

**Untersuchung des zellulären Proteins PBF
(Papillomavirus Binding Factor)
und dessen Rolle bei der Regulation der Transkription
von Papillomviren**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Steffi Boeckle

aus Köln

2002

Berichterstatter:

Prof. Dr. Herbert Pfister

Prof. Dr. Börries Kemper

Vorsitzender:

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Beisitzerin:

Dr. Gertrud Steger

Tag der Disputation:

07. Januar 2003

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Papillomviren.....	1
1.2	Der zelldifferenzierungsabhängige Lebenszyklus der Papillomviren.....	4
1.3	Der Aufbau des PV-Genoms	5
1.4	Die Funktionen der viralen Genprodukte	6
1.5	Die Regulation der Transkription durch zelluläre Faktoren.....	7
1.6	Die Regulation der PV-Genexpression durch E2	10
1.7	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	12
2.	Material	13
2.1	Bakterienstämme	13
2.2	Hefen	13
2.3	Eukaryote Zellen.....	13
2.4	Nukleinsäuren	14
2.4.1	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide	14
2.4.2	Klonierungsvektoren	16
2.4.3	Reporterplasmide	16
2.4.4	Expressionsvektoren	17
2.4.5	Hefe-Plasmide	18
2.4.6	DNA-Längenstandards	19
2.4.7	Sonstige Nukleinsäuren	19
2.5	Radioaktivität	19
2.6	Enzyme	20
2.7	Größenstandards	20
2.8	Antiseren.....	20
2.9	Reagenzien.....	20
2.9.1	Reagenziensysteme (Kits)	20
2.9.2	Puffer und Lösungen	21
2.9.3	Sonstige Chemikalien	27
2.10	Medien	28
2.10.1	Medien für die Hefekultivierung	28
2.10.2	Medien für die Bakterienkultivierung	29
2.10.3	Medien für die Zellkultivierung	30
3.	Methoden.....	31
3.1	Bakterienkultur	31
3.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation.....	31
3.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	31
3.1.3	Elektroporation	31
3.1.4	Langzeitlagerung von Bakterien.....	31
3.1.5	Kulturen zur Plasmidisolierung.....	32
3.1.6	Amplifizierung der HaCaT-cDNA-Bank	32
3.2	Das Hefe-One-Hybrid-System	32
3.2.1	Hefe-Flüssigkulturen	34
3.2.2	Agarplatten	34
3.2.3	Herstellung kompetenter Hefen.....	34
3.2.4	Transformation von Hefe.....	34
3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe.....	35
3.2.6	β -Galaktosidase-Tests	36
3.2.7	Langzeitlagerung von Hefe	36

3.2.8	Das Hefe-Two-Hybrid-System.....	37
3.3	Zellkulturen	38
3.3.1	Passagieren der Zellen	38
3.3.2	Transfektion der C33A-Zellen.....	38
3.3.3	Transfektion von HeLa- und RTS3b-Zellen.....	39
3.3.4	Zellernte.....	39
3.3.5	Luciferase- und β -Galaktosidase-Tes.....	40
3.4	DNA-Methoden	40
3.4.1	Standardmethoden	40
3.4.2	DNA-Präparation.....	40
3.4.3	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.....	41
3.4.4	DNA-Sequenzierung	41
3.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.4.6	<i>In vitro</i> Mutagenese.....	42
3.5	RNA-Isolierung	43
3.6	5' RACE	43
3.7	Proteine.....	45
3.7.1	Herstellung von Kernextrakten.....	45
3.7.2	Proteinisolierung mittels Affinitätschromatographie	46
3.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	47
3.7.4	Gelretardierungsexperiment ("EMSA")	47
3.7.5	Western-Blot.....	47
3.7.6	GST-Proteine	48
3.7.7	<i>In vitro</i> Translation	48
3.8	Interaktionsversuche.....	49
3.9	Immunfluoreszenz	49
3.10	FACS-Analyse.....	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Isolierung des PBF 5' Endes	51
4.2	Rekombinantes PBF und Herstellung eines spezifischen Antikörpers	53
4.3	Lokalisierung von PBF	55
4.4	Charakterisierung der PBF-Bindestelle.....	57
4.5	PBF bindet nicht an die methylierte Bindestelle P2	59
4.6	PBF bildet Dimere oder Multimere	60
4.7	Die Untersuchung der Rolle des Zinkfingers	61
4.8	PBF und RUNX1 binden gemeinsam an die E2 Bindestelle P2 aus HPV8	62
4.9	Mutationen in der HPV8 E2-Bindestelle P2 reduzieren die P ₇₅₃₅ -Aktivität.....	63
4.10	Vergleich der Repression vermittelnden E2 Bindestellen von HPV 8 und BPV 1	65
4.11	Mutationen im CCGG-Motiv von BPV1 E2 BS-1 reduzieren die P ₇₁₈₅ -Aktivität.....	67
4.12	BPV1 E2 verdrängt PBF von BPV1 E2 BS-1	68
4.13	Der Nachweis von endogenem PBF.....	69
4.14	Die an BS-1 bindenden zellulären Faktoren sind Aktivatoren der Transkription	72
4.15	PBF bindet an die Repression vermittelnde E2 BS#4 aus HPV16.....	73
4.16	Eine Mutation, die die Bindung von PBF an HPV16 E2 BS#4 <i>in vitro</i> verhindert, reduziert <i>in vivo</i> die P ₉₇ -Aktivität	75
4.17	Die an HPV16 E2 BS#4 bindenden zellulären Faktoren aktivieren die Transkription	76
4.18	Endogenes PBF bindet an HPV16 BS#4	78

4.19	Untersuchungen zur Rolle von PBF bei der Regulation der Transkription.....	79
4.20	PBF vermittelt Repression.....	79
4.21	Überexpression von PBF in RTS3b- und C33A-Zellen führt zur Reduktion der Zellzahl	81
4.22	Die Suche nach möglichen Interaktionspartnern von PBF.....	83
4.23	Ein zellulärer Faktor moduliert die Bindungseigenschaften von PBF an 16 BS#4	84
4.24	Der Faktor aus RTS3b-Zellen konnte in weiteren Zelllinien nachgewiesen werden	85
4.25	Charakterisierung der Bindeeigenschaften des „RTS3b-Faktors“	87
4.26	Die Suche nach einem HPV16 E2 BS#4-bindenden Faktor mit Hilfe des Hefe- One-Hybrid-Systems	89
4.27	ONPG-Test	91
4.28	Hefe-Retransformation	92
5.	Diskussion.....	94
5.1	Charakterisierung von PBF	94
5.2	Die Rolle von PBF bei der PV-Genexpression	97
5.3	Der RTS3b-Faktor	104
6.	Literaturverzeichnis	108
7.	Abkürzungsverzeichnis	117
8.	Zusammenfassung	119
9.	Abstract	120
10.	Lebenslauf	121
11.	Erklärung	122
12.	Danksagung.....	123

1. Einleitung

1.1 Die Papillomviren

Papillomviren (PV) bilden die Familie der Papillomaviridae. Diese Viren infizieren die Zellen der Haut bzw. Schleimhaut und induzieren dort primär benigne, epitheliale Tumoren wie Warzen, Papillome, Kondylome, etc. Diese sind meist harmlos, da sie ein begrenztes Wachstum aufweisen und sich spontan zurückbilden (Shah und Howley, 1996). Infektionen mit bestimmten humanen PV-Typen (HPV) bedeuten jedoch ein hohes Risiko, daß sich Karzinome entwickeln (zur Hausen, 1996). HPVs, die nur selten in malignen Tumoren zu finden sind (wie z.B. HPV6 und HPV11 aus Genitalwarzen), gehören zu den sogenannten „Niedrigrisiko-Typen“ (aus: zur Hausen, 2000). Typen, die regelmäßig in HPV-assoziierten Karzinomen gefunden werden, wird ein erhöhtes karzinogenes Potential zugeschrieben. Sie gehören zu den als „Hochrisiko-Typen“ bezeichneten Viren.

Bei PV handelt es sich um kleine, ikosaedrische, nicht umhüllte Viren, die im Zellkern der Wirtszelle replizieren. Hier findet auch der Zusammenbau der Virionen statt (Howley, 1996). Die Viruskapside besitzen einen Durchmesser von 50-60 nm und bestehen aus 72 Kapsomeren. Ihr Genom besteht aus ringförmig geschlossener, doppelsträngiger DNA von etwa acht Kilobasenpaaren, die mit zellulären Histonen assoziiert ist und nucleosomenähnliche Strukturen bildet.

Bis zum Jahr 2001 wurden über hundert verschiedene PV-Typen isoliert, und davon 86 humane und 16 animale Typen vollständig sequenziert (de Villiers, 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien in dem am besten konservierten offenen Leserahmen (ORF) L1 wurde die Familie der *Papillomaviridae* phylogenetisch in fünf Unterfamilien (*Papillomavirinae*) eingeteilt (Abb. 1). In der Unterfamilie A findet man die genitalen / schleimhaut-infizierenden PV, in der Unterfamilie B die kutane Gruppe u.a. mit den Epidermodysplasia verruciformis-assoziierten HPV, die Unterfamilie C enthält animale PV (u.a. den bovinen Typ 1 (BPV1)), die Unterfamilie D besteht aus drei bovinen PV-Typen und zu der Unterfamilie E gehören HPV1, HPV63 und einige animale PV. Die Unterfamilien (z.B. A) bestehen aus mehreren Gattungen (zB. A1-A14), denen die verschiedenen Typen zugeordnet sind. Dabei wird ein HPV als eigener Typ definiert, wenn er weniger als 90 % Homologie im L1-Leserahmen zu dem am nächsten verwandten Typ aufweist (zusammengefaßt in: de Villiers, 2001).

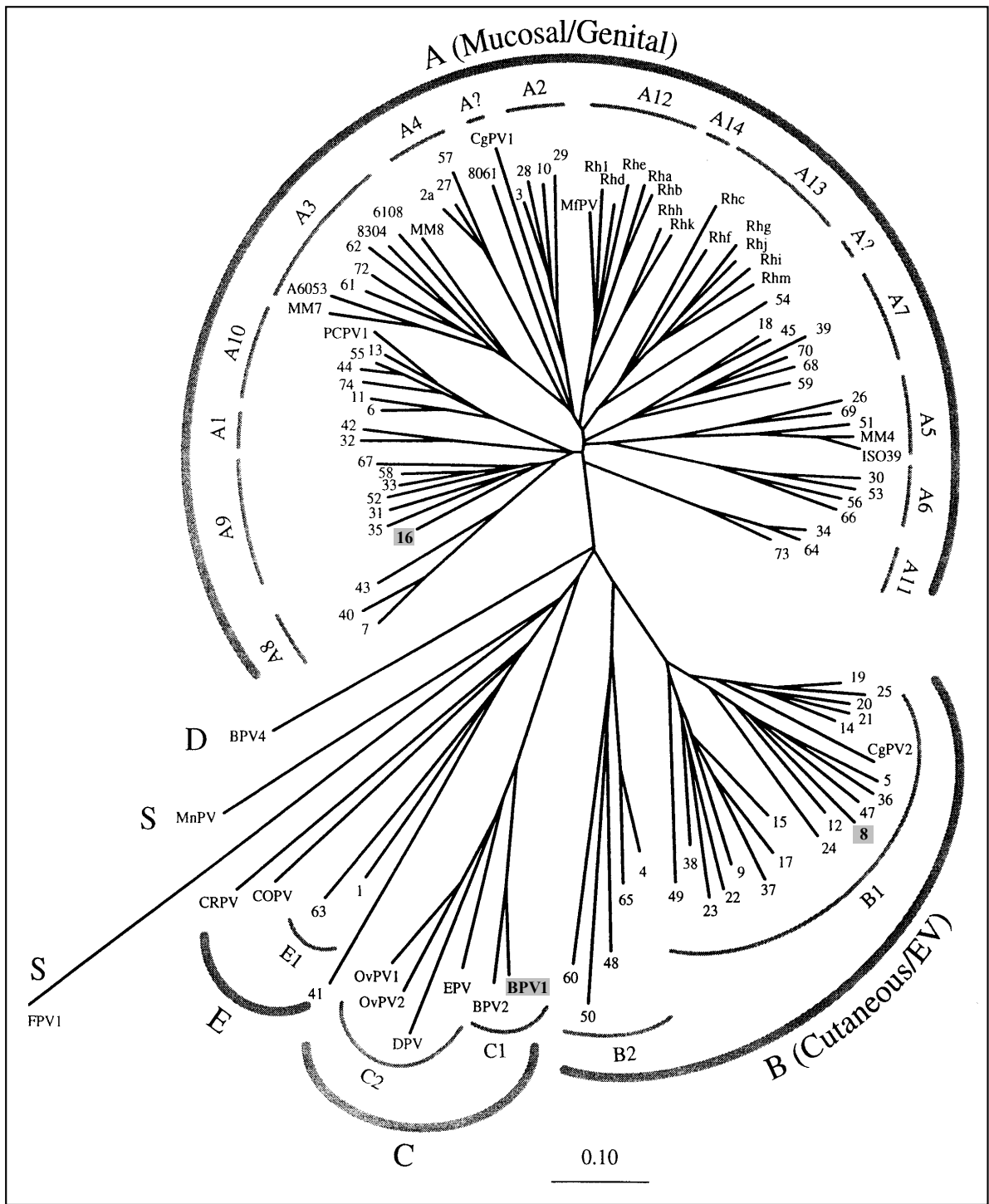


Abb. 1 Stammbaum der Papillomviren

Einteilung von 106 PV nach Sequenzhomologien des L1-Leserahmens, die mit den Zielepithelien der Viren korreliert (aus Myers *et al.*, 1997). Einfache Zahlen geben HPV-Typen an, deren gesamtes Genom sequenziert wurde. Buchstaben und Zahlen bezeichnen animale Typen oder HPV-Typen, deren Sequenz nicht vollständig bekannt ist. Die in dieser Arbeit untersuchten PV-Typen sind grau unterlegt. Mucosal = schleimhaut-infizierende PV; cutaneous = haut-infizierende (kutane); EV = Epidermodysplasia verruciformis-assoziierte PV).

Die Vertreter der HPVs, die die Schleimhaut des Anogenitaltraktes infizieren (die „genitalen“ PV), sind besonders im Zusammenhang mit Dysplasien der Gebärmutterhalsschleimhaut (CIN = cervikale, intraepitheliale Neoplasien), die als Vorläufer des Zervixkarzinoms gelten, untersucht worden. Neuere Studien belegen, daß 99,7 % der invasiven Zervixkarzinome HPV-positiv sind. Die am häufigsten nachgewiesenen PV waren die Hochrisiko-Typen HPV16 (53 %) und HPV18 (15 %), HPV45 (9 %), HPV31 (6 %) und HPV33 (3 %) (Muñoz, 2000). Die Typen 16 und 18 wurden bereits früher als humanes Karzinogen eingestuft (IARC, 1995), gefolgt von den anderen genannten HPV-Typen. Die Assoziation der Hochrisiko-Typen mit Karzinomen korreliert zudem mit der Beobachtung, daß die DNAs von HPV16 und 18 *in vitro* menschliche Keratinozyten immortalisieren können (Mansur und Androphy, 1993). DNA von PV, die man nur selten oder gar nicht in malignen Läsionen findet, ist dazu nicht in der Lage (z.B. Storey *et al.*, 1988; Münger *et al.*, 1989).

