor, an die Zelle binden und sie infizieren können.

Die zweite Komponente des Systems ist der retrovirale Vektor pLXSN, der ebenfalls Elemente des Moloney-Mäuseleukämievirus Typ 10A1 beinhaltet. Er verfügt neben den 5'- und 3'-LTRs, wovon der erste auch als Promotor für die Kontrolle der Expression des gewünschten Gens zuständig ist, auch über das Verpackungssignal ψ^+ , das in Kombination mit dem *gag*-, *pol*- und *env*-Gen der Verpackungszelllinie erst die Entstehung rekombinanter Viren erlaubt. Da die rekombinanten Retroviren keine Strukturgene exprimieren, sind sie replikationsunfähig. Somit können diese Retroviren eine Vielzahl Zellen infizieren und das gewünschte Gen weitergeben, jedoch nicht in diesen Zellen replizieren.

3.2.9.2 Herstellung von rekombinanten Retroviren

Für die Herstellung von rekombinanten Retroviren, zur Überexpression der E6-Proteine wurden zunächst die gewünschten ORFs (16E6, 16E6-P59V, 8E6, 8E6-V68P) in den retroviralen pLXSN-Vektor kloniert. Für die Gewinnung der rekombinanten Retroviren für die siRNA-Konstrukte wurde der retrovirale pSUPERIOR-Vektor verwendet. Für die Etablierung von stabilen Verpackungszelllinien wurden die Verpackungszellen pT67 in einer Konzentration von 1.0×10^5 in six-wells ausgesät. Am nächsten Tag wurden $3 \mu\text{g}$ der jeweiligen DNA in einem retroviralen Vektor mittels „FuGENE“ transfiziert und nach 48h mit $500 \mu\text{g/ml}$ G418 bzw. $3 \mu\text{g/ml}$ Puromycin selektioniert. Nach Abschluss der Selektion wurden die Zellen in eine große Zellkulturflasche überführt und bis zu einer Konfluenz von ca. 90% bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden 16 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben und diese über Nacht (bzw. bis zu 24h) bei 32°C und 10% CO_2 zur Induktion der Virusproduktion inkubiert. Am folgenden Tag konnte der infektiöse Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren werden oder direkt für eine retrovirale Infektion verwendet werden.

3.2.10 Herstellung von retroviral infizierten, stabilen Zelllinien

Für die Herstellung einer retroviral infizierten, stabilen Zelllinie wurden die Zellen in einem six-well ausgesät und am nächsten Tag für 10 min bei 37°C mit 2 ml DMEM ohne Zusätze mit 5 µg/ml Polybrene inkubiert. Anschließend wurde pro six-well ein Gemisch aus 2 ml retroviralem Überstand mit 2 ml DMEM ohne Zusätze und 5 µg/ml Polybrene auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 300 g 1h bei RT zentrifugiert, dann zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit 2 ml Medium überschichtet. Es folgte eine 48-stündige Inkubation bei 37°C, bei der die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht haben sollten. Anschließend wurden die infizierten Zellen trypsinisiert in einem antibiotikahaltigen Medium, entsprechend der auf dem Vektor kodierten Resistenz, für 72h selektioniert. Die positiven Zellen wurden anschließend expandiert und die Expression der jeweiligen Gene mittels RT-PCR nachgewiesen. Die stabil infizierten Zellen wurden immer in der Gegenwart des zur Selektion verwendeten Antibiotikums kultiviert.

Bei Ko-Infektion mit einem weiteren Retrovirus, erfolgte ein zweiter Infektionszyklus, mit anschließender Selektion über einen anderen Selektionsmarker und Überprüfung der jeweiligen Genexpression mittels RT-PCR. Die Kultivierung dieser koinfizierten Zellen erfolgte in der Gegenwart der beiden verwendeten Selektionsmarker.

3.2.10.1 Retrovirale Infektion von RTS3b-Zellen mit pLXSN-E6-Konstrukten

RTS3b-Zellen wurden in einer Konzentration von 0.9×10^5 in einem six-well ausgesät und am nächsten Tag mit retroviralem Überstand von pLXSN-LV, -8E6, -8E6-V68P, -16E6 und -16E6-P59V nach Protokoll infiziert. Nach 48stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in 800 µg/ml G418-haltigen E-Medium gesplittet und für weitere 72h bei 37°C selektioniert. Anschließend wurden die Zellen expandiert und mittels RT-PCR die Expression der Gene überprüft.

3.2.10.2 Retrovirale Infektion von C127i-Zellen mit rekombinanten Retroviren für verschiedene 8E6 Protein

Für die Herstellung dieser C127i-Zelllinie wurden die Zellen in einer Konzentration von 1.5×10^5 in einem six-well ausgesät und am nächsten Tag mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-LV, -8E6 und -8E6-V68P nach Protokoll

infiziert. Nach 48stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in 800 µg/ml G418-haltigen DMEM gesplittet und für 72h selektioniert. Nach abgeschlossener Selektion wurden die Zellen expandiert und für weitere Experimente verwendet.

3.2.11 Wachstumsassay im reduzierten E-Medium

Für den Wachstumsassay im reduzierten E-Medium (-EGF, -Insulin und 0.25% FCS) wurden RTS3b-pLXSN-LV, -pLXSN-8E6, pLXSN-8E6-V68P, pLXSN-16E6 und pLXSN-16E6-P59V Zellen trypsiniert und im reduzierten Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 0.9×10^5 Zellen ausgesät und das Wachstum der Zellen über eine Zeitspanne von zwei Wochen beobachtet. Die Zellen wurden alle drei Tage mit 2 ml frischem, reduziertem Medium versorgt.

3.2.12 Soft-Agar-Assay

Für den Soft-Agar-Assay wurden zunächst six-well-Platten mit einer Agaroselösung beschichtet. Hierfür wurde autoklavierte 1.2% Agarose im Verhältnis 1:1 mit 2x MEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gemischt und je 1 ml dieser 0.6%igen Agaroselösung in ein six-well gegeben. Die beschichteten Platten wurden über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die entsprechenden C127i-Zellen in einer Konzentration von 1.875×10^5 zu 2.5 ml 0.3%iger Agaroselösung + 2x MEM + 10% FCS + 1% Pen/Strep gegeben, jeweils 1 ml dieser Zell-Agaroselösung auf die beschichteten Agarose-six-wells geträufelt und die Platten 10 Minuten bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Platten für 2-3 Wochen bei 37°C inkubiert, das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet und die Zellen einmal in der Woche mit 150 µl 2x MEM+ 10% FCS + 1% Pen/Strep versorgt.

3.3 DNA-Methoden

3.3.1 DNA-Standardmethoden

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

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

3.3.2 Plasmidpräparation

Sowohl für analytische und präparative Plasmidisolierung, als auch für DNA-Fragment Aufreinigungen wurden Reagenziensysteme (Kits) der Firma QIAGEN (QIAprep Spin/QIAprep 8 Miniprep, Plasmid Midi und Maxi, *Gel Extraction* und *PCR-Purification* Kit) und Invitrogen verwendet. Die Reagenziensysteme basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach BIRNBOIM und DOLY (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzgel). Die über Nacht gewachsenen Kulturen wurden nach der Ernte entsprechend der Protokolle von QIAGEN bzw. Invitrogen behandelt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt spektralphotometrisch im NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) bei einer OD von 260 nm bestimmt.

3.3.3 DNA-Sequenzierung

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

jeweils 3-10 pmol Primer und 250-350 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über das Programm Edit View Version 1.0.2 (Perkin Elmer).

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

Auf Eis wurden je nach Plasmid-Größe 1-30 ng der Plasmid-DNA und jeweils 1 µg beider Primer in sauberstem H₂O zusammen pipettiert. Alle Reaktionen wurden mit einer Konzentration von 25 µM der vier Desoxyribonukleotide und einer Mg²⁺-Konzentraion von 1-2 mM durchgeführt. Unmittelbar nach der Zugabe von 1.0 µl Accu-Pol-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler Biometra, Göttingen) gestellt. Dabei wurde jede Reaktion nach folgendem Basisschema gestartet:

1 Temperaturzyklus:	94°C	2 min	
25 Temperaturzyklen:	94°C	30 sec	(Denaturierung)
	52°C	30 sec	(Hybridisierung)
	72°C	1.5-3 min	(Polymerisierung)
1 Temperaturzyklus:	72°C	7-10 min	

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

3.3.5 *In vitro* Mutagenese

Mit Hilfe des Reagenziensystems „Quick Change™ *Site directed Mutagenesis Kit*“ (Stratagene, La Jolla, USA) wurden Punktmutationen in DNA-Konstrukte eingeführt. Für die *in vitro* Mutagenese wurden 50 ng des Plasmides, in welches die gewünschte Punktmutation eingeführt werden soll, je 125 ng eines zueinander komplementären Primerpaares, das die Mutation enthält, 5 µl des Reaktionspuffers und 1 µl des dNTP-Mixes, in einem 50 µl Gesamtansatz mit 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase versetzt und sofort in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät gestellt. Für die *in vitro* Mutagenese wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

1 Temperaturzyklus:	94°C	30 sec
12-18 Temperaturzyklen:	94°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	2 min/kb der zu amplifizierenden DNA
1 Temperaturzyklus:	68°C	10 min

Die komplementäre DNA wurde von der Polymerase synthetisiert. Nachdem die Proben auf 37°C abgekühlt waren, wurde 1 µl des Restriktionsenzym DpnI, welches die parenterale, methylierte und nicht die neu synthetisierte dsDNA schneidet, hinzugegeben und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Mit 2 µl des gespaltenen PCR-Produktes erfolgte eine Transformation in XL1-Blue Bakterien. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Platten mit Ampicillin bzw. Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA der Klone durch Sequenzierung auf die Anwesenheit der Mutation überprüft.

3.4 RNA-Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Isolierung von Gesamtzell-RNA wurden Reagenziensysteme der Firma Qiagen (Hilden) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit einem Zellschaber in einem β-Mercaptoethanol-haltigen Puffer

abgeschabt und über QIAshredder-Säulen (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Das Eluat wurde anschließend für die weitere RNA-Isolation nach Angaben des Herstellers mit dem *Micro to Midi Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die RNA wurde hierbei säulenchromatographisch durch Adsorption an eine Silica-Gel-basierte Membran isoliert. Um die DNA, die trotz der hohen RNA-Affinität der Säule, an die Säule gebunden hat abzubauen, wurde ein DNase-Verdau mit einer RNase-freien DNase (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die RNA wurde anschließend in RNase-freien H₂O eluiert und die Konzentration spektrometrisch im NanoDrop®ND1000 UV/Vis-Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) bei einer OD von 260 nm bestimmt.

3.4.2 One-Step-RT-PCR

Bei dem „*OneStep RT-PCR-Kit*“ (Qiagen, Hilden) kann die Reverse Transkription und die anschließende PCR in einem Schritt durchgeführt werden, da das Kit über einen Enzym-Mix verfügt, der sowohl die Reverse Transkriptase als auch die HotStarTaq DNA-Polymerase beinhaltet. Hierfür wurde ein Master-Mix nach folgendem Schema pipettiert:

10µl	Q-Solution
10µl	5x QIAGEN <i>OneStep RT-PCR Buffer</i>
2µl	dNTP-Mix (enthält 10mM von jedem dNTP)
3µl	Primer A (10µM)
3µl	Primer B (10µM)
2µl	QIAGEN <i>OneStep RT-PCR-Enzyme Mix</i>
1µl	RNasin
1-2µg	Template-RNA
ad 50µl	H ₂ O

Als Positivkontrolle wurde immer 1 pg Plasmid-DNA mitgenommen. Anschließend wurden die Proben in den PCR-Block gestellt und folgendes PCR-Programm verwendet:

Reverse Transkription:	50°C	30 min
Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase:	95°C	15 min
3-Step-Cycling: (25-40 Zyklen)		
Denaturierung:	95°C	30 sec
Annealing:	57°C	45 sec
Extension:	72°C	2 min
Final Extension:	72°C	10 min

3.4.3 siRNA-Design

Um effizient siRNAs in Zellen zu transfizieren werden bestimmte siRNA-Oligos benötigt. Die Kriterien hierfür hängen davon ab, ob das Oligo direkt in die Zelle oder zuerst in einen Vektor kloniert und dann in die Zellen transfiziert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die siRNAs nach der zweiten Methode in die Zelle gebracht. Hierbei wurden unterschiedliche Vektoren verwendet und es wurde nach den Empfehlungen des Herstellers verfahren. Generell bestehen die siRNAs aus einer ca. 19 Nukleotiden großen Zielsequenz in *sense* und *antisense* Richtung, die mit Hilfe des *siRNA-Target-Finder*-Suchprogramms von Ambion (Austin, USA) ausgesucht wurden. Diese *sense* und *antisense* Sequenz wurde durch einen 9bp großen *Spacer* getrennt, der dafür verantwortlich ist, dass das Transkript eine 19bp große Loop-Struktur bilden kann die dann in der Zelle zu einer funktionellen siRNA gespalten wird. Am 5'-Ende des Oligos wurde eine bestimmte Restriktionsschnittstelle eingefügt, während am 3'-Ende vor der zweiten, anderen Restriktionsschnittstelle zusätzlich eine T5-Sequenz eingefügt wurde.

3.4.3.1 Annealing der siRNAs

Für das Annealing der siRNA-Oligos wurden je 1 µg/µl des siRNA-Oligos A und des siRNA-Oligos B mit 46 µl Annealing Solution (Ambion, Austin, USA) vermischt, bei 90°C für 30 min und anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für die Ligation wurden anschließend 10 ng/µl der annealten Oligos eingesetzt.

3.5 Proteinmethoden

3.5.1 Quantitative Proteinbestimmung

3.5.1.1 Bradford-Protein-Konzentrationsbestimmung

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

3.5.1.2 BCA-Assay

Die Konzentration der Proteine, die mit dem RIPA-Puffer hergestellt wurden, wurde anhand des BCA-Assays der Firma Pierce bestimmt. Hierfür wurde in eine 96-Loch-Platte eine Verdünnungsreihe von 0-10 µg BSA in RIPA-Puffer als Eichkurve pipettiert. Die proteinhaltige Lösung in der 96-Loch-Platte (unverdünnt oder bis 1:20 verdünnt) wurde mit 200 µl einer 1:50 Verdünnung der BCA-Assay-Lösung versetzt, die OD₅₄₀ im Spektralphotometer bestimmt und die Proteinkonzentration aus der jeweiligen Verdünnung errechnet.

3.5.2 Aufreinigung prokaryoter GST-Fusionsproteine

Proteine, die an die Glutathion-S-Transferase fusioniert waren, wurden in BL21-pLysS-Bakterien exprimiert. Hierfür wurden 200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium 1:100 mit einer Vorkultur der Bakterien angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7-0.9 inkubiert. Die Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgt über einen Zeitraum von 2-3 h bei 30 oder 37°C. Durch Zentrifugation wurden anschließend die Zellen bei 4000 g und 4°C pelletiert und in 5 ml 0.5 M LSDB resuspendiert. Die Bakterien wurden durch viermaliges Sonifizieren bei 100 Watt für 30 sec auf Eis lysiert und die entstandenen Zelltrümmer bei der anschließenden Zentrifugation bei 4°C und 4000 g pelletiert. Der

im Überstand vorhandene Extrakt wurde in 2 ml Eppendorfggefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Für die Aufreinigung der im Zellextrakt enthaltenen GST-Fusionsproteine wurde Glutathion-Sepharose (Amersham, Freiburg) verwendet. Hierbei wird das an der Oberfläche exponierte Glutathion sehr effizient und spezifisch von dem GST-Fusionsanteil gebunden. Für jeden Ansatz wurden je 15 μl der Sepharosekügelchen einmal mit 1 ml H_2O und einmal mit 1 ml 0.5 M LSDB gewaschen. Während dieser Waschschrirte wurde das Eppendorfggefäß mit der Sepharose für 1 min in der Hand geschüttelt und anschließend bei 1000 g für 1 min pelletiert.

Auf die so equilibrierte Sepharose-Matrix wurde für eine Testaufreinigung 100 oder 500 μl des Bakterienextraktes gegeben und der Ansatz im „Überkopf“-Schüttler für 1 h bei 4°C inkubiert. Um die unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen wurde anschließend 4 x mit 1 M und 2 x mit 0.1 M LSDB-Puffer gewaschen. Durch die Zugabe von 15 μl 2 x SDS-Probenpuffer und 5-minütiger Inkubation bei 95°C wurden die gereinigten GST-Fusionsproteine von der Sepharose gelöst, über ein SDS-PAG aufgetrennt und anschließend durch eine 30-minütige Färbung mit *Coomassie brilliant blue* visualisiert.

3.5.3 Aufreinigung von eukaryonten GST-Fusionsproteinen

Konstrukte, die in den eukaryonten Vektor pEBG kloniert wurden und N-terminal mit dem GST-Protein fusioniert sind, wurden mit Hilfe der CaPO_4 -Methode in C33a-Zellen transfiziert. Die Proteinkonzentration der aus diesen Zellen gewonnenen Ganzzellextrakte wurde anhand eines Bradford-Assays bestimmt. Für jeden Ansatz wurden je 15 μl equilibrierte Glutathion-Sepharosekügelchen mit 800-2000 μg der jeweiligen GST-Proteine im „Überkopf“-Schüttler für 1h bei 4°C inkubiert. Nachdem die unspezifisch gebundenen Proteine durch das viermalige Waschen mit 1 M- und zweimaligen Waschen mit 0.1M-LSDB-Puffer entfernt worden waren, wurden die aufgereinigten Proteine entweder durch die Zugabe von 15 μl 2x SDS-Probenpuffer denaturiert und auf ein SDS-PAG aufgetragen oder für weitere Experimente, wie bspw. einem Phosphatase-Assay oder einem „*Substrat-Trapping-Assay*“ verwendet.

3.5.4 Western Blot

Für die Western Blot Analysen wurden die über ein SDS-PAG aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (NC, BioRad, München) übertragen. Dafür wurde eine luftblasenfreie Schichtung aus einem in Transfer-Puffer getränkten Schwamm, zwei Whatman-Papieren, dem Gel, der NC-Membran, zwei weiteren Whatman-Papieren sowie einem weiteren Schwamm hergestellt und nach der Fixierung zwischen zwei Kunststoffplatten in eine Blotkammer überführt. Es wurde entweder eine Spannung von 35 V über Nacht oder von 80 V für mindestens zwei Stunden so angelegt, dass sich der Filter zwischen dem Gel und der Anode der Kammer befand. Nach dem Transfer folgte eine einminütige Anfärbung der Proteine mit einer Ponceau-S-Lösung. Durch das Waschen des Filters mit H₂O wurde der Hintergrund entfärbt und die Markerbanden mit einem Stift nachgezeichnet. Die Membran wurde mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und anschließend in TBST vollständig entfärbt. Die unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen wurde durch die einstündige Inkubation der NC-Membran in Abblocklösung verhindert. Daraufhin wurde der Filter, auf Parafilm gelegt, mit einer entsprechenden Menge an verdünntem 1. Antikörper überschichtet und zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgten drei zehnminütige Waschschrte in TBST und eine einstündige Inkubation mit verdünntem POD-gekoppeltem 2. Antikörper. Anschließend wurde die Membran 4 x 10 min in TBST gewaschen, erneut auf Parafilm gelegt und für eine Minute mit 1.5 ml „*BM Chemiluminescent Blotting Substrat*“ (1485 µl Lösung A und 15 µl Lösung B) überschichtet. Diese Lösung enthält Luminol, das durch die an den zweiten Antikörper gekoppelte POD in einer Oxidationsreaktion umgesetzt wird. Das entstandene Zwischenprodukt zerfällt unter Emission von Licht. Der Filter wurde vorsichtig abgetropft und zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Expositionskassette fixiert. In der Dunkelkammer konnte dann, je nach Stärke des Signals, für einige sec bis hin zu mehreren min ein ECL-Film aufgelegt und anschließend entwickelt werden, um das Signal sichtbar zu machen. Bei starken Signalen konnte der Blot auch in der Gel-Dokumentationsanlage mit Chemilumineszenz-Einheit der Firma BioRad (München) entwickelt werden. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Programm „*Quantity One*“ der Firma BioRad (München).

3.5.5 *In vitro* Translation

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

3.5.6 *in vitro* Degradationsassay

Für den *in vitro* Degradationsassay wurde pcDNA-FLAG-1-PTPH1 und pcDNA-FLAG-1-16E6 bzw. die 16E6-Mutanten oder pCDNA-FLAG-8E6 mittels Retikulozytenlysats *in vitro* translatiert. Anschließend wurden je 1.5 μl *in vitro* translatiertes PTPH1 und 3.5 μl *in vitro* translatiertes 16E6, 8E6 bzw. 16E6-Mutanten zusammen gegeben und für 3h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein SDS-PAG aufgetragen und die Proteine über Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.5.7 *in vivo* Degradationsassay

Für den *in vivo* Degradationsassay wurden je 2.45 μg pCMV-Myc-PTPH1 und verschiedene FLAG-getaggte E6-Konstrukte in C33a-Zellen kotransfiziert. Zur Transfektionskontrolle wurden zusätzlich 0.1 μg Myc-hNAP1 transfiziert. Nach 24h wurden aus diesen Zellen Ganzzellextrakte gewonnen und je 15 μg des Extraktes auf ein SDS-PAG aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine auf eine NC-Membran gebロットet, mit einem spezifischen Myc-Antikörper inkubiert und die verbleibenden Mengen von PTPH1 mithilfe von ECL über die Gel-Dokumentationsanlage (BioRad, München) detektiert.

3.5.8 Protein-Protein Interaktionsanalysen

3.5.8.1 Interaktionen mit *in vitro* translatierten Proteinen (GST-Pull-Down-Assay)

Für Interaktionen von bakteriellen GST-Proteinen mit *in vitro* translatierten Proteinen wurden die GST-Fusionsproteine wie bereits beschrieben an Sepharosekügelchen gebunden und gereinigt, wobei 100 μl des 0.1 M LSDB des

letzten Waschschriffs im Eppendorfgefäß belassen wurden. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl des *in vitro* Translationsansatzes und eine zweistündige, taumelnde Inkubation des Ansatzes, zur effizienteren Durchmischung, auf Eis. Daraufhin wurden 4-6 Waschschriffs mit 0.1-0,2 M LSDB durchgeführt, um die unspezifischen Interaktionen zu minimieren. Dabei wurde für den letzten Waschschriff 0.1 M LSDB verwendet. Die Sepharosekügelchen mit den gebundenen Proteinen wurden anschließend in 15 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für fünf min denaturiert. Die Proteine wurden über ein SDS-PAG aufgetrennt, das Gel in *Coomassie brilliant blue* 30 min gefärbt, dreimal 10 min mit Entfärber behandelt und zur Verstärkung des Signals 20 min in Amplifizierer geschwenkt. Zuletzt wurde das Gel für 45 min im Geltrockner getrocknet. Ein über Nacht bei -80°C radiosensitiver, exponierter Film lieferte den Nachweis der radioaktiv markierten, gebundenen Proteine.

3.5.8.2 Koimmunpräzitationen

Für die Koimmunopräzitation wurden pro Ansatz zwei 15 cm Zellkulturschalen mit 62.5×10^5 C33a-Zellen mit Expressionsvektoren für die jeweiligen Proteine transfiziert. Nach 48h wurden Ganzzellextrakte hergestellt, ihre Proteinkonzentration bestimmt und schließlich 0.5-2 mg Proteinextrakt für 2-3 h bei 4°C mit 15 µl α-M2-FLAG-gekoppelten Sepharosekügelchen inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 3-6x mit 50-300 mM LSDB-Puffer gewaschen, wobei der letzte Waschschriff mit 0.1 M LSDB-Puffer erfolgte. Nach der Zugabe von 15 µl 2 x SDS-Probenpuffer wurden die Proteine bei 95°C für fünf Minuten denaturiert, bevor sie in einem SDS-PAG aufgetrennt, im Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Hilfe entsprechender Antikörper die Proteine visualisiert wurden.

3.5.9 Substrat-Trapping-Assay

Für den „*Substrat-Trapping-Assay*“ wurden über *in vitro* Mutagenese spezielle „*Substrat-Trapping-Mutanten*“ hergestellt, bei denen die katalytische Domäne inaktiv ist, wodurch die tyrosin-phosphorylierten Proteine binden konnte, jedoch keine Dephosphorylierung der Substrate möglich war. Hierfür wurde in einem PTPH1-Konstrukt das Aspartat im katalytischen Zentrum an Position 811 gegen ein Alanin

ausgetauscht, was zu einer inaktiven katalytischen Domäne führte. Bei einer weiteren Mutanten von PTPH1 wurde durch den zusätzlichen Austausch des Tyrosin an Position 676 gegen ein Phenylalanin eine Tyrosinphosphorylierungsstelle in PTPH1 deletierte, wodurch eine sterische Hinderung von Substraten durch das gebundene Phosphat verhindert werden sollte. Diese Konstrukte wurden in C33a-Zellen transfiziert. Als Negativkontrollen dienten der pEBG-Leervektor und das pEBG-PTPH1-Wildtyp-Konstrukt. Nach 48h wurden Ganzzellextrakte gewonnen und je 1.8 mg dieser Extrakte über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Anschließend wurde zu diesen aufgereinigten Proteinen 2-4 mg mit 30 mM Pervanadat behandelte HaCat-Extrakte gegeben und in einem Überkopf-Schüttler bei 4°C für 3h inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 0.1M LSDB wurden 15 µl 2x SDS-Probenpuffer zu den Beads gegeben und diese bei 95°C für 5 min denaturiert. Die Proben wurden anschließend über ein PAG aufgetrennt und auf eine NC-Membran geblottet. Die gebundenen Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurden über einen Py20-Antikörper, der tyrosin-phosphorylierte Proteine erkennt, nachgewiesen. Zur Identifizierung der neuen Substrate von PTPH1 wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten, über einen *Protein Mass Fingerprint* (PMF) am ZMMK analysiert und über die *Mascot*-Datenbank identifiziert.

3.5.10 Phosphatase-Assay

Für den Phosphatase-Assay wurden C33a-Zellen mit verschiedenen Myc-PTPH1 Konstrukten und 16E6- bzw. 8E6-Konstrukten kotransfiziert und 48h später Ganzzell-Extrakte gewonnen. 800 µg dieser Extrakte wurden 2h bei 4°C im Überkopf-Schüttler über 15 µl Myc-Beads aufgereinigt. Nach zwei Waschschrritten mit 0.1M LSDB-Puffer folgten zwei weitere Waschschrritte mit einem pNPP-Tyrosin-Assay-Buffer (Firma Upstate, New York, USA) und eine anschließende 15minütige Zentrifugation bei 3200 rpm. Zu dem pelletierten Immunokomplex wurden 50 µl 500 µM Tyrosin-Phosphopeptid (RRLIEDAE(pY)AARG, Firma Upstate, New York, USA) bzw. Growth-Hormone-Receptor-Phosphopeptid (NFLMDNA(pY)FCEADAKK, Firma PanTecs, Tübingen), die beide über ein zentrales, phosphoryliertes Tyrosin verfügen, dass durch PTPH1 dephosphoryliert werden kann, gegeben und dieses Gemisch bei 30°C 1h geschüttelt. Anschließend wurden die Proben erneut pelletiert und 25-30 µl der Probe auf eine 96-well-Platte gegeben. Auf diese 96-well Platte wurde auch eine

Phosphat-Standardreihe (zwischen 200 und 2000 pmol Phosphat) pipettiert. Anschließend wurden 100 µl einer *Malachite Green Solution* (Upstate, Lake Placid, USA) zu den Proben gegeben, die Platte bei RT 15 min inkubiert und die OD bei 620nm gemessen.

4 ERGEBNISSE

Es ist bekannt, dass das PDZ-Bindemotiv notwendig ist für die 16E6-vermittelte Transformation von etablierten Nagerzelllinien (KIYONO *et al.*, 1997) und die Induktion von epithelialen Hyperplasien in 16E6 transgenen Mäusen (NGUYEN *et al.*, 2003; SIMONSON *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion und wahrscheinlich die Degradation von PDZ-Domänen-Proteinen wichtig für das onkogene Potential von 16E6 sind. Die biologisch relevanten Zielproteine, die in diesen Prozess involviert sind, sind noch nicht bekannt.

In Vorarbeiten wurde ein Hefe-Two-Hybrid-Screen mit den 12 C-terminalen Aminosäuren von 16E6, die das PDZ-Bindemotiv von 16E6 beinhalteten, als Köderprotein für das Screening einer HaCat cDNA-Expressions-Library durchgeführt. Aus diesem Screen konnten, zusätzlich zu den bekannten Interaktionspartnern hDlg und hScrib, insgesamt 24 cDNA-Klone identifiziert werden, die für die Protein-Tyrosin-Phosphatase H1 (PTPH1) kodierten (TÖPFFER, 2005). Eine Interaktion von PTPH1 mit 16E6 war zu Beginn der vorliegenden Dissertation nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Interaktion zwischen 16E6 und PTPH1 bestätigt und die funktionellen Auswirkungen auf PTPH1, sowie die Relevanz für die biologischen Aktivitäten von E6 untersucht werden.

4.1 PTPH1 interagiert mit dem PDZ-Bindemotiv von 16E6 *in vitro*

Um sicherzustellen, dass die durch das Hefe-Two-Hybrid-System gefundene Interaktion des PDZ-Bindemotivs von 16E6 mit PTPH1 nicht artifiziell ist, wurden GST-Pull-Down-Assays durchgeführt. Hierfür wurde *in vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes PTPH1 mit an Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniertem 16E6-C, das die C-terminalen Aminosäuren 85-151 umfasst, bzw. 16E6-N, das die Aminosäuren 1-84 umfasst, inkubiert. Wie in Abbildung 7 gezeigt, konnte 16E6-C (Spur 3,) radioaktiv markiertes PTPH1 effizient präzipitieren, im Gegensatz zu 16E6-N (Spur 4) und GST (Spur 2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PTPH1 mit dem C-Terminus von 16E6 interagiert.

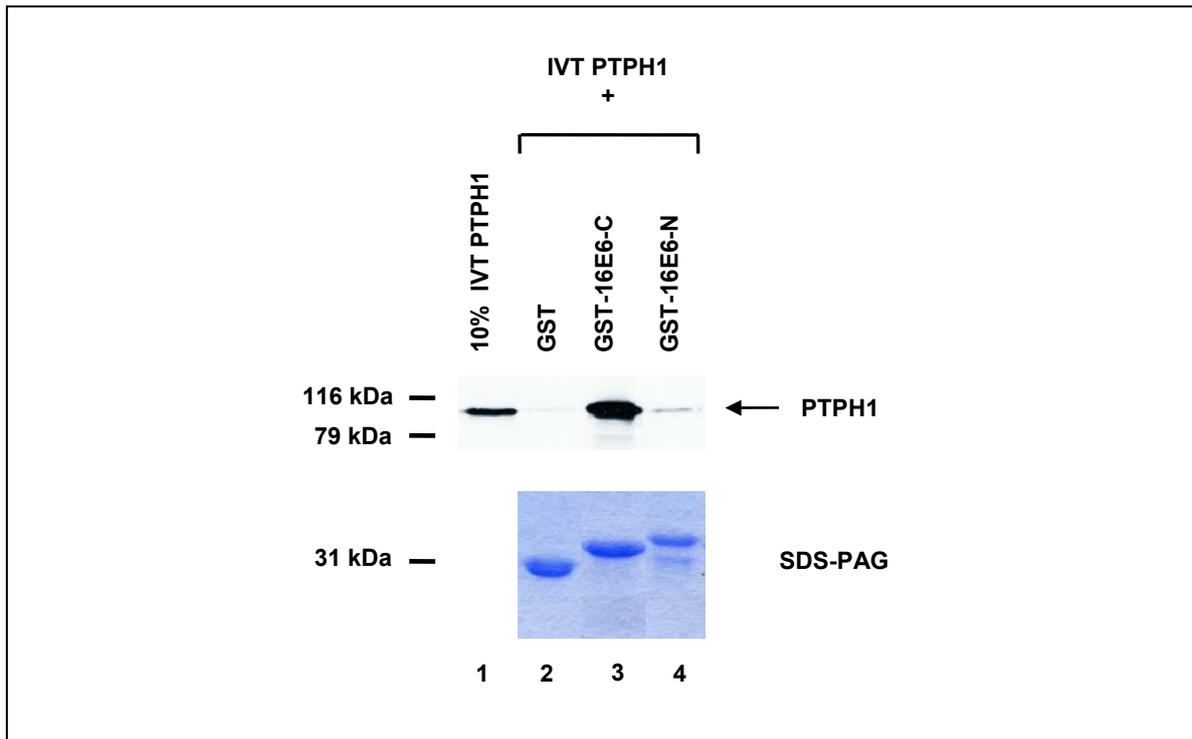


Abb. 7: Der C-Terminus von 16E6 interagiert mit PTPH1 *in vitro*.

