





# **Regulation der Transkription und Replikation von HPV8 und Charakterisierung der transformierenden Eigenschaft des viralen E7-Proteins**

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

vorgelegt von  
**Baki Akgül**  
aus Sivas / Türkei

Köln, 2002

Berichtersteller: Prof. Dr. H. J. Pfister  
Prof. Dr. T. Langer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.2.2003

|  |           |
|--|-----------|
| I. EINLEITUNG  | 1         |
| 1.1 Humane Papillomviren   | 1         |
| 1.2 Beteiligung humaner Papillomviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms | 1         |
| 1.3 Rolle von HPV bei der Entstehung des „nicht-melanozytären Hautkrebses“   | 2         |
| 1.4 Aufbau der menschlichen Haut   | 5         |
| 1.5 Infektion menschlicher Haut durch Papillomviren                          | 8         |
| 1.6 Aufbau von Papillomviren   | 9         |
| 1.7 DNA-Replikation der Papillomviren  | 10        |
| 1.8 Virusproteine  | 11        |
| 1.8.1 E1-Protein   | 11        |
| 1.8.2 E2-Protein   | 11        |
| 1.8.3 E6- und E7-Proteine  | 13        |
| 1.9 Nicht-kodierende Region (NCR) EV-assoziiierter HPVs                      | 17        |
| 1.10 UV-Licht  | 18        |
| 1.11 Akkumulation von p53 in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung               | 19        |
| 1.12 Das p53-Protein   | 20        |
| <b>1. 13 ZIELSETZUNG</b>   | <b>23</b> |
| <b>II. MATERIAL</b>  | <b>25</b> |
| 2.1 Bakterien  | 25        |
| 2.2 Eukaryonte Zellen  | 25        |
| 2.3 Patientenmaterial  | 26        |
| 2.4 Medien   | 26        |
| 2.4.1 Medien für die Bakterienkultur   | 26        |
| 2.4.2 Medien für die Zellkultur  | 27        |
| 2.5 Nukleinsäuren  | 28        |
| 2.5.1 Plasmide   | 28        |
| 2.5.2 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide                               | 32        |
| 2.5.3 Sonstige natürliche Nukleinsäuren                                      | 33        |
| 2.6 Enzyme   | 33        |
| 2.7 Antikörper   | 34        |
| 2.7.1 Antikörper für die Immunhistochemie                                    | 34        |
| 2.7.2 Antikörper für die Western-Blot-Analyse                                | 34        |
| 2.8 Reagenziensysteme  | 35        |
| 2.9 Radioisotope   | 36        |
| 2.10 Reagenzien  | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.11 Lösungen und Puffer .....  | 36        |
| <b>III. METHODEN .....</b>  | <b>37</b> |
| 3.1 Bakterienkultur .....   | 37        |
| 3.1.1 Transformation .....  | 37        |
| 3.1.2 Kulturen zur Plasmidisolierung.....   | 37        |
| 3.2 Plasmid-DNA-Präparationen.....  | 37        |
| 3.3 Molekularbiologische Methoden.....  | 37        |
| 3.3.1 Standardmethoden .....  | 37        |
| 3.3.2 DNA-Sequenzierung.....  | 38        |
| 3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....   | 38        |
| 3.3.4 <i>In vitro</i> DNA-Mutagenese.....   | 38        |
| 3.3.5 EMSA.....   | 39        |
| 3.3.6 <i>In vitro</i> Transkription und Protein-Translation .....                       | 40        |
| 3.4 Zellkulturtechniken .....   | 40        |
| 3.4.1 Kultivierung von Zelllinien .....   | 40        |
| 3.4.2 Isolierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten aus Hautgewebe.....            | 41        |
| 3.4.3 Kultivierung von primären Keratinozyten .....                                     | 41        |
| 3.4.4 Bestrahlung von eukaryonten Zellen .....  | 42        |
| 3.4.5 Langzeitlagerung von Zellen.....  | 42        |
| 3.5 Herstellung rekombinanter Retroviren.....   | 43        |
| 3.6 Infektion von primären Keratinozyten mit rekombinanten Retroviren .....             | 44        |
| 3.7 Organotypische Zellkulturen (raft-Kulturen).....                                    | 44        |
| 3.8 Immunhistochemische Untersuchung .....  | 46        |
| 3.9 Funktionelle Tests .....  | 47        |
| 3.9.1 Transienter Replikationstest.....   | 47        |
| 3.9.2 Southern-Blot-Hybridisierung .....  | 48        |
| 3.9.3 Transfektion von RTS3b-Zellen für den transienten Replikationstest .....          | 49        |
| 3.9.4 Transiente Transfektion von RTS3b-Zellen zur Reporter-gen-Analyse.....            | 49        |
| 3.9.5 Transiente Transfektion von primären Keratinozyten zur Reporter-gen-Analyse ..    | 50        |
| 3.9.6 Transfektion von PT67-Zellen mit SuperFect.....                                   | 50        |
| 3.9.7 $\beta$ -Galaktosidase- und Luciferase-Assay.....                                 | 51        |
| 3.9.8 Gewinnung von Kernextrakten aus eukaryonten Zelllinien.....                       | 51        |
| 3.9.9 Expression und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen..... | 52        |
| 3.9.10 GST-Interaktionsassays.....  | 52        |
| 3.9.11 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse .....                          | 53        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>IV. ERGEBNISSE .....</b>  | <b>54</b>  |
| 4.1 Identifizierung des minimal notwendigen <i>ori</i> -Sequenzbereiches .....   | 54         |
| 4.2 Der minimale <i>ori</i> -Bereich von HPV8 enthält eine von der Konsensussequenz<br>abweichende E2-Bindestelle .....            | 55         |
| 4.3 p53 bindet an das M29-Sequenzmotiv von HPV8 .....  | 58         |
| 4.4 Analyse der Interaktion zwischen p53 und den Replikationsproteinen E1 und E2 .....   | 60         |
| 4.5 Einfluss von HPV8-E2 auf die Bindung von p53 an seine Bindestelle in M29.....  | 61         |
| 4.6 Kooperativer Einfluss von p53 und E2 auf die Aktivität des frühen Promotors P <sub>175</sub> von<br>HPV8 in RTS3b-Zellen ..... | 63         |
| 4.7 Einfluss von p53 auf die Promotoraktivität EV-assoziiierter HPVs .....   | 67         |
| 4.8 Einfluss von UV-B-Licht auf die Promotoraktivität EV-assoziiierter HPVs .....  | 69         |
| 4.9 Bedeutung von EV-spezifischen Sequenzmotiven für die UV-B-abhängige<br>Stimulierung der HPV8-Transkription.....                | 72         |
| 4.10 Etablierung organotypischer raft-Kulturen .....   | 74         |
| 4.11 Untersuchung zur Zytokeratin-Expression in HPV8-E2, -E6, -E7 und -E6/E7 raft-<br>Kulturen .....                               | 79         |
| 4.12 Degradation der Basalmembran in E7-raft-Kulturen .....  | 82         |
| 4.13 Ermittlung der MMP-Expression in der E7-raft-Kultur .....   | 85         |
| <b>V. DISKUSSION.....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>VI. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>VII. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>   | <b>114</b> |
| <b>VIII. ABSTRACT .....</b>  | <b>116</b> |
| <b>IX. ANHANG .....</b>  | <b>118</b> |
| ABKÜRZUNGEN .....  | 118        |
| DANKSAGUNG .....   | 121        |
| LEBENS LAUF .....  | 123        |

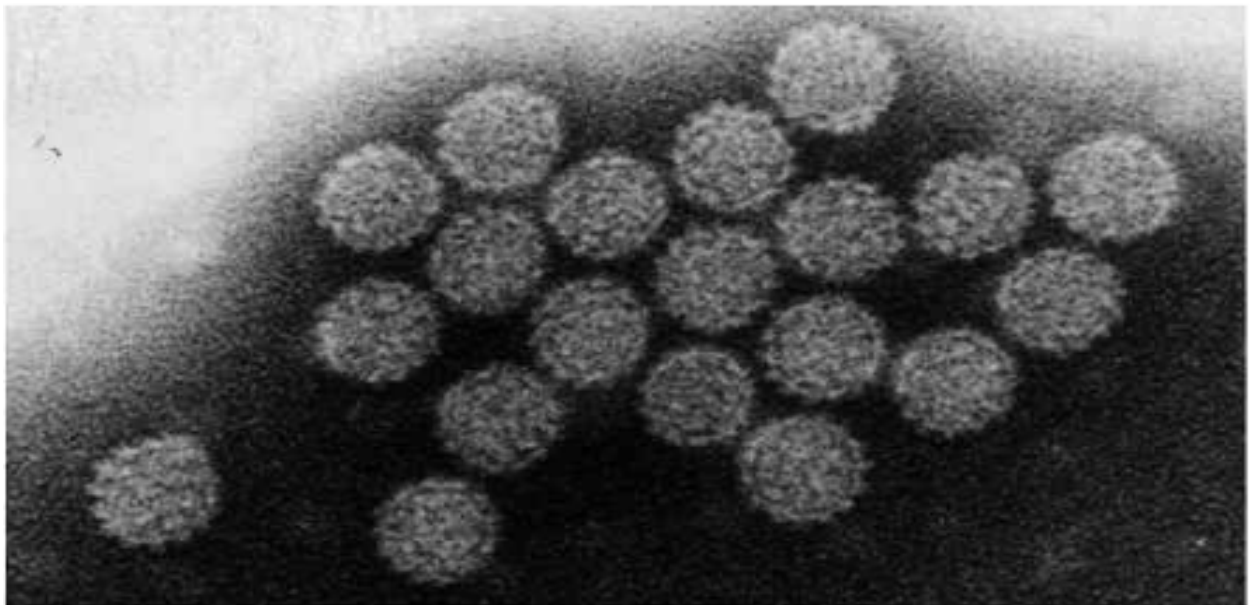




## I. EINLEITUNG

### 1.1 Humane Papillomviren

Papillomviren sind eine große Gruppe von DNA-Viren, die mehrschichtiges Plattenepithel von Vertebraten infizieren und beim Menschen je nach Virustyp verschiedene gutartige oder maligne Tumore, wie z.B. Papillome, Hautwarzen oder das Zervixkarzinom, hervorrufen können (Shah und Howley, 1996). Allein beim Menschen gibt es über 90 komplett charakterisierte Papillomvirus-Genotypen (HPVs), die aufgrund ihres Tropismus' in Haut- und Schleimhaut-Typen unterteilt werden (zur Hausen, 2000).



**Abb.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von HPV-Partikeln, die aus einer Plantarwarze isoliert wurden.**

Kontrastierung: Phosphorwolframsäure; Vergrößerung: 20000x; (mit freundlicher Genehmigung von Prof. H. J. Pfister)

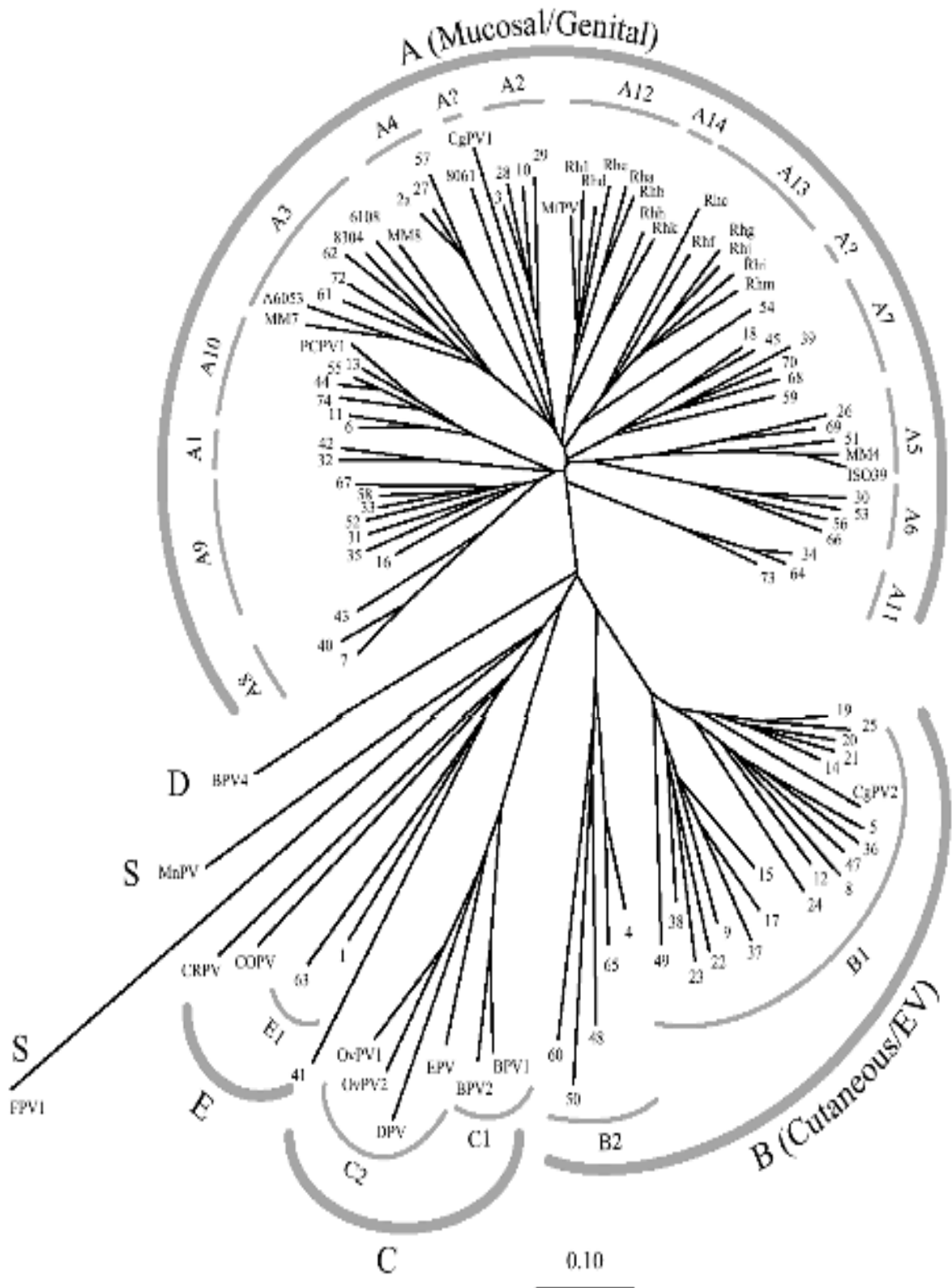
### 1.2 Beteiligung humaner Papillomviren bei der Entstehung des Zervixkarzinoms

Die größte Subgruppe im phylogenetischen Stammbaum der Papillomviren wird durch die HPV-Typen repräsentiert, die die Schleimhäute des Anogenitaltraktes infizieren (Abb.2). Mehr als 40 der identifizierten HPV-Typen infizieren den Anogenitaltrakt (Myers *et al.*, 1997). Nur ein Teil dieser Typen konnte bisher in Anogenitalkarzinomen gefunden werden (Bosch *et al.*, 1995; Pirog *et al.*, 2000). Die

Typen, die am häufigsten detektiert wurden, sind HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 und 69 (zur Hausen, 2000). Diese werden zu den sogenannten high-risk genitalen HPV-Typen gezählt. Die mit dem Zervixkarzinom und einem Teil der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome assoziierten HPV-Typen 16 und 18 sind die Hauptvertreter dieser Hochrisikogruppe (Gissmann, 1992). HPV-Typen, die nur selten oder nie in malignen Tumoren des Anogenitaltrakts auftreten, werden als low-risk genitale HPV-Typen bezeichnet. Hierzu zählen vor allem HPV 6 und 11, die genitale Warzen hervorrufen. Die Genome der high-risk mukosotropen HPV-Typen kodieren für mindestens zwei Proteine (E6 und E7), die die Zellproliferation anregen und zelltransformierende Eigenschaften besitzen (zur Hausen, 2000). Auf die Eigenschaften dieser Proteine und ihre Rolle bei der malignen Entartung wird später näher eingegangen.

### **1.3 Rolle von HPV bei der Entstehung des „nicht-melanozytären Hautkrebses“**

Die zweitgrößte Subgruppe auf dem phylogenetischen Stammbaum der Papillomviren umfaßt HPV-Typen, die in Läsionen von Epidermodysplasia verruciformis (EV)-Patienten gefunden werden (Myers *et al.*, 1997; Abb. 2). EV ist eine äußerst seltene, genetisch bedingte Hauterkrankung (Jablonska und Majewski, 1994) und zeichnet sich durch eine ausgeprägte Prädisposition für HPV-Infektionen aus, die zu lebenslang persistierenden, gutartigen Hautläsionen, wie flachen Warzen und makulären Läsionen, führen. Die genetische Prädisposition für diese Hautkrankheit wird autosomal rezessiv vererbt und konnte kürzlich einem DNA-Lokus auf Chromosom 17 zugeordnet werden (Ramos *et al.*, 2002). In einem Zeitraum von 10-20 Jahren entwickeln sich auf dem Boden der primär benignen Tumoren multiple präkanzeröse Läsionen, die bei bis zu 60% der EV-Patienten zu Plattenepithelkarzinomen entarten (Fuchs und Pfister, 1996). Auffällig ist, dass in EV-Karzinomen vorwiegend HPV5 oder HPV8 auftreten, obwohl sich in den benignen EV-Läsionen etwa 20 verschiedene EV-assoziierte Virustypen nachweisen lassen, was möglicherweise auf ein besonderes onkogenes Potential von HPV5 und 8 hinweist (Pfister, 1992). Es wurde bis vor kurzem vermutet, dass Infektionen mit diesen HPV-Typen auf Patienten mit Epidermodysplasia verruciformis begrenzt sind. Neuere Studien zeigen, dass sie nicht nur in



**Abb.2: Phylogenetischer Stammbaum der Papillomviren nach Sequenzdaten des L1-Leserahmens (aus Myers *et al.*, 1997). Evolutionär ist die große Gruppe der genitalen PV von der Gruppe der kutanen PV abgegrenzt.**

Plattenepithelkarzinomen von EV-Patienten vorkommen, sondern auch in malignen, nicht-melanozytären Hauttumoren - zu denen Basaliome (BCCs) und Plattenepithelkarzinome (SCCs) gezählt werden - von Nierentransplantatempfängern und von immunkompetenten Patienten sowie in normaler Haut (Pfister und ter Schegget, 1997; Boxmann *et al.*, 1999; Berkhout *et al.*, 2000; Harwood *et al.*, 2000). Dieser nicht-melanozytärer Hautkrebs (NMSC) ist der häufigste maligne Tumor des Menschen (Corona, 1996). Anerkannte Risikofaktoren beim NMSC sind ein geschwächter Immunstatus, der jeweilige Hauttyp, extensive Sonnenexposition, ionisierende Strahlung, verschiedene chemische Karzinogene und das Alter der gefährdeten Person (Bouwes Bavinck und Berkhout, 1997). Als wichtigster Risikofaktor gilt der Grad der natürlichen UV-Bestrahlung, da BCCs und SCCs und EV-Tumore zumeist an lichtexponierten Körperstellen lokalisiert sind (Jablonska, und Majewski, 1994). Die Wichtigkeit von UV-Licht bei der Entwicklung von NMSC wird dadurch unterstrichen, dass Patienten mit Erbkrankheiten der Haut wie Xeroderma pigmentosum oder Albinismus, die durch eine erhöhte Sensitivität gegen UV-Licht charakterisiert sind, ein viel höheres Risiko besitzen, NMSC zu entwickeln (Jablonska und Majewski, 1994). Der Pigmentierungsgrad der Haut spielt bei der Entstehung von NMSC auch eine entscheidende Rolle. NMSC ist weit häufiger bei hellhäutigen Europäern und seltener bei Afrikanern und Asiaten vertreten. Zudem hat die geographisch bedingte Strahlungsintensität der Sonne einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von NMSC (Vitaliano und Urbach, 1980).

Der direkte Beweis für den Einfluss von UV-Licht auf die NMSC-Pathogenese stammt von Studien an Biopsien, die gezeigt haben, dass spezifische *p53*-Mutationen in den NMSCs vorkommen, die auf UV-Licht zurückzuführen sind (Ziegler *et al.*, 1993). Die Frequenz der *p53*-Mutationen liegt in SCCs bei 15-69% (Nelson *et al.*, 1994). Neben den *p53*-Mutationen enthalten die SCCs Mutationen im *ras*-Gen (van der Schroeff *et al.*, 1990) sowie in den Genen von *p21WAF/CIP1* (Liu *et al.*, 1999) und *p16INK4/CDKN2A* (Pavey *et al.*, 1999). Damit ist zum einen die Signaltransduktionskaskade der Wachstumsfaktoren in der Zelle (Ras) gestört, und zum anderen führt der Ausfall von *p16* und *p21* zur unkontrollierten Zellproliferation. Die BCCs zeichnen sich neben einer hohen Mutationsrate im *p53*-Gen (Ziegler *et al.*, 1993) und im *PTCH*-Gen (Gailani und Bale, 1997) durch eine

hohe Expressionsrate von Bcl-2, einem anti-apoptotisch wirkenden Protein, aus (Cerroni und Kerl, 1994).

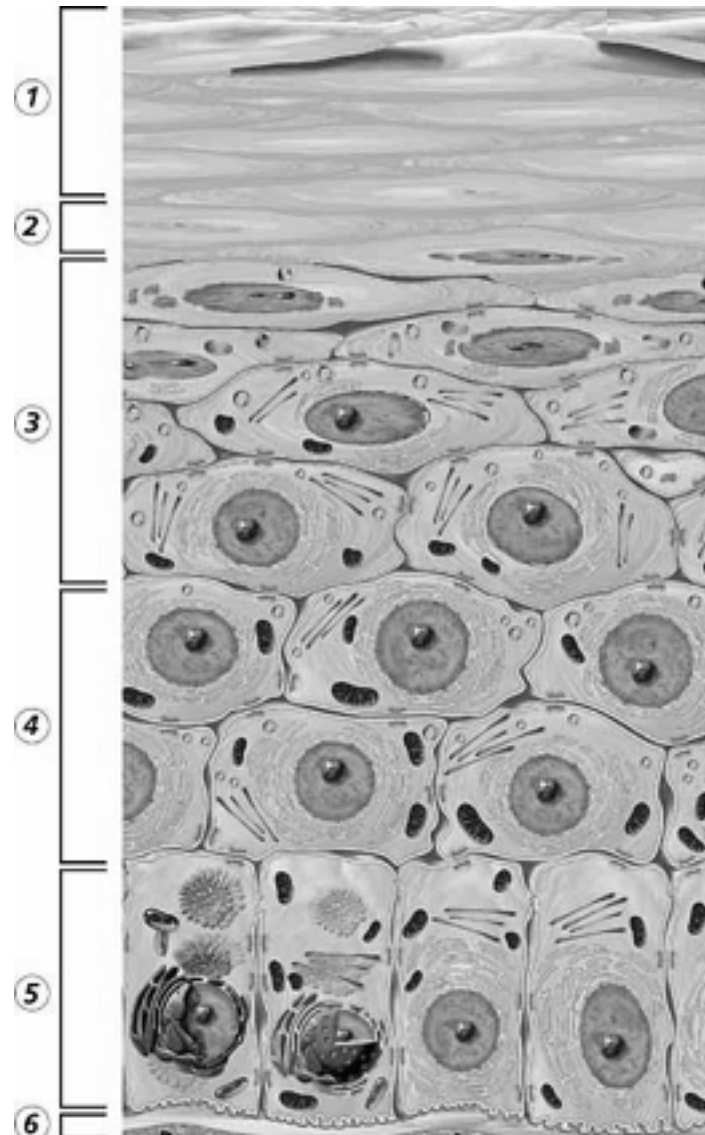
Während die kausale Rolle von HPV bei der Entstehung genitaler Tumore sehr gut beschrieben ist, bleibt es bis heute unklar, in welcher Weise sie an der kutanen Onkogenese beteiligt sind, da die transformierenden Eigenschaften der E6- und E7-Proteine der kutanen HPV-Typen gegenüber den genitalen high-risk-Typen kaum untersucht sind (Abb. 5, 6) (Kiviat, 2000). Es wird erwogen, dass das UV-Licht HPV-Infektionen der Haut stimuliert und so zur Progression benigner Läsionen beiträgt. Diese Hypothese konnte kürzlich durch die Entdeckung eines UV-responsiven Kontrollelements im frühen Promoter des kutanen HPV77 unterstützt werden (Purdie *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass E6-Proteine verschiedener kutaner HPV-Typen die Apoptose in Folge von UV-Schäden inhibieren, weist auf eine weitere Interaktion zwischen HPV und Sonnenexposition hin (Jackson und Storey, 2000).

### **1.4 Aufbau der menschlichen Haut**

Die menschliche Haut besitzt eine komplexe Struktur, wobei sie sich von außen nach innen in Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis) gliedert. Epidermis und Dermis stellen die Haut im eigentlichen Sinne dar und werden auch als Cutis bezeichnet. Die Epidermis setzt sich aus fünf verschiedenen Schichten zusammen, diese sind Hornschicht (Stratum corneum), Glanzschicht (Stratum lucidum), Körnerzellschicht (Stratum granulosum), Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und Basalschicht (Stratum basale) (Abb. 3). Stratum spinosum und Stratum basale werden auch als Stratum germinativum (Regenerationsschicht) bezeichnet, da hier durch mitotische Teilungen fortwährend neue Zellen entstehen. Die Zellen wandern in die oberen drei Zellschichten (Verhornungsschicht) ein, wo sie eine Umstrukturierung der in ihnen enthaltenen Keratinfilamente erfahren und zu kernlosen Korneozyten (Hornzellen) differenzieren, um schließlich ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel zu bilden. Dermis und Epidermis sind miteinander dreidimensional verzapft. Dabei dient eine speziell differenzierte Suprastruktur des dermalen Bindegewebes, die Basalmembran, nicht nur als Verankerungs- und Verbindungsstruktur, sondern regelt auch Wachstum und Differenzierung der Zellen in den basalen Schichten der Epidermis. In der Dermis

lassen sich zwei Schichten differenzieren: die Papillarschicht (Stratum papillare) und die Geflechschicht (Stratum reticulare). Über die bindegewebigen Papillen des Stratum papillare ist die Dermis fest mit der Epidermis verzahnt. Das Bindegewebe der Haut ist in komplexer Weise aus Strukturproteinen und Bindegewebszellen, den Fibroblasten, aufgebaut, wobei die Fibroblasten für die Synthese und den Abbau dieser Strukturproteine verantwortlich sind. Zu ihnen werden verschiedene multifunktionale Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin und unterschiedliche Kollagene gezählt (Kielty und Shuttleworth, 1997). Der Abbau einzelner Bindegewebsproteine wird in kontrollierter Weise durch Enzyme, die zur Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) gehören, reguliert. Die Aktivität dieser MMPs wird wiederum von Fibroblasten synthetisierten Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases) kontrolliert (Kugler, 1999).

Letztendlich garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis der Synthese von Strukturproteinen auf der einen Seite und der MMPs und ihrer Inhibitoren auf der anderen Seite die Funktion des Bindegewebes der Haut. Dieses sensible Gleichgewicht wird jedoch durch UV-Strahlung entscheidend gestört (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997). Darüber hinaus führt eine chronische UV-B-Exposition vermutlich über eine gestörte Zell-Matrix-Interaktion und durch ein Ungleichgewicht zwischen Matrix-Synthese und Matrix-Abbau zur Begünstigung von Tumorinvasion und Metastasierung.



**Abb.3: Schematische Darstellung der Epidermis.**

Bei der Differenzierung wandeln sich die Basalzellen in kernlose Hornzellen um.

- 1: Hornschicht (Stratum corneum)
- 2: Glanzschicht (Stratum lucidum)
- 3: Körnerschicht (Stratum granulosum)
- 4: Stachelzellschicht (Stratum spinosum)
- 5: Basalzellschicht (Stratum basale)
- 6: Basalmembran

(entnommen aus [www.eucerin.de](http://www.eucerin.de))

### 1.5 Infektion menschlicher Haut durch Papillomviren

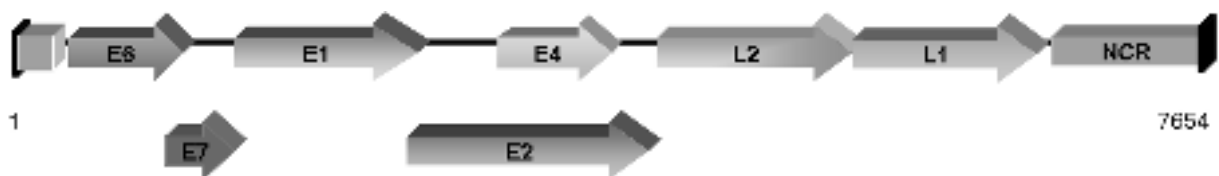
Papillomviren replizieren sich streng wirtsspezifisch und vermehren sich in Abhängigkeit vom Differenzierungsstatus der Haut (Fuchs und Pfister, 1997). Sie infizieren vermutlich zunächst undifferenzierte Zellen des Stratum basale, die sie durch Mikroverletzungen der äußeren Schichten erreichen (Melchers *et al.*, 1993). Als ein möglicher Rezeptor konnte das  $\alpha$ -6-Integrin identifiziert werden, das auf der Oberfläche von epithelialen, endothelialen und neuronalen Zellen exprimiert wird (Evander *et al.*, 1997). Dieser Rezeptor scheint nach jüngsten Erkenntnissen nicht von allen Papillomviren gebunden zu werden. Er ist obligatorisch für HPV6b (Evander *et al.*, 1997) und HPV16 (Yoon *et al.*, 2001) und wird von bovinen Papillomviren für den Eintritt in die Zelle nicht benutzt (Sibbet *et al.*, 2000). HPV33 erkennt Heparansulfate auf den Zelloberflächen und scheint mit einem noch unbekanntem, zweiten Rezeptor zu interagieren (Giroglou *et al.*, 2001). Nach Aufnahme des Virus durch Endozytose findet im Kern der undifferenzierten, proliferationskompetenten Basalzellen die Transkription der frühen, für die Replikation notwendigen Gene E1 und E2 statt (Howley und Lowy, 2001). Das virale Genom wird danach synchron mit der zellulären DNA-Synthese repliziert. Die Zellen des Stratum basale teilen sich während des Erneuerungsprozesses der Haut zur Hautoberfläche hin, was zu einer kontinuierlichen Differenzierung der basalen Keratinozyten führt. Während der Differenzierung werden neue zelluläre Gene aktiviert, wodurch es zu einer Änderung des zellulären Milieus kommt; dies mag eine Verstärkung der viralen Transkription und vegetativen Replikation zur Folge haben. Außerdem werden weitere virale Gene aktiviert, was eine vorübergehende Verzögerung der Zelldifferenzierung nach sich ziehen kann und die Ausbildung von Warzen begünstigt (Chow und Broker, 1994; zur Hausen und De Villiers, 1994). Beginnend im Stratum granulosum wird die Replikation von der Expression der viralen Strukturproteine und dem Zusammenbau neuer Viruspartikel begleitet. In den terminal ausdifferenzierten Zellen des Stratum corneum kann man die reifen Virione als parakristalline Strukturen im Keratin eingebettet vorfinden. Die Freisetzung der infektiösen Viruspartikel erfolgt nicht durch Lyse der Wirtszelle, sondern durch Abschuppung infizierter Hautzellen (Howley, 1996). Alle Papillomviren bleiben sehr lange außerhalb der Wirtszelle stabil und infektiös. Die Aufrechterhaltung einer schwachen Replikation bei latenten Infektionen ist in den basalen Schichten der Epidermis möglich, in denen das virale Genom synchron mit



der zellulären DNA-Synthese repliziert wird (Gilbert und Cohen, 1987). Hierbei treten keine apparenten Epithelveränderungen auf. Dieser Zustand kann Monate oder Jahre andauern und danach wieder in einen produktiven Infektionszyklus übergehen.

### 1.6 Aufbau von Papillomviren

Die ikosaedrischen HPV-Partikel bestehen aus 72 Kapsomeren und haben einen Durchmesser von ca. 55 nm (Abb.1). Sie enthalten ein doppelsträngiges, zirkulär geschlossenes DNA-Genom, welches etwa 8000 Basenpaare umfasst und mit zellulären Histonproteinen in einer nukleosomenähnlichen Struktur vorliegt (Pfister, 1984). Die teilweise überlappenden offenen Leserahmen („open reading frames“, ORFs), die für virale Proteine kodieren, liegen alle auf einem DNA-Strang (Abb.4) und nehmen trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Typen relativ zueinander entsprechende Positionen ein (Pfister und Fuchs, 1987).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des HPV8-Genoms.**

Bei dieser Darstellung wurde das zirkuläre HPV8-Genom an der Position 1/7654 geöffnet. NCR: non coding region (modifiziert nach Pfister und Fuchs, 1987).

Unterteilt wird das Genom in einen kodierenden und einen nicht-kodierenden Bereich („non coding region“, NCR). Der kodierende Bereich umfasst Leserahmen, deren Produkte im viralen Vermehrungszyklus zu teilweise unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Sie kodieren für Proteine, die dementsprechend traditionell als frühe („early“, E) und späte („late“, L) Proteine bezeichnet werden. Die Produkte der frühen Gene erfüllen vor allem regulatorische Funktionen bei der Replikation, Transkriptionskontrolle und Zelltransformation, während Produkte der

späten Gene, L1 und L2, die Strukturproteine des Kapsids darstellen. Zwischen den offenen Leserahmen von L1 und E6 befindet sich die NCR, die bei allen bisher untersuchten Papillomviren die wichtigsten *cis*-Kontrollelemente für die Regulation der Transkription und Replikation des viralen Genoms enthält.

### 1.7 DNA-Replikation der Papillomviren

Die DNA-Replikation der HPVs in differenzierendem Epithelgewebe wird in drei Stadien eingeteilt (Howley, 1996). Während der Amplifikations-Phase in den Basalzellen des Epithels wird das virale Genom unmittelbar nach der Infektion bis zum Erreichen einer für die Virusgruppen typischen Genomkopienzahl repliziert. In der folgenden „maintenance“-Phase wird die DNA im Durchschnitt einmal pro Zelle während der S-Phase des Zellzyklus dupliziert. Diese Art der Replikation sichert die Persistenz und latente Infektion der Zellen. In den differenzierten Epithelzellen kommt es zur „vegetativen“ DNA-Replikation. Es wird eine große Anzahl von Virusgenomen produziert, die in Viruskapside verpackt werden. Die Mechanismen, die diesen Phasenwechsel steuern, sind noch nicht eindeutig geklärt. Man vermutet, dass in undifferenzierten Zellen am DNA Replikations-Ursprungspunkt (*origin of replication, ori*) eine Theta-( $\theta$ )-Struktur ausgebildet wird, die eine bidirektionale Replikation der viralen DNA ermöglicht (Flores *et al.*, 1997). Hierbei entstehen zwei Replikationsgabeln, die sich in entgegengesetzter Richtung vom Replikationsursprung entfernen. In differenzierten Keratinozyten hingegen scheint die virale DNA nach dem Mechanismus des rollenden Rings („rolling circle“) repliziert zu werden, wobei die Replikationsgabel sich um einen ringförmigen Matrizenstrang herumrollt. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von zellulären Faktoren in differenzierenden Zellen oder eine sehr hohe Konzentration der Replikationsproteine E1 und E2 könnten auch eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Replikation spielen.

## 1.8 Virusproteine

### 1.8.1 E1-Protein

E1 ist mit 600 bis 650 Aminosäuren das längste und am höchsten konservierte Protein der Papillomviren. Der Replikationsinitiator E1 ist ein kernlokalisiertes, ATP bindendes Phosphoprotein (Sun *et al.*, 1990), das sequenzspezifisch an die DNA bindet (Holt *et al.*, 1994). Es besitzt eine ATP-abhängige Helikase-Aktivität (Yang *et al.*, 1993), die in Anwesenheit von Topoisomerase I und Replikationsprotein A (RPA) doppelsträngige DNA entwindet (Kuo *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von E1 durch CyclinE-Cdk2, einem Zellzyklusregulatorprotein der S-Phase, notwendig ist, um die Replikation einzuleiten (Cueille *et al.*, 1998).

### 1.8.2 E2-Protein

Vom E2-Leserahmen wird ein multifunktionales, 43 bis 48 kD großes DNA bindendes Phosphoprotein kodiert (Chiang *et al.*, 1992). Es moduliert die DNA Replikation, Transkription und Segregation des viralen Genoms bei der Zellteilung (Mc Bride *et al.*, 1991; Skiadopoulos und McBride, 1998; Lehman und Botchan, 1998). Das E2-Protein zeigt einen für die meisten Transkriptionsfaktoren typischen modularen Aufbau mit zwei physikalisch und funktionell getrennten Domänen: einer Aktivierungsdomäne, die im N-terminalen Bereich liegt und einer DNA-Binde- und -Dimerisierungsdomäne im C-Terminus. Beide Domänen sind über eine sogenannte "hinge-Region" miteinander verbunden. Die N- und C-terminalen Regionen sind unter Papillomviren hoch konserviert, dagegen ist die "hinge-Region" mit unterschiedlicher Länge und Aminosäuresequenz sehr variabel (McBride *et al.*, 1991). Das E2-Protein bindet als Dimer an die Basenfolge 5'-ACC(N)<sub>6</sub>GGT-3' (Androphy *et al.*, 1987), die in mehreren Kopien im viralen Genom vorhanden ist (Steger *et al.*, 1996). Die E2-Bindestelle (E2BS) ist unter den einzelnen HPV-Typen sehr konserviert, wobei die Anzahl in der NCR zwischen den HPV-Subgruppen variiert. E2 kann die virale Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren, wobei die Position der E2-Bindestellen relativ zu anderen *cis*-aktiven Promotorelementen für den jeweiligen Effekt verantwortlich ist (Steger *et al.*, 1993). Genauere Untersuchungen haben allerdings auch gezeigt, dass bei HPV16 und 18 Repression erst bei erhöhter E2-Konzentration auftritt, während bei niedriger E2-

Menge Aktivierung des E6/E7-Promotors zu messen war (Bouvard *et al.*, 1994; Steger und Corbach, 1997).