Eine weitere Krebsart bei der zum Teil auch PV eine Rolle spielen sind Tumoren im Kopf- und Halsbereich (head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC), die 1990 weltweit etwa 6 % der neu auftretenden Krebsfälle ausmachten (Parkin *et al.*, 1999). Neben den anerkannten Risikofaktoren wie z.B. starker Alkohol- oder Tabakkonsum (Vokes *et al.*, 1993), stellen onkogene PV zusätzliche oder unabhängige Risikofaktoren dar. So wurde in etwa 26 % der unterschiedlichen Tumoren HPV-DNA nachgewiesen (Gillison *et al.*, 2000), im Fall der untersuchten Tonsillen-Karzinome in 58 %. Die meisten der HPV-positiven HNSCC enthielten Sequenzen des bereits erwähnten, schleimhaut-infizierenden Hochrisiko-Typs HPV16 (Klussmann *et al.*, 2001).

Die höchste Entartungsrate tritt bei Patienten mit der seltenen Krankheit Epidermodysplasia verruciformis (Ev) auf. Diese Krankheit, die familiär gehäuft auftritt, macht die Patienten empfänglich für Infektionen mit einer Gruppe von HPV-Typen, den Ev-assoziierten Viren. Während eine Vielzahl von Ev-assoziierten Typen in den gutartigen, makulösen Hautveränderungen vorliegen, konnten HPV5 oder HPV8 in 90 % der Plattenepithelkarzinome gefunden werden, die sich sehr häufig bei diesen Patienten entwickeln (Pfister, 1992). Nach etwa 10-30 Jahren entstehen diese Tumoren innerhalb der ursprünglich gutartigen Läsionen, meistens an sonnenlichtexponierten Stellen (Orth, 1987). Untersuchungen bei Negroiden, die nur selten maligne Entartungen aufweisen, verstärken den Verdacht, daß UV-Strahlung ein wichtiger Kofaktor der Karzinogenese ist (Jacyk und de Villiers, 1993). Eine weitere Patientengruppe, bei der Ev-HPV in Plattenepithelkarzinomen

gefunden wurden, sind immunsupprimierte Nierentransplantatempfänger, aber auch in Hauttumoren immunkompetenter Patienten konnte Ev-HPV DNA gefunden werden. Die Rolle, die HPV bei der malignen Entartung der Haut spielt, ist bisher unklar (Pfister und ter Schegget, 1997).

Ein weiterer Vertreter der PV ist das Rinderpapillomvirus BPV1. Es gehört zu den sogenannten Fibropapillomviren, die hauptsächlich die subepithelialen Fibroblasten infizieren und transformieren. Als einziger Vertreter der PV kann es Artbarrieren überwinden. So hat man natürliche Infektionen mit BPV1 bei Pferden, Eseln und Schafen gefunden (z.B. Angelos *et al.*, 1991).

1.2 Der zellendifferenzierungsabhängige Lebenszyklus der Papillomviren

Die PV gelangen vermutlich durch Mikroverletzungen in die Haut oder Schleimhaut und infizieren die Basalzellen der Epidermis. Sie replizieren epithelspezifisch und vermehren sich in Abhängigkeit von der Differenzierung der Haut (zusammengefasst in: Fuchs und Pfister, 1997), die parallel mit der Teilung der Basalzellen, und der Verdrängung der darüberliegenden Keratinozyten zur Hautoberfläche hin erfolgt. Das Hauptkapsidprotein L1 vermittelt den ersten Kontakt mit Epithelzellen des *Stratum basale* durch eine relativ spezifische Bindung an Heparin (Joyce *et al.*, 1999; Giroglou *et al.*, 2001). Viele epitheliale Zellen können HPV-Partikel *in vitro* binden und aufnehmen, aber es findet in ihnen keine Virusvermehrung statt. Dies deutet darauf hin, daß der Zelltropismus der PV für epitheliale Keratinozyten und Fibroblasten durch intrazelluläre Ereignisse festgelegt wird, und nicht durch die Anwesenheit eines spezifischen Oberflächenrezeptors (Müller *et al.*, 1995). Nach der endosomalen Aufnahme in die Zelle (Selinka *et al.*, 2002) wird das virale Genom in den Zellkern transportiert. Hier liegt es extrachromosomal vor und es findet eine geringe Expression der frühen viralen Gene, und eine geringe Replikation der viralen DNA (~50 Kopien) statt. Teilt sich die infizierte Zelle, so wird die virale DNA auf die Tochterzellen verteilt (Stubenrauch und Laimins, 1999). In den Zellen des *Stratum spinosum* und *granulosum* nimmt die Expression der regulatorischen Proteine, einschließlich der Onkoproteine E6 und E7, zu und es kommt zur vegetativen Replikation der DNA. In den terminal differenzierten Zellen des *Stratum granulosum* erfolgt die Expression der späten Gene. Der Zusammenbau der Virionen ist auf die differenzierten Keratinozyten begrenzt (Dürst *et al.*, 1992; Higgins *et al.*, 1992; Haller *et al.*, 1995). Die infektiösen HPVs werden mit den Zellen des *Stratum corneum* abgestoßen und bei deren Zerfall freigesetzt.

1.3 Der Aufbau des PV-Genoms

Im Genom von PV lassen sich drei Regionen unterscheiden (Abb. 2). Die frühe (E, „early“) Region besteht aus mindestens sechs ORFs. Diese kodieren für regulatorische Proteine, die für Transkription, Replikation und Pathogenese notwendig sind. Die späte (L, „late“) Region besitzt zwei ORFs, die für die Strukturproteine L1 und L2 kodieren, sowie eine nicht kodierende Region (NCR), auch „long control region“ (LCR) oder „upstream regulatory region“ (URR), die Kontrollelemente für die Transkription und Replikation enthält. Alle ORFs liegen auf dem selben DNA-Strang und sind trotz großer Unterschiede in Sequenz, Position, Größe und Funktion innerhalb der Papillomviren gut konserviert (Pfister und Fuchs, 1987). Die Transkription erfolgt durch mindestens zwei verschiedene Promotoren. In den unteren Zellschichten des infizierten Epithels sind die Transkripte des frühen Promotors, stromaufwärts des E6-ORF, vorherrschend, wie für HPV16 und 31b gezeigt wurde. Die mRNAs sind polycistronisch und kodieren für mehrere frühe ORFs, die durch alternatives Splicen entstehen (Baker, 1993). Die frühen Transkripte benutzen hauptsächlich ein Polyadenylierungssignal stromabwärts des E5-Leserahmens (Hummel *et al.*, 1992; Ozbun und Meyers, 1998). In den oberen Zellschichten kommt es differenzierungsabhängig zur vegetativen Replikation durch Aktivierung des Promotors im E7-ORF und damit verbunden zur Zunahme der E1-, E2- und späten Transkripte (aus: Stubenrauch und Laimins, 1999). Die Transkription dieser prä-mRNAs endet entweder an dem Polyadenylierungssignal am Ende des E5- oder, in steigender Menge, am Ende des L1-Leserahmens (Terhune *et al.*, 1999). Diese Polyadenylierungssignale sind zwischen den einzelnen PV konserviert (Baker und Howley, 1987; Kennedy *et al.*, 1990).

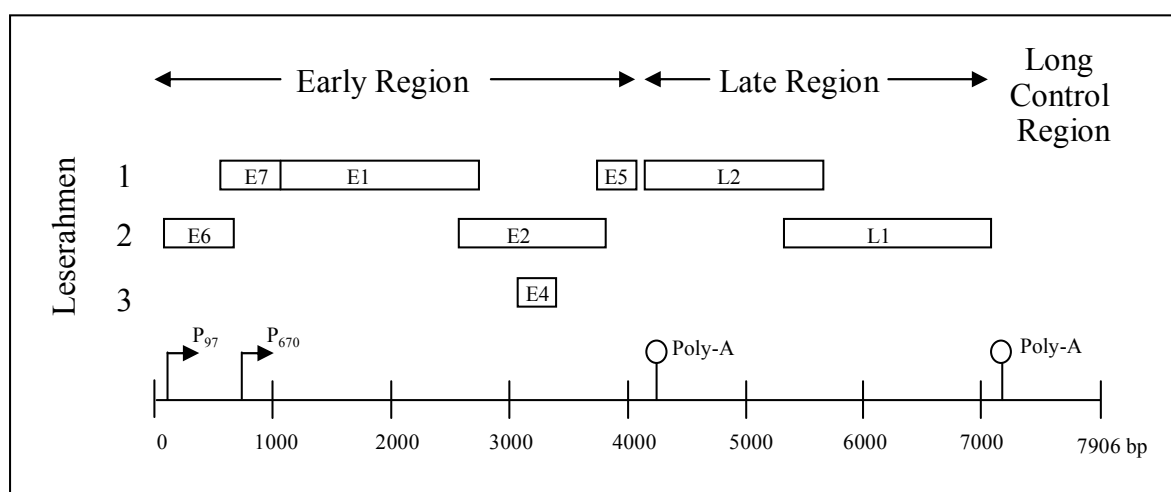


Abb. 2 Die Genomorganisation der PV am Beispiel des genitalen HPV16

Das Genom der PV ist in drei Abschnitte eingeteilt, die frühe „Early“, die späte „Late“ und die „Long Control Region“. Die offenen Leserahmen liegen alle auf dem gleichen DNA-Strang und sind als Boxen markiert. Die Lage der Transkriptions-Terminationssignale (Poly-A) sowie die des frühen (Onkogen-)Promotors P₉₇ und des späten Promotors P₆₇₀ sind angegeben

1.4 Die Funktionen der viralen Genprodukte

E1 und E2

Das E2-Protein ist etwa 45-50 kDa groß und besteht aus drei Domänen. Die N-terminale Aktivierungsdomäne und die C-terminale DNA-Binde-/Dimerisierungsdomäne sind zwischen den einzelnen PV konserviert (Ham *et al.*, 1991), im Gegensatz zur Verbindungsregion („Hinge“), die nur schwach konserviert und von unterschiedlicher Länge ist. Sie stellt eine flexible Verbindung zwischen den beiden Domänen dar, kann aber auch selber über andere Proteine die Transkription beeinflussen, wie für BPV1 E2 und TBP (TATA-Box Binding Protein) gezeigt wurde (Steger *et al.*, 1995). Neben dem gesamten E2-Protein existieren in der Zelle auch zwei N-terminal verkürzte Formen. Diese reprimieren die Aktivierung durch E2 und inhibieren die Replikation (siehe unten), da ihnen die für beide Funktionen essentielle Aktivierungsdomäne fehlt (McBride *et al.*, 1991). BPV1 E2 bindet über seine Aktivierungsdomäne an mitotisches Chromatin (Skiadopoulos und McBride, 1998) und erlaubt dadurch vermutlich die Verteilung der Virus-DNA auf die Tochterzellen. Auch eine Rolle von E2 bei der Verpackung der Virus-DNA in Kapside wurde gezeigt (Day *et al.*, 1998). Die E2-Proteine erfüllen außerdem eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Transkription, auf die weiter unten genauer eingegangen wird.

Zusammen mit E1 ist E2 für die virale Replikation nötig (Mohr *et al.*, 1990; Ustav und Stenlund, 1991). Das E2-Protein rekrutiert das Protein E1 an den Replikationsursprung (ori) (Sanders und Stenlund, 1998), an den E1 relativ unspezifisch bindet. Zur Stabilisierung der schwachen Interaktion von E1 mit der DNA bindet E2 an benachbarte Sequenzen (McBride *et al.*, 1991) und bildet mit E1 einen Komplex (Frattini und Laimins, 1994; Sedman und Stenlund, 1995). Dabei interagieren sowohl die DNA-bindenden Domänen beider Proteine, als auch die E2-Transaktivierungsdomäne und die C-terminale Helikasedomäne von E1 (Mohr *et al.*, 1990; Masterson *et al.*, 1998; Chen und Stenlund, 1998; Gillitzer *et al.*, 2000). Durch diese Kooperation werden Spezifität und Effizienz der E1-Bindung erhöht, so daß E2 aus dem Komplex entlassen wird, während sich weitere E1-Moleküle anlagern (Sanders und Stenlund, 1998). Dieser multimere Komplex besitzt Helikase-Aktivität und leitet die Entwindung der DNA am ori ein. Zusätzlich interagiert E1 mit Replikationsfaktoren der Wirtszelle und bringt diese an den ori (u.a. die DNA-Polymerase alpha) (zusammengefaßt in: Stubenrauch und Laimins, 1999 sowie Wilson *et al.*, 2002).

Die Onkogene E6 und E7

Die Replikation der viralen DNA findet in den differenzierten Zellen der Haut statt. Hierfür benötigen die PV Wirtszellfaktoren, die in diesen Zellen nicht mehr exprimiert werden. Die Genprodukte der E6- und E7-ORFs sind Onkoproteine, die die geeignete Umgebung für eine Expression der für die virale Replikation notwendigen Faktoren schaffen. Durch die Interaktion u.a. mit Tumorsuppressorproteinen der Wirtszelle inaktivieren sie verschiedene Zellzyklus-Kontrollpunkte (Crook und Vousden, 1996). Die E7-Proteine der Hochrisiko-Typen können die DNA-Synthese in Zellen induzieren (Demeter *et al.*, 1994), indem sie an das Retinoblastom-Genprodukt (Rb) binden (Dyson *et al.*, 1989). Durch die Interaktion mit weiteren Wirtszellproteinen (zusammengefaßt in: zur Hausen, 2000) spielen sie u.a. eine Rolle bei der Zellimmortalisierung (Münger und Phelps, 1993) sowie bei der Induktion von Apoptose (Puthenveetil *et al.*, 1996).

Die von E7 verursachte unkontrollierte DNA-Synthese würde zum frühzeitigen Tod der Wirtszelle führen (Thomas *et al.*, 1998). Um der Apoptose entgegenzuwirken, sind die E6-Proteine der genitalen Hochrisiko-Typen in der Lage an p53 zu binden (Werness *et al.*, 1990) und es dem ubiquitin-abhängigen Abbau zuzuführen (Scheffner *et al.*, 1990). Auch für E6 wurde eine Reihe zellulärer Interaktionspartner gefunden (zusammengefaßt in: zur Hausen, 2000) die u.a. die Aktivierung der Wirtszell-Telomerase (Klingelhutz *et al.*, 1996) vermitteln.

Während in prämaligen Veränderungen das virale Genom typischerweise extrachromosomal vorliegt (Dürst *et al.*, 1985), kommt es im Verlauf der Karzinogenese zur Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom, wie es in der Mehrheit der Zervixkarzinome gefunden wurde (Choo *et al.*, 1987). Bei diesem Prozess kommt es in der Regel zur Zerstörung des E2-Leserahmens und daraus resultierend zu einer veränderten E6- / E7-Expression.