GST-Pull-Down Assay. GST (Spur 2), GST16E6-C (AS 85-151, Spur 3) und GST-16E6-N (AS 1-84, Spur 4) wurden mit ³⁵S-markiertem, *in vitro* translatiertem (IVT) PTPH1 inkubiert. In Spur 1 wurden 10% des *in vitro* Translations-Produktes von PTPH1 als Input-Kontrolle aufgetragen. Im unteren mit *Coomassie blue* gefärbten SDS-PAG sind die entsprechenden GST-Proteine dargestellt, die für den Interaktionsassay eingesetzt wurden. Die Position des gebundenen IVT PTPH1 und einige Markerbanden sind gekennzeichnet.

Es ist bekannt, dass 16E6 über sein PDZ-Bindemotiv mit PDZ-Domänen-Proteinen interagiert. Da auch PTPH1 über eine PDZ-Domäne verfügt, sollte untersucht werden, ob 16E6 über sein PDZ-Bindemotiv an PTPH1 bindet.

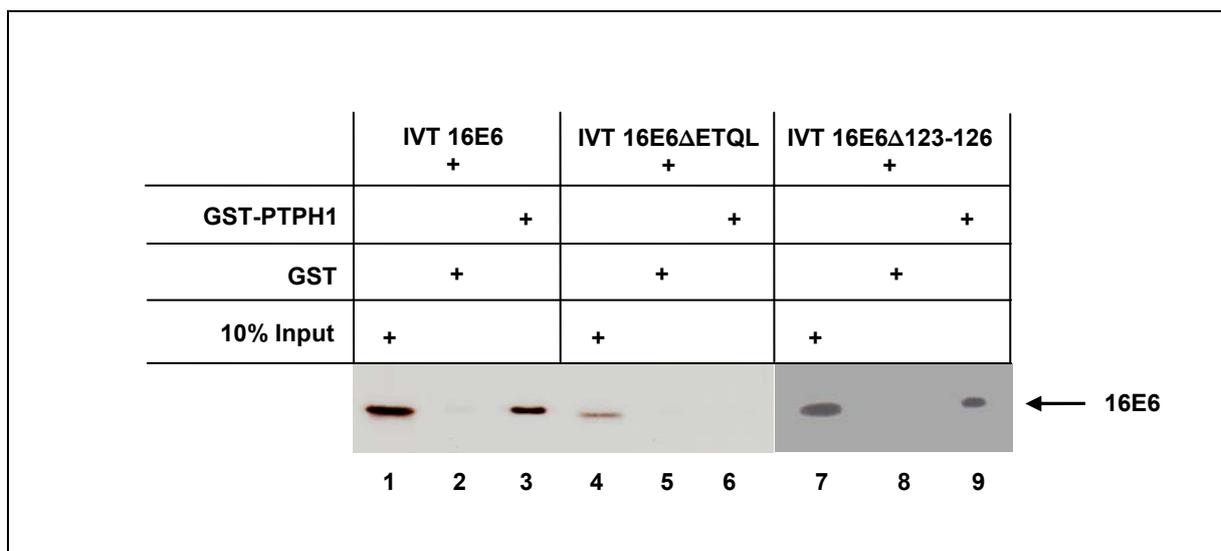


Abb. 8: 16E6 bindet über sein PDZ-Bindemotiv an PTPH1 *in vitro*.

GST-Interaktionsassay. In den Spuren 2, 3, 5, 6, 8 und 9 wurden aufgereinigtes GST oder GST-PTPH1 mit *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem 16E6 (Spuren 2-3), 16E6ΔETQL (Spuren 5-6) oder 16E6Δ123-126 (Spuren 8-9) inkubiert. Die Spuren 1, 4 und 7 zeigen 10% des Inputs der jeweiligen IVT 16E6-Variante. Die Position des gebundenen IVT 16E6 ist eingezeichnet.

Hierfür wurde GST-PTPH1 mit *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem 16E6, 16E6ΔETQL, bei dem das PDZ-Bindemotiv von 16E6 deletiert wurde, bzw. mit 16E6Δ123-126, einer internen Deletionsmutante, die kein p53 degradieren kann, inkubiert. Während GST-PTPH1 16E6 präzipitieren konnte (Abb. 8, Spur 3), wies GST-PTPH1 keine Interaktion mit 16E6ΔETQL auf (Spur 6). Wie erwartet, konnte 16E6Δ123-126 (Spur 9) immer noch an GST-PTPH1 binden. Diese Daten belegen, dass GST-PTPH1 *in vitro* mit den vier C-terminalen Aminosäuren ETQL von 16E6 interagiert.

4.2 16E6 bindet auch *in vivo* an PTPH1

Zum Nachweis der Interaktion von 16E6 mit PTPH1 in der Zelle wurden C33a-Zellen mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und für FLAG-16E6 bzw. verschiedene Mutanten von 16E6 transfiziert, die Zellen nach 48h geerntet und aus LSDB-Ganzzelextrakten die FLAG-getaggten Proteine mit ihren Interaktionspartnern präzipitiert. In einem anschließenden Western-Blot wurde Myc-getaggtes PTPH1 nachgewiesen.

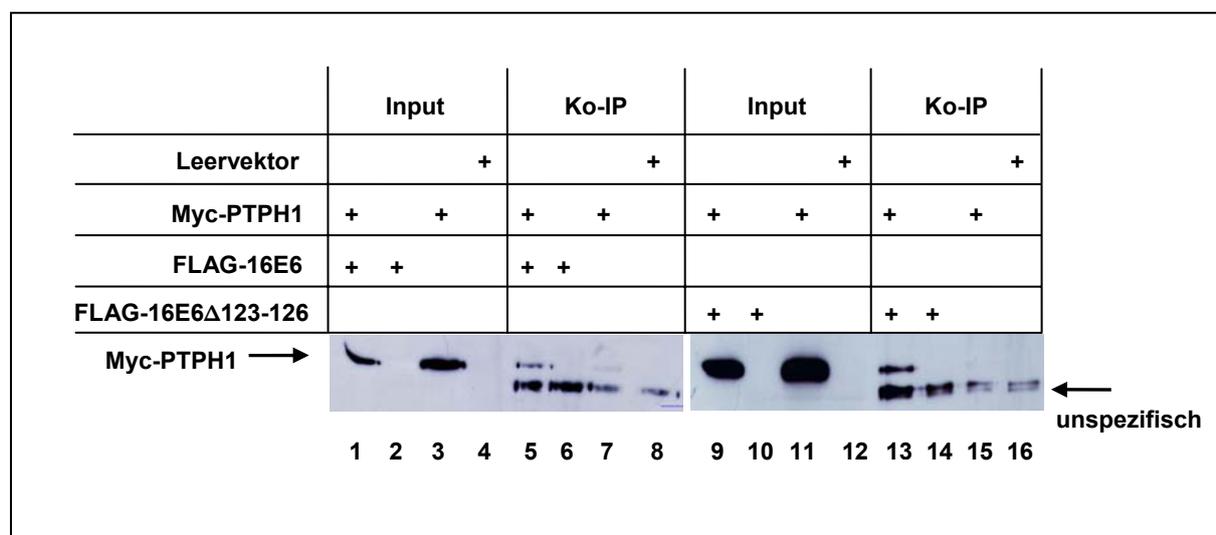


Abb. 9: PTPH1 interagiert mit 16E6 und 16E6Δ123-126 *in vivo*.

Ko-Immunopräzipitation. Je 1.2 mg Extrakte von C33a-Zellen, die transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-16E6 (Spuren 1-8) oder FLAG-16E6Δ123-126 (Spuren 9-16) in verschiedenen Kombinationen (wie in der Fig. angegeben) transfiziert wurden, wurden mit 15 µl Anti-M2-FLAG-Beads inkubiert. Das kopräzipitierte Myc-PTPH1 wurde in einem Western-Blot mit einem Myc-Antikörper detektiert. Zum Nachweis der Expression von Myc-PTPH1 wurden 15 µg der Extrakte als Kontrolle aufgetragen (Spuren 1-4 und 9-12). Die Position von Myc-PTPH1 und einer unspezifischen Bande sind in der Abb. gekennzeichnet.

Die Abbildung 9 zeigt, dass Myc-PTPH1 nur präzipitiert werden konnte, wenn es mit FLAG 16E6 (Spur 5) oder FLAG-16E6Δ123-126 (Spur 13) koexprimiert wurde.

In den Proben, in denen kein FLAG-16E6 vorlag, war kein Myc-PTPH1 detektiert worden (Spur 7+15), was belegt, dass PTPH1 nicht unspezifisch an die FLAG-Beads bindet. Entsprechend konnte kein Myc-PTPH1 nachgewiesen werden, wenn nur FLAG-16E6 (Spur 6) bzw. nur FLAG-16E6 Δ 123-126 (Spur 14) exprimiert wurden. Um die Expression von Myc-PTPH1 in den entsprechenden Extrakten zu bestätigen, wurden je 15 μ g Ganzzellextrakt in einem Western-Blot untersucht (Spuren 1-4 und 9-12).

4.3 Die PDZ-Domäne ist essentiell für die Interaktion von 16E6 und PTPH1

Die PDZ-Bindedomäne ist ein spezifisches Protein-Protein-Interaktions-Modul mit einer strukturell gut untersuchten „Interaktionstasche“, die mit einem PDZ-Motiv-Liganden gefüllt werden kann (DEV *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob auch die Interaktion mit 16E6 über diese „Interaktionstasche“ erfolgt, sollte eine Ko-Immunopräzipitation mit Expressionsvektoren für FLAG-16E6 Δ 123-126 und Myc-PTPH1 Δ 504-598, bei dem die PDZ-Domäne deletiert wurde, durchgeführt werden. Die PDZ-Domäne von PTPH1 wird durch die Aminosäuren 511-605 kodiert. Mittels *in vitro* Mutagenese wurde diese (von Aminosäure 504-598) deletiert.

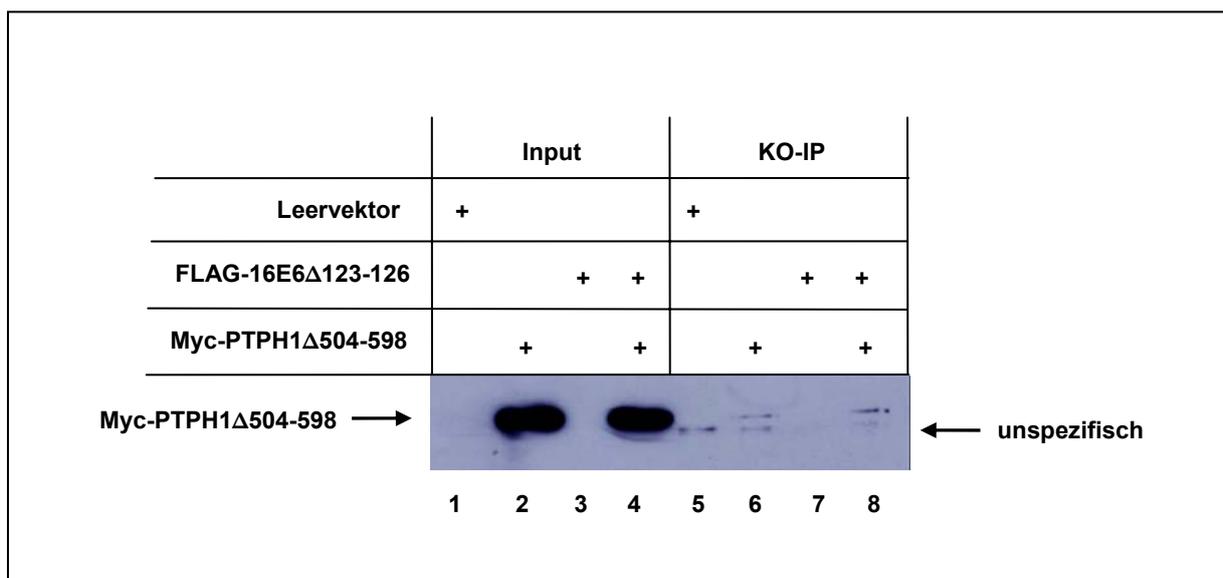


Abb. 10: Die PDZ-Domäne von PTPH1 ist essentiell für die Interaktion mit 16E6. Ko-Immunopräzipitation. Je 1.2 mg Extrakt von C33a-Zellen, transient transfiziert mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 Δ 504-598, dem die PDZ-Domäne fehlt, und 16E6 Δ 123-126, wurden mit 15 μ l M2-FLAG-Beads inkubiert. Gebundenes Myc-PTPH1 Δ 504-598 wurde mit Hilfe des Myc-Antikörpers detektiert (Spuren 5-8). Zum Nachweis der Expression von Myc-PTPH1 Δ 504-598 wurden 15 μ g der Extrakte aufgetragen (Spuren 1-4). Das detektierte Myc-PTPH1 Δ 504-598 und die unspezifischen Banden sind in der Abb. eingezeichnet.

Wie die Ko-Immunopräzipitation in Abbildung 10 zeigt, konnte FLAG-16E6 Δ 123-126 Myc-PTPH1 Δ 504-598 nicht präzipitieren (Spur 8). Als Kontrolle für die Expression von Myc-PTPH1 Δ 504-598 wurden 15 μ g Ganzzellextrakt in einem Western-Blot mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop untersucht (Spuren 1-4). Diese Daten belegen, dass die Interaktion mit 16E6 über die PDZ-Domäne von PTPH1 vermittelt wird.

4.4 GST-16E6-C bindet endogenes PTPH1 aus primären Keratinozyten

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass rekombinantes, überexprimiertes 16E6 und PTPH1 miteinander interagieren. Als nächstes sollte ursprünglich untersucht werden, ob endogenes 16E6 mit endogenem PTPH1 interagiert. Dies war jedoch nicht möglich, da die verfügbaren 16E6 Antikörper das E6-Protein, das in SiHa oder Caski-Zellen exprimiert wird, nicht erkannten. Ferner ist die Expression von endogenem PTPH1 sehr gering und verschiedene käuflich erworbene Antikörper gegen PTPH1 waren kaum in der Lage, das endogene PTPH1 im Western-Blot oder in einer Immunpräzipitation nachzuweisen.

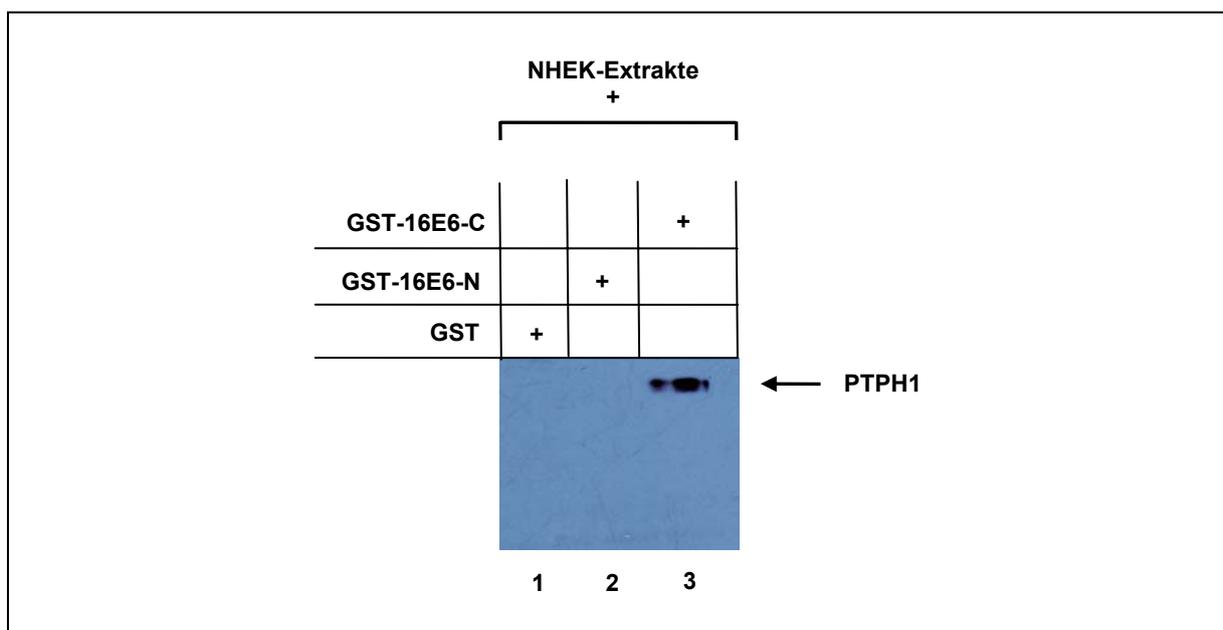


Abb. 11: 16E6 bindet an endogenes PTPH1 aus primären Keratinozyten (NHEK).

Je 2 mg Extrakt aus primären Keratinozyten (NHEK) wurden mit aufgereinigtem GST (Spur 1), GST-16E6-N (Spur 2) oder GST-16E6-C (Spur 3) inkubiert. Gebundenes PTPH1 wurde in einem Western-Blot mit einem Antikörper gegen PTPH1 nachgewiesen. Das detektierte PTPH1 ist in der Abb. eingezeichnet.

Deswegen wurden für die Bestätigung der Interaktion von 16E6 mit endogenem PTPH1 Ganzzellextrakte aus primären Keratinozyten gewonnen und je 2 mg NHEK-Extrakt mit aufgereinigtem GST-fusioniertem 16E6-C, bzw. 16E6-N inkubiert (Abb. 11). In einem Western-Blot entwickelt mit einem PTPH1-Antikörper, der uns von Nicholas Tonks (ZHANG *et al.*, 1997) zur Verfügung gestellt wurde und der, verglichen mit allen anderen verfügbaren PTPH1-Antikörpern, eine größere Spezifität für PTPH1 aufweist, wurde das gebundene PTPH1 detektiert. GST-16E6-C (Spur 3) konnte spezifisch endogenes PTPH1 binden, im Gegensatz zu 16E6-N (Spur 2) und GST allein (Spur 1).

4.5 16E6 degradiert PTPH1 *in vitro*

Die Interaktion von 16E6 mit PDZ-Domänen-Proteinen führt normalerweise zu einer verstärkten Degradation der Proteine (KIYONO *et al.*, 1997; MASSIMI *et al.*, 2004), obwohl auch Ausnahmen bekannt sind (HAMPSON *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob 16E6 die verstärkte Degradation von PTPH1 induziert, wurden *in vitro* Degradationsassays durchgeführt.

Es ist bekannt, dass 16E6 die Degradation von PDZ-Domänen-haltigen Proteinen, wie hDlg, hScrib, MAGI usw. über das Ubiquitinsystem mittels der Ubiquitinligase E6-AP vermittelt (MANTOVANI *et al.*, 2001; NAKAGAWA UND HUIBREGSTE, 2000; GRM UND BANKS, 2004). Im Rabbit-Retikulozytenlysate sind alle Komponenten, wie die Ubiquitin konjugierenden Enzyme und E6-AP, enthalten. Um zu überprüfen, ob 16E6 PTPH1 *in vitro* degradieren kann, wurden zuerst 16E6 und PTPH1 im Rabbit-Retikulozytenlysate *in vitro* translatiert. Die beiden *in vitro* translatierten, ³⁵S-markierten Proteine wurden inkubiert und die Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die Abbildung 12a zeigt, dass die Menge von PTPH1 mit zunehmender Inkubationszeit in Gegenwart von 16E6 kontinuierlich abnimmt. Nach ca. 3h war die spezifische PTPH1 Bande verschwunden (Spur 6), was verdeutlicht, dass 16E6 die Stabilität von PTPH1 beeinflusst. Die Kinetik der 16E6-vermittelten Degradation von PTPH1 war vergleichbar zu der von p53 (Spur 7-12). Für p53 ist beschrieben, dass 16E6 p53 in Kooperation mit der Ubiquitinligase E6-AP degradiert (SCHEFFNER *et al.*, 1993). Die Interaktion mit PTPH1 ist essentiell für die Degradation, da die Stabilität der Deletionsmutante PTPH1 Δ 504-598, die nicht mehr an 16E6 bindet, durch 16E6 nicht beeinflusst wurde (Abb. 12b, Spuren 3-4).

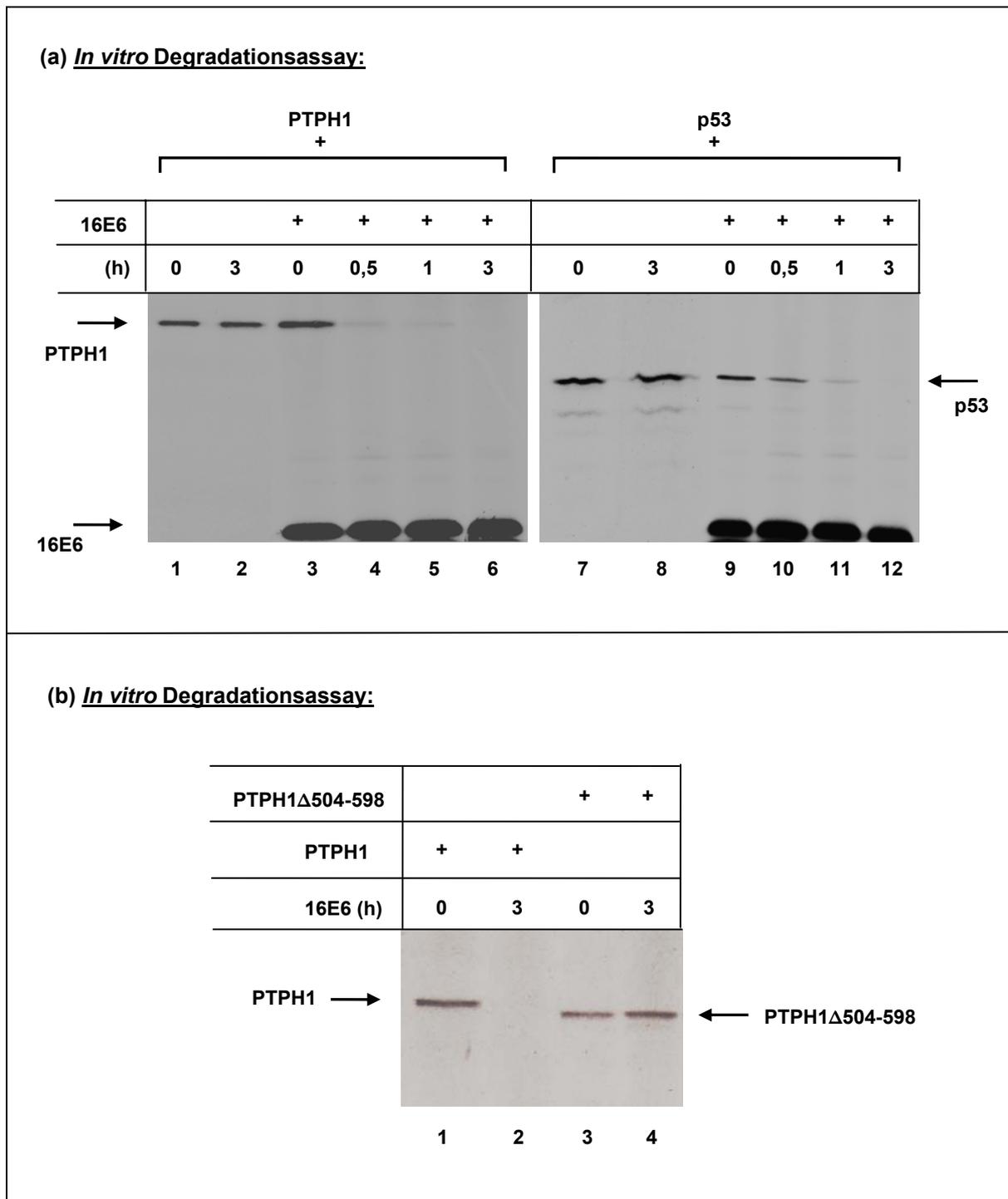


Abb. 12: 16E6 induziert die verstärkte Degradation von PTPH1 *in vitro*.

(a) *In vitro* Degradationsassay. *In vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes PTPH1 (Spur 1-6) bzw. p53 (Spuren 7-12) wurden für unterschiedliche Zeitpunkte in Gegenwart von IVT ³⁵S-markiertem 16E6 (Spuren 3-6 und 9-12) inkubiert, bevor sie über ein SDS-PAG aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. Als Kontrolle wurde in den Spuren 1+2 bzw. 7+8 IVT PTPH1 bzw. p53 in Abwesenheit von IVT 16E6 inkubiert. Die Positionen von PTPH1, 16E6 und p53 sind eingezeichnet.

(b) Die PDZ-Domäne von PTPH1 ist notwendig für die Degradation. *In vitro* Degradationsassay. IVT, ³⁵S-markiertes PTPH1 (Spuren 1+2) oder PTPH1Δ504-598 (Spuren 3+4) wurden mit ³⁵S-markiertem 16E6 (Spuren 1-4) für 3h inkubiert, bevor sie über ein SDS-PAG aufgetrennt und anschließend über Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. Die Positionen von PTPH1 und PTPH1Δ504-598 sind angegeben.

4.6 16E6 degradiert PTPH1 auch *in vivo*, was mit der Bindung an PTPH1 und E6-AP korreliert

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Degradation von PTPH1 durch 16E6 auch im Zellkultursystem erfolgt, wurden C33a-Zellen transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-16E6 kotransfiziert und nach 24h Ganzzellextrakte gewonnen. Anschließend wurden mit Hilfe eines Western-Blots die intrazellulären Mengen von rekombinanten PTPH1 bestimmt. Die Expression von 16E6 führte zur Reduktion der intrazellulären PTPH1-Spiegel (Abb. 13, Spur 2). Dieses Experiment belegt, dass 16E6 PTPH1 auch im Zellkultursystem degradieren kann.

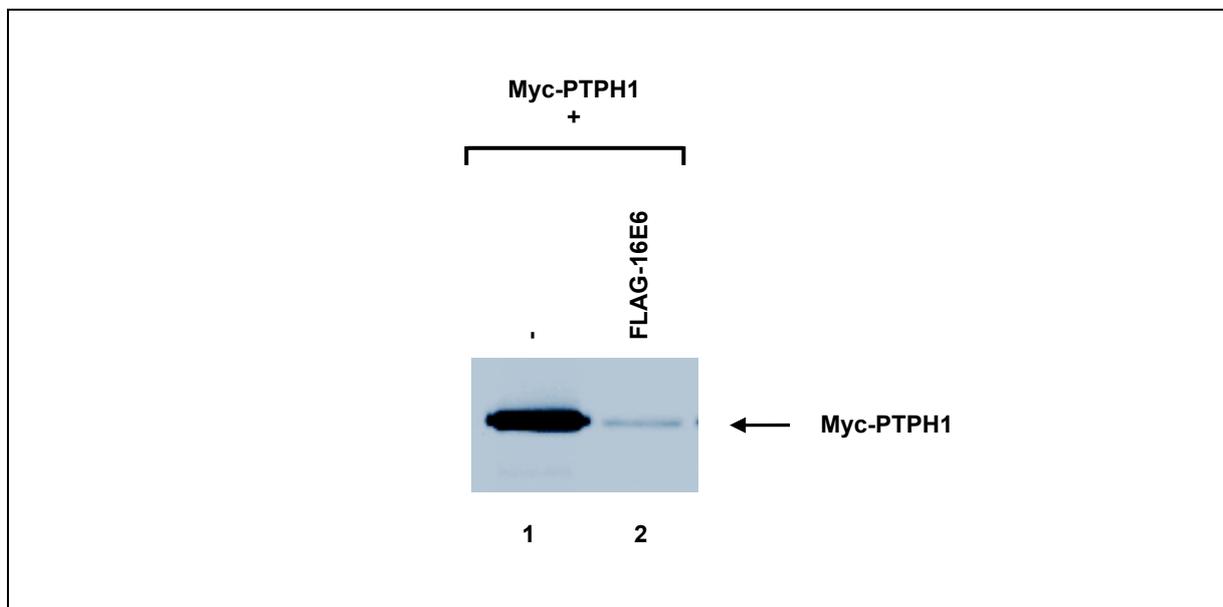


Abb. 13: 16E6 induziert die Degradation von PTPH1 *in vivo*. C33a-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-16E6 (Spur 2) transfiziert. 15 µg der gewonnenen Extrakte wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die intrazellulären Mengen von Myc-PTPH1 mit dem Myc-Antikörper detektiert. Als Referenzkontrolle wurden je 15 µg Extrakt von C33a-Zellen, die mit Myc-PTPH1 transfiziert wurden, aufgetragen (Spur 1). Die Position von Myc-PTPH1 ist in der Abbildung eingezeichnet.

Um Einblicke in die Sequenz-Vorraussetzungen von 16E6 zu erlangen, die notwendig für den proteolytischen Abbau von PTPH1 sind, wurden verschiedene 16E6 Mutanten auf ihre PTPH1 Degradations-Kapazität in *in vitro* und *in vivo* Degradationsassays untersucht. Wie oben beschrieben, wurden für den *in vivo* Degradationsassay C33a-Zellen mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-16E6 bzw. 16E6-Mutanten kotransfiziert. Um Variationen des Myc-PTPH1 Spiegels aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen auszuschließen, wurde ein Expressionsvektor für das humane Myc-Nucleosome-Assembly-Protein-1 (hNAP-1),

das nicht von 16E6 beeinflusst wird, als interne Kontrolle kotransfiziert (Abb. 14b, Spuren 10-17). Wie aus den Abbildungen 14a und 14b ersichtlich wird, induziert 16E6 den proteolytischen Abbau von PTPH1 (Spuren 2+11). Die Interaktion von 16E6 mit PTPH1 ist essentiell für die Degradation von PTPH1, da die 16E6 Δ ETQL-Mutante weder *in vivo* noch *in vitro* in der Lage war, PTPH1 in die proteolytische Degradation zu führen (Spuren 3+13). Da sich das 16E6 PDZ-Bindemotiv (ETQL) leicht von dem Konsensus-PDZ-Motiv S/TXV unterscheidet (NOURRY *et al.*, 2003), wurde über *in vitro* Mutagenese die Mutante 16E6+ETQV hergestellt, bei der das C-terminale Leucin gegen ein Valin ausgetauscht wurde. Diese Sequenz vermittelt eine stärkere Bindung an PDZ-Domänen. Die 16E6+ETQV Mutante induzierte eine stärkere Degradation von PTPH1 *in vivo* (Spur 17). Diese Daten belegen, wie essentiell das PDZ-Bindemotiv von 16E6 für die Degradation von PTPH1 ist. Obwohl die C-terminale Hälfte von 16E6 (AS 85-151) mit PTPH1 interagiert (Abb. 8), war sie nicht ausreichend, um die PTPH1-Spiegel zu reduzieren, unabhängig von der Anwesenheit (Spuren 4+12) oder der Abwesenheit (Spur 6) des ETQL-Motivs.

Die proteolytische Degradation von vielen zellulären Proteinen, die von dem PDZ-Bindemotiv gebunden werden, benötigt die Komplexbildung von 16E6 mit E6-AP, einer zellulären Ubiquitinligase, obwohl auch andere Ubiquitinligasen involviert sein können, wie für hDlg vermutet (PIM *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob E6-AP die Ligase ist, die für die proteolytische Degradation von PTPH1 verantwortlich ist, wurden drei Mutanten von 16E6 getestet, die sich in ihrer Bindung an E6-AP unterscheiden. Die Deletion der AS 123-126 verhindert die Interaktion mit E6-AP, die Degradation von p53 und vermittelt einen Defekt in der Immortalisierung (FOSTER *et al.*, 1994; GEWIN *et al.*, 2004; KIYONO *et al.*, 1998; KLINGELHUTZ *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1999). Diese Deletion eliminierte die Fähigkeit von 16E6 PTPH1 zu degradieren (Spuren 5+15). Der Austausch der Aminosäure F an der Position 47 gegen ein Arginin (16E6-F47R) (beschrieben in NOMINÉ *et al.*, 2006) hat keinen Einfluss auf die Bindung an E6-AP, aber verhindert die Degradation von p53, indem die Rekrutierung von p53 zum Komplex 16E6-E6-AP gehemmt wird (NOMINÉ *et al.*, 2006; ZANIER *et al.*, 2005). Dies wurde im Zusammenhang mit einer weiteren Mutation des C an Position 6 zu einem S analysiert (NOMINÉ *et al.*, 2006, ZARNIER *et al.*, 2005). In unserem Labor konnte nachgewiesen werden, dass 16E6-F74R auch ohne diese zusätzliche Mutation nicht in der Lage war, p53 zu degradieren (Daten nicht gezeigt).