Die DNA genitaler HPVs liegt in benignen und präkanzerösen Läsionen meist extrachromosomal vor (Dürst *et al.*, 1985). Bei der Tumorprogression integriert die virale DNA in das Genom der Wirtszelle. Die zur Integration notwendige Öffnung findet in der Region der E1/E2-ORFs statt (Schwarz *et al.*, 1985; Matsukura *et al.*, 1986). Dabei kann der E2-Leserahmen zerstört werden, was zu einem Funktionsverlust des E2-Proteins führt. Da E2 auch reprimierend auf den E6/E7-Promotor wirkt, kann es zu einer verstärkten Expression der Onkogene E6 und E7 kommen (Romanczuk *et al.*, 1990). Das Fehlen des E2-Proteins kann jedoch nicht alleinige Ursache der malignen Entartung sein, da in ca. 30% der HPV16 positiven Zervixkarzinome das Virusgenom extrachromosomal vorliegt (Cullen *et al.*, 1991). Außerdem liegt das Genom der EV-assoziierten Typen HPV5 und 8 in allen Tumoren episomal vor (Fuchs und Pfister, 1996).

Wie schon erwähnt, ist das E2-Protein auch an der Initiation der viralen DNA-Replikation beteiligt, indem es an E1 anbindet und dieses zum Replikationsursprung rekrutiert. Kürzlich ist gezeigt worden, dass das E2-Protein von HPV31 immortalisierte und normale Keratinozyten in der S-Phase des Zellzyklusses arretiert, was mit einer kontinuierlichen Replikation der zellulären DNA verbunden ist. Der Verlust der Replikationskontrolle beruhte einerseits auf der Konzentrationserhöhung der cyclinA- und cyclinE-abhängigen Kinasen, sowie auf einem schnellen Abbau des zellzyklusregulierenden Tumorsuppressors p53. E2 ist demnach in der Lage, die DNA-Replikation durch Kontrolle des Zellzyklus', welcher größtenteils von p53 reguliert wird, zu stimulieren (Frattini *et al.*, 1997).

Offenbar besitzt das E2-Protein von HPV8 auch transformierende Eigenschaften. So konnten epitheliale Zellen und Fibroblasten nach Transfektion eines E2-Expressionsvektors Kolonien in Softagar bilden. Ausserdem war der Serumbedarf dieser Zellen reduziert. Die transformierenden Eigenschaften des E2-Proteins waren von einer intakten Aktivierungsdomäne abhängig, so dass der transformierende Effekt möglicherweise auf einer transkriptionellen Fehlregulierung wichtiger Wachstumskontrollgene beruht (Fuchs *et al.*, 1993).

### 1.8.3 E6- und E7-Proteine

Die E6- und E7-Proteine von Papillomviren sind Onkoproteine, die durch ihre Interaktionen mit wirtskodierenden Tumorsuppressorproteinen verschiedene Zellzykluskontrollpunkte inaktivieren (Crook und Vousden, 1996). Untersuchungen des Expressionsmusters von mRNA in HPV-Tumoren ergaben, dass E6- und E7-Onkoproteine in allen Zellschichten verstärkt im Vergleich zu gutartigen Haut- oder Schleimhautproliferationen exprimiert werden. Eine erhöhte E6/E7-Expression wird als eine der Ursachen für die Entartung der Tumoren bei einer HPV-Infektion gesehen (Chow und Broker, 1997).

#### E6-Protein

Das E6-Protein von HPV16 allein kann menschliche Mammazellen immortalisieren (Band *et al.*, 1991), während für die Immortalisierung anderer menschlicher Zellen neben dem E6-Protein auch das E7-Protein vorhanden sein muss (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Hudson *et al.*, 1990; Münger *et al.*, 1989). Das E6-Protein der high-risk anogenitalen HPVs interagiert mit dem Tumorsuppressorprotein p53 (Werness *et al.*, 1990) und führt es dem Ubiquitin-abhängigen Abbau zu. Dabei bindet die Ubiquitinligase E6-AP (E6 associated protein) an E6. Dieser Komplex von E6 und E6-AP fungiert als Ubiquitin-Protein-Ligase bei der Degradation des p53 durch das Proteasom (Scheffner *et al.*, 1990, 1993). Dergestalt können p53-abhängige Regulationswege, z. B. die Einleitung von Apoptose, inhibiert werden. Der biologische Sinn könnte somit darin bestehen, Mechanismen, die in der Zelle bei unregulierter DNA-Synthese zum frühzeitigen Zelltod führen, zu unterbinden. Die Wechselwirkung von p53 mit dem E6-Protein ist der Hauptgrund für die genomische Instabilität von Zellen, die mit high-risk HPV-Typen infiziert sind (Thomas und Laimins, 1998). In der humanen Population ist das p53-Gen polymorph für die Aminosäure 72, die entweder Prolin oder Arginin sein kann. Besitzt das p53 an der Position 72 ein Arginin, so ist es verstärkt für eine Degradierung anfällig. Das Zervixkarzinom ist dann siebenmal häufiger anzutreffen (Storey *et al.*, 1998).

Die E6-Proteine der kutanen HPV-Typen interagieren nicht mit p53 oder E6-AP und können p53 nicht degradieren (Steger und Pfister, 1992; Elbel *et al.*, 1997). E6-Proteine der EV-assoziierten Typen 5, 8, 47 können Rattenfibroblasten transformieren, sind aber nicht in der Lage, humane Keratinozyten zu

immortalisieren (Iftner *et al.*, 1988; Kiyono *et al.*, 1989, 1992; Pfister, 1992; Schmitt *et al.*, 1994).

| Zelluläre Proteine                     | Funktion                    | genitale HPV                        | kutane HPV                           |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| p53                                    | Tumorsuppressor             | Werness <i>et al.</i> , 1990        | Nein. Steger und Pfister, 1992       |
| E6-AP                                  | Ubiquitin-Ligase            | Huibregtse <i>et al.</i> , 1991     | Nein. Elbel <i>et al.</i> , 1997     |
| E6BP / ERC-55                          | Kalzium-bindendes Protein   | Chen <i>et al.</i> , 1995           | -                                    |
| paxillin                               | Signaltransduktion          | Tong und Howley, 1997               | -                                    |
| hDLG                                   | Kontrolle der Zellpolarität | Kiyono <i>et al.</i> , 1997         | Nein. Kiyono <i>et al.</i> , 1997    |
| TAFs                                   | Transkriptionsfaktor        | Massimi <i>et al.</i> , 1997        | Ja. Enzenauer <i>et al.</i> , 1998   |
| TBP                                    | Transkriptionsfaktor        | Massimi <i>et al.</i> , 1997        | Ja. Enzenauer <i>et al.</i> , 1998   |
| c-myc                                  | Transkriptionfaktor         | Gross-Mesilaty <i>et al.</i> , 1998 | -                                    |
| hMcm7                                  | DNA-Replikation             | Kukimoto <i>et al.</i> , 1998       | -                                    |
| IRF-3                                  | Transkriptionsfaktor        | Ronco <i>et al.</i> , 1998          | -                                    |
| HMCM7                                  | Replikationsfaktor          | Kukimoto <i>et al.</i> , 1998       | -                                    |
| E6TP1                                  | GAP-Protein                 | Gao <i>et al.</i> , 1999            | -                                    |
| p300 / CBP                             | Transkriptions-Koaktivator  | Patel <i>et al.</i> , 1999          | Ja. Beckmann, 2001                   |
| MUPP-1                                 | Signaltransduktion          | Lee <i>et al.</i> , 2000            | -                                    |
| hScrib                                 | Kontrolle der Zellpolarität | Nakagawa und Huibregtse, 2000       | -                                    |
| p73                                    | Tumorsuppressor-Protein     | Park <i>et al.</i> , 2001           | -                                    |
| AMF-1 /Gps2                            | Transkriptions-Koaktivator  | Degenhardt und Silverstein, 2001    | Ja. Degenhardt und Silverstein, 2001 |
| zyxin                                  | Focal adhesion protein      | Degenhardt und Silverstein, 2001    | -                                    |
| MAGI-1,2,3                             | Signaltransduktion          | Thomas <i>et al.</i> , 2001         | -                                    |
| fibulin                                | Kalzium-bindendes Protein   | Du <i>et al.</i> , 2002             | -                                    |
| O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase | DNA-Reparatur               | Srivenugopal <i>et al.</i> , 2002   | -                                    |
| XRCC1                                  | DNA-Reparatur               | Iftner <i>et al.</i> , 2002         | Ja. Iftner <i>et al.</i> , 2002      |

**Abb.5: Tabellarische Übersicht der mit dem E6-Proteinen interagierender zellulärer Faktoren.** E6-Proteine genitaler HPVs binden die angegebenen Proteine, wohingegen die meisten Interaktionen für E6-Proteine kutaner HPVs nicht untersucht (-) worden sind.

### **E7-Protein**

Die onkogenen Eigenschaften des E7-Proteins wurden am besten bei Untersuchungen der genitalen HPV-Typen 16 und 18 aufgeklärt. Der E7-Leserahmen kodiert für ein Zinkfingerprotein, welches etwa 100 Aminosäuren umfasst und 11kD groß ist. Hauptsächlich ist es in den Kernen der infizierten Zellen lokalisiert, jedoch ist es auch in geringen Mengen im Zytoplasma zu finden (Smotkin und Wettstein, 1987). Das E7-Protein der high-risk anogenitalen HPV-Typen ist in der Lage, primäre Vorhautkeratinozyten zu immortalisieren (Halbert *et al.*, 1991). Es interagiert mit dem Retinoblastomprotein pRb (Dyson *et al.*, 1989) und führt zu dessen Abbau über das 26S-Proteasom (Berezutskaya und Bagchi, 1997). Auch das E7-Protein der low-risk-genitalen und der EV-HPV-Typen bindet an pRb, wobei die Affinität zu pRb aber deutlich niedriger ist (Iftner *et al.*, 1988; Kiyono *et al.*, 1989; Schmitt *et al.*, 1994). Das nach der Mitose dephosphorylierte pRb-Protein bindet den zellulären Transkriptionsfaktor E2F, inaktiviert diesen und verhindert dadurch den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Tritt das E7-Protein mit dem dephosphorylierten pRb in Wechselwirkung, kann pRb das E2F nicht mehr binden. Hierdurch wird die Transkription der Gene, die von E2F-abhängigen Promotoren kontrolliert werden, induziert (Armstrong und Roman, 1997). Die Folge ist eine unkontrollierte Zellteilung (Jones *et al.*, 1997). Die Aktivierung von E2F-abhängigen Genen erfolgt nicht nur in Zellen, die mit den high-risk-genitalen Typen infiziert sind, sondern auch in menschlichen Zellen mit den low-risk Typen 6 und 11 (Armstrong und Roman, 1997) und den kutanen Typen 5, 12, 14, 20, 21, 25 und 47 (Hiraiwa *et al.*, 1996). Von diesen getesteten kutanen HPV-Typen war nur HPV47 E7 in der Lage, Rattenfibroblasten zu transformieren (Hiraiwa *et al.*, 1996), was kürzlich auch für HPV8-E7 und HPV15-E7 gezeigt werden konnte (Roth, 2000; Krause, 2001). Da den E7-Proteinen der kutanen Papillomviren aufgrund der älteren Daten keine Beteiligung beim der Transformation nachgewiesen wurde, sind die möglichen zellulären Interaktionspartner kaum charakterisiert, sowie der Mechanismus der Zell-Transformation nicht untersucht worden.

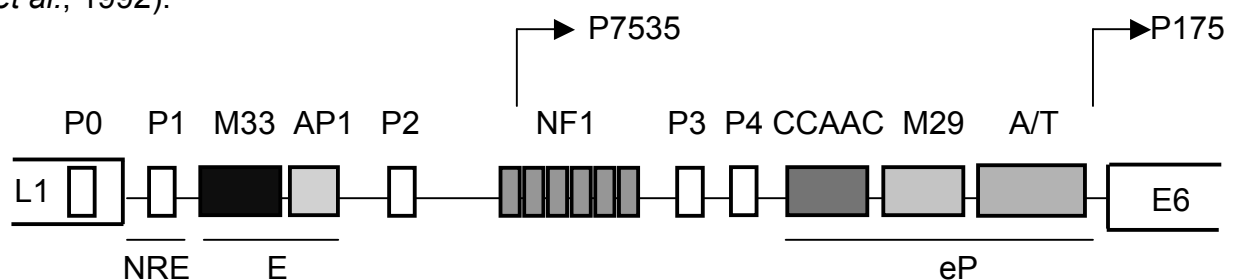
| Zelluläre Proteine    | Funktion                                      | genitale HPVs                         | kutane HPVs                        |
|-----------------------|---|---------------------------------------|------------------------------------|
| pRb,                  | Tumorsuppressorprotein                        | Münger <i>et al.</i> , 1989           | Ja. Schmitt <i>et al.</i> , 1994   |
| p107, p130            | pRb assoziierte Proteine                      | Dyson <i>et al.</i> , 1992            | -                                  |
| TBP                   | Transkriptionsfaktor                          | Mazzarelli <i>et al.</i> , 1995       | Ja. Enzenauer <i>et al.</i> , 1998 |
| TAF100                | Transkriptionsfaktor                          | Mazzarelli <i>et al.</i> , 1995       | Ja. Enzenauer <i>et al.</i> , 1998 |
| p27                   | CDK Inhibitor                                 | Zerfass-Thome <i>et al.</i> , 1996    | -                                  |
| AP-1                  | Transkriptionsfaktor                          | Antinore <i>et al.</i> , 1996         | -                                  |
| p21                   | CDK Inhibitor                                 | Funk <i>et al.</i> , 1997             | -                                  |
| S4                    | 26S Proteasom-Untereinheit                    | Berezutskaya und Bagchi, 1997         | -                                  |
| hTid                  | Tumorsuppressorprotein                        | Schilling <i>et al.</i> , 1998        | -                                  |
| p48                   | Komponente des Transkriptions-Komplexes ISGF3 | Barnard und McMillan, 1999            | -                                  |
| MPP2                  | Transkriptionsfaktor                          | Luscher-Firzlaff <i>et al.</i> , 1999 | -                                  |
| Mi2 $\beta$ (HDAC)    | Komponente des Histon-Acetylase-Komplexes     | Brehm <i>et al.</i> , 1999            | -                                  |
| M2PK                  | Pyruvatkinase                                 | Zwerschke <i>et al.</i> , 1999        | -                                  |
| IGFBP-3               | Insulin like growth factor binding protein-3  | Mannhardt <i>et al.</i> , 2000        | -                                  |
| $\alpha$ -Glucosidase | Glykogen abbauendes Enzym                     | Zwerschke <i>et al.</i> , 2000        | -                                  |
| F-actin               | Komponente des Zytoskeletts                   | Rey <i>et al.</i> , 2000              | -                                  |
| TAP-1                 | Peptidtransport                               | Vambutos <i>et al.</i> , 2001         | -                                  |
| Skip                  | Transkriptionsfaktor                          | Prathapam <i>et al.</i> , 2001        | Marcuzzi, 2002                     |
| Ribosomal Proteins    | Ribosomenaufbau                               | Tomassino, persönliche Mitteilung     | Marcuzzi, 2002                     |
| eEF-1 $\alpha$        | Translationsinitiator                         | Storey, persönliche Mitteilung        | Marcuzzi, 2002                     |

**Abb.6: Tabellarische Übersicht der mit dem E7-Proteinen interagierender zellulärer Faktoren.** E7-Proteine genitaler HPVs binden die angegebenen Proteine, wohingegen die meisten Interaktionen für E7-Proteine kutaner HPVs nicht untersucht (-) worden sind.



### 1.9 Nicht-kodierende Region (NCR) EV-assoziiierter HPVs

Die NCR von Papillomviren ist ein genomisches Segment ohne offene Leserahmen und befindet sich zwischen dem L1- und dem E6-Leserahmen. Sie enthält eine große Anzahl von *cis*-regulatorischen Sequenzelementen, die die Genexpression und Replikation des Virusgenoms steuern. In Abb.7 ist der Aufbau der NCR des EV-assoziierten HPV8 gezeigt. Die NCR EV-assoziiierter HPVs ist mit ca. 400 bp halb so lang wie die der anderen HPV-Typen (Fuchs *et al.*, 1986; Krubke *et al.*, 1987). Auch die Organisation der NCR unterscheidet sich, ist aber unter den EV-assoziierten Viren hoch konserviert (Ensser und Pfister, 1990; Iftner, 1990). Sie enthält zusätzlich zu den allgemein bei Papillomviren vorkommenden Sequenzelementen (Bindestellen für E2, AP1, NF1, YY1) die aus 29 bzw. 33 Nukleotiden bestehenden hochkonservierten Sequenzmotive M29 und M33 sowie eine CCAAC-Box und eine lange A/T-reiche Region. Ebenfalls charakteristisch für die Gruppe der EV-assoziierten Viren ist die Anordnung der Palindrome P0 bis P4, die Bindestellen für das virale E2-Protein darstellen, sowie eine Anhäufung von NF1-Bindestellen zwischen P2 und P3 (Ensser und Pfister, 1990). In der NCR befinden sich zwei Promotoren, die nach den Positionen der entsprechenden mRNA-cap-Stellen als P<sub>7535</sub> und P<sub>175</sub> bezeichnet wurden (Stubenrauch *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1993). P<sub>175</sub> stellt vermutlich den Promotor des E6-Onkogens dar, wohingegen vom späten Promotor P<sub>7535</sub> mRNAs initiiert werden, die nach unterschiedlichem Spleissen am NCR-internen Spleiß-Donor (SD) für die Kapsidproteine L1 und L2 oder das Transaktivatorprotein E2 kodieren (Stubenrauch *et al.*, 1992).



**Abb. 7: Funktionelle Sequenzelemente in der NCR von HPV 8 mit den angrenzenden Leserahmen E6 und L1.** E: Enhancer; eP: früher Promotor; P<sub>7535</sub>: mRNA-cap-Stelle des späten Promotors; P<sub>175</sub>: mRNA-cap-Stelle des frühen Promotors; NRE: negativ regulierendes Element des späten Promotors; SD: Spleiß-Donor; AP1: Bindestelle für den zellulären Faktor AP1; NF1: Bindestellen für den zellulären Transkriptionsfaktor NF1; M33, M29, CCAAC, A/T: bei EV-Viren konservierte Sequenzmotive (modifiziert nach May *et al.*, 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass das M33-Motiv in Verbindung mit der proximalen AP1-Bindestelle ein konstitutiver Enhancer des späten Promotors ist (Horn *et al.*, 1993). Stromaufwärts des späten Promotors P<sub>7535</sub> befindet sich ein negativ regulierendes Element (NRE) aus 38 bp, welches mit der E2-Bindestelle P1 überlappt und den späten Promotor reprimiert (May *et al.*, 1994). Weiterhin wirken M29 und bei Bindung von E2 auch das P2-Palindrom negativ auf den späten Promotor (Stubenrauch und Pfister, 1994).

### 1.10 UV-Licht

Nicht alle Strahlen der Sonne treffen auf die Erdoberfläche. Die Ozonschicht der Atmosphäre durchdringen die wärmespendende Infrarotstrahlung, das sichtbare Licht und die langwellige ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung). Zwar machen die UV-Strahlen nur sechs Prozent der auf der Erde auftreffenden Sonnenstrahlung aus, trotzdem reichen sie aus, um die Haut zu belasten. Innerhalb des ultravioletten Bereiches werden drei Klassen von Strahlen unterschieden, wobei jeder Bereich unterschiedliche biologische und physikalische Eigenschaften besitzt (Shea und Parrish, 1991). Das UV-C-Licht ist mit 200 bis 280 nm der kurzwelligste und energiereichste Bereich des ultravioletten Lichtes. UV-C-Licht ist sehr aggressiv und für alle Lebewesen gefährlich. Bei intakter Ozonschicht wird dieser Bereich des ultravioletten Lichtes aus dem Strahlenspektrum der Sonne herausgefiltert, bevor es auf die Erdoberfläche trifft. Die langwelligeren UV-A-Strahlen liegen in einem Wellenlängenbereich von 320 bis 400 nm und sind Hauptbestandteil des UV-Lichtes. Zwar gelten die UV-A-Strahlen als weitgehend unschädlich, aber ihr mutagenes Potential konnte in Bestrahlungsexperimenten mit Mäusen und Fischen nachgewiesen werden (Sternborg und van der Leun, 1990; Setlow *et al.*, 1993). Das energiereichste UV-B-Licht mit einer Wellenlänge von 280 bis 320 nm macht nur ein Zehntel der UV-Strahlung aus, schädigt die Haut aber stark. Epidemiologische und experimentelle Studien konnten belegen, dass UV-B ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von Hautkrebs ist (Brash *et al.*, 1991; de Gruij und Forbes, 1995; Nataraj *et al.*, 1995).

Als entscheidender Auslöser der Photokarzinogenese gelten mutagene Schädigungen von Nukleinsäuren durch UV-B-Strahlung. Die Basen der Nukleinsäuren sind die Chromophore, welche die Energie der UV-B-Strahlung

aufnehmen und chemisch modifiziert werden. Die häufigsten Produkte dieser Energieabsorption sind Folge von Reaktionen zwischen benachbarten Pyrimidinen, bevorzugt zwischen benachbarten Thyminresten. Das Thymin-Dimer ist kovalent über einen Cyclobutan-Ring verbunden und ist in etwa 85% aller Primärläsionen UV-exponierter Haut zu finden (Livneh *et al.*, 1993). Seltener tritt das sogenannte TC(6-4)-Produkt, ein (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukt auf (D'Errico *et al.*, 1996). Dem TC(6-4)-Photoprodukt kommt im Vergleich zum Thymin-Dimer das größere mutagene Potential bei der Entstehung von Tumoren zu (Brash *et al.*, 1996). Den UV-induzierten Mutationen gemein ist die Brückenbildung zwischen und innerhalb von DNA-Strängen, was häufig eine C  $\rightarrow$  T oder eine CC  $\rightarrow$  TT Transition zur Folge hat. Betroffene DNA-Abschnitte können ohne eine Korrektur bei der Replikation der DNA nicht mehr korrekt abgelesen werden. Das Überleben der Zelle nach UV-B induzierter DNA-Schädigung hängt von einem subtilen Zusammenspiel mehrerer Reparaturmechanismen ab.

Liegen mutierte DNA-Sequenzen in aktiven DNA-Abschnitten und insbesondere in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen (Gene, welche das Zellwachstum positiv oder negativ beeinflussen können), kann unter Umständen eine maligne Transformation der betroffenen Zelle die Folge sein (Ananthaswamy und Pierceall, 1990). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das p53-Gen in 60 bis 75% der aktinischen Keratosen, ca. 50% der Basaliome und in mehr als 90% der kutanen Plattenepithelkarzinome mutiert ist (Ziegler *et al.*, 1993). Das Basenaustauschmuster wurde nicht bei p53-Mutationen von Malignomen innerer Organe gefunden, was die Existenz UV-spezifischer DNA-Mutationen nahelegt (Brash *et al.*, 1991; 1996).

### **1.11 Akkumulation von p53 in Keratinozyten nach UV-Bestrahlung**

Die zellulären Reaktionen nach UV-Bestrahlung werden als UV-Antwort (UV response) bezeichnet (Bender *et al.*, 1997). Auf die durch UV-Strahlung gesetzten Schäden reagiert die Zelle aktiv, d.h. über bestimmte Signaltransduktionswege und Aktivierung der Transkription wird die de-novo-Synthese bestimmter Proteine initiiert. Funktionen dieser UV-Antwort dienen dem Schutz der Zelle vor den Auswirkungen von DNA-Schäden. Im Zellkern wird p53 als Sensor für strahleninduzierte DNA-Schäden angesehen (Giaccia und Kastan, 1997; Szumiel,

1998). Im Normalfall liegt das p53-Protein wegen seiner kurzen Halbwertszeit (ca. 30 min.) nur in sehr geringen Konzentrationen in den Zellen vor (Ko und Prives, 1996). Nach UV-Bestrahlung lösen im Zellkern DNA-Schäden eine Signalkaskade aus, die zur Akkumulation des p53 Proteins führt (Hall *et al.*, 1991; Kastan *et al.*, 1991). Die Steigerung der p53-Konzentration resultiert aus einer drastischen Erhöhung der Halbwertszeit des Proteins. So konnte nach einer Bestrahlung von primären Keratinozyten mit physiologischen UV-B-Dosen (8 und 16 mJ/cm<sup>2</sup>) eine Steigerung der p53-Konzentration nach 5 Stunden detektiert werden, die auch noch nach 24 Stunden vorhanden war. Die Halbwertszeit des Proteins betrug dann ca. 200 min (Decraene *et al.*, 2001).

Die Akkumulation des p53-Proteins nach UV-Bestrahlung in primären Keratinozyten *in vitro* stimmt mit der Situation in menschlicher Haut *in vivo* überein. In unbestrahlter Haut ist das p53 nicht nachweisbar. Wird die Haut dem UV-Licht ausgesetzt, akkumuliert p53 in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis und in den Fibroblasten der Dermis. Es ist schon 2 Stunden nach Bestrahlung nachweisbar, erreicht die höchste Konzentration nach 24 Stunden und nach ca. 360 Stunden wieder den Basalspiegel (Hall *et al.*, 1993).

### 1.12 Das p53-Protein

Das p53-Protein wurde erstmals 1979 auf Grund der Eigenschaft beschrieben, dass es mit dem transformierenden SV40-Tumorantigen Komplexe bildet (Lane und Crawford, 1979). Das humane p53-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13) lokalisiert und kodiert für ein multifunktionales, nukleäres Phosphoprotein, das an Prozessen der Signaltransduktion, der Regulation des Wachstums, der DNA-Replikation und -Reparatur, sowie bei der Steuerung der Apoptose beteiligt ist. Unter den bekannten Tumorsuppressoren nimmt p53 eine herausragende Rolle ein, da es in ca. 50 bis 60% aller menschlichen Tumoren genetisch verändert ist.

Das native p53-Protein ist phosphoryliert und im Zellkern lokalisiert, wo es sich zu Tetrameren zusammenlagert. Es lassen sich mindestens drei funktionelle Domänen unterscheiden, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden. Die ersten 42 Aminosäuren stellen die Domäne der transkriptionalen Transaktivierung dar (Fields und Jang, 1990). Eine spezifische DNA-

Bindungsdomäne (AS 102-292) ist im mittleren Teil des Proteins lokalisiert (Kern *et al.*, 1991). Für die Transkriptionsaktivierung muss das p53-Protein als Tetramer sequenzspezifisch an das zweimal vorkommende DNA-Motiv 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' binden (El-Deiry *et al.*, 1992). Bemerkenswert ist, dass Mutationen, die in menschlichen Tumoren gefunden werden, überwiegend die DNA-Bindungsdomäne betreffen (Walker *et al.*, 1999). Mutationen innerhalb dieses zentralen Abschnitts des Proteins können Konformation und Stabilität des p53-Proteins entscheidend verändern und zu einer schlechteren Bindungsfähigkeit von p53 an die DNA führen. Das C-terminale Ende (AS 324-355) wurde bisher als unspezifische DNA-Bindungsdomäne angesehen, in dem auch die Domäne für die Tetramerisierung lokalisiert ist (Stürzbecher *et al.*, 1992).

Funktionen von p53 lassen sich am besten in geschädigten oder gestressten Zellen nachweisen. Das aktivierte p53 kann Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretieren, um eine Reparatur von DNA-Schäden vor der DNA-Replikation zu erlauben (Lane, 1992). Dies geschieht dadurch, dass p53 die Transkription des WAF1 (wild type p53 activated fragment) Gens stimuliert, dessen Genprodukt p21 die Funktion Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs) inhibiert, die über Phosphorylierung den Übergang zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen steuern (El-Deiry *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994). Das p53-Protein fördert außerdem die Synthese des GADD45 (GADD: Growth Arrest and DNA Damage) Proteins, das wiederum das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) bindet, welches an der DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt ist (Smith *et al.*, 1994). In vielen Tumoren ist eine Veränderung des p53-Gens die Ursache für die unkontrollierte Proliferation der Zellen (Hollstein *et al.*, 1994).

Ist eine Reparatur von DNA-Schäden nicht möglich, führt alternativ die Apoptose, der programmierte Zelltod, zur Elimination der geschädigten Zelle (Canman und Kastan, 1996). Hierbei unterdrückt p53 die Synthese des Apoptose inhibierenden Proteins Bcl-2 und fördert durch sequenzspezifische Transkriptionsaktivierung die Synthese des Apoptose fördernden Proteins Bax. Bax hemmt durch die Komplexbildung mit Bcl-2-Monomeren den blockierenden Effekt des Bcl-2 Onkoproteins auf die Apoptose (Chao und Korsmeyer, 1998).

Weit mehr Informationen hat man zur Interaktion des p53 mit dem Mdm2-Protein. Die erhöhte p53-Konzentration führt zu einer Konzentrationserhöhung des Mdm2 Proteins, das sowohl über negative Rückkopplung (Fuchs *et al.*, 1998), als auch

über eine direkte Bindung an den N-Terminus von p53 dessen Degradierung einleitet (Piette *et al.*, 1997). Nach DNA-Schädigung hingegen wird p53 an seinem N-Terminus phosphoryliert (Siliciano *et al.*, 1997), wodurch die Bindungsaffinität des Proteins zu Mdm2 abnimmt (Shieh *et al.*, 1997).

## 1. 13 Zielsetzung

Bei humanen Papillomviren sind die funktionellen *ori*-Elemente für die genitalen HPV-Typen 11 (Sun *et al.*, 1996), 16 (Del Vecchio *et al.*, 1992), 18 (Lee *et al.*, 1997) und 31b (Frattini und Laimins, 1994) charakterisiert worden. Alle untersuchten Fragmente liegen im E6-ORF-proximalen Bereich der NCR, weisen einen hohen A/T-Gehalt auf und enthalten eine E1- und mindestens eine E2-Erkennungssequenz (Holt und Wilson, 1995). Im Hinblick auf die genetische und biologische Besonderheit EV-assoziiierter HPVs sollte das minimale, für die Replikation der viralen DNA notwendige *ori*-Element von HPV8 charakterisiert werden. In meiner Diplomarbeit konnte der *ori* schon bis auf die Sequenzelemente P4-CCAAC-M29 eingeschränkt werden (Akgül, 1999). Nun sollte die Rolle dieser Einzelmotive für die DNA-Replikation genauer ermittelt werden.

Bei der Suche nach M29 bindenden zellulären Faktoren wurde in Hefe-One-Hybrid-Experimenten das Tumorsuppressorprotein p53 als ein möglicher M29 bindender Faktor identifiziert (Haigis, 1998). Das M29-Sequenzmotiv von HPV8 stellt zugleich auch ein Kernelement des frühen Promotors P<sub>175</sub> von HPV8 dar (Stubenrauch *et al.*, 1992; Pajunk *et al.*, 1997). Zunächst sollte in Band-Shift-Experimenten die Bindung von p53 an M29 bestätigt und die Funktion von p53 bei der Regulierung des frühen Promotors ermittelt werden.

Charakteristischerweise beobachtet man bei EV-Patienten die Entwicklung maligner Tumore meist an sonnenexponierten Körperteilen (Majewski und Jablonska, 1994). Es ist bekannt, dass UV-Licht an der Entstehung von NMSC beteiligt ist (Kiviat, 1999). Wenig bekannt ist dagegen, welche Rolle die Infektion mit kutanen HPV-Typen bei der Entwicklung von NMSC spielt. Bisher ist der Zusammenhang zwischen UV-Licht, HPV-Infektion und der Entwicklung vom NMSC kaum untersucht worden. Es wird in diesem Zusammenhang angenommen, dass das UV-Licht HPV-Promotoraktivität in der Haut stimuliert, so dass es zur Überexpression der viralen Onkogene kommt, was zur Progression benigner Läsionen beiträgt. Diese Hypothese konnte kürzlich durch die Entdeckung eines UV-responsiven Kontrollelements im frühen Promotor des kutanen, aber nicht-EV-assoziierten HPV77 erhärtet werden (Purdie *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass das Tumorsuppressorprotein p53 an dieses Kontrollelement bindet und für die UV-vermittelte Promotoraktivierung verantwortlich ist. In Anbetracht dieser Tatsache

war herauszufinden, ob UV-Strahlung einen Einfluss auf die Promotor-Aktivitäten von HPV8 hat. Hierzu sollten verschiedene NCR-Reporter-Testkonstrukte in primäre Keratinozyten transfiziert, diese Zellen anschließend mit UV-Licht definierter Wellenlänge bestrahlt und auf Promotoraktivität untersucht werden. Um festzustellen, ob die bei HPV8 beobachteten Effekte für EV-Viren repräsentativ sind, bestand auch die Aufgabe HPV5, 9, 14, 23, 24 und 25 in UV-Experimenten zu untersuchen.

Die für die genitalen high-risk HPV-Typen demonstrierte onkogene Wirkung wird auf die E6- und E7-Proteine dieser Typen zurückgeführt. Die bisherigen Daten zur onkogenen Wirkung der HPV8-*early*-Proteine wurden in Nagetierzellen ermittelt. Um das zelltransformierende Potential des HPV8 in Keratinozyten zu untersuchen, sollten unter Verwendung rekombinanter Retroviren, die für E2, E6, E7 und E6/E7 kodieren, primäre humane Hautkeratinozyten infiziert und danach in *in-vitro*-Hautorgan-Modellen (organotypische raft-Kulturen) hinsichtlich der Effekte einer Überexpression auf die Keratinozyten-Differenzierung und -Morphologie untersucht werden.



## II. MATERIAL

### 2.1 Bakterien

**Epicurian Coli XL2-Blue Ultracompetent Cells** (Stratagene, Heidelberg): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lac*<sup>q</sup> Z\_M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>].

**Epurian Coli BL21-Codon Plus (DE3)-RIL** (Stratagene, Heidelberg): F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *dcm Tet<sup>r</sup> gal*[(DE3) *endA Hte* [*argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>*].

### 2.2 Eukaryonte Zellen

#### RTS3b

Eine humane, HPV-negative Keratinozytenlinie, die aus einem Hautkarzinom eines Nierentransplantatempfängers etabliert wurde (Purdie *et al.*, 1993).

#### PT67

Eine von NIH3T3 abgeleitete Fibroblastenzelllinie zur Herstellung von infektiösen, nichtreplikationsfähigen Retroviren. PT67-Zellen enthalten die *gag*-, *pol*- und *env*-Gene des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MoMuLV) stabil in ihr Genom integriert. Das *env*-Gen ist vom Typ 10A1 abgeleitet und kodiert für zwei Oberflächenproteine, die an die amphotrophischen zellulären Rezeptoren RAM1 und GALV anbinden können (Miller und Chen, 1996). Die Transfektion mit einem Expressionsvektor, der das retrovirale Verpackungssignal  $\Psi^+$ , sowie das zu untersuchende Fremdgen und einen Selektionsmarker enthält, erlaubt die Produktion von infektiösen, nichtreplikationsfähigen Viren (Retro-X<sup>TM</sup> System, Clontech, Palo Alto).

### **Swiss3T3**

Embryonale Mäusefibroblasten , die als „feeder“-Zellen für die Kultivierung primärer Keratinozyten benutzt wurden (Rheinwald und Green, 1975).

### **High Five Insektenzellen**

Eine aus *Trichoplusia ni* etablierte Insektenzelllinie (Invitrogen, Groningen).

## **2.3 Patientenmaterial**

### **Operationsgewebe**

Im Rahmen einer routinemäßig durchgeführten Schönheitsoperation entfernter Bauchlappen einer im Dezember 1962 geborenen Patientin diente zur Isolierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten.

### **Spenderhaut**

Spenderhaut, bestehend aus Dermis und Epidermis (European Skin Bank, Beverwijk, Niederlande) wurde zur Konstruktion von „raft“-Kulturen verwendet.

## **2.4 Medien**

### **2.4.1 Medien für die Bakterienkultur**

LB-Broth Base (Fertigmedium)

GibcoBRL (Eggenstein)

LB-Agar (Fertigmedium)

GibcoBRL (Eggenstein)

### 2.4.2 Medien für die Zellkultur

|   |                       |
|---|-----------------------|
| DMEM-Glutamax                             | GibcoBRL (Eggenstein) |
| DMEM/F12 (1:1)-Glutamax                   | GibcoBRL (Eggenstein) |
| Trypsin/EDTA-Lösung                       | GibcoBRL (Eggenstein) |
| PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)      | GibcoBRL (Eggenstein) |
| bereits inaktiviertes fötales Kälberserum | GibcoBRL (Eggenstein) |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung            | GibcoBRL (Eggenstein) |

### Keratinocytenmedium

Das Medium für die Kultivierung von Keratinocyten wurde aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

|                                   |                        |
|-----------------------------------|------------------------|
| DMEM                              | 45%                    |
| DMEM / Nut Mix F12 (1:1)-Glutamax | 45%                    |
| FKS                               | 10%                    |
| Penicillin-Streptomycin           | 0,01%                  |
| Hydrokortison                     | 0,4 $\mu$ g/ml         |
| Choleratoxin                      | $10^{-10}$ M           |
| Transferrin                       | 5 $\mu$ g/ml           |
| Triiodothyronin                   | $2 \times 10^{-11}$ M  |
| Adenin                            | $1,8 \times 10^{-4}$ M |
| Insulin                           | 5 $\mu$ g/ml           |
| Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) | 10 ng/ml               |

## **2.5 Nukleinsäuren**

### **2.5.1 Plasmide**

#### **Klonierungsvektoren**

##### **pUC8**

Ein universeller Klonierungsvektor mit einer multiplen Klonierungsstelle (Yanisch-Perrom *et al.*, 1985).

##### **pCMV1**

Dieser Klonierungsvektor enthält eine multiple Klonierungsstelle, den CMV-Promotor und den origin of replication von SV40. Er wurde zum Auffüllen von Transfektionsansätzen auf vergleichbare Gesamt-DNA-Mengen verwendet (GibcoBRL, Eggenstein).

##### **pGEX2T**

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

##### **pALuc**

Ein Promortestplasmid mit dem Luciferasegen aus *Photinus pyralis*. Das Vektor-Rückgrat aus pBL-CAT6 wurde mit dem Luciferase/SV40 t-Intron und der SV40 Polyadenylierungskassette aus p19Luc kombiniert (Dong *et al.*, 1994b).