1.5 Die Regulation der Transkription durch zelluläre Faktoren

Die LCR der genitalen Papillomviren ist in der Regel ~1 kb lang. Bei HPV16 enthält sie an ihrem 3`Ende den für die Transkription der Onkogene E6 und E7 verantwortlichen frühen Promotor P₉₇ (Abb. 3). Weiter stromaufwärts befindet sich ein Verstärkerelement (Enhancer), in dem Bindestellen für zelluläre Faktoren lokalisiert sind. Die Organisation der LCR von HPV16 ist repräsentativ für alle genitalen HPV-Typen. Sie enthält Erkennungssequenzen für mindestens zwölf verschiedene zelluläre Transkriptionsfaktoren (aufgeführt in: Veress *et al.*, 1999). Durch die Bindung an ihre Erkennungssequenzen können diese Faktoren die Transkription des P₉₇ positiv (z.B. AP-1 (Chan *et al.*, 1990), Sp-1 (Gloss und Bernard, 1990), NFI (Apt *et al.*, 1993) Oct-1 (O`Connor und Bernard, 1995) und TEF-1 (Ishiji *et al.*, 1992))

oder negativ beeinflussen, wie z.B. YY1 (Dong *et al.*, 1994b; May *et al.*, 1994) und NF-IL6 (Kyo *et al.*, 1993). Eine Rolle bei der Keratinozyten-Spezifität des Enhancers spielt wohl AP-1. Hierbei handelt es sich um einen Heterodimer-Komplex aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Familien deren jeweiligen Expressionsmuster und Gewebeverteilungen unterschiedlich sind. Die AP-1-Zusammensetzung ändert sich im Laufe der Differenzierung, so daß seine Aktivität zunimmt (Thierry *et al.*, 1992) und AP-1 zusammen mit HMG-I(Y) zur Ausbildung eines Nucleoprotein-Komplexes führt (Bouallaga *et al.*, 2000). Dadurch kommt es zur Aktivierung des späten Promotors. Zudem korreliert das AP-1 Expressionsmuster mit dem von HPV31b E6/E7, was impliziert, daß die Expression der Onkogene im differenzierenden Epithel von AP-1 abhängig sein könnte (Kyo *et al.*, 1997).

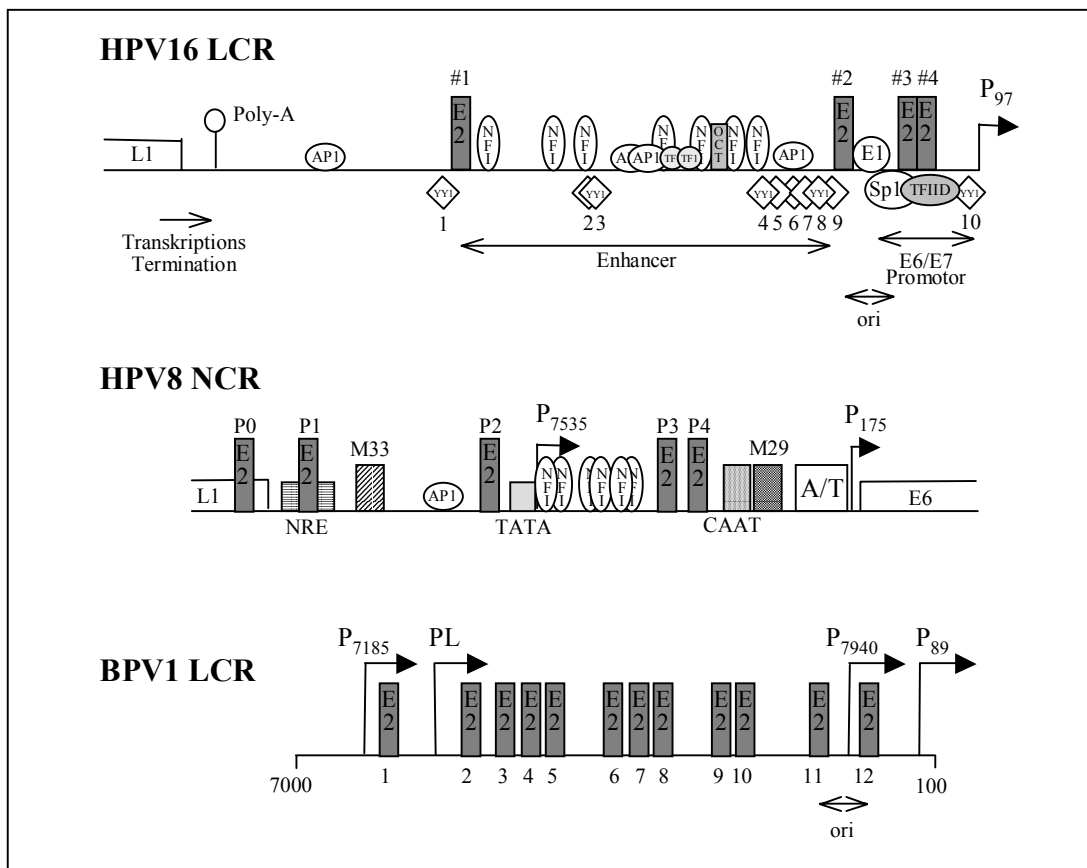


Abb. 3 Die URR von HPV16, HPV8 und BPV1

HPV16: Die LCR von HPV16 enthält am 5'Ende ein Transkriptions-Terminationssignal (Poly-A), das epitheliale zellspezifische Enhancer-Element mit Bindestellen für zelluläre Faktoren und im 3' Bereich den Replikationsursprung (ori) sowie den Promotor P₉₇. OCT: Oct-1; TF1: TEF-1 (aus: O'Connor *et al.*, 1996).

HPV8: Die NCR von HPV8 mit den hoch konservierten Sequenzelementen der Ev-assozierten HPVs und den Bindestellen für das virale E2-Protein (P0-P4). Die Initiationsstellen der Transkription sind als Pfeile dargestellt (nach Fuchs und Pfister, 1996). NRE: negative regulating element.

BPV1: Die Lage der E2-Bindestellen, des ori und der Promotoren sind angegeben.

Der Transkriptionsfaktor Yin-Yang 1 (YY1) spielt eine Rolle bei der Regulation zellulärer und viraler Gene (O'Connor *et al.*, 1996). Dabei vermittelt YY1 durch die Bindung an unterschiedliche regulatorische Elemente sowohl Aktivierung als auch Repression, wie z.B. für den Promotor P₁₇₅ von HPV8 gezeigt werden konnte (Pajunk *et al.*, 1997). Die Bedeutung der YY1-Bindung für die Kontrolle des E6/E7-Promotors wurde deutlich, nachdem Mutationen in YY1-Bindestellen in Isolaten aus Zervixkarzinomen gefunden wurden. Diese Mutationen verhinderten *in vitro* die YY1-Bindung und Reporterkonstrukte, die die Mutationen im Kontext der LCR enthielten, zeigten eine erhöhte Aktivität (May *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 1994b). Mehrere Mechanismen wurden beschrieben, die die unterschiedlichen regulatorischen Effekte erklären sollen, z.B. die Konkurrenz mit Aktivatorproteinen um DNA-Bindung (Natesan und Gilman, 1995; Lu *et al.*, 1994; Dong und Pfister, 1999). Eine wichtige Rolle scheint YY1 bei der Induktion des späten Promotors zu spielen. Stromaufwärts des P₆₇₀ wurden zwei Bindestellen identifiziert, die sowohl von YY1 als auch von hSkn-1a, einem differenzierungsspezifischen Transkriptionsfaktor, gebunden werden. Im Verlauf der Differenzierung wird hSkn-1a induziert und verdrängt YY1 von den Bindestellen, so daß der Promotor aktiviert wird (Kukimoto und Kanda, 2001). Weiterhin führt die Bildung von Heterodimeren mit Regulatoren der Transkription (Shrivastava *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995) oder die Biegung der DNA durch YY1 (Natesan und Gilman, 1993) zu einer Veränderung der Promotoraktivität. Die reprimierende bzw. aktivierende Aktivität von YY1 kann ebenfalls durch Acetylierung und Deacetylierung von YY1 bestimmt werden (Yao *et al.*, 2001).

Kutane PV besitzen eine wesentlich kürzere NCR als die genitalen Typen (im Fall von HPV8: 460 bp) (Fuchs und Pfister, 1996), mit Bindestellen für die bereits beschriebenen zellulären Faktoren AP-1, NFI und YY1 (zusammengefaßt in: Fuchs und Pfister, 1997). Zusätzlich besitzen Ev-assoziierte PV weitere Sequenzelemente wie das M33/AP1-, CAAT-, M29-Motiv und eine 50 bp-Folge von A und T (A/T-Motiv) sowie fünf E2-Bindestellen (P0-P4) mit hoch konservierter Anordnung (Fuchs und Pfister, 1996). HPV8 besitzt einen Promotor am 3`Ende der NCR an Position 175 (P₁₇₅), der für die E6-Expression verantwortlich ist, und P₇₅₃₅, der die L1- und E2-Expression steuert. Die Promotoraktivität wird durch das Negativ Regulierende Element (NRE), das mit der E2-Bindestelle P1 überlappt negativ moduliert, während die M33/AP1-Region einen positiven Einfluß ausübt.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der PV-Transkription spielt die Assoziation der DNA mit speziell positionierten Nucleosomen, die den Zugang zur DNA für Transkriptionsfaktoren

blockieren und somit den Promotor reprimieren. CDP, das an die LCR von HPV16 bindet, unterstützt diese Repression und inhibiert zusätzlich die Replikation. Die Repression kann durch einen noch nicht verstandenen Mechanismus nach der Integration in das Wirtsgenom ausgeschaltet werden, was zu einer Überexpression der Onkogene führt. Daher wäre die Integration in die zelluläre DNA ein weiterer Schritt in der Tumorprogression (zusammengefaßt in: Bernard, 2000).

1.6 Die Regulation der PV-Genexpression durch E2

Zusätzlich zu den Bindestellen zellulärer Transkriptionsfaktoren, enthält die LCR humaner PVs (Abb. 3) vier bis fünf Bindestellen für das virale E2-Protein mit der Konsensussequenz ACCGN₄CGGT, die eine unterschiedliche Affinität für E2 besitzen. Das vollständige E2-Protein ist in der Lage, die Transkription zu aktivieren (z.B. Bouvard *et al.*, 1994) oder zu reprimieren (z.B. Tan *et al.*, 1992). Für die Aktivierung benötigt E2 die N-terminale Aktivierungsdomäne, über die zelluläre Zielproteine kontaktiert werden: z.B. die Transkriptionsfaktoren TBP, TFIIB, Sp1, AMF1 und CBP/p300 (Li *et al.*, 1991; Spalholz *et al.*, 1991; Rank und Lambert, 1995; Steger *et al.*, 1995; Benson *et al.*, 1997; Breiding *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung durch Bindung von E2 an hochaffine, promotor-distale Bindestellen vermittelt wird (Stubenrauch und Pfister, 1994; Stubenrauch *et al.*, 1996; Steger und Corbach, 1997). Repression erfolgt hingegen durch Bindung von E2 an niedrigaffine, promotor-proximale Bindestellen, die mit Erkennungssequenzen für zelluläre Transkriptionsfaktoren überlappen.

Für die genitalen Typen wurde herausgefunden, daß die Repression des frühen Promotors durch Bindung von E2 an eine (HPV18; Dostatni *et al.*, 1991; Demeret *et al.*, 1994) bzw. zwei (HPV16; Tan *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1994) promotor-proximale E2-Bindestellen vermittelt wird. Diese Bindstellen sind durch ein bzw. drei Nukleotide von der Erkennungssequenz für Sp1 bzw. TBP, die DNA-bindende Komponente des TFIID, getrennt, so daß diese Faktoren verdrängt und P₉₇ reprimiert wird. Außerdem wird die Beteiligung weiterer, bisher nicht charakterisierter, zellulärer Faktoren angenommen, da Mutationen außerhalb der bekannten Bindestellen die Promotoraktivität weiter reduzieren (Demeret *et al.*, 1997). Für HPV18 konnte gezeigt werden, daß die Bindung an die unterschiedlich affinen Bindestellen dosisabhängig ist, so daß in Gegenwart niedriger E2-Konzentrationen die hoch affinen Bindestellen besetzt sind, und der Promotor aktiviert wird. Liegen in der Zelle hohe Mengen an E2 vor, so kommt es durch Bindung der niedrig affinen Bindestellen zur Repression (Steger und Corbach, 1997).

Die Aktivierung des HPV8 P₇₅₃₅ durch E2, die ebenfalls dosisabhängig ist, wird durch Bindung von E2 an P0 und P1 sowie an P3 und P4 vermittelt. Die niedrig affine Bindestelle P2, die unmittelbar vor der TATA-Box des P₇₅₃₅ lokalisiert ist, reprimiert den Promotor (Stubenrauch und Pfister, 1994). Punktmutationen innerhalb der E2-Bindestelle P2 verhindern nicht nur die Repression durch E2, sondern reduzieren zudem in Abwesenheit von E2 die Promotoraktivität, was darauf hindeutet, daß zelluläre Faktoren, die für die Basalaktivität nötig sind, hier binden (Horn *et al.*, 1993; Stubenrauch und Pfister, 1994; Stubenrauch *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß RUNX1 (früher: PEBP2, CBF oder AML1) an die 5'-Hälfte dieser E2-Bindestelle bindet und für die Basalaktivität des P₇₅₃₅ mit verantwortlich ist (Schmidt *et al.*, 1997). Die Bindung von RUNX1 an die DNA wird durch Autoinhibition vermindert, so daß erst durch die Dimerisierung mit CBF β eine effiziente Bindung stattfinden kann. Die Aktivierungsdomäne von RUNX1 ist zweigeteilt, und beide Teile scheinen unabhängig voneinander Transkription aktivieren zu können (zusammengefaßt in: Ito, 1999). Die Untersuchungen ergaben weiterhin, daß E2 mit RUNX1 um die Bindung an die DNA kompetiert (Schmidt *et al.*, 1997). Da die beschriebene Mutation in P2 jedoch die Bindung von RUNX1 *in vitro* nicht beeinträchtigte (Schmidt *et al.*, 1997), könnte ein weiterer zellulärer Faktor hier binden, der von E2 verdrängt wird.

Bei BPV1, das 17 E2-Bindestellen enthält, wird durch das vollständige E2-Protein die Transkription mehrerer Promotoren (P₇₉₄₀, P₈₉, P₂₄₄₃ und P₃₀₈₀) stark aktiviert (Spalholz *et al.*, 1987, Spalholz *et al.*, 1991), während der Promotor an Position 7185 (P₇₁₈₅) durch Bindung der niedrig affinen Bindestelle 1 (BS-1), die stromabwärts des Promotors liegt, reprimiert wird (Li *et al.*, 1989; Stenlund und Botchan, 1990; Vande Pol und Howley, 1990). Die Sequenzen, die die Repression vermittelnden Bindestellen BS-1 aus BPV1 und P2 aus HPV8 umgeben, sind hoch konserviert und es konnte gezeigt werden, daß RUNX1 auch an BPV4 BS-2 und BPV1 BS-1 bindet (Jackson und Campo, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). Mutationen, die die Bindung von RUNX1 *in vitro* verhinderten, reduzierten die P₇₁₈₅-Aktivität in Reporterkonstrukten und verhinderten weitestgehend die Repression durch E2. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Repression von HPV8 P₇₅₃₅ und BPV1 P₇₁₈₅ durch E2 über die Konkurrenz von RUNX1 und E2 um DNA-Bindung vermittelt wird (Schmidt *et al.*, 1997), und daß ein weiterer zellulärer Faktor an der Regulation beteiligt sein könnte.

Im Verlauf meiner Diplomarbeit konnte mit Hilfe des Hefe-One-Hybrid-Systems und der Repression vermittelnden E2-Bindestelle P2 aus HPV8 ein Teil eines Gens isoliert und

kloniert werden, das für einen bisher unbekanntem, zellulären Faktor kodiert. Der klonierte ORF, der kein Startkodon enthält, war 1095 n lang und kodierte für ein etwa 42 kDa großes Protein. Die Bindung des Faktors an P2 aus HPV8 konnte mit Hilfe eines Gelretardierungsexperiments (EMSA) mit prokaryot exprimiertem Protein nachgewiesen werden. Durch Mutationsanalysen wurden die für die Bindung essentiellen Nukleotide als CCCGGT bestimmt. Diese Sequenz ist im 3'-Bereich von P2 enthalten. Weiterhin ergaben sich durch Kompetitionsversuche Hinweise darauf, daß das unbekannte Protein ebenfalls an die Repression vermittelnde BPV1 BS-1 bindet (Boeckle, 1998).