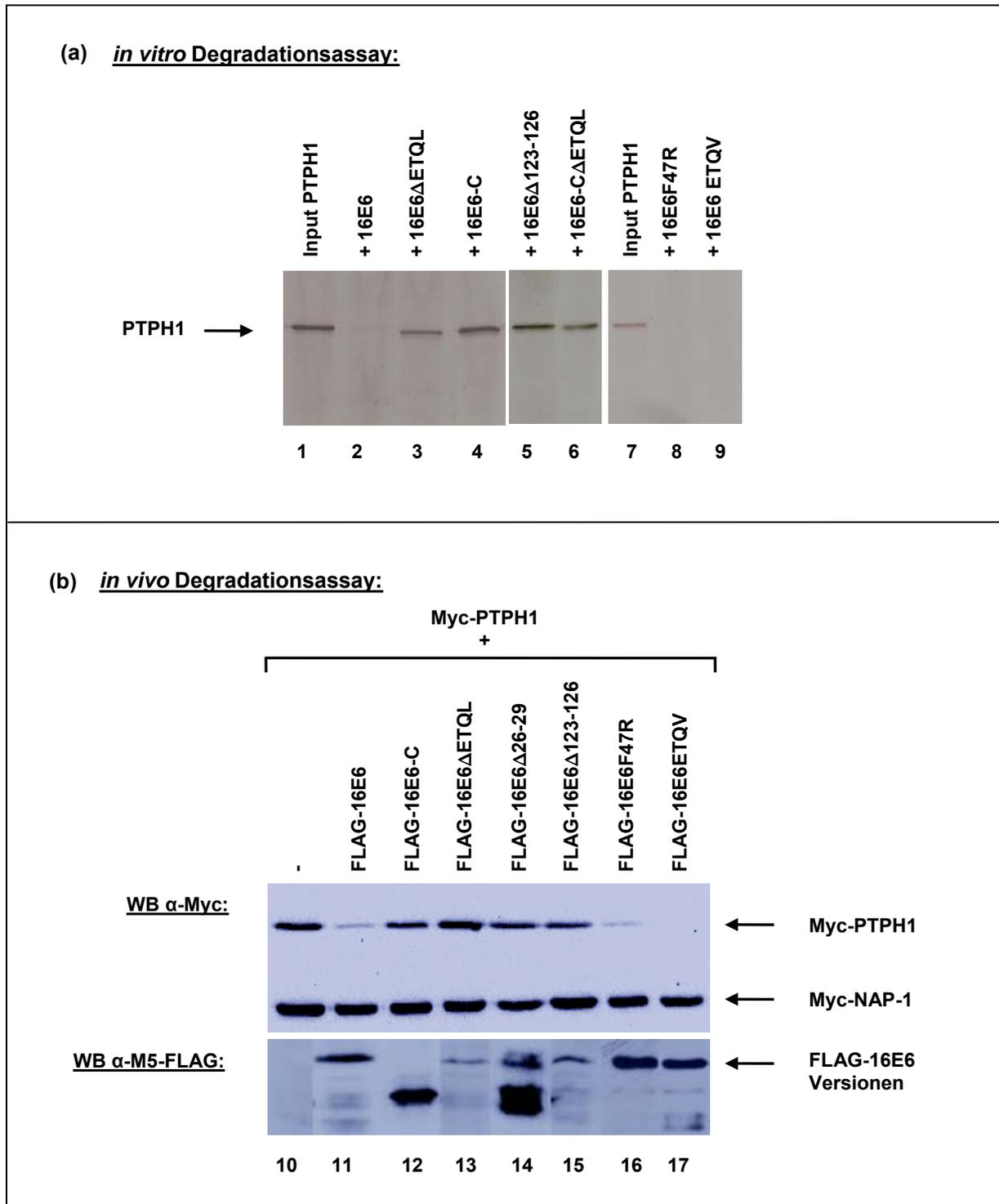


Abb. 14: 16E6 degradiert PTPH1 *in vitro* und *in vivo*.

(a) *In vitro* Degradationsassay. IVT, ³⁵S-markiertes PTPH1 und 16E6 (Spur 2), 16E6ΔETQL (Spur 3), 16E6-C (Spur 4), 16E6Δ123-126 (Spur 5), 16E6-CΔETQL (Spur 6), 16E6-F47R (Spur 8) oder 16E6ETQV (Spur 9) wurden für 3h miteinander inkubiert, bevor sie über ein SDS-PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. In den Spuren 1 und 7 wurden 10% des IVT-Produktes von PTPH1 aufgetragen. Die Position von PTPH1 ist eingezeichnet.

(b) *In vivo* Degradationsassay. Ein Expressionsvektor für Myc-PTPH1 wurde kotransfiziert mit einem Expressionsvektor für FLAG-16E6 oder für verschiedene 16E6-Mutanten wie in der Figur angegeben (Spuren 10-17). Ein Expressionsvektor für Myc-hNAP-1 wurde als Transfektionskontrolle kotransfiziert. 15 µg der gewonnenen Extrakte wurden auf einen SDS-PAGE aufgetrennt und Myc-PTPH1 und Myc-hNAP-1 wurden in einem Western Blot mit dem Myc-Antikörper detektiert. Zum Nachweis der Expression der verschiedenen E6-Proteine wurden 1 mg Extrakt der transfizierten C33a-Zellen über M2-FLAG-Beads aufgereinigt und die gebundenen E6-Proteine in einem Western-Blot mit dem M5-FLAG Antikörper detektiert. Die Positionen von Myc-PTPH1, Myc-hNAP-1 und der 16E6 Versionen sind angegeben.

Die Abbildung 14a und b zeigt, dass die F47R Mutation weder *in vitro* noch *in vivo* einen Einfluss auf die Degradation von PTPH1 hatte (Spur 8+16). Die dritte 16E6-Mutante 16E6 Δ 26-29, die E2- und E6-AP-bindungsdefekt ist (GRM *et al.*, 2005), wurde nur im *in vivo* Degradationsassay untersucht (Abb. 14b). Auch diese Mutante konnte PTPH1 nicht in die proteolytische Degradation führen (Spur 14). Die Expression der FLAG-16E6 Proteine wurde über einen Western Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop nachgewiesen (Abb. 14b, unterer Blot). Diese Daten belegen eine Korrelation zwischen der Bindung von 16E6 an E6-AP und der Degradation von PTPH1.

4.7 Der Proteasom-Inhibitor MG132 stabilisiert PTPH1 in Gegenwart von 16E6

Um die Beteiligung des Proteasoms an der 16E6-vermittelten Degradation von PTPH1 nachzuweisen, wurde der Einfluss des Proteasom-Inhibitors MG132 auf die Fähigkeit von 16E6, PTPH1 zu degradieren, untersucht.

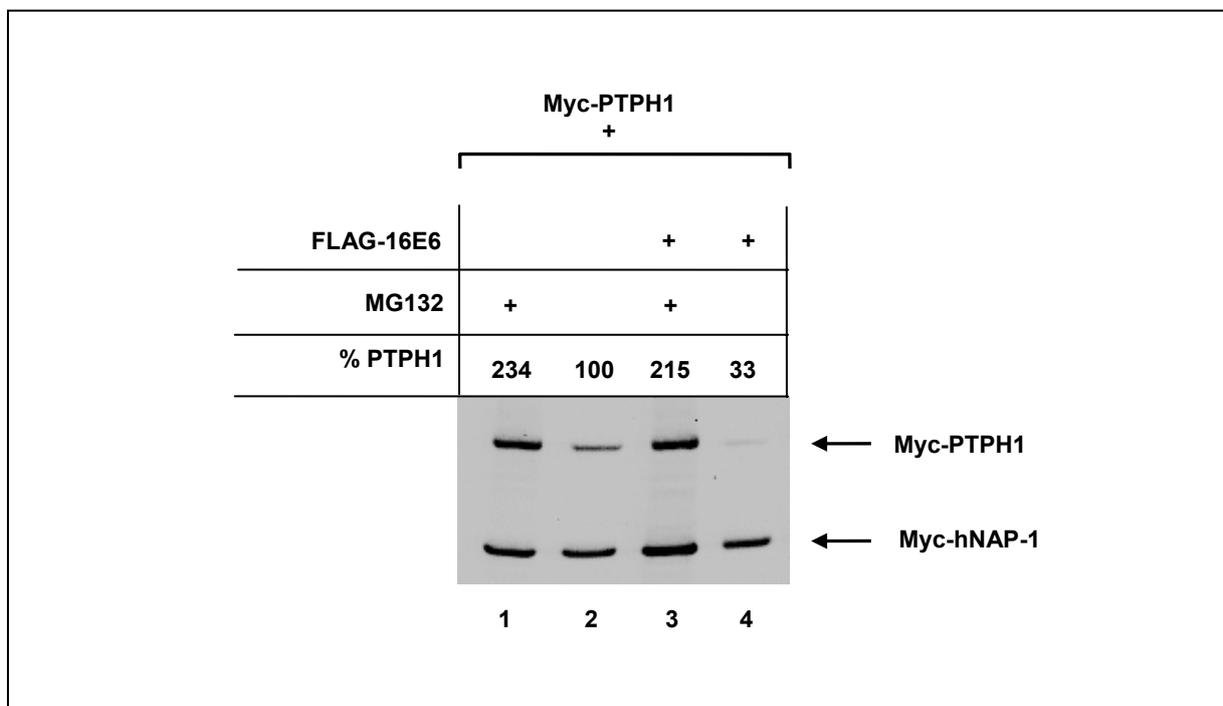


Abb. 15: Der Proteasom Inhibitor MG132 verhindert die Degradation von PTPH1 durch 16E6.

C33a-Zellen, die transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-16E6 transfiziert wurden, wurden vor der Ernte entweder mit 25 μ M MG132 (Spuren 1+3) oder mit ETOH (Spuren 2+4) für 12h inkubiert, je 15 μ g der Extrakte über ein SDS-PAGE aufgetrennt und Myc-PTPH1 über einen Myc-Antikörper detektiert. Die prozentualen Mengen an PTPH1 wurden über das Programm *Quantity One* (Biorad) quantifiziert und der Wert von Myc-PTPH1 allein wurde auf 100% gesetzt. Die Position des detektierten Myc-PTPH1 und Myc-hNAP-1 sind eingezeichnet.

Hierfür wurden die transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1, Myc-hNap-1 und FLAG-16E6 transfizierten Zellen vor Ernte mit MG132 bzw. dem Lösungsmittel Ethanol behandelt (Abb. 15). Die Inkubation in Gegenwart von MG132 führte zu einer Stabilisierung von PTPH1 von 100% (Spur 2) auf 234 % (Spur 1), was darauf hindeutet, dass PTPH1 normalerweise über das Proteasom abgebaut wird. Die Gegenwart von 16E6 hatte eine drastische Reduktion der Menge von PTPH1 auf 33% (Spur 4) zur Folge, die durch die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 verhindert werden konnte (Spur 3). Dieses Experiment unterstützt die Vermutung, dass PTPH1 durch 16E6 über das Proteasom abgebaut wird.

4.8 Das Exon 12 von PTPH1 hat keinen Einfluss auf die Degradation von PTPH1 durch 16E6

Während der Untersuchungen stellte sich heraus, dass den 24 cDNAs für PTPH1, die im ursprünglichen Hefe-Two-Hybrid-System gefunden wurden (TÖPFFER, 2005), die AS 334-379 fehlten. Dieses Segment liegt zwischen der Band4.1-Domäne und der PDZ-Domäne (siehe Abbildung 17).

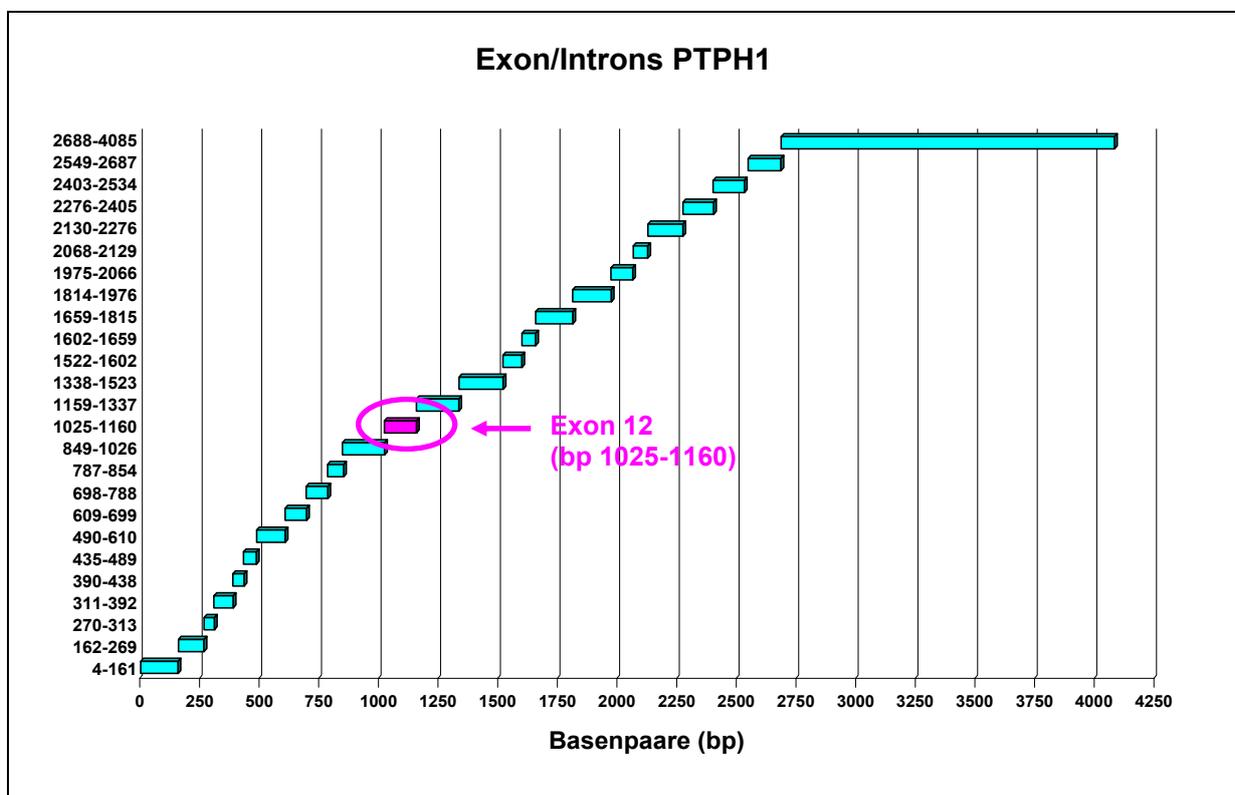


Abb. 16: Darstellung der Exons von PTPH1.

In der Abbildung sind die 25 Exons von PTPH1 und die entsprechenden Positionen, die von den 25 Exons kodiert werden, in der mRNA gezeigt. Das Exon 12 (bp 1025-1160), das den 24 cDNAs für PTPH1 fehlt, ist in der Abbildung in pink dargestellt.

Diese 45 Aminosäuren haben keine strukturellen Ähnlichkeiten mit bekannten Protein-Motiven. Über eine BLAST-Suche konnte gezeigt werden, dass diese 45 AS genau vom Exon 12 kodiert werden. Wie in Abbildung 16 dargestellt, umfasst das Gen von PTPH1 25 Exons. Wahrscheinlich stellen die 24 cDNA-Klone, die aus der HaCat-cDNA-Bank isoliert wurden, eine alternative Splice-Variante von PTPH1 dar. Um zu untersuchen, ob die Interaktion und Degradation von PTPH1 durch dieses Exon 12 beeinflusst wird, wurden Expressionsvektoren für das full-length HA-PTPH1+Ex12 und FLAG-16E6 transient in C33a-Zellen transfiziert und in einem *in vivo* Degradationsassay analysiert (Abb. 17). Als Transfektionskontrolle wurde ein Expressionsvektor für HA-hNAP-1 kotransfiziert. Wie in Abbildung 17 gezeigt, konnte PTPH1+Ex12 (Spur 1) von 16E6 ebenso degradiert werden, wie der Wildtyp.

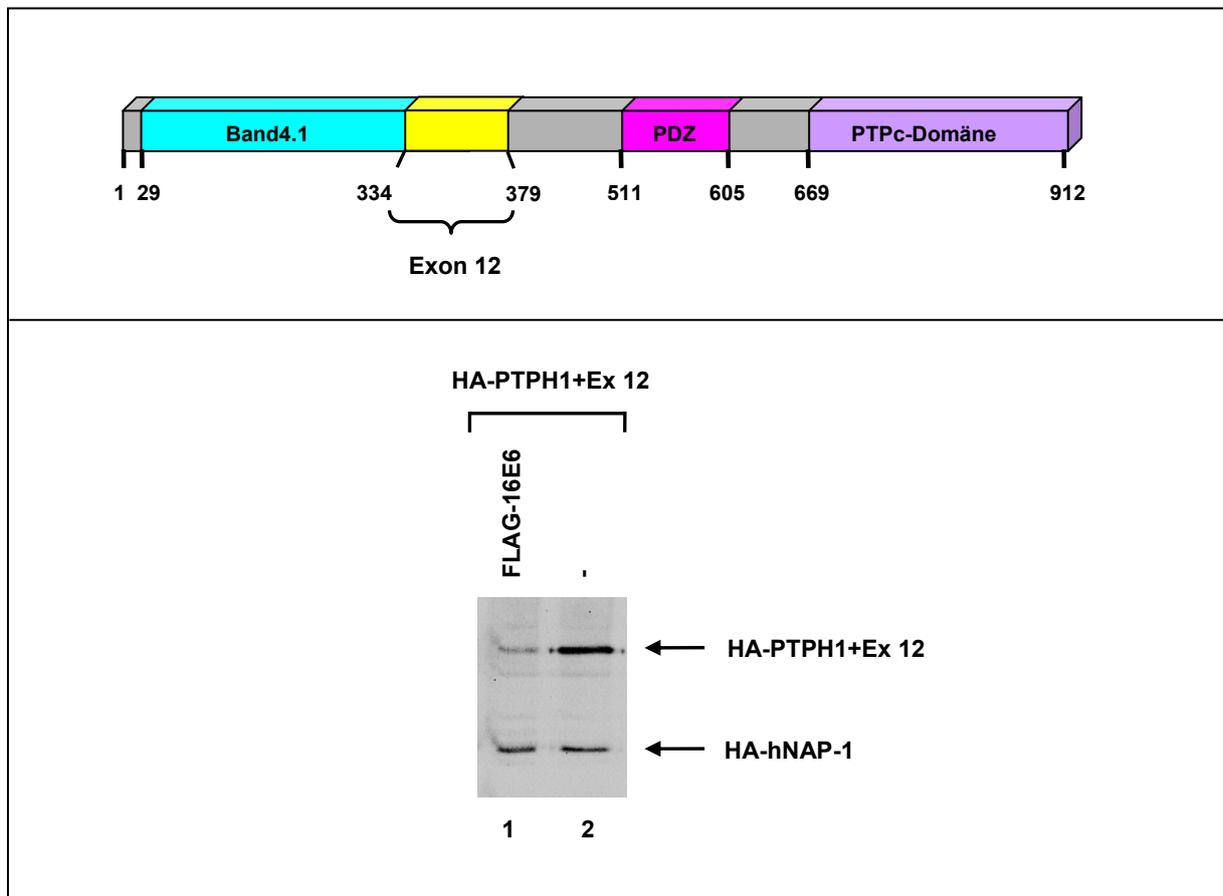


Abb. 17: 16E6 degradiert auch HA-PTPH1+Ex 12.

In vivo Degradationsassay. 15 µg Extrakte von C33a-Zellen, die transient mit HA-PTPH1+Ex12, FLAG-16E6 und HA-hNAP1 transfiziert wurden, wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western-Blot mit dem HA-Antikörper nachgewiesen. Die Positionen der beiden Proteine HA-PTPH1+Ex und HA-hNAP-1 sind gekennzeichnet. Der Aufbau von PTPH1, mit den Positionen der zur Band4.1-Domäne homologen Region, der PDZ-Domäne und der Phosphatase-Domäne (PTPc) sowie das Exon 12 sind gezeigt.

4.9 Das Targeting von PTPH1 ist bei HPV 18E6 konserviert

Das PDZ-Bindemotiv ist unter den genitalen Hochrisiko HPV-Typen konserviert. Wie erwartet war auch 18E6, das für ein konserviertes PDZ-Bindemotiv S/TXV kodiert, in der Lage, PTPH1 zu degradieren, wie in *in vitro* (Abb. 18a, Spuren 1-2) und *in vivo* (Abb. 18b, Spuren 3-4) Degradationsassays belegt wurde.

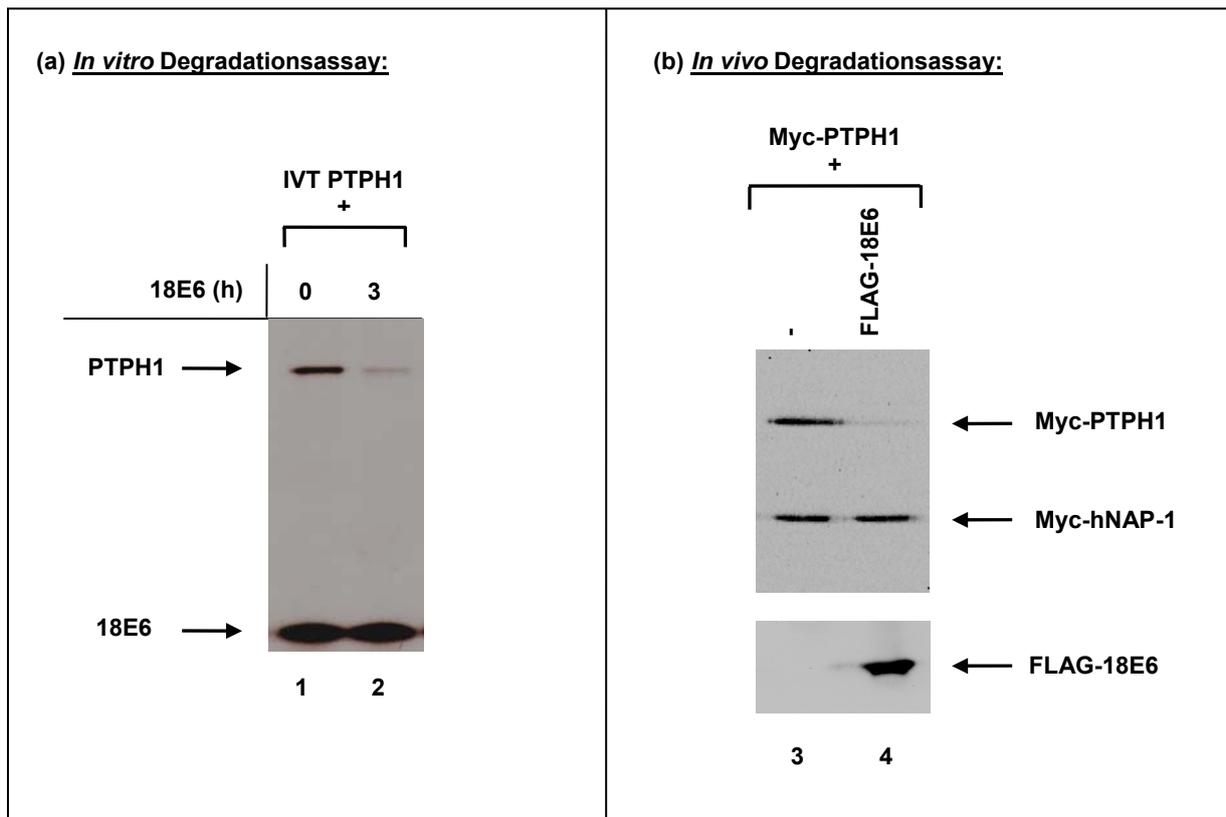


Abb. 18: Auch 18E6 induziert die verstärkte Degradation von PTPH1.

(a) *In vitro* Degradationsassay. IVT, ³⁵S-markiertes PTPH1 und 18E6 wurden für 0h (Spur 1) bzw. 3h (Spur 2) miteinander inkubiert, bevor sie über ein SDS-PAGE analysiert und über eine Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. Die Positionen von 18E6 und PTPH1 sind eingezeichnet.

(b) *In vivo* Degradationsassay. Je 15 µg Extrakte von C33a-Zellen, die mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-18E6 (oberer Blot, Spur 4) oder FLAG-LV (Spur 3) transfiziert wurden, wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen und in einem Western-Blot auf die Menge an Myc-PTPH1 mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop untersucht. Ein Expressionsvektor für Myc-hNAP-1 wurde als Kontrolle kotransfiziert. Für den Expressionsnachweis von 18E6 wurde ein mg der Extrakte mit Hilfe von M2-FLAG-Beads aufgereinigt und gebundenes FLAG-18E6 mit einem FLAG-Antikörper detektiert (unterer Blot, Spuren 3+4). Die Positionen von Myc-PTPH1, Myc-hNAP-1 und FLAG-18E6 sind eingezeichnet.

Des Weiteren konnte 18E6 PTPH1 in einer ähnlichen Kinetik wie 16E6 degradieren, denn das spezifische PTPH1-Signal war nach 3h fast verschwunden (Spuren 1-2). Die Expression von FLAG-18E6 wurde über einen Western Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop nachgewiesen (Abb. 18b, unterer Blot).

4.10 Die endogenen Mengen von PTPH1 sind in HPV-positiven Zelllinien reduziert

Die bisher gezeigten Daten implizieren, dass in etablierten HPV-positiven, zervikalen Zelllinien der endogene PTPH1-Spiegel aufgrund der Degradation durch die E6-Proteine geringer als in HPV-negativen Zelllinien sein müsste. Um dies zu überprüfen, wurden die endogenen Mengen von PTPH1 in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien über eine Immunpräzipitation verglichen. Es wurden die Zelllinien SiHa und Caski, die HPV16 positiv sind, sowie die HPV-18 positive Zelllinie HeLa verwendet. Die Zelllinien RTS3b und C33a, sowie normale, humane, epitheliale Keratinozyten (NHEK) wurden als Vertreter HPV-negativer Zellen eingesetzt. Für die Detektion der endogenen Spiegel von PTPH1 wurden die verschiedenen Ganzzellextrakte mit einem PTPH1 Antikörper inkubiert und die Antikörper-Antigen-Komplexe mit Protein-A-Sepharose präzipitiert. Anschließend wurde das gebundene PTPH1 über einen Western Blot mit dem PTPH1 Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung 19 zeigt, dass in den HPV-positiven Zelllinien SiHa, Caski und HeLa (Spuren 4, 3 und 1) im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien RTS3b, C33a (Spuren 5 und 6) und primären, humanen, epithelialen Keratinozyten (NHEK, Spur 2) weniger PTPH1 nachweisbar war. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis von Aktin (unterer Blot, Spuren 1-6).

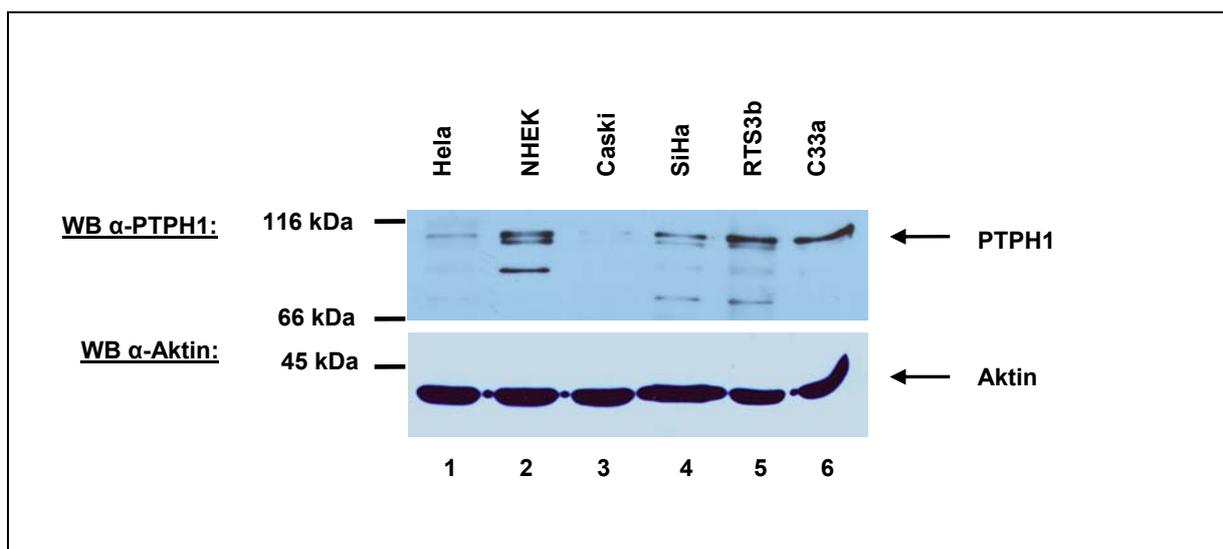


Abb. 19: Endogene Spiegel von PTPH1 sind in HPV positiven Zelllinien reduziert.

Immunpräzipitation. Je 1.2 mg Ganzzellextrakte der HPV16-positiven Zelllinien Caski (oberer Blot, Spur 3) und SiHa (Spur 4), der HPV18-positiven Zelllinie HeLa (Spur 1), der HPV-negativen Zelllinien RTS3b (Spur 5) und C33a (Spur 6), sowie von normalen, humanen, epithelialen Keratinozyten (NHEK, Spur 2) wurden für die Immunpräzipitation mit einem PTPH1-Antikörper eingesetzt. Der Nachweis von präzipitiertem PTPH1 erfolgte über einen Western-Blot, der ebenfalls mit dem PTPH1-Antikörper entwickelt wurde. Als Kontrolle wurde die Menge an Aktin in 15 µg der Extrakte in einem Western-Blot mit dem Aktinantikörper nachgewiesen (unterer Blot, Spuren 1-6).

4.11 Reduktion der intrazellulären E6-Menge korreliert mit einer Erhöhung der endogenen PTPH1-Konzentration in SiHa-Zellen

Bei einer Reduktion der Menge von E6 in HPV-positiven Zervixkarzinom-Zelllinien sollte es zu erhöhten Spiegeln an endogenem PTPH1 kommen. Die Integration von HPV in das Wirtsgenom ist ein wichtiger Schritt bei der zervikalen, neoplastischen Progression und führt in der Regel zu einer Deletion oder Unterbrechung des ORFs des viralen Transkriptionsfaktor E2, während die Expression der E6- und E7-Gene erhalten bleibt (LONGWORTH UND LAIMINS, 2004; MÜNGER *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass die Überexpression von E2 unter Kontrolle heterologer Promotoren in HPV-positiven Zervixkarzinom-Zelllinien den frühen HPV-Promotor effizient reprimiert. Dies führt zu einer Reduktion der E6- und E7-Expression (DESAINTEs *et al.*, 1997; GODWIN UND DIMAIO, 2000; GODWIN *et al.*, 1998; THIERRY UND YANIV, 1987).

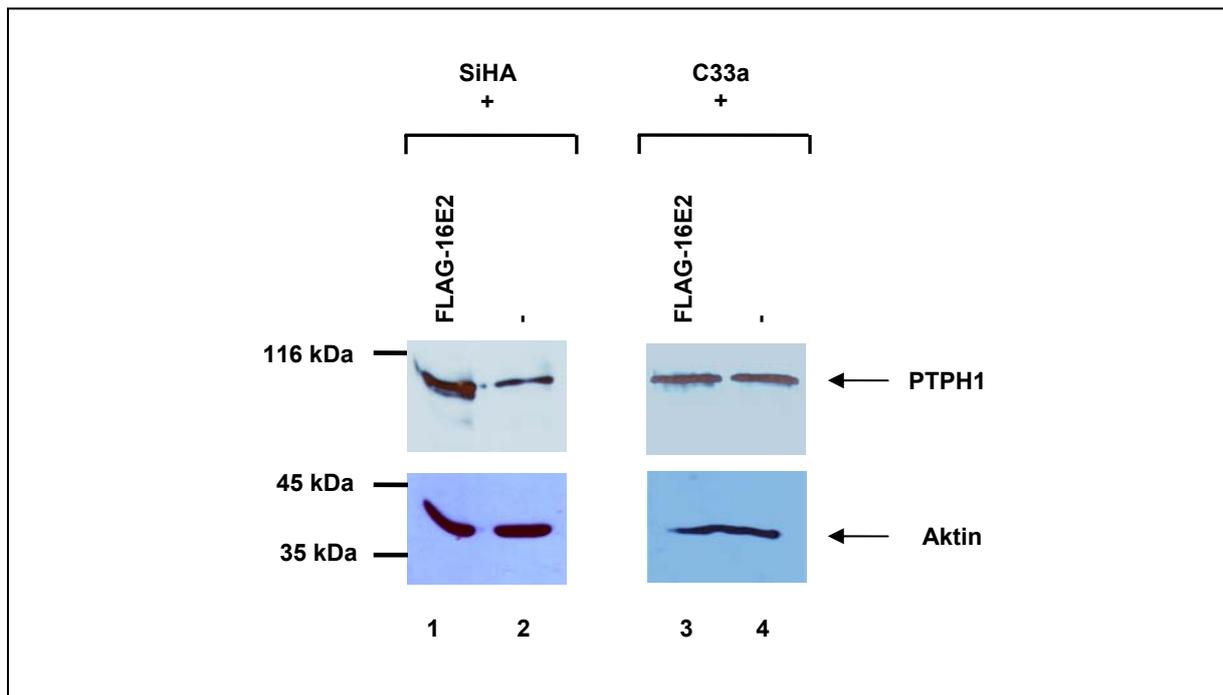


Abb. 20: Die Einführung eines Expressionsvektors für 16E2 in SiHa-Zellen führt zu einer Erhöhung der endogenen PTPH1 Menge.
SiHa und C33a Zellen wurden mit Expressionsvektoren für 16E2 (obere Blots, Spuren 1+3) oder dem Leervektor pcDNA3.1-FLAG (Spuren 2+4) transfiziert. Nach 24h wurden die transfizierten Zellen für 48h mit 800 µg/ml G418 selektioniert. Je 1.2 mg der Zellextrakte wurden für eine Immunopräzipitation mit dem PTPH1-Antikörper eingesetzt. Als Kontrolle wurden 15 µg Extrakt auf die Menge an Aktin untersucht (untere Blots, Spuren 1-4). Einige Markerbanden und die Position von Aktin und PTPH1 sind eingezeichnet.