##### **pCB6**

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

### Replikations-Testkonstrukte

#### **p85**

Ein Replikationstestplasmid, bei dem die Nukleotide 13 bis 118 von HPV8 in die *Sma*I Schnittstelle des Vektors pUC8 eingefügt wurden (Akgül, 1999).

#### **p88**

Ein Plasmid, welches die HPV8-Sequenz von Position 13 bis 118 in dem Vektors pUC8 enthält.

#### **p88E2mut**

In dem Plasmid p88 wurde durch ortsspezifische Mutagenese mit den Primern M29E2mut die E2-Bindestelle mutiert.

### Luciferase-Testkonstrukte

#### **pNCR8-Luc**

Die HPV8-NCR und Teile der flankierenden L1- und E6-Leserahmen wurden als *Hind*III/*Bgl*II Fragment aus dem Plasmid pNCR8-CAT (Stubenrauch *et al.*, 1992) in die *Hind*III/*Bam*HI-Schnittstellen des Plasmids pALuc kloniert (Lemme, 1998).

#### **pNCR8-Luc $\Delta$ CCAAC, pNCR8-Luc $\Delta$ M29, pNCR8-Luc $\Delta$ A/T**

Von pNCR8-Luc abgeleitete Vektoren, bei denen mittels PCR das CCAAC-Motiv (Nukleotide 50-79), das M29-Element (Nukleotide 84-112), und die A/T-Region (Nukleotide 119-167) deletiert wurden (Müller, A., unveröffentlicht).

#### **pNCR8-3'-Luc**

Dieses Konstrukt enthält die 3'-Hälfte der HPV8 NCR (Nukleotide 10 bis 558) in pALuc. Proximal zu dieser Promotor/Reporter Kassette wurde das M33/AP1 Motiv als Dimer kloniert (Hoberg, 2000).

**pNCR5-Luc,pNCR9-Luc,pNCR14-Luc,pNCR23-Luc, pNCR24-Luc, pNCR25-Luc**

Die NCR Region und Teile der L1- und E6-Leserahmen von HPV5 (nt. 7145-568), HPV9 (nt. 6959-550), HPV14 (nt. 6837-615), HPV23 (nt. 6859-557), HPV24 (nt. 6948-508) und HPV25 (nt. 7121-559) wurden jeweils in den Vektor pALuc kloniert (Lemme, 1998).

**Expressionsvektoren****pCE1**

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

**pCE2**

Ein eukaryonter Expressionsvektor, der den E2-Leserahmen von HPV8 als *Bcl*I/*Bg*II Fragment (Nukleotide: 2686-4222) in der *Bg*II Schnittstelle des Plasmids pCB6 aufweist (Stubenrauch *et al.*, 1994).

**pCp53 wt**

Dieses Plasmid ist von pCMV-NEO-BAM abgeleitet und trägt die 1,8 kb lange, humane *p53* cDNA, die die Nukleotide 66-1794 umfaßt (Nigro *et al.*, 1989).

**pCp53<sub>175</sub>**

pCp53<sub>175</sub> ist von pCp53wt abgeleitet und trägt eine Mutation als Aminosäureaustausch an Position 175 der *p53* Sequenz, wobei ein Arginin durch ein Histidin ersetzt wurde (Nigro *et al.*, 1989).

**pSP65p53**

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

**pCMV- $\beta$ -Gal**

Das Plasmid pCMV- $\beta$ -Gal ist ein Expressionsvektor, der die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens von *E.coli* unter der Kontrolle des CMV-Promoters in eukaryontischen Zellen ermöglicht (Clontech, Palo Alto).

**pLXSN**

Dieser ca. 5,9 kb umfassende eukaryontische, retrovirale Expressionsvektor enthält Elemente des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MoMuLV) und des Moloney-Murine-Sarcoma-Virus (MoMuSV). Über die 5'LTR des MoMuLV, die Promotor- und Enhancer-Sequenzen umfasst, wird die Expression des Gens in der MCS und des viralen Verpackungssignals  $\Psi^+$ , das vor der MCS liegt, kontrolliert. Der frühe SV40-Promotor ( $P_{SV40e}$ ) überwacht die Expression des Neomycin-Resistenzgens ( $Neo^r$ ) für die Selektion in eukaryonten Zellen. Für die Replikation und Selektion in Bakterien beinhaltet der pLXSN-Vektor den bakteriellen DNA-Replikationsursprung aus dem „col E1“-Typ und ebenso das *E.coli* Ampicillin-Resistenzgen.

**pLXSN-8-E2, -E6, -E7**

Auf pLXSN basierende retrovirale Expressionsvektoren, die die offenen Leserahmen von HPV8-E2 (nt. 2680-4230), -E6 (nt. 168-188) und -E7 (nt. 623-986) aus dem Vektor pVE34 (Steger *et al.*, 1990) über die *EcoRI* und *BamHI* Schnittstellen der MCS integriert haben (Roth, 1999).

**pLXSN-8-E6/E7**

Auf pLXSN basierende retrovirale Expressionsvektoren, die die offenen Leserahmen von HPV8 E6 und E7 (nt. 160-1023) aus dem Vektor pVE34 (Steger *et al.*, 1990) integriert hat (Schaper, 2003).

## 2.5.2 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Sämtliche HPLC-gereinigte Oligonukleotide wurden bei der Firma Interactiva (Ulm) synthetisiert. Die Nukleotidangaben (nt.) beziehen sich bei HPV Nukleotiden auf das Nummerierungssystem von HPV8 (Fuchs *et al.*, 1986). Angegeben ist jeweils die Sequenz des sense-Oligonukleotids. Einzelnukleotide, die von der Wildtypsequenz abweichen, sind unterstrichen.

### Oligonukleotide für Gel-Retardations-Experimente

| <u>Name</u> | <u>Nukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung</u> | <u>Position<br/>(nt.)</u> |
|-------------|---|---------------------------|
| M29com      | CTATAGCATGTTTTGCCTGTATCGTTTTCGATCAC<br>ACCA | 76-118                    |
| M29E2       | GCCTGTATCGTTTTCGATCACACC                    | 94-117                    |
| M29E2mut    | TTTGCCTGTCTGGTTTTCGATCACACCATA              | 91-120                    |
| P2C         | AACCGACCGCAAACGGTACATAAAGGTGAGT             | 7486-7516                 |
| p53-c       | TACAGAATCGCTCTAAGTCGCCTGGGG                 |                           |
| p53+c       | TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGG                 |                           |

### Oligonukleotide für die *in vitro*-Mutagenese

| <u>Name</u> | <u>Nukleotidsequenz in 5' → 3' Richtung</u> | <u>Position<br/>(nt.)</u> |
|-------------|---|---------------------------|
| Ori-1       | CTTAATCATGGGCCCTTATTGCCAAC                  | 44-69                     |
| Ori-2       | CTTAATCATAAGTTCCCGGGGCCAACAACC              | 44-73                     |
| Ori-3       | CATAAGTTGTTATGGGCCCAACCATC                  | 50-76                     |
| Ori-4       | GTTATTGCCACCCGGGATCGTCTATAGC                | 58-85                     |
| Ori-5       | GCCAACAACGGGCCCTATAGCATG                    | 64-88                     |
| Ori-6       | CAACCATCGCCCGGGGCATGTTTTTGCC                | 69-96                     |
| Ori-7       | CCATCGTCTATGGGCCCTTTTTGCCTG                 | 72-98                     |
| Ori8        | CGTCTATAGCATCCCGGGGCCTGTATCG                | 76-103                    |



---

|          |                                    |        |
|----------|------------------------------------|--------|
| Ori-9    | GCATGTTTTGGGCCCTATCGTTTTTCG        | 84-109 |
| Ori-10   | GCATGTTTTGCCTCCCGGGTTTTTCGATCAC    | 84-114 |
| Ori-11   | GCCTGTATCGGGCCCGATCACACCATATTG     | 94-123 |
| Ori-12   | GCCTGTATCGTTTTCCCGGGCACCATATTG     | 94-123 |
| p53mut   | CCATCGTCTATAGTCGCTTTTTGCCTGTATCG   | 72-104 |
| M29E2mut | GCATGTTTTGCCTGTCTGGTTTTTCGATCACACC | 84-117 |

### **Sequenzierungsprimer**

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| pLXSN-5' | CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC    |
| pLXSN-3' | GAG CCT GGG GAC TTT CCA CAC CC    |
| pALuc-5' | GTATCTTATCATGTCTGGATCTCG          |
| pALuc-3' | GCGGTTCCATCCTCTAGAGGATAGAATGGCGCC |

### **2.5.3 Sonstige natürliche Nukleinsäuren**

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Heringssperma<br>(sonificated salmon sperm DNA) | GibcoBRL (Eggenstein) |
| Hefe-t-RNA                                      | GibcoBRL (Eggenstein) |
| Poly dl/dC                                      | GibcoBRL (Eggenstein) |

### **2.6 Enzyme**

Alle für diese Arbeit relevanten Enzyme wurden bei folgenden Firmen erworben: Roche (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), New England Biolabs (Schwalbach), Promega (Madison, USA) und Stratagene (Heidelberg).

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Antikörper für die Immunhistochemie

| Primärantikörper                          | Antigen    | Verdünnung | Aufschluss               | Referenz                                  |
|---|------------|------------|--------------------------|---|
| <b>LHK1</b><br>Maus, monoklonal           | Keratin 1  | Überstand  | Zitratpuffer<br>(90' RT) | CR-UK<br>Machesney <i>et al.</i> , 1998   |
| <b>LHK6</b><br>Maus, monoklonal           | Keratin 6  | Überstand  | Zitratpuffer<br>(90' RT) | CR-UK<br>Machesney <i>et al.</i> , 1998   |
| <b>LHP1</b><br>Maus, monoklonal           | Keratin 10 | Überstand  | Zitratpuffer<br>(90' RT) | CR-UK<br>Leigh <i>et al.</i> , 1993       |
| <b>LLO25</b><br>Maus, monoklonal          | Keratin 16 | Überstand  | Zitratpuffer<br>(90' RT) | CR-UK<br>Lane, 1991                       |
| <b>E3</b><br>Maus, monoklonal             | Keratin 17 | 1:200      | Zitratpuffer<br>(90' RT) | CR-UK<br>Guelstein <i>et al.</i> , 1988   |
| <b>MMP-1 (Ab-1)</b><br>Maus, monoklonal   | MMP-1      | 1:100      | Zitratpuffer<br>(90' RT) | Oncogene<br>Zhang <i>et al.</i> , 1993    |
| <b>MMP-8 (C20)</b><br>Ziege, polyklonal   | MMP-8      | 1:100      | Zitratpuffer<br>(90' RT) | Santa Cruz<br>Balbin <i>et al.</i> , 1998 |
| <b>MT1-MMP (Ab 4)</b><br>Maus, monoklonal | MT1-MMP    | 1:100      | Zitratpuffer<br>(90' RT) | Oncogene<br>Sato <i>et al.</i> , 1994     |
| <b>LH7.2</b><br>Maus, monoklonal          | Kollagen 7 | Überstand  | 15' Prot.K<br>(90' RT)   | CR-UK<br>Leigh <i>et al.</i> , 1987       |

### 2.7.2 Antikörper für die Western-Blot-Analyse

#### **DO-1** (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz)

Ein monoklonaler, in Mäusen hergestellter Antikörper, der das humane p53-Protein spezifisch erkennt.

#### **Anti-Maus IgG** (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz)

Ein polyklonaler mit Peroxidase gekoppelter Antikörper, der gegen das IgG der Maus in Ziegen erzeugt wurde.

**pAb421**

Ein monoklonaler p53-Antikörper, der im C-terminalen Bereich des humanen p53-Proteins bindet (AA: 370-378) und die spezifische DNA-Bindung aktiviert (Helander *et al.*, 1993).

**2.8 Reagenziensysteme**

|  |                                    |
|--|------------------------------------|
| Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit    | Stratagene (Heidelberg)            |
| Lumi-Light Western Blotting Substrate        | Roche (Mannheim)                   |
| QIA prep 8 Miniprep Kit                      | Qiagen (Hilden)                    |
| Plasmid Maxi Kit                             | Sigma Aldrich (Deisenhofen)        |
| TNT-T7/T6 Coupled Reticulocyte Lysate System | Promega (Madison)                  |
| Glutathione Sepharose 4B                     | Amersham-Pharmacia (Uppsala)       |
| Random Primers DNA Labeling Kit              | GibcoBRL (Eggenstein)              |
| Transfast                                    | Promega (Madison)                  |
| FuGENE™6                                     | Roche (Mannheim)                   |
| NICK Column                                  | Amersham-Pharmacia (Uppsala)       |
| Superfect                                    | Qiagen (Hilden)                    |
| Polybrene                                    | Sigma Aldrich (Deisenhofen)        |
| Cell Culture Lysis Reagent                   | Promega (Madison)                  |
| 5-Bromo-2-Deoxyuridin                        | Sigma Aldrich (Deisenhofen)        |
| Cryospray                                    | Bright Instrument (Cambridgeshire) |
| Luciferase Assay System                      | Promega (Madison)                  |
| Vectastain ABC Universal Kit                 | Vector Laboratories (Peterborough) |
| TSA Fluorescein System                       | NEN Life Science Products (Boston) |

## 2.9 Radioisotope

Radioaktiv markierte Nukleotide [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-dATP, [ $\beta$ - $^{32}\text{P}$ ]-dATP sowie L-[ $^{35}\text{S}$ ]-Methionine wurden bei der Fa. Amersham-Pharmacia (Braunschweig) oder ICN Biomedicals (Eschwege) erworben.

## 2.10 Reagenzien

Es wurden Laborchemikalien der Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), BIO-RAD (München), Calbiochem (La Jolla), Dianova (Hamburg), Fresenius (Bad Homburg), GibcoBRL (Eggenstein), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Uppsala), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma Aldrich (Deisenhofen) im Reinheitsgrad „reinst“ bzw. „p.a.“ eingesetzt.

## 2.11 Lösungen und Puffer

Alle Puffer für molekularbiologische Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.*, (1989) angesetzt.

### III. METHODEN

#### 3.1 Bakterienkultur

##### 3.1.1 Transformation

Die Transformation des E.coli-Stammes XL2-Blue erfolgte nach Protokoll der Firma Stratagene.

##### 3.1.2 Kulturen zur Plasmidisolierung

Zur Kultivierung von plasmidtransformierten E.coli wurden diese aus Vorkulturen in 200 ml LB/Ampicillin (100 µg/ml) überimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt.

#### 3.2 Plasmid-DNA-Präparationen

Plasmid-DNA-Präparationen wurden mithilfe der Reagenziensysteme der Firma Qiagen (Hilden) und Sigma Aldrich (Deisenhofen) durchgeführt.

#### 3.3 Molekularbiologische Methoden

##### 3.3.1 Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1992) durchgeführt.

- Ethanol-Präzipitation von DNA
- Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung von 5'-überhängenden DNA-Fragmenten
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren
- Denaturierende diskontinuierliche Elektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen
- Bestimmung der Proteinkonzentration

### **3.3.2 DNA-Sequenzierung**

Jeweils 3 bis 10 pmol Primer und ca. 200ng Plasmid-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 6µl auf einem ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Norwalk) sequenziert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Edit View (Perkin Elmer, Norwalk).

### **3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (Mullis und Fallona, 1984) eingesetzt. Typischerweise wurden 20-50ng Matrizen-DNA, je 200nM Primer, 200µM dNTPs, 10µl 10x-Pfu-Polymerase-Puffer, 1-2 Einheiten Pfu-Polymerase eingesetzt und mit Wasser auf 100µl aufgefüllt. Der Denaturierungsschritt erfolgte für 1 min bei 95°C, die Hybridisierung für 1 min bei entsprechend optimierter Temperatur und die Elongation für 2 min / kbp DNA bei 72°C.

### **3.3.4 *In vitro* DNA-Mutagenese**

Um einzelne Nukleotidaustausche gezielt in eine DNA-Sequenz einzuführen, wurde das „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Fa. Stratagene verwendet. Hierfür sind zwei komplementäre Oligonukleotidprimer erforderlich, die dieselbe Punktmutation besitzen und an je einem der Plasmidstränge anbinden, welche die das zu mutierende Fragment tragen. Die Primer sollten die Mutation auf jeder Seite um 10 bis 5 Nukleotide überlappen und ihre Schmelztemperatur sollte über 78°C liegen.

### 3.3.5 EMSA

Mit Hilfe von Gel-Retardations-Experimenten (EMSA) können Protein-DNA-Interaktionen *in vitro* untersucht werden. Sie basieren darauf, dass DNA-Moleküle, an die ein Protein gebunden ist, in einem nicht denaturierenden PAA-Gel langsamer wandert als ihre nicht gebundene Form. Hierzu wurden zunächst 1 µg zweier, komplementärer, einzelsträngiger Oligonukleotide in einem Gesamtvolumen von 200 µl Annealingpuffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl) 15 min bei 75°C inkubiert und über einen Zeitraum von 2-3h auf RT abgekühlt. 40ng dieser nun doppelsträngigen DNA wurden mit 1 µl [<sup>32</sup>P]-dATP (10 mCi/ml), Polynukleotidkinasepuffer und T7-Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1h bei 37°C inkubiert, um die 5'-Enden radioaktiv zu markieren. Danach wurde das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert und der Ansatz 2-3h auf RT abgekühlt. Die markierte DNA wurde abschließend über eine NICK-Column (Amersham-Pharmacia, Uppsala) aufgereinigt und in 400 µl Wasser eluiert.

A) Die Bindung des HPV8-E2-Proteins an E2-Erkennungssequenzen wurde, wie bei Stubenrauch und Pfister (1994) beschrieben, mit 1 µg polydI/dC als unspezifischem Kompetitor durchgeführt.

B) p53-DNA-Interaktionen erfolgten nach dem Protokoll von Purdie *et al.* (1999) mit 50ng unspezifischer DNA aus Heringssperma als unspezifischem Kompetitor. Zunächst wurden alle Komponenten der Bindungsreaktion und das *in vitro* translatierte p53 Protein für 15 min bei RT stehen gelassen. Nach Zugabe der radioaktiven DNA-Probe erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min, bevor 1 µl des p53-Antikörpers pAb421 zum Reaktionsansatz gegeben und die Proben für weitere 30 min bei RT inkubiert wurden.

C) Die Untersuchung der p53-Bindung unter dem Einfluß von HPV8-E2 fand unter E2-Reaktionsbedingungen statt, wobei 50ng Heringssperma-DNA als Kompetitor eingesetzt und die Ansätze auf 10% Glycerin eingestellt wurden.

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf einem 5%igen nichtdenaturierenden PAA-Gel bei 150V für 1,5h in 0,5x TBE (0,025M Tris-Cl pH=8.0; 0,025M Borsäure;

0,5mM EDTA) als Laufpuffer. Das Gel wurde anschließend getrocknet und autoradiographisch untersucht.

### **3.3.6 *In vitro* Transkription und Protein-Translation**

Die Synthese von Proteinen erfolgte *in vitro* mit dem „TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ (Promega) unter Zugabe von RNasin als RNase-Inhibitor. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l Retikulozyten-Lysate und 1  $\mu$ l T7 oder T6 Polymerase zu 1  $\mu$ g Plasmid-DNA, 2  $\mu$ l TNT-Puffer, 1  $\mu$ l TNT-Aminosäuremix ohne Methionin, 1  $\mu$ l RNasin und 2  $\mu$ l [<sup>35</sup>S]-Methionin wurde der Ansatz mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt und 90 min bei 30°C inkubiert. 1-5  $\mu$ l der Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, das fertige Gel fixiert (10% Methanol; 10% Essigsäure), Amplify-Lösung (Amersham Pharmacia) gelegt, getrocknet und die Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

## **3.4 Zellkulturtechniken**

### **3.4.1 Kultivierung von Zelllinien**

H1299- und RKO-Zellen wurden in RPMI1640 und Swiss-3T3-Zellen in DMEM jeweils mit einem Zusatz von 10% FKS und 1% Penicillin / Streptomycin bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. RTS3b-Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in Keratinozytenmedium gehalten und bei einer Zelldichte von ca. 90% passagiert. Grundsätzlich erfolgte die Subkultivierung von Monolayerkulturen durch Behandlung mit Trypsin/EDTA. Dabei wurden sie in PBS gewaschen und in 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA verdaut, bis sie sich vom Flaschenboden ablösten. Diese Zellsuspension wurde mit Medium verdünnt und je nach erwünschtem Dichtegrad auf neue Zellkulturflaschen verteilt.



### 3.4.2 Isolierung primärer Keratinozyten und Fibroblasten aus Hautgewebe

Hautgewebe, welches routinemässig im Rahmen von Schönheitsoperationen entfernt worden war, wurde bis zur Aufarbeitung in Transportmedium (DMEM versetzt mit 10% FCS, 600 U/ml Penicillin; 600 µg/ml Streptomycin; 250 µg/ml Gentamycin; 2,5 µg/ml Fungizone) bei 4°C gelagert. Dann erfolgte die Abschabung der Epidermis mithilfe eines Dermatoms und die Überführung in serumfreies DMEM. Unter sterilen Bedingungen wurde die Epidermis in eine Petrischale gegeben, mit 0,02% EDTA mehrmals gewaschen, anschließend in 0,25% Trypsin bei 37°C für 2 h inkubiert und dabei alle halbe Stunde kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von DMEM (10% FCS) zur Neutralisation des Trypsins wurde die Zellsuspension gesiebt. Das Filtrat (eine Zellsuspension hochangereichert mit Keratinozyten) wurde 5 min bei 300g zentrifugiert. Die Keratinozyten wurden anschließend in Keratinozytenmedium resuspendiert und je  $2 \times 10^6$  Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gegeben, in die  $\gamma$ -bestrahlte Swiss3T3 Fibroblasten vorgegeben waren (siehe auch 3.4.3).

Zur Gewinnung primärer Fibroblasten wurde das im Sieb verbliebene Gewebe in eine Petrischale gegeben und über Nacht in Kollagenase D (Roche, Mannheim) (0,03g auf 60ml DMEM) bei 37°C inkubiert. Diese Fibroblastensuspension wurde am Folgetag gesiebt und das Filtrat pelletiert. Das Zellpellet wurde in DMEM (10% FCS) resuspendiert und die Fibroblasten in 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert.

### 3.4.3 Kultivierung von primären Keratinozyten

Primärkulturen von Keratinozyten wurden in Keratinozytenmedium auf einem sogenannten "feeder layer" (einer mit  $\gamma$ -Strahlung (6000 Rad) behandelten Schicht teilungsunfähiger Fibroblasten) bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> gehalten. Die Fibroblasten sondern essentielle Wachstumsfaktoren ins Kulturmedium ab, die für die Monolayerkultur der Keratinozyten gebraucht werden. Unter diesen Bedingungen vermehren sich die Keratinozyten, während die dermalen Fibroblasten langsam absterben (Rheinwald und Green, 1975). Zum Passagieren wurden die 50% bis 70% konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA

inkubiert. Nach einigen Minuten wurde vorsichtig gegen die Zellkulturflasche geklopft bis sich nahezu alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Diese abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und je nach Dichtegrad ausgesät.

### **3.4.4 Bestrahlung von eukaryonten Zellen**

#### **□ Bestrahlung von Swiss 3T3 Fibroblasten**

Konfluent gewachsene Swiss 3T3-Zellen wurden trypsiniert und in Keratinozytenmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit Medium auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  pro ml eingestellt. Anschließend erfolgt die Bestrahlung der Zellen mit 6000 Rad. Die bestrahlten Zellen wurden für die Keratinozytenkulturen in  $75 \text{ cm}^2$  Flaschen mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  ausgesät. Bestrahlte Zellen konnten bis zu vier Tage bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert werden.

#### **UV-B Bestrahlung von Keratinozyten**

Für die monochromatische UV-B-Bestrahlung von Keratinozyten wurde ein CL-1000 Ultraviolett-Crosslinker (UVP, Cambridge) benutzt, der mit UV-B-Lampen ausgestattet war, deren Emissionspeak bei 302 nm lag. In  $6 \text{ cm}$  Schalen transfizierte Zellen wurden vor der UV-Bestrahlung zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer UV-B Dosis von  $15 \text{ mJ} / \text{cm}^2$  bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit  $4 \text{ ml}$  Keratinozytenmedium inkubiert.

### **3.4.5 Langzeitlagerung von Zellen**

Die Zellen aus einer  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflasche wurden mit Trypsin abgelöst und  $5 \text{ min.}$  bei RT und  $1000 \text{ g}$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FCS mit  $10\%$  (v/v) DMSO aufgenommen und die Zellsuspension in Einfrierröhrchen überführt. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ .

Die zu reaktivierenden Zellen wurden nach schnellem Auftauen bei 37°C, Überführen in Kulturmedium, Zentrifugation (5 min., RT, 1000 g) und anschließendem Resuspendieren in entsprechendem Medium in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

### 3.5 Herstellung rekombinanter Retroviren

Mit dem Retro X-System (Clontech, Palo Alto) ist man in der Lage, rekombinante infektiöse, aber replikationsinkompetente Retroviren herzustellen. So ist es möglich, ein fremdes Gen in eine Vielzahl verschiedener Säugerzellen einzubringen und stabil in das Wirtsgenom sich teilender Zellen zu integrieren. Das System besteht aus einer Verpackungszelllinie, die auf der Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 basiert und die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* des Moloney-Mäuseleukämievirus' Typ 10 A1 in ihr Genom integriert hat. Als Verpackungszelllinie wird in den hier beschriebenen Experimenten die Zelllinie PT76 eingesetzt. Als retrovirale Vektoren werden pLXSN und davon abgeleitete Konstrukte verwendet. Diese wurden mittels des Transfektionsreagenzes SuperFect™ in die Verpackungszelllinie eingeführt. Sie besitzen neben den 5'- und 3'-LTR, die als Promotoren fungieren, das Verpackungssignal  $\Psi$ , welches in Kombination mit den *gag*-, *pol*- und *env*-Genen der Verpackungszelllinie diese erst dazu befähigt, rekombinante Viren herzustellen. Um eine Population nur transfizierter Zellen zu erhalten, wird eine zweiwöchige Selektion mit Geneticin (0,5 mg/ml Medium) durchgeführt und anschließend werden die selektionierten Zellklone gepoolt expandiert. Diese Zellen produzieren infektiöse, nicht-replikationsfähige Retroviren, die ins Kulturmedium abgesondert werden.

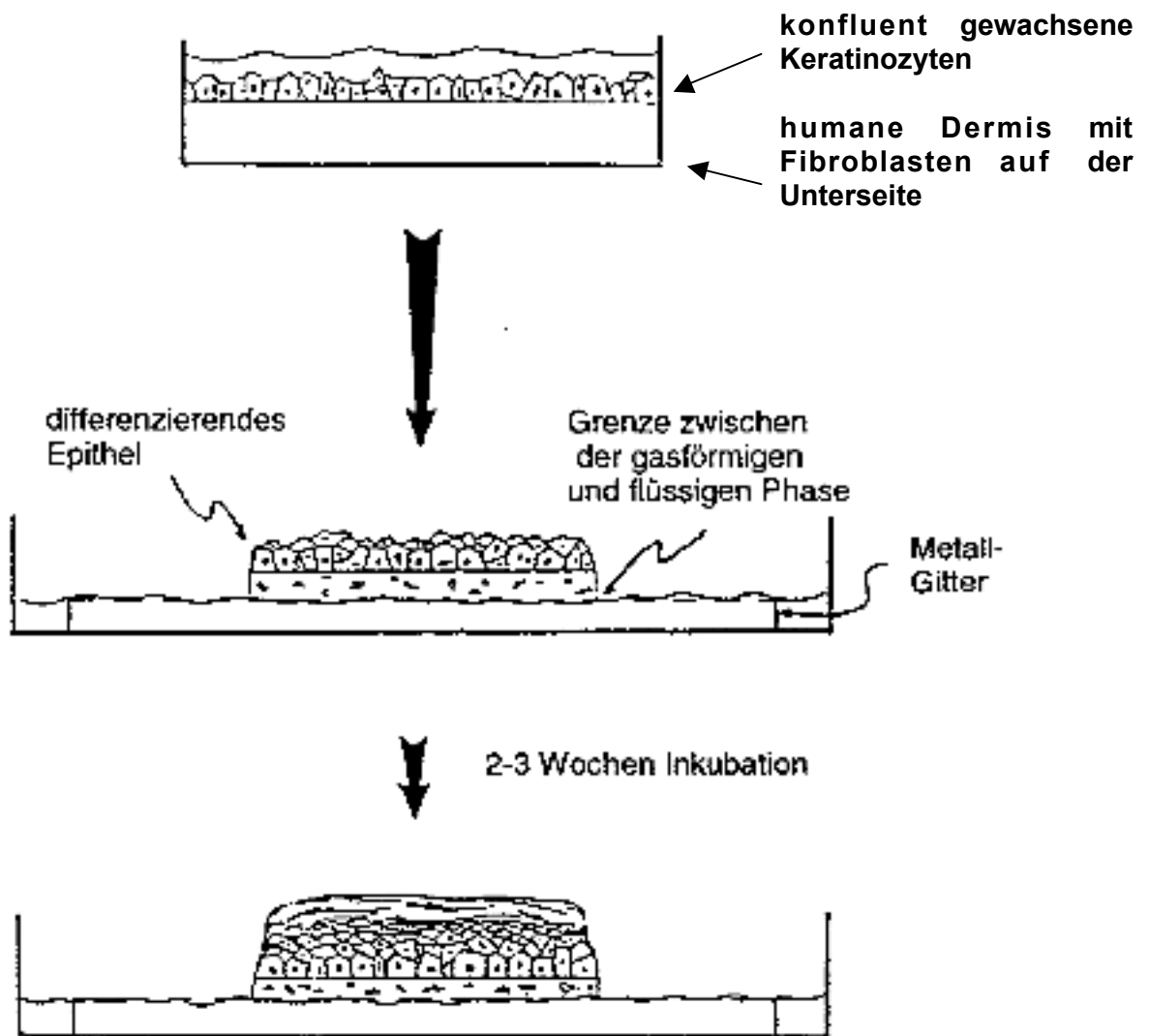
Zur Gewinnung der jeweiligen Virusüberstände waren die jeweiligen Kulturen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen und 20 ml Medium gehalten worden. Bei einer Zelldichte von ca. 80-90% wurde das Medium abgezogen und 8 ml frisches Medium zugegeben. Die Zellen wurden nun bei 32°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. 24 h später wurden die Überstände abgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3.6 Infektion von primären Keratinozyten mit rekombinanten Retroviren

48 h vor der Infektion waren die zu infizierenden primären Keratinozyten mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  in Defined-Keratinocyte-SFM Medium ausgesät worden. Zur Infektion wurde das Medium der Keratinozyten abgenommen und durch serumfreies DMEM mit Polybrene (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) ersetzt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und zwischenzeitlich die retroviralen Überstände aufgetaut und mit Polybrene (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration) versetzt. Danach nahm man das Medium der Zellen ab und gab die präparierten Überstände zu den Zellen. Die 6-Loch-Zellkulturplatten wurden nun 1 h mit  $350\text{g}$  zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit Defined-Keratinocyte-SFM Medium gewaschen und inkubiert. 48 bis 72 h später führte man eine dreitägige Selektion mit Genitacin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Medium) durch und expandierte anschließend die selektionierten Zellklone gepoolt.

### 3.7 Organotypische Zellkulturen (raft-Kulturen)

In Glycerol gelagerte Spenderhaut (European Skin Bank, Beverwijk, Niederlande), bestehend aus Epidermis und Dermis, wurde zweimal mit PBS gewaschen und 10 Tage in antibiotikahaltigem PBS (600 U/ml Penicillin; 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin; 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycin; 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Fungizone) bei  $37^\circ\text{C}$  gelagert (Todd *et al.*, 1993). Nach dieser Inkubation schabte man die Epidermis ab, wusch die Dermis mehrmals mit PBS und schnitt sie dann in  $1,5 \times 1,5$  cm große Quadrate. In 6 cm Schalen wurde dann auf das Stratum reticulare (Unterseite der Dermis) ein Edelstahlring ( $\varnothing = 1,2$  cm) positioniert. Anschließend erntete man primäre, humane Fibroblasten aus großen Kulturflaschen, zählte sie und stellte sie in Keratinozytenmedium auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen / ml ein. 1 ml dieser Suspension wurde in den vorbereiteten Ring pipettiert, zusätzlich Keratinozytenmedium in die Schale gegeben und das ganze über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$  inkubiert.



**Abb. Schematische Darstellung des raft-Systems**

Keratinozyten wurden auf humane Dermis ausgesät. Sobald die Zellen konfluent gewachsen waren, wurde die Dermis auf ein Metall-Gittergelegt und 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze inkubiert (modifiziert nach Meyers und Laimins, 1994).

Am nächsten Morgen zog man das Medium ab, entfernte den Ring, drehte die Dermis um und legte den Edelstahlring auf die Papillardermis (Dermisoberseite). In Defined-Keratinocyte-SFM Medium (GibcoBRL) kultivierte primäre Keratinozyten wurden geerntet, ausgezählt und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in Keratinozytenmedium eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde in den Ring gegeben und die Schale wieder mit einigen ml Keratinozytenmedium benetzt. Diese Anordnung lagerte man nun 2 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und  $10\% \text{CO}_2$ . Nach dieser Zeit wurde der Ring entfernt und die Dermis 4 bis 6 h in frischem

Keratinzytenmedium inkubiert. Danach setzte man die Dermis in 6 cm Schalen auf Edelstahlgitter. Es wurde gerade soviel Keratinozytenmedium in die Schale gegeben, dass die Dermis von unten benetzt war. An jedem dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Am 14. Tag wurde die raft-Kultur dann für 6 h in mit 5-Bromo-2-Deoxyuridin (50µg/ml) versetztem Keratinozytenmedium inkubiert und anschließend halbiert. Ein Gewebestück wurde nach Gefrieren mit Cryoembed im Stickstoffbad konserviert und bei -80°C gelagert. Für die Einbettung in Paraffin fixierte man die raft-Kulturen in mit PBS gepuffertem Formalin (10%ig) und bettete sie in Paraffin ein.

### 3.8 Immunhistochemische Untersuchung

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden mit einem Mikrotom 4µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt. Man glättete die einzelnen Schnitte in einem Wasserbad bei 42°C, trug sie auf Adhäsiv-Objektträger auf und trocknete sie anschließend in einem Brutschrank bei 42°C. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch serielle Inkubation für jeweils 5 min in einem Tauchbad von 100%igem Xylol (I) und (II), 100%igem Ethanol (I) und (II), 90% und 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate in destilliertem Wasser für 10 min belassen. Vor der Immunfärbung wurden SCC-Paraffinschnitte entweder in vorgekochtem Zitratpuffer (10mM, pH 6.0) für 4 min in einem Überdruckkochtopf aufgekocht oder mit ProteinaseK (20 µg/ml) für 15 min verdaut. Hierdurch wird die Membran der Zellen perforiert und für den Antikörper zugänglich gemacht. Danach wurden die Schnitte zweimal für 5 min in PBS gespült. Die raft-Schnitte wurden nicht mit Zitratpuffer oder ProteinaseK behandelt. Alle Inkubationen der Objektträger mit Antikörpern und Enzym-Konjugaten wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen, deckte man die Schnitte mit normalem Pferdeserum (10%ig in PBS, Harlan Sera-Lab) für 30 min ab. Anschließend wurden je 100 µl der Antikörperlösung auf die Schnitte geträufelt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen dreimal für je 5 min in PBS gespült. Die Darstellung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte mittels der

„markierten Avidin-Biotin-Methode“, einer indirekten Immunperoxidase-Methode, und zwar mit Hilfe des Vectastain Elite ABC-Kits (Vector Laboratories) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens beruht auf der hohen Bindungsaffinität des Glykoproteins Avidin zu Biotin. Ein biotinkonjugierter Sekundärantikörper bindet sich dabei an den gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Primärantikörper. Mit seinen freien Valenzen bindet sich dann das peroxidasekonjugierte Avidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Als Chromogen für die Peroxidase wurde das TSA-Fluorescein-Substrat (NEN Life Science Products, Boston) benutzt, welches nach Anregung mit UV-Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtet.

Bei jeder Serie von Färbungen wird jeweils eine Positiv-Kontrolle mitgefärbt, um sicherzustellen, dass ein negatives Ergebnis nicht aufgrund einer fehlerhaften Anwendung der Methode entstanden ist. Entsprechend wird auch parallel zu jeder gefärbten Serie eine Negativ-Kontrolle durchgeführt, d.h. der spezifische Antikörper wird nicht zugegeben.

### **3.9 Funktionelle Tests**

#### **3.9.1 Transienter Replikationstest**

Der Replikationstest wurde als Modifikation der Methode von Ustav und Stenlund *et al.*, 1991 etabliert.