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Leserahmen des unbekanntem Faktors vollständig isoliert werden. Das kodierte Protein sollte dann prokaryot und eukaryot exprimiert werden, um seine Bindungseigenschaften und eventuellen weiteren Funktionen näher zu charakterisieren, und seine mögliche Rolle bei der Regulation der Transkription von PV zu bestimmen.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

- *Epicurian coli*[®] **XL1-Blue**; Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, La Jolla).
- *Epicurian coli*[®] **BL21(DE3)pLysS**; Genotyp: B F- dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]; Chloramphenicol-resistent bei Konzentrationen > 40 mg/ml, aber sensitiv bei 100 mg/ml (Stratagene, La Jolla).
- *E. coli* **KC8**; Genotyp: F- thi-1 hsd S20 (r_B-, m_B-) supE44 recA13 ara14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20(str r) xy1-5 mtl-1 (Clontech Laboratories, Heidelberg).
- *E. coli* **BNN132**; Genotyp: endA1 gyr96 hsdR17 relA1 supE44 thi Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB⁺ lacI^qZ ΔM15] λKC (kann-cre) (Clontech Laboratories, Heidelberg).

2.2 Hefen

- *Saccharomyces cerevisiae* **YM4271**; Genotyp: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-903. Hefestamm für Hefe-One-Hybrid-System (Clontech Laboratories, Heidelberg).
- *Saccharomyces cerevisiae* **HF7c**; Genotyp: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, trp1-901, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, URA3:: (GAL4 17-mers)₃-CYC1-lacZ (Feilotter *et al.*, 1994). Hefestamm für Hefe-Two-Hybrid-System (Clontech Laboratories, Heidelberg).

2.3 Eukaryote Zellen

- **C33A-Zellen** (ATCC HTB-31); Spontan immortalisierte humane Zervixkarzinom-Zelllinie; epitheliale Morphologie; enthält kein HPV-Genom (N. Auersperg, 1964).
- **RTS3b-Zellen**; Humane Plattenepithelzelllinie aus der Haut (Ohr); ursprünglich HPV5 und 8 positiv, nach mehreren Passagen negativ (Purdie *et al.*, 1993); RT = renal transplant recipient, S = SCC, Patient: 3, Biopsie: b.
- **HaCaT-Zellen**; Spontan transformierte humane epitheliale Zelllinie aus der Haut; differenzierungsfähig (Boukamp *et al.*, 1988); nicht tumorigen.
- **HeLa-Zellen** (ATCC CCL-2); Humane epitheliale Zelllinie aus der Zervix; Adenokarzinom; aneuploid; isoliert 1951 (Gey *et al.*, 1952); enthält HPV18-Sequenzen.
- **c127i-Zellen** (ATCC CRL-1616); Nicht-transformierte epitheliale Zelllinie aus Brustdrüsenkarzinom einer Maus (*Mus musculus*, Stamm: RIII); P.M. Howley.

- **COS-7-Zellen** (ATCC CRL-1651); SV40-transformierte Fibroblasten-Zelllinie aus CV-1 Affenzellen; Niere; African green monkey; Y. Gluzman.
- **Primäre Keratinozyten (NHEK)**; Normale humane epidermale Keratinozyten eines erwachsenen Spenders; Brustepidermis; EpiPack[®]CC-2501 (Cell Systems, St. Katharinen).

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Seraing) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

- **Sequenzierungs- und Klonierungsprimer**

Oligonukleotid-Bezeichnung	Sequenz	Anmerkung
5' RACE		
GSP1	5'-GGCACTTGTACATCACCTTCACAG-3'	5'RACE
GSP2	5'-CGTGGAGCTGGTTCGTCCAGC-3'	5'RACE
GSP3/SphI	5'-ACATGCATGCGGGTCAGGATCGGTCTCAAAGCCATGATC-3'	5'RACE
Abridged Anchor Primer	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIG-3'	5'RACE
AUAP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	5'RACE
Sequenzierung		
LUC-396	5'-TGTTCCAGGAACCAGGGCGTATCTC-3'	
HISi-1	5'-ATTATCATGACATTAACC-3'	pHISi-1; nt 5373-5390
LacZi	5'-GCTACAAAGGACCTAATG-3'	pLacZi; nt 285-268
5'ACT2	5'-TACCACTACAATGGATG-3'	in der Gal4-AD
3'ACT2	5'-GTGAACTTGCAGGGGTTTTTCAGTATCTACG-3'	pACT2; nt 4975-4945
T7Prom-pos	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	T7-Promotor
T7Prom-neg	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	T7-Promotor
PCR		
PBF-5'/XhoI	5'-CCCGCTCGAGGCGAGTGTCTGTCCCGACGCC-3'	PBF in pET14b
PBF-5'/BamHI	5'-CGGGATCCATGGCGAGTGTCTGTCCC-3'	PBF in pXJ41 und pGEX-2T
EcoRI/PBF	5'-CCGAATTCATGGCGAGTGTCTGTCC-3'	PBF in pM
PBF3'	5'-CCATGATCAGTTTGGGGAGAACC-3'	PBF nt.761-739
XM 030918	5'-CCCCCTCGAGATGGCCCTGTGAACGAAGGACCCCC-3'	RAI 5'Ende XM-Klon
RAI C-Term. Down	5'-CCAACCTCGAGCCGGCCCCGTCCCAGAGCAGCCC-3'	RAI n. 829-851
RAI C-Term.Up	5'-CTTCGGATCCCTAGACTTTACTCCTTTGAGGCTTC-3'	RAI 3'Ende
Klonierung	Diese Oligonukleotide (obere =A, untere =B) sind komplementär und bilden die angegebenen Überhänge, wie sie nach Behandlung der doppelsträngigen DNA mit dem jeweiligen Enzym entstehen. Die annealenden Oligonukleotide wurden über die komplementären Enden aneinander und in Plasmide ligiert (= Multimerisierung).	
Linker p57pXJ41	5'-TCGAGCCTGGACCATGCCG-3'	XhoI Linker für

	5'- AATTCGGCATGGTCCAGGC -3'	EcoRI	Klonierung
16E2BS1	5'- AGCTTACCGAAACCGGTG -3' 5'- GATCCACCGGTTTCGGTA -3'	HindIII BamHI	HPV16 BS#4 wt MLP
16P1mtA	5'- AGCTTACCGAAA <u>AC</u> CGGTG -3' 5'- GATCCACCGT <u>TTT</u> TCGGTA -3'	HindIII BamHI	HPV16 BS#4 mtA MLP
BPV1/BS1wt	5'- AGCTTGAACCCACACCCGGTACAG -3' 5'- GATCCTGTACCGGGTGTGGTTCCA-3'	HindIII BamHI	BPV1 BS-1 wt MLP
BPV1/BS1mt3	5'- AGCTTGAACCCACAC <u>AC</u> CGGTACAG -3' 5'- GATCCTGTACCGT <u>IGT</u> GTGGTTCCA-3'	HindIII BamHI	BPV1 BS-1mt3 MLP
BPV1/BS1mt PEBP	5'- AGCTTGGAT <u>AC</u> CACACCCGGTACAG -3' 5'- GATCCTGTACCGGGTGTG <u>TA</u> TCCA-3'	HindIII BamHI	BPV1 BS-1mt1 MLP
BPV1/BS1mt3+PE	5'- AGCTTGGAT <u>AC</u> CACAC <u>AC</u> CGGTACAG -3' 5'- GATCCTGTACCGT <u>IGT</u> GTG <u>TA</u> TCCA-3'	HindIII BamHI	BPV1 BS-1 mt1/3 MLP
HPV16 BS#4	5'- AATTCGAACCGAAACCGGTTAGTAT -3' 5'- AATTATACTAACCGGTTTCGGTTCG-3'	EcoRI EcoRI	HPV16 BS#4 Hefepiasmide
in vitro Mutagenese	Zu jedem der hier aufgeführten Oligonukleotide (A) existiert ein komplementäres Oligonukleotid (B).		
8/PEBPmut	5'- TAAGAAACCGACCG <u>AG</u> CCCCGGTACATAAAAGG -3'		HPV8 NCR RUNX1
8/PEBP/P2Dmut	5'- TAAGAAACCGACCG <u>AGCCA</u> AAGTACATAAAAGG -3'		HPV8 NCR RUNX1/P2D
BPV-BS1-mt3	5'- GTTTATTGGAACCCACAC <u>AC</u> CGGTACACATCCTGTCCAG - 3'		BPV1 LCR mt3
BPV-BS1-mt4	5'- GTTTATTGGAACCCACACA <u>AG</u> GTACACATCCTGTCCAG - 3'		BPV1 LCR mt4
<i>BPV1mt1/4</i>	5'- <i>GT</i> TTATTGGAT <u>AC</u> CACACA <u>AG</u> GTACACATCCTGTCC -3'		<i>BPV1 LCR mt1/4</i>
PBF/Mut ZnFinger	5'- GATGTACAAGGCCTGTGGCCAAACGCTGGCAAAGTT- CTG-3'		PBF

- **Oligonukleotide für EMSA-Experimente** (die gegenüber der WT-Sequenz veränderten Nukleotide sind unterstrichen; ds = doppelsträngig ohne Überhänge; die Sequenz des kodierenden Stranges ist angegeben (= Oligo A), Oligonukleotid B ist komplementär.

P2TATA	5'- ACCGACCGCACCCGGTACATAAAAGGTGAGT -3'	(Stubenrauch and Pfister, 1994)
P2TATA met	5'-AACCGACCGCACCC <u>me</u> CGGTACATAAAAGGTGAGT -3'	
P2 mt	5'- ACCGT <u>AC</u> GCACCCGGTACA -3'	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)
P2 mt PEBP	5'- ACCGACCG <u>AG</u> CCCCGGTACA -3'	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)
P2 C	5'- AACCGACCGCAA <u>AC</u> CGGTACATAAAAGGTGAGT -3'	(Stubenrauch and Pfister, 1994)
P2 C1	5'- AACCGACCGCAA <u>AC</u> CGGTACATAAAAGGTGAGT -3'	
P2 D	5'- AACCGACCGCACCA <u>AG</u> TACATAAAAGGTGAGT -3'	(Boeckle, 1998)
P2 E	5'- AACCGACCGCACCCGGCGCATAAAAGGTGAGT -3'	(Boeckle, 1998)
P2 E1	5'- AACCGACCGCACCCGGC <u>AC</u> ATAAAAGGTGAGT -3'	
P2 F	5'- AACCGACCGCACCCGTTACATAAAAGGTGAGT -3'	
BPV1 E2BS-1 wt	5'- GTTTATTGGAACCCACACCCGGTACACATCC -3'	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)
BPV1-mt1	5'- GTTTATTGGAT <u>AC</u> CACACCCGGTACACATCC -3'	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)
BPV1-mt2	5'- GTTTATTGGG <u>ACC</u> GCACCCGGTACACATCC -3'	(Schmidt <i>et al.</i> , 1997)
BPV1-mt3	5'- GTTTATTGGAACCCACAC <u>AC</u> CGGTACACATCC -3'	
BPV1-mt4	5'- GTTTATTGGAACCCACACA <u>AG</u> GTACACATCC -3'	
P105TATA (A + B)	5'- TCGACGGTGATCCGTATATAAAAGATGTGAGAAA -3' 5'- TCGATTTCTCACATCTTTTATATACGGATCACCG -3'	TATA-Box des frühen Promotors aus HPV18
PEA2 (A + B)	5'- GATCACTGACCGCAGCTG-3' 5'- GATCCAGCTGCGGTCAGT-3'	<i>Bona fide</i> RUNX1-BS
SP1 (A + B)	5'- GATCTAAACCCCGCCAGCG -3' 5'- GATCCGCTGGGCGGGTTTA -3'	Distale SP1-BS des P _{Thy} aus HSV1; BamHI

16E2 BS#4wt	5'- GAACCGAAACCGGTTAGTATA-3'	Prom.-proximale E2BS; HPV16
16E2 BS#4mtA	5'- GAACCGAAAACCGGTTAGTATA-3'	
16E2 BS#4mtG	5'- GAACCGAAAGCGGTTAGTATA-3'	
16E2 BS#4mtT	5'- GAACCGAAATCGGTTAGTATA-3'	
16E2 BS#41mut	5'- GAACCGAAACGGGTTAGTATA-3'	
16E2 BS#43mut	5'- GAACCGAAACGCCTTAGTATA-3'	
16E2 BS#4mutG1	5'- GAACCGAAACCCGTTAGTATA-3'	
16E2 BS#4mutG2	5'- GAACCGAAACCGCTTAGTATA-3'	
C-myb	5'- TACAGGCATAACGGTCCCGTAGTGA-3'	

Falls nicht anders angegeben besitzen die unten genannten Plasmide das β -Laktamasegen zur Selektion der plasmid-haltigen Bakterien mittels Ampicillin.

2.4.2 Klonierungsvektoren

- **pUC18** (2,7 kb) dient der Vermehrung von Plasmiden und der Blau/Weiß-Selektion in *E. coli*. Es enthält das α Peptid des lacZ-Gens. Acc. Nr.: L08752 (Invitrogen, Karlsruhe)

2.4.3 Reporterplasmide

- **pALuc** (5,2 kb) ermöglicht den Einbau eines Promotors in die MCS stromaufwärts des *firefly*-Luciferasegens für transiente Transfektionen (Dong *et al.*, 1994 b).
- **p8/P₇₅₃₅-Luc** sowie **p8/P₇₅₃₅ P2C-Luc** (5,7 kb) besitzt einen 551 bp-Abschnitt der NCR von HPV8 (7077-7628), die in die BamHI/EcoRI-Schnittstelle der MCS von pALuc kloniert wurde (pA7535-Luc sowie pP2C-Luc; Stubenrauch *et al.*, 1996). Das Plasmid diente auch als Matrize in der *in vitro* Mutagenese zur Einführung der beschriebenen Mutationen.
- **p16LCR-Luc** (Dong *et al.*, 1994 b) enthält die über BamHI klonierte HPV16 LCR₍₇₀₀₈₋₉₈₎ in pALuc. Das Plasmid wurde auch für die *in vitro* Mutagenese zur Erstellung der Mutante p16LCR BS#4mtA-Luc verwendet.
- **pBPV1/P₇₁₈₅-Luc** (BPV1LCR-Luc; H.-M. Schmidt, 1996) entstand durch Ligation des HincII₇₁₄₆-/ NarI₇₂₇₆-Fragments aus der BPV1 LCR in die SmaI-Schnittstellen von pALuc.
- **pC18Luc** (G. Steger, Köln) ist ein Vektor, der den Adenovirus Major Late Promoter mit vier E2-Bindestellen vor dem Luciferasegen enthält. Das Plasmid diente der Klonierung der verschiedenen Bindestellen über HindIII und BamHI vor den MLP, wobei die E2 Bindestellen deletiert wurden.
- **pG5Luc** enthält das EcoRI- / BamHI- (138 bp-) Fragment aus pG5CAT (UAS_G 17mer x 5) in der EcoRI-/ BamHI-Schnittstelle von pALuc.
- **pRSV- β Gal** (7282 bp) enthält das β -Galaktosidasegen unter der Kontrolle des Rous-Sarcoma-Virus-Promotors (B. Bourachot, Paris).