Um zu analysieren, ob diese E2-vermittelte Repression mit einer Veränderung der endogenen PTPH1-Konzentration korreliert, wurden SiHa-Zellen mit einem

Expressionsvektor für FLAG-16E2 transfiziert. Aufgrund der Tatsache, dass die Wiedereinführung von E2 in Zervixkarzinom-Zelllinien, wie HeLa, zu einem Wachstumsstopp oder zur Apoptose führen kann (FRANCIS *et al.*, 2000; NISHIMURA *et al.*, 2000) wurden die Zellen nur für 48h mit G418 selektioniert. Verglichen mit dem Leervektor (Abb. 20, Spur 2) wiesen Extrakte aus SiHa-Zellen, die mit dem 16E2-Vektor transfiziert wurden, eine deutlich erhöhte Menge an PTPH1 (Spur 1) auf. E2 per se hatte keinen Effekt auf den endogenen PTPH1-Spiegel, wie durch die Überexpression von 16E2 in HPV-negativen C33a-Zellen nachgewiesen werden konnte (Spuren 3 und 4). Als Kontrolle für gleiche Proteinkonzentrationen bei der Immunpräzipitation wurde die Menge an Aktin über einen Western Blot überprüft (unterer Blot, Spuren 1-4). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die erhöhten, intrazellulären PTPH1-Spiegel eine Folge der reduzierten Expression von 16E6 durch die E2-vermittelte Repression des frühen Promotors p97 ist. Dies deckt sich mit dem Modell, dass 16E6 die verstärkte Degradation von endogenem PTPH1 in SiHa-Zellen induziert.

4.12 Herstellung einer stabilen C127i-Zelllinie mit PTPH1-Knock-Down

Im Fall von 16E6 ist das PDZ-Bindemotiv notwendig für die morphologische Transformation von etablierten Nagerzelllinien (KIYONO *et al.*, 1997). Unsere Daten belegen, dass 16E6 die proteolytische Degradation von PTPH1 induziert und somit die intrazellulären Mengen von PTPH1 reduziert. Es wurde vorgeschlagen, dass PTPH1 als Tumorsuppressorprotein fungiert, da es in menschlichen Karzinomen somatische Mutationen aufwies (WANG *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Menge an PTPH1 durch 16E6 und der morphologischen Transformation der C127i-Zellen durch 16E6 besteht, sollten die Spiegel an endogenem PTPH1 in diesen Zellen durch siRNA verringert werden. Diese siRNA sollte von dem stabil in das Genom integrierten pTER⁺-Vektor unter Kontrolle des H1-Promotors exprimiert werden. Zunächst wurde mit Hilfe des „*siRNA-Target-Finder*“ der Firma Ambion (Austin, USA) nach potentiellen siRNA-Sequenzen in der Sequenz von Maus-PTPH1 gesucht. Aus den gefundenen siRNA-Sequenzen wurden zwei ausgewählt, die siRNA-mPTPH1-A (Basenpaare 1223-1242) und die siRNA-mPTPH1-B (Basenpaare 1557-1576). Für die Klonierung in den pTER⁺-Vektor

wurden entsprechende DNA-Oligonukleotide hergestellt. Diese DNA-Oligonukleotide bestehen aus der 19 Nukleotide (Nt) großen ausgewählten Zielsequenz in *sense* und einer zu dieser reversen, komplementären *antisense* Orientierung, die über einen 9 Nt großen Spacer miteinander verbunden sind (Abb. 21). An das 3'-Ende wurde das RNA-Terminationssignal eingefügt. Für die Klonierung in den pTER⁺-Vektor wurden Nukleotidüberhänge für die BamH1- und HindIII-Schnittstellen an das 5'-Ende bzw. 3'-Ende des Oligonukleotids angefügt.

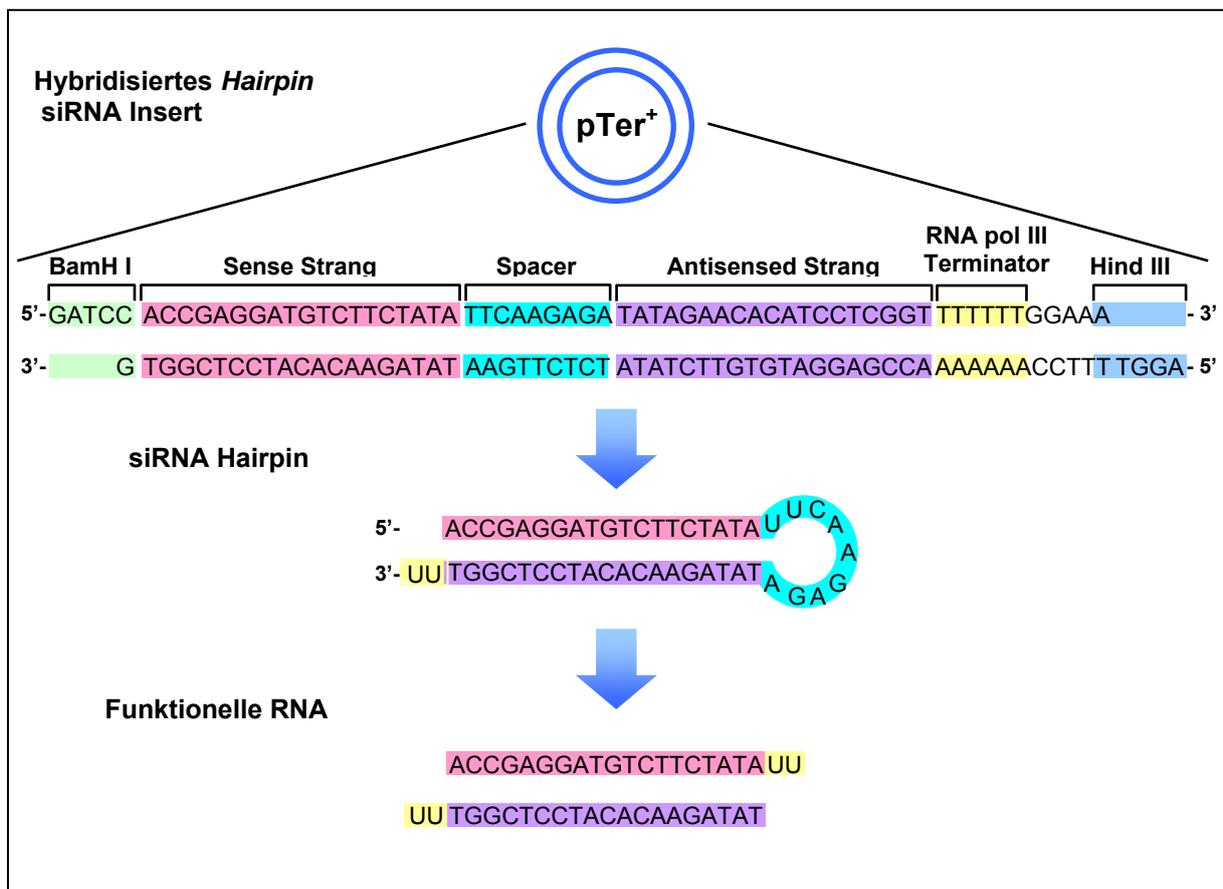


Abb.: 21: siRNA-Design am Beispiel der siRNA-mPTPH1-A.

Die beiden DNA-Oligonukleotide wurden hybridisiert und anschließend über BamH1 und HindIII in den pTER⁺-Vektor kloniert. Das resultierende RNA-Transkript bildet in der Zelle eine Hairpin-Struktur, die schnell in eine funktionelle RNA gespalten werden kann.

Für die Herstellung der C127i-pTER⁺-siRNA-mPTPH1-A- bzw. -B-Zelllinie wurden C127i-Zellen mit den Expressionsvektoren pTER⁺-LV, pTER⁺-siRNAmPTPH1-A bzw. pTER⁺-siRNAmPTPH1-B transfiziert, die Zellen durch die Zugabe des Antibiotikums Zeocin 48h selektioniert und mittels RT-PCR der *Knock-down* von mPTPH1 überprüft. Die Abbildung 22 belegt, dass die Expression der siRNAmPTPH1-A in C127i-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der PTPH1-RNA führte (Spur 3). Im Gegensatz dazu war in den C127i-Zellen, die die siRNAmPTPH1-

B exprimieren, keine effiziente Reduktion der PTPH1-RNA feststellbar (Spur 4). Die Analyse der Expression des *Housekeeping*-Gens HRPT-1 diente dem Nachweis, dass nur die RNA-Level für PTPH1 reduziert und gleiche RNA-Mengen eingesetzt worden waren (Abb. 22, unteres Agarosegel). Für die weiterführenden Experimente wurde die C127i-pTER⁺siRNAmPTPH1-A, sowie die C127i-pTER⁺-LV Zelllinie verwendet.

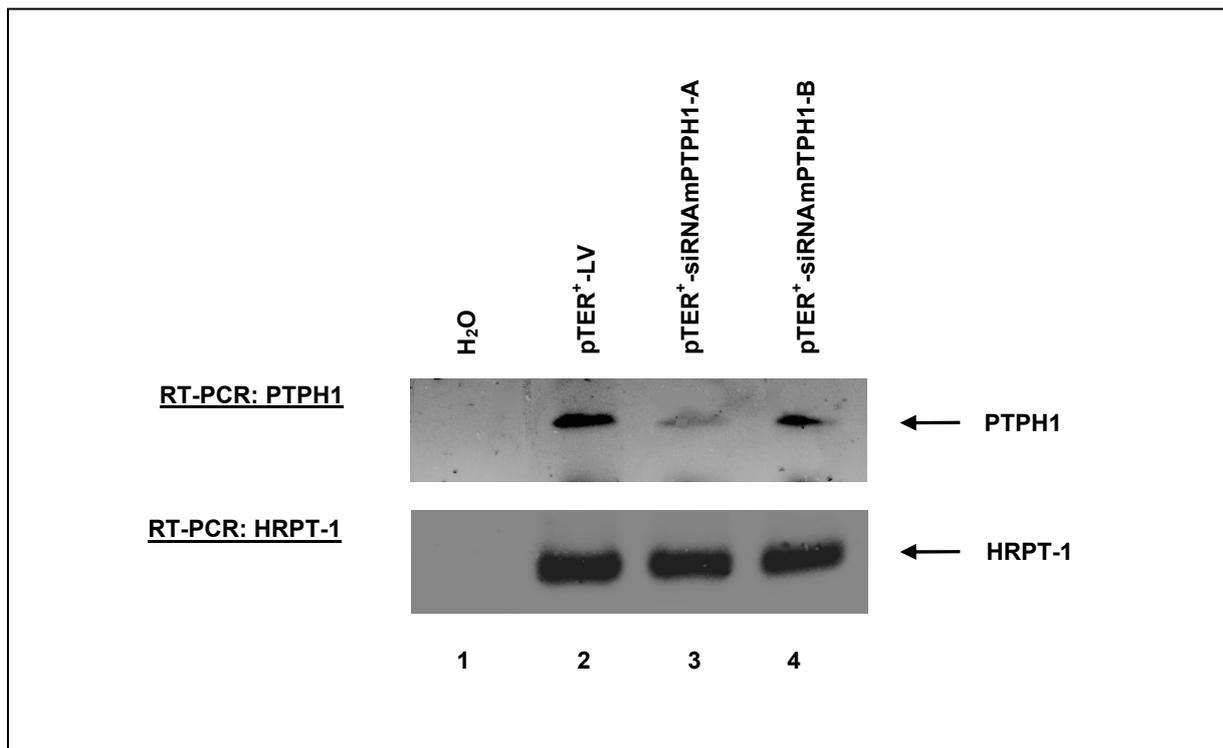


Abb. 22: Nachweis des PTPH1 Knock-Downs.

RT-PCR. Je 1 µg der jeweiligen RNA wurde in einer *One-Step-RT-PCR* (Qiagen) mit den Primern PTPH1-XhoI-5' und mPTPH1Seq.860-3' auf die Anwesenheit von PTPH1 überprüft. Für das 1%ige Agarosegel wurden je 10 µl des RT-PCR-Produktes aufgetragen. Spur 1 zeigt die H₂O-Negativkontrolle. Das Level der PTPH1-RNA in den C127i-pTER⁺siRNAmPTPH1-A-Zellen (Spur 3) bzw. den C127i-pTER⁺siRNAmPTPH1-B-Zellen (Spur 4) wurde mit dem der C127i-pTER⁺-LV-Zellen (Spur 2) verglichen (oberes Agarosegel). Die Expression der HRPT-1 Gens wurde als interner Kontrolle überprüft (unteres Agarosegel). In der Abbildung ist die Position des amplifizierten PTPH1- bzw. HRPT-1 Fragments eingezeichnet.

4.13 Die Reduktion der endogenen Menge an PTPH1 führt zur morphologischen Transformation der Mausfibroblasten-Zelllinie C127i

Im Verlauf der Kultivierung der C127i-siRNA-mPTPH1-A-Zellen wurde eine morphologische Veränderung der Zellen deutlich (Abb. 23). Im Vergleich zu den C127i-pTER-LV-Zellen, die die gewohnte, pflastersteinähnliche Zellform in Folge der Kontaktinhibition aufwiesen (Abb. 23, linke Spalte), veränderte sich die Morphologie der C127i-pTER⁺-siRNAmPTPH1-A-Zellen (rechte Spalte). Die Zahl der lang gestreckten, spindelförmigen Zellen nahm zu, bis die C127i-pTER⁺-siRNAmPTPH1-

A-Zellen nach 6 Tagen (rechte Spalte, untere Abb.) morphologisch transformiert erschienen. Die Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt ihre Kontaktinhibition verloren und wuchsen ungeordnet übereinander, im Gegensatz zu den C127i-pTER⁺-LV- (linke Spalte, untere Abb.) und den C127i-pTER⁺-siRNAmPTPH1-B-Zellen (Daten nicht gezeigt).

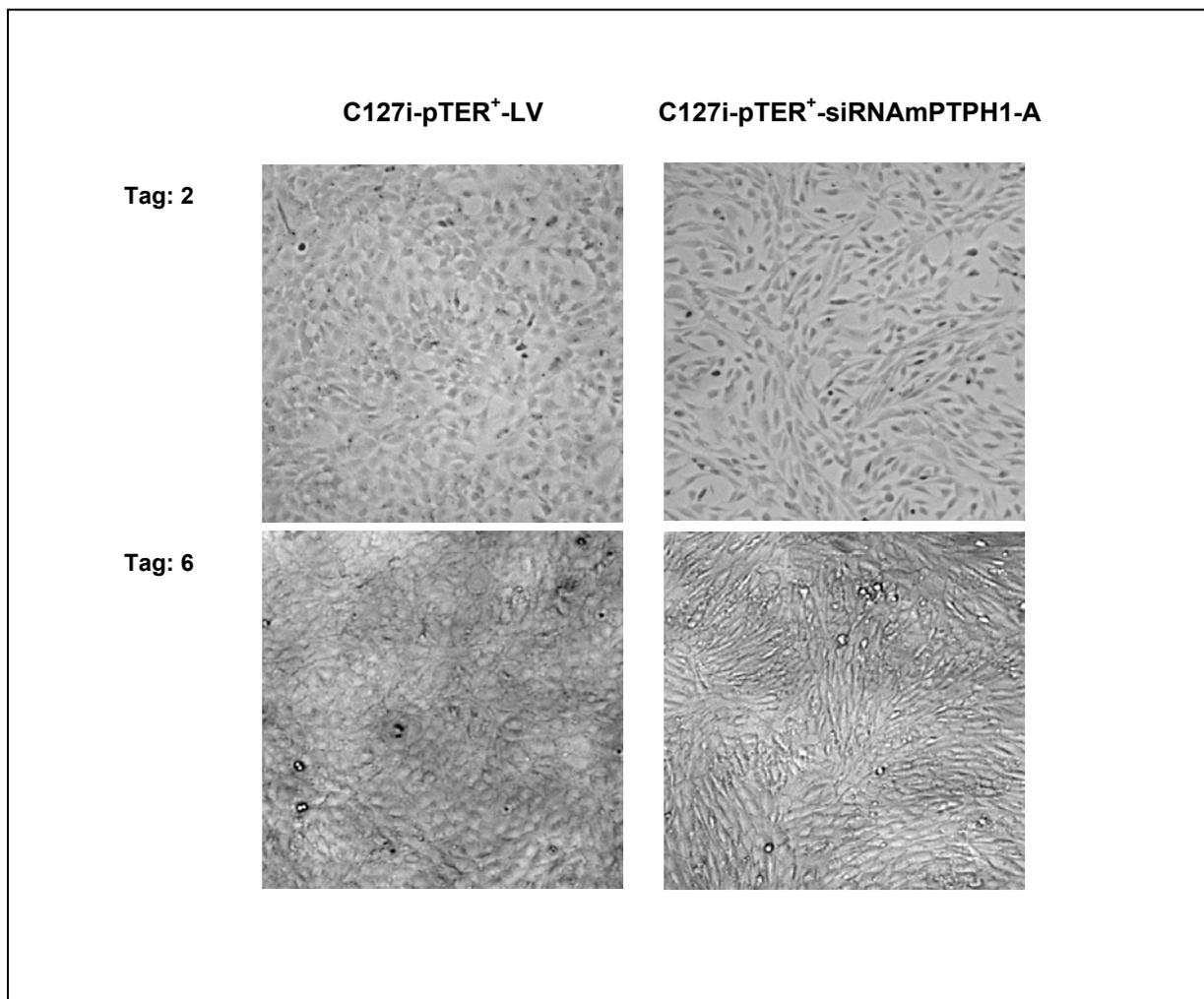


Abb. 23: Die Reduktion des endogenen PTPH1-Spiegel führt zu einer Transformation der C127i-Zellen. Dargestellt sind Mikroskopaufnahmen der C127i-pTER⁺-LV-Zellen (linke Spalte) und der C127i-pTER⁺-siRNAmPTPH1-A-Zellen (rechte Spalte). Oben sind die jeweiligen Zellen an Tag 2 und unten an Tag 6 nach dem Aussäen abgebildet.

4.14 Die Reduktion der intrazellulären PTPH1-Konzentration in C127i-Zellen führt zum Wachstum im Soft-Agar

Um zu überprüfen, ob die durch die Reduktion der endogenen PTPH1-Menge induzierte morphologische Transformation der C127i-Zellen auch das Wachstum im Weichagar ermöglicht, wurden so genannte Soft-Agar-Assays durchgeführt. Das Wachstum im Soft-Agar ist ein weiterer Hinweis auf Transformation, da Zellen, die in

diesem Assay wachsen, ihre Adhäsionsabhängigkeit verloren haben und proliferieren können, ohne an eine Oberfläche gebunden zu sein. Nach 10-14 Tagen zeigte sich, dass die Reduktion der endogenen Menge an PTPH1 in den C127i-Zellen zur Bildung von Kolonien im Soft-Agar führte (Abb. 24, rechts, violette Pfeile), im Gegensatz zu den C127i-pTER⁺-LV-Zellen (Abb. 24, links). Diese Daten belegen, dass die Reduktion der PTPH1-Menge in den C127i-Zellen zur Transformation der Zellen führt.

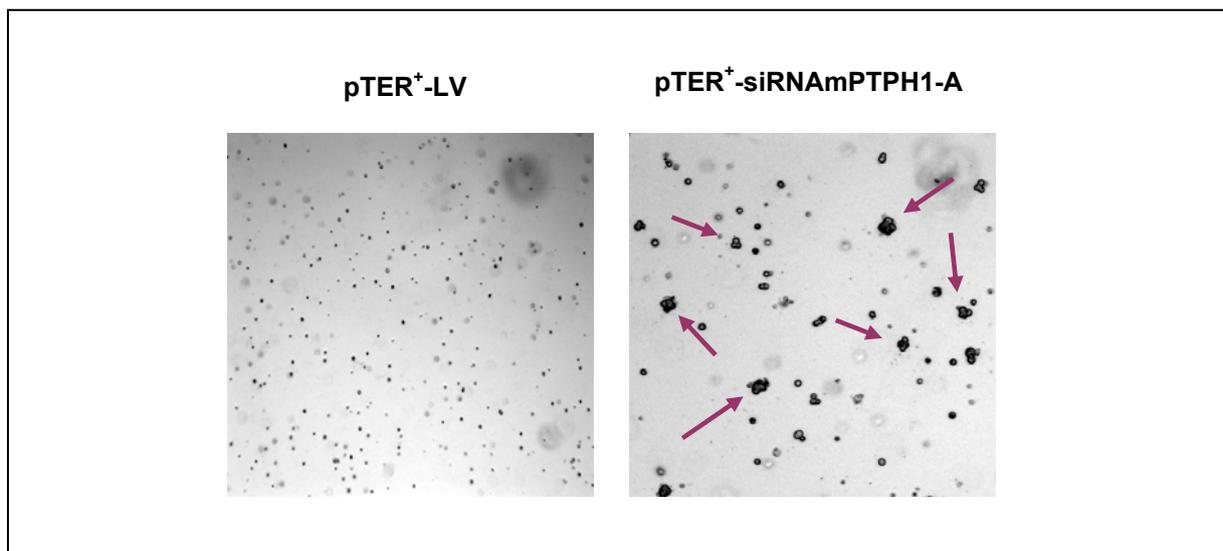


Abb. 24: Die Reduktion der intrazellulären PTPH1-Menge ermöglicht die Bildung von Kolonien im Soft-Agar. Lichtmikroskopische Aufnahmen. Für den Soft-Agar-Assay wurden 1.875×10^5 C127i-pTER⁺-LV-Zellen (linke Spalte) bzw. C127i-pTER⁺-siRNAmPTPH1-A-Zellen (rechte Spalte) in 2.5 ml 0.3%iger Agaroselösung+2xMEM aufgenommen und je 1 ml dieser Suspension in die 0.6%iger Agaroselösung+2xMEM gegeben. Das Wachstum der Zellen wurde über einen Zeitraum von 10-14 Tagen im Lichtmikroskop beobachtet und die Zellen einmal pro Woche mit 150 μ l 2x MEM versorgt. Die wachsenden Klone der C127i-pTER⁺-siRNAmPTPH1-Zellen sind mit violetten Pfeilen gekennzeichnet.

4.15 PTPH1 interagiert mit dem HPV 8E6 Protein *in vitro*

Auch das kutane HPV8E6-Protein ist in der Lage, die morphologische Transformation von Nagezelllinien zu induzieren (IFTNER *et al.*, 1988). Möglicherweise spielt das Ausschalten von PTPH1 auch eine Rolle bei der morphologischen Transformation von C127i-Zellen durch 8E6. Es sollte untersucht werden, ob 8E6 trotz eines fehlenden PDZ-Bindemotivs die Aktivität von PTPH1 beeinflusst. Hierfür wurde zunächst ein GST-Pull-Down mit GST-PTPH1 und *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem 8E6 durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch 8E6 mit PTPH1 *in vitro* interagieren konnte (Abb. 25, Spur 3). Das als Negativkontrolle verwendete GST wurde nicht von 8E6 gebunden (Spur 2).

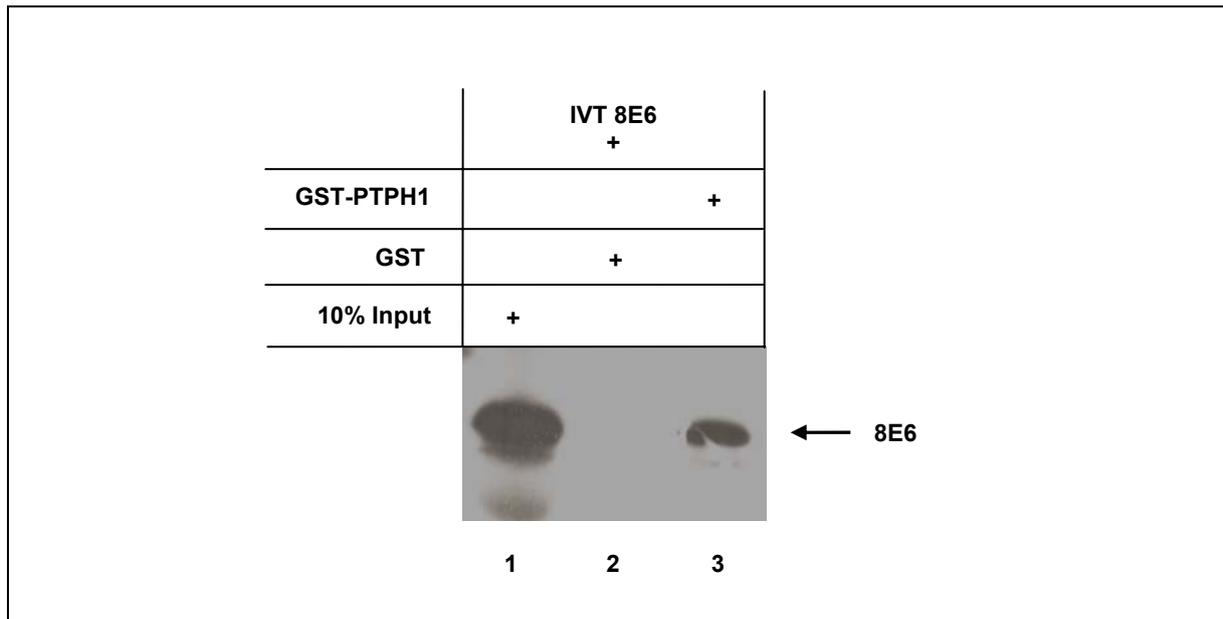


Abb. 25: 8E6 interagiert mit PTPH1 *in vitro*.

GST-Pull-Down-Assay. Über GST-Beads aufgereinigte GST (Spur 2) und GST-PTPH1 (Spur 3) Proteine wurden mit ³⁵S-markiertem, IVT 8E6 inkubiert, bevor sie über ein SDS-PAG aufgetrennt und gebundenes 8E6 über Autoradiographie sichtbar gemacht wurde. In der Spur 1 wurden 10% des IVT-Produktes von 8E6 aufgetragen. Die Position von 8E6 ist in der Abbildung eingezeichnet.

4.16 PTPH1 interagiert mit dem HPV 8E6 Protein *in vivo*

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Dafür wurden C33a-Zellen mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-8E6, FLAG-8E6-N (AS 1-93), FLAG-8E6-C (AS 94-155) oder FLAG-8E6 Δ 132-136 transient transfiziert. Wie in Abbildung 26 gezeigt, interagiert das 8E6-Protein mit Myc-PTPH1 (Spur 4). Im Gegensatz zu dem C-Terminus von 8E6 (Spur 1), wurde PTPH1 spezifisch vom N-Terminus gebunden (Spur 2), was daraufhin deutet, dass die N-terminale Region von 8E6 für die Interaktion mit PTPH1 verantwortlich ist. Die Deletion der AS 132-136 in 8E6, die zum Verlust der Bindung an den zellulären Koaktivator p300 führt (MÜLLER-SCHIFFMANN *et al.*, 2006), hatte keinen Einfluss auf die Interaktion mit PTPH1 (Spur 3). Die Expression von Myc-PTPH1 wurde in einem Western-Blot mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop bestätigt (mittlerer Blot, Spuren 1-6), während die Expression der E6-Proteine über eine M2-FLAG-Immunopräzipitation und einem anschließenden Western-Blot mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen wurde (unterer Blot, Spuren 1-6).

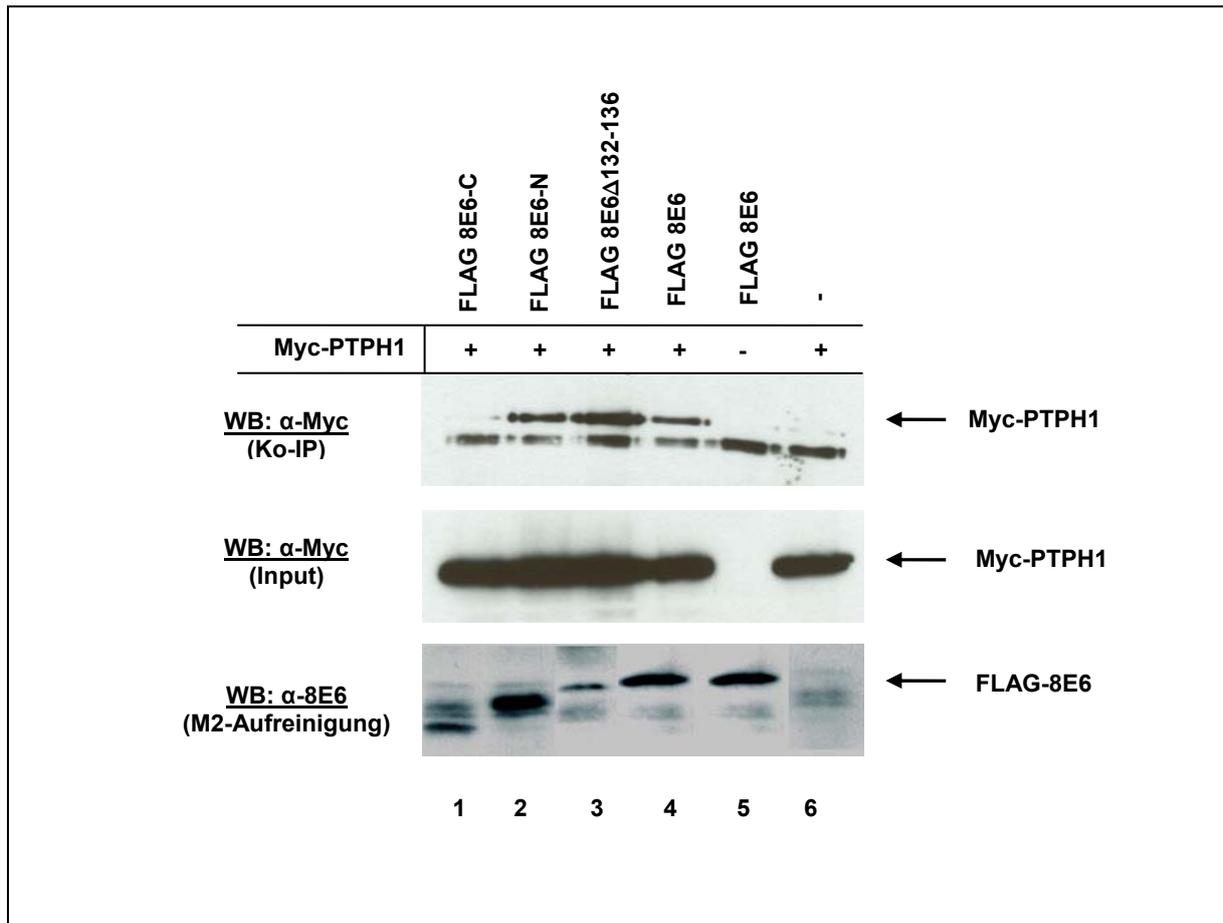


Abb. 26: 8E6 bindet mit der N-terminalen Region an PTPH1.

Ko-Immunopräzipitation. C33a-Zellen wurden, wie in der Abb. angegeben, transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-8E6, FLAG-8E6-N (AS 1-93), FLAG-8E6-C (AS 94-155) oder FLAG-8E6 Δ 132-136 transfiziert. 1 mg der Extrakte wurde für eine Immunopräzipitation mit M2-FLAG-Beads eingesetzt und kopräzipitiertes Myc-PTPH1 in einem Western-Blot mit dem Myc-Antikörper detektiert (obere Blot, Spuren 1-6). Je 15 μ g der Extrakte wurden als Kontrolle aufgetragen, um die Expression von Myc-PTPH1 in einem Western-Blot mit dem Myc-Antikörper nachzuweisen (mittlerer Blot, Spuren 1-6). Die Überprüfung der Expression der E6-Proteine erfolgte über die FLAG-Immunopräzipitate, gefolgt von einem Western-Blot mit dem FLAG-Antikörper (unterer Blot, Spuren 1-6). In der Abb. sind die Positionen des gebundenen Myc-PTPH1 und die FLAG-8E6-Versionen eingezeichnet.