Bei der Zellernte wurde das Medium abgesogen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einem Gummischaber abgekratzt, in 2 ml PBS resuspendiert und 1 min mit 3000 g pelletiert. Zur Extraktion der episomalen DNA wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l Resuspendierpuffer (50 mM Glukose; 25 mM Tris; 10 mM EDTA; pH 8.6) aufgenommen und die Zellen mit 400  $\mu$ l frisch angesetzttem Lysispuffer I (0,2 M NaOH; 1% SDS) 3 min bei RT lysiert. Das Zellysat wurde in 300  $\mu$ l Neutralisierungspuffer (3 M Kac; pH 4.8) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Um die Zellfragmente abzutrennen, wurde der Rohextrakt für 5 min mit 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 540  $\mu$ l Isopropanol versetzt und anschließend

nochmal für 15 min 20000 g zentrifugiert. Zur Entfernung der Proteinverunreinigungen, wurde das Pellet in 200  $\mu$ l Proteinase-K-haltigen Lysispuffer II (100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,2% SDS; 200  $\mu$ g/ml Proteinase K) aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Hiernach folgte eine Phenolextraktion und Ethanol-fällung. Das Pellet wurde in 20  $\mu$ l einer RNaseA-Lösung (0,0625 mg/ml) aufgenommen und auf zwei gleiche Ansätze aufgeteilt. Während die Testplamid-DNA in einem Ansatz mit einer nur einmal schneidenden Restriktionsendonuklease linearisiert wurde (im Fall der HPV8 Testkonstrukte: BamHI), wurde sie im anderen Ansatz zusätzlich mit einem Überschuß an *DpnI* gespalten. Dieses Enzym verdaut DNA, die am Adenosin im Motiv 5'-GATC-3' methyliert ist. Da die transfizierte DNA aus *dam*<sup>+</sup>-Bakterien isoliert wurde und entsprechend methyliert ist, wird sie in einer *DpnI*-Spaltung in kurze Fragmente gespalten und kann nach der elektrophoretischen Auftrennung leicht von der neu replizierten, nichtmethylierten DNA, die von *DpnI* nicht gespalten wird, unterschieden werden. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die DNA Fragmente in einer Gelelektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

### 3.9.2 Southern-Blot-Hybridisierung

Das zu blottende Agarosegel wurde zunächst 20 min in 0,25M HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren. Danach wurde das Gel kurz mit Wasser gespült und in 0,4M NaOH zur Denaturierung der DNA inkubiert. Anschließend wurde die DNA unter alkalischen Bedingungen auf eine Hybond-N<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham-Pharmacia, Uppsala) transferiert. Als radioaktiv markierte Hybridisierungssonde wurden 25ng pNCR8-CAT mit dem Random Primers DNA Labeling System (GibcoBRL, Eggenstein) nach dem Protokoll des Herstellers radioaktiv markiert. Die so entstandene Sonde wurde über eine NICK Column (Amersham-Pharmacia, Uppsala) aufgereinigt und in 400 $\mu$ l Wasser eluiert. Der Filter mit der transferierten DNA wurde mit 100 ml Prähybridisierungslösung (2x SSC; 1x Denhardts-Reagenz (0,02% BSA; 0,02% Polyvinylpyrrolidon; 0,02% Ficoll 400); 0,1mg/ml Hefe-t-RNA) für 3h in einem Rollinkubator bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung dekantiert und stattdessen die Hybridisierungslösung



(50% Formamid; 5x SSC; 1x Denhardt; 0,1 mg/ml Hefe-RNA; 0,1% SDS; 20 mM Na-P-Puffer) mit der radioaktiv markierten Sonde zur Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C über Nacht. Am Folgetag wurde der Filter zweimal in je 200 ml Waschpuffer (6x SSC; 0,5% SDS) bei 65°C gewaschen, in 2x SSC gespült, mit Frischhaltefolie abgedeckt und dann gegen einen Röntgenfilm exponiert.

### **3.9.3 Transfektion von RTS3b-Zellen für den transienten Replikationstest**

Einen Tag vor der Transfektion wurden RTS3b-Zellen konfluent gewachsener Kulturflaschen mit PBS gewaschen, trypsinisiert jeweils  $6 \times 10^5$  Zellen in 10cm Schalen verteilt. Bei den transienten Replikationstests wurden 1 pmol des Replikations-Testkonstruktes und jeweils 2 µg der Expressionvektoren für E1 (pCE1) und E2 (pCE2) eingesetzt. Pro Reaktion wurden zunächst 20µl FuGENE™ 6 (Roche, Mannheim) in 280µl serumfreiem DMEM-Medium verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Diese Verdünnung gab man tropfenweise auf die vorpipettierte DNA, vorsichtig gemischt und inkubierte sie für weitere 15 min bei RT. und 200ng pCMV-β-Gal-DNA zusammengesetzt war. Während der 15- minütigen Komplexbildung von FuGENE™ 6 mit der DNA wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10ml Komplettmedium überschichtet. Nach tropfenweiser Zugabe der Transfektionsansätze auf die Zellen erfolgte eine Inkubation für 72 h im Brutschrank.

### **3.9.4 Transiente Transfektion von RTS3b-Zellen zur Reporteragen-Analyse**

Für die Transfektion der RTS3b-Zellen mit Luciferasetestkonstrukten wurden 6-Loch-Schalen benutzt. Dabei wurden pro Loch 2-3x  $10^5$  Zellen ausplattiert, sodass am Tage der Transfektion eine Konfluenz der Zellen von ca. 50% gegeben war. Pro Reaktion wurden zunächst 2µl FuGENE™ 6 (Roche, Mannheim) in 98µl serumfreiem DMEM-Medium verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Diese Verdünnung gab man tropfenweise auf die vorpipettierte DNA, vorsichtig gemischt und inkubierte sie für weitere 15 min bei RT. Pro Ansatz wurden 900ng Plasmid-

DNA verwendet, die aus 500ng Luciferasekonstrukt, 200ng Expressionsplasmid und 200ng pCMV- $\beta$ -Gal-DNA zusammengesetzt war. Während der 15- minütigen Komplexbildung von FuGENE™ 6 mit der DNA wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Komplettmedium überschichtet. Nach tropfenweiser Zugabe der Transfektionsansätze auf die Zellen erfolgte eine Inkubation für 24 h im Brutschrank.

### **3.9.5 Transiente Transfektion von primären Keratinozyten zur Reportergen-Analyse**

Primäre Keratinozyten wurden mit dem Reagenz Transfast™ (Promega) transfiziert. In 6 cm Schalen wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in 4 ml Keratinozytenmedium ausgesät. Für diese Experimente waren die Keratinozyten nicht mit feeder-Zellen inkubiert worden. Zu 2 ml serumfreiem DMEM wurden 3  $\mu$ g Luciferasetestkonstrukt und 500 ng pCMV- $\beta$ -Gal Plasmid pipettiert. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l Transfast waren die Proben 10 Sekunden intensiv gemischt und 15 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert worden. Während dieser Zeit wurden die Keratinozyten zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend tropfte man das DNA-Transfast-Gemisch auf die Zellen und gab nach 1 h zusätzlich 4 ml frisches serumhaltiges Keratinozytenmedium zu den Zellen.

### **3.9.6 Transfektion von PT67-Zellen mit SuperFect**

Einen Tag vor der Transfektion wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Am Folgetag wurden 10  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA auf ein Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l serumfreiem DMEM-Medium aufgefüllt, 40  $\mu$ l SuperFect zugegeben und gemischt. Die Komplexbildung fand während einer 10 min Inkubationszeit bei RT statt. Zusammen mit 3 ml serumhaltigem Medium wurde der Ansatz auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 1,5 h Inkubation im Brutschrank wusch man die Zellen erneut mit PBS und versetzte sie mit frischem Medium.

### 3.9.7 $\beta$ -Galaktosidase- und Luciferase-Assay

Zur Vorbereitung auf die Messung der Luciferase- und  $\beta$ -Gal-Aktivitäten wurden die transfizierten Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 300  $\mu$ l Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Madison) 15 min bei RT inkubiert. Das Zellysats gab man danach in ein Eppendorf-Gefäß und war somit sowohl für Luciferase- als auch für  $\beta$ -Galaktosidase-Assay einsetzbar.

Der Luciferase-Test erfolgte im Luminometer der Fa. Berthold (Wildbach). 50  $\mu$ l Zellextrakt und 100  $\mu$ l Assay-Puffer (100mM  $KPO_4$ -Puffer pH=7.8, 15mM  $MgSO_4$ , 50mM ATP) wurden in 5ml-Glasröhrchen gemischt und in den Luminometer gestellt, der mit 0,025%iger Luciferin-Lösung (in Assaypuffer) beladen war. Nach automatischer Injektion erfolgte die maschinelle Lumineszenzbestimmung mit anschließender Wertausgabe. Für den  $\beta$ -Galaktosidase-Assay wurden 150  $\mu$ l Zellüberstand, 135  $\mu$ l 0,1M  $Na_2HPO_4$  pH=7.5, 1,5  $\mu$ l 100x Mg (0,1M  $MgCl_2$ , 4,5M  $\beta$ -Mercaptoethanol) und 33  $\mu$ l ONPG (4 mg/ml in 0,1M  $Na_2HPO_4$  pH=7,5) vermischt und bei 37°C inkubiert. Nach ausreichender Gelbfärbung stoppte man die Reaktion mit 450  $\mu$ l 1M  $Na_2CO_3$ -Lösung. Die relative Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 420nm bestimmt.

### 3.9.8 Gewinnung von Kernextrakten aus eukaryonten Zelllinien

Die Zellen einer 10 cm Schale wusch man zweimal mit eiskaltem PBS, überschichtete sie mit 10 ml PBS und überführte sie, mit einem Zellschaber gelöst, auf Eis. Die Zellen wurden bei 300 g und 4°C 5 min pelletiert, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und 30 Sekunden lang zentrifugiert. Anschließend resuspendierte man das Zellsediment in 400  $\mu$ l kaltem Puffer A (10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF) und inkubierte es 15 min auf Eis. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l einer 10%igen NP40-Lösung wurde der Ansatz 10 Sekunden intensiv gemischt. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert, vom Überstand getrennt, in 50  $\mu$ l kaltem Puffer B (20mM HEPES, pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) resuspendiert und 15 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Der Extrakt

wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für 15 min von Kerntrümmern befreit und bei –80°C eingefroren (Schreiber *et al.*, 1989).

### 3.9.9 Expression und Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Mit pGEX-Derivaten transformierte E.coli-Übernachtskulturen (BL21DE3) wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt und bis zu einer relativen Absorption (bei 600nm) von 0,6-1,0 wachsen gelassen. Nun begann eine Behandlung der Kultur mit 1 mM IPTG, um die Proteinexpression zu induzieren. 2h später wurden die Bakterien bei 2000g für 15 min pelletiert. Das Sediment nahm man in 10 ml LSDB-500 (50mM Tris pH=8.0; 0,1% NP40; 1mM DTT; 10% Glycerol; 500mM KCl) auf und sonifizierte es bei 4°C viermal mit 50W. Die Trennung der Proteine von den Zelltrümmern erfolgte durch 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 15000g. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

### 3.9.10 GST-Interaktionsassays

Die Untersuchung der Protein-Protein-Wechselwirkung erfolgte mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen, die mit *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert worden waren. Hierzu wurden die GST-Fusionsproteine mit 100µl Glutathion-S-Sepharose-Matrix (Amersham-Pharmacia, Uppsala) in LSDB-500 (mit 500mM KCl) 1h bei 4°C inkubiert. Dabei binden die GST-Fusionsproteine an das Sepharose gekoppelte Glutathion an. Die gebundenen GST-Fusionsproteine wurden anschließend viermal mit LSDB-1000 (mit 1M KCl) und zweimal mit LSDB-100 (mit 100mM KCl) gewaschen, indem die durch Zentrifugation (1min; 1000x g) pelletierte Sepharose in den entsprechenden Puffern resuspendiert wurde. Im Anschluß daran nahm man eine 2-stündige Inkubation bei 4°C mit den radioaktiv markierten bzw. *in vitro* translatierten Proteinen in 500µl LSDB-100 (mit 100 mM KCl) vor. Nach viermaligem Waschen mit 100-250mM KCl haltigem LSDB-Puffer wurde die

Glutathion-Sepharose pelletiert und mit 30  $\mu$ l 2xSDS-Probenpuffer (Ausubel *et al.*, 1992) versehen, bei 95°C denaturiert und die Proben auf einer SDS-PAGE getrennt. Die durch Interaktion präzipitierten Proteine detektierte man entweder durch Wester-Blot oder im Falle *in vitro* translaterter Proteine durch Radiolumineszenz.

### 3.9.11 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse

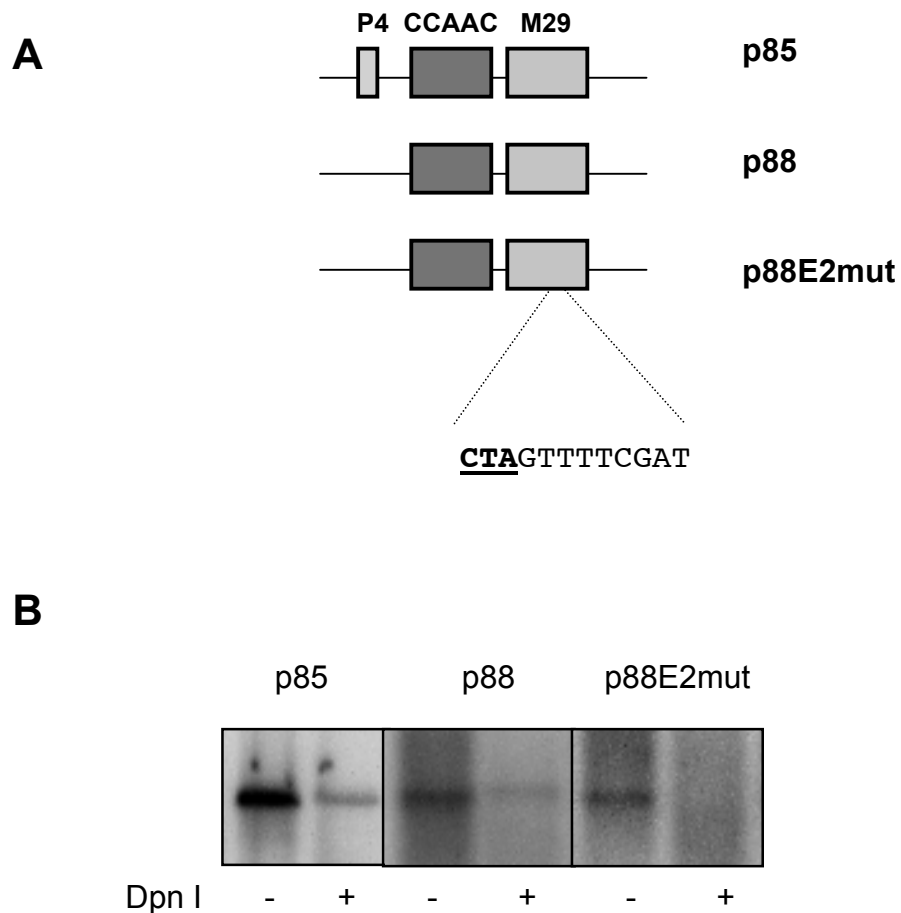
Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer 5 min. bei 95°C erhitzt und durch SDS-PAGE getrennt. Diese Gele legte man luftblasenfrei auf einen Nitrozellulosefilter und blottete sie 2 h lang in einem „semi-dry“ diskontinuierlichen Elektrotransfer (Kyhse-Andersen, 1984) auf einen Nitrozellulosefilter. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde als Block-Lösung 5%ige Magermilch in TBST (10mM Tris-Cl pH=8.0; 150mM NaCl; 0,05% Tween20) eingesetzt. Die Membran wurde für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln in der Block-Lösung inkubiert. Der erste Antikörper (DO-1) wurde 1:5000 in der Block-Lösung verdünnt und mit der Membran 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min., wurde die Membran mit einer Lösung des zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 bedeckt und ebenfalls 1 h bei RT leicht geschüttelt. Danach wurden die nicht gebundenen sekundären Antikörper durch drei 10-minütige Waschschrte mit TBST entfernt. Der Filter wurde für 1 min. mit 1-2 ml ECL-Detektionsreagenz (Amersham Pharmacia) überschichtet und mit Klarsichtfolie bedeckt. Die Protein-Antikörper-Komplexe konnten danach aufgrund von Chemolumineszenz als Banden auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

## IV. ERGEBNISSE

### 4.1 Identifizierung des minimal notwendigen *ori*-Sequenzbereiches

In allen Studien zur transienten DNA-Replikation von Papillomviren wurden die viralen Proteine E1 und E2 als notwendige virale *trans*-Faktoren identifiziert. Weiterhin konnte in allen diesbezüglich untersuchten HPV Typen der *origin of replication* innerhalb der NCR des viralen Genoms kartiert werden.

Um die Lage der als *ori* aktiven Sequenzen von HPV8 zu ermitteln, wurden im Rahmen einer früheren Studie verschiedene NCR Subfragmente auf ihre Replikationsfähigkeit getestet (Akgül, 1999). Unter Bedingungen des transienten Tests erwies sich das Replikationskonstrukt p85, das die HPV8-Sequenzelemente P4-CCAAC-M29 enthält, als replikationsfähig. Dagegen konnte für die Testkonstrukte, in denen die CCAAC oder M29-Sequenzen aus diesem Kontext deletiert wurden, keine Replikation nachgewiesen werden. Um die funktionelle Bedeutung der E2-Bindestelle P4 zu ermitteln, wurde die HPV8-Sequenz 76-118, welche nur die Sequenzelemente CCAAC und M29 umfasst, als doppelsträngige DNA in den Klonierungsvektor pUC8 inseriert (p88) und auf seine Replikationsfähigkeit getestet. Dieses Minimalkonstrukt erwies sich in transienten Replikationstests als replikationsfähig, was daran zu erkennen ist, dass eine DpnI-resistente DNA Bande, die replizierte DNA darstellt, im Southern-Blot existiert (Abb. 9). Der Befund spricht dafür, dass sich der minimale Sequenzbereich der HPV8-NCR, der für die Initiation der Replikation notwendig ist, auf die Sequenzelemente CCAAC und M29 beschränkt.



**Abb. 9: Kartierung der minimalen *ori*-Sequenzen von HPV8.**

(A): Schematische Darstellung der HPV8-Sequenzmotive in p85, p88 und Darstellung der Mutation der E2-Bindestelle P5 in p88E2mut. (siehe auch Abb. 10A)

(B): Transienter Replikationstest der Replikationstestkonstrukte p85, p88 und p88E2mut. Die Replikationsfähigkeit der Testkonstrukte zeigt sich durch das Auftreten einer Bande bei der DpnI- verdauten DNA-Präparation im Southern-Blot.

#### 4.2 Der minimale *ori*-Bereich von HPV8 enthält eine von der Konsensussequenz abweichende E2-Bindestelle

Alle bisher untersuchten *ori*-Elemente von Papillomviren umfassen drei charakteristische Sequenzelemente: mindestens eine E2-Bindestelle, eine E1-Bindestelle sowie einen kurzen A/T-reichen Sequenzabschnitt 3' der E1-Bindestelle (Ustav und Ustav, 1998). Bei HPV8 hingegen umfasst die *ori*-Region die bei EV-Viren hochkonservierten Sequenzelemente CCAAC und M29 und enthält überraschenderweise keine bekannte E2-Bindestelle. Dieser Sequenzabschnitt enthält zwar keine A/T-Strecke, ist aber mit 60% A/T-Gehalt sehr reich an A und T

Nukleotiden. Ein Computervergleich zeigte, dass das CCAAC-Motiv eine sehr hohe Übereinstimmung mit der publizierten Konsensussequenz der E1-Bindestellen anderer Papillomviren zeigt (O'Conner et al., 1995). Es ist daher anzunehmen, dass das CCAAC Motiv die E1-Bindestelle repräsentiert. Wenn man die Sequenz des M29-Elementes genauer betrachtet, findet man eine der E2-Konsensusbindesequenz ähnliche Region (Abb. 10A). Der M29-Bereich, der ein perfektes Palindrom darstellt, weicht nur an zwei Positionen von der E2-Erkennungssequenz ab. Aufgrund dieser Beobachtung sollte in Gel-Retardations-Experimenten untersucht werden, ob HPV8 E2 diese mögliche Bindestelle erkennt. Hierzu wurden [ $^{32}$ P]-markierte doppelsträngige Oligonukleotide, die diese kryptische E2-Bindestelle von HPV8 (M29E2) umfassen, mit gereinigtem E2-Protein inkubiert. Als Positivkontrolle diente das Oligonukleotid P2C, das eine hochaffine E2-Bindestelle trägt (Stubenrauch und Pfister, 1994). Wie in Abb. 10B zu sehen ist, erkennt das E2-Protein das Oligonukleotid M29E2 (Spur 2). Die Spezifität dieser E2-DNA-Interaktion konnte mit Hilfe von Kompetitorsequenzen bestätigt werden. Bei Zugabe der Oligonukleotide M29E2 (Spur 3) bzw. P2C (Spur 4) als spezifische Kompetitoren war es möglich, die E2-M29 Bindung zu unterbinden. Hingegen konnte der E2-M29-Komplex durch das heterologe Kompetitoroligonukleotid SP1 (Spur 6), das eine bona fide SP1-Bindestelle trägt, und durch das M29E2mut-Oligonukleotid (Spur 5), welches dieselbe Sequenz wie das M29E2 Oligonukleotid aufweist aber am 5'-Ende des E2-Palindroms mutiert ist, nicht verhindert werden. Somit ist deutlich geworden, dass das E2-Protein in der Lage ist, diese kryptische E2-Bindestelle zu binden. Diese neu charakterisierte E2-Erkennungssequenz wurde des weiteren als P5 bezeichnet. Die Relevanz dieser E2-Bindestelle für die Replikation konnte dadurch belegt werden, dass Mutationen dieser Erkennungssequenz zum Ausfall der Replikation des p88E2mut Konstruktes führte (Abb. 9).

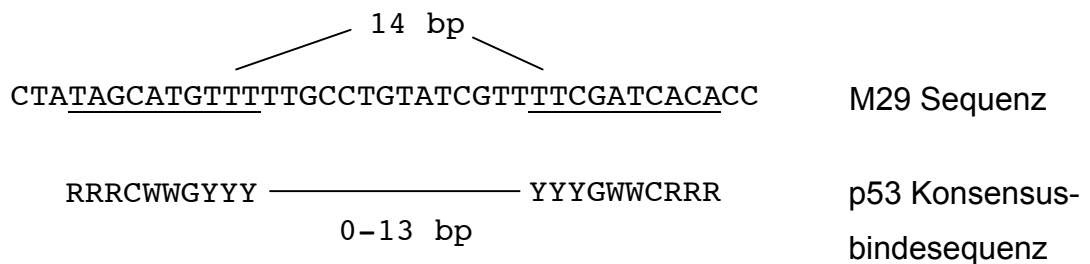




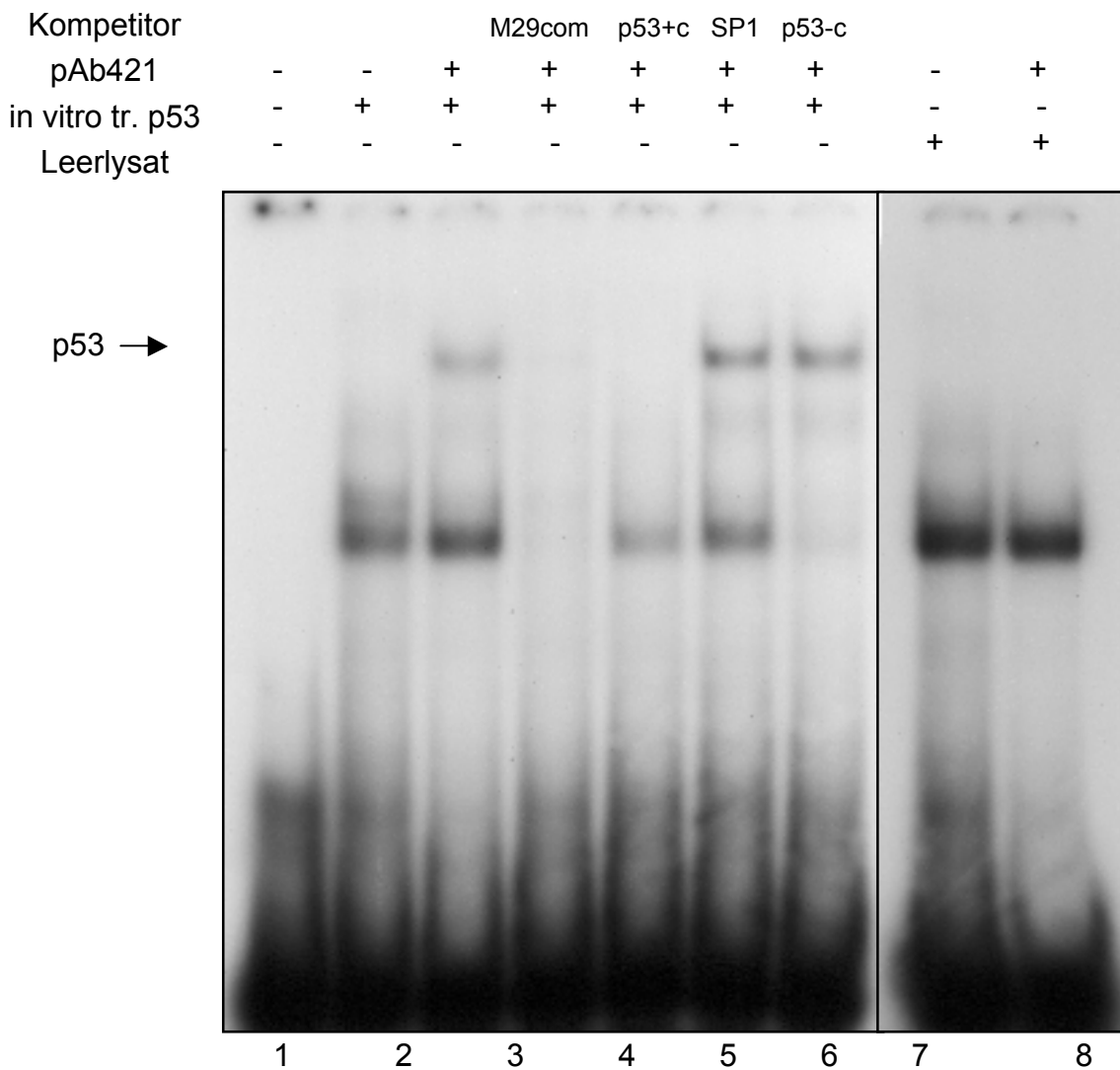
### 4.3 p53 bindet an das M29-Sequenzmotiv von HPV8

Bei der Suche nach M29 bindenden, zellulären Faktoren wurde in Hefe-One-Hybrid- Experimenten das Tumorsuppressorprotein p53 als ein möglicher, M29-Motiv bindender Faktor identifiziert (Haigis, 1998). Die p53-Bindestequence wird in der Literatur als ein Dimer des Sequenzdekamers PuPuPuC(A/T)/(T/A)GPyPyPy beschrieben, wobei die Einzelelemente bis zu 13 Basenpaare auseinander liegen können (El-Deiry et al., 1992). Die mögliche Bindestelle für p53 in M29 stimmt weitgehend mit der Konsensusbindestelle überein, wobei aber die beiden Sequenzdekamere sogar durch 14 Basenpaare getrennt sind (Abb. 11A). Um den direkten Nachweis der Bindung zu erbringen, wurden Gel-Retardationsexperimente durchgeführt. Hierfür translatierte man das p53-Protein *in vitro* und inkubierte es mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem, doppelsträngigem M29com-Oligonukleotid. Die Proben wurden zusätzlich mit dem p53-Antikörper pAb421 inkubiert, welcher am C-Terminus von p53 bindet und dessen „spezifische DNA-Bindeaktivität“ durch Konformationsänderung des Proteins stimuliert (Helander et al., 1993). p53 ist in der Lage, eine direkte Protein-DNA-Interaktion mit dem M29-Sequenzelement einzugehen (Spur 3). Die Bindung konnte durch Zugabe von nichtradioaktiv markierten, homologen Kompetitoren M29com (Spur 4) und p53+c (Spur 5), die aktive p53-Bindestellen tragen, unterbunden werden. Bei Zugabe der unspezifischen Kompetitoren Sp1 (Spur 6) und p53-c (Spur 7), die keine bzw. eine mutierte p53-Bindestelle enthielten, konnte die p53-M29-Bindung nicht unterbunden werden. Diese Daten beweisen, dass das im Hefe-One-Hybrid-System identifizierte p53 ein direkt M29 bindender, zellulärer Faktor ist.

A



**B**



9

**Abb. 11: p53 bindet an das M29-Sequenzmotiv von HPV8.**

(A): Vergleich der p53-Konsensusbindestelle und der möglichen Bindestelle für p53 im M29- Sequenzelement. R: A oder T; W: A oder T; Y: C oder T. (B): 250ng einer  $^{32}$ P markierten DNA Probe, die die M29-Sequenz umfaßt, wurde mit *in vitro* translatiertem p53 inkubiert. Das Symbol + bzw. - bedeutet eine bzw. keine Zugabe von angegebenen Komponenten im Reaktionsansatz. Durch Zugabe des Antikörpers pAb421 wurde die spezifische DNA- Bindeaktivität des p53 aktiviert, wonach es direkt an die M29-Sequenz band (Spur 3). Die Spezifität des p53-M29-Komplexes wurde durch Zugabe von unmarkierten M29com bzw. p53+c Oligonukleotiden, die aktive p53-Erkennungssequenzen tragen, als homologe Kompetitoren (Spur 4 und 5) und SP1 bzw. p53-c als heterologe Kompetitoren (Spur 6 und 7) in einem 100-fachen Überschuß nachgewiesen. Die Position des p53-DNA-Komplexes ist mit einem Pfeil markiert.

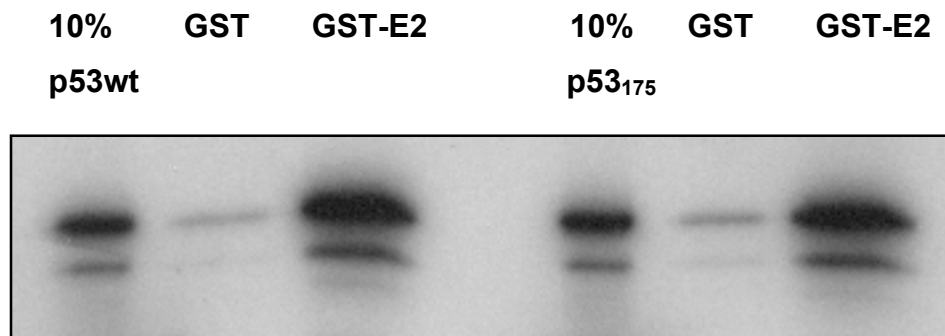
#### 4.4 Analyse der Interaktion zwischen p53 und den Replikationsproteinen E1 und E2

In einer früheren Untersuchung konnte die Überexpression von Wildtyp p53 im transienten Replikationstest die DNA-Replikation von HPV8 inhibieren, wohingegen die DNA-bindedefekte Mutante p53<sub>175</sub> die Replikation nicht unterdrückte (Akgül, 1999). Zur Untersuchung einer möglichen Protein-Protein-Interaktion von p53 mit den HPV8-Replikationsfaktoren E1 und E2 wurden diese als Glutathion-S-Transferase (GST-)-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, an Matrix gekoppelte Glutathion-S-Sepharose gebunden und mit *in vitro* transkribiertem, translatiertem und <sup>35</sup>S-Methionin markiertem p53-Protein inkubiert. Nach Entfernen der unspezifisch gebundenen Proteine durch mehrmaliges Waschen wurden die Protein-Protein-Komplexe elektrophoretisch über SDS-PAGE getrennt und das gebundene p53-Protein autoradiographisch nachgewiesen. Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, konnte Wildtyp-p53 an GST-E2 anbinden, wohingegen keine Bindung an GST-E1 oder GST alleine detektiert werden konnte. Auch die p53-Mutante p53<sub>175</sub> konnte in diesen Experimenten mit derselben Intensität wie p53wt an E2 binden (Abb. 13). Somit scheint die Repression der HPV8-DNA-Replikation nicht durch die Bindung von p53 an E2 verursacht worden zu sein, da auch die DNA-bindedefekte Mutante p53<sub>175</sub>, die die DNA-Replikation von HPV8 Konstrukten nicht mehr inhibierte, an E2 bindet.



**Abb. 12: Interaktion von p53 mit HPV8-E1 und -E2 *in vitro*.**

Die GST-E1 und GST-E2 Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert, mit *in vitro* translatiertem <sup>35</sup>S-markiertem p53 inkubiert, die Proteinkomplexe mit 250 mM KCl Puffer gewaschen, auf einer SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch nachgewiesen. 10% der in den Experimenten eingesetzten p53-Menge wurden als Positivkontrolle auch auf das Gel aufgetragen.

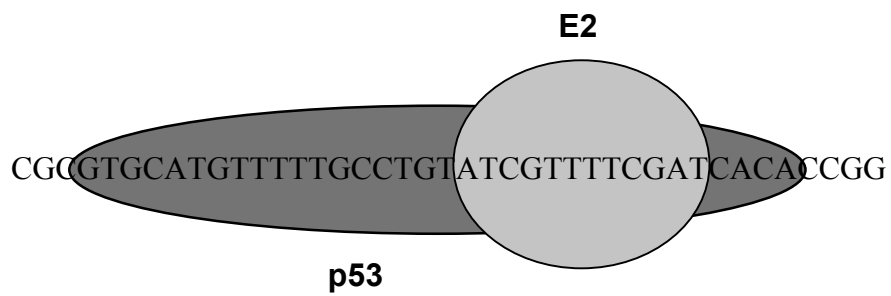


**Abb.13: Interaktion von HPV8-E2 mit p53wt und p53<sub>175</sub>.**

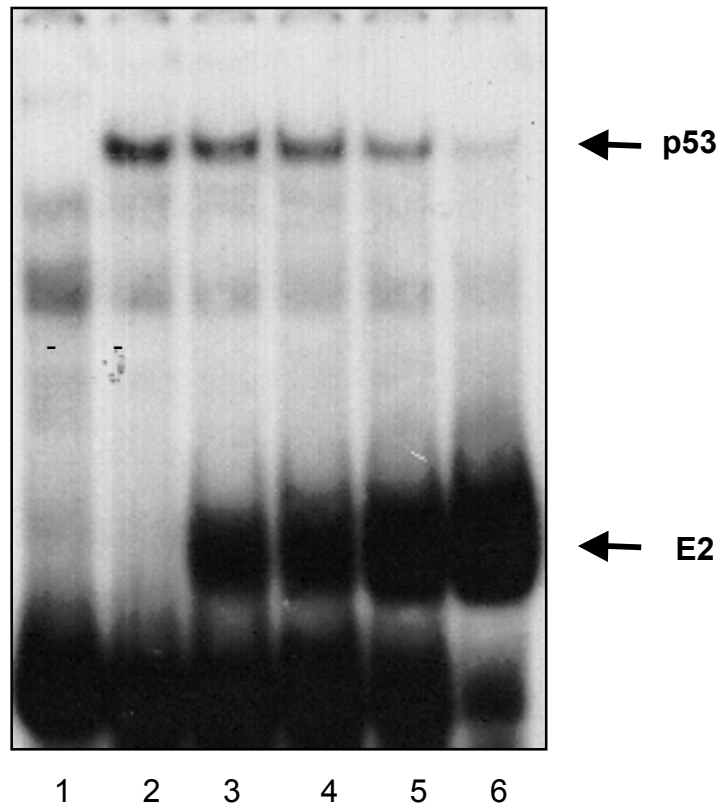
GST und GST-E2 wurden in Bakterien exprimiert, mit *in vitro* translatiertem S35-markiertem p53wt bzw. p53<sub>175</sub> inkubiert, die Proteinkomplexe mit 250 mM KCl Puffer gewaschen, auf einer SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch nachgewiesen. 10% der in den Experimenten eingesetzten p53 Menge wurde als Positivkontrolle auch auf das Gel aufgetragen.

#### 4.5 Einfluss von HPV8-E2 auf die Bindung von p53 an seine Bindestelle in M29

Wie bereits erwähnt, binden das zelluläre p53 und das virale HPV8-E2-Protein an Sequenzen in M29. Der Abb. 14 kann man entnehmen, dass diese neu identifizierten Bindestellen überlappen. Aufgrund dieser Befunde sollte in Gel-Retardations-Experimenten untersucht werden, ob E2 in der Lage ist, gleichzeitig mit p53 an M29 zu binden. In den jeweiligen Reaktionsansätzen wurde zunächst *in vitro* translatiertes p53 mit dem doppelsträngigen, [<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotid M29com inkubiert und dazu anschließend der p53-Antikörper pAb421 pipettiert, um die spezifische DNA-Bindeaktivität von p53 zu aktivieren. Danach wurden steigende Mengen gereinigten HPV8-E2-Proteins zugegeben. Es ist zu erkennen, daß p53 und E2 an M29 anbinden, aber große Mengen des E2 das p53 von seiner Bindestelle verdrängen (Abb. 14). Die komplette Verdrängung trat jedoch erst bei sehr hohen Mengen von E2 ein. Bei Zugabe beider Proteine konnte kein ternärer langsam laufender Komplex nachgewiesen werden, der auf eine Interaktion zwischen p53, E2 und DNA zurückgeführt werden könnte. Mit diesen Experimenten ist gezeigt, dass p53 und E2 an M29 anbinden können, und dass hohe Mengen von E2 das an M29 gebundene p53-Protein verdrängen können.



|                |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|
| <b>HPV8-E2</b> |   |   |   |   |   |   |   |
| <b>pAb421</b>  | + | + | + | + | + | + | - |
| <b>p53</b>     | - | + | + | + | + | + | - |

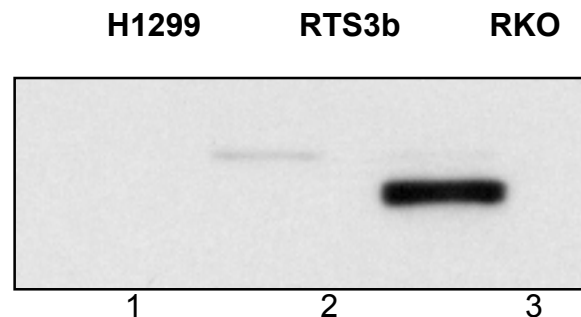


**Abb. 14: Bindung von E2 und p53 an das M29-Element.**

(A): Überlappung der p53- und E2-Bindestellen in M29 von HPV8. Die p53-Bindesequenz ist mit einer Ellipse und die E2-Erkennungssequenz mit einem Kreis hervorgehoben. (B): Die Menge an *in vitro* translatiertem p53 wurde konstant gehalten (Spuren 2-6) und die Menge an HPV8-E2 stetig erhöht (Spuren 3-6). Die Positionen der p53-DNA bzw. E2-DNA Komplexe sind mit einem Pfeil markiert.