- **pSV40-βGal** (~7,2 kb) besitzt das HindIII-/ BamHI-Fragment aus RSV-βGal in der HindIII-/ BglIII-Schnittstelle von pJ3.

2.4.4 Expressionsvektoren

- **pET14b** (4671 bp) erlaubt die prokaryote Expression eines beliebigen Proteins fusioniert mit sechs Histidinen am N-Terminus in *E. coli*. Es besitzt einen T7-Promotor und kann *in vitro* und *in vivo* durch die T7-Polymerase transkribiert werden (Novagen, Madison).
- **pXJ41** (4269 bp) ist ein eukaryoter Expressionsvektor, der von J.H. Xiao (1990) konstruiert wurde und den T7-Promotor vor der MCS, sowie eine Ampicillin- und Tetracyclinresistenz enthält.
- **pCEP4** (10,4 kb) ist ein eukaryoter Expressionsvektor mit dem P_{CMV} vor der MCS. Es trägt eine Hygromycin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pGEX-2T** (5 kb) ist ein prokaryotes Expressionsplasmid, das den offenen Leserahmen der Glutathion-S-Transferase (GST) vor der MCS enthält, und die Expression eines Proteins fusioniert mit GST erlaubt. Es besitzt einen tac-Promotor für die induzierbare Expression durch z.B. IPTG und das lacI^q-Gen, dessen Genprodukt (lac-Repressor) den tac-Promotor reprimiert. GenBank Acc.Nr. U13850 (Amersham Biosciences, Freiburg).
- **pEGFP-C1** (4,7 kb) ist ein für Säugerzellen optimiertes Expressionsplasmid, das den Leserahmen (798 bp) einer stark fluoreszierenden („enhanced“) Variante des „green fluorescent proteins“ (GFP) enthält (Anregung mit 488 nm, Emission bei 507 nm). Es ermöglicht die Expression eines Proteins fusioniert mit EGFP. Es enthält eine Neomycinresistenz-Kassette zur Selektion stabil transfizierter Zellen mit G418 und einen Bakterienpromotor zur Expression der Kanamycin-Resistenz. GenBank Acc.Nr. U55763. (Clontech, Heidelberg).
- **pQEαN94C226**; prokaryotischer Expressionsvektor einer mit sechs Histidinen fusionierten, verkürzten PEBP2αA1-Untereinheit, die die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomänen enthält (Ogawa *et al.*, 1993).
- **pM** (3,5 kb) ermöglicht die Expression eines Proteins fusioniert an die Gal4-DBD₍₁₋₁₄₇₎. Der Leserahmen der GAL4-DBD und die MCS liegen stromaufwärts des SV40 poly A Transkriptions-Terminierungs-Signals. Das Plasmid enthält den frühen Promotor aus SV40 (Clontech, Heidelberg).

2.4.5 Hefe-Plasmide

Alle hier aufgelisteten Plasmide wurden von Clontech (Heidelberg) bezogen.

- **pACT2** (8,1 kb) ist ein Hefe-Expressionsvektor, der die Gal4-Aktivierungsdomäne₍₇₆₈₋₈₈₁₎ fusioniert mit einem Protein unter der Kontrolle eines verkürzten ADH1-Promotors exprimiert. Er enthält das leu2-Gen zur Selektion (Bartel *et al.*, 1993). pACT2 repliziert in Hefen und Bakterien (Shuttle-Vektor). Die humane Keratinozyten-cDNA-Bank (HaCaT cDNA-Bank, Clontech) wurde in diesen Vektor kloniert.
- **pHISi-1** (5,4 kb) trägt das HIS3-Reportergen (EcoRI/BamHI) zur Integration in den HIS-Locus des Hefegenoms unter Kontrolle des HIS3-Minimalpromotors. Die MCS erlaubt das Einfügen von beliebigen DNA-Sequenzen (z.B. Bindetellen) vor den Promotor. Das Plasmid hat ohne Aktivierung eine geringe HIS3-Grundexpression („leaky“) und kann nicht autonom in Hefe replizieren (Alexandre *et al.*, 1993).
- **pLacZi** (6,9 kb); Das Plasmid trägt das lacZ-Gen unter Kontrolle des Hefe-Cyclin-Gen Minimalpromotors und kann am ura-Locus in das Hefegenom integriert werden. Es besitzt keinen Hefe-ori. Der Promotor führt ohne Aktivierung zu einer sehr geringen lacZ-Expression (Luo *et al.*, 1996).
- **p53HIS** (6,6 kb) wird als Reporter-Kontrollplasmid verwendet und entstand durch Insertion von drei Tandem-Kopien der Konsensusbindestelle für p53 in die EcoRI/XbaI Schnittstelle von pHISi (Luo *et al.*, 1996).
- **p53BLUE** (6,9 kb) ist ein Kontrollplasmid, das drei Tandem-Kopien der p53-Konsensusbindestelle in der EcoRI/SalI Schnittstelle von pLacZi enthält (Luo *et al.*, 1996). Zur Selektion und Integration in Hefe enthält es das ura3-Gen und repliziert autonom.
- **pGAD53m** (7,6 kb) kodiert für ein Fusionsprotein, das aus murinem p53₍₇₂₋₃₀₀₎ und der Gal4-Aktivierungsdomäne₍₇₆₈₋₈₈₁₎ besteht (Luo *et al.*, 1996). Zur Selektion in Hefe enthält es das leu2-Gen und repliziert autonom.
- **pGAD424** (6,7 kb) kodiert für die Gal4-Aktivierungsdomäne₍₇₆₈₋₈₈₁₎(AD). Es enthält das leu2-Gen zur Selektion in Hefe und repliziert autonom (Bartel *et al.*, 1993).
- **pGBT9** (5,4 kb) besitzt den verkürzten ADH1-Promotor stromaufwärts des offenen Leserahmens für die Gal4-DBD₍₁₋₁₄₇₎ und der MCS. Er enthält das Tryptophangen (trp1) zur Selektion und repliziert autonom (Bartel *et al.*, 1993).
- **pVA3** (6,4 kb) ist ein Derivat von pGBT9, das für ein Fusionsprotein aus Maus p53 und Gal4-DBD kodiert. Es enthält das trp1-Gen.

- **pTD1** (15 kb) ist ein Derivat des pGAD3F und kodiert für ein Hybridprotein aus SV40 large T-Antigen₍₈₄₋₇₀₈₎ und Gal4-AD. Es trägt das leu2-Gen.
- **pCL1** (15,3 kb) kodiert für das gesamte Wildtyp-GAL4-Protein und enthält zur Selektion das leu2-Gen.
- **pLAM 5'** (6 kb) ist ein Derivat von pGBT9, das für ein Hybrid aus humanem Lamin C₍₆₆₋₂₃₀₎ und der Gal4-DBD kodiert. Das Gen für die Selektion ist trp1.
- **HaCaT-cDNA-Bank**

Die cDNA-Expressionsbank wurde von der Firma Clontech Laboratories (Heidelberg) bezogen. Zur Erststrangsynthese der cDNA wurde mRNA aus spontan immortalisierten humanen Keratinozyten (HaCaT) verwendet. Dafür wurden an das PolyA-Ende im 3'-Bereich der mRNA Oligonukleotide mit 15 Desoxythymidinnukleotiden und einer XhoI-Schnittstelle hybridisiert. Nach der Verlängerung mit reverser Transkriptase und Zweitstrangsynthese wurde im 5'-Bereich ein Adapter an die cDNA ligiert, der eine schon gespaltene EcoRI-Schnittstelle enthielt. Unter Erhaltung der Polarität wurden die cDNA-Fragmente über die EcoRI- und XhoI-Schnittstellen in den Vektor pACT2 eingefügt. Die cDNA-Bank wurde einmal in *E. coli* BNN132 amplifiziert. Unter Kontrolle des verkürzten ADH1-Promotors werden die cDNA-Fragmente fusioniert mit der Gal4-AD in Hefe exprimiert.

2.4.6 DNA-Längenstandards

- 1 kb DNA-Leiter und 1 kb DNA-Leiter plus (Invitrogen, Karlsruhe).
- DNA-Molekulargewichtsmarker VIII (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.4.7 Sonstige Nukleinsäuren

- Lachssperma-DNA (Sonicated salmon sperm DNA) (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Desoxynukleotide (dNTPs) (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.5 Radioaktivität

- ³²P- α -Adenosintriphosphat (Amersham Biosciences, Freiburg)
- ³²P- γ -Adenosintriphosphat (Amersham Biosciences, Freiburg)
- ³⁵S-Methionin (Amersham Biosciences, Freiburg)

2.6 Enzyme

- Es wurden Restriktionsendonukleasen folgender Firmen verwendet:
 - New England BioLabs GmbH, Schwalbach
 - Invitrogen GmbH, Karlsruhe
 - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (New England BioLabs, Schwalbach)
- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Diagnostics, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (New England BioLabs, Schwalbach)
- T4 Polynukleotidkinase (New England BioLabs, Schwalbach)
- *Taq* DNA-Polymerase (Amersham Biosciences, Freiburg)
- *Pwo* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.7 Größenstandards

- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, Niedermolekular (BioRad Laboratories, München)

2.8 Antiseren

- Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, F(ab')₂ Fragment Specific (dianova, Hamburg)
- Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) Peroxidase Conjugate (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ni-NTA Conjugates (zur Detektion von 6xHis-Proteinen) (Qiagen, Hilden)

2.9 Reagenzien

2.9.1 Reagenziensysteme (Kits)

- Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay-Kit (Clontech, Heidelberg)
- MATCHMAKER One-Hybrid-System (Clontech, Heidelberg)
- MATCHMAKER Two-Hybrid-System (Clontech, Heidelberg)
- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep 8 Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAGEN Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAGEN PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- QuikChangeTM Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla)

- SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison)
- TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Madison)
- 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0
(Invitrogen, Karlsruhe)

2.9.2 Puffer und Lösungen

Für Hefen:

- **10 x TBE-Puffer** (pH 8.0)

Tris-Base	450 mM
Borsäure	450 mM
EDTA	10 mM
- **2 x HBS** (HEPES-buffered saline) (pH 7.05)

NaCl	280 mM
HEPES	50 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
- **50 x TAE-Puffer**

Tris-Acetat	2 M
EDTA (pH 8.0)	50 mM
- **10 x TE-Puffer** (pH 7.5)

Tris-HCl	100 mM
EDTA	10 mM
- **10 x LiAc-Puffer**

1 M Lithiumacetat (LiAc) (pH 7.5) (Sigma-Aldrich)
- **1 x PEG/LiAc**

PEG 4000	40 %
TE-Puffer	1 x
LiAc-Puffer	1 x
- **Z-Puffer** (pH 7.0)

Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
- **Hefe Lyse-Puffer** (pH 8.0)

Triton X-100	2 %
--------------	-----

SDS	1 %																		
NaCl	100 mM																		
Tris (pH 8.0)	10 mM																		
EDTA	1 mM																		
<ul style="list-style-type: none"> 50 % PEG 4000 Polyethylenglykol (durchschnittliches Molekulargewicht 3,350 g/l) (Sigma-Aldrich) X-Gal Stammlösung 50mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid in N,N-dimethylformamid (AppliChem) Z-Puffer/X-Gal Lösung <table border="0"> <tbody> <tr> <td>β-Mercaptoethanol</td> <td>0,35 mM</td> </tr> <tr> <td>X-Gal Stammlösung</td> <td>0,835 mM</td> </tr> </tbody> </table> 		β -Mercaptoethanol	0,35 mM	X-Gal Stammlösung	0,835 mM														
β -Mercaptoethanol	0,35 mM																		
X-Gal Stammlösung	0,835 mM																		
Puffer O																			
Tris (pH 8.0)	20 mM																		
EDTA	0,1 mM																		
Glycerin	20 %																		
vor Gebrauch Zugabe von:																			
β -Mercaptoethanol	7 mM																		
PMSF	1 mM																		
Aprotinin	10 μ g/ml																		
Leupeptin	10 μ g/ml																		
Pepstatin	10 μ g/ml																		
<ul style="list-style-type: none"> Hefe-Extraktionspuffer (pH 8.0) <table border="0"> <tbody> <tr> <td>Tris HCl (pH 8.0)</td> <td>100 mM</td> </tr> <tr> <td>Ammoniumsulfat</td> <td>400 mM</td> </tr> <tr> <td>MgCl₂</td> <td>10 mM</td> </tr> <tr> <td>Glycerin</td> <td>10 %</td> </tr> <tr> <td>β-Mercaptoethanol</td> <td>7 mM</td> </tr> <tr> <td>PMSF</td> <td>1 mM</td> </tr> <tr> <td>Aprotinin</td> <td>10 μg/ml</td> </tr> <tr> <td>Leupeptin</td> <td>10 μg/ml</td> </tr> <tr> <td>Pepstatin</td> <td>10 μg/ml</td> </tr> </tbody> </table> 		Tris HCl (pH 8.0)	100 mM	Ammoniumsulfat	400 mM	MgCl ₂	10 mM	Glycerin	10 %	β -Mercaptoethanol	7 mM	PMSF	1 mM	Aprotinin	10 μ g/ml	Leupeptin	10 μ g/ml	Pepstatin	10 μ g/ml
Tris HCl (pH 8.0)	100 mM																		
Ammoniumsulfat	400 mM																		
MgCl ₂	10 mM																		
Glycerin	10 %																		
β -Mercaptoethanol	7 mM																		
PMSF	1 mM																		
Aprotinin	10 μ g/ml																		
Leupeptin	10 μ g/ml																		
Pepstatin	10 μ g/ml																		

Für Proteine

- **Puffer A für Kernextrakte**

HEPES pH 7.9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,5 mM

- **Puffer C für Kernextrakte**

HEPES pH 7.9	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM

Für Proteingele:

- **30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid (Gel 30)** (Carl Roth GmbH und Co., Karlsruhe)

- **4 x TrisCl/SDS, pH 8.8**

Trisbase	1,5 M
SDS	0,4 %

- **4x TrisCl/SDS, pH 6.8**

Trisbase	500 mM
SDS	0,4 %

- **10% Ammoniumpersulfat**

- **SDS-Polyacrylamidgel (PAA-Gel)**

Endkonzentration im Trenngel

Acrylamid / Bisacrylamid	10 % / 0,267 %
bzw. Acrylamid / Bisacrylamid	15 % / 0,4 %
TrisCl/SDS, pH 8.8	1 x
Ammoniumpersulfat	0,03 %
TEMED	0,1 %

Endkonzentration im Sammelgel

Acrylamid / Bisacrylamid	3,9 % / 0,1 %
--------------------------	---------------

TrisCl/SDS, pH 6.8	1 x
Ammoniumpersulfat	0,05 %
TEMED	0,1 %
• Färbelösung	
Methanol	50 %
Essigsäure	10 %
H ₂ O	40 %
Coomassie (in MeOH)	0,05 %
• Entfärbelösung	
Methanol	5 %
Essigsäure	7 %
H ₂ O	88 %

Für Western Blots:

- **5xSDS Elektrophorese Puffer**

Tris-Base	125 mM
Glycin	1 M
SDS	0,02 %
- **Transferpuffer**

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20 %
- **TBST**

1 M Tris, pH 8.0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 %
- **Abblock-Lösung (in TBST)**

BSA	2 %
Milchpulver	2 %
- **Antikörper-Verdünnungspuffer**

0,2 % BSA in TBST

Für EMSA-Experimente:

- **5 % Polyacrylamid-Gel**

Polyacrylamid / Bisacrylamid	5 % / 0,267 %
TBE	0,5 x
Ammoniumpersulfat	0,04 %
TEMED	0,2 %

- **2 x Bindungs-Puffer**

Endkonzentration:

HEPES, pH 7.9	12 mM
Glycerol	10 %
EDTA	0,5 mM
MgCl ₂	4 mM
KCl	60 mM
NP40	0,1 %
BSA	50 ng/μl
DTT	2 mM
Spermidin	4 mM
ssDNA	25 ng/μl
polydI/dC	50 ng/μl

- **Salzlösung**

Endkonzentration:

HEPES	2 mM
MgCl ₂	4 mM
Glycerin	10 %

Für Luciferase-Tests:

- **Luciferase-Extraktions-Puffer**

KPO ₄ -Puffer, pH 7,8	100 mM
DTT	1 mM

- **Luciferase-Assay-Puffer**

KPO ₄ -Puffer, pH 7,8	100 mM
MgSO ₄	15 mM
ATP-Stock	3 mg/ml

Für βGal-Tests:

- **βGal-Puffer**

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
MgCl ₂	1 mM
β-Mercaptoethanol	45 mM
ONPG	0,67 mM

- **ONPG** (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)

4 mg/ml ONPG in 0,1 M NaPO₄-Puffer, pH 7.0 (AppliChem, Darmstadt)

Für die Affinitätschromatographie:

Die Indices sind die KCl- bzw. Imidazol-Konzentration in mM. Alle Puffer A werden in A0-0 unter Zugabe von 0,5 mM PMSF und 10 mM β-Mercaptoethanol angesetzt.