4.17 Die PDZ-Domäne von PTPH1 ist nicht essentiell für die Interaktion mit 8E6

Auch wenn die Bindung von C-terminalen PDZ-Motiven an PDZ-Domänen das typische Modul der Interaktion darstellt, ist beschrieben, dass PDZ-Domänen auch andere Motive kontaktieren können (HUNG UND SHENG, 2002; NOURRY *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob dies für die Interaktion zwischen 8E6 und PTPH1 gilt, wurde die Notwendigkeit der PDZ-Domäne von PTPH1 für die Interaktion mit 8E6 analysiert. Hierfür wurden Extrakte von C33a-Zellen, die transient mit Myc-PTPH1 Δ 504-598 und FLAG-8E6 transfiziert worden waren, auf eine Interaktion untersucht. Wie die Ko-Immunopräzipitation in der Abbildung 27 belegt, konnte PTPH1 Δ 504-598, dem die PDZ-Domäne fehlt, immer noch mit 8E6 interagieren (Spur 3). Dies deutet daraufhin,

dass nicht die PDZ-Domäne von PTPH1 für die Interaktion mit 8E6 notwendig ist, sondern andere Regionen involviert sind.

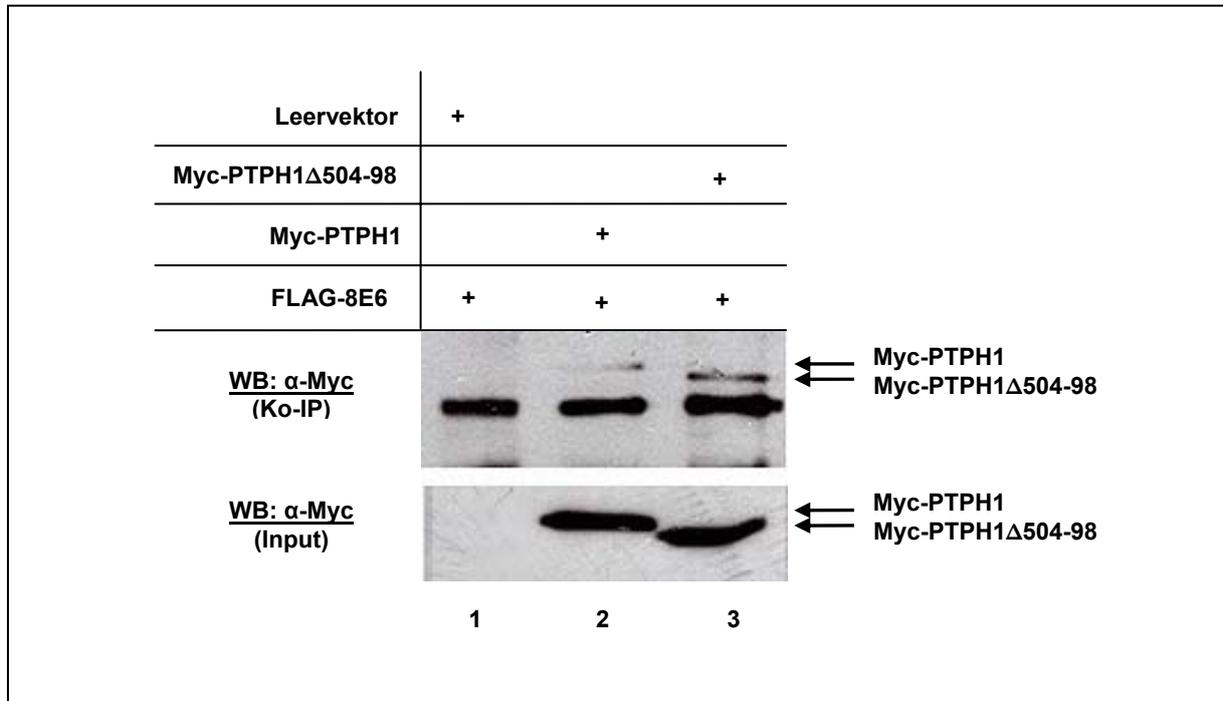


Abb. 27: Die PDZ-Domäne ist nicht essentiell für die Interaktion mit 8E6.

Ko-Immunopräzipitation. 1 mg Extrakt von C33a-Zellen, die transient mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 (Spur 2) bzw. Myc-PTPH1Δ504-598 (Spur 3) und FLAG-8E6 (Spuren 1-3) transfiziert wurden, wurden für eine Immunpräzipitation mit M2-FLAG-Beads eingesetzt. Gebundenes Myc-PTPH1 bzw. Myc-PTPH1Δ504-598 wurde mit einem Myc-Antikörper detektiert. Die Positionen von Myc-PTPH1 und Myc-PTPH1Δ504-598 sind in der Abb. angegeben.

4.18 Die AS Valin an der Position 68 innerhalb der N-terminalen Domäne des HPV 8E6-Poteins moduliert die Interaktion mit PTPH1

Die bisher beschriebenen Daten belegen, dass die Interaktion mit PTPH1 unter den E6-Proteinen von HPV16 und HPV8 konserviert ist, allerdings nicht die Art der Wechselwirkung. Während im Fall von 16E6 das PDZ-Modul für die Interaktion verantwortlich ist, wird sie bei 8E6 über den N-Terminus vermittelt.

E6-Proteine von HPV bestehen aus zwei stabil gefalteten Domänen, der C-terminalen (E6C) und der N-terminalen (E6N) Domäne. Kürzlich wurde die 3D-Struktur von 16E6-C ermittelt (NOMINÈ *et al.*, 2006). Da die Aminosäuresequenz der E6N-Domäne leicht an der von E6C ausgerichtet werden kann, wird davon ausgegangen, dass die Struktur der beiden Domänen ähnlich ist. Unter der Annahme einer pseudodimerischen 3D-Struktur der beiden E6-Domänen konnten NOMINE *et al.* (2006) „spezialisierte“ Oberflächen-AS im genitalen Hochrisiko-HPV16 E6-Protein

identifizieren (Abb. 28). Der Vergleich dieser spezialisierten AS mit anderen HPV-Spezies belegt, dass diese Oberflächen AS innerhalb der gleichen Spezies konserviert, jedoch von Spezies zu Spezies unterschiedlich sind (NOMINÈ *et al.*, 2006). Das könnte im Zusammenhang mit der Fähigkeit von E6-Proteinen verschiedener HPV stehen, ein spezifisches Set von zellulären Proteinen binden zu können. Zur Eingrenzung der Domäne innerhalb des N-Terminus von 8E6, die für die Interaktion mit PTPH1 notwendig ist, wurden zunächst Aminosäuren von 8E6 gesucht, die auf der Oberfläche des Proteins liegen und innerhalb der kutanen HPV-E6-Proteine konserviert, allerdings bei den genitalen Hochrisiko E6-Proteinen unterschiedlich sind (NOMINE *et al.*, 2006, Abb. 28).

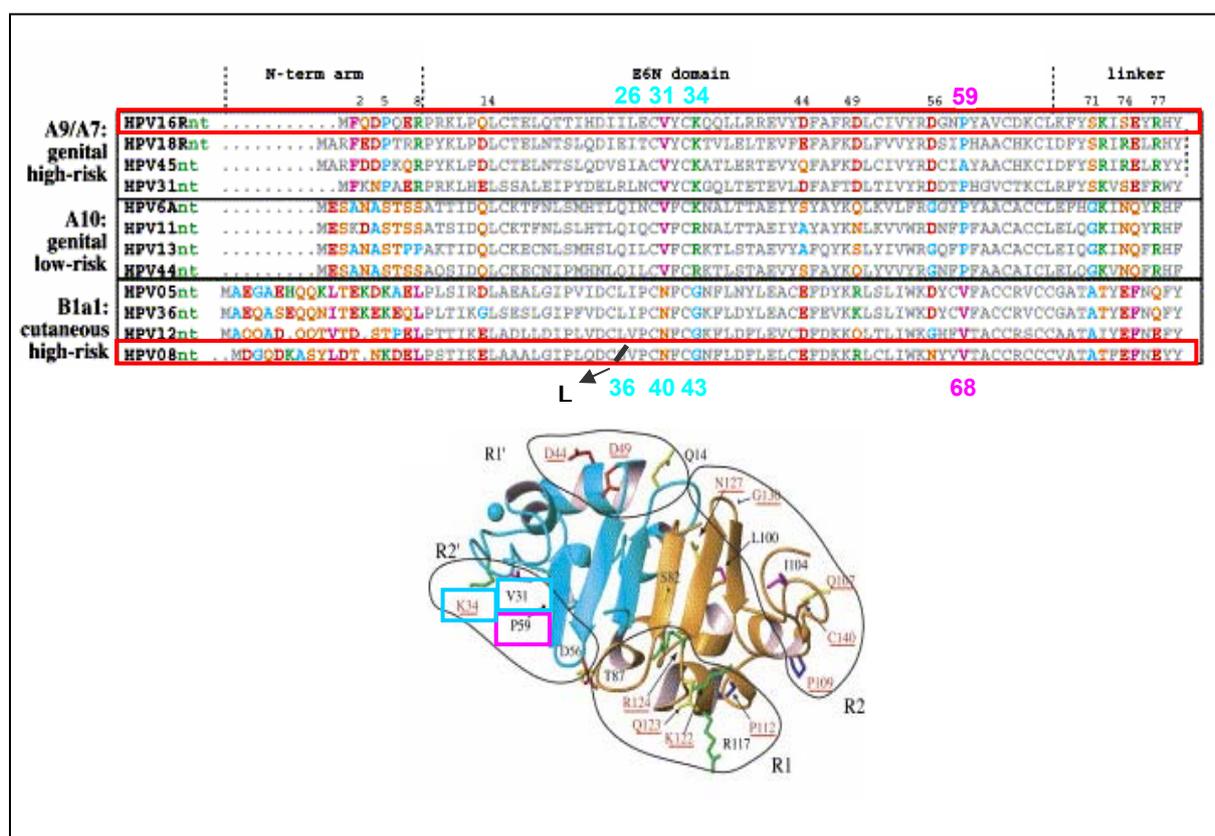


Abb. 28: Sequenzvergleich der N-terminalen Hälften der kutanen und genitalen E6-Proteine.

Dargestellt sind die N-terminalen Sequenzen verschiedener genitaler und kutaner E6-Proteine. Die Sequenzen von HPV8 und HPV16E6 sind rot umrandet. Die oben angegebenen AS-Positionen beziehen sich auf das 16E6-Protein, während die unten angegebenen AS-Positionen den Positionen im 8E6-Protein entsprechen. Die AS, die in FLAG-8E6-V68P verändert wurde ist rosa eingekreist, während die AS, die in FLAG-8E6-L36S-N40V-G43K ausgetauscht wurden in türkis dargestellt sind. Der Fehler in der ursprünglich publizierten Sequenz an Pos. 36 ist korrigiert (Austausch von S gegen L). Unten gezeigt ist die 3D-Struktur des 16E6-Proteins. Die Positionen der konservierten AS, die in 8E6 eingefügt wurden liegen auf der Oberfläche und sind ebenfalls rosa (8E6-V68P) bzw. türkis (8E6-L36S-N40V-G43K) markiert. Jede Domäne weist zwei Cluster von spezialisierten Oberflächen-AS R1 und R2 für E6C (braun) und R1' und R2' für E6N (blau) auf (modifiziert nach NOMINÈ *et al.*, 2006).

Um eine mögliche Rolle dieser AS bei der Interaktion zu untersuchen, wurden einige dieser Reste zu AS mutiert, die bei den genitalen Hochrisiko-E6-Proteinen an der entsprechenden Stelle vorlagen, da unsere Daten belegen, dass der N-Terminus

von 16E6 nicht an PTPH1 binden konnte (Abb. 1). Für die 8E6-V68P-Mutante wurde die Aminosäure Valin an Position 68 mittels *in vitro* Mutagenese gegen die Aminosäure Prolin ausgetauscht. Für die Doppelmutante 8E6-N40V-G43K wurden die Aminosäure Asparagin an Position 40 und die Aminosäure Glycin an Position 43 mittels *in vitro* Mutagenese in die Aminosäuren Valin bzw. Lysin umgewandelt. Aus technischen Gründen beinhalteten die Primer, die zur Herstellung der Doppelmutante verwendet wurden, auch die Aminosäureposition 36. Entsprechend der HPV8-Sequenz aus der Datenbank vor der Korrektur des Sequenzfehlers wurde für Position 36 ein Serin-Codon eingefügt. Während der Überprüfung der Klone stellte sich heraus, dass an dieser Stelle aber ein Leucin vorliegen muss. Aufgrund dieser Tatsache entstand in der Doppelmutante 8E6-N40V-G43K die weitere Mutation L36S.

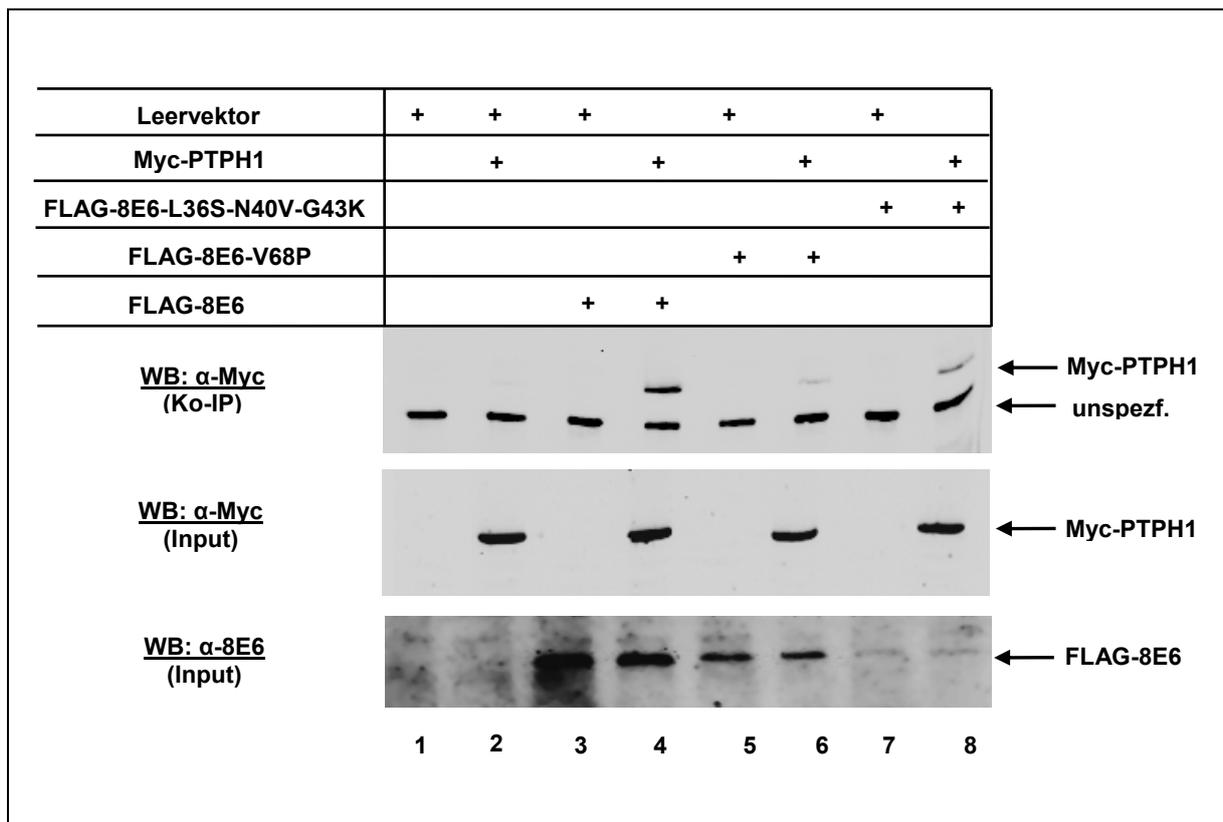


Abb. 29: Die AS V68 von 8E6 ist essentiell für die Interaktion mit PTPH1.

Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-LV (Spur 1), FLAG-8E6 (Spur 4), FLAG-8E6-V68P (Spur 6) oder FLAG-8E6-L36S-N40V-G43K (Spur 8) wurden in C33a-Zellen kotransfiziert, je 1 mg der gewonnenen Extrakte über FLAG-Beads aufgereinigt und das gebundene Myc-PTPH1 in einem Western-Blot mit dem Myc-Antikörper detektiert. Der mittlere Blot zeigt die Expression von Myc-PTPH1 unter Verwendung von 15 µg der Extrakte und der untere Blot bestätigt die E6-Expression. Die Positionen von Myc-PTPH1, der FLAG E6-Proteine und die unspezifische Banden sind eingezeichnet.

Die mutierten 8E6-Proteine FLAG-8E6-V68P bzw. FLAG-8E6-L36S-N40V-G43K wurden in einer Ko-Immunopräzipitation auf ihre Fähigkeit, an PTPH1 zu

binden, untersucht. Wie in Abb. 29 gezeigt, konnte 8E6-V68P (Spur 6), im Gegensatz zu 8E6 (Spur 4) nur sehr wenig PTPH1 präzipitieren. Die dreifach Mutante 8E6-L36S-N40V-G43K war in ihrer Fähigkeit PTPH1 zu binden nicht beeinträchtigt (Spur 8). Die verringerte Menge an präzipitiertem PTPH1 könnte auf die reduzierte Expression dieser Mutante zurückzuführen sein, wie im unteren Teil der Abbildung 29 in Spur 7 und 8 belegt.

4.19 8E6 degradiert PTPH1 weder *in vivo* noch *in vitro*

Unsere Daten belegen, dass 16E6 über die Interaktion mit E6-AP die proteolytische Degradation von PTPH1 induziert. Um zu überprüfen, ob auch 8E6 zum proteosomalen Abbau von PTPH1 führt, wurden *in vivo* und *in vitro* Degradationsassays durchgeführt.

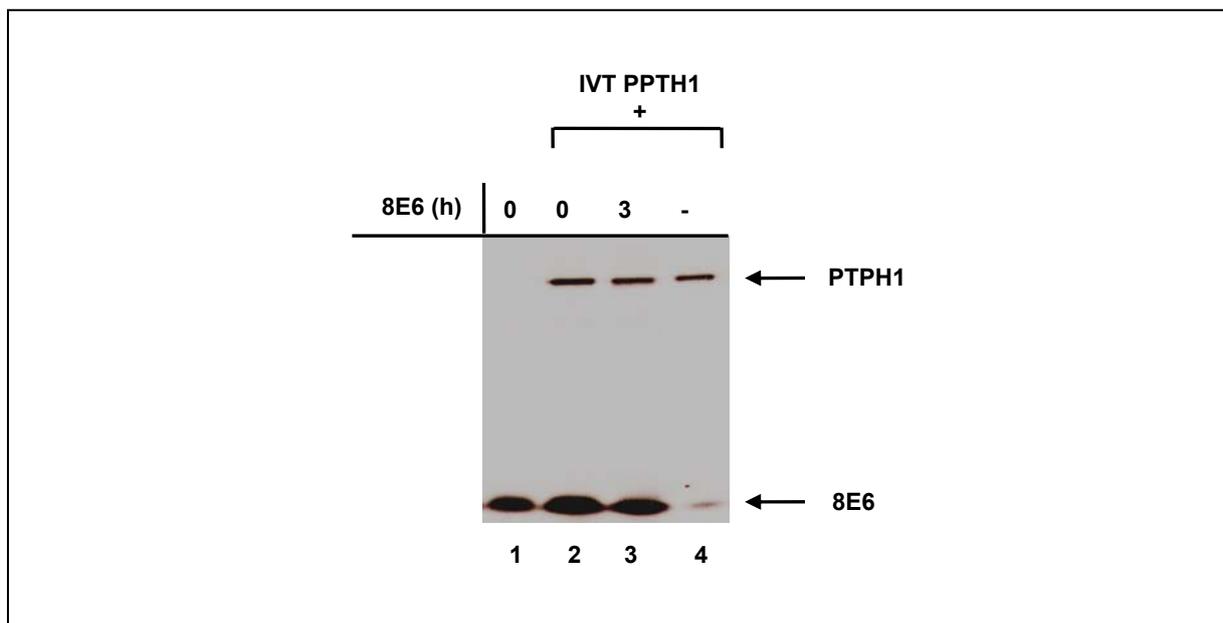


Abb. 30: 8E6 degradiert PTPH1 nicht *in vitro*.

In vitro Degradationsassay. IVT, ³⁵S-markiertes 8E6 und PTPH1 wurden für 0h (Spur 2) oder 3h (Spur 3) zusammen bei 30°C inkubiert, bevor sie über ein SDS-PAG analysiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. In den Spuren 1 und 4 sind jeweils 10% des IVT-Produktes von 8E6 bzw. PTPH1 aufgetragen. Die Bande auf der Höhe von 8E6 in Spur 4 stellt die Lauffront dar. Die Positionen von PTPH1 und 8E6 sind in der Abb. eingezeichnet.

Für den *in vitro* Degradationsassay wurden *in vitro* translatiertes 8E6 und PTPH1 für verschiedene Zeiten miteinander inkubiert. Dabei veränderte sich die Menge von PTPH1 in Gegenwart von 8E6 über einen Zeitraum von 3h nicht (Abb. 30, Spuren 2+3). Das deutet daraufhin, dass 8E6 PTPH1 nicht in die proteolytische Degradation führen kann.

Zur Überprüfung dieser *in vitro* Daten wurden *in vivo* Degradationsassays durchgeführt. C33a-Zellen wurden transient transfiziert mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-8E6, FLAG-8E6-V68P oder FLAG-8E6-V68P+ETQL, eine Mutante von 8E6, die das PDZ-Bindemotiv von HPV-16E6 exprimiert. Die gewonnenen Extrakte wurden auf die intrazellulären Spiegel von Myc-PTPH1 untersucht. Als Transfektionskontrolle wurde wieder ein Expressionsvektor für Myc-hNAP-1 kotransfiziert. Weder das 8E6-Protein (Abb. 31, Spur 2), noch die beiden 8E6-Mutanten V68P (Spur 3) bzw. V68P+ETQL (Spur 4), konnten die Mengen an Myc-PTPH1 verringern, sondern übten eher einen stabilisierenden Einfluss auf PTPH1 aus. Selbst das gezielte Heranführen an PTPH1 über das PDZ-Bindemotiv von 16E6 in 8E6-V68P+ETQL ermöglichte es 8E6 nicht, PTPH1 zu degradieren. Diese Daten belegen, dass 8E6 die Mengen an PTPH1 nicht reduzieren kann.

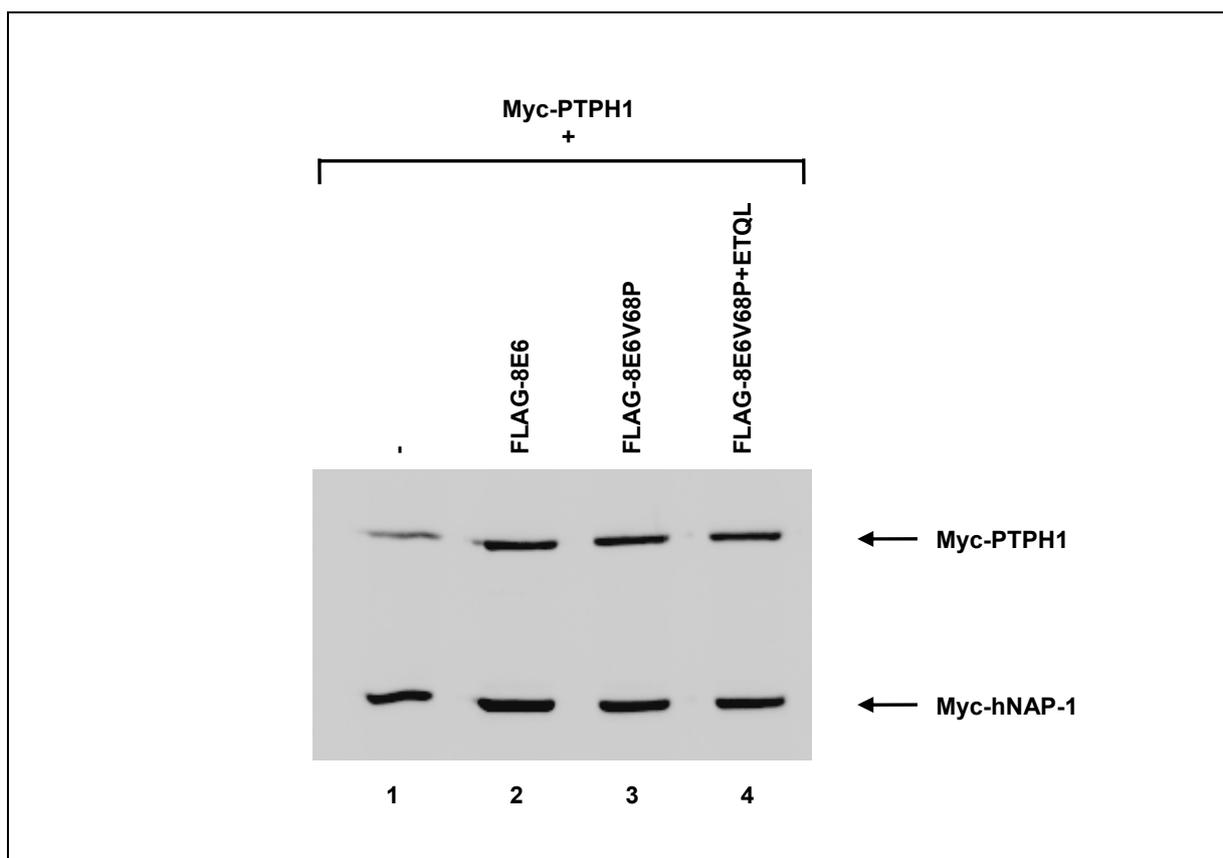


Abb. 31: 8E6 verringert nicht die intrazellulären Mengen von PTPH1.

In vivo Degradationsassay. Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-8E6 (Spur 2), FLAG-8E6-V68P (Spur 3) oder FLAG-8E6-V68P+ETQL (Spur 4), eine Mutante von 8E6, an die das ETQL-Motiv von 16E6 fusioniert wurde, wurden in C33a-Zellen transfiziert. Je 15 µg der Extrakte wurden über ein SDS-PAGE aufgetrennt und die Menge an PTPH1 über einen Myc-Antikörper in einem Western-Blot detektiert. Als interne Transfektionskontrolle diente humanes Myc-hNAP-1. In der Abb. sind die Positionen von Myc-PTPH1 und Myc-hNAP-1 eingezeichnet.

4.20 Phosphatase Assay

Da 8E6 die Mengen an PTPH1 nicht verringert, sollte untersucht werden, ob 8E6 die Funktion von PTPH1 anderweitig moduliert. Um zu überprüfen, ob die Interaktion von E6-Proteinen mit PTPH1 deren Phosphataseaktivität beeinflusst, wurden so genannte Phosphatase-Assays durchgeführt. Hierfür wurden C33a-Zellen mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-8E6, FLAG-8E6-V68P und als Kontrolle FLAG-16E6 oder FLAG-16E6 Δ ETQL kotransfiziert. Je 800 μ g der gewonnenen Extrakte wurden mit Myc-Beads inkubiert, um PTPH1 und seine assoziierten Proteine zu präzipitieren. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit entweder 500 μ M eines Tyrosin-Phosphopeptids oder eines *Growth-Hormone-Receptor* (GHR) Phosphopeptids. Von dem Tyrosinphosphopeptid, das ein Substrat von PTP-1B ist (Upstate, New York, USA), war nicht bekannt, ob es auch ein Substrat von PTPH1 ist und dephosphoryliert werden kann. Um die Ergebnisse des Phosphatase-Assays mit dem Tyrosinphosphopeptid zu bestätigen, wurde das GHR-Phosphopeptid verwendet, das im Verlauf dieser Arbeit als Substrat von PTPH1 identifiziert wurde (PILECKA *et al.*, 2007). Beide Phosphopeptide beinhalten ein zentrales, phosphoryliertes Tyrosin, dessen Phosphatrest von der katalytischen Domäne der Phosphatase über eine Hydrolysereaktion freigesetzt werden kann. Die Proben wurden schließlich 15 Minuten mit 100 μ l *Malachite-Green*-Lösung inkubiert. Durch die Umsetzung des Farbstoffes *Malachite-Green* konnte die Menge an freigesetztem Phosphat im Spektralphotometer quantifiziert werden. Nach der Subtraktion des Wertes der Leervektor-Probe, die den Phosphathintergrund symbolisiert, und der Berücksichtigung der Inkubationszeit (60 Min) konnte die Menge an pmol Phosphat ermittelt werden, die pro Minute von PTPH1 umgesetzt wurde.

Das Diagramm in Abbildung 32 zeigt ein repräsentatives Experiment von dreien, die ähnliche Ergebnisse lieferten. Aus diesem Diagramm wird deutlich, dass sowohl das Tyrosin-Phosphopeptid, als auch das GHR-Phosphopeptid von PTPH1 als Substrate erkannt wurden. Die Expression des 16E6-Proteins führte in beiden Fällen zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität von PTPH1, während die PTPH1-Interaktionsdefekte Mutante 16E6 Δ ETQL keinen Einfluss auf die Enzym-Aktivität von PTPH1 hatte. Dies war auch zu erwarten, da 16E6 die Menge an PTPH1 reduziert, im Gegensatz zu 16E6 Δ ETQL.

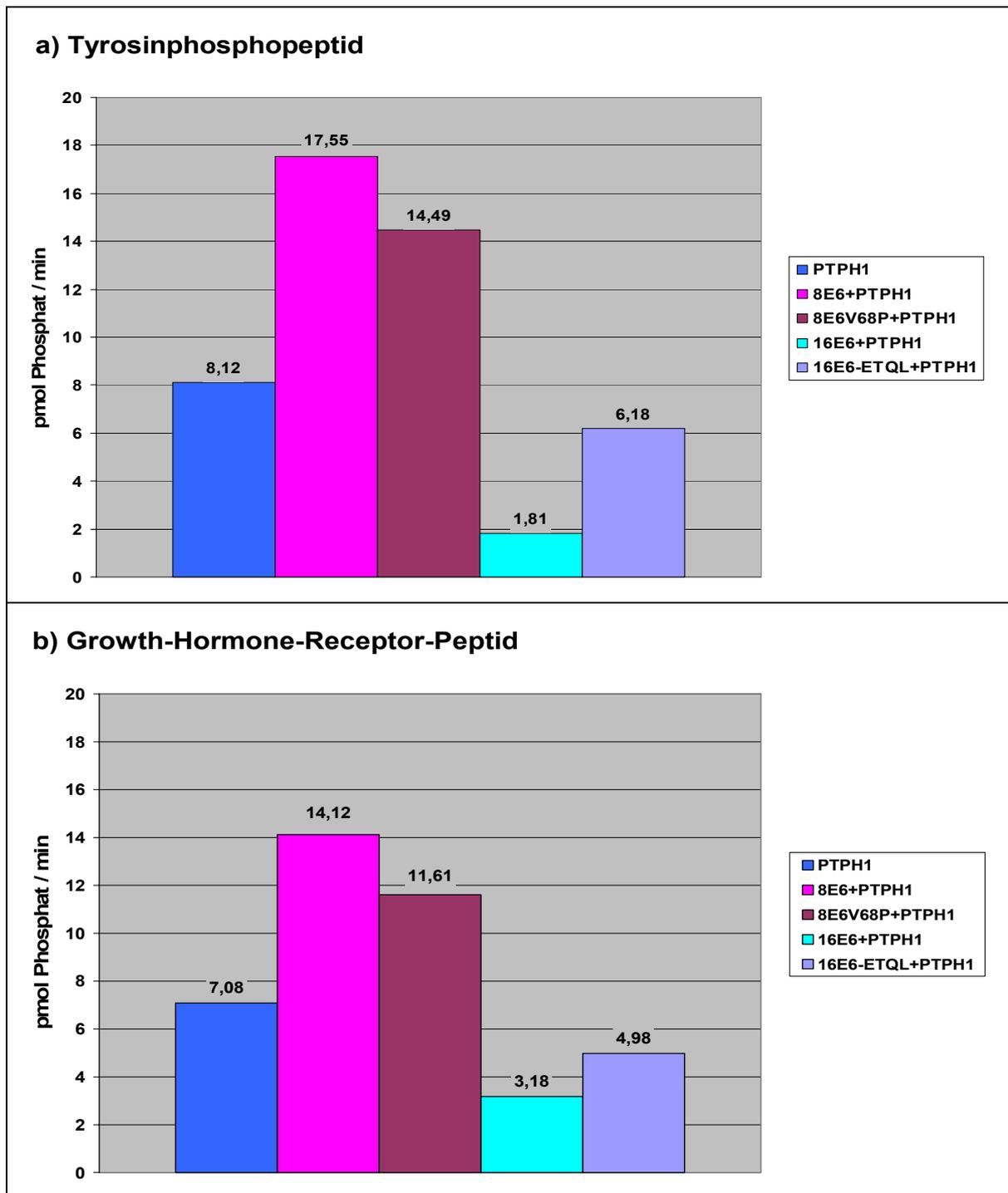


Abb. 32: Einfluss der E6-Proteine auf die Phosphataseaktivität von PTPH1.