#### 4.6 Kooperativer Einfluss von p53 und E2 auf die Aktivität des frühen Promotors P<sub>175</sub> von HPV8 in RTS3b-Zellen

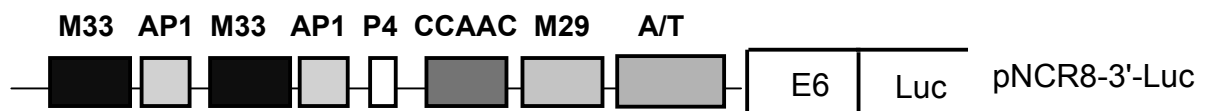
Das M29-Sequenzmotiv von HPV8 ist ein essentielles Sequenzmotiv für die DNA-Replikation von HPV8 (Abb. 9) und stellt zugleich auch ein Kernelement des frühen Promotors P<sub>175</sub> von HPV8 dar (Stubenrauch et al., 1992; Pajunk et al., 1997). Ob die Interaktion von p53 und E2 funktionelle Konsequenzen auf die Promotoraktivität hat, sollte in Reporter-gen-Untersuchungen analysiert werden. In Vorbereitung dieser Versuche wurde zuerst der p53-Status der Keratinozytenlinie RTS3b bestimmt, in der die Transfektionen durchgeführt werden sollten. Kernextrakte aus diesen Zellen und aus H1299 (eine Lungenepithelzelllinie, die endogen kein p53 exprimiert) und RKO Zellen (Kolonkarzinomzellen, die endogen Wildtyp-p53 enthalten) wurden im Western-Blot analysiert. Das Ergebnis mit dem gegen p53 gerichteten Antikörper DO-1 verdeutlichte, dass H1299-Zellen kein p53 (Spur 1) bzw. RKO-Zellen p53 exprimieren (Spur 3). Man erkennt auch, dass RTS3b-Zellen endogen kein p53 exprimieren (Spur 2), und somit für die Untersuchung der HPV-Promotorregulation durch Überexpression von exogenem p53 geeignete Keratinozyten darstellen.



**Abb.15: Nachweis der p53-Expression in H1299, RKO und RTS3b Zellen.** Jeweils 30 µg Gesamt-Proteinextrakte aus den Zelllinien H1299, RKO und RTS3b wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf ein Nitrozellulosefilter transferiert. Mittels Western-Blot-Analyse mit dem monoklonalen, gegen p53 gerichteten Antikörper DO-1 wurde p53 mit dem ECL-System nachgewiesen.

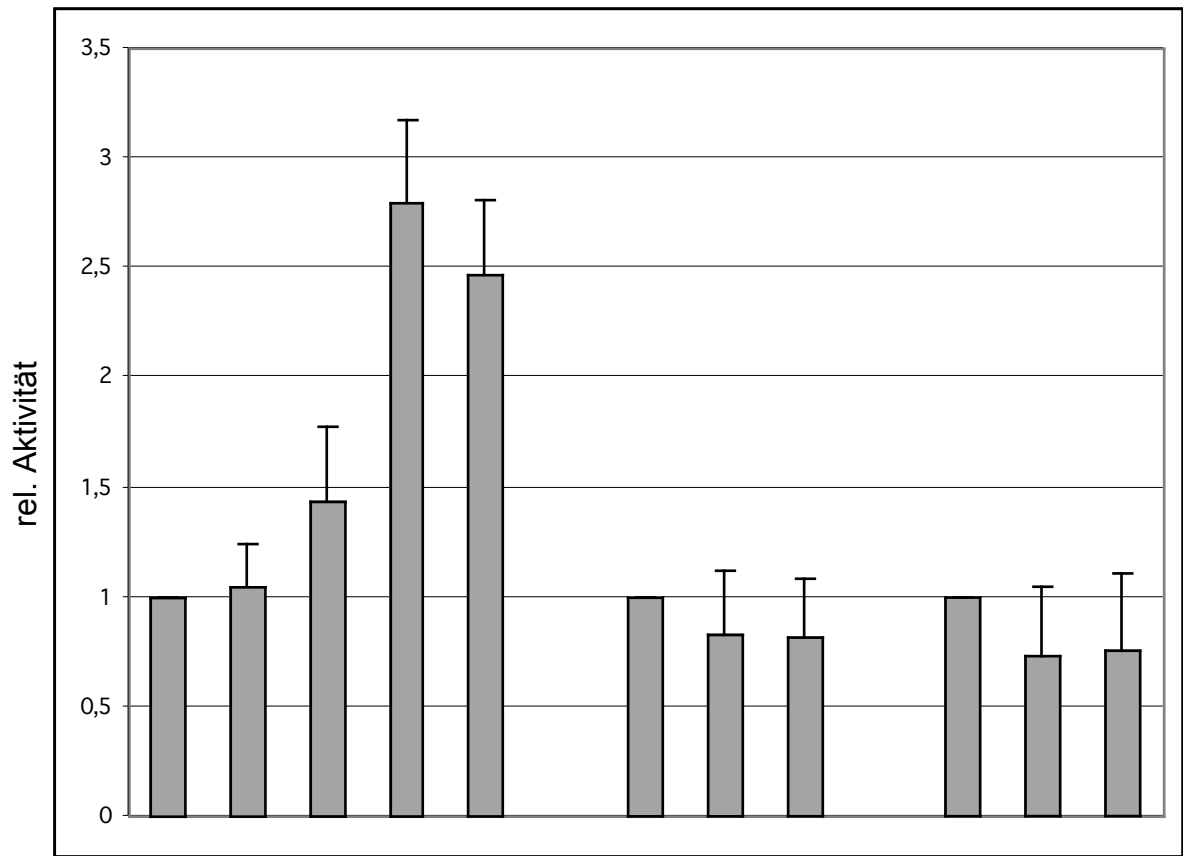
Für die Reporteragen-Analyse wurde pNCR8-3'-Luc, das den 3'-Bereich der HPV8-NCR stromaufwärts zum Luciferasegen enthält (Hoberg, 2000), mit dem p53-Expressionsvektor pCp53wt in RTS3b-Zellen transfiziert. Das pNCR8-3'-Luc enthält ein Dimer des HPV8-Enhancers M33/AP1 (Horn et al., 1993) vor dem NCR-Fragment, um die sehr schwache Aktivität des frühen Promotors zu verstärken (Abb. 16A). Mit steigenden pCp53wt-Mengen war eine bis zu 2,8-fache Stimulierung der Luciferaseexpression zu erreichen. Wenn das Luciferasekonstrukt pNCR8-3'-Lucp53mut mit Wildtyp-p53-Expressionsplasmid kotransfiziert wurde, konnte keine Stimulierung der Promotoraktivität beobachtet werden. Zu demselben Ergebnis kam man auch, wenn das pNCR8-3'-Luc Konstrukt mit einem Expressionsvektor kotransfiziert wurde, welcher die DNA-bindedefekte Mutante kodiert (pCp53<sub>175</sub>) (Abb. 16B). Diese Transfektionsexperimente weisen daraufhin, dass p53 ein Aktivator des frühen Promotors ist, und dass für die Promotoraktivierung p53 an seine Bindestelle in M29 binden muss. Um den Einfluss von E2 auf die p53 vermittelte Promotoraktivierung zu untersuchen, wurde der E2-Expressionsvektor pCE2 kotransfiziert. Steigende Mengen an pCE2 erhöhten die Promotoraktivität bis auf das 6-fache, wohingegen E2 alleine die Promotoraktivität nur um das Zweifache steigerte (Abb. 17). p53 und E2 können somit den frühen Promotor von HPV8 kooperativ stimulieren.

**A**





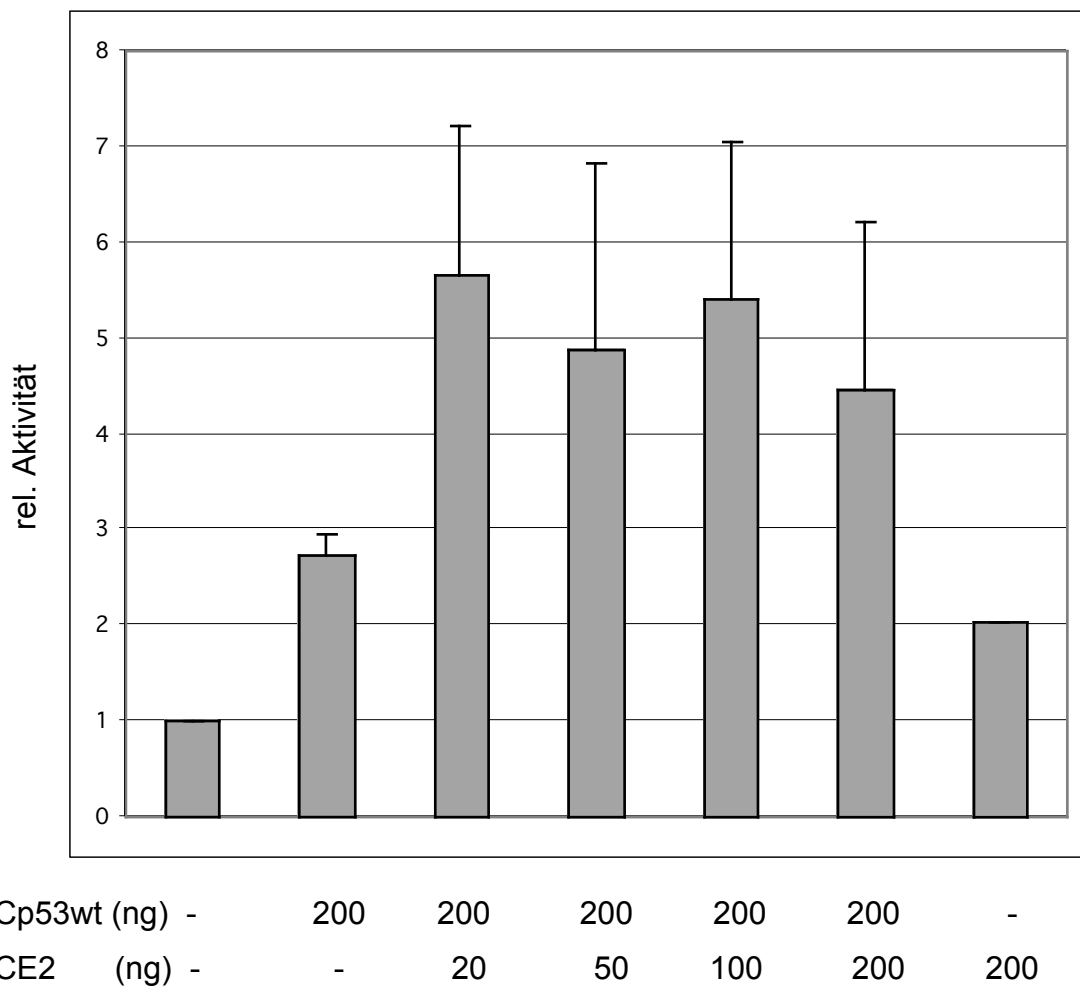
**B**



|                           |              |    |    |                    |     |   |              |     |   |     |     |
|---------------------------|--------------|----|----|--------------------|-----|---|--------------|-----|---|-----|-----|
| pCp53wt (ng)              | 0            | 10 | 50 | 100                | 200 | 0 | 100          | 200 | - | -   | -   |
| pCp53 <sub>175</sub> (ng) | -            | -  | -  | -                  | -   | - | -            | -   | 0 | 100 | 200 |
| Reporterplasmid           | pNCR8-3'-Luc |    |    | pNCR8-3'-Lucp53mut |     |   | pNCR8-3'-Luc |     |   |     |     |

**Abb. 16: p53 aktiviert den frühen Promotor von HPV8.**

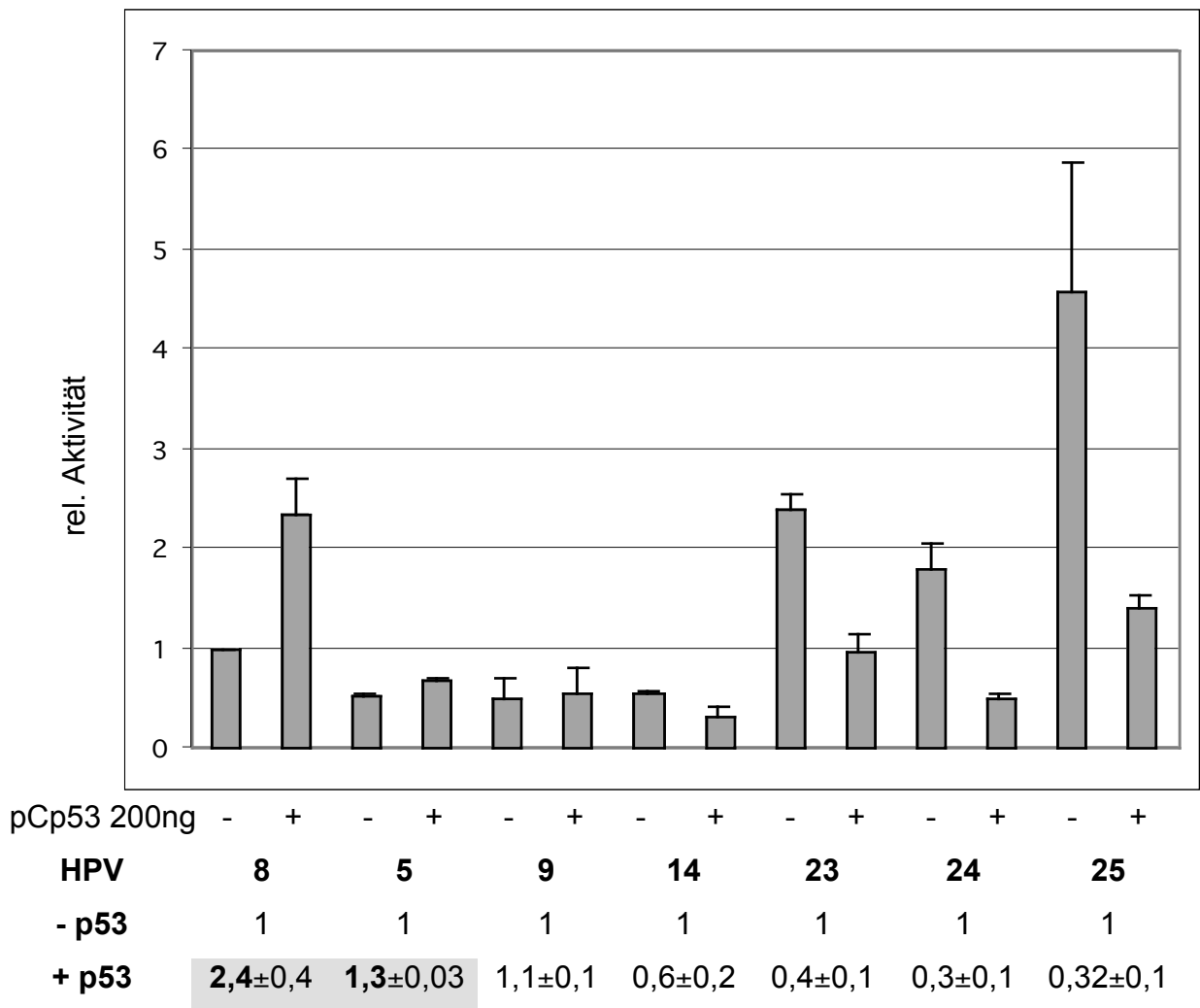
(A): Graphische Darstellung der HPV8-Sequenzelemente, die in den Vektor pNCR8-3'-Luc kloniert wurden. Die Symbole stellen die Lage der Sequenzmotive M33/AP1, CCAAC, M29, A/T und Bindestellen für E2 dar. (B): p53-negative RTS3b-Zellen wurden mit den Reporterplasmiden pNCR8-3'-Luc bzw. pNCR8-3'-Lucp53mut, mit pCMV- $\beta$ -Gal und Expressionsplasmiden für p53 (pCp53wt, pCp53<sub>175</sub>) wie angegeben kotransfiziert. Die endgültige Menge an Expressionsvektor mit CMV-Promotor wurde mit "leerem" Expressionsvektor konstant gehalten. Die Luciferaseaktivität wurde mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normalisiert. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionen berechnet.



**Abb. 17: Einfluss von HPV8-E2 und p53 auf die Aktivität des frühen Promotors von HPV8.** RTS3b-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pNCR8-3'-Luc, sowie mit unterschiedlichen Mengen der Expressionsplasmide für HPV8-E2 (pCE2) und Wildtyp-p53 (pCp53wt) cotransfiziert. Als Referenz wurde die Luciferase-Aktivität des Reporterplasmids ohne Cotransfektion gleich 1 gesetzt. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionen berechnet.

#### 4.7 Einfluss von p53 auf die Promotoraktivität EV-assoziiierter HPVs

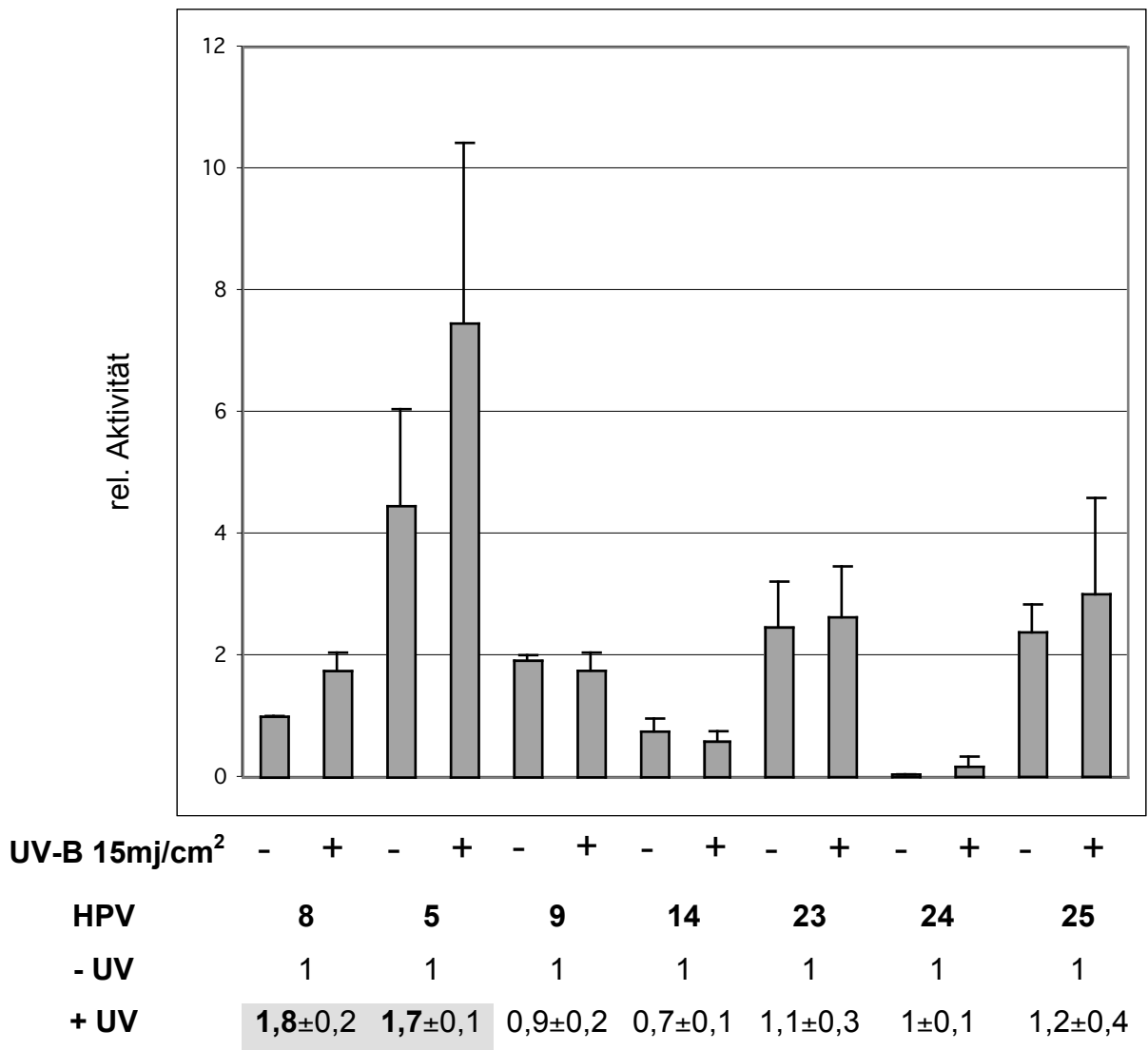
Da cotransfiziertes p53 den frühen Promotor von HPV8 aktivierte, sollte in Folgeexperimenten analysiert werden, ob die Aktivität der gesamten NCR von HPV8 und die anderer EV-assoziiierter PV auch durch p53 beeinflusst wird. Hierfür wurden auf pALuc basierende Luciferase-Testkonstrukte verwendet (pNCRX-Luc), in die die NCR von HPV5, 8, 9, 14, 23, 24 und 25 kloniert wurde (Lemme, 1998). Diese Viren sind EV-assoziierte HPVs und gehören aufgrund von Sequenzhomologien unterschiedlichen Untergruppen an (Ensser und Pfister, 1992). Die bereits in der Einleitung erwähnten HPV-Typen 5 und 8 sind mit makulösen Hautveränderungen assoziiert, die häufig maligne entarten (Pfister, 1992). HPV9 und 14 induzieren flache, warzenartige Hautveränderungen (Kremsdorf et al., 1982; Egawa et al., 1993). HPV9 wurde auch in einem Keratoakanthom entdeckt (Scheurlen et al., 1986). HPV23, 24 und 25 induzieren benigne, makulöse Hautveränderungen (Gassenmaier et al., 1984; Kremsdorf et al., 1984). Diese Luciferase-Testkonstrukte wurden mit dem p53-Expressionsvektor pCp53wt in RTS3b transfiziert und 24 Stunden später die relativen Luciferase-Expressionen ermittelt. Die Promotoraktivitäten der einzelnen HPV-Typen unterscheiden sich bis zu einer Zehnerpotenz. Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, aktivierte cotransfiziertes p53 die HPV8-NCR 2,4-fach und die HPV5-NCR 1,3-fach. Es war kein Einfluss von p53 auf die NCR9-Aktivität messbar, wohingegen die Promotoren von HPV14, 23, 24 und 25 reprimiert wurden. Der Transkriptionsfaktor p53 scheint ein Aktivator für die Transkription der onkogenen HPV-Typen 8 und 5 zu sein.



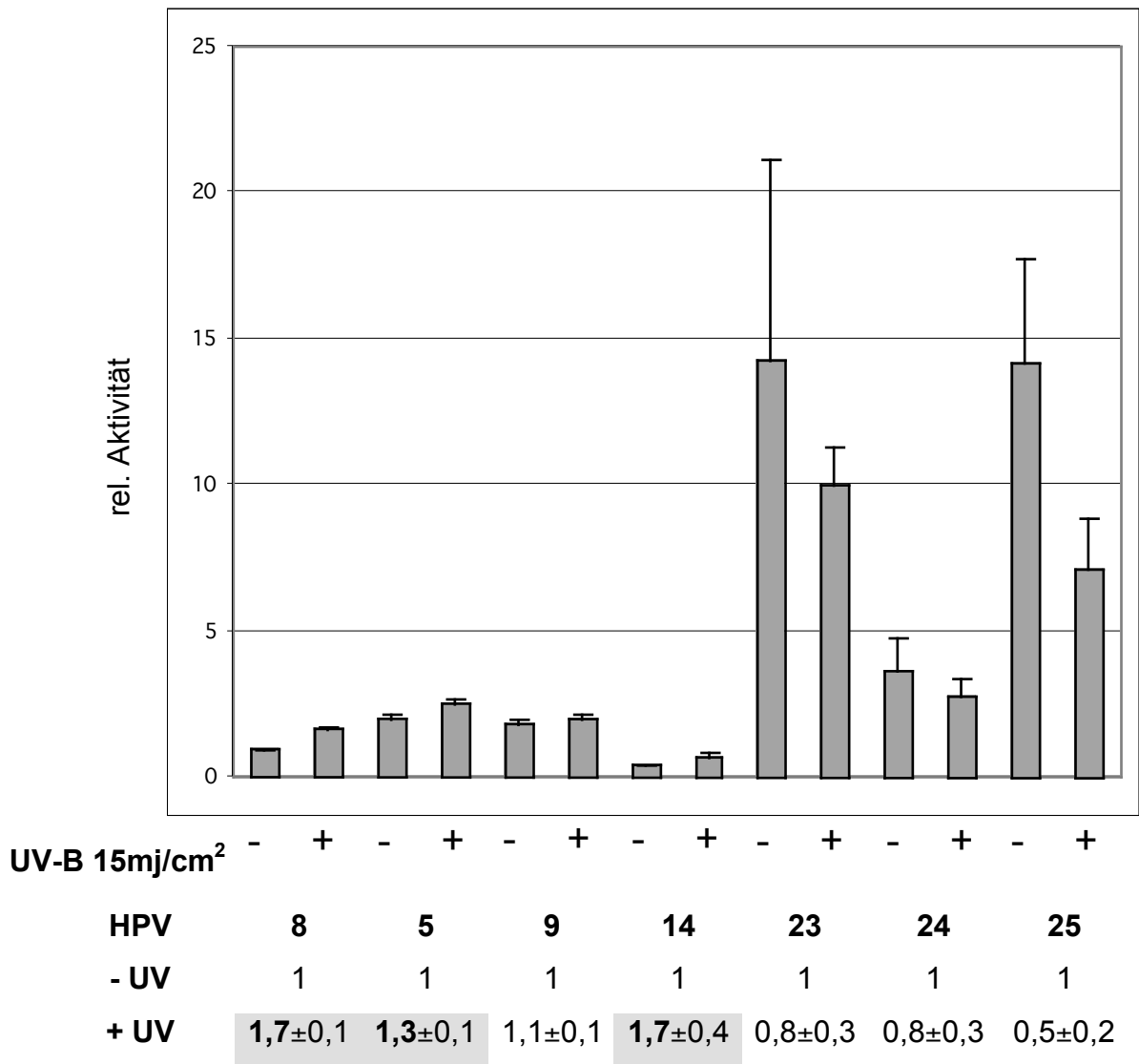
**Abb.18: Einfluss von p53 auf die Promotor-Aktivität EV-assoziiierter HPVs.** RTS3b-Zellen wurden mit Luciferasekonstrukten, die die NCR-Regionen von HPV8, 5, 9, 14, 23, 24 und 25 trugen, mit 200ng pCp53wt bzw. 200ng pCMV-1 (Leervektor) transfiziert. Das Diagramm zeigt Durchschnittswerte von 3 unabhängigen Experimenten, wobei die Luciferaseaktivitäten der verschiedenen EV-HPVs im Verhältnis zu Leervektor transfiziertem pNCR8-Luc und in der Tabelle die Luciferaseaktivitäten der jeweiligen mit Leervektor transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt wurden. Die Luciferaseaktivität wurde mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normalisiert.

#### 4.8 Einfluss von UV-B-Licht auf die Promotoraktivität EV-assoziiierter HPVs

UV-Licht ist an der Entstehung von NMSC beteiligt (Kiviat, 2000). Epidermodysplasia verruciformis Patienten entwickeln besonders an sonnenlichtexponierten Hautstellen virusinduzierte Plattenepithelkarzinome. Dieses Phänomen weist auf eine synergistische Wirkung des UV-Lichtes bei der EV-Karzinogenese hin. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob UV-Licht einen direkten Einfluss auf die Transkription verschiedener EV-HPVs hat. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Luciferase-Testkonstrukte, die die NCR verschiedener EV-HPVs beinhalten, in primäre kutane Hautkeratinozyten und in die Keratinozytenzelllinie RTS3b transfiziert, die Zellen mit UV-B-Licht bestrahlt und die relative Luciferase-Expression ermittelt. Die transfizierten Zellen wurden nach 16 h mit einer UV-B-Dosis von  $15\text{mj}/\text{cm}^2$  bestrahlt und 24 h später geerntet, um die Luciferase-Proteinexpression auszuwerten. Diese Versuchparameter wurden in ersten Testtransfektionen ermittelt. Der Dosisbereich von  $15\text{mj}/\text{cm}^2$  weist *in vitro* eine vernachlässigbare Zytotoxizität auf und ist von physiologischer Relevanz, da UV-B-Strahlung von dieser Intensität *in vivo* bis zu den basalen Keratinozyten der humanen Haut durchdringt (Herzinger *et al.*, 1995). Experimente in primären Zellen zeigten eine ca. 1,5-fache Stimulierung der pNCR8-Luc und pNCR5-Luc Aktivität nach UV-B-Bestrahlung, während die NCRs von HPV9, 14, 23, 24 und 25 nicht stimuliert werden konnten (Abb. 19). In RTS3b Zellen hingegen konnte nur für pNCR8-Luc eine ca. 1,5-fache Steigerung der Promotoraktivität gemessen werden. Durch das UV-B-Licht wurde die NCR-Aktivität von HPV5 nur 1,2-fach stimuliert. Die NCRs von HPV9, 23, 24 und 25 wurden wiederum nicht aktiviert. In diesen Zellen konnte bei pNCR14-Luc allerdings eine Stimulierung und für pNCR25-Luc eine signifikante Repression der Promotoraktivität gemessen werden (Abb. 20).



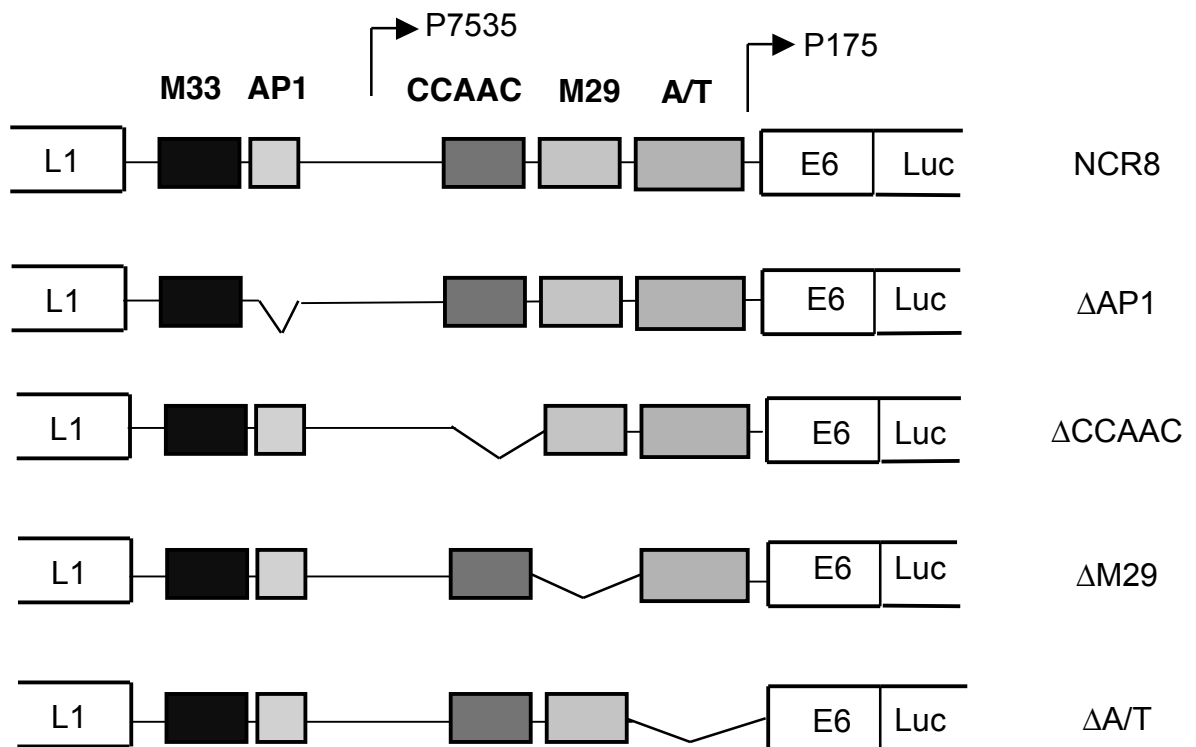
**Abb. 19: Einfluss von UV-B Licht auf die Promotoraktivität EV-assoziierter PV in primären Hautkeratinozyten.** Das Diagramm zeigt Durchschnittswerte von 3 unabhängigen Experimenten in primären kutanen Keratinozyten, wobei die Luciferaseaktivitäten der verschiedenen EV-HPVs im Verhältnis zu unbestrahlten, pNCR8-Luc transfizierten Zellen und in der Tabelle die relativen Luciferaseaktivitäten der jeweiligen nicht bestrahlten Kontrollen gleich 1 gesetzt wurden. Die Luciferaseaktivität wurde mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normalisiert.



**Abb. 20: Einfluss von UV-B Licht auf die Promotoraktivität EV-assoziiertes PV in RTS3b-Zellen.** Das Diagramm zeigt Durchschnittswerte von 3 unabhängigen Experimenten in RTS3b Zellen, wobei die Luciferaseaktivitäten der verschiedenen EV-HPVs im Verhältnis zu unbestrahlten pNCR8-Luc transfizierten Zellen und in der Tabelle die relative Luciferaseaktivitäten der jeweiligen nicht bestrahlten Kontrollen gleich 1 gesetzt wurden. Die Luciferaseaktivität wurde mit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität normalisiert.

#### 4.9 Bedeutung von EV-spezifischen Sequenzmotiven für die UV-B-abhängige Stimulierung der HPV8-Transkription

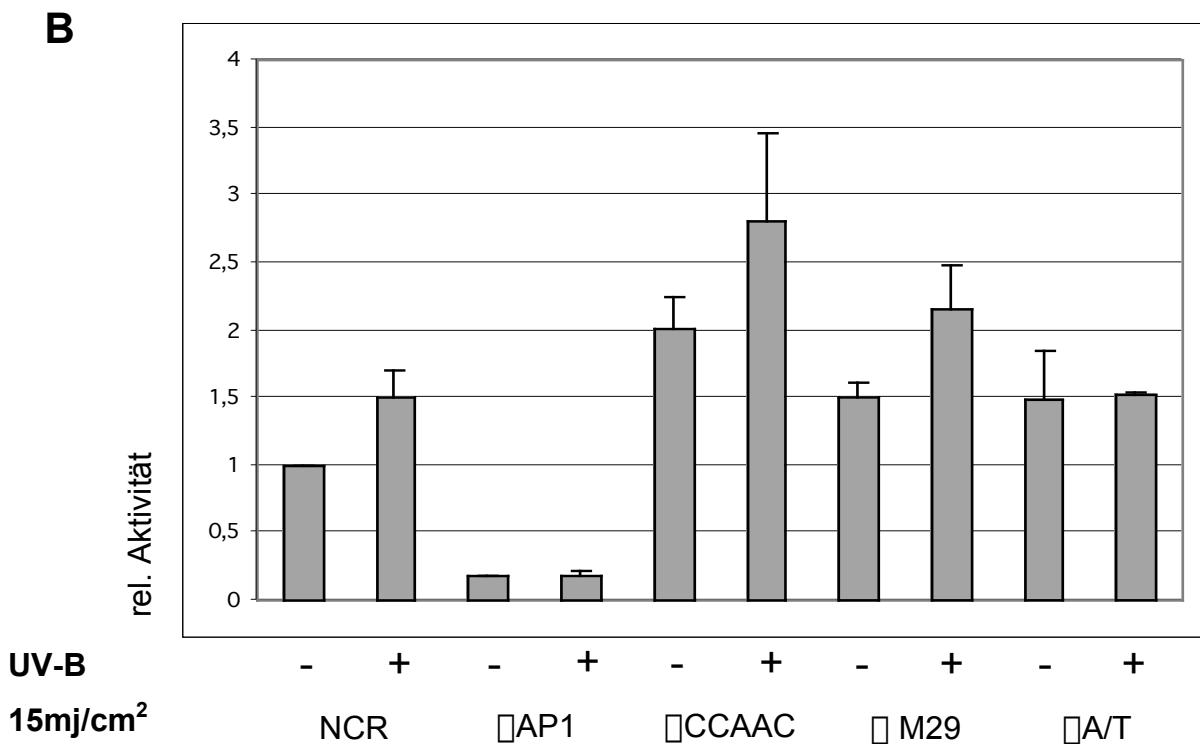
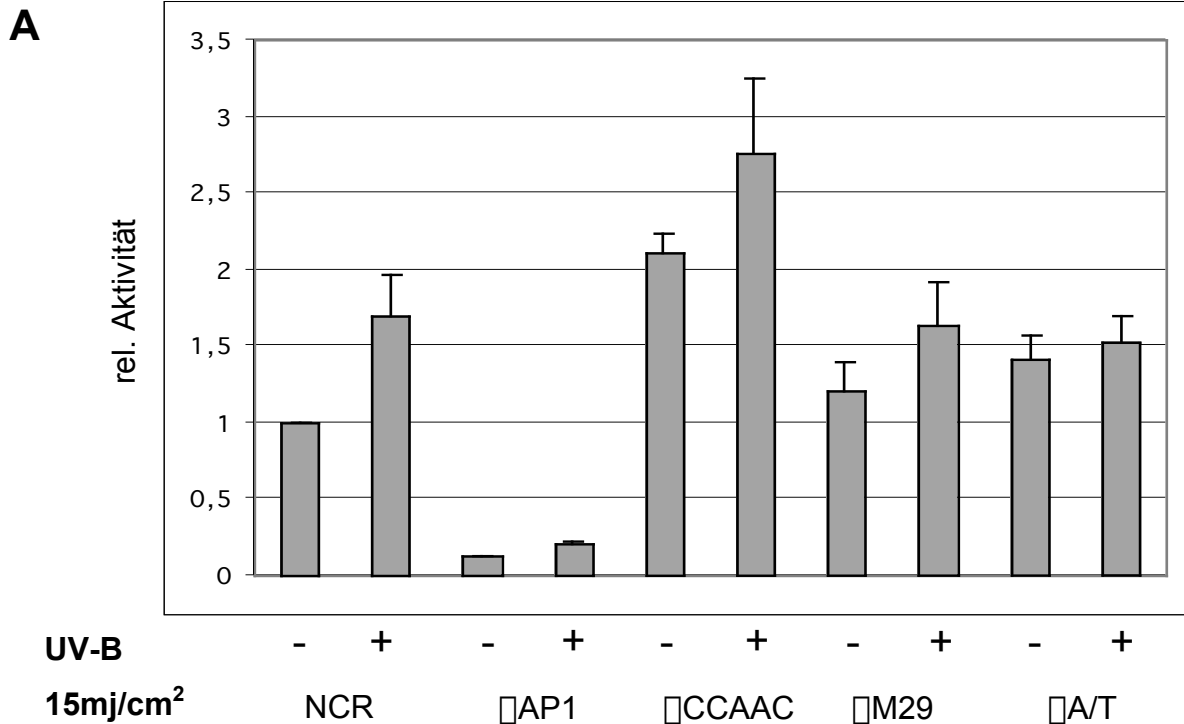
Da die NCR von HPV8 in Keratinozyten aktiviert werden konnte, sollte das Sequenzelement herausgefunden werden, welches die beobachtete UV-B-Antwort vermittelt hatte. Hierfür wurden NCR-Mutanten mit Deletionen der EV-spezifischen Sequenzelemente AP1, CCAAC, M29 und A/T auf ihre Promotoraktivitäten nach UV-B-Bestrahlung untersucht. Da die Deletion des AP1-Motivs zum Verlust der Grundaktivität des Konstruktes führte, konnten keine brauchbaren Daten für die AP1-Mutante erzielt werden. Das Wildtypkonstrukt pNCR8-Luc und die Deletionsmutanten pNCR8-Luc $\Delta$ CCAAC, pNCR8-Luc $\Delta$ M29 (Abb. 21) wurden durch UV-B in primären Keratinozyten und RTS3b-Zellen in ihren Promotoraktivitäten stimuliert (Abb. 22). Dagegen war nach UV-B-Bestrahlung die Steigerung der Aktivität des pNCR8-Luc $\Delta$ A/T deutlich geringer oder sogar nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass möglicherweise das A/T-Sequenzmotiv bei der UV-B vermittelten Promotoraktivität von HPV8 ein Rolle spielt.