- **Puffer A₀₋₀**

TrisCl (pH 7.9)	20 mM
Glycerin	10 %

- **Puffer A₁₀₀₀₋₀** (Waschpuffer 1)

KCl	1000 mM
-----	---------

- **Puffer A₀₋₁₀₀₀**

Imidazol	1000 mM
----------	---------

- **Puffer A₃₀₀₋₂₀** (Waschpuffer 2)

KCl	300 mM
Imidazol	20 mM

- **Puffer A₁₈₀₋₁₅₀** (Elutionspuffer)

KCl	180 mM
Imidazol	150 mM

- **HSLB** (High Salt Lysis Puffer)

TrisCl (pH 7.9)	20 mM
Glycerin	10%
NaCl	500 mM

HSLB[⊕] nach Zugabe von:

β-Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	0,5 mM
Leupeptin	10 µg/ml

Pepstatin	10 µg/ml
Aprotinin	10 µg/ml
Imidazol (optional)	5 mM

Sonstiges:

- **LSDB (mit versch. Konzentrationen an KCl)**

Glycerin	20 %
Tris pH 7.9	50 mM
DTT	1 mM
NP40	0,1 %
KCl	100 mM, 500 mM oder 1 M

- **TSB („Transformation Storage Buffer“) in LB-Medium**

PEG (MW = 3,350)	30 mM
DMSO	5 %
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

- **PBS („phosphate buffered saline“)**

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

- **TELT-Puffer (Tris-EDTA-LiCl-Triton-Puffer)**

Tris HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	62,5 mM
LiCl	2,5 M
TritonX 100 (v/v)	0,4 %

2.9.3 Sonstige Chemikalien

Es wurden Laborchemikalien mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „zur Analyse“ (p.a.) folgender Firmen verwendet: Amersham Biosciences (Freiburg), Carl Roth GmbH und Co. (Karlsruhe), Difco (Detroit), ICN (Aurora), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

- 3-Amino-1,2,4-triazol (Amitrol, 3-AT) C₂H₄N₄ (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Glaskügelchen (425-600 µm), säuregewaschen (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- β -Mercaptoethanol (14,1 M) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Spermidin, freie Base (N-[3-Aminopropyl]-1,4-butanediamine)
(Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Agarose für DNA (Biozym, Hess. Oldendorf)
- Agarose für die Molekularbiologie, höchster DNA Reinigungsgrad
(BioRad, München)
- Nickel-NTA-Agarose in 50%-Ethanol (Qiagen, Hilden)
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Aprotinin, Leupeptin, PMSF (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Pepstatin A (AppliChem, Darmstadt)
- D-Luciferin, freie Säure (C₁₁H₈N₂O₃S₂) (Roche Diagnostics, Mannheim)
- BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) bestehend aus: A = Luminescence
Substrate Solution und B = Starting Solution (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) (Invitrogen, Karlsruhe)
- Accutase (PAA Laboratories, Cölbe)
- FuGENE™ 6 Transfektionsreagens (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Lysozym (10 μ g/ μ l) (Serva, Heidelberg)
- Rifampicin (AppliChem, Darmstadt)
- Protein Assay Reagens (BioRad, München)
- Glykogen aus Rinderleber (20 mg/ml) (Fluka, Deisenhofen)
- Saponin (rein) (Fluka, Deisenhofen)
- Glutathione-Sepharose™ 4B (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Amplifizierer (Amplify Fluographic Reagent) (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Hygromycin B (Invitrogen, Karlsruhe)

2.10 Medien

2.10.1 Medien für die Hefekultivierung

- **YPD-Vollmedium** (Clontech Laboratories, Heidelberg)
 - 20 g/l Difco Pepton
 - 10 g/l Hefe Extrakt
 - 20 g/l Glucose

Flüssigmedium wird in Wasser angesetzt und autoklaviert. YPD-Platten werden durch Zugabe von 20 g/l Agar vor dem Autoklavieren hergestellt.

- **Synthetisches Minimalmedium (SD-Medium)**

6,7 g/l Difco Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren (Difco, Detroit)

2% Glucose

Das Medium wurde in Wasser angesetzt (für SD-Platten zusätzlich 20 g/l Agar) und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Aminosäuren aus 100x Ansätzen und ggf. 3-AT hinzugegeben.

L-Adenin Hemisulfatsalz	20 mg/l
L-Histidin HCl Monohydrat	20 mg/l
L-Leucin	100 mg/l
L-Lysin HCl	30 mg/l
L-Tryptophan	20 mg/l
L-Uracil	20 mg/l

(alle Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.10.2 Medien für die Bakterienkultivierung

- **LB-Medium** (Luria-Bertani-Medium, pH 7.2) (USB, Cleveland)

Bacto-Trypton 10 g/l

Bacto-Hefe-Extrakt 5 g/l

NaCl 8 g/l

Bacto-Agar (optional) 15 g/l

Zusatz von Antibiotikum: 100µg/ml (für Ampicillin)

- **M9-Medium**

Na₂HPO₄ 48 mM

KH₂PO₄ 22 mM

NaCl 8,5 mM

NH₄Cl 18,6 mM

MgSO₄ 2 mM

Glucose 0,4 %

CaCl₂ 0,1 mM

ad. 979 ml Wasser; autoklavieren, dann Zusatz von:

Histidin 10 ml

Tryptophan	10 ml
Thiamin (Vitamin B ₁)	1 ml

2.10.3 Medien für die Zellkultivierung

- **Dulbecco`s MEM** („Modified Eagle Medium“)

mit Glutamax, ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg Glucose, mit Pyridoxin (Invitrogen, Karlsruhe); Zusatz von:

Fötales Kälberserum (FCS)	7,5 % (für C33A- und HeLa-Zellen)
	10 % (für HaCaT-Zellen)

Streptomycinsulfat	120 mg/l
--------------------	----------

Penicillin	120 mg/l
------------	----------

- **E-Medium** (für Keratinozyten, RTS3b)

Dulbecco`s MEM (s.o)	50 %
----------------------	------

Dulbecco`s Nut Mix F-12 (mit Glutamax, mit Pyridoxin; Invitrogen, Karlsruhe)	50 %
--	------

L-Glutamin	350 µg/ml
------------	-----------

Transferrin	5 µg/ml
-------------	---------

Triiodo-thyronin	2×10^{-11} M
------------------	-----------------------

Adenin	$1,8 \times 10^{-4}$ M
--------	------------------------

Insulin	5 µg/ml
---------	---------

Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
-------------------------	-----------

Hydrocortison	0,4 µg/ml
---------------	-----------

Choleratoxin	10^{-10} M
--------------	--------------

FCS	10 %
-----	------

EGF (epidermal growth factor)	10 ng/ml
-------------------------------	----------

3. Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation

Für die Transformation wurden die *E. coli*-Stämme XL1 Blue und BL21 pLysS verwendet. Um die Bakterien kompetent zu machen, wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml frischer Bakterienkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 unter Schütteln wachsen gelassen. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis gestellt, bei 3.500 upm und 4 °C für 10 min zentrifugiert, in 5 ml kaltem TSB resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Die Bakterien konnten direkt für die Transformation eingesetzt oder in Aliquots bei –80 °C gelagert werden (nach: Chung and Miller, 1988).

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

100 µl der kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes bzw. ca. 1 ng Plasmid-DNA vermischt, für 30 min auf Eis gestellt und 45 sec bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl LB/20 mM Glucose wurden sie bei 37 °C unter Schütteln für eine Stunde inkubiert, um das Resistenzgen zu exprimieren. Die Transformanten wurden auf antibiotikumhaltigen (100 µg/ml) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C selektioniert.

3-4 µl aus Hefe isolierte Plasmid-DNA wurden mit 20 µl chemisch kompetenten *E. coli* XL-1 Blue, die käuflich erworben wurden, wie oben beschrieben transformiert.

3.1.3 Elektroporation

Zur Transformation von Bakterien mit aus Hefe isolierten Plasmiden. 20 µl elektrokompetente *E. coli* KC8-Bakterien wurden mit 4 µl Plasmid-DNA vermischt und elektroporiert („Easyject +“-Gerät der Firma EquiBio; 2,5 KV, C=25, R=451, T=12 oder 1,5 V, C=25, R=201, T=5). Nach Zugabe von 300 µl M9-Medium wurden die Ansätze zur Selektion der cDNA-Plasmid-tragenden Bakterien auf M9-Platten mit Histidin und Tryptophan ausgestrichen und drei Tage bei 37 °C inkubiert.

3.1.4 Langzeitlagerung von Bakterien

Von einer dichten Bakterienvorkultur wurde 1 ml entnommen, mit 500 µl 50 % Glycerin vermischt (Endkonzentration: 16,7 %) und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

3.1.5 Kulturen zur Plasmidisolierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide verfügten über ein Resistenzgen, so daß durch Zugabe von 100 µg/ml Antibiotikum (meistens Ampicillin = Amp) sowohl in Flüssigmedium als auch in Agarplatten eine Selektion auf plasmidtragende Bakterien durchgeführt werden konnte. Zur analytischen Plasmidisolierung wurden 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium (LB/Amp-Medium) in einem 13 ml-PE-Röhrchen (Sarstedt) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. im Rotationsinkubator bei 37 °C wachsen gelassen. Kulturen für die präparative Plasmidisolierung wurden in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben angesetzt. Das Volumen betrug in der Regel 100 ml (für "high-copy"-Plasmide), für „low-copy“-Plasmide wie z.B. pHISi-1 und pET14b wurden 500 ml LB/Amp-Medium für die gleiche Ausbeute benötigt. Die Kulturen wurden ü.N. bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

3.1.6 Amplifizierung der HaCaT-cDNA-Bank

Für die Vermehrung der HaCaT-cDNA-Bank wurden 0,4 µl der plasmidtragenden Bakterien BNN132 (Clontech) in 1 ml LB-Medium resuspendiert und in 50 ml LB/Amp-Medium überführt. Je 1 ml der Suspension wurde auf LB/Amp-Agar (Ø 15 cm-Platten) ausgestrichen und ü.N. bei 30 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden abgekratzt, in insgesamt 2 l LB/Amp-Medium aufgenommen, 30 min bei 30 °C geschüttelt und durch Zentrifugation (10 min, 5000 upm, 4 °C) geerntet. Für die Plasmidisolierung wurden die Pellets mit Hilfe des Maxi-Prep-Kits der Firma QIAGEN aufgearbeitet.

3.2 Das Hefe-One-Hybrid-System

Das Hefe-One-Hybrid-System beruht auf der Erkenntnis, daß Transkriptionsfaktoren aus funktionellen Domänen aufgebaut sind (z.B. der DNA-bindenden Domäne (DBD) und der Aktivierungsdomäne (AD)). Das Hefe-Gal4-Protein besitzt eine N-terminale DBD, die über ein flexibles Bindeglied mit der C-terminalen AD verbunden ist. Die Aktivierungsdomäne behält ihre Funktion *in vivo* auch dann bei, wenn sie mit einer fremden DNA-Bindungsdomäne gekoppelt (fusioniert) wird (Hybrid-Protein). Dies bildet die Grundlage für das Hefe-One-Hybrid- sowie das Hefe-Two-Hybrid-System. In dieser Arbeit wurde die Systeme der Firma Clontech (Heidelberg) verwendet.

Die Identifizierung eines DNA-bindenden Proteins erfolgt mit Hilfe einer cDNA-Expressions-Bank, die die von cDNAs kodierte Proteine fusioniert mit der Gal4-AD. Diese cDNA-Bank wird zusammen mit Reporterkonstrukten, die ein Reportergen (z.B. pLacZi das lacZ- oder

pHISi-1 das HIS3-Gen) unter Kontrolle eines Promotors hinter mehreren Kopien der zu untersuchenden Sequenz besitzen, in einen Hefestamm transformiert. Bindet ein von der cDNA kodiertes Protein an die Erkennungssequenz, so ist es in der Lage den Promotor über die fusionierte Gal4-AD zu aktivieren, was in einer verstärkten Expression des Reportergens resultiert.

Da das Plasmid pHISi-1 nicht autonom in Hefezellen replizieren kann, wird es im HIS3-Gen linearisiert und über homologe Rekombination in die defekte Kopie dieses Gens im (His⁻)-Hefestamm YM4271 integriert, wobei ein funktionsfähiges Gen entsteht. Die Aktivität des HIS3-Promotors reicht gerade aus, um den Hefen ein Wachstum auf Histidin-Mangelmedium zu ermöglichen. Ein weiteres Reporterkonstrukt ist das pLacZi-Plasmid, das neben dem URA3-Gen zur Integration in das Hefegenom und zur Selektion, das bakterielle lacZ-Gen unter der Kontrolle des Cyclin-Minimalpromotors aus Hefe enthält. Der Einsatz zweier unterschiedlicher Promotoren, d.h. unterschiedlicher DNA-Sequenzen in diesem Bereich, soll die Aktivierung beider Reporter durch einen in der Promotorregion unspezifisch bindenden Faktor vermindern. Alle Hefe-Expressionsvektoren replizieren autonom in Hefe und tragen das Leucingen (Leu) als Selektionsmarker.

Die Hintergrundaktivität des HIS3-Promotors muß für die Transformation mit der cDNA-Bank durch Zugabe von 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), das das HIS3-Genprodukt kompetitiv hemmt, reprimiert werden. Um die Menge des Inhibitors zu bestimmen, die gerade ausreicht, um das vom Hefestamm exprimierte Histidin zu neutralisieren, werden die Stämme auf Agarplatten (SD/His⁻) mit ansteigenden 3-AT-Konzentrationen inkubiert. Die ermittelte Menge an 3-AT wird bei jedem Versuch, der auf der Wachstumsselektion basiert, dem Medium zugesetzt, so daß nur Stämme, deren Promotoraktivität durch Bindung eines Fusionsproteins an die Erkennungssequenz stimuliert wird, auf den Platten wachsen können. Der Reporterstamm wird mit der cDNA-Bank transformiert, und verstärkt wachsende Klone werden auf Selektionsplatten vereinzelt. Die Aktivierung des zweiten Reportergens (lacZ) wird in zwei verschiedenen β -Galaktosidase-Tests untersucht und zu den Aktivitäten der p53-BLUE-Kontrollstämme in Relation gesetzt. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen für den Wachstums- und die β -Galaktosidase-Tests wurden vier bereits vorhandene Kontrollstämme, 53HIS bzw. 53BLUE mit jeweils pGAD53m oder pGAD424, eingesetzt (Boeckle, 1998).