(a) Phosphatase-Assay mit dem Tyrosinphosphopeptid. C33a-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Myc-PTPH1 und FLAG-8E6, FLAG-8E6V68P, FLAG-16E6 oder FLAG-16E6 Δ ETQL kotransfiziert und je 800 μ g der gewonnenen Extrakte mit 15 μ l Myc-Beads inkubiert. Das Präzipitat wurde anschließend in Gegenwart von 500 μ M eines Tyrosinphosphopeptids für 1h bei 30°C inkubiert. Das freigesetzte Phosphat wurde anschließend in einem Malachite Green Assay bei einer OD von 620nm detektiert. Die OD-Werte wurden mit dem Wert des Leervektors verrechnet. Für die Berechnung der pmol Phosphat, die pro Minute freigesetzt wurden, wurden die errechneten Werte durch die Inkubationszeit (60 min) dividiert. In dem Diagramm sind die pmol Phosphat, die pro Minute umgesetzt wurden (y-Achse), dargestellt. Die jeweiligen Mengen von freien pmol Phosphat/min sind oberhalb der Banden eingetragen.

(b) Phosphatase-Assay mit dem Growth-Hormone-Receptor Phosphopeptid. Der experimentelle Ablauf dieses Phosphatase-Assays war entsprechend dem unter (a) beschriebenen, mit dem Unterschied das hier 500 μ M eines Growth-Hormon-Receptor Phosphopeptids eingesetzt wurden. Auf der y-Achse des Diagramms sind die pmol Phosphat, die pro Minute umgesetzt wurden, dargestellt. Die Mengen an freigesetztem Phosphat sind in dem Diagramm oberhalb der entsprechenden Banden eingetragen.

Überraschenderweise kam es zu einer etwa zweifachen Stimulation der Phosphataseaktivität von PTPH1, wenn 8E6 koexprimiert wurde. Die PTPH1-bindungsverminderte Mutante 8E6-V68P konnte die katalytische Aktivität von PTPH1 ebenfalls stimulieren, wenn auch der Effekt etwas verringert war. Aus diesen Daten wird deutlich, dass der Einfluss von 8E6 auf die Phosphataseaktivität von PTPH1 wohl nicht von der Bindung abhängig ist, da die Mutante V68P im Vergleich zu 8E6 nur eine leicht reduzierte, katalytische Aktivität aufwies, was am ehesten durch die geringere Expression dieser Mutante in der Zelle zu erklären ist (Abb. 29).

Die Ergebnisse aus dem *in vivo* Degradationsassay (Abb. 31) deuten daraufhin, dass 8E6 und 8E6-V68P die Menge an koexprimiertem Myc-PTPH1 erhöhen. Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Phosphataseaktivität von 8E6 auf die erhöhten Spiegel von PTPH1 zurückzuführen ist, wurden die Myc-Beads mit dem gebundenen PTPH1 und seinen assoziierten Proteinen nach dem Phosphatase-Assay in einem Western-Blot auf die Mengen des präzipitierten Myc-PTPH1 überprüft.

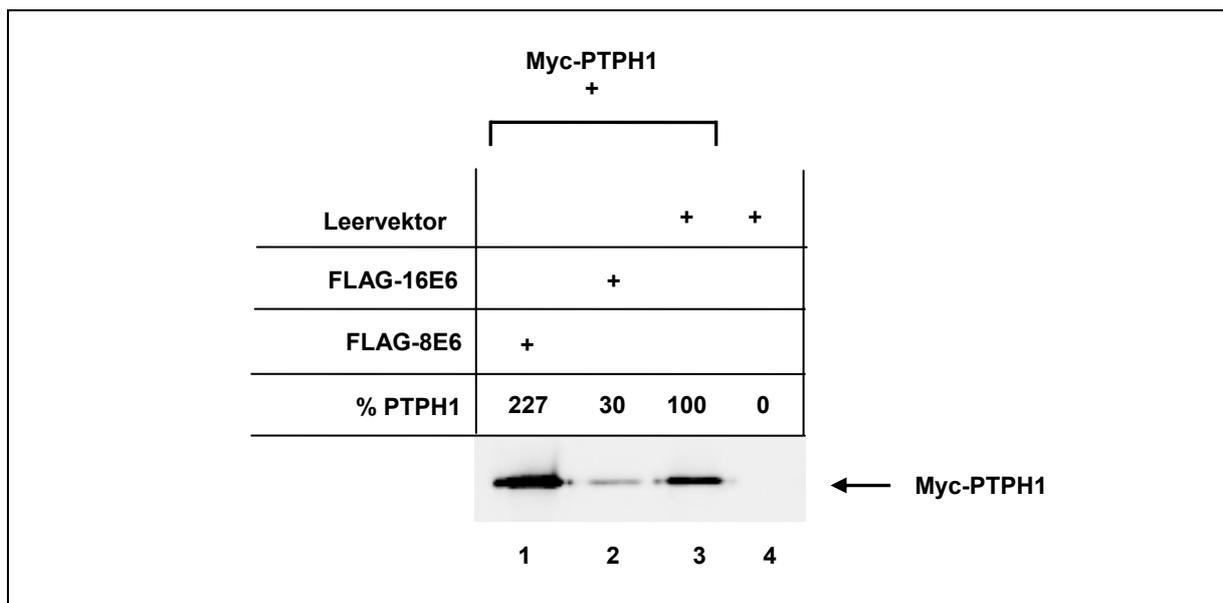


Abb. 33: 8E6 stabilisiert Myc-PTPH1.

Western-Blot. Die Myc-Beads des Phosphatase-Assays mit dem präzipitierten PTPH1 und seinen assoziierten Proteinen wurden mit 15 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C denaturiert, über ein SDS-PAG aufgereinigt und anschließend das gebundene Myc-PTPH1 in einem Western mit dem Myc-Antikörper detektiert. Die prozentualen Mengen von PTPH1 wurden über *Quantity One* quantifiziert und sind in der Abbildung angegeben. Die Position von Myc-PTPH1 ist eingezeichnet.

Wie aus der Abbildung 33 ersichtlich wird, konnte bei Koexpression von 16E6 (Spur 2) nur 30% Myc-PTPH1 gebunden werden. Im Gegensatz dazu war die Menge an präzipitierten Myc-PTPH1 bei Ko-Expression mit 8E6 (Spur 1), verglichen mit der alleinigen Expression von Myc-PTPH1 (Spur 3), auf 227% erhöht. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Stimulation der PTPH1-Phosphataseaktivität auch

aufgrund höherer Mengen an PTPH1, die durch die Expression von 8E6 und vermutlich auch 8E6-V68P bedingt sind, erfolgen könnte. Entsprechend könnte die Repression der Phosphataseaktivität durch 16E6 auf die reduzierten Spiegel von PTPH1 zurückzuführen sein. Werden die Werte aus dem Phosphatase-Assay mit den ermittelten Mengen an präzipitiertem Myc-PTPH1 normalisiert, so ergibt sich kein Unterschied zu den Werten ohne 8E6. Dies deutet daraufhin, dass 8E6 die Phosphataseaktivität von PTPH1 nicht beeinflusst.

4.21 8E6V69P und 16E6 infizierte RTS3b-Zellen wachsen im reduzierten E-Medium

Es ist beschrieben, dass der Verlust von PTPH1 in epidermalen, immortalisierten Keratinozyten das Wachstum der Zellen im Wachstumsfaktor reduzierten Medium vermitteln kann (JING *et al.*, 2007). Eine Interaktion der E6-Proteine mit PTPH1 könnte mit der Tumorsuppressor-Funktion von PTPH1 interferieren, um E6 exprimierenden Zellen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Es ist beschrieben, dass 16E6 der durch die Wachstumsfaktor-Reduktion induzierten Apoptose entgegen wirkt (MYTHILY *et al.*, 1999). Über eine Funktion von 8E6 auf die Apoptose, induziert durch Wachstumsfaktormangel, ist bisher nichts bekannt.

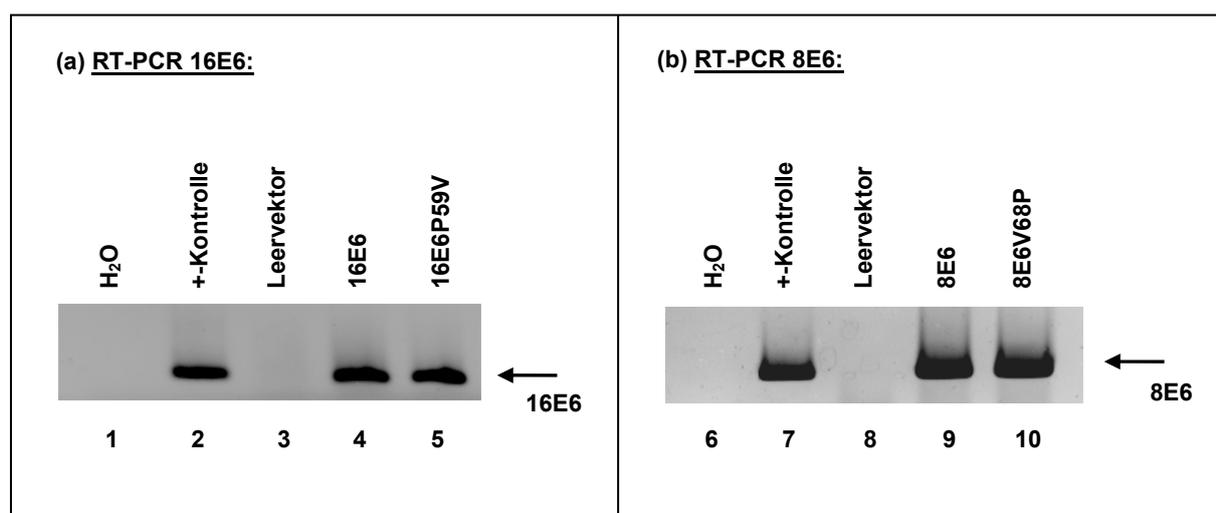


Abb. 34: Nachweis der verschiedenen E6-RNAs in den stabil infizierten RTS3b-Zellen.
(a) RT-PCR-16E6. Je 1 µg RNA, die aus den LV- (Spur 3), 16E6- (Spur 4) bzw. 16E6P59V-RTS3b-Zellen (Spur 5) isoliert wurde, wurde für die RT-PCR eingesetzt. 16E6-C-Bamup und HPV16-LCR-nt-512-Kpnl dienen als Primer für die Amplifikation von 16E6. Anschließend wurden je 10 µl des RT-PCR-Produktes auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Als Positivkontrolle für die PCR (Spur 2) wurde 1 pg pEBG-16E6 eingesetzt, während in Spur 1 die H₂O-Negativkontrolle aufgetragen ist. Die Position von 16E6 ist eingezeichnet.
(b) RT-PCR-8E6. Je 1 µg RNA aus den LV- (Spur 8), 8E6- (Spur 9) bzw. 8E6-V68P-RTS3b-Zellen (Spur 10) wurde für die RT-PCR eingesetzt. Als Primer für die Amplifikation von 8E6 dienten die Primer *HPVpET8E6-5'* und *HPVpET8E6-3'*. Auf das 1%ige Agarosegel wurden je 10 µl des RT-PCR-Produktes aufgetragen. Als Positivkontrolle für die PCR wurde 1 pg pEBG-8E6-Plasmid-DNA eingesetzt (Spur 7), während H₂O als Negativkontrolle diente (Spur 6). Die Position von 8E6 ist eingezeichnet.

Um zu untersuchen, ob E6 die Wachstumsfaktorabhängigkeit der immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie RTS3b moduliert, wurden stabile RTS3b-Zelllinien hergestellt, die mit den rekombinanten Retroviren pLXSN, pLXSN-8E6, pLXSN-8E6-V68P, pLXSN-16E6 bzw. pLXSN-16E6-P59V infiziert wurden. Für die Mutante 16E6-P59V wurde die AS Prolin an Position 59, die konserviert unter den genitalen E6-Proteinen ist, in ein Valin umgewandelt, das an der entsprechenden Stelle in kutanen HPV konserviert ist. Nach Abschluss der Selektion wurde zunächst in einer RT-PCR die Transkription der jeweiligen E6-Gene in den verschiedenen Zelllinien bestätigt (Abb. 34).

Um den Einfluss der E6-Proteine auf das Wachstum von Zellen im reduzierten Medium zu analysieren, wurden die oben erwähnten, stabilen RTS3b-Zellen in einer Konzentration von $0,9 \times 10^5$ Zellen im Wachstumsfaktor reduzierten E-Medium ausgesät und beobachtet. Diesem Medium waren kein Insulin, kein EGF und nur 0.25% FCS zugesetzt. Bereits nach wenigen Tagen zeigte sich, dass sowohl die pLXSN-LV, als auch die 8E6 infizierten Zellen nicht mehr proliferierten. Dabei wiesen diese Zellen stark kontrastierte Kerne auf, die darauf hindeuten, dass die Zellen sterben (Abb. 35, türkiser Pfeil). Im Gegensatz dazu konnten 16E6 infizierte-RTS3b-Zellen im reduzierten E-Medium wachsen und wiesen die für RTS3b typische Morphologie auf (violetter Pfeil). Offenbar ist 8E6 nicht wie 16E6 in der Lage, der Wachstumsfaktormangel induzierten Apoptose entgegen zu wirken. Überraschenderweise proliferierten 8E6-V68P infizierte RTS3b-Zellen im reduzierten E-Medium. Hierbei waren zwei unterschiedliche Morphologien erkennbar. Zum einen zeigten sich eng gepackte Zellen (rosa Pfeil), zum anderen waren lang gestreckte, spindelförmige Zellen zu beobachten (violetter Pfeil).

Das heißt, dass das Einführen der AS Prolin an die Position 68 8E6 die Fähigkeit vermittelt, Zellwachstum im serumreduzierten Medium zu induzieren. Ein Valin an dieser Stelle, wie im Fall von HPV8, eliminiert die Fähigkeit von 16E6 eine Wachstumsfaktor unabhängige Proliferation zu vermitteln, denn die RTS3b-Zellen, die mit 16E6-P59V infiziert wurden, starben zum größten Teil bereits in den ersten Tagen. Die Zellen, die angewachsen waren, proliferierten nicht und waren verkümmert (blauer Pfeil). Offensichtlich ist dieses Prolin an Position 59 in 16E6 entscheidend für das Wachstum im reduzierten Medium, da diese Fähigkeit mit Hilfe des Prolins in 8E6 transferiert werden kann. Im Gegensatz dazu scheint das Valin an

Position 68 von 8E6, das unter den kutanen E6-Proteinen konserviert ist, essentiell für die Interaktion mit PTPH1 zu sein.

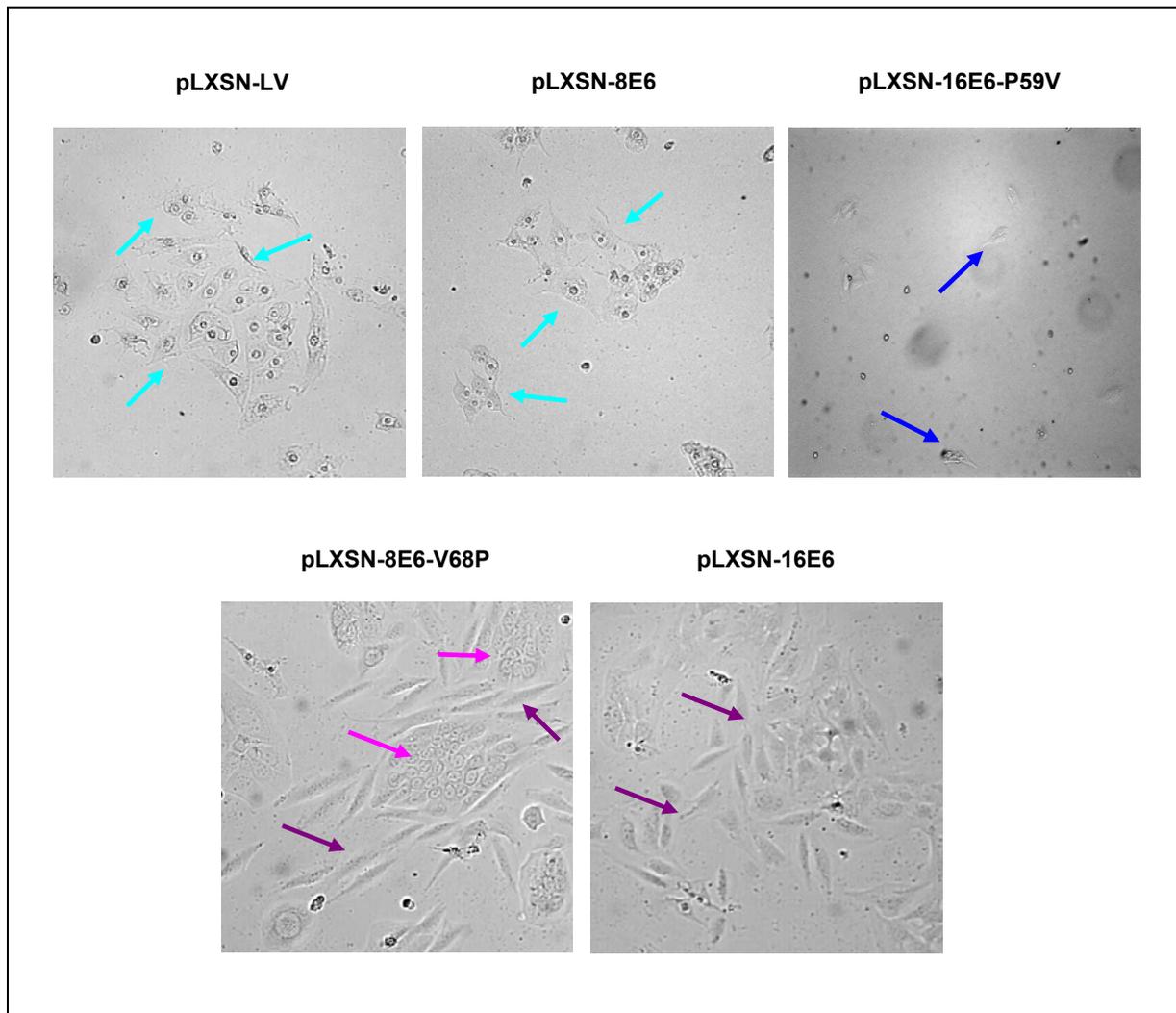


Abb. 35: 8E6-V68P und 16E6 vermitteln das Wachstum von RTS3b-Zellen im reduzierten E-Medium.

Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von RTS3b-Zellen, die mit rekombinanten Retroviren für pLXSN-LV, -8E6, -16E6-P59V, -8E6-V68P bzw. -16E6 infiziert und im reduzierten E-Medium (-Insulin, -EGF, +0.25% FCS) in einer Konzentration von 0.9×10^5 -Zellen in einem six-well ausgesät wurden. Gekennzeichnet sind die kontrastierten Kerne (türkise Pfeile), die verkümmerten Zellen (blaue Pfeile), die lang gestreckten (violette Pfeile) und die eng gepackten RTS3b-Zellen (rosa Pfeile).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Interaktion mit PTPH1 wahrscheinlich keine Rolle bei der Vermittlung des Wachstums im reduzierten Medium spielt. So bindet 16E6 an PTPH1 und führt zur Reduktion der endogenen PTPH1-Mengen, während 16E6-P59V in seiner Bindung an PTPH1 nicht beeinträchtigt sein sollte, aber die Fähigkeit verlor, Wachstum im serumreduzierten Medium zu vermitteln. Andererseits ist 8E6-V68P in seiner Interaktion mit PTPH1 deutlich beeinträchtigt und ermöglicht das Wachstum im reduzierten Medium.

4.22 Substrat-Trapping-Assay

Um die Rolle von PTPH1 bei der Kontrolle des Wachstums von Keratinozyten und mögliche Modulationen durch E6-Proteine zu verstehen, ist es essentiell die spezifischen Substrate von PTPH1 zu kennen. Bisher sind nur wenige Substrate von PTPH1 bekannt. Auf den ersten Blick besteht kein Zusammenhang zwischen den bekannten Substraten von PTPH1, wie bspw. VCP (ZAHNG *et al.*, 1999) oder der T-Zell-Rezeptor(TCR)-ζ-Untereinheit (SOZIO *et al.*, 2004), und einer Rolle bei der HPV vermittelten Transformation. Vermutlich existieren weitere Substrate von PTPH1, vor allem in Keratinozyten, den Zielzellen von HPV. Es sollte versucht werden, diese mittels eines so genannten Substrat-Trapping-Assays zu identifizieren.

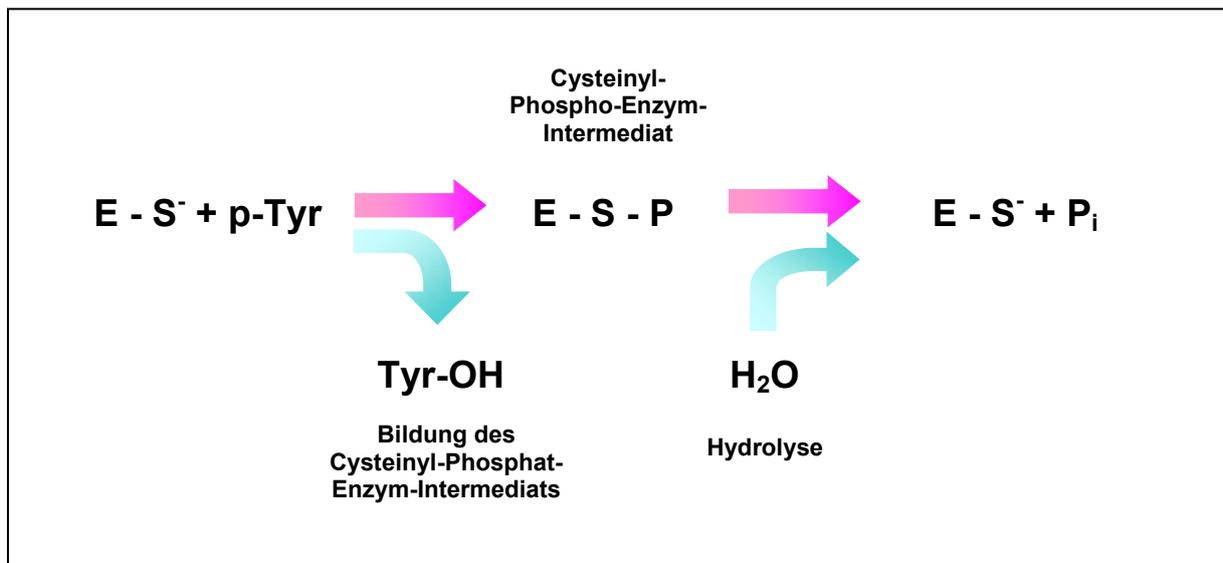


Abb. 36: Genereller Mechanismus der Katalyse von PTPs.

Das γ -Schwefel-Atom im katalytischen Zentrum fungiert als Nukleophil, das das Phosphor-Atom des Substrates angreift und dadurch zur Bildung des Cysteinyl-Phosphat-Enzym-Intermediats (E-S-P) beiträgt. Das Arginin im katalytischen Zentrum ist hierbei für die Bindung des Substrats und die Stabilisierung des Intermediats notwendig. Während der Formation des Intermediats dient das Aspartat im katalytischen Zentrum als generelle Säure zur Protonierung des Sauerstoffs des Tyrosin-Restes (Tyr-OH). Im zweiten Schritt der Katalyse fungiert das gleiche Aspartat während der Hydrolyse des Phospho-Enzym-Komplexes als generelle Base und bedingt die Freisetzung des Phosphats (P_i) und führt zum Ausgangszustand der Phosphatase (E-S⁻) (modifiziert nach TABENERO *et al.*, 2008). Das E in der Abb. steht für das Enzym, das S⁻ für das γ -Schwefel-Atom des Cysteins und das p-Tyr für das Tyrosin phosphorylierte Substrat.

Die PTP-Superfamilie verfügt über ein *PTP-signature motif* ((H/N)C(X)₅R(S/T)) in der katalytischen Domäne, das bei allen PTPs konserviert ist. Aufgrund dieser Tatsache ist der Wirkungsmechanismus der Tyrosin-Dephosphorylierung bei allen PTPs gleich. Der chemische Prozess ist in zwei Phasen unterteilt und vermittelt über die Bildung eines Phosphoenzym-Intermediats die Hydrolyse des Tyrosin-Phosphats (Abb. 36). Die Herstellung von so genannten Substrat-Trapping-Mutanten, die zwar in der Lage sind Substrate zu binden, jedoch nicht deren Dephosphorylierung

induzieren zu können, ermöglicht die Identifizierung von neuen Substraten. Dies führt dazu, dass das Substrat an der Phosphatase gebunden bleibt. Es gibt zwei Möglichkeiten Substrat-Trapping-Mutanten herzustellen. Für die Herstellung einer komplett inaktiven Substrat-Trapping-Mutante wird das Cystein im katalytischen Zentrum gegen ein Serin ausgetauscht, während der Austausch des Aspartat im katalytischen Zentrum gegen ein Alanin zu einer Mutante führt, die in ihrer Hydrolyserate eingeschränkt ist (zusammengefasst in: LIANG *et al.*, 2007). Da der Austausch von Aspartat zu Alanin eine höhere Affinität der Phosphatase zu den phosphorylierten Proteinsubstraten induziert, wurde in dieser Arbeit diese Mutation eingefügt. Der Phosphorylierungsstatus der Substrate hängt von Stimuli innerhalb der Zellen ab. Um das Maß der Tyrosinphosphorylierung der zellulären Proteine für den Substrat-Trapping-Assay zu erhöhen, wurden die Zellen vor der Ernte mit Pervanadat behandelt. Durch Pervanadat wird eine irreversible Oxidation am katalytischen Cystein von PTPs erreicht, was zur einer Stabilisierung der tyrosinphosphorylierten Proteine führt (zusammengefasst in: LIANG *et al.*, 2007).

Im Verlauf dieser Dissertation wurden zwei verschiedene Substrat-Trapping-Mutanten von PTPH1 hergestellt. Für die Substrat-Trapping-Mutante PTPH1-D811A wurde das Aspartat an Position 811 im katalytischen Zentrum von PTPH1 gegen ein Alanin ausgetauscht (ZHANG *et al.*, 1999). Die zweite Mutante PTPH1-D811A-Y676F enthält neben dem bereits erwähnten Aminosäureaustausch D811A einen weiteren AS-Austausch an Position 676. In Publikationen wurde beschrieben, dass das Tyrosin an Position 676 von PTPH1 phosphoryliert wird und dass dieses gebundene Phosphat zu einer sterischen Hinderung der Bindung der Substrate führen kann (ZHANG *et al.*, 1999). Damit die Substrat-Trapping-Mutanten mit ihren gebundenen Proteinen effizient aufgereinigt werden konnten, wurden die PTPH1-Proteine in eukaryontischen Zellen als GST-Fusionsproteine exprimiert.

Um diese PTPH1-Mutanten auf ihre Substrat-Trapping-Eigenschaften zu testen, wurden C33a-Zellen mit Expressionsvektoren für pEBG-LV, pEBG-PTPH1+Ex12, pEBG-PTPH1-D811A oder pEBG-PTPH1-D811A-Y676F transfiziert, die entsprechenden GST-fusionierten Proteine aufgereinigt und anschließend mit 2 mg Pervanadat behandelten HaCat-Ganzzellextrakten inkubiert. Die gebundenen Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurden in einem Western-Blot mit dem Py20-Antikörper, der spezifisch Phospho-Tyrosine erkennt, detektiert.

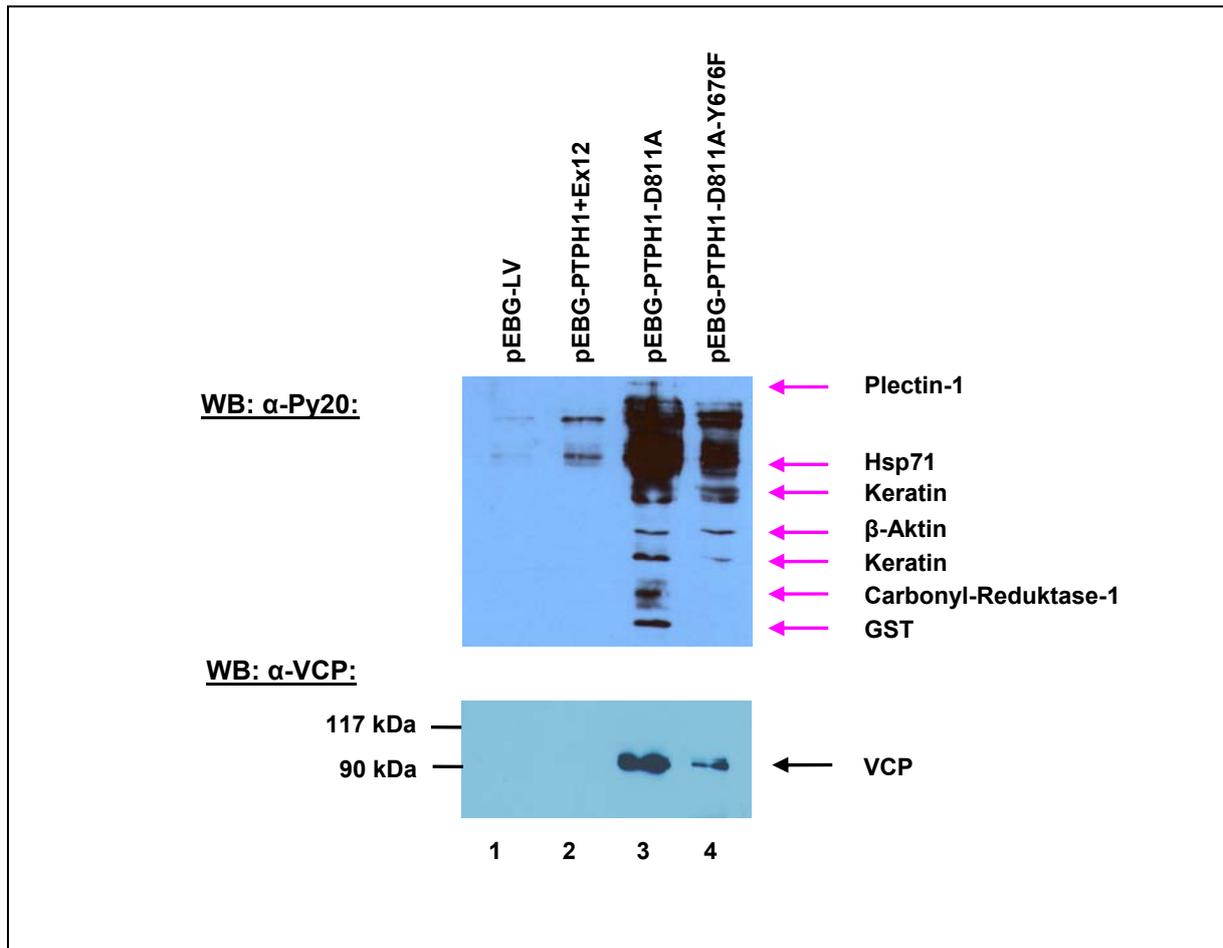


Abb. 37: Substrat-Trapping-Assay.

Expressionsvektoren für pEBG-LV (Spur 1), pEBG-PTPH1+Ex12 (Spur 2), pEBG-PTPH1-D811A (Spur 3) oder pEBG-PTPH1-D811A-Y676F (Spur 4) wurden in C33a-Zellen transfiziert. Je 1.8 mg der gewonnenen Ganzzellextrakte wurden mit 20 µl GST-Beads inkubiert. Die gebundenen GST-Proteine wurden anschließend mit 2 mg HaCat-Ganzzellextrakten, die mit Pervanadat behandelt wurden, inkubiert. Die gebundenen Tyrosin-phosphorylierten Proteine wurden in einem Western-Blot mit dem Py20-Antikörper detektiert (oberer Blot). Die eingezeichneten Pfeile im Western-Blot kennzeichnen die Banden, die aus einem SDS-Gel ausgeschnitten wurden und in einem PMF analysiert wurden. Die Namen der im PMF analysierten Proteine sind hinter den jeweiligen Pfeil angegeben. Als Kontrolle wurde der Blot mit einem Antikörper gegen VCP behandelt (unterer Blot). Die Positionen der Markerbanden und VCP sind gekennzeichnet.