**Abb. 21: Schematische Darstellung der HPV8-NCR-Deletionsmutanten.**

Ausgehend von pNCR8-Luc wurden die EV-HPV spezifischen Sequenzmotive AP1, CCAAC, M29 und A/T mittels PCR deletiert.





**Abb. 22: Vergleichende Darstellung der relativen Promotoraktivitäten der Wildtyp-NCR und von NCR-Deletionsmutanten von HPV8 in primären Keratinozyten (A) und RTS3b-Zellen (B) nach UV-B Bestrahlung.**

#### 4.10 Etablierung organotypischer raft-Kulturen

Die starke Anpassung des viralen Vermehrungszyklus' an den Differenzierungsstatus der Wirtszelle gestaltete die Suche nach einem geeigneten Zellkultursystem für Papillomviren schwierig. Eine bessere Ergänzung zu Monolayer-Zellkulturen, in denen mit undifferenzierten Zellen gearbeitet wird, sind sogenannte organotypische raft-Kulturen, die eine Art künstliche Haut bilden. Sie bestehen aus dermalen Komponenten und epidermalen Keratinozyten. Durch Induktion der Keratinozyten-Differenzierung an der Luft-Medium-Grenze wird eine mehrschichtige Epidermis mit Verhornungsschicht (Stratum corneum) gebildet (Bell et al., 1983; Prunerias et al., 1983). Dieses dreidimensionale Hautmodell kommt in seiner Struktur und Funktion der lebenden, natürlichen Haut sehr nahe. In diesem System werden Keratinozyten entweder auf einer deepidermierten humanen Dermis (DED) oder auf Kollagen als Matrix ausgesät, die dann auf Metallgitter an der Luft-Medium-Grenze inkubiert werden. So wird im Vergleich zu Monolayer-Kulturen eine komplette Differenzierung der Keratinozyten erreicht.

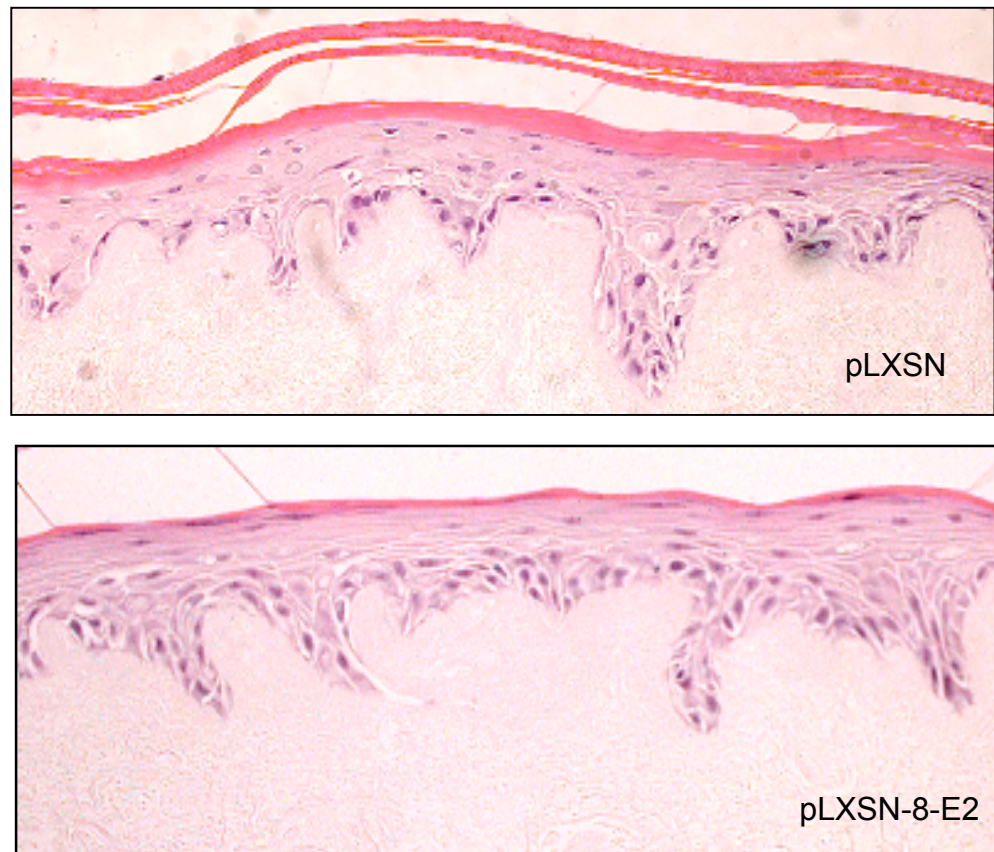
Das raft-Kultur-System wurde erstmals von McCance und Mitarbeitern (1988) für eine Studie der Papillomviren genutzt. Mit HPV16-DNA transfizierte Vorhaut-Keratinozyten bildeten in der raft-Kultur zwar mehrere Zellschichten, zeigten aber ein anderes Differenzierungsmuster als nichttransfizierte Zellen. Interessanterweise glichen die Differenzierungsabnormalitäten histologisch denen anogenitaler intraepithelialer Neoplasien in vivo. Für die HPV-spezifischen Effekte in raft-Kulturen konnten die E6- und E7-ORFs von HPV18 als notwendig und ausreichend identifiziert werden (Hudson et al., 1990).

Bislang existieren keine Arbeiten mit primären Hautkeratinozyten, die die Rolle der frühen Genprodukte der EV-assoziierten HPVs bei der kutanen Onkogenese zeigen. Das Ziel dieser Experimente war es, primäre Hautkeratinozyten, die frühe Proteine von HPV8 exprimieren, in raft-Kulturen einzusetzen, um den Einfluss der viralen Proteine auf die Keratinozyten-Differenzierung und -Morphologie zu studieren. Die raft-Kulturen wurden auf DED als Matrix angesetzt, da die Epidermis dieser rafts der normalen menschlichen Haut ähnlicher ist als bei solchen rafts, die auf Kollagen erstellt wurden (Regnier et al., 1981).

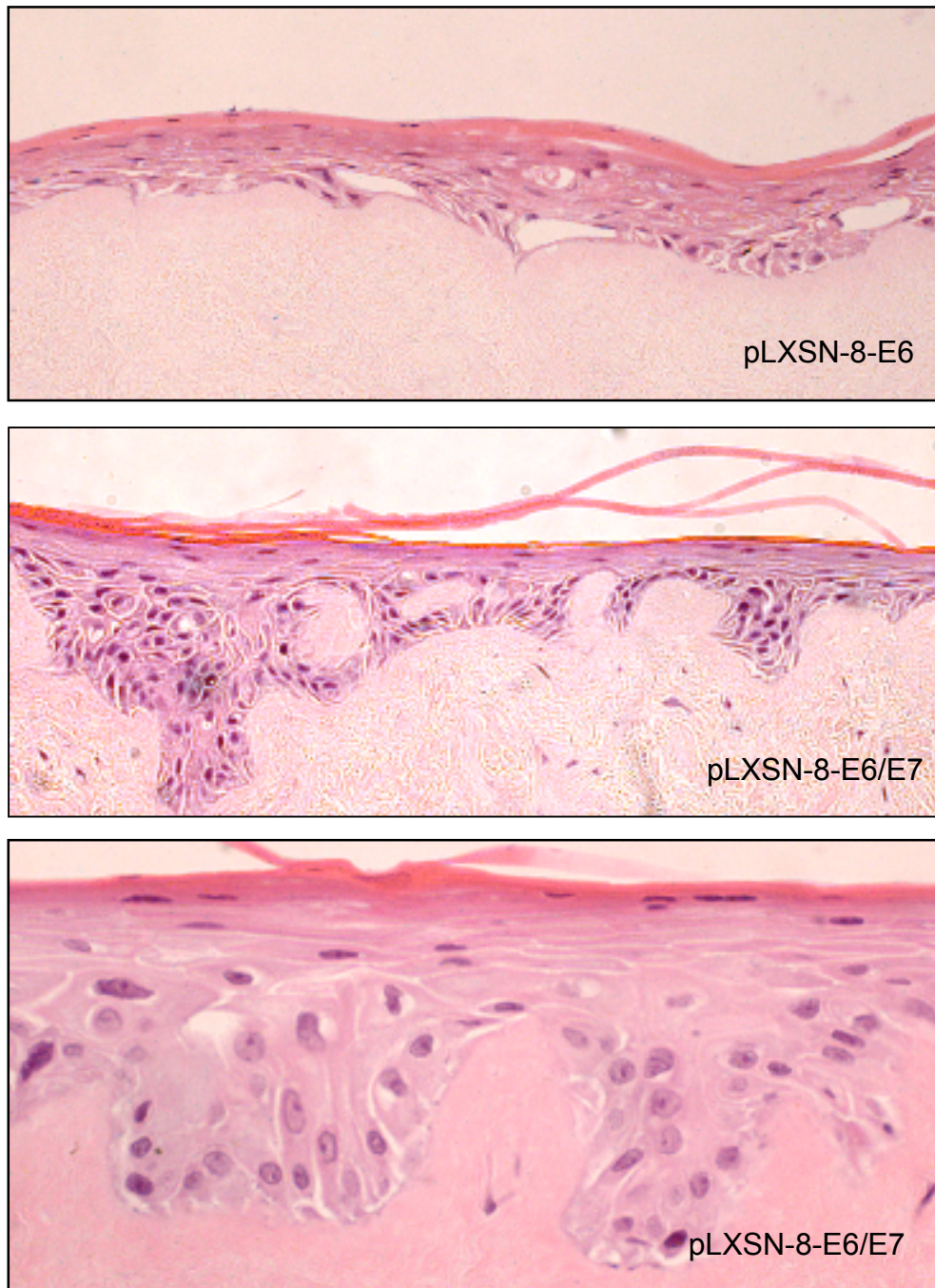
Hierfür wurden Keratinozyten der Passage 0 mit auf dem Vektor pLXSN basierenden rekombinanten Retroviren infiziert, die für E2, E6, E7 und E6/E7 von HPV8 kodieren. Nach anschließender Selektion auf erfolgreiche Infektion wurden

die Zellen dann, wie im Methodenteil beschrieben, auf die vorbereitete Dermis ausgesät und anschließend für 14 Tage auf einem Drahtgitter für 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze gehalten, um die Keratinozyten-Differenzierung zu stimulieren. Nach 2 Wochen wurden die raft-Kulturen in PBS-gepuffertem Formalin (10%ig) fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur morphologischen Untersuchung der rafts wurden 4  $\mu$ m dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt und mit Haematoxilin und Eosin gefärbt.

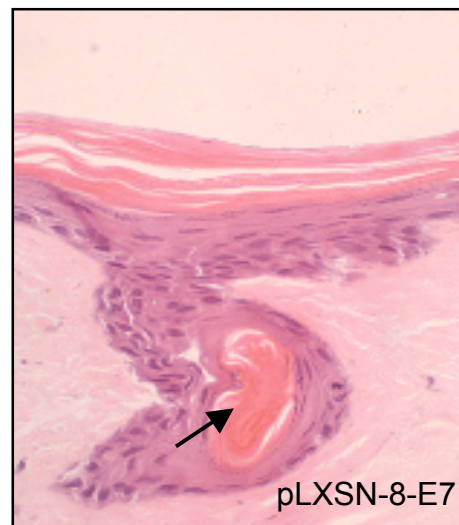
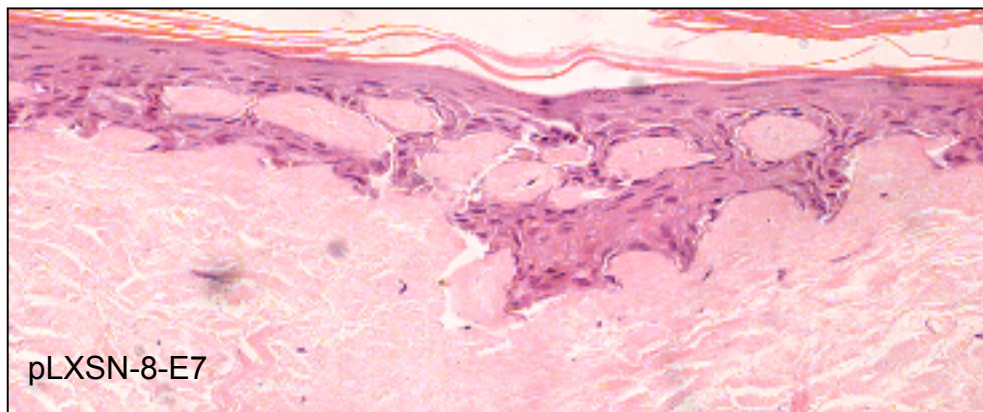
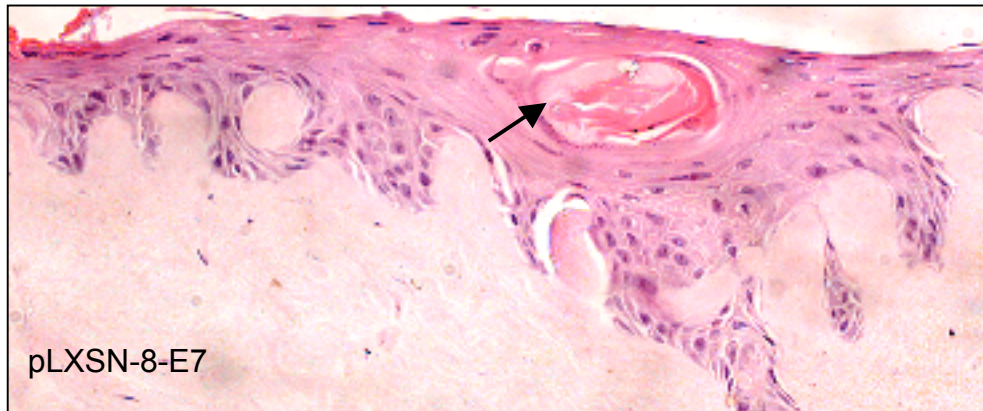
In den mit leerem retroviralem Vector pLXSN und pLXSN-8-E2 hergestellten raft-Kulturen erkennt man alle Stufen der Keratinozyten-Differenzierung, beginnend vom Stratum basale, über das Stratum spinosum, Stratum granulosum bis zur Ausbildung des Stratum corneum (Abb. 23). Die Expression der HPV8-Proteine E6, E7 und E6/E7 sorgten in den jeweiligen raft-Kulturen für die Aufhebung der normal geschichteten Architektur der Epidermis. In der E6 raft-Kultur findet man typischerweise basale Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma (Abb. 24). Die Epithelien sind auch parakeratotisch, was eine Differenzierungsstörung der Epidermis darstellt. Keratinozyten bauen dabei ihre Keratohyalin granula nicht ab und verlieren ihre Zellkerne bis ins Stratum corneum nicht. In der E7-raft-Kultur sind breite in die unterliegende Dermis eindringende Keratinozytenzapfen zu erkennen (Abb. 25). In derselben Kultur haben Zellen des Stratum spinosum sogenannte "Hornperlen" - auch "Tumorperlen" genannt - gebildet. Diese werden von konzentrisch und zwiebelschalenförmig gelagerten, verhornenden Zellen geformt. Diese zwei auffallenden Merkmale der E7-rafts, Vordringen von Keratinozyten in die Dermis und das Vorhandensein von Tumorperlen, sind charakteristisch für Plattenepithelkarzinome. Die E6/E7 raft-Kultur zeigte dysplastische, basale Zellen mit pleiomorphen Kernen (Abb. 24). Man fand Parakeratose wie in der E6-Kultur und auch Merkmale der E7-Kultur wie Vordringen von Keratinozyten in die Dermis und die Bildung von Tumorperlen, aber nicht so stark ausgeprägt im Vergleich mit der E7-raft-Kultur.



**Abb. 23: Histologie der raft-Kulturen von primären kutanen Keratinozyten, die mit rekombinanten für pLXSN bzw. pLXSN-8-E2 kodierenden Retroviren infiziert worden waren.** Keratinozyten wurden auf de-epidermierter Dermis ausgesät, auf deren Unterseite humane Fibroblasten angebracht waren. Die raft-Kulturen wurden 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze gehalten, anschließend in 10% Formamid fixiert und in Paraffin eingebettet. 5µm Schnitte wurden mit Haematoxilin und Eosin gefärbt.



**Abb. 24: Histologie der raft-Kulturen von primären kutanen Keratinozyten, die mit rekombinanten für pLXSN-8-E6 bzw. pLXSN-8-E6/E7 kodierenden Retroviren infiziert worden waren. 5µm Schnitte wurden mit Haematoxilin und Eosin gefärbt.**

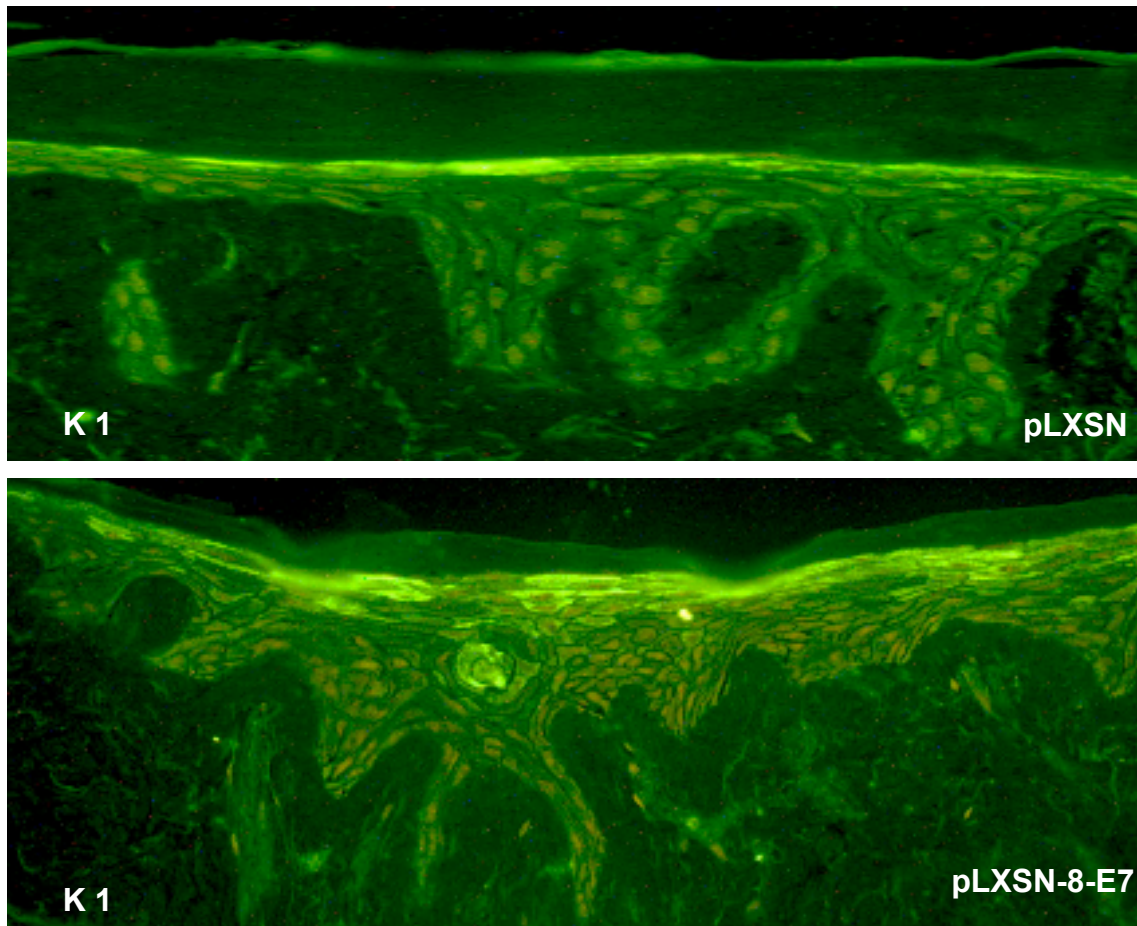


**Abb. 25: Histologie der raft-Kulturen von primären kutanen Keratinozyten, die mit rekombinanten für pLXSN-8-E7 kodierenden Retroviren infiziert worden waren. 5µm Schnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin gefärbt. Pfeile deuten auf Tumorperlen in den raft-Kulturen hin.**

#### 4.11 Untersuchung zur Zytokeratin-Expression in HPV8-E2, -E6, -E7 und -E6/E7 raft-Kulturen

Jede Epithelzelle exprimiert ein spezifisches Muster von Zytokeratinen als Teil des Zytoskeletts. Zytokeratine, kurz Keratine, gehören zur Klasse der Intermediärfilamente (Albert und Fuchs, 1992). Epithelien oder einzelne Epithelzellen können anhand ihres Keratinmusters charakterisiert werden. Zytokeratine gelten als Marker epithelialer Differenzierung, da ihre Expression vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig ist (Moll, 1991). Die Keratine 1/10 erscheinen in den suprabasalen Zellschichten des Epithels und sind somit Marker, welche die Einleitung der terminalen Differenzierung anzeigen (Holzmann et al., 1994). Bei Verletzung oder Hyperproliferation werden die (normalerweise in der Haut nicht vorkommenden) Keratine 6 und 16 exprimiert und stellen somit molekulare Marker für die Hyperproliferation von Keratinozyten dar (Weiss et al., 1984). In einigen hyperproliferierenden epidermalen Keratinozyten wird außerdem K17 exprimiert, das insbesondere in BCCs (Moll et al., 1982a) und SCCs (Proby et al., 1993) vermehrt vorkommt. Keratin 17 wird suprabasal in hyperproliferativen Läsionen und benignen Warzen exprimiert, erscheint basal und suprabasal in maligne transformierter Epidermis und wird daher als Marker für invasive Keratinozyten angesehen (Proby et al., 1993).

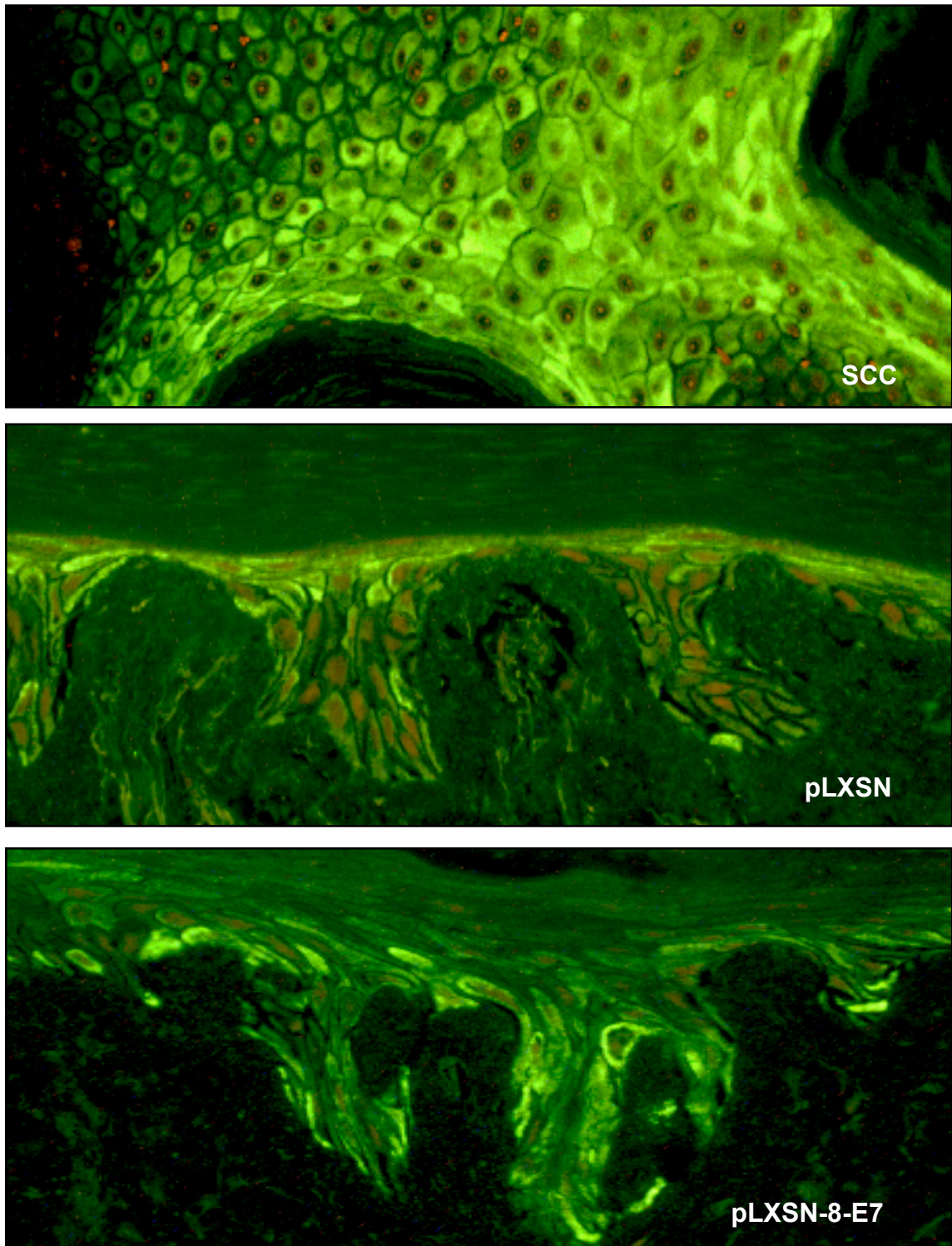
Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Veränderungen der Zytokeratine 1/10, 6/16, 17 und somit der Zelldifferenzierung in der Epidermis der HPV8-E2, -E6, -E7 und -E6/E7 rafts zu untersuchen. Das Keratinpaar 1/10 wird in den E2, E6, E6/E7 raft-Kulturen ausschließlich im Stratum granulosum gebildet. E7 allein hingegen induzierte eine verfrühte Expression von K1/10 im Stratum spinosum, was zeigt, daß E7 eine verfrühte Einleitung der terminalen Differenzierung in kutanen Keratinozyten bewirkt (Abb. 26). Keratine 6 und 16 werden in allen Kulturen exprimiert und verdeutlichen, daß raft-Kulturen hyperproliferative Zellsysteme darstellen (Daten nicht gezeigt). K17 wird, wie erwartet, stark in SCCs exprimiert. In der pLXSN raft-Kultur fand man K17 nur in den oberen suprabasalen Epidermisschichten, wohingegen in der E7 raft-Kultur zusätzlich eine intensive Expression in den basalen Zellen zu erkennen war, die in die Dermis invadieren (Abb. 27).



|       | K1                    | K10                   |
|-------|-----------------------|-----------------------|
| pLXSN | St. Granulosum<br>+++ | St. Granulosum<br>+   |
| E2    | St. Granulosum<br>+++ | St. Granulosum<br>+++ |
| E6    | St. Granulosum<br>+   | St. Granulosum<br>+   |
| E7    | St. Spinosum<br>++    | St. Spinosum<br>+++   |
| E6/E7 | St. Granulosum<br>+++ | St. Granulosum<br>+++ |

**Abb. 26: Immunhistochemische Färbungen der raft-Kulturen mit Antikörpern gegen Keratin 1 und 10.** Dargestellt sind die K1 Färbungen der pLXSN und pLXSN-8-E7 Kulturen. In der Tabelle sind die Färbungen aller raft-Kulturen gegen K1 und K10 zusammengefasst. Die Stärke der optisch festgestellten Färbung wurde von nicht sichtbar (-) bis sehr stark (+++) dargestellt. Gegenfärbung mit Propidiumjodid.

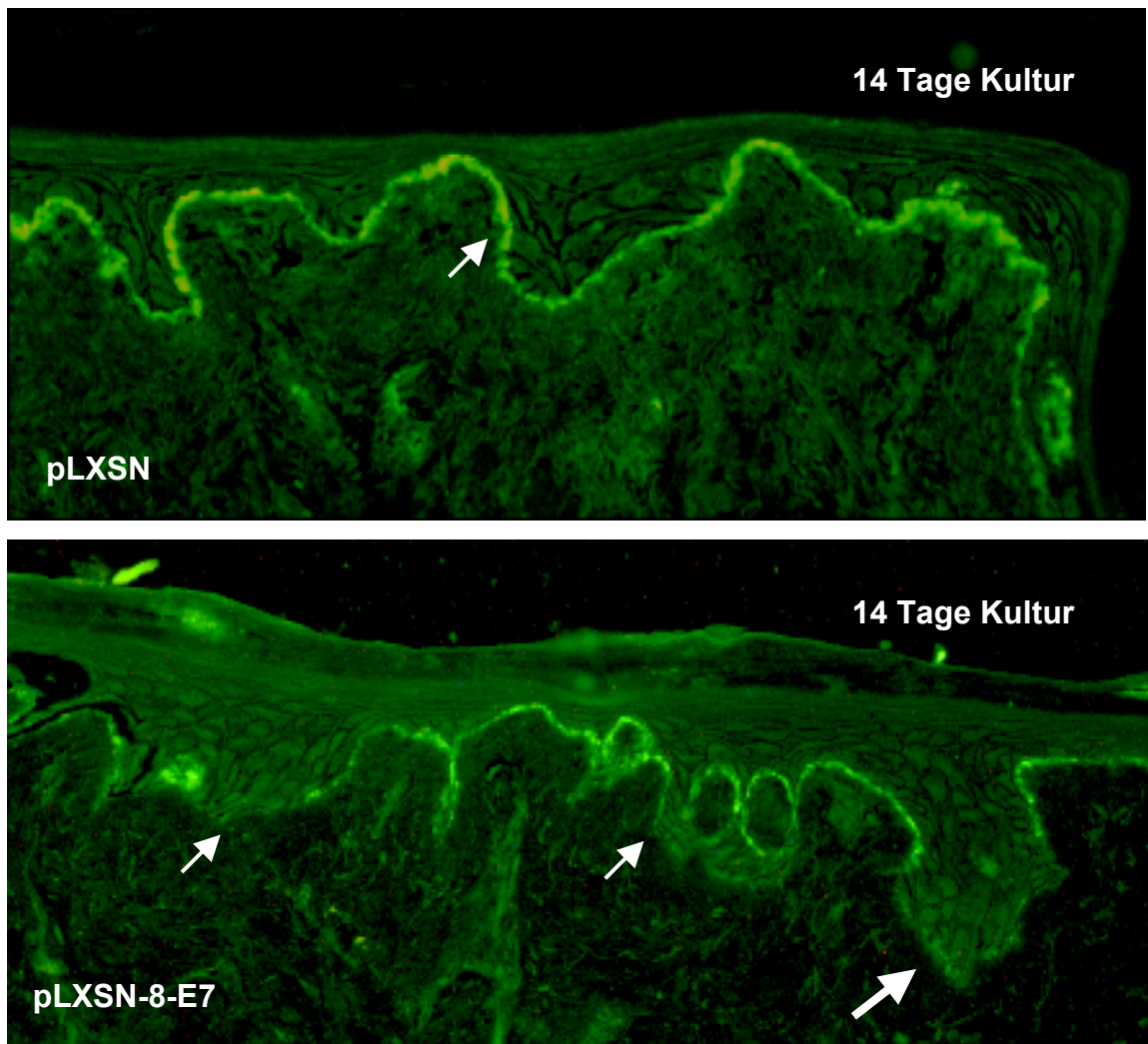




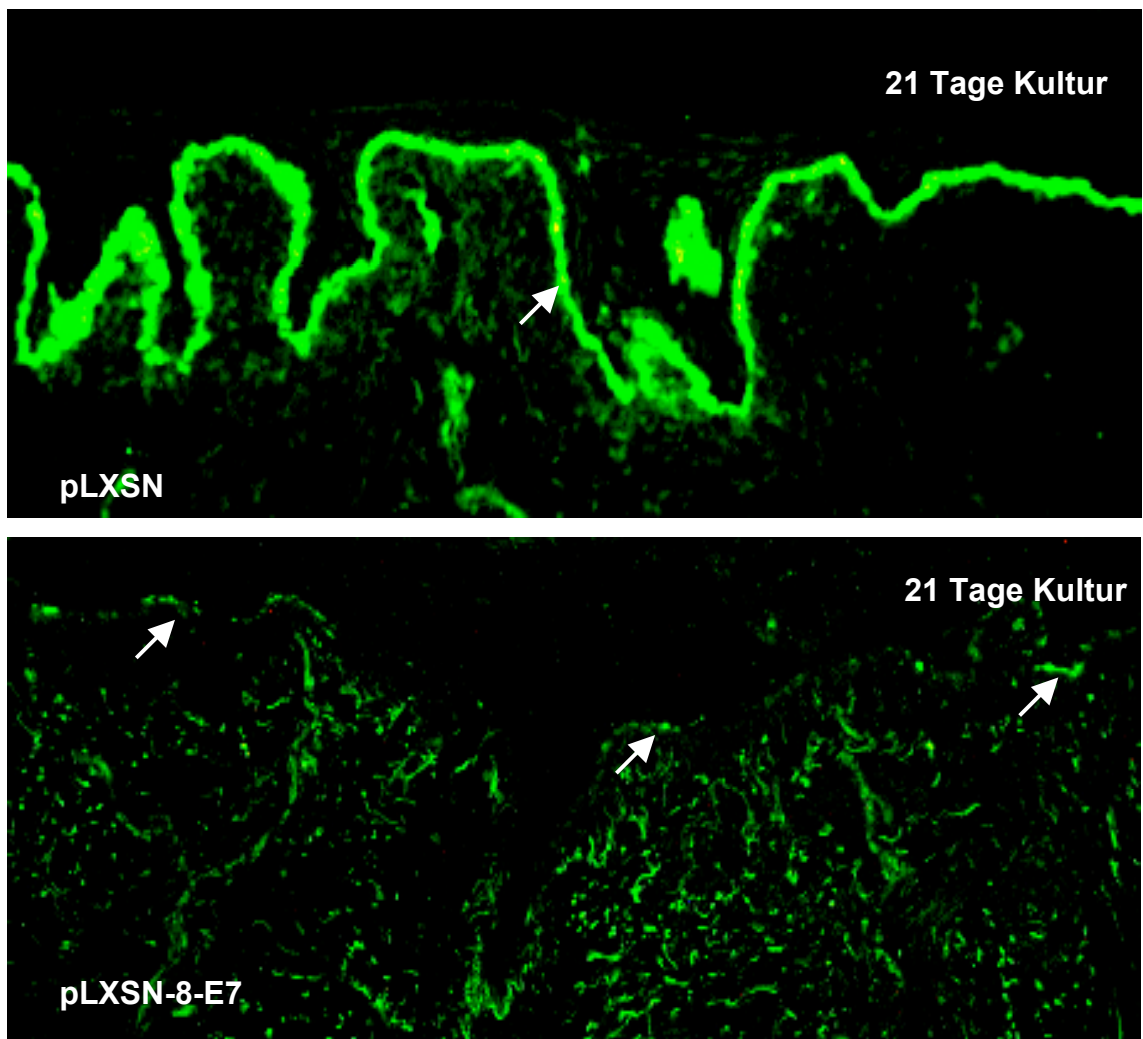
**Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis von Keratin 17 in pLXSN und pLXSN-8-E7-raft-Kulturen.** In Paraffin eingebettete Schnitte der pLXSN und pLXSN-8-E7 rafts und einem SCC wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen, gegen Keratin 17 gerichteten Antikörper inkubiert und mithilfe des TSA Fluorescein Systems unter dem UV-Mikroskop sichtbar gemacht.

#### 4. 12 Degradation der Basalmembran in E7-raft-Kulturen

Eine Sonderform der extrazellulären Matrix, die sogenannte Basalmembran, findet sich an allen Grenzflächen zwischen Epithelzellschichten und den darunter liegenden Bindegeweben (Paulson, 1992; Yurchenco und O'Rear, 1994). Sie bestimmt die Polarität der angrenzenden Zellen und deren Differenzierung (Guo und Grinnell, 1989). Die Basalmembran bildet durch ihren speziellen Aufbau einen selektiven molekularen Filter, den verschiedene Tumor- und Entzündungszellen passieren können. Die lokale Destruktion der Basalmembran ist eine Voraussetzung für das infiltrative Wachstum von epithelialen Zellen (Andreasen et al., 2000). Kollagen-Typ VII als wesentlicher Bestandteil der Verankerungsfibrillen der Basalmembran ist für die Verbindung der Basalmembran und der Epidermis mit dem papillären dermalen Bindegewebe verantwortlich (Sakai et al., 1986). Der Abbau von Kollagen-Typ VII in der Basalmembran ist ein Indiz für eine frühe Invasion von Keratinozyten (Hagedorn et al., 1998). Um den invasiven Phänotyp der E7-raft-Kultur näher zu untersuchen, wurden Schnitte immunhistochemisch auf Kollagen-VII-Expression untersucht. Wie man in Abb. 28 erkennen kann, wird Kollagen VII an der dermal-epidermal-Grenze in der pLXSN-raft-Kultur durchgehend exprimiert, was auf eine intakte Basalmembran in der Kontrolle hinweist. In der E7-raft-Kultur hingegen findet man an den Stellen, wo Keratinozyten in die Dermis invadieren, keine oder sehr schwache Kollagen-VII-Färbung, was zeigt, dass genau an diesen Stellen Kollagen VII abgebaut wurde und die Basalmembran durchbrochen ist. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden raft-Kulturen mit Keratinozyten eines zweiten Patienten angesetzt und 21 Tage an der Luft-Medium-Grenze gehalten, um die Beschaffenheit der Basalmembran in der E7-Kultur nach einer längeren Inkubationszeit zu untersuchen. Immunhistochemische Färbungen verdeutlichten, dass kaum noch Kollagen VII an der Dermis-Epidermis-Grenze vorhanden war, wohingegen die Kontrolle deutliche Kollagen VII Expression zeigte. HPV8-E7 kann somit die Degradation der Basalmembran bewirken, um die Invasion von Keratinozyten in die Dermis zu ermöglichen.



**Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen VII in pLXSN und pLXSN-8-E7-raft-Kulturen, die 14 Tage an der Luft-Medium-Grenze inkubiert wurden.** In Paraffin eingebettete Schnitte der pLXSN und pLXSN-8-E7 raft-Kulturen wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen, gegen Kollagen VII gerichteten Antikörper inkubiert und mithilfe des TSA Fluorescein Systems unter dem UV-Mikroskop sichtbar gemacht. (pLXSN-Kultur: Pfeil deutet auf intakte Basalmembran; pLXSN-8-E7 Kultur: Pfeile deuten auf invadierende Keratinozyten, an den Stellen, wo Kollagen VII in der Basalmembran nicht mehr vorhanden ist.)

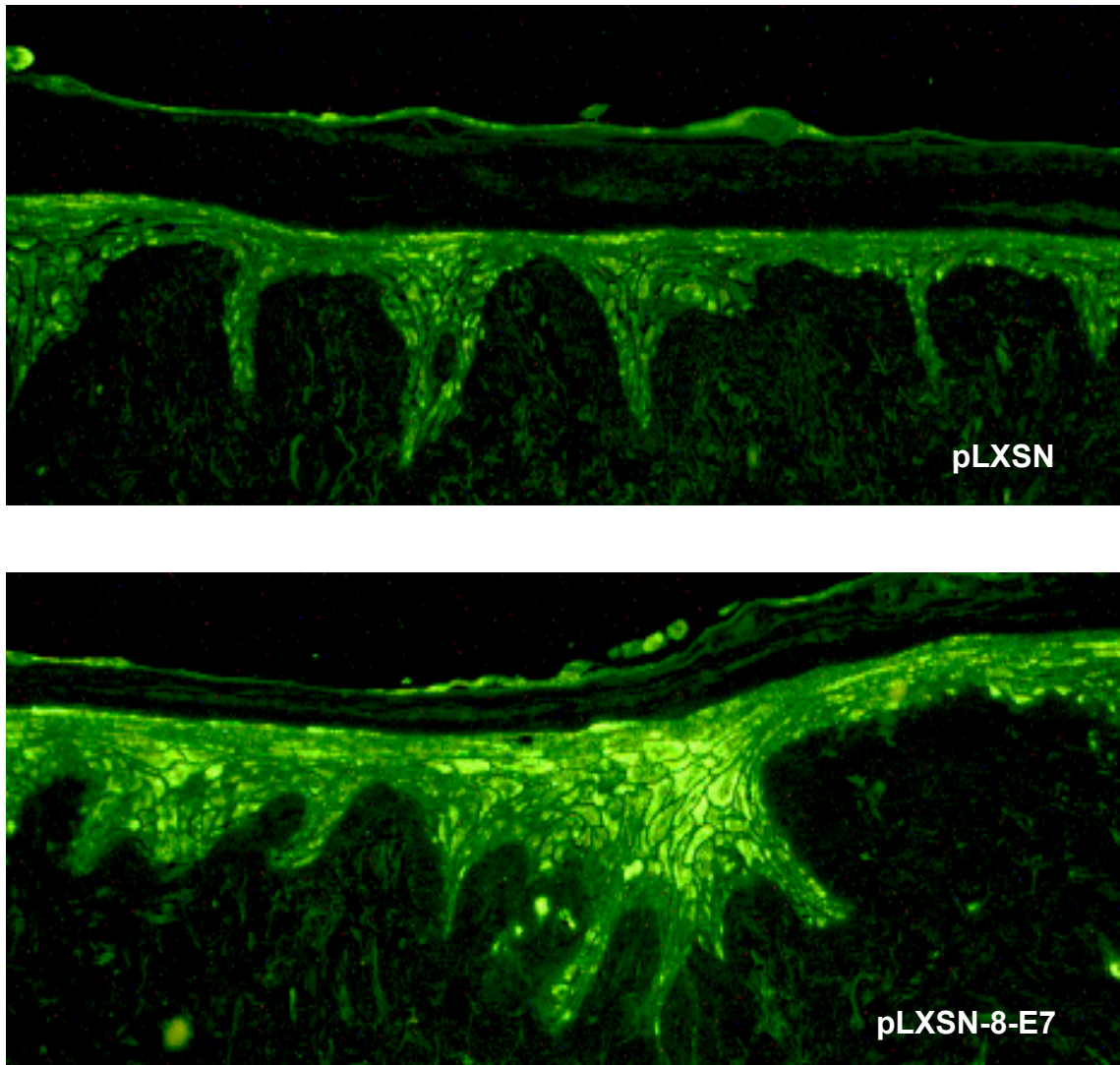


**Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen VII in pLXSN und pLXSN-8-E7-raft-Kulturen, die 21 Tage an der Luft-Medium-Grenze inkubiert wurden.** In Paraffin eingebettete Schnitte der pLXSN und pLXSN-8-E7 raft-Kulturen wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen, gegen Kollagen VII gerichteten Antikörper inkubiert und mithilfe des TSA Fluorescein Systems unter dem UV-Mikroskop sichtbar gemacht. (pLXSN-Kultur: Pfeil deutet auf intakte Basalmembran; pLXSN-8-E7 Kultur: Pfeile deuten auf Reste der Basalmembran hin.)

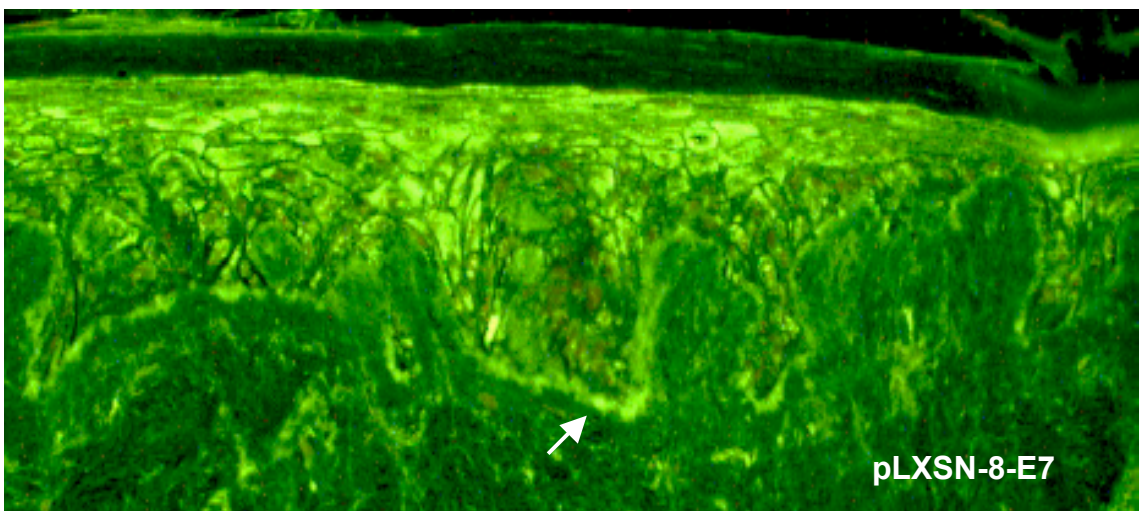
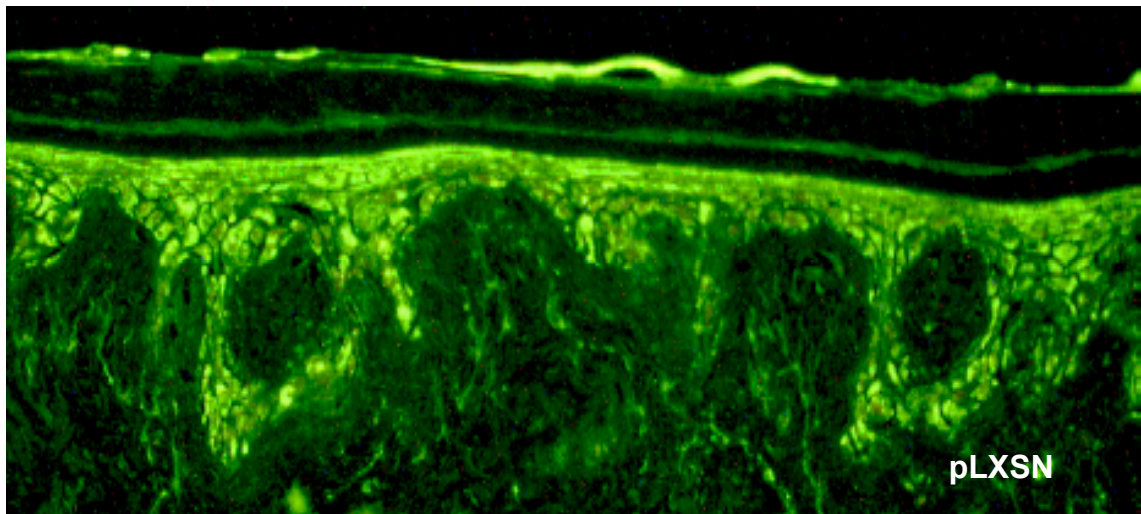
#### 4.13 Ermittlung der MMP-Expression in der E7-raft-Kultur

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), eine Familie von homologen Proteinase, sind in der Lage, nahezu alle Bestandteile der Extrazellulärmatrix abzubauen und spielen eine wichtige Rolle bei der Bindegewebsmodellierung im Rahmen physiologischer Prozesse wie der Wundheilung, Zellmigration und dem Gewebsumbau (Mignatti und Rifkin, 1993). Die meisten dieser Enzyme werden von unterschiedlichen Zellen des Bindegewebes, aber auch von Entzündungszellen und wahrscheinlich auch von Tumorzellen sezerniert. Die Sekretion der MMPs erfolgt in einer latenten Proenzymform (Zymogen, pro-MMP) und werden durch Plasmin oder auch über MT-MMPs aktiviert (Seiki, 1999).

Aufgrund der Kollagen-VII-Degradation in der Basalmembran der E7-rafts, sollten Überexpression der Kollagen VII degradierenden Kollagenasen MMP-1 (Kollagenase-1), MMP-8 (Kollagenase-2) und MMP-13 (Kollagenase-3) in den 14-Tage-raft-Kulturen nachgewiesen werden. Zudem wurden die Schnitte mit einem Antikörper gegen MMP-14 (MT1-MMP) gefärbt, welches am invasiven Phänotyp von Keratinozyten beteiligt zu sein scheint (Nagavarapu et al., 2002). Man erkennt in Abb. 30, dass MT1-MMP in der Epidermis der E7-Kultur, verglichen zur Kontrolle, stark hochreguliert worden ist. Die Konzentration von MMP-8 und MMP-13 war an der Dermis-Epidermis-Grenze schwach erhöht. Das Vorhandensein von MMP-1 hingegen konnte deutlich an der Dermis-Epidermis-Grenzzone nachgewiesen werden (Abb. 31).



**Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis von MT1-MMP in pLXSN und pLXSN-8-E7-raft-Kulturen.** In Paraffin eingebettete Schnitte der pLXSN und pLXSN-8-E7 raft-Kulturen wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen, gegen MT1-MMP gerichteten Antikörper inkubiert und mithilfe des TSA Fluorescein Systems unter dem UV-Mikroskop sichtbar gemacht.



**Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis von MMP-1 in pLXSN und pLXSN-8-E7-raft-Kulturen.** In Paraffin eingebettete Schnitte der pLXSN und pLXSN-8-E7 raft-Kulturen wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen, gegen MMP-1 gerichteten Antikörper inkubiert und mithilfe des TSA Fluorescein Systems unter dem UV-Mikroskop sichtbar gemacht. (pLXSN-8-E7-Kultur: Pfeil deutet auf MMP-1 Proteine an der Epidermis-Dermis-Grenzzone.)

## V. DISKUSSION

Der Lebenszyklus der humanen Papillomviren ist eng an den Differenzierungsprozess der infizierten Keratinozyten gebunden. Im Hinblick auf das Fehlen eines permissiven Zellkultursystems für HPVs ist der transiente Replikationstest die beste Methode zur Untersuchung der viralen DNA-Replikations-Mechanismen. Diese Methode wurde schon für die Untersuchung der Replikation des kutanen HPV1a (Gopalakrishnan und Khan, 1994) und der genitalen HPV-Typen 11 (Sun *et al.*, 1996), 16 (Del Vecchio *et al.*, 1992), 18 (Lee *et al.*, 1997) und 31b (Frattini und Laimins, 1994) eingesetzt. Alle bislang untersuchten *ori*-Elemente bei Papillomviren umfassen drei charakteristische Sequenzelemente: mindestens eine E2-Bindestelle, eine E1-Erkennungssequenz sowie einen kurzen, A/T-reichen Sequenzabschnitt (Ustav und Ustav, 1998). EV-assoziierte HPVs sind bezüglich ihrer DNA-Replikation noch nicht untersucht worden. Der Replikations-Mechanismus dieser Viren ist deshalb interessant, weil sie sich in ihren regulatorischen Sequenzen von anderen Papillomviren unterscheiden und im Gegensatz zu genitalen Papillomviren ausschließlich extrachromosomal persistieren. Im Rahmen einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Replikation von HPV8 von dessen E1- und E2-Proteinen abhängig ist. Der *ori* konnte auch bis auf die Sequenzelemente P4-CCAAC-M29 eingeschränkt werden, wobei CCAAC und M29 essentielle Elemente darstellten (Akgül, 1999). In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die E2-Bindestelle P4 kein notwendiges Sequenzmotiv des minimalen *ori* ist, da das Replikationstestplasmid p88, das nur die Elemente CCAAC und M29 trägt, repliziert werden konnte. Computervergleiche zeigten, dass CCAAC eine sehr hohe Übereinstimmung mit der publizierten Konsensussequenz der E1-Bindestellen anderer Papillomviren aufweist (O'Conner *et al.*, 1995). Daher ist anzunehmen, dass die CCAAC-Box die E1-Bindestelle bei EV-assoziierten Viren darstellt. Obwohl die Replikation von HPV8 vom viralen Replikationsfaktor E2 abhängig war, war keine der bereits beschriebenen E2-Bindestellen im *ori* enthalten. Wenn man die Sequenz des M29-Elementes aber genauer betrachtet, findet man eine der E2-Konsensusbindestelle 5'-ACCN<sub>6</sub>GGT-3' ähnliche Sequenz 5'-ATCGTTTTTCGAT-3', die ein perfektes Palindrom darstellt und nur in 2 Positionen von der Konsensussequenz abweicht. Band-Shift-Experimente bestätigten, dass E2 mit einer relativ hohen Affinität diese abweichende Sequenz in



M29 erkennt. Auch führte die Mutation dieser Sequenz im Replikationsplasmid p88 zum Ausfall der Replikation, was zeigt, dass diese Nukleotide als E2-Erkennungssequenz im minimalen *ori* fungieren. HPV8-E2 kann somit auch von der allgemeingültigen Konsensussequenz 5'-ACCN<sub>6</sub>GGT-3' abweichende Sequenzen binden, was bisher nur für HPV16-E2 beschrieben ist, das an 5'-ACACN<sub>5</sub>GGT bindet (Newhouse und Silverstein, 2001).

Im Hefe-One-Hybrid-Versuch konnte das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 als ein potentieller M29 bindender Faktor identifiziert werden. Das p53 ist ein multifunktionelles Regulatorprotein, das bei der Kontrolle des Zellzyklusses, der DNA-Replikation und der Transkription vieler Gene eine zentrale Rolle spielt (Ko und Prives, 1996). Die Überexpression von p53 führte in transienten Replikationsexperimenten zur Hemmung der DNA-Replikation von HPV8, wohingegen die DNA-bindedefekte Mutante p53<sub>175</sub> die Replikation nicht mehr inhibierte (Akgül, 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p53 an M29 bindet, wobei dessen Erkennungssequenz mit der neu charakterisierten E2-Bindestelle überlappt. Im Falle von HPV8 überlappen auch die *ori*-aktiven Sequenzen mit dem Kernbereich des frühen Promotors P<sub>175</sub>, der die Sequenzmotive CCAAC-M29-A/T umfasst (Pajunk *et al.*, 1997). In einer Serie von Experimenten wurde die DNA-Bindung von E2 und p53 an M29 und die mögliche physiologische Bedeutung dieser Wechselwirkung untersucht. Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigten eine direkte Bindung von E2 an Wildtyp-p53 und die Mutante p53<sub>175</sub>. In Band-Shift-Experimenten haben E2 und p53 an M29 gebunden, wobei aber große Mengen E2 das p53-Protein von seiner Bindestelle verdrängten. In transienten Reporter-Experimenten stimulierte kotransfiziertes p53, bei direkter Bindung an seine Erkennungssequenz in M29, die Aktivität des frühen Promotors um das ca. 2,5-fache. Zusätzlich zu p53 kotransfiziertes HPV8-E2, das in der Lage ist an M29 und an die E2-Bindestelle P4 zu binden, verstärkte die p53-vermittelte Aktivierung sogar 6-fach, wobei E2 alleine die Luciferase-Expression nur um das Zweifache erhöhte. Das p53 scheint also eine duale Rolle im Lebenszyklus von HPV8 zu spielen, da es über die Bindung an das M29-Sequenzmotiv die DNA-Replikation einerseits inhibiert, andererseits aber die Transkription stimuliert. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass E2 und p53 an der Kontrolle der DNA-Replikation und der Onkogen-Expression beteiligt sind. Padlewska *et al.* (2001) haben gezeigt, dass das p53-Protein in EV-Läsionen hauptsächlich in den

Basalzellen des Epithels vorhanden ist. Durch *in situ* Hybridisierungs-Experimente konnte das Vorhandensein von E2-Transkripten in EV-Läsionen in den zentralen Schichten des Epithels nachgewiesen werden (Haller *et al.*, 1995). Es ist aufgrund dieser Daten denkbar, dass die DNA-Replikation und die Aktivität des frühen Promotors von HPV8 von den Konzentrationsgradienten von E2 und p53 in den differenzierenden Keratinozyten der Epidermis abhängig ist. Somit würde in den basalen Zellschichten der infizierten Epidermis p53 als Transkriptionsfaktor benutzt werden, um die Expression der Onkogene E6 und E7 zu ermöglichen, wobei aber die vegetative DNA-Replikation blockiert wird. In den oberen Zellschichten, wo grosse Mengen an E2 vorhanden ist, kommt es auch gleichzeitig zu der massiven Replikation des viralen Genoms.

Die Plattenepithelkarzinome bei EV-Patienten entstehen meistens an Hautstellen, die dem Sonnenlicht ausgesetzt sind. Die Rolle von UV-Licht in der Entwicklung von nicht-melanozytären-Hautkrebsarten (NMSC) ist bekannt (Kiviat, 2000). Der sich häufende Nachweis von HPV-DNA in prämaligen und malignen Hautläsionen sowie die maligne Entartung von sonnenexponierten Läsionen von EV-Patienten (Jablonska und Majewski, 1994) wurden als Anlass genommen, den Einfluss von UV-Licht auf die Promotoraktivität von verschiedenen EV-HPVs zu untersuchen. In primären Hautkeratinozyten wurde die NCR von HPV8 und HPV5 durch UV-B-Licht um das ca. 1,8-Fache gesteigert, wohingegen kein Einfluss auf die NCR von HPV9, 14, 23, 24 und 25 gemessen werden konnte. Purdie *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Promotoraktivität von HPV 77 *in vitro* durch UV-Licht über eine p53-Bindestelle innerhalb der HPV77-NCR induziert wird. Dieses Ergebnis veranlasste uns, nach den Untersuchungen in primären Keratinozyten (die höchstwahrscheinlich Wildtyp-p53 exprimierten, da sie aus gesunder Haut etabliert wurden) die Promotoraktivitäten unserer Konstrukte auch in den p53-null-Keratinozyten RTS3b nach UV-B-Bestrahlung zu messen. Die NCR von HPV8 wurde in diesen Zellen wiederum stimuliert (1,7-fach Steigerung). Auch Kotransfektionen mit einem p53-Expressionsvektor in RTS3b-Zellen zeigten, dass die NCR von HPV8 deutlich (2,4-fach) stimuliert wird. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Promotoraktivität von HPV8 durch p53 reguliert werden kann, und die UV-induzierte Aktivierung zumindest auch p53-unabhängig sein kann. In RTS3b-Zellen hatte UV-B nur einen geringen Einfluss auf HPV5 zeigte (1,3-fache

Steigerung); auch kotransfiziertes p53 stimulierte pNCR5-Luc 1,3-fach. Die UV- und p53-vermittelte Stimulierung der Promotor-Aktivität ist für HPV5 additiv. Ähnlich wie für HPV8 scheint auch für HPV5 ein p53-abhängiger Weg zu existieren, der aber nicht so effizient ist. Möglicherweise ist ein anderer zellulärer Faktor zusätzlich an der UV-vermittelten Aktivierung beteiligt. Transfektionen mit Deletionsmutanten von HPV8, bei denen konservierte Sequenzelemente innerhalb der NCRs entfernt wurden, verdeutlichten, dass möglicherweise die A/T-Box eine große Rolle bei der UV-B vermittelten Aktivierung spielt. Computerunterstützte Analysen ließen vermuten, dass der Transkriptionsfaktor Oct-1 möglicherweise an diese Region von auch bei HPV5 bindet. Für Oct-1 ist bekannt, dass seine Expression p53-unabhängig ist (Takahashi *et al.*, 2001) und seine DNA-Bindeaffinität in Zellen nach UV-Bestrahlung erhöht wird (Zhao *et al.*, 2000). Da die NCR8 und NCR5 unabhängig von der p53-Expression auch in p53-null-Keratinocyten aktiviert wurde, könnte in der Tat Oct-1 an der UV-B vermittelten, p53-unabhängigen Aktivierung beteiligt sein. Um die Rolle von Oct-1 bei der Promotorregulierung zu klären, bedarf es weiterer Transfektionen mit einem Reporterplasmid, in dem die Oct-1-Bindestelle im Kontext der gesamten HPV8-NCR mutiert ist. Außerdem muss die direkte Bindung von Oct-1 an das A/T-Element in Band-Shift-Experimenten bewiesen werden. In einer früheren Studie wurde behauptet, dass UV-Licht keinen Einfluss auf die NCR von HPV5 hat, aber die von HPV23 um das ca. 17-fache aktiviert wird (De Villiers *et al.*, 1999). Die abweichenden Resultate könnten teilweise damit erklärt werden, dass andere Zellen (HaCaT) zur Analyse benutzt wurden, die endogen mutiertes p53 exprimieren. Da die HPV-Typen 5 und 8 nach UV-B-Bestrahlung in primären Keratinocyten, den natürlichen Zielzellen der kutanen HPVs, aktiviert werden, kann eine mögliche Korrelation von HPV-Infektion, UV-Licht und maligner Entartung von EV-Läsionen angenommen werden, zumal in EV-Tumoren auch hauptsächlich HPV5 und HPV8 gefunden wurden. Die vorliegende Studie wurde allein mit den Kontrollregionen der einzelnen HPV-Typen durchgeführt, so dass die Promotoraktivität nur durch die zellulären Transkriptionsfaktoren gesteuert wurden. *In vivo* sind für die HPV-Transkription aber auch die viralen E1- und E2-Proteine wichtig (Stubenrauch und Laimins, 1999), die in dieser Studie nicht getestet wurden. Weitere Studien müssten demnach durchgeführt werden, um den Einfluss der viralen E1 und E2 Proteine auf die Promotoraktivität und den UV-Effekt der

einzelnen HPVs zu testen und die Rolle des frühen und späten Promotors bei der UV-B vermittelten NCR-Aktivierung zu klären.

Bislang ist das zelltransformierende Potential der frühen Proteine kutaner Papillomviren *in vitro* nur in Nagerfibroblasten nachgewiesen worden (Iftner *et al.*, 1988; Kiyono *et al.*, 1992; Roth, 1999; Krause, 2002). Es existieren keine Arbeiten in primären Hautkeratinozyten, die die Rolle der frühen Genprodukte von EV-assoziierten HPVs bei der kutanen Onkogenese zeigen. Lediglich Boxman *et al.* (2001) untersuchten das transformierende Potential der E6/E7-Proteine von HPV5, 12, 15, 17, 20 und 38 in raft-Kulturen primärer Vorhaut-Keratinozyten, die auf einer Kollagen-1-Matrix basierten. Deshalb wurden in dieser Studie primäre Keratinozyten mit rekombinanten Retroviren, die für HPV8-E2, -E6, -E7 und -E6/E7 kodieren, infiziert, selektioniert und in organotypischen raft-Kulturen mit de-epidermierter humaner Dermis als Matrix eingesetzt, um den Einfluss dieser Genprodukte auf die Keratinozyten-Differenzierung und -Morphologie zu studieren. In diesem System beeinflusste HPV8-E2 die Morphologie der Keratinozyten kaum. HPV8-E6 störte die Differenzierung der Keratinozyten, was durch parakeratotische Zellen in diesen Kulturen zu erkennen ist. In raft-Kultur zeigte sich dagegen ein sehr starker Einfluss von E7 auf die Keratinozyten-Morphologie. Die Expression von E7 beschleunigte die Differenzierung der Epithelzellen, was an der verfrühten Expression der Zytokeratine K1/10 zu erkennen ist. In einigen Fällen führt dies zu vollständig keratinisierten Zellen, die sogenannte Tumorperlen ausbildeten. Außerdem waren in der E7-raft-Kultur Epithelzapfen zu erkennen, die in die darunterliegende Dermis vordrangen. Das Vorhandensein von Tumorperlen und Keratinozyten-"Invasion" ist ein für Plattenepithelkarzinome (SCCs) charakteristisches Gewebsmerkmal. Immunhistochemische Färbungen zeigten für Keratin 17 positive Keratinozyten in der Basalzell-Schicht der E7-raft-Kultur. Da Keratin 17 ein früher Marker für invasive Zellen ist, ist E7 wohl auch in der Lage, die Keratinozyten-Invasion zu aktivieren. Eine obligatorische Voraussetzung für die "Invasion" von Zellen ist die Penetration der Basalmembran. Immunhistochemische Färbungen gegen das Kollagen-Typ-VII, einen Hauptbestandteil der Basalmembran, zeigte in der Tat lokale Destruktionen dieser Membran, besonders an Stellen, an denen Keratinozyten in die Dermis migrierten. Das Kollagen VII degradierende Enzym MMP-1, sowie das an der Keratinozyten-Invasion beteiligte

MT1-MMP sind im Vergleich zu ihren Kontroll-Kulturen in der E7-raft-Kultur überexprimiert. MMP-1 ist hauptsächlich an der Dermis-Epidermis-Zone konzentriert und degradiert höchstwahrscheinlich das Kollagen VII der Basalmembran. Eine E7-raft-Kultur, die drei Wochen an der Luft-Medium-Grenze inkubiert wurde, wies kaum noch eine Kollagen-VII-Expression auf. Es scheint, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Basalmembran komplett aufgelöst wird. Die Befunde sprechen erstmals deutlich für die kausale Rolle der E7-Proteine kutaner EV-Viren bei der *in vitro*-Zell-Transformation von Keratinozyten. Vergleichend zu diesen Daten konnten Boxman *et al.* (2001) hingegen keine großen Effekte von E6/E7 erkennen. Lediglich in den raft-Kulturen mit HPV15- und HPV17-E6/E7 konnten papillenähnliche Formationen basaler Keratinozyten beschrieben werden. HPV5-E6/E7 hatte keinen Einfluss auf die Keratinozyten-Differenzierung, wohingegen sie aber in raft-Kultur mit Vorhaut-Keratinozyten auf de-epidermierter Dermis als Matrix die Bildung von Tumorperlen induzierten (Garcia-Escudero, persönliche Mitteilung). Auf Kollagen-1 basierende Kulturen besitzen keine Basalmembran zu Beginn der raft-Kultur. Diese wird erst innerhalb von ca. 20 Tagen von basalen Keratinozyten sezernierten Molekülen gebildet (Smola, persönliche Mitteilung). Da aber die Polarisierung und Differenzierung der basalen Zellen eines Epithels durch Basalmembranbestandteile koordiniert wird (Manes *et al.*, 2000), kann der Unterschied zwischen den Ergebnissen von Boxman *et al.* (2001) und dieser Arbeit auf das Vorhandensein der Basalmembran in raft-Kulturen mit de-epidermierter Dermis zurückgeführt werden. Somit scheint das raft-Kultur-System mit de-epidermierter, humaner Dermis die Methode der Wahl zu sein, die Effekte der Onkoproteine kutaner Papillomviren auf Keratinozyten mit Berücksichtigung der Zell-Differenzierung zu studieren.

Erste Hinweise auf aggressives und invasives Verhalten von E7-überexprimierenden Keratinozyten konnte in dieser Arbeit im raft-Kultur-System innerhalb von 14 Tagen erreicht werden. *In vivo* verläuft die Transformation von Keratinozyten aber sehr viel langsamer ab. Die virusinduzierte Plattenepithelkarzinome bei *Epidermodysplasia verruciformis*-Patienten entwickeln sich erst nach einigen Jahrzehnten auf dem Boden primär benignen Tumoren. Dieser zeitliche Unterschied zwischen den *in vitro* Bedingungen und der eigentlichen *in vivo* Situation beruht einerseits darauf, dass in der raft-Kultur das E7-Protein in Keratinozyten überexprimiert wurde, wohingegen im Tumor der

Patienten aber nur wenige E7-Transkripte nachweisbar sind (Haller *et al.*, 1995). Nach langjähriger Sonnenlicht-Exposition könnte durch den UV-Anteil des Lichtes die E7-Expression *in vivo* stimuliert werden, was dann zu einer allmählich steigenden Konzentration von E7 im infizierten Gewebe führen könnte und die Karzinomentstehung ermöglichen würde. Andererseits sind die Keratinozyten in raft-Kulturen hyperproliferativ, was der normalen Proliferation in der Epidermis nicht entspricht. Bei de-epidermierter Dermis durchgeführten raft-Kulturen werden die Keratinozyten auf eine nicht vollständig intakte Basalmembran ausgesät. Die Keratinozyten sind zu Beginn ihrer Proliferations- und Differenzierungs-Phase damit beschäftigt, die Basalmembran zu reparieren, was einem Wundheilungsprozess in gesunder Haut entsprechen würde. Mit pLXSN-transformierte Zellen waren in der Lage, die Basalmembran wieder völlig herzustellen, wohingegen pLXSN-8-E7 transformierte Keratinozyten zudem die Degradation dieser Membran verursachten.

Mit Hilfe des organotypischen raft-Kultur-Systems konnten interessante Eigenschaften für HPV8-E7 beschrieben werden, die *in vivo* für die virusinduzierte Tumorentstehung wichtig sein könnten.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Akgül, B.** (1999). Kartierung und Charakterisierung des DNA-Replikations-Ursprungspunktes der Epidermodysplasia verruciformis-assoziierten humanen Papillomvirustypen HPV8 und HPV9. Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln.
- Alberts, K. und Fuchs, E.** (1992). The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cyto.* **134**: 243-279.
- Ananthaswamy, H. N. und Pierceall, W. E.** (1990). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* **52**: 1119-1136.
- Andreasen, P. A., Egelund, R. und Petersen, H. H.** (2000). The plasminogen system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell Mol. Life Sci.* **57**: 25-40.
- Androphy, E. J., Lowy, D. R. und Schiller, J. T.** (1987). Bovine papillomavirus E2 trans-acting gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature.* **325**: 70-73.
- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. und McCance, D. J.** (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *EMBO J.* **15**: 1950-1960.
- Armstrong, D. J. und Roman, A.** (1997). The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology.* **239**: 238-246.
- Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Pendas, A. M., Lopez, J. M., Jimenez, M. G., Murphy, G. und Lopez-Otin, C.** (1998). Collagenase 2 (MMP-8) expression in murine tissue-remodeling processes. Analysis of its potential role in postpartum involution of the uterus. *J. Biol. Chem.* **273**: 23959-23968.
- Band, V., De Caprio, J. A., Delmolino, L., Kulesa, V. und Sager, R.** (1995). Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J. Virol.* **65**: 6671-6676.
- Barnard, P. und McMillan, N. A.** (1999). The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology.* **259**: 305-313.
- Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lampiere, C., Nusgens, B. und Neveux, Y.** (1983). The reconstruction of living skin. *J. Invest. Dermatol.* **81**: 2-10.
- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P. und Rahmsdorf, H. J.** (1997). UV-induced signal transduction. *J. Photochem. Photobiol. B.* **37**: 1-17.

- Berezutskaya, E. und Bagchi, 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, R. J., Bouwes Bavinck, J. N. und ter Schegget, J.** (2000). Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2087-2096.
- Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffmann, M. H., Moreno, V., Kurman, R. und Shah, K. V.** (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**: 796-802.
- Bouvard, V. Storey, A., Pim, D. und Banks, L.** (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO.* **13**: 5451-5459.
- Bouwes Bavinck, J. N. und Berkhout, R.J.** (1997). HPV infections and immunosuppression. *Clin. Dermatol.* **15**: 427-437.
- Boxman, I. L., Mulder, L. H., Russell, A., Bouwes Bavinck, J. N., Green, A. und Ter Schegget, J.** (1999). Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br. J. Dermatol.* **141**: 246-249.
- Boxman, I. L., Mulder, L. H., Noya, F., de Waard, V., Gibbs, S., Broker, T. R., ten Kate, F., Chow, L. T. und ter Schegget, J.** (2001). Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia- verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 1397-1404.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. und Ponten, J.** (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 10124-10128.
- Brash, D. E., Ziegler, A., Jonason, A. S., Simon, J. A., Kunala, S. und Leffell, D. J.** (1996). Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1**: 136-142.
- Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. und Kouzarides, T.** (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* **18**: 2449-2458.
- Canman, C. E. und Kastan, M. B.** (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature.* **384**: 213-214.



- Cerroni, L. und Kerl, H.** (1994). Aberrant bcl-2 protein expression provides a possible mechanism of neoplastic cell growth in cutaneous basal-cell carcinoma. *J. Cutan. Pathol.* **21**: 398-403.
- Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J.** (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 395-419.
- Chen, J. J., Reid, C. E., Band, V. und Androphy, E. J.** (1995). Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science.* **269**: 529-531.
- Chiang, C. M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. und Chow, L.** (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomavirus origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 5799-5803.
- Chow, L. und Broker, T.** (1994). Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* **37**: 150-158.
- Chow, L. und Broker, T.** (1997). Small DNA tumor viruses. In: *Viral Pathogenesis*. Neal Nathanson, et al., (eds); Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia: 267-301.
- Corona, R.** (1996). Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **32**: 37-42.
- Crook, T. und Vousden, K. H.** (1996). In: *Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses*. Edited by C. Lacey, Leeds University Press, Leeds.
- Cueille, N., Nougarede, R., Mechali, F., Philippe, M. und Bonne-Andrea, C.** (1998). Functional interaction between the bovine papillomavirus virus type 1 replicative helicase E1 and Cyclin E-Cdk2. *J. Virol.* **72**: 7255-7262.
- Cullen, A. P., Reid, R., Champion, M. und Lorincz, A. T.** (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* **65**: 606-612.
- D'Errico, M., Calcagnile, A. und Dogliotti, E.** (1996). Genetic alteration in skin cancer. *Ann. Ist. Super Sanita.* **32**: 53-63.
- Decraene, D., Agostinis, P., Pupe, A., de Haes, P. und Garmyn, M.** (2001). Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**: 78-83.
- Degenhardt, Y. Y. und Silverstein, S. J.** (2001). Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.* **75**: 151-160.
- De Gruijl, F. R. und Forbes, P. D.** (1995). UV-induced skin cancer in a hairless mouse model. *Bioessays.* **17**: 651-660.
- De Villiers, E. M., Ruhland, A. und Sekaric, P.** (1999). Human papillomaviruses in non-melanoma skin cancer. *Semin. Cancer. Biol.* **9**: 413-422.

- Del Vecchio, A. M., Romanczuk, H., Howley, P. M. und Baker, C. C.** (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.* **66**: 5949-5958
- Dong, X. P., Stubenrauch, F., Beyer-Finkler, E. und Pfister, H.** (1994). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer.* **58**: 803-808.
- Du, M., Fan, X., Hong, E. und Chen, J. J.** (2002). Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**: 962-969.
- Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. und Reed, S. I.** (1994). P53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell.* **76**: 1013-1023.
- Dürst, M. A., Kleinheinz, A., Hotz, M. und Gissmann, L.** (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *Science.* **243**: 934-937.
- Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. und Harlow, E.** (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* **243**: 934-937.
- Egawa, K., Delius, H., Matsukura, T., Kawashima, M. und DeVilliers, E. M.** (1993). Two novel types of human papillomavirus, HPV63 and HPV65 comparisons of their distinct clinical and histological features and their DNA sequences to other HPV types. *Virology.* **194**: 789-799.
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S. und Iftner, T.** (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology.* **239**: 132-149.
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**: 45-49.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* **75**: 817-25.
- Ensser, A. und Pfister, H.** (1990). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses present a subgenus-specific organization of the regulatory genome region. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3919-3922.
- Evander, M., Frazer, J. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. und McMillan, N. A.** (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.
- Fields, S. und Jang, S. K.** (1990). Presence of a potent transcriptionactivating sequence in the p53 protein. *Science.* **249**: 1046-1049.