Die Methoden, mit denen das Hefe-One-Hybrid-System zur Durchsuchung der cDNA-Bank eingesetzt wurde, sind im folgenden aufgeführt.

3.2.1 Hefe-Flüssigkulturen

Flüssigkulturen wurden in YPD-Vollmedium oder selektivem SD-Medium angesetzt. Kleinere Kulturen bis 5 ml konnten mit einer einzelnen Kolonie von Platte angeimpft werden, die mit einem sterilen Zahnstocher gepickt wurde. Größere Kulturen ab 10 ml sollten mit einem Zehntel an Flüssigkultur versetzt werden. Die Kulturen wurden in einem 30 °C-Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

3.2.2 Agarplatten

Die untransformierten Hefestämme wurden auf YPD-Platten inkubiert. Zur Selektion von transformierten Hefen, d.h. zur Überprüfung des Phänotyps, wurden SD-Platten eingesetzt, die für die Wachstumskontrolle zusätzlich 3-AT enthielten.

3.2.3 Herstellung kompetenter Hefen

50 ml YPD-Medium wurden mit 1 ml Vorkultur angeimpft und ü.N. bei 30 °C unter Schütteln bis zur stationären Phase ($OD_{600} > 1,5$) wachsen gelassen. Das Volumen wurde mit YPD-Medium auf 300 ml erhöht, und die Kultur weitere 3 Stunden inkubiert. Die Hefen wurden 5 min bei 2.500 upm bei RT zentrifugiert und mit 25 ml 1 x TE-Puffer gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml TE/LiAc aufgenommen (Endvolumen ~ 1,5 ml) und innerhalb von zwei Stunden für die Transformation eingesetzt.

3.2.4 Transformation von Hefe

a) Die Transformation von Expressions- und Reporterplasmiden

Die Integration der Vektoren in das Hefegenom erfolgte über homologe Rekombination mit den im Selektionsgen linearisierten Plasmiden. Hierfür wurde 1 µg pHISi oder pHISi-1 sowie deren Derivate mit XhoI und 1 µg pLacZi sowie dessen Derivate mit NcoI in einem 20 µl-Restriktionsansatz verdaut. Die Expressionsplasmide, die in Hefe episomal vorliegen (pGAD und cDNA-Plasmide), wurden ungespalten transformiert. Zu der Plasmid-DNA wurden 100 µg Lachssperma-DNA und 100 µl kompetente Hefen gegeben. Der Ansatz wurde gemischt, mit 600 µl PEG/LiAc versetzt, und nach vorsichtigem Vortexen 30 min bei 30 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde mit 70 µl DMSO vermischt. Nach 15 min bei 42 °C und 2 min auf Eis, wurden die Hefen 10 sec bei 14.000 upm zentrifugiert, in 150 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen und auf SD-Agar ausplattiert. Nach einigen Tagen Inkubation bei 30°C wurden die gebildeten Hefe-Kolonien gepickt und erneut ausgestrichen, um den Phänotyp zu bestätigen.

b) Die Transformation der HaCaT-cDNA-Bank

Um den Vektor pACT2 mit den inklonierten cDNA-Fragmenten (cDNA-Bank) in den Hefe-Reporterstamm zu transformieren, wurden in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen 20 µg der cDNA-Plasmide und 2 mg frisch denaturierte Lachssperma-DNA (2 x je 5 min 95 °C und 4 °C) gemischt. Der Zugabe von 1 ml kompetenter Hefen und 6 ml PEG/LiAc, folgte nach kurzem Vortexen eine Inkubation von 30 min bei 30 °C im Thermoschüttler. Anschließend wurden 700 µl DMSO zugegeben, vorsichtig vermischt und alles 15 min bei 42 °C inkubiert. Nach 2 min auf Eis, wurden die Hefen für 5 min bei 2.500 upm pelletiert, in 50 ml SD/His⁻ Medium resuspendiert, auf zwei 50 ml-Röhrchen verteilt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde 5 min bei 2.500 upm zentrifugiert, und das Pellet in 6 ml 1 x TE-Puffer aufgenommen. Eine 1:30- und eine 1:900-Verdünnung, die auf SD-Platten (Ura⁻, Leu⁻) ohne 3-AT ausgestrichen wurden, dienten der Ermittlung der Transformationseffizienz. Die restlichen Hefen wurden auf 15 cm-SD Platten (His⁻, Ura⁻, Leu⁻ mit 75mM 3-AT) ausgestrichen. Nach wenigen Tagen bildeten jene Hefen Kolonien, die ein Fusionsprotein exprimierten, welches über den cDNA-kodierten Proteinanteil an den Promotor binden und diesen über die Gal4-AD aktivieren konnte. Die gewachsenen Kolonien wurden auf Selektionsplatten vereinzelt.

3.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Die Methode zur Isolierung von Plasmiden aus Hefe basiert auf dem Protokoll der Firma Clontech (nach: Hoffman and Winsten, 1987; Kaiser and Auser, 1993). Hefen einer stationären 5 ml-SD-Übernachtskultur wurden bei 2.500 upm für 5 min bei 20 °C zentrifugiert, durch Vortexen in 200 µl Hefe-Lysepuffer resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß, das 200 µl Glaskügelchen enthielt, gegeben. Nach Zusatz von 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI), wurden die Zellen durch Vortexen (10 x je 1 min Vortexen, 1 min auf Eis) aufgebrochen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 14.000 upm, RT), um die Kügelchen und Zelltrümmer zu pelletieren. Für die Transformation chemisch kompetenter Bakterien, wurde die DNA aus dem Überstand unter Zugabe von 1 µl Glykogen nach dem üblichen Protokoll gefällt und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Für die Transformation von *E. coli* KC8 mittels Elektroporation wurde die DNA ohne Glykogen gefällt und nach der Resuspension in TE zusätzlich über eine DNA-Miniprep-Säule (Qiagen) aufgereinigt und in Wasser eluiert, um Salze zu entfernen.

3.2.6 β -Galaktosidase-Tests

a) Der X-Gal-Filtertest

Der X-Gal Filtertest ist eine schnelle Methode des qualitativen β -Galaktosidasenachweises in Hefe. Von jedem Klon wurden jeweils drei Kolonien in Gitternetzanordnung auf SD-Platten ausgestrichen und zwei Tage wachsen gelassen. Dann wurde ein runder Whatman-Filter blasenfrei auf die Kolonien gelegt, so daß er sich festsaugte. Um dessen Orientierung festzuhalten, bohrte man drei asymmetrische Löcher in den Filter, der dann abgezogen und mit den festhaftenden Kolonien nach oben für 15 sec in flüssigen Stickstoff getaucht wurde. Nun wurde er bei RT aufgetaut, mit den Kolonien nach oben auf einen mit Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Filter gelegt und bei 30 °C inkubiert, bis sich die Kolonien blau färbten.

b) Der ONPG-Test

Das Protokoll stammt aus dem "Hefe-Two-Hybrid-System" der Firma Clontech. Mit dem ONPG-Test ist eine Quantifizierung der β -Galaktosidaseaktivität möglich. 10 ml SD-Medium (His⁻, Ura⁻, Leu⁻) wurden mit 1 ml einer dichten Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde mindestens 5 h bei 30 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,45-0,5 (alle Hefen sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden), wurden 1,5 ml der Kultur entnommen und die Hefen in einem Eppendorfgefäß für 30 sec bei 14.000 upm pelletiert, in 1 ml Z-Puffer gewaschen, erneut wie oben zentrifugiert und dann in 300 µl Z-Puffer aufgenommen. Von diesem Ansatz wurden 100 µl mit 900 µl Wasser gemischt und für die Bestimmung der Zellzahl (Messung der OD₆₀₀) eingesetzt. Die zwei anderen 100 µl-Aliquots sowie 100 µl Z-Puffer als Negativkontrolle wurden je 3x wechselweise in flüssigen Stickstoff und ein 37 °C-Wasserbad getaucht, um die Hefen aufzubrechen. 700 µl Z-Puffer/ β -Mercaptoethanol wurden zugesetzt und die Farbreaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG/Z-Puffer gestartet. Die Proben wurden bei 30 °C inkubiert bis eine Gelbfärbung auftrat, dann wurden alle Ansätze mit 400 µl 1 M Na₂CO₃ gestoppt und für 10 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Die OD₄₂₀ des Überstands wurde bestimmt und durch die Anzahl der Zellen nach dem Waschen (OD₆₀₀) dividiert (= relative Aktivität).

3.2.7 Langzeitlagerung von Hefe

Hefekulturen wurde mit Glycerin (Endkonzentration 16,7 %) versetzt und gut gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Diese Kulturen konnten reaktiviert werden, indem mit einer Pipettenspitze Hefe abgekratzt, auf Platten ausgestrichen und kultiviert wurde.

3.2.8 Das Hefe-Two-Hybrid-System

Das Hefe-Two-Hybrid-System beruht ebenfalls auf der Trennung der DNA-bindenden und transaktivierenden Domäne von Gal4 und dient der Identifizierung möglicher Interaktionspartner eines zu untersuchenden Proteins. Der Leserahmen dieses Proteins wird in einen Vektor kloniert „in frame“ mit dem ORF der Gal4-DBD, der dann zusammen mit einer cDNA-Bank in Hefe transformiert wird. Wenn in einer Hefezelle das Zielprotein/Gal4DBD, das über die Gal4-Bindestellen an den Promotor bindet, mit einem unbekanntem Protein/Gal4AD interagiert, entsteht ein funktionaler Aktivator, der die Transkription des Reportergens stimuliert. Der betreffende Klon kann durch sein verstärktes Wachstum bzw. die Farbreaktion identifiziert werden. Der Hefestamm HF7c, der für das Hefe-Two-Hybrid-System eingesetzt wurde, und die verwendeten Plasmide der Firma Clontech sind im Materialteil beschrieben. Die hier verwendeten Medien und Reagenzien sowie die Durchführung der Experimente entsprechen außer den im folgenden aufgeführten Abweichungen denen des Hefe-One-Hybrid-Systems und sind im Protokoll „MATCHMAKER Two-Hybrid-System“ (PT1265-1) der Firma Clontech beschrieben.

Das für die Expression des Hybridproteins Gal4-DBD/PBF in Hefe verwendete Plasmid pGBT9/PBF sowie pGBT9 wurden wie unter Punkt 4.2.4.1 beschrieben in HF7c transformiert, und ein Wachstumstest auf verschiedenen Selektionsplatten durchgeführt. Da in Abwesenheit von Histidin kein erkennbares Wachstum zu beobachten war, konnte der Stamm für die cDNA-Durchsuchung eingesetzt werden. Für die Transformation mit der HaCaT-cDNA-Bank wurde wie unter 4.2.3 und 4.2.4.2 beschrieben verfahren. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

- Herstellung kompetenter Hefen

1 l YPD-Medium wurde mit 35 ml einer dichten Übernachtskultur angeimpft ($OD_{600} = 0,2$) und 4 h bei 30 °C geschüttelt. Nach der Ernte (5 min, 3500 upm (Heraeus), RT) und einem Waschschriff mit 400 ml Wasser, wurde das Pellet in 8 ml 1 x TE/LiAc aufgenommen.

- Transformation der cDNA-Bank

Für die Kotransformation von PBF/pGBT9 und der cDNA-Bank wurden 300 µg pGBT9/PBF, 300 µg cDNA-Plasmide sowie 5 mg denaturierte Lachssperma-DNA und 8 ml kompetente Hefen eingesetzt. Nach Zugabe von 60 ml PEG/LiAc wurde der Ansatz 30 min bei 30 °C geschüttelt, vorsichtig mit 7,5 ml DMSO vermischt, 15 min bei 42 °C inkubiert und pelletiert (5 min, 3500 upm, RT). Das Pellet wurde mit 50 ml

1 x TE gewaschen und in 10 ml 1 x TE resuspendiert. Jeweils 400 µl der Hefen wurden auf einer 15 cm-Platte SD His⁻/Trp⁻/Leu⁻ sowie 10 µl mit 500 µl H₂O vermischt und auf SD Trp⁻/Leu⁻ (Kontrolle der Transformationseffizienz) ausplattiert und eine Woche bei 30 °C inkubiert.

- Selektion der positiven Klone

Alle verstärkt wachsenden Kolonien wurden vereinzelt und für einen β-Galaktosidase-Filter-Test eingesetzt. Aus den Klonen, die eine Blaufärbung aufwiesen, wurden die Plasmide isoliert, und in KC8-Bakterien transformiert, um die cDNA-Plasmide von pGBT9/PBF zu trennen.

- Herstellung der Kontroll-Hefestämme

Für den βGalaktosidasetest wurden folgende, im Materialteil beschriebene Plasmide in HF7c transformiert (in der Klammer ist das zu erwartende Resultat für den Test angegeben):

pCL1	(blau)
pGBT9 + pGAD424	(weiß)
pVA3 + pGAD424	(weiß)
pGBT9 + pTD1	(weiß)
pVA3 + pTD1	(blau)
pLAM5` + pTD1	(weiß)

3.3 Zellkulturen

3.3.1 Passagieren der Zellen

Alle Zelllinien wurden bei 37 °C, 6 % CO₂ und 80-90 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen gehalten, C33A- und HeLa-Zellen in DMEM / 7,5 % FCS, HaCaT-Zellen in DMEM / 10 % FCS und RTS3b-Zellen in E-Medium. Die Zellen wurden regelmäßig mit 1 x PBS gewaschen, kurz in 2-4 ml Trypsin inkubiert und nach dem Ablösen in Medium resuspendiert. Je nach Dichtegrad wurden die Zellen verdünnt (1:3 - 1:10) und in eine neue Flasche ausgesät.

3.3.2 Transfektion der C33A-Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen einer konfluenten Schale (Ø = 10 cm) mit 1 x PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin abgelöst und mit 8 ml Medium vermischt, wobei alle Lösungen RT haben sollten. In einer Neubauer Zählkammer wurden unter dem Mikroskop die Anzahl der Zellen pro Milliliter Kultur bestimmt. Für die Transfektion in 6cm-Schalen wurden 4,5 x

10^5 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag, spätestens vier Stunden vor der Transfektion, wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Ein Transfektionsansatz enthielt folgende Komponenten:

Reporterkonstrukt	2 μ g	
RSV- β Gal	1 μ g	
H ₂ O	ad 153 μ l	
2 x HBS	176 μ l	(Zugabe erst kurz vor der Transfektion)
2 M CaCl ₂	22,5 μ l	(Probe sofort für 10 sec vortexen)

Die Proben blieben für 15 min bei RT stehen, bevor sie vorsichtig an der Sterilbank auf die Zellen aufgetropft und verteilt wurden. Die Zellen wurden ü.N. in Gegenwart des Präzipitats inkubiert, dann zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit 5 ml frischem Medium einen weiteren Tag inkubiert.