Wie der Western-Blot belegt (Abb. 37), wies die pEBG-PTPH1-D811A-Mutante größere Substrat-Trapping-Eigenschaften auf, da die PTPH1-D811A-Mutante deutlich mehr Tyrosin-phosphorylierte Proteine präzipitieren konnte (Abb. 37, Spur 3), als die Doppelmutante pEBG-PTPH1-D811A-Y676F (Spur 4). Um die Effizienz des Substrat-Trappings zu überprüfen, sollte VCP, ein bekanntes Substrat von PTPH1 (ZHANG *et al.*, 1999), im Präzipitat nachgewiesen werden. Hierfür wurde der Blot mit einem Antikörper gegen VCP behandelt. PTPH1-D811A (Spur 3) konnte VCP ebenfalls stärker binden, als PTPH1-D811A-Y676F (Spur 4, unterer Blot). Um die potentiellen Substrate von PTPH1 zu identifizieren, wurde aus transfizierten C33a-Zellen das entsprechende GST- bzw. GST-PTPH1-D811A-Protein aufgereinigt, und mit 4 mg HaCat-Ganzzellextrakten inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden

auf jeweils zwei Gelslots aufgetragen und über ein SDS-PAG aufgetrennt. Ein Gelslot wurde mit *Coomassie brilliant blue* gefärbt und der andere nach dem Transfer im Western-Blot mit dem Py20-Antikörper inkubiert, um Tyrosin-phosphorylierte Proteine zu detektieren. Insgesamt konnten sieben Banden, die spezifisch bei der Substrat-Trapping-Mutante vorhanden waren, identifiziert werden. Im *Coomassie* gefärbten SDS-PAG waren diese spezifischen Banden ebenfalls sichtbar. Die Banden wurden aus dem *Coomassie* gefärbten Gel isoliert und in einem *Protein-Mass-Fingerprint* (PMF) im Servicelabor des ZMMK analysiert. Die Ergebnisse des PMFs sind in der Abbildung 37 hinter den jeweiligen Pfeilen zusammengefasst.

Zwei der Proben wurden als Keratin identifiziert. Da Keratin als Substrat ausgeschlossen werden kann, ist es wahrscheinlich, dass das Keratin-Protein im *Coomassie*-Gel die tyrosin-phosphorylierten Proteine überlagert hat. Ebenso scheidet die Glutathion-S-Transferase (GST) als Substrat aus, da die neuen Substrate über die Bindung des PTPH1-Substrat-Komplexes an die Glutathion-Sepharose-Beads identifiziert wurden. Auch hier könnten die tyrosin-phosphorylierten Proteine von GST im *Coomassie*-Gel überlagert worden sein. Zusammengefasst konnten aus den Banden die NADPH-abhängige Carbonyl-Reduktase-1, die nicht tyrosin-phosphoryliert werden kann, sowie Plectin-1, β -Aktin und das *Heat-Shock cognate* 71 kDa Protein (Hsp71), die alle über Tyrosinphosphorylierungsstellen verfügen (RUSH *et al.*, 2005), als neue potentielle Substrate von PTPH1 identifiziert werden. Die PMF-Analysen dieser drei Proteine sind in den Abbildungen 38 (a-c) dargestellt.

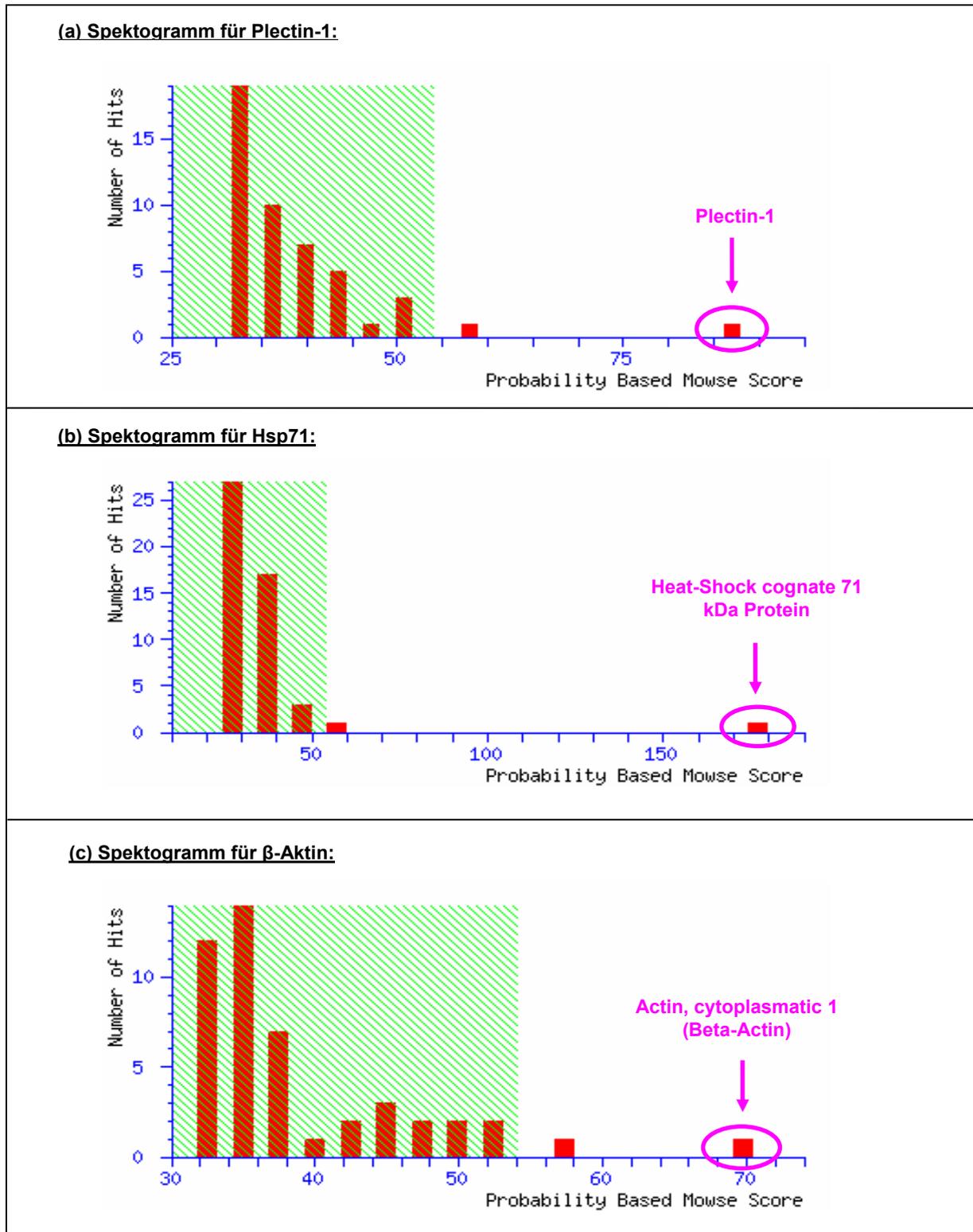


Abb. 38: Spektrogramme der PMF-Analyse für Plectin-1 (a), Hsp71 (b) und β-Aktin (c). Abgebildet ist der *Probability Based Mowse Score*, der auf der x-Achse dargestellt ist. Der Score setzt sich zusammen aus $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass der beobachtete Match kein Zufall ist. Auf der y-Achse ist die Nummer der Treffer dargestellt. Protein-Treffer, die über 54 liegen sind signifikant. Der grün markierte Bereich zeigt die Protein-Treffer, die unterhalb dieses Wertes liegen und zu vernachlässigen sind. Das Plectin-1 wies einen *Probability Based Mowse Score* von 87, Hsp71 einen von 177 und β-Aktin einen von 70 auf. Die jeweiligen Position sind in der Abbildung pink markiert.

5 DISKUSSION

Die Bindung der E6-Proteine genitaler Hochrisiko HPV an PDZ-Domänenhaltige Proteine trägt zum onkogenen Potential dieser Viren bei. Die Deletion des PDZ-Bindemotivs beeinträchtigt die Fähigkeit von E6, Keratinozyten zu immortalisieren, etablierte Nagerzelllinien und immortalisierte Keratinozyten zu transformieren, sowie epithelialen Hyperplasien in transgenen Mäusen zu induzieren (KIYONO *et al.*, 1997, 1998; LIU *et al.*, 1999; MANTOVANI UND BANKS, 2001; NGUYEN *et al.*, 2003; WATSON *et al.*, 2003; SIMONSON *et al.*, 2005). Die transformierende Aktivität, die vom PDZ-Bindemotiv vermittelt wird, ist vermutlich nicht auf die Interaktion mit einem spezifischen, zellulären Protein zurückzuführen, sondern auf die Wechselwirkung mit verschiedenen, zellulären PDZ-Domänen Proteinen. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit belegen, dass PTPH1 ein weiteres Zielprotein des PDZ-Bindemotivs von genitalen Hoch-Risiko-HPV ist.

Die Spezifität der Interaktion zwischen 16E6 und PTPH1 wurde mit Hilfe von rekombinanten PTPH1 und 16E6 Proteinen überprüft, die in verschiedenen Systemen wie Hefe (Töpfer, 2005), Bakterien, *in vitro* Translation mittels Rabbit-Retikulozytenlysat und in Säugerzellen synthetisiert wurden. Zusätzlich konnte GST-16E6-C endogenes PTPH1 aus primären Keratinozyten präzipitieren, was unterstreicht, dass das native PTPH1-Protein von 16E6 gebunden werden kann und die Interaktion nicht auf rekombinantes PTPH1 beschränkt ist. Das PDZ-Bindemotiv von 16E6 und die PDZ-Domäne von PTPH1 erwiesen sich als essentiell für die Interaktion.

16E6 vermittelt die Degradation von PTPH1, wie mit Hilfe von *in vivo* und *in vitro* Degradationsassays gezeigt werden konnte. Dafür wird das PDZ-Bindemotiv von 16E6, sowie die PDZ-Bindedomäne von PTPH1 benötigt, was impliziert, dass die direkte Interaktion beider Proteine wichtig für die Degradation ist. Die Interaktion mit PTPH1, die über das PDZ-Bindemotiv erfolgt, und dessen Degradation scheint unter den genitalen Hoch-Risiko E6-Proteinen konserviert zu sein, wie die gezeigten Daten für 18E6 belegen. Die Beteiligung des Proteasoms wurde mit Hilfe des Proteasom Inhibitors MG132 nachgewiesen. In Gegenwart von MG132 konnte 16E6 nicht mehr den proteolytischen Abbau von PTPH1 induzieren. Zusätzlich zur Interaktion der

beiden Proteine erfordert die PTPH1-Degradation die Bindung von 16E6 an E6-AP, denn die E6-AP-bindungsdefekten Mutanten 16E6 Δ 123-126 und 16E6 Δ 26-29 waren nicht mehr in der Lage, PTPH1 zu degradieren. Die Rolle von E6-AP konnte in H1299-K3, in denen die Expression von endogenem E6-AP durch RNA-Interferenz verhindert wurde (KUBALLA *et al.*, 2007), bestätigt werden. Während 16E6 die Degradation von PTPH1 in den parental H1299-Zellen induzieren konnte, war diese in den H1299-K3-Zellen stark reduziert. Durch die Transfektion eines Expressionsvektors für ein E6-AP, dessen RNA nicht von der siRNA erkannt wurde, erlangte 16E6 seine Fähigkeit wieder, PTPH1 zu degradieren. Diese wurde durch die Deletion der 16E6-BS in E6-AP (AS 378-395) wieder aufgehoben (TÖPFFER *et al.*, 2007). Zusammengefasst belegen diese Experimente, dass für die proteolytische Degradation von PTPH1 durch 16E6 sowohl die Bindung von 16E6 an die Ubiquitinligase E6-AP als auch an PTPH1 benötigt wird. Diese Daten wurden in der Publikation von JING *et al.* (2007), die im Verlauf dieser Dissertation erschienen ist, bestätigt.

Das Fehlen des Exons 12 von PTPH1 in den Splice-Varianten hatte keinen Einfluss auf die Degradation von PTPH1 durch 16E6. Da alle 24 cDNA-Klone, die mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems aus HaCat-Zellen isoliert worden waren, über kein Exon 12 verfügten, ist diese Splice-Variante wahrscheinlich die Hauptisoform von PTPH1, die in HaCat-Zellen exprimiert wird. Das Serin an Position 359 innerhalb des von Exon 12 kodierten Segments von AS 334 bis AS 379 gehört zu einer von zwei Bindestellen für das 14-3-3 β Protein. Die vorhergegangene Beobachtung, dass in HaCat-Zellen weniger PTPH1 im Komplex mit 14-3-3 vorliegt (ZHANG *et al.*, 1997), könnte auf die Expression dieser Splice-Variante von PTPH1 zurückzuführen sein. Eine Funktion dieser Bindung an 14-3-3 β , die somit in HaCat-Zellen reduziert wäre, ist nicht bekannt.

Die erniedrigten Spiegel von PTPH1 in den HPV-positiven Zervixkarzinom-Zelllinien SiHa, Caski and HeLa im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien C33a, RTS3b und den primären Keratinozyten (NHEK) sind vermutlich auf die Expression der E6-Onkoproteine zurückzuführen, die eine verstärkte Degradation von endogenem PTPH1 zur Folge hat. In Übereinstimmung damit resultierte eine Verringerung der E6-Expression in erhöhten PTPH1-Mengen. Die Überexpression

des Transkriptionsfaktors E2 hatte nur in SiHa-Zellen die Zunahme der PTPH1-Spiegel zur Folge. Es ist bestens bekannt, dass E2 die Expression von E6 in HPV-positiven Zervixkarzinom-Zelllinien hemmt. Ein Effekt von E2 auf die PTPH1 Konzentration war nicht in den HPV-negativen C33a-Zellen zu beobachten. Somit ist ausgeschlossen, dass die erhöhten Spiegel an PTPH1 eine Folge der E2-vermittelten Apoptose sind, denn E2 induziert auch Apoptose in der HPV-negativen Zelllinie C33a (DEMERET *et al.*, 2003). Die Integration des HPV-Genoms in das Wirtsgenom führt zum Verlust des Transkriptions-Repressors E2 und gilt als ein wichtiger Schritt in der HPV-induzierten Karzinogenese (zusammengefasst in: LONGWORTH UND LAIMINS, 2004; MÜNGER *et al.*, 2004). Die erhöhte Expression von E6 und E7 als Folge der fehlenden Repression durch E2 vermittelt den Zellen einen Wachstumsvorteil (PETT *et al.*, 2004, 2006). Der reduzierte Spiegel von PTPH1, als eine Konsequenz der hohen E6-Mengen, könnte das Zellwachstums fördern und somit zur Tumorprogression beitragen. Ein direkter Einfluss von PTPH1 auf die Regulation des Zellwachstums wird durch Ergebnisse aus Studien bestätigt, in denen PTPH1 überexprimiert oder ausgeschaltet wurde. Die Überexpression von PTPH1 in NIH3T3-Zellen störte die Progression des Zellzyklus und verlangsamte dadurch das Zellwachstum (ZHANG *et al.*, 1999). Ferner führte sie zur Inhibition des Wachstums von RTS3b-Zellen (TÖPFFER UND STEGER; nicht publizierte Daten). Andererseits konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verringerung der endogenen Mengen an PTPH1 zur Transformation der Mausfibroblasten-Zelllinie C127i führte. Diese Transformation äußerte sich in einer veränderten Morphologie mit lang gezogenen, übereinander wachsenden Zellen, während die parentalen C127i-Zellen in einer pflastersteinartigen Anordnung wuchsen. Das Wachstum der PTPH1-Knock-out-Zellen im Soft-Agar-Assay verdeutlicht den Verlust der Adhäsionsabhängigkeit der Zellen. Die Fähigkeit zu proliferieren, ohne an eine Oberfläche gebunden zu sein, stellt einen wichtigen Schritt bei der malignen Progression von Zellen dar. Somit könnte die 16E6 vermittelte Reduktion der PTPH1-Menge eine entscheidende Rolle bei der Transformation von etablierten Mausfibroblasten spielen.

Auch die Expression von 8E6 in Mausfibroblasten hat eine morphologische Transformation zur Folge (IFTNER *et al.*, 1988). Wie Ko-Immunopräzipitationen und GST-Pull-Down Experimente belegen, interagiert auch 8E6 mit PTPH1, obwohl die kutanen Hochrisiko E6-Proteine für kein PDZ-Bindemotiv kodieren. Die Bindung wird

durch eine N-terminal gelegene Region von 8E6 vermittelt. Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen, dass 8E6 die endogenen Spiegel von PTPH1 weder *in vivo* noch *in vitro* verringert. Da 8E6 nicht an E6-AP bindet (STEGER UND PFISTER, 1992, ELBEL *et al.*, 1997), wurde auch keine E6-AP vermittelte proteolytische Degradation von PTPH1 erwartet. Die in einer neueren Publikation gezeigte schwache Interaktion von 8E6 mit E6-AP (BEDARD *et al.*, 2008) ist somit wohl nicht ausreichend, um gebundene, zelluläre Faktoren wie PTPH1 in die proteolytische Degradation zu führen. Im Gegensatz zu 16E6 waren die Mengen an rekombinantem Myc-PTPH1 regelmäßig erhöht, wenn 8E6 koexprimiert wurde. Dies erweckt den Eindruck, dass 8E6 zu einer Stabilisierung von PTPH1 beitragen könnte. Allerdings lieferten erste Untersuchungen hierfür keine eindeutigen Ergebnisse. In HaCat-Zellen, die stabil das 8E6-Protein exprimierten, konnte im Vergleich zu normalen HaCat-Zellen, kein Unterschied in der PTPH1-Konzentration erkannt werden. Im Gegensatz dazu wiesen primäre Keratinozyten, die mit 8E6-exprimierenden, rekombinanten Retroviren infiziert worden waren, deutlich erhöhte PTPH1-Spiegel auf (eigene Daten). Leider war es nicht möglich, die PTPH1 Menge in der Haut bzw. in Hauttumoren E6-transgener Mäuse mit normaler Haut zu vergleichen, da zur Zeit kein Antikörper gegen Maus PTPH1 verfügbar ist. Somit bleibt der Einfluss von 8E6 auf endogenes PTPH1 zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Es wäre möglich, dass 8E6 einen aktivierenden Einfluss auf den CMV-Promotor hat, der die Expression von rekombinantem Myc-PTPH1 kontrolliert. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Interaktion zwischen 8E6 und dem Ko-Aktivator p300 gefunden. Durch diese Interaktion, die von den AS 132-136 vermittelt wird, stimuliert 8E6 die Ko-Aktivatorfunktion von p300 und ist so in der Lage, die Transkription zu aktivieren (MÜLLER *et al.*, 2002). Da auch die 8E6-V68P-Mutante, die in ihrer Interaktion mit PTPH1 deutlich geschwächt, aber in ihrer Wechselwirkung mit p300 nicht beeinflusst sein sollte, erhöhte PTPH1-Spiegel zur Folge hatte, könnte tatsächlich die Stimulation der Transkription eine Rolle spielen.

Wie erwartet, erfolgt die Bindung von 8E6 nicht über die PDZ-Domäne von PTPH1. Studien in unserem Labor belegten, dass 8E6 an den C-terminalen Bereich von PTPH1 bindet, der für die Phosphataseaktivität kodiert (JORDANOVSKI, 2007). Da 8E6 die Menge an PTPH1 nicht reduziert, könnte es über seine Wechselwirkung mit der Phosphatase-Domäne die Enzymaktivität von PTPH1 beeinflussen. Allerdings wurde die Phosphataseaktivität in den hier durchgeführten Phosphatase-Assays

durch 8E6 nicht gehemmt. Wie zu erwarten, führte dagegen die Koexpression von 16E6 zu einer Reduktion der Phosphataseaktivität, im Gegensatz zu 16E6 Δ ETQL, das PTPH1 nicht degradiert. Dies belegt, dass der Phosphatase-Assay zuverlässige Ergebnisse lieferte. Die verstärkte, katalytische Aktivität von PTPH1 in Gegenwart von 8E6 und 8E6-V68P ist wahrscheinlich auf die erhöhten Spiegel von PTPH1 zurückzuführen. Nach Normalisierung auf die Mengen an präzipitierbarem PTPH1 war die spezifische Phosphataseaktivität von PTPH1 nicht verändert. Ein Einfluss von 8E6 auf die katalytische Aktivität von endogenem PTPH1 konnte, aufgrund der geringen Spezifität der vorhandenen Antikörper nicht untersucht werden. Möglicherweise moduliert 8E6 die PTPH1-Aktivität anderweitig. Es könnte die Interaktion von PTPH1 mit anderen Proteinen stören, die zur Regulation von PTPH1 beitragen, oder Auswirkungen auf die Lokalisation von PTPH1 haben.

Die Daten dieser Arbeit belegen zwar, dass sowohl HPV16 als auch HPV8 mit PTPH1 interagieren, aber die funktionellen Auswirkungen auf PTPH1 unterschiedlich sind. So reprimiert 16E6, im Gegensatz zu 8E6, über die Degradation von PTPH1 die Phosphataseaktivität. Gegensätzliche Effekte auf zelluläre Proteine nach der Bindung von genitalen bzw. kutanen E6-Proteinen sind nicht unbekannt. Während die Bindung von 16E6 die Ko-Aktivatorfunktion von p300 hemmt, kommt es nach der Interaktion mit 8E6 zur Stimulation der Ko-Aktivatorfunktion (PATEL *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999; THOMAS UND CHIANG, 2005; MÜLLER-SCHIFFMANN *et al.*, 2006). Trotz gegensätzlicher Effekte könnte die Interaktion beider E6-Proteine mit p300 im Zusammenhang mit der E6-vermittelten Transformation stehen. 16E6 ist in der Lage, eine p300 bindungs-defekte Adenovirus E1A-Mutante bzgl. ihrer Transformationsfähigkeit zu komplementieren (BERNAT *et al.*, 2002), während die Deletion der AS 132-136 in 8E6, die für die Bindung an p300 notwendig sind, zum vollständigen Verlust der morphologischen Transformation von C127i-Zellen führt (STEGGER, persönliche Mitteilung).

Auch bei PTPs kann sowohl eine erhöhte, als auch eine erniedrigte Phosphataseaktivität eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Am besten untersucht ist dies bei der *Src-homology-2 (SH2) domain-containing protein tyrosine phosphatase-2* (SHP2). So sind einige „*gain-of-function*“ Mutationen von SHP2 bekannt, die dazu führen, dass SHP2 als aktive PTP vorliegt, obwohl kein Stimulus vorhanden ist (KEILHACK *et al.*, 2005). Die aktivierenden, somatischen Mutationen in

SHP2 stellen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von bestimmten Kinderkrebsarten dar, wie bspw. der akuten, myelotischen Leukämie. Beim LEOPARD-Syndrom, das eine Form des autosomal vererbaren Noonan-Syndroms darstellt und mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Leukämien assoziiert ist (TARTAGLIA UND GELB., 2005), wurden hingegen „*loss-of-function*“ Mutationen in SHP2 gefunden (KONTARIDES *et al.*, 2006). Somit ist es nicht ausgeschlossen, dass auch die Interaktion von 8E6 mit PTPH1 eine Rolle bei der 8E6-vermittelten Transformation spielt, obwohl initiale Experimente keine Hinweise lieferten.

Eine Reduktion der endogenen Spiegel von PTPH1 in immortalisierten, humanen Keratinozyten ermöglicht ein Wachstum im reduzierten Medium, wie JING *et al.* (2007) zeigen konnten. 16E6-exprimierende, immortalisierte, humane Keratinozyten wiesen einen ähnlichen Phänotyp auf (JING *et al.*, 2007). Die Fähigkeit von 16E6 der durch Wachstumsfaktormangel induzierten Apoptose entgegen zu wirken, wurde bereits beschrieben (MYTHILY *et al.*, 1999). Dagegen waren 8E6-exprimierende RTS3b-Zellen nicht in der Lage, im Wachstumsfaktor reduzierten Medium zu wachsen. Dies zeigt, dass diese Funktion nicht unter den kutanen und genitalen HPV-Typen konserviert ist. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, scheint die unter den genitalen E6-Proteinen konservierte AS Prolin an Position 59 (im Fall von 16E6) hierbei eine essentielle Rolle zu spielen. Das Einführen der AS Prolin in die entsprechende Position in 8E6 (V68P), versetzte 8E6 in die Lage, das Wachstum im serumreduzierten Medium zu induzieren. Andererseits hatte das Vorhandensein eines Valin, das unter den kutanen Proteinen an dieser Stelle konserviert ist, in 16E6 den Verlust dieser Fähigkeit zur Folge. Diese Befunde stimmen mit dem Modell von NOMINÉ *et al.* (2006) überein. Es wurde vorgeschlagen, dass innerhalb einzelner Spezies konservierte AS, die an der Oberfläche des nativen Proteins lokalisiert sind, für die Spezies-spezifischen Funktionen von E6 verantwortlich sind. Somit wäre P59 eine spezialisierte AS von 16E6, die über eine Interaktion mit zellulären Faktoren, die noch zu identifizieren sind und wohl nicht PTPH1 einschließen, die Notwendigkeit für Wachstumsfaktoren reduzieren kann. Bei kutanen E6-Proteinen hingegen vermittelt das Valin an Position 68 die Wechselwirkung mit PTPH1. Entsprechend sollten die E6-Proteine anderer kutaner HPV ebenfalls über diese AS mit PTPH1 interagieren. Initiale Experimente belegen,

dass auch 5E6 an PTPH1 bindet, allerdings wurden die beteiligten AS noch nicht ermittelt (JORDANOVSKI, 2007).

Um die Konsequenz der Interaktion der E6-Proteine mit PTPH1 auf die Zelle zu verstehen, ist es notwendig, die zellulären Zielproteine von PTPH1 zu kennen. Obwohl der Zellzyklus-Regulator VCP (*Valoisin-containing protein*), der als Antwort auf eine T-Zell-Stimulation tyrosin-phosphoryliert wird, als Substrat von PTPH1 identifiziert wurde (ZHANG *et al.*, 1999), konnte keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus von VCP in 16E6-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Wahrscheinlich existieren in humanen Keratinozyten andere, bisher noch nicht identifizierte Substrate von PTPH1, die die wachstums-inhibierende Wirkung von PTPH1 vermitteln. Zum Beispiel könnte PTPH1 in die durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren vermittelte, phosphotyrosin-abhängige Signaltransduktion involviert sein. Um solche potentiellen Substrate von PTPH1 zu identifizieren, wurde in dieser Dissertation ein Substrat-Trapping-Assay durchgeführt.

Im Rahmen dieses Substrat-Trapping-Assays wurden auch Proteine präzipitiert, die keine Phosphoproteine sind, wie z.B. die NADPH-abhängige Carbonyl-Reduktase-1. Wahrscheinlich erfolgte die Präzipitation dieses Proteins über eine Phospho-Tyrosin unabhängige Interaktion mit PTPH1. Die NADPH-abhängige Carbonyl-Reduktase-1 könnte eine wichtige Rolle bei der Regulation von PTPH1 spielen, da das katalytische Cystein von PTPs durch verschiedene reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) reversibel oxidiert und somit inaktiviert werden kann (zusammengefasst in: OSTMAN *et al.*, 2006). Im Rahmen der Transformation und Tumorprogression kommt es vermehrt zur Produktion von ROS, die durch Oxidation von PTPs zu deren Inaktivierung führen können (zusammengefasst in: OSTMAN *et al.*, 2006). Die NADPH-abhängige Carbonyl-Reduktase-1 könnte einen Einfluss auf die reversible Reduktion von oxidiertem PTPH1 haben.

Drei, der im Substrat-Trapping-Assay isolierten Proteine weisen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen auf (RUSH *et al.*, 2005), die theoretisch von PTPH1 dephosphoryliert werden könnten, und stellen somit potentielle Substrate dar. Das *Heat-Shock cognate* 71 kDa Protein (Hsp71), das zu der Familie der Stress-Proteine gehört, konnte kürzlich in Brustkrebstumoren identifiziert werden (LIM, *et al.*, 2004).

Plectin-1 ist ein so genanntes Zytolinker-Protein. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 500 kDa und es existieren zahlreiche Splice-Varianten. Die Hauptaufgabe des Plectin-1-Proteins ist die Organisation des zytoskelettalen Netzwerkes, indem es als mechanischer Linker zwischen den verschiedenen zellulären Strukturen, inklusive der Filament-Netzwerke fungiert. So interagiert es bspw. mit Aktin und ist an den Hemidesmosomen lokalisiert (zusammengefasst in: WICHE *et al.*, 1998). Plectin kann zur Überbrückung von langen Distanzen mit sich selbst interagieren (WICHE, 1989). Der Verlust des Plectin-1 Gens ist mit der autosomal vererbaren Erkrankung *Epidermolysis bullosa* assoziiert, die sich in der Ausbildung von Hautblasen und einer Muskel-Dystrophie äußert (GACHE *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 1996; BAUER *et al.*, 2001). Neuere Publikationen belegen, dass die Plectin-kontrollierte Zytoarchitektur einen Einfluss auf die MAP-Kinase hat, die eine Rolle bei der Migration und bei der Antwort auf zellulären Stress spielt (OSMANAGIC-MYERS *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde β -Aktin von der Substrat-Trapping-Mutante gebunden. Auch dieses Protein spielt eine Rolle im Zytoskelett. Es ist bekannt, dass die onkogene Transformation oft zu einer Unterbrechung des Aktinzytoskeletts führt. Die Veränderungen des Zytoskeletts beeinflussen die Zellmotilität aufgrund der Änderungen in der Aktindynamik und führen zum Verlust von Zelladhäsion. Die erhöhte Zellmotilität ist wichtig für den invasiven Phänotyp von Krebszellen (zusammengefasst in: CASTRO-BARROS AND MARSHALL, 2005). Plectin-1 kann über seine Aktinbinde-Domäne (ABD) mit Aktin interagieren (SEVIK *et al.*, 2004). Deshalb wäre es auch denkbar, dass nur eines der beiden Proteine von PTPH1 gebunden wird und das zweite ko-präzipitiert wurde.

Die N-terminale Band-4.1-FERM-Domäne ist wahrscheinlich für die Lokalisation von PTPH1 an der Schnittstelle zwischen dem Zytoskelett und der Membran verantwortlich (zusammengefasst in: OSTMANN *et al.*, 2006). Diese subzelluläre Lokalisation könnte, zumindest zum Teil, die Substrate von PTPH1 festlegen. Die hier gefundenen potentiellen Substrate, Plectin-1 und β -Aktin, bilden Komponenten des Zytoskeletts und passen in dieses Bild. Es ist bekannt, dass das PDZ-Bindemotiv genitaler HPV E6-Proteine zur morphologischen Transformation von Keratinozyten einschließlich einer Desorganisation des Aktinzytoskeletts führt (WATSON *et al.*, 2006). Ein 16E6-vermittelter Einfluss auf die Dephosphorylierung von Plectin-1 und β -Aktin könnte eine molekulare Rolle bei der 16E6 induzierten morphologischen Transformation von immortalisierten, humanen Keratinozyten und der Störung von

epithelialen *Tight-Junctions* spielen (zusammengefasst in: MANTOVANI UND BANKS, 2001; WATSON *et al.*, 2003). Initiale, eigene Versuche zeigen, dass 8E6 ebenfalls eine morphologische Veränderung von primären Keratinozyten induziert, die einem epidermalen-mesenchymalen Übergang (EMT) ähneln (Daten nicht gezeigt), der mit einer Neuorganisation des Aktinzytoskeletts einhergeht (PELLEGRIN UND MELLOR, 2007). Es bleibt zu klären, ob PTPH1 hierbei eine Rolle spielt und ob diese durch 8E6 moduliert wird. Die weitere Aufklärung der Rolle von PTPH1 bei der Organisation des Zytoskeletts und des Einflusses der E6-Proteine könnte zum Verständnis der molekularen Grundlagen der E6-vermittelten Transformation beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Accardi R, Dong W, Smet A, Cui R, Hautefeuille A, Gabet AS, Sylla BS, Gissmann L, Hainaut P and Tomassino M (2006). Skin human papillomavirus type 38 alters p53 functions by accumulation of Δ Np73. *EMBO reports*.

Akgül B, Cooke JC and Storey A (2006). HPV-associated skin disease. *J. Pathol.* **208**: 165-175.

Arimura Y, Hinoda Y, Itoh F, Takekawa M, Tsujisaki M, Adachi M, Imai K, and Yachi A (1992). cDNA cloning of a new protein tyrosine phosphatase in the human colon. *Tumour Biol.* **13**: 180-186.

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

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

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

Bauer JW, Rouan F, Kofler B, Rezniczek GA, Kornacker I, Muss W, Hametner R, Klaussegger A, Huber A, Pohla-Gubo G, Wiche G, Uitto J and Hintner H (2001). A compound heterozygous one amino-acid insertion/nonsense mutation in the plectin gene causes epidermolysis bullosa simplex with plectin deficiency. *Am. J. Pathol.* **158**: (2) 617-625.