- Flores, E. R. und Lambert, P. F.** (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol.* **71**: 7167-7179.
- Frattini, M. G. und Laimins, L. A.** (1994). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* **204**: 799-804.
- Frattini, M. G., Hurst, S. D., Lim, H. B., Swaminathan, S. und Laimins, L. A.** (1997). Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO*. **16**: 318-331.
- Fuchs, P. G., Iftner, T., Weninger, J. und Pfister, H.** (1986). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.* **58**: 626-634.
- Fuchs, P. G., Horn, S., Iftner, T., May, M., Stubenrauch, F. und Pfister H.** (1993). Molecular biology of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus. *Doerfler, W., Böhm, P. (eds.). Virus strategies. Verlag Chemie, Weinheim* 517-529.
- Fuchs, P. G. und Pfister, H.** (1996). Papillomaviruses in epidermodysplasia verruciformis. In: Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses. Edited by Lacey, C. *Leeds University Press, Leeds*: 253-261.
- Fuchs, P. G. und Pfister, H.** (1997). Molecular biology of HPV and mechanisms of keratinocyte transformation. In: Human Papillomavirus infections in dermatovenereology. Edited by Gross, G. und von Krogh, G. *CRC Press, Boca Raton*: 15-46.
- Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. und Ronai, Z.** (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*. **17**: 2543-2547.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B. und Galloway, D. A.** (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* **11**: 2090-2100.
- Gailani, M. R. und Bale, A. E.** (1997). Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 1103-1109.
- Gao, Q., Srinivasan, S., Boyer, S. N., Wazer, D. E. und Band, V.** (1999). The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol. Cell Biol.* **19**: 733-744.
- Gassenmeier, A., Lammel, M. Pfister, H.** (1984). Molecular cloning and characterization of the DNAs of human papillomaviruses 19, 20, 25 from a patient with Epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* **52**: 1019-1023.

**Giaccia, A. J. und Kastan, M. B.** (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* **12**: 2973-2983.

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

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

**Gissmann, L.** (1992). Human papillomaviruses and genital cancer. *Semin. Cancer Biol.* **3**: 253-261.

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

**Gross-Mesilaty, S., Reinstein, E., Bercovich, B., Tobias, K. E., Schwartz, A. L., Kahana, C. und Ciechanover, A.** (1998). Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proc. Natl. Acad. USA.* **95**: 8058-8063.

**Guelstein, V. I., Tchypysheva, T. A., Ermilova, V. D., Litvinova, L. V., Troyanovsky, S. M. und Bannikov, G. A.** (1988). Monoclonal antibody mapping of keratins 8 and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast cancer. *Int. J. Cancer.* **42**: 147-153.

**Guo, M. und Grinnell, F.** (1989). Basement membrane and human epidermal differentiation in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 372-378.

**Hagedorn, H. G., Tubel, J., Wiest, J., Schleicher, E. D. und Nerling, A. G.** (1998). Prognostic aspects of the loss of epithelial basement membrane components in preinvasive and invasive laryngeal carcinomas. *Anticancer Res.* **18**: 201-207.

**Haigis, H.** (1998). Identifikation zellulärer Proteine, welche an Promotor-proximale Sequenzen des Humanen Papillom Virus Typ 8 binden. Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln.

**Halbert, C. L., Demers, G. W. und Galloway, D. A.** (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* **65**: 473-478.

**Hall, P. A., Ray, A., Lemoine, N. R., Midgley, C. A., Krausz, T. und Lane, D. P.** (1991). P53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. *Lancet.* **338**: 513.

**Hall, P. A., McKee, P. H., Menage, H. D., Dover, R. und Lane, D. P.** (1993). High levels of p53 in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene.* **8**: 203-207.

- Harwood, C. A., Suretheran, T., McGregor, J. M., Spink, P. J., Leigh, I. M., Breuer, J. und Proby, C. M.** (2000). Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.* **61**: 289-297.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. und Schiller, J. T.** (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO* **8**:3905-3910.
- Helander, S. D., Peters, M. S. und Pittelkow, M. R.** (1993). Expression of p53 in benign and malignant epidermal pathologic conditions. *J. Am. Acad. Dermatol.* **28**: 741-748.
- Herzinger, T., Funk, J. O., Hillmer, K., Eick, D., Wolf, D. A. und Kind, P.** (1995). Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene.* **11**: 2151-2156.
- Hiraiwa, A., Kiyono, T., Suzuki, S., Ohashi, M. und Ishibashi, M.** (1996). E7 proteins of four groups of human papillomaviruses, irrespective of their tissue tropism or cancer association, possess the ability to transactivate transcriptional promoters E2F site dependently. *Virus Genes.* **12**: 27-35.
- Hoberg, S.** (2000). Vergleichende Promotoranalyse von HPV8 und HPV25. Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln.
- Hollstein, M., Rice, K., Greeblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. und Harris, C. C.** (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic. Acids Res.* **22**: 3551-3555.
- Holt, S., Schuller, G. und Wilson, V.** (1994). DNA binding specificity of the bovine papillomavirus E1 protein is determined by sequences containing within an 18 base-pair inverted repeat element at the origin of replication. *J. Virol.* **68**: 1094-1102.
- Holzmann, H., Kippenberger, S., Ramirez-Bosca, A., Bereiter-Hahn, J. und Bernd, A.** (1994). Zell- und Gewebekulturmodelle in der Dermatologie. *Hautarzt.* **45**: 304-312.
- Horn, S., Pfister, H. und Fuchs, P. G.** (1993). Constitutive transcriptional activator of Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8. *Virology.* **196**: 674-681.
- Howley, P. M.** (1996). Papillomavirinae: The viruses and their replication. *Fields Virology. 3<sup>rd</sup> edition; Raven Press, Philadelphia* : 2045-2076.
- Howley, P. M. und Lowy, D. R.** (2001). Papillomaviruses and their replication. in *Fields Virology, 4. ed., Lippincott Williams Wilkins*, 2197-2229.

- Hudson, J. B., Bedell, M. A., McCance, D. J. und Laimins, L. A.** (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* **64**: 519-526.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M. und Howley, P. M.** (1990). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**: 4129-4135.
- Iftner, T., Bierfelder, S., Csapo, Z. und Pfister, H.** (1988). Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J. Virol.* **62**: 3655-3661.
- Iftner, T.** (1990). Papillomavirus genomes: Sequence analysis related to functional aspects. In: *Pfister, H. (ed.). Papillomavirus and human cancer . Boca Raton, Fla., CRC Press, Inc.* 181-202.
- Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J. I., Caldecott, K. W. und Stubenrauch, F.** (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *EMBO J.* **21**: 4741-4748.
- Jablonska, S. und Majewski, S.** (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**: 157-175.
- Jackson, S. und Storey, A.** (2000). E6 proteins from diverse cutaneous HPV types inhibit apoptosis in response to UV damage. *Oncogene.* **19**: 592-598.
- Jones, D. L., Alani, R. M. und Münger, K.** (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**: 2101-2111.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Craig, R. W.** (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**: 6304-6311.
- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. und Vogelstein, B.** (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science.* **252**: 1708-1711.
- Kielty, C. M. und Shuttleworth, C. A.** (1997). Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc. Res. Tech.* **38**: 413-427.
- Kiviat, N. B.** (2000). Papillomavirus in non-melanoma skin cancer: epidemiological aspects. *Cancer Biol.* **9**: 397-403.
- Kiyono, T., Nagashima, K. und 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. und Ishibashi, M.** (1992). Differences in transforming activity and coded amino acid sequence among E6 genes of several papillomavirus associated with epidermodysplasia verruciformis. *Virology*. **186**: 628-639.

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

**Ko, L. J. und Prives, C.** (1996). P53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**: 1054-1072.

**Krause, A.** (2002). Untersuchung des zelltransformierenden Potentials des E7-Gens der Epidermodysplasia verruciformis-assoziierten humanen Papillomvirustypen HPV8 und HPV15. Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln.

**Kremsdorf, D., Jablonska, S., Favre, M. und Orth, G.** (1982). Biochemical characterization of two types of human papillomavirus associated with Epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* **43**: 436-447.

**Kremsdorf, D., Favre, M., Jablonska, S., Obalek, S. und Rueda, L.** (1984). Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus associated with Epidermodysplasia verruciformis. *J. Virol.* **52**: 1013-1018.

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

**Kugler, A.** (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.* **19(2C)**: 1589-1592.

**Kukimoto, I., Aihara, S., Yoshiike, K. und Kanda, T.** (1998). Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**: 258-262.

**Kuo, S., Liu, J., Broker, T. und Chow, L.** (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J. Biol. Chem.* **269**: 24058-24065.

**Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **10**: 203-209.

**Lane, D. P. und Crawford, L. V.** (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* **278**: 261-263.

**Lane, E. B., Wilson, C. A., Hughes, B. R. and Leigh, I. M.** (1991). Stem cells in hair follicles. Cytoskeletal studies. *Anm. N. Y. Acad. Sci.* **642**: 197.

**Lane, D. P.** (1992). Cancer. P53, guardian of the genome. *Nature.* **394**: 616-617.

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

**Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. und Javier, R. T.** (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.

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

**Leigh, I. M., Purkis, P. E., Navsaria, H. A. und Phillips, T. J.** (1987). Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* **117**: 591-597.

**Leigh, I. M., Purkis, P. E., Whitehead, P. und Lane, E. B.** (1993). Monospecific monoclonal antibodies to keratin 1 carboxy terminal (synthetic peptide) and to keratin 10 as markers of epidermal differentiation. *Br. J. Dermatol.* **129**: 110-119.

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

**Liu, M., Wikonkal, N. M. und Brash, D. E.** (1999). UV induces p21WAF1/CIP1 protein in keratinocytes without p53. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 283-284.

**Livneh, Z., Cohen-Fix, O., Skaliter, R. und Elizur, T.** (1993). Replication of damaged DNA and the molecular mechanism of ultraviolet light mutagenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 465-513.

**Luscher-Firzlaff, J. M., Westendorf, J. M., Zwicker, J., Burkhardt, H., Henriksson, M., Muller, R., Pirollet, F. und Luscher, B.** (1999). Interaction of the fork head domain transcription factor MPP2 with the human papilloma virus 16 E7 protein: enhancement of transformation and transactivation. *Oncogene.* **18**: 5620-5630.

**Machesney, M., Tidman, N., Waseem, A., Kirby, L. und Leigh I.** (1998). Activated keratinocytes in the epidermis of hypertrophic scars. *Am. J. Pathol.* **152**: 1133-1141.

**Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Ana Lacalle, R. und Martinez-A, C.** (2000). Cells on the Move: A dialogue between polarization and motility. *IUBMB Life.* **49**: 89-96.



- Mannhardt B, Weinzimer SA, Wagner M, Fiedler M, Cohen P, Jansen-Durr P, Zwerschke W.** (2000). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell Biol.* **20**: 6483-6495.
- Massimi, P., Pim, D. und Banks, L.** (1997). Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *J. Gen. Virol.* **78**: 2607-2613.
- Matsukura, T., Kande, T., Furuno, A., Yoshikawa, H., Kawana, T. und Yoshiike, K.** (1986). Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J. Virol.* **58**: 979-982.
- May, M., Grassmann, K., Pfister, H. und Fuchs, P. G.** (1994). Transcriptional silencer of the human papillomavirus type 8 late promoter interacts alternatively with the viral *trans* activator E2 or with a cellular factor. *J. Virol.* **68**: 3612-3619.
- Mazzarelli, J. M., Atkins, G. B., Geisberg, J. V. und Ricciardi, R. P.** (1995). The viral oncoproteins Ad5 E1A, HPV16 E7 and SV40 TAg bind a common region of the TBP-associated factor-110. *Oncogene.* **11**: 1859-1864.
- McBride, A. A., Romanczuk, H. und Howley, P. M.** (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 18411-18414.
- McCance, D. J., Kopan, R., Fuchs, E. und Laimins, L. A.** (1988). Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 7169-7173.
- Melchers, W., de Mare, S., Kuitert, E., Galama, J., Walboomers, J. und van den Brule, A. J.** (1993). Human papillomavirus and cutaneous warts in meat handlers. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2547-2549.
- Mignatti, P. und Rifkin, D. B.** (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* **73**: 161-195.
- Miller, A. D. und Chen, F.** (1996). Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J. Virol.* **70**: 5564-5571.
- Moll, R., Franke, W. W., Volc-Platzer, B. und Krepler, R.** (1982a). Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *J. Cell Biol.* **95**: 285-295.
- Moll, R.** (1991). Differenzierung und Entdifferenzierung im Spiegel der Intermediärfilaments-Expression: Untersuchungen an normalen, alterierten und malignen Epithelien mit Betonung der Cytokeratine. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **75**: 446-459.

- Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M. und Schlegel, R.** (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**: 4417-4421.
- Myers, G., Sverdrup, F., Baker, C., Mc Bride, A., Münger, K. und Bernard, H.-U.** (1997). Human papillomaviruses. *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos* .
- Nagavarapu, U., Relloma, K. und Herron, G. S.** (2002). Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates cellular invasiveness and survival in cutaneous epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **118**: 573-581.
- Nakagawa, S. und Huibregtse, J. M.** (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.
- Nataraj, A. J., Trent, J. C. und Ananthaswamy, H. N.** (1995). P53 gene mutations and photocarcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B.* **62**: 218-230.
- Nelson, M. A., Einspahr, J. G., Alberts, D. S., Balfour, C. A., Wymer, J. A., Welch, K. L., Salasche, S. J., Bangert, J. L., Grogan, T. M. und Bozzo, P. O.** (1994). Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* **85**: 23-29.
- Newhouse, C. D. und Silverstein, S. J.** (2001). Orientation of a novel DNA binding site affects human papillomavirus-mediated transcription and replication. *J. Virol.* **75**: 1722-1735.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., et al.** (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* **342**: 705-708.
- O'Conner, M., Chan, S.-V. und Bernard, H.-U.** (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. *Human Papillomaviruses Database Compendium, Los Alamos*.
- Padlewska, K., Ramoz, N., Cassonnet, P., Riou, G., Barrois, M., Majewski, S., Croissant, O., Jablonska, S. und Orth, G.** (2001). Mutation and abnormal expression of the p53 gene in the viral skin carcinogenesis of epidermodysplasia verruciformis. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 935-942.
- Pajunk, H., May, C., Pfister, H. und Fuchs, P. G.** (1997). Regulatory interactions of transcription factor YY1 with control sequences of the E6 promoter of human papillomavirus type 8. *J. Gen. Virol.* **78**: 3287-3295.
- Park, J. S., Kim, E. J., Lee, J. Y., Sin, H. S., Namkoong, S. E. und Um, S. J.** (2001). Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins. *Int. J. Cancer.* **91**: 822-827.

- Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ.** The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* **18:** 5061-5072.
- Paulson, M.** (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27:** 93.
- Pavey, S., Conroy, S., Russell, T. und Gabrielli, B.** (1999). Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res.* **59:** 4185-4189.
- Pfister, H.** (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* **99:** 111-181.
- Pfister, H. und Fuchs, P. G.** (1987). Papillomaviruses: Particles, genome organization and proteins. In: *Syrjänen, K.; Gissmann, L., Koss, L. G. (eds.). Papillomavirus and human disease. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York,* 1-18.
- Pfister, H.** (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin. Cancer Biol.* **3:** 263-271.
- Pfister, H. und ter Schegget, J.** (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin. Dermatol.* **15:** 335-347.
- Piette, J., Neel, H. und Marechal, V.** (1997). Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene.* **28:** 1001-1010.
- Pirog, E. C., Kleter, B., Olgac, S., Bobkiewicz, P., Lindeman, J., Quint, W. G., Richart, R. M. und Isacson, C.** (2000). Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* **157:** 1055-1062.
- Prathapam, T., Kuhne, C. und Banks L.** (2001). The HPV-16 E7 oncoprotein binds Skip and suppresses its transcriptional activity. *Oncogene.* **20:** 7677-7685.
- Proby, C. M., Churchill, L., Purkis, P. E., Glover, M. T., Sexton, C. J. und Leigh, I. M.** (1993). Keratin 17 expression as a marker for epithelial transformation in viral warts. *Am. J. Pathol.* **143:** 1667-1678.
- Prunieras, M., Regnier, M. und Woodley, D.** (1983). Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* **81:** 28-33.
- Purdie, K. J., Sexton, C. J., Proby, C. M., Glover, M. T., Williams, A. T., Stables, J. N. und Leigh, I. M.** (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res.* **53:** 5328-5333.
- Purdie, K. J., Pennington, J., Proby, C. M., Khalaf, S., de Villiers, E. M., Leigh, I. M. und Storey, A.** (1999). The promoter of a novel human papillomavirus

(HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *EMBO J.* **18**: 5359-5369.

**Ramoz, N., Rueda, L. A., Boudjar, B., Montoya, L.-S., Orth, G. und Favre, M.** (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat. Genetics.* **32**: 1-3.

**Regnier, M., Prunerias, M. und Woodley, D.** (1981). Growth and differentiation of adult human epidermal cells on dermal substrates. *Front. Matrix. Biol.* **9**: 4-35.

**Rey, O., Lee, S., Baluda, M. A., Swee, J., Ackerson, B., Chiu, R. und Park, N. H.** (2000). The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 interacts with F-actin in vitro and in vivo. *Virology.* **268**: 372-381.

**Rheinwald, J. G. und Green, H.** (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* **6**: 331-343.

**Romanczuk, K., Thierry, F. und Howley, P. M.** (1990). Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P<sub>g7</sub> and type 18 P<sub>105</sub>. *J. Virol.* **64**: 2849-2859.

**Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. und Howley, P. M.** (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* **12**: 2061-2072.

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

**Sakai, L. Y., Keene, D. R., Morris, N. P. und Burgeson, R. E.** (1986). Type VII collagen is a major component of anchoring fibrils. *J. Cell Biol.* **103**: 1577-1586.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

**Sato, H., Kinoshita, T., Takino, T., Nakayama, K. und Seiki, M.** (1993). Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* **393**: 101-104.

**Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blauschun, R. und Wenk, J.** (1997). UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.* **378**: 1247-1257.

**Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. und Howley, P. M.** (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* **63**: 1129-1136.

- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. und Howley, P. M.** (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. **75**: 495-505.
- Scheurlen, W., Gissmann, L., Gross, G. und zur Hausen, H.** (1986). Molecular cloning of two new HPV types (HPV37 and HPV38) from a Keratoacanthoma and a malignant Melanoma. *Int. J. Cancer*. **37**: 505-510.
- Schilling, B., De-Medina, T., Syken, J., Vidal, M., Münger, K.** (1998). A novel human DnaJ protein, hTid-1, a homolog of the Drosophila tumor suppressor protein Tid56, can interact with the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology*. **247**: 74-85.
- Schmitt, A., Harry, J. B., Rapp, B., Wettstein, F. O. und 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.
- Schreiber, E., Matthias, M., Müller, M. und Schaffner, W.** (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **9**: 6419-6420.
- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. und zur Hausen, H.** (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. **314**: 111-114.
- Seiki, M.** (1999). Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS*. **107**: 137-143.
- Setlow, R. B., Grist, E., Thompson, K. und Woodhead, A. D.** (1993). Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 6666-6670.
- Shah, K. V. und Howley, P. M.** (1996). Papillomaviruses. *Fields Virology*. 3<sup>rd</sup> edition; Raven Press, Philadelphia : 2077-2109.
- Shea, C. und Parrish, J.** (1991). Non ionising radiation and the skin. In: Physiology, biochemistry and molecular biology of the skin. Edited by Goldsmith, L. A. New York: Oxford University Press Ed. II: 910-927.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. und Prives, C.** (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. **91**: 325-334.
- Sibbet, G., Roero-Graillet, C., Meneguzzi, G. und Campo, M. S.** (2000). Alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J. Gen. Virol.* **81**: 327-334.
- Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. und Kastan, M. B.** (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* **11**: 3471-3481.

**Skiadopoulos, M. H. und McBride, A. A.** (1998). Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J. Virol.* **72**: 2079-2088.

**Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Conner, P. M. und Fornace, A. J.** (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science.* **266**: 1376-1380.

**Smotkin, D. und Wettstein, F. O.** (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol.* **61**: 1686-1689.

**Srivenugopal, K. S. und Ali-Osman, F.** (2002). The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene.* **21**: 5940-5945.

**Steger, G., Olszewsky, M., Stockfleth, E. und Pfister, H.** (1990). Prevalence of antibodies to human papillomavirus type 8 in human sera. *J. Virol.* **64**: 4399-4406.

**Steger, G. und Pfister, H.** (1992). In vitro expressed HPV8 E6 protein does not bind p53. *Arch. Virol.* **125**: 355-360.

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

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

**Steger, G. und Corbach, S.** (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* **71**: 50-58.

**Sterenborg, H. J. und van der Leun, J. C.** (1990). Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source. *Photochem. Photobiol.* **51**: 325-330.

**Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I. M., Matlashewski, G. und Banks, L.** (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature.* **393**: 229-234.

**Stubenrauch, F., Malejczyk, J., Fuchs, P. G. und Pfister, H.** (1992). Late promoter of human papillomavirus type 8 and its regulation. *J. Virol.* **66**: 3485-3493.

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

**Stubenrauch, F. und Laimins, L. A.** (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* **9**: 379-286.

- Stürzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E. und Jenkins, J. R.** (1992). A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene*. **7**: 1513-1523.
- Sun, S., Thorner, L., Lentz, M., MacPherson, P. und Botchan, M.** (1990). Identification of a 68-kilodalton nuclear ATP-binding phosphoprotein encoded by bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* **64**: 5093-5105.
- Sun, Y. N., Lu, J. und McCance, D. J.** (1996). Mapping of HPV11 E1 site and determination of other important cis elements for replication of the origin. *Virology*. **216**: 219-222.
- Szumiel, I.** (1998). Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat. Res.* **150**: S92-101.
- Takahashi, S., Saito, S., Ohtani, N. und Sakai, T.** (2001). Involvement of the Oct-1 regulatory element of the gadd45 promoter in the p53-independent response to ultraviolet irradiation. *Cancer Research*. **61**: 1187-1195.
- Thomas, J. T. und Laimins, L. A.** (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J. Virol.* **72**: 1131-1137.
- Thomas, M., Glaunsinger, B., Pim, D., Javier, R. und Banks, L.** (2001). HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*. **20**: 5431-5439.
- Todd, C., Hewitt, S. D., Kempenaar, J., Noz, K., Thody, A. J. und Ponc, M.** (1993). Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Arch. Dermatol. Res.* **285**: 455-459.
- Tong, X. und Howley, P. M.** (1997). The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. USA.* **94**: 4412-4417.
- Ustav, M. und Stenlund, A.** (1991). Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *EMBO J.* **10**: 449-457.
- Ustav, E. und Ustav, M.** (1998). E2 protein as a master regulator of extrachromosomal replication of the papillomaviruses. *Papillomavirus Report*. **9**: 145-152.
- Vambutas, A., DeVoti, J., Pinn, W., Steinberg, B. M. und Bonagura, V. R.** (2001). Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clin. Immunol.* **101**: 94-99.

- Van der Schroeff, J. G., Evers, L. M., Boot, A. J. und Bos, J. L.** (1990). Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **94**: 423-425.
- Vitaliano, P. P. und Urbach, F.** (1980). The relative importance of risk factors in nonmelanoma carcinoma. *Arch. Dermatol.* **116**: 454-456.
- Walker, D. R., Bond, J. P., Tarone, R. E., Harris, C. C., Makalowski, W., Boguski, M. S. und Greenblatt, M. S.** (1999). Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene.* **18**: 211-218.
- Weiss, R. A., Eichner, R. und Sun, T. T.** (1984). Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J. Cell Biol.* **98**: 1397-1406.
- Werness, B. A., Levine, A. J. und Howley, P. M.** (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* **248**: 76-79.
- Yang, L., Mohr, I., Clark, R. und Botchan, M.** (1993). The E1 protein of bovine papillomavirus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 5086-5090.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 bacteriophage cloning vectors and host strains: Nucleotidesequence of M13mp18 and pUC19-Vectors. *Gene.* **33**: 103-119.
- Yoon, C. S., Kim, K. D., Park, S. N. und Cheong, S. W.** (2001). Alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**: 668-673.
- Yurchenco, P. D. und O'Rear, J. J.** (1994). Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**: 674.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. und Jansen-Durr, P.** (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* **13**: 2323-2330.
- Zhao, H., Jin, S., Fan, F., Fan, W., Tong, T. und Zhan, Q.** (2000). Activation of the transcription factor Oct-1 in response to DNA damage. *Cancer Research.* **60**: 6276-6280.
- Zhang, J., Fujimoto, N., Iwata, K., Sakai, T., Okada, Y. und Hayakawa, T.** (1993). A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) using monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta.* **219**: 1-14.



**Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E. und Brash, D. E.** (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 4216-4220.

**Zimmermann, H., Degenkolbe, R., Bernhard, H.-U. und O'Conner, M. J.** (1999). The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can downregulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.* **73**: 6209-6219.

**zur Hausen, H. und De Villiers, E. M.** (1994). Human Papillomaviruses. *Annual Review of Microbiology.* **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.

**Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E. und Jansen-Durr, P.** (1999). Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. USA.* **96**: 1291-1296.

**Zwerschke, W., Mannhardt, B., Massimi, P., Nauenburg, S., Pim, D., Nickel, W., Banks, L., Reuser, A. J. und Jansen-Durr, P.** (2000). Allosteric activation of acid alpha-glucosidase by the human papillomavirus E7 protein. *J. Biol. Chem.* **275**: 9534-9541.

### VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die humanen Papillomviren 5 (HPV5) und 8 (HPV8) gehören zu den onkogenen HPV-Typen, die mit nicht-melanozytären Hauttumoren bei *Epidermodysplasia verruciformis* (EV)-Patienten assoziiert sind. Die Karzinome der EV-Patienten entstehen vorwiegend an sonnenexponierten Stellen der Haut, sodass eine kokarzinogene Wirkung der UV-Komponente des Sonnenlichts bei der Krebsentstehung vermutet wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in transienten Replikationstests mit Subfragmenten aus der nicht-kodierenden-Region (NCR) des Virusgenoms gezeigt werden, dass ein 65 bp langes Fragment aus dem 3'-Bereich als Replikations-Ursprungspunkt (*ori*) fungiert. Er umfasst die Sequenz-Elemente CCAAC und M29, die bei EV-assoziierten HPVs charakteristische Sequenzmotive darstellen. Die Analyse des M29-Motivs zeigte eine von der Konsensus-Sequenz abweichende Bindestelle für das virale E2-Protein, die mit einer p53-Erkennungs-Sequenz überlappt. Die E2 und p53 Proteine binden kompetitiv an M29. Die *ori*-Elemente sind auch essentiell für die Regulierung des frühen Promotors von HPV8. Im Gegensatz zu seiner inhibierenden Wirkung auf die DNA-Replikation, stimuliert p53 den E6-Onkogen-Promotor. Diese Daten lassen vermuten, dass p53 an der Kontrolle der DNA-Replikation und Transkription von HPV8 beteiligt ist.

Da EV-Karzinome hauptsächlich an sonnenexponierter Haut gefunden werden, wurde der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Promotor-Regulierung EV-assoziiierter HPVs untersucht. Transiente Reporter-gen-Untersuchungen in primären Hautkeratinozyten und in p53-null Keratinozyten zeigten, dass die NCR von HPV8 und HPV5 nach UV-B-Bestrahlung aktiviert werden, wobei die Stimulierung von HPV5 in RTS3b-Zellen deutlich geringer war. Es scheint, dass die UV-B abhängige Promotor-Aktivierung von HPV5 zum Teil p53-abhängig ist, die von HPV8 aber auch p53-unabhängig erreicht werden kann. Transfektionen mit Deletionsmutanten der HPV8-NCR, und computergestützte Untersuchungen der A/T-Sequenz verdeutlichten, dass der zelluläre Transkriptionsfaktor Oct-1 für die UV-B Antwort verantwortlich sein könnte.

Bis heute ist sehr wenig über das zelltransformierende Potential der frühen Proteine von EV-assoziierten HPVs bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte der HPV8-E2, -E6, -E7 und -E6/E7 Proteine auf die Differenzierung und Morphologie von Keratinozyten in organotypischen raft-Kulturen untersucht. Auf

dem Vektor pLXSN basierende Retroviren wurden benutzt um primäre Hautkeratinozyten zu infizieren, die auf de-epidermierter humaner Dermis ausgesät wurden. Nach 14 Tagen an der Luft-Medium-Grenze zeigten die E6-, E7- und E6/E7-exprimierenden Zellen veränderte Differenzierung und Morphologie. Kein Unterschied konnte zwischen der pLXSN und pLXSN-8-E2 raft-Kultur beobachtet werden. In der E6 raft-Kultur waren basale Zellen mit vakuolisierten Zytoplasmen zu erkennen. Die Epithelien waren auch parakeratotisch. In der E7-raft-Kultur waren atypische Keratinozyten zu erkennen, die in Zapfen in die unterliegende Dermis vordrangen. An diesen Stellen kam es auch zur lokalen Degradation von Kollagen VII der Basalmembran. In derselben Kultur existierten auch Hornperlen, die von konzentrisch und zwiebelschalenförmig gelagerten, verhornenden Keratinozyten gebildet wurden. Die E6/E7 raft-Kultur zeigte dysplastische basale Zellen mit pleiomorphen Nuclei. Man fand Parakeratose wie in der E6-Kultur und auch Merkmale der E7-Kultur. Immunhistochemische Färbungen verdeutlichten, dass die Kollagen VII abbauende Matrix-Metallo-Protease an der Dermis-Epidermis-Grenzzone überexprimiert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das E7-Protein entscheidend an der durch HPVs induzierten kutanen Onkogenese beteiligt ist.

## VIII. ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) types 5 and 8 are strongly associated with non-melanoma skin cancer in patients with the inherited disease epidermodysplasia verruciformis (EV). EV-tumours predominantly arise on sun-exposed skin, which points to a role of UV radiation and HPV as cofactors in skin carcinogenesis. In transient replication assays using deletion mutants and cloned subfragments of the non-coding region (NCR) of HPV8 we identified a 65 bp sequence in the 3'-part of the NCR to be necessary and sufficient to support replication *in cis*. The origin of replication (*ori*) of HPV8 is composed of the sequence motifs CCAAC and M29, which are highly conserved among the majority of EV-HPVs. Analysis of M29 revealed an unconventional binding site of the E2 protein and an overlapping DNA-recognition site of the tumor suppressor protein p53. Both these factors competitively bind to M29. The minimal *ori* sequences are also functionally critical for the early-promoter P<sub>175</sub>. In contrast to its inhibitory effect on replication, p53 stimulated the P<sub>175</sub> activity in transient transfection experiments depending on its interaction with M29. These observations suggest that p53 is involved in controlling the balance between DNA-replication and early gene expression of HPV8.

Since EV-tumours are found on sun-exposed skin, we analysed the effect of UV-B radiation on promoter-activity of EV-associated HPVs. In reporter gene assays, the full-length NCRs of HPV8 and HPV5 were upregulated after UV-B irradiation in primary cutaneous keratinocytes and in the p53-null keratinocytes RTS3b, but only small effects could be observed with the NCR of HPV5 in RTS3b cells. In the case of HPV5, the UV-B-dependent promoter-activation seems to be p53-dependent, whereas HPV8 can be regulated p53-independently. Using NCR deletion mutants of HPV8 it was shown that the A/T-Box might be involved in UV-B mediated activation of transcription.

Studies on the biology of EV-HPVs are rare compared to extensive investigations on genital HPV types. To date, little is known about the effects of the early proteins of EV-associated HPVs in keratinocytes. We investigated the effects of the E2, E6, E7 and E6/E7 genes of HPV8 on growth and differentiation of primary human skin keratinocytes in an organotypic raft-culture system. The corresponding ORFs were cloned into the retroviral vector pLXSN and recombinant viruses were then used to

infect primary skin keratinocytes, which were seeded onto de-epidermalized human dermis. After 14 days at the air-liquid interface, keratinocytes expressing the viral proteins E6, E7 and E6/E7 showed an altered differentiation profile and morphology. For E2 no differences could be observed compared to the negative control culture. In the E6 and E6/E7 raft-cultures parakeratosis was noted. The epithelial cells in the E7 raft-culture were atypical in size and shape and migrated downward into the dermis, penetrating the basement membrane as seen by disruption of collagen type VII expression in areas where keratinocytes have invaded the dermis. As in the E6/E7 expressing raft-cultures there were tumour pearls present, which represent fully keratinised cells. Immunohistochemical analysis also showed, that the collagen-type VII degrading matrix-metallo-proteinase 1 (MMP-1) is overexpressed at the dermal-epidermal-junction. These results demonstrate that keratinocytes transduced with HPV8-E7 show invasive characteristics of neoplastic cells.

## IX. ANHANG

## ABKÜRZUNGEN

|         |  |
|---------|--|
| Ab      | Antibody; Antikörper                           |
| ATP     | Adenosin-Triphosphat                           |
| BCC     | Basal-cell-carcinoma                           |
| bp      | Basenpaar                                      |
| BPV     | Bovines Papillomvirus                          |
| BSA     | Bovines Serum Albumin                          |
| Cdk     | Cylin-abhängige Kinase                         |
| CMV     | Cytomegalo-Virus                               |
| DMEM    | Dulbecco's modified Eagle Medium               |
| DMSO    | Dimethylsulfoxid                               |
| dNTP    | Desoxynukleosidtriphosphat                     |
| DTT     | Dithiothreitol                                 |
| E2BS    | E2-Bindestelle                                 |
| E. coli | Escherichia coli                               |
| EDTA    | Ethylendiamintetraacetat                       |
| EGTA    | Ethylenglykoltetraacetat                       |
| EGF     | Epidermaler Wachstumsfaktor                    |
| EV      | Epidermodysplasia verruciformis                |
| g       | Erdbeschleunigung                              |
| GST     | Glutathion-S-Transferase                       |
| HEPES   | N-2-Hydroxethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure |
| HPV     | Humanes Papillomvirus                          |
| IPTG    | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid           |
| K       | Keratin  |
| kD      | Kilodalton                                     |
| Luc     | Luciferase                                     |
| min     | Minute   |
| MMP     | Matrix-Metallo-Protease                        |
| MoMuLV  | Moloney-Murine-Leukemia-Virus                  |

|       |   |
|-------|---|
| m-RNA | messenger Ribonukleinsäure                              |
| NCR   | non-coding-region                                       |
| NMSC  | Non melanoma skin cancer; nicht-melanozytärer-Hautkrebs |
| nt    | Nukleotid   |
| OD    | Optische Dichte   |
| ONPG  | o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside               |
| ORF   | open-reading-frame                                      |
| ori   | origin of replication                                   |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                         |
| PCR   | Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion    |
| PMSF  | Phenylmethylsulfonylfluorid                             |
| pRb   | Retinoblastom-Protein                                   |
| PV    | Papillomvirus   |
| RLU   | Relative light unit                                     |
| RT    | Raumtemperatur  |
| SCC   | Squamous-cell-carcinoma; Plattenepithel-Karzinom        |
| SDS   | Natriumdodecylsulfat                                    |
| SSC   | Standard saline citrate                                 |





## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Herbert Pfister, für seine Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung bedanken, die zur Durchführung dieser Promotionsarbeit geführt haben.

Meinen verstorbenen Betreuer Prof. Pawel G. Fuchs werde ich nie vergessen.

Herrn Prof. Thomas Langer danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Bei Frau Alexandra van Mil möchte ich mich ganz herzlich für die technische Assistenz bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie der Universität zu Köln, besonders meinen Laborkollegen Maja Adam, Nadine Sichtig und Paolo Marcuzzi, sei für die sehr gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima gedankt.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Prof. Alan Storey und der gesamten Arbeitsgruppe am "Institute for Dermatology, Cancer Research UK, London" für die technische und wissenschaftliche Beratung bei der Durchführung meiner Experimente bedanken.

Diese Arbeit wurde vom Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) gefördert. Der Aufenthalt in London wurde durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) und von Cancer Research UK ermöglicht.

Diese Promotionsarbeit ist meinen Eltern und der Familie Erika und Klaus Höner aus Bergisch Gladbach gewidmet.



## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

|                      |                              |
|----------------------|------------------------------|
| Name, Vorname        | Akgül, Baki                  |
| Geburtstag           | 03.05.1975 in Sivas / Türkei |
| Familienstand        | ledig                        |
| Staatsangehörigkeit: | türkisch                     |

### Schulbildung:

|           |   |
|-----------|---|
| 1981-1985 | Gemeinschaftsgrundschule Hand / Paffrath, Bergisch-Gladbach |
| 1985-1991 | Realschule im Kleefeld, Bergisch-Gladbach                   |
| 1991-1994 | Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen                         |
| 06. 1994  | Allgemeine Hochschulreife                                   |

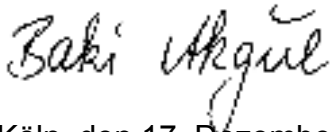
### Hochschulausbildung:

|                   |   |
|-------------------|---|
| 1994 - 1999       | Studium der Biologie (Diplom) an der Universität zu Köln  |
| 1998 - 1999       | Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu Köln<br>Thema: "Kartierung und Charakterisierung des DNA-Replikationsursprungspunktes der Epidermodysplasia verruciformis-assoziierten humanen Papillomvirustypen HPV8 und HPV9." |
| 05.1999           | Diplom in Biologie  |
| 07.1999-12.2002   | Dissertation am Institut für Virologie der Universität zu Köln<br>Thema: "Regulation der Transkription und Replikation von HPV8 und Charakterisierung der transformierenden Eigenschaft des viralen E7-Proteins."                           |
| 02.2002 – 06.2002 | DAAD Stipendiant, Forschungsaufenthalt am Skin Tumour Laboratory, Cancer Research UK, London  |
| 07.2002-10.2002   | Cancer Research UK Stipendiant, Forschungsaufenthalt am Skin Tumour Laboratory, Cancer Research UK, London  |



**ERKLÄRUNG**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 der Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Herbert Pfister betreut worden.



Köln, den 17. Dezember 2002

Teilpublikation:

**Akgül, B., Karle, P., Adam, M., Fuchs, P. G. and Pfister, H.**

Dual role of the tumor-suppressor p53 on replication and transcription of the epidermodysplasia verruciformis associated HPV8. (im Druck in *Virology*)