Bedard KM, Underbrink MP, Howie HL, and Galloway DA (2008). The E6 Oncoproteins from Human Betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6-AP-Dependent Mechanism and prolong the lifespan of Primary Keratinocytes. *J. Virol.* **82**: 3894-3902.

Berezutskaya E and Baghci S (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26-S proteasome. *J. Biol. Chem.* **272**: 30135-30140.

Berkhout RJ, Bouwes Bavnick JN and ter Schegget J (2000). Persistence of Human Papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplantat receptions. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2087-2096.

Bernard HU (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of Human Papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* **32**: (Suppl. 1), S1-S2.

Bernat A, Massimi P and Banks L (2002). Complementation of p300/CBP defective-binding mutant of adenovirus E1A by human papillomavirus E6 proteins. *J. Gen. Virol.* **83**: 829-833.

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

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

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A and Fusenig NE (1988). Normal Keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* **106**: 761-771.

Castro-Barros J and Marshall CJ (2005). Activation of either ERK1/2 or ERK 5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* **118**: 1663-1671.

Clifford GM, Smith JS, 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.

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

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

Chung CT and Miller RH (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent cells. *Nuc. Acid. Res.* **16**: 3580.

Del Vecchio AM, Romanczuk H, Howley PM and Baker CC (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.* **66**: 5949-5958.

Demeret C, Yaniv M and Thierry F (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J. Virol.* **68**: 7075-7082.

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

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

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

Dev KK (2004). Making protein interactions druggable: targeting PDZ-domains. *Nat. Rev Drug Discov.* **3**: 1047-1056.

Dong XP, Stubenrauch F, Beyer-Finkler E, and Pfister H (1994). Prevalence of deletion of YY-1-binding sites in episomal HPV16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer.* **58**: 803-808.

- Dyson N, Howley PM, Münger K and Harlow E** (1989). The human papillomavirus 16E7 oncoprotein is able to bind to retinoblastoma gene product. *Science*. **243**: 934-937.
- Einstein MH, and Goldberg GL** (2002). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest.* **20**: 1080-1085.
- Elbel M, Carl S, Spaderna S and Iftner T** (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomavirus with the p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology*. **239**: 132-149.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, and McMillan NA** (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.
- Favre M, Breitburd F, Croissant O, and Orth G** (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.* **21**: 1205-1209.
- Foster SD, Demers GW, Etscheid BG and Galloway DA** (1994). The ability of human papillomavirus E6 protein to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* **68**: 5698-5705.
- Fournier N, Raj K, Saudan P et al.** (1999) Expression of Human Papillomavirus 16 E2 protein in *Schizosaccharomyces pombe* delays the initiation of mitosis. *Oncogene*. **18**: 4015-4021.
- Francis DA, Schmid SI, and Howley PM** (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J. Virol.* **74**: 26798-2686.
- Frattini MG, Hurst SD, Lim HB, Swaminathan S and Laimins L** (1997). Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic Human Papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J.* **16**: 318-331.
- Friedel F, Kimura I, Osato T and Ito Y** (1970). Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma tissue of uterus. Its establishment and morphology. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **135**: 543-545.
- Fuchs PG, Iftner T, Weininger J, and Pfister H** (1986). *Epidermodysplasia verruciformis*-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.* **58**: 626-634.
- Fuchs PG, Horn S, Iftner T, May M, Stubenrauch F, and Pfister H** (1993). Molecular biology of *Epidermodysplasia verruciformis*-associated human papillomaviruses. In: *Virus strategies*. Doerfler, W. & Böhm P., (eds.) (Verlag Chemie, Weinheim): 517-529.
- Fuchs PG, and Pfister H** (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology*. **37**: 159-167.

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

Gache Y, Chavanas S, Lasour JP, Wiche G, Owaribe K, Meneguzzi G and Ortonne JP (1996). Defective expression of plectin in Epidermolysis Bullosa Simplex with muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* **97**: 2289-2298.

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

Gardiol D, Kühne C, Glausinger B, Lee SS, Javier R, Banks L (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 target the discs large tumor suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* **18**: 5487-5496.

Gewin L, Myers H, Kiyono T and Galloway DA (2004). Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type 16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev.* **18**: 2269-2282.

Gey GO, Coffman WD and Kubicek MT (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265.

Giampieri S, and Storey A (2004). Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing E6 protein from Human Papillomaviruses types 5 and 8. *Br. J. Cancer.* **90**: 2203-2209.

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

Goodwin EC, Naeger LK, Breiding DE, Androphy EJ and Di Maio D (1998). Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J. Virol.* **72**: 3925-3934.

Goodwin EC and DiMaio D (2000). Repression of Human Papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 12513-12518.

Grm HS and Banks L (2004). Degradation of hDlg and MAGIs by human papillomavirus E6 is E6-AP independent. *J. Gen. Virol.* **85**: 2815-2819.

Grm HS, Massimi P, Gammoh N and Banks L (2005). Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene.* **24**: 5149-64.

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

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

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

Hampson L, Li C, Oliver AW, Kitchener HC, and Hampson IN (2004). The PDZ protein Tip-1 is a gain of function target of the HPV16 E6 oncoprotein. *Int. J. Oncol.* **25**: 1249-1256.

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

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, and Schiller JT (1989). HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO. J.* **8**: 3905-3910.

Higgins GD, Uzelin DM, Philips GE, McEvoy P, Marin R and Burrell CJ (1992). Transcription pattern of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial neoplasia: evidence for promoter usage within the E7 open reading frame during epithelial differentiation. *J. Gen. Virol.* **8**: 2047-2057.

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

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

Hung AY and Sheng M (2002). PDZ-Domains: structural modules for protein complex assembly. *J. Biol. Chem.* **277**: 5699-5702.

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

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

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

Iftner T, Elbel M, Schopp B et al., (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* **21**: 4741-4748.

Itoh F, Ikuta S, Hinoda Y, Arimura Y, Ohe M, Adachi M, Ariyama T, Inazawa J, Imai K, and Yachi A (1993). Expression and chromosomal assignment of PTPH1 gene encoding a cytosolic protein tyrosin phosphatase homologous to cytoskeletal-associated proteins. *Int. J. Cancer* **55**: 947-951.

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.

Jing M, Bohl J, Brimer N, Kinter M and Vande Pol SB (2007). Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **81**: 2231-2239.

Jordanovski D (2007). Zelluläre Zielproteine von 8E6: p300 und PTPH1. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Joyce JG, Thung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehmann ED, Sands JA, Jansen KU, and Keller PK (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interact with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274**: 5810-5822.

Keilhack H, David FS, McGregor M, Cantley LC and Neel BG (2005). Diverse biochemical properties of SHP-2 mutants: implications for disease phenotypes. *J. Biol. Chem.* **280**: 30984-30993.

Kiyono T, Nagashima K and Ishibashi M (1989). The primary structure of major viral RNA in a rat cell line transfected with type 47 human papillomavirus DNA and the transforming activity of its cDNA and E6 gene. *Virology.* **173**: 551-565.

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

Kiyono T, Hiraiwa M, Fujita, Hayashi T, Akiyama, and Ishibashi M (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natil. Acad. Sci. USA,* **94**: 11612-11616.

Kiyono T, Foster SA, Kopp JI, McDougall JK, Galloway DA and Klingelutz AJ (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize huamn epithelial cells. *Nature.* **396**: 84-88.

Klingelutz AJ, Foster SA and McDougall JK (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* **380**: 79-81.

Kontraidis MI, Swanson KD, David FS, Bradford D and Neel BG (2006). PTPN11 (SHP2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects. *J. Biol. Chem.* **281**: 6785-6792.

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

Kuballa P, Matentzoglou K and Scheffner (2007). The role of the ubiquitin ligase E6-AP in human papillomavirus E6-mediated degradation of PDZ-Domain containing proteins. *J. Biol. Chem.* **282**: 65-71.

Kühne C and Banks L (1999). Cellular targets of the Papillomavirus E6proteins. *Papillomavirus Report* **10**: 139-145.

Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, and Javier RT (2000). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.* **74**: 9680-9693.

Leverrier S, Bergamaschi D, Ghali L, Ola A, Warnes G, Akgül B, Blight K, Garcia-Escudero R, Penna A, Eddaoudi A, and Storey A (2007). Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. *Apoptosis.* **12**: 549-560.

Liang F, Kumar S and Zhang ZY (2007). Proteomic approach to study protein tyrosine phosphatases. *Mol. BioSyst.* **3**: 308-316.

Lim YP, Wong CY, Ooi LL, Drucker BJ and Epstein RJ (2004). Selective tyrosine hyperphosphorylation of cytoskeletal and stress proteins in primary human breast cancers: implications for adjuvant use of kinase-inhibitory drugs. *Clin. Cancer Res.* **10**: 3980-3987.

Liu L, Chen jj, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, Band V and Androphy EJ (1999). Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* **73**: 7297-7307.

Longworth MS and Laimins LA (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 362-372.

Lowy DR and Schiller JT (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J. Clin. Invest* **116**: 1167-73.

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

Marcuzzi GP (2006). Analyse des onkogenen Potentials der frühen Gene E6 und E7 des humanen Papillomvirus Typ 8 durch die Etablierung transgener Mausmodelle. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Mantovani F and Banks L (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*. **20**: 7874-7887.

Mantovani F, Massimi P, and Banks L (2001). Proteasome-mediated regulation of the hDlg tumor suppressor protein. *J. Cell Sci.* **114**: 4285-4292.

Massimi P, Gammoh N, Thomas M and Banks L (2004). HPV E6 specifically targets different cellular pools of its PDZ domain-containing tumor suppressor substrates for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 8033-8039.

May M, Grassmann K, Pfister H, and Fuchs PG (1994). Transcriptional silencer of the human papillomavirus type 8 late promoter interacts alternatively with the viral transactivator E2 or with a cellular factor. *J. Virol.* **68**: 3612-3619.

Mizushima S and Nagata S (1990). pEF-Bos, a powerful mammalian expression vector. *Nucl. Acid Res.* **18**: (17) 5322.

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

Müller (2003). Die Rolle der Interaktion des zellulären Koaktivators p300 mit den E2- und E6- Proteinen von Papillomviren bei der Regulation der viralen Genexpression. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Müller-Schiffmann A, Beckmann J and Steger G (2006). The E6 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 can stimulate the viral early and late promoters by distinct mechanisms. *J. Virol.* **80**: 8718-8728.

Mullis KB, and Fallona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods. Enzym.* **155**: 335-350.

Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzales SL, Grace M and Zacny VL (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *J. Virol.* **80**: 8718-8728.

Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, and Huh KW (2004). Mechanism of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. Minireview. *J. Virol.* **78**: 11451-11460.

Munoz N (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* **19**: 1-5.

Myers G, Sverdrup F, Baker C, McBride A, Münger K, and Bernard HU (1997). Human papillomaviruses. *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos.*

Mythily D, Krishna S and Terganokar (1999). Pleiotropic effects of human papillomavirus type 16 oncogene expression in human epithelial cell lines. *J. Gen. Virol.* **80**: 1707-1713.

Nakagawa S and Huibregtse (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 8244-8253.

Nguyen MM, Nguyen ML, Caruana G, Bernstein A, Lambert PF, and Griep AE (2003). Requirement of PDZ-containing proteins for cell cycle regulation and differentiation in the mouse lens epithelium. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 8970-8981.

Nishimura A, Ono T, Ishimoto A et al. (2000). Mechanisms of Human Papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol.* **74**: 3752-3760.

Nominè Y, Masson M, Charbonnier S, Miguet L, Potier N, Van Dorsselaar A, Atkinson RA, Travè G and Kieffer B (2005). ¹H and ¹⁵N resonance assignment, secondary structure and dynamic behaviour of the C-terminal domain of human papillomavirus oncoprotein E6. *J. Biomol NMR.* **31**: 129-141.

Nominè Y, Masson M, Charbonnier S, Zarnier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibler AP, Desplancq D, Atkinson RA & other authors (2006). Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Mol. Cell* **21**: 665-678.

Nourry C, Grant SG and Borg JP (2003). PDZ-Domain proteins: plug and play. *Sci STKE* 2003, RE7.

O'Connor MJ, Tan SH, Tan CH, and Bernard HU (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by squenching Ap-1 activity. *J. Virol.* **7**: 6529-6539.

Ohtani K, DeGregori J and Nevins JR (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 12146-12150.

Osmanagic-Myers, Gregor M, Walko G, Burgstaller G, Reipert S and Wiche G (2006). Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinase involved in cellular stress response and migration. *J. of Cell Biol.* **174**: 557-567.

Ostman A, Hellberg C and Bohmer FD (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **6**: 307-320.

Patel D, Huang SM, Baglia LA, and McCance (1999). The E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* **18**: 5061-5072.

Pellegrin S and Mellor H (2007). Actin stress fibres. *J. Cell. Sci.* **120**: 3491-3499.

Pett MR, Alazawi WO, Roberts I, Downen S, Smith DI, Stanley MA and Coleman N (2004). Acquisition of high level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* **64**: 1359-1368.

Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA and Coleman N (2006). Selection of cervical keratinozytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous retroviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 3822-3827.

Pfister H (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **99**: 111-181.

Pfister H, and Fuchs P (1987). Papillomaviruses: particles , genome organisation and proteins. In: *Papillomaviruses and human disease*. Herausg: K. Syrjänen, L. Gissmann, L.G. Koss, *et al.*

Pfister H (2003). Human Papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **31**: 52-56.

Phelps WC, Yee CL, Münger K, and Howley PM (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation function similar to those of adenovirus E1A. *Cell.* **53**: 539-547.

Pilecka I, Patrignani C, Pescini R, Curchod ML, Perrin D, Xue Y, Yasenchak J, Clark A, Magnone MC, Zaratini P, Valenzuela D, Rommel C, and van Huijsduijnen RH (2007). Protein-tyrosine Phosphatase H1 Controls Growth Hormone Receptor Signaling and Systemic Growth. *J. of Biol. Chem.* **282**: 35405-35415.

Pim D, Thomas M, Javier R, Gardiol D, and Banks L (2000). HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase. *Oncogene* **19**: 719-725.

Pim D, Thomas M and Banks L (2002). Chimeric HPV E6 proteins allow dissection of the proteolytic pathways regulating different E6 cellular target proteins. *Oncogene.* **21**: 8140-8148.

Purdie KJ, Sexton CJ, Porby CM, Glover MT, Williams AT, Stables JN, and Leigh IM (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res.* **53**: 5328-5333.

Riley RR, Duensing S, Brake T, Munger K, Lambert PF, and Arbeit JM (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer Res.* **63**: 1626-1635.

Robles AI, and Harris CC (2001). p53-mediated Apoptosis and Genomic Instability Diseases. *Acta Oncol.* **40**; 696-701.

Roth D (2000) Untersuchungen des zelltransformierenden Potentials hautspezifischer Papillomviren. *Diplomarbeit*. Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Rush J, Moritz A, Lee KA, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha XM, Polakiewicz RD and Comb MJ (2005). Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotechnol.* **23**:(1) 94-101.

Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, Kyriakis JM and Zon LI (1994). Role of SAPK/ERK-kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*. **372**: (6508), 794-798.

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

Schaper ID, Marcuzzi GP, Weissenborn SJ, Kasper HU, Dries V, Smyth N, Fuchs P and Pfister H (2005). Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res*. **65**: 1394-1400.

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

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

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

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

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

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

Shai A, Brake T, Somoza C, and Lambert PF (2007). The Human Papillomavirus E6 protein dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer Res*. **67**: 1626-1635.

Simonson SJS, Difilippantino MJ, and Lambert PF (2005). Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Biol*. **13**: 59-67.

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

Smith FJD, Eady RAJ, Leigh IM, McMillan JR, Rugg RL, Kelsell DP, Bryant SP, Spurr NK, Geddes JF, Kirtschig G, Milana G, de Bono AG, Owaribe K, Wiche G, Pulkkinen L, Utto J, McLean WHL and Lane EB (1991). Plectin deficiency results muscular dystrophy with Epidermolysis bullosa. *Nature Genet.* **13**: 450-457.

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

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

Sozio M, Mathis A, Young JA, Wälchli S, Pitcher LA, Wrage PC, Bartok B, Campell A, Watts JD, Aebersold R, van Huijsduijnen RH, and van Oers NSC (2004). PTPH1 is a predominant Protein-tyrosin Phosphatase capable of interacting with and Dephosphorylation the T Cell Receptor ζ -Subunit. *J. Biol. Chem.* **279**: 7760-7769.

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

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

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

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

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

Tabanero L, Aricescu AR, Jones Y and Sedlacsek S (2008). Protein tyrosine phosphatases: structure-function. *FEBS J.* **275**: 867-882.

Tan SH, Gloss B and Bernard HU (1992). During negative regulation of the Human Papillomavirus-16 E6 promotor, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promotor element. *Nucleic Acids Res.* **20**: 251-256.

Tanaka M, Gupta R and Mayer BJ (1995). Differential inhibition of signaling pathways by dominant negative SH2/SH3 adaptor proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**: (12), 6829-6837.

Tartaglia M and Gelb BD (2005). Noonan syndrome and related disorders: Genetics and pathogenesis. *Ann. Review of Genomics and Human Genetics.* **6**: 45-68.

Thierry F and Yaniv M (1987). The BPV1 E2-trans-acting protein can be either a repressor or activator of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* **6**: 3391-3397.

Thomas JT, and Laimins LA (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J. Virol.* **72**: 1131-1137.

Thomas JT, Laimins LA, and Ruesch MN (1998). Perturbation of cell cycle control by E6 and E7 oncoproteins of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, **9**: 59-64.

Thomas M, Glausinger B, Pim D, Javier R, and Banks L (2001). HPV16 E6 and MAGUK Protein Interactions: Determination of the molecular basis for specific Protein Recognition and Degradation. *Oncogene.* **20**: 5431-5439.

Thomas M, Laura K, Hepner K, Guccione E, Sawyers C, Lasky L, and Banks L (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene.* **21**: 5088-5096.

Thomas M, and Chiang CM (2005). E6 oncoprotein represses p53-Dependent gene activation via Inhibition of Protein Acetylation Independently of Inducing p53 Degradation. *Mol. Cell.* **17**: 251-264.

Tonks NK (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 833-845.

Töpffer S (2005). Identifizierung von zellulären Faktoren, die mit E6-Proteinen von HPV interagieren, Diplomarbeit, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Töpffer S, Müller-Schiffmann A, Matentzoglou K, Scheffner M and Steger G (2007). Proteine tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of high-risk genital human papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* **88**: 2956-2965.

Turek LP (1994). The structure, function, and regulation of papillomavirus genes in infection and cervical cancer. *Adv. Virus Res.* **44**: 305-356.

van de Weterling M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FCP, Brummelkamp TR, Agami R and Clevers H (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO reports.* **4**: (6) 609-615.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, and Munoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**: 12-19.

Wang Z, Shen D, Persons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA & other authors (2004). Mutational analysis of tyrosine phosphatase in colorectal cancers. *Science.* **304**: 1164-1166.

Watson RA, Thomas M, Banks L and Roberts S (2003). Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes. *J. Cell Sci.* **116**: 4925-4935.

Werness BA, Levine AJ, and Howley PM (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. **248**: 76-79.

Wiche (1989). Plectin: general overview and appraisal of its potential role as a subunit protein of the cytomatrix. *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **24**: 41-67.

Wiche G (1998). Role of Plectin in cytoskeleton organisation and dynamics. *J. Cell. Sci.* **111**: 2477-2486.

Yang Q, and Tonks NK (1991). Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5949-5953.

Zhang SH, Kobayashi R, Graves PR, Piwnica-Worms, and Tonks NK (1997). Serine Phosphorylation-dependent association of the Band 4.1-related Protein-tyrosine Phosphatase PTPH1 with 14-3-3 β Protein. *J. Biol. Chem.* **272**: 27281-27287.

Zhang SH, Liu J, Kobayashi R, and Tonks NK (1999). Identification of the Cell Cycle Regulator VCP (p07/CDC48) as a substrate for the Band 4.1-related Protein-tyrosin Phosphatase PTPH1. *J. Biol. Chem.* **274**: 17806-17812.

Zheng Y, Schlöndorff J, and Blobel CP (2002). Evidence for Regulation of the Tumor Necrosis Factor α -Convertase (TACE) by Protein-tyrosine Phosphatase PTPH1. *J. Biol. Chem.* **227**: 42463-42470.

Zarnier K, Charbonnier S, Baltzinger M, Nominè Y, Altschuh D and Travè G (2005). Kinetic analysis of the interactions of human papillomavirus E6 oncoproteins with the ubiquitin ligase E6-AP using surface plasmon resonance. *J. Mol. Biol.* **349**: 401-412.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, and O'Connor MJ (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, and de Villiers EM (1994). Human Papillomaviruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**: 427-447.

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

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

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AS	Aminosäure, -n
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>BRM-activated killer</i>
bp	Basenpaare
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CMV	Cytomegalo-Virus
Da	Dalton
DBD	DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiotheritol
<i>E.coli</i>	<i>Escheria coli</i>
E6-AP	<i>E6 associated protein</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminiscence</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al</i>	und andere
EMT	<i>Epidermal-Mesenchymal-Transition</i>
<i>Ev</i>	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FCS	Fötale Kälberserum

g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
GZE	Ganzzellextrakte
h	human
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES gepufferte PBS-Lösung
hDlg	(humanes) Homolog zum <i>Drosophila discs large suppressor</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hNAP-1	<i>Human Nucleosome-Assembly-Protein-1</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase
hScrib	(humanes) Homolog zum <i>Drosophila scribble</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> translatiert/-e/-es
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCR	<i>Long Control Region</i>
LSDB	<i>Low Salt Dilution Buffer</i>
MAGI	<i>Membrane associated guanylate kinase with inverted orientation</i>
MAGUK	<i>Membrane associated guanylate kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MUPP1	Multiple-PDZ domain protein
mRNA	messenger RNA
NAP	<i>Nucleosome assembly protein</i>
NCR	<i>Non Coding Region</i>
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
NMSC	<i>Non melanoma skin cancer</i> (Nicht melanozytärer Hautkrebs)
NP40	Nonident P40
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAG	Polyacrylamid-Gel

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDZ	PSD-95, Dlg, Zo-1
PI	Proteaseinhibitoren
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
pRb	Retinoblastom-Protein
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTPc	Phosphatase-Domäne
PTPH1	Protein-Tyrosin-Phosphatase H1
PV	Papillomvirus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP2	<i>Src-homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sp-1	<i>Specific protein-1</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor α-convertase</i>
TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline + Tween20</i>
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin
TIP-1	<i>Tax-Interacting-Protein-1</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Factor-1
Tris	Tris(-Hydroxymethyl-)aminomethan
TSB	<i>Transformation and Storage Buffer</i>
u.a.	unter anderen, -m
VCP	<i>Valoisin containing protein</i>
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
YY1	Ying Yang 1

8 ZUSAMMENFASSUNG

Das E6-Protein des mit dem Zervixkarzinom assoziierten Humanen Papillomavirus (HPV) 16 (16E6) besitzt ein C-terminales PDZ-Bindemotiv, das unter den E6-Proteinen genitaler Hoch-Risiko-HPV-Typen konserviert ist. Über dieses PDZ-Bindemotiv bindet E6 an PDZ-Domänen-haltige Proteine und induziert in der Regel deren proteasomale Degradation. Dies korreliert mit dem onkogenen Potential von 16E6. Im Rahmen der Vorarbeiten wurde eine Interaktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase PTPH1 mit dem PDZ-Bindemotiv von 16E6 beobachtet. PTPH1 besitzt Eigenschaften eines Tumorsuppressorproteins. In dieser Arbeit konnte die Interaktion zwischen 16E6 und PTPH1 mittels GST-Pull-Down Experimenten und Ko-Immunopräzipitationen bestätigt werden. *In vitro* und *in vivo* Degradationsassays belegten, dass 16E6 den proteasomalen Abbau von PTPH1 induziert. Hierfür waren sowohl die Interaktion des PDZ-Bindemotivs von 16E6 mit der PDZ-Domäne von PTPH1 als auch die Bindung von 16E6 an die zelluläre Ubiquitin-Ligase E6-AP notwendig. Die Wechselwirkung mit PTPH1 scheint unter den genitalen Hoch-Risiko E6-Proteinen konserviert zu sein, da auch HPV18 E6 an PTPH1 bindet und dessen Degradation vermittelt. HPV-positive, von Zervixkarzinomen abstammende Zelllinien, wiesen geringere Spiegel an endogenem PTPH1 auf, als HPV-negative Zellen, was darauf hindeutet, dass das in diesen Zelllinien exprimierte E6 intrazelluläres PTPH1 degradiert. Entsprechend kam es nach Einführen des HPV16 E2-Proteins, das die Expression von E6 stark reprimiert, in HPV16 positiven SiHa-Zellen zur Erhöhung der endogenen PTPH1-Mengen. Die Degradation von PTPH1 scheint auch für die morphologische Transformation von etablierten Nagerzelllinien durch 16E6 essentiell zu sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des endogenen PTPH1 durch spezifische shRNA zur morphologischen Transformation der C127i-Mausfibroblasten-Zelllinie führte. Mittels eines Substrat-Trapping-Assays konnten drei potentielle Substrate von PTPH1 identifiziert werden. Zwei davon, Plectin-1 und β -Aktin, spielen eine Rolle bei der Ausbildung des Zytoskeletts.

E6-Proteine kutaner Hoch-Risiko HPV-Typen haben ebenfalls onkogenes Potential. So induziert auch das E6-Protein des kutanen HPV8 (8E6) die morphologische Transformation von C127i-Zellen. Obwohl 8E6 kein PDZ-Bindemotiv besitzt, konnte hier eine Interaktion mit PTPH1 festgestellt werden. Die Auswirkung der Interaktion mit 8E6 auf die Funktion von PTPH1 bleibt allerdings offen. 8E6 führte weder zum verstärkten Abbau von PTPH1, noch hatte es einen Einfluss auf die Phosphataseaktivität. 8E6 bindet über seine N-terminale Domäne an PTPH1. Die Mutation des Valins an Position 68, das unter den E6 Proteinen kutaner HPV-Typen konserviert ist, in ein Prolin, das sich an der entsprechenden Position bei genitalen E6 Proteinen befindet, eliminierte weitgehend die Interaktion mit PTPH1. Darüber hinaus verlieh das Prolin an Position 68 8E6 die Fähigkeit, Wachstum von RTS3b-Zellen im Wachstumsfaktor reduzierten Medium zu induzieren. Das Wildtyp 8E6 war dazu nicht in der Lage, im Gegensatz zu 16E6. Entsprechend führte der Austausch des Prolins an Position 59 in 16E6 in ein Valin dazu, dass RTS3b-Zellen im reduzierten Medium nicht wachsen konnten. Diese Daten deuten daraufhin, dass die Aminosäure Valin an Position 68 bei kutanen E6-Proteinen die Interaktion mit PTPH1 vermittelt, während die genitalen Hoch-Risiko E6 Proteine PTPH1 über ihr PDZ-Bindemotiv binden. Das Prolin an entsprechender Position genitaler E6-Proteine hingegen verleiht die Fähigkeit, die Wachstumsfaktor-Abhängigkeit der Zielzellen zu verringern, eine Eigenschaft, die den kutanen E6-Proteinen fehlt.

9 ABSTRACT

The E6 protein of the cervical carcinoma associated human papillomavirus (HPV) 16 (16E6) has a C-terminal PDZ-binding-motif, which is conserved among genital high-risk HPV-types. Via this motif E6 can bind to PDZ-domain proteins and induce their accelerated degradation. This contributes to the oncogenic potential of 16E6. The protein-tyrosine-phosphatase PTPH1 was identified as a new protein bound by the PDZ-binding-motif of 16E6. PTPH1 was suggested to act as a tumor-suppressor-protein. In this work the interaction between 16E6 and PTPH1 was confirmed by GST-pull-down-assays and co-immunoprecipitations. *In vitro* and *in vivo* degradation-assays revealed, that 16E6 induced the proteosomal degradation of PTPH1. This required both the interaction of the PDZ-binding-motif with the PDZ-domain of PTPH1 and the binding of 16E6 to the cellular ubiquitin ligase E6-AP. The targeting of PTPH1 seems to be conserved among high-risk genital E6 proteins, since also HPV18 E6 was able to interact with PTPH1 and to mediate its accelerated degradation. HPV-positive cervical carcinoma cell lines revealed lower levels of endogenous PTPH1 than HPV negative cells. This suggests that the expression of E6 in these cells enhances the degradation of intracellular PTPH1. Correspondingly, the introduction of the HPV16 E2 protein, known to repress the expression of E6, resulted in higher amounts of PTPH1 in HPV16 positive SiHa-cells. The interaction with PTPH1 may be essential for the 16E6-mediated morphologic transformation of established rodent cell lines. Here it has been shown, that the reduction of endogenous PTPH1 by specific shRNA induced the morphologic transformation of the C127i-mouse fibroblast cell line. Three potential substrates of PTPH1 have been identified by substrate-trapping-assays. Two of them are involved in the development of the cytoskeleton.

E6 proteins of cutaneous high-risk HPV-types also have oncogenic potential. For instance the E6 protein of the cutaneous HPV8 (8E6) has the ability to transform C127i-cells as well. Although 8E6 does not encode a PDZ-binding-motif, an interaction with PTPH1 was observed. The consequence of this interaction on the function of PTPH1 remains unclear. 8E6 neither affected the stability of PTPH1, nor the phosphatase activity. 8E6 binds to PTPH1 via its N-terminal domain. The mutation of the valin at position 68, which is conserved among the cutaneous E6 proteins, to prolin, the conserved amino acid at the corresponding position in the E6 proteins of genital high-risk HPV-types, eliminated the interaction with PTPH1. Moreover the prolin in position 68 enabled 8E6 to induce cell growth in growth factor reduced medium. This activity could not be observed with wildtype 8E6, in contrast to 16E6. Correspondingly, the replacement of the prolin at position 59 in 16E6 by valin did not allow the growth of cells expressing this 16E6 mutant in reduced medium. These data implicate, that the amino acid at position 68 of cutaneous E6 proteins mediates the interaction with PTPH1, while genital high-risk E6 proteins bind to PTPH1 via their PDZ-binding-motif. A prolin at the corresponding position in genital E6 proteins confers their ability to reduce growth factor requirements of target cells. This feature is not shared by cutaneous E6 proteins.

10 DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Gertrud Steger für ihre Betreuung in allen praktischen und theoretischen Belangen. Ihre Menschlichkeit, ihre Diskussionsbereitschaft und ihre hilfreichen Ratschläge haben zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Pfister danke ich für die Betreuung meiner Promotion und die kritische Diskussion meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Helmut W. Klein und Prof. Dr. Siegfried Roth für Ihre Bereitschaft, die vorliegende Arbeit vor der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Rolf Kaiser, der sich dazu bereit erklärt hat, den Beisitz in meiner Disputation zu übernehmen. Außerdem möchte ich ihm für die Unterstützung in allen Belangen danken.

Ich möchte mich herzlich bei meinen Laborkollegen Darko Jordanovski und Jessica Drake für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Baki Akgül danke ich ganz herzlich für die fachliche Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen.

Bei Dali Lazic, Susanne Schmidt und Jenny Pahne möchte ich mich für die fachliche und vor allen Dingen freundschaftliche Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Menschen, die mich begleiten. Bei meinen Eltern möchte ich mich für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums und vor allem während meiner Promotionszeit bedanken. Ich danke Ihnen, dass sie immer an mich geglaubt haben. Meinem Freund Björn danke ich für die aufbauenden Worte, die ständige moralische Unterstützung und seine Liebe.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Wilhelm-Sander-Stiftung gefördert.

11 ERKLÄRUNG

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

Die Bestimmungen 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 sind unter folgendem Titel veröffentlicht worden:

Töpffer S, Müller-Schiffmann A, Matentzoglou K, Scheffner M and Steger G (2007). Protein tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of high-risk genital human papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* **88**: 2956-2965.

Köln, den 07.10.2008

Stephanie Töpffer

12 LEBENS LAUF

Zur Person

Name	Stephanie Töpffer
Anschrift	Aschenbrödelweg 18, 51067 Köln
Geburtsdatum	27.04.1980
Geburtsort	Köln-Holweide
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

Aug. 1986 – Juni 1990	Katholische Grundschule Neufelderstr., Köln-Holweide
Aug. 1990 – April 1999	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Köln-Buchheim
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Okt. 1999 - Jan. 2005	Hochschulstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Studiengang: Diplom-Biologie Hauptfach: Genetik 1. Nebenfach: Biochemie 2. Nebenfach: Pharmakologie Abschluss: Diplom-Biologin
Seit Mai 2005:	Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Experimentelle Arbeit am Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln, Arbeitsgruppe: Dr. Gertrud Steger Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert Pfister
Seit Mai 2005:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln

Veröffentlichungen

Töpffer S, Müller-Schiffmann A, Matentzogl u K, Scheffner M and Steger G (2007). Protein tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of high-risk genital human papillomaviruses. J. Gen. Virol. **88**: 2956-2965.