3.3.3 Transfektion von HeLa- und RTS3b-Zellen

Für die Transfektion von HeLa- und RTS3b-Zellen wurden 1×10^5 Zellen in Sechsllochplatten ausgesät, ü.N. inkubiert und am folgenden Tag meistens mit 500 ng Reporterplasmid und 500 ng eines β -Gal-kodierenden Plasmids sowie in einigen Experimenten zusätzlich mit unterschiedlichen Mengen an Expressionsplasmid transfiziert. Hierzu wurden pro Ansatz 1,5- bis 2 μ l FuGENETM 6 Transfektionsreagens (Roche Diagnostics) pro μ g DNA mit 100 μ l serumfreiem Medium (Dulbecco's MEM) gemischt, 5 min bei RT stengelassen, auf die DNA gegeben, 15 min bei RT inkubiert und auf die Zellen aufgetropft. Nach 48 h im Brutschrank, wurden die Zellen geerntet.

3.3.4 Zellernte

48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml 1 x PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml 1x PBS in die Schälchen gegeben, die Zellen mit einem Gummischaber vom Boden abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß auf Eis überführt. Nach dem Pelletieren der Zellen (2 min, 14.000 upm) wurden sie in 100 μ l Luciferase-Extraktions-Puffer aufgenommen und durch fünf Zyklen aus je 2 min im 37°C-Wasserbad und flüssigem Stickstoff aufgebrochen. Es folgte eine Zentrifugation (5 min, 14.000 upm, 4 °C) und der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde in ein Eppendorfgefäß auf Eis überführt.

3.3.5 Luciferase- und β -Galaktosidase-Test

Für den β Gal-Test:

30 μ l Extrakt wurden mit 470 μ l β Gal-Puffer vermischt. Nach Zugabe von 100 μ l ONPG, wurden die Ansätze bei 37 °C bis zur Gelbfärbung inkubiert (zwischen 0,5-5 h). Nach Abstoppen der Reaktion mit 300 μ l 1 M Natriumcarbonat, wurde die OD₄₂₀ im Photometer bestimmt (β Gal-Wert). Der ermittelte Wert ist ein Maß für die Transformationseffizienz.

Für den Luciferase-Test:

Die Messungen wurden in einem *Lumat* der Firma Berthold durchgeführt. 15 μ l Extrakt wurden zu 100 μ l Luciferase-Assay-Puffer in ein Röhrchen gegeben und gemessen. Hierfür injizierte der *Lumat* 300 μ l des luciferin-haltigen Luciferase-Assay-Puffers und maß die Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sec. Der ermittelte Wert (RLU) ist ein Maß für die Aktivität des Luciferasegens, die zur Transformationseffizienz relativiert wurde (RLU/ β Gal).

3.4 DNA-Methoden

3.4.1 Standardmethoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Protokollen von Maniatis *et al.* (1989) und Ausubel *et al.* (1997) bzw. laut Protokoll der entsprechenden Firma durchgeführt.

- Ethanol- und Phenolfällung von DNA
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase
- Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Polymerase
- Phosphorylierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarose- und Polyacrylamidgele)
- Reinigung von PCR-Produkten (Gel Extraction Kit, Qiagen)

3.4.2 DNA-Präparation

Die Plasmidisolierungen wurden mit den verschiedenen Kits (QIAprep 8 Plasmid Miniprep Kit, Plasmid Midi Kit und Plasmid Maxi Kit) der Firma Qiagen durchgeführt. Die über Nacht gewachsenen Kulturen wurden nach der Ernte entsprechend den Protokollen von Qiagen behandelt. Am Ende wurde das DNA-Pellet in 10 mM TrisHCl, pH 8,0, resuspendiert. Die Ausbeute betrug zwischen 10-20 μ g (Miniprep) und 200-400 μ g (Midi- und Maxi-Kit) DNA.

Zu analytischen Zwecken wurde die DNA-Isolierung mit TELT- durchgeführt. Die Bakterien aus 1,5 ml Kultur wurden 30 sec bei 10.000 upm in einer Tischzentrifuge sedimentiert, und das Pellet in 200 µl TELT-Puffer + 20 µl Lysozym (10 µg/µl) aufgenommen und gevortext. Nach Inkubation von 1 min bei 96 °C und 3 min auf Eis, folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 14.000 upm. Der Überstand wurde mit 100 µl Isopropanol versetzt, gevortext und 10 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 14.000 upm, 4°C) und nach dem Trocknen in TE oder 10 mM TrisHCl, pH 8.0 gelöst.

Der DNA-Gehalt wurde im Spektralphotometer in Quarzküvetten bei 260 nm bestimmt. Der Quotient aus den optischen Dichten bei 260 und 280 nm diente als Reinheitskontrolle.

3.4.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden erfolgte mit der Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4. Das Enzym katalysiert den Transfer des γ -Phosphats von ATP an das 5'-OH-Ende der DNA. Für die radioaktive Markierung von 20 ng doppelsträngiger Oligonukleotide wurden 5 µCi ^{32}P - γ -ATP (5000 Ci/mmol) verwendet. Die Reaktion (1 h, 37 °C) erfolgte im Kinasepuffer (66 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl_2 , 15 mM DTT, 1 mM Spermidin) mit 10 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 5 µl. Das Enzym wurde dann durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert.

Doppelsträngige Oligonukleotide mit überhängenden Enden wurden durch eine von dem Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I katalysierten Auffüllreaktion radioaktiv markiert. Die DNA (40 ng) wurde mit 10 µCi ^{32}P - α -dATP, 10mM dCTP, dGTP, dTTP und 2,5 U Enzym 20 min bei RT inkubiert und dann auf Eis gestellt oder bei -20°C eingefroren.

3.4.4 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden vom ZMMK der Universität zu Köln durchgeführt.

3.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung eines DNA-Abschnitts wurden 10-100 ng Plasmid-DNA, je 1 µg zweier Oligonukleotide, die zu je einem DNA-Strang komplementär waren, auf Eis pipettiert. Nach Zugabe von 10 µl Puffer sowie je 2,5 mM der vier Desoxynukleotide, wurde mit sauberstem Wasser auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt, 0,5µl Polymerase mit dem Ansatz vermischt, und alles kurz zentrifugiert. Die Probe wurde in den auf 93°C vorgeheizten

Thermocycler gestellt und die Temperaturzyklen gestartet.

- | | | | |
|----|-------|--------|----------------------------------|
| 1. | 93 °C | 5 min | |
| 2. | 93 °C | 1 min | (Denaturierung der Matrize) |
| | 52 °C | 1 min | (Annealing der Primer) |
| | 72 °C | 3 min | (Extension durch die Polymerase) |
| 3. | 72°C | 7 min | |
| 4. | 4 °C | Halten | |

Der zweite Schritt wurde insgesamt 25 Mal durchlaufen.

Je nach Einsatz der verschiedenen Polymerasen und unterschiedlichen Oligonukleotide, konnten die Parameter dieses Basisprotokolls an die jeweiligen Bedingungen (z.B. bezüglich Annealingtemperatur, Extensionszeit, Magnesiumchlorid-Konzentration und Zyklenzahl) angepaßt werden. PCR-Reaktionen, mit PBF-kodierenden Plasmiden als Matrize, wurden unter Zugabe von 2 % DMSO zum Ansatz durchgeführt.

3.4.6 *In vitro* Mutagenese

Punktmutationen wurden mit Hilfe des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System“ (Stratagene, La Jolla) eingeführt. Hierfür wurde das zu mutierende Plasmid mit einem Primerpaar, das jeweils die gewünschte Mutation enthielt, in einer PCR-Reaktion wie folgt eingesetzt:

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

- PCR-Bedingungen:
- | | | |
|-----|-------|--------|
| 1x | 95 °C | 30 sec |
| 18x | 95 °C | 30 sec |
| | 55 °C | 1 min |
| | 68 °C | 12 min |
| 1x | 68 °C | 15 min |
| | 4 °C | Halten |

Je nach Länge und Sequenz der Primer bzw. der Matrize konnten die PCR-Bedingungen verändert werden. Durch Zugabe von 1 µl DpnI in den PCR-Ansatz, wurde das in Bakterien replizierte, unmutierte Ursprungsplasmid verdaut (1-2 h, 37 °C). 1 µl des Ansatzes wurde für die Transformation in *E. coli* verwendet.

3.5 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus HaCaT-Zellen wurde unter sterilen, RNase-freien Bedingungen mit Reagenzien der Firma Promega (SV Total RNA Isolation System) durchgeführt.

1 x 10⁵ HaCaT-Zellen wurden in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen bei 300 x g (1200 upm, Heraeus) für 5 min bei RT pelletiert, mit 25 ml kaltem, sterilem 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Pipettieren und Vortexen in 175 µl SV RNA-Lysis Buffer + β-Mercaptoethanol gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 350 µl SV RNA Dilution Buffer hinzugegeben und der Ansatz 3-4 Mal invertiert. Nach einer Inkubation von 3 min bei 70 °C, folgte eine Zentrifugation bei 13000 x g, für 10 min bei 20 °C. Der Überstand wurde durch Pipettieren mit 200 µl 95 % Ethanol gemischt, auf eine Säule gegeben und 1 min bei 13000 x g und RT zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, 600 µl SV RNA Wash Solution auf die Säule gegeben und wie oben zentrifugiert. Die DNase I wurde auf Eis aufgetaut und 5 µl mit 45 µl SV DNase Dilution Buffer vermischt. Der 50 µl-Ansatz wurde auf die Membran der Säule getropft und 15 min bei RT inkubiert, bevor 200 µl SV DNase Stop Solution hinzugegeben und der Ansatz 1 min bei 13000 x g zentrifugiert wurde. Die Säule wurde einmal mit 600 µl und einmal mit 250 µl SV RNA Wash Solution gewaschen und 2 min bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule (ohne Deckel) wurde in ein Auffangröhrchen gestellt, und die RNA mit 100 µl nuklease-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 13000 x g) eluiert und eingefroren (-20 °C).

3.6 5'RACE

Für die Isolierung eines 5'-Endes des PBF-Leserahmens, wurde das 5' RACE System (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) der Firma Invitrogen verwendet.

a) Erststrang-Synthese von HaCaT-RNA

Für die Umschreibung der RNA in cDNA, wurde ein PBF-spezifischer Primer (GSP1) zusammen mit der Gesamt-RNA aus HaCaT als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt:

1µl GSP1 (20 ng/µl)

13 µl HaCaT-RNA (= 5 µg)

1,5 µl 10 x PCR-Puffer

Zum Annealen des Primers wurde der Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert, auf RT abkühlen gelassen, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von

1 µl 10 x PCR-Puffer
2,5 µl 25 mM MgCl₂
1 µl 10 mM dNTPs
2,5 µl 0,1 M DTT
1,5 µl H₂O

Der Ansatz wurde 1 min auf 42 °C erhitzt bevor 1 µl der DNA-Polymerase SUPERScript™ II RT hinzugegeben und der Ansatz bei 42 °C 50 min inkubiert wurde. Es folgten die Inaktivierung des Enzyms (15 min, 70 °C), die Erwärmung der Probe auf 37 °C und der Verdau der RNA mit 1 µl RNase-Mix für 30 min bei 37 °C.

b) Reinigung der cDNA

Die Reinigung erfolgte mittels GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge. Zu der cDNA wurde 120 µl auf Raumtemperatur erwärmte Bindungslösung gegeben, der Ansatz auf eine Säule gegeben und 20 sec bei 13000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde viermal mit je 400 µl kaltem 1 x Waschpuffer und zweimal mit je 400 µl kaltem 70 % Ethanol gewaschen (20 sec, 13000 x g). Um Ethanolreste zu entfernen, wurde die Säule 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Die cDNA wurde in ein Eppendorfgefäß eluiert, indem 50 µl steriles 65 °C warmes Wasser auf die Säule getropft wurden und diese für 20 sec bei 13000 x g zentrifugiert wurde.

c) dC-Tailing

Synthese eines homopolymeren Endes (dC-Tailing) zur Erstellung einer Bindestelle am 3'Ende der cDNA für den in der PCR benötigten „Abridged Anchor Primer“. Ein Teil der gereinigten cDNA wurde für diese Reaktion eingesetzt:

5 µl 5 x Tailing Buffer
2,5 µl 2mM dCTP
16,5 µl HaCaT-cDNA

Der Ansatz wurde 3 min bei 94 °C inkubiert, 1 min auf Eis abgekühlt, gesammelt, mit 1 µl Enzym TdT vermischt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch Erhitzen inaktiviert (65 °C, 10 min).

d) Amplifizierung der gesuchten cDNA

Hierfür wurde eine PCR mit der cDNA, einem genspezifischen Primer (GSP2) und dem Abridged Anchor Primer, der an das dC-Ende hybridisiert, durchgeführt.

31,5 µl H₂O
5 µl Proof2-Puffer
3,5 µl 25 mM MgCl₂

1 µl	10 mM dNTPs
2 µl	GSP2 (10 µM)
2 µl	Abridged Anchor Primer (10 µM)
5 µl	dC-cDNA

Der Ansatz wurde gemischt, auf 94 °C erhitzt und 2,5 U Taq/Pwo (0,5 µl) zugegeben.

PCR-Bedingungen:	1 x	94 °C	3 min
	30 x	94 °C	1 min
		52 °C	1 min
		68 °C	2 min
	1 x	68 °C	5 min
		4 °C	Halten

e) Nested PCR

Um das spezifische Produkt anzureichern, wurde eine weitere PCR angeschlossen. Eine 1:100-Verdünnung (in TE) der ersten PCR, der AUAP (Abridged Universal Amplification Primer), der verschiedene Schnittstellen enthält, und der GSP3 wurden verwendet.

33,5 µl	H ₂ O
5 µl	Proof2-Puffer
3 µl	25mM MgCl ₂
1 µl	10mM dNTPs
1 µl	GSP3/SphI (10 µM)
1 µl	AUAP (10 µM)
5 µl	verdünntes PCR-Produkt
0,5 µl	Taq/Pwo (5 U/µl)

Die PCR wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die vorangegangene PCR. Das entstandene Produkt wurde gefällt, auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und isoliert. Die gereinigten Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, in die entsprechenden Schnittstellen in pUC18 ligiert und sequenziert.

3.7 Proteine

3.7.1 Herstellung von Kernextrakten

Für die Herstellung von Kernextrakten wurden die Zellen in Schalen (Ø 10 cm) ausgesät und 48 h inkubiert, so daß die Schalen etwa 80 % konfluent waren. Die Zellen wurden mit 5 ml kaltem 1 x PBS gewaschen und nach Zugabe von 2 ml 1 x PBS mit einem Gummischaber abgekratzt. In einem 2 ml-Reaktionsgefäß wurden die Zellen bei 1500 upm, 4 °C für 10 min

pelletiert, in 400 μ l Puffer A resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 25 μ l 10 % NP40 wurde sofort 10 sec gevortext und 30 sec bei RT und 14000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 μ l Puffer C aufgenommen und 30 min im Kühlraum (4 °C) stark geschüttelt. Nach 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 15.300 upm, wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert (nach Schreiber *et al.*, 1989).

3.7.2 Proteinisolierung mittels Affinitätschromatographie

Für die Proteinisolierung aus den mit einem pET14b-Expressionsplasmid transformierten Bakterien *E. coli* BL21(DE3)pLysS, wurden zwischen 40 und 500 ml LB-Medium, das 100 μ g/ml Ampicillin enthielt, mit einem Zehntel der Menge an Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C wachsen gelassen. Vor Induktion der Kultur mit 1 mM IPTG, wurde ein 1 ml-Aliquot entnommen, 1 min bei 14.000 upm zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert. Nach 1 h Inkubation bei 30 °C wurde Rifampicin (1 mM Endkonzentration) zu der Kultur gegeben, und eine weitere Stunde bei 30 °C geschüttelt. Zum Schluß wurde eine weitere 1 ml-Probe entnommen, zentrifugiert und eingefroren, bevor die restlichen Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 5.000 upm, 4 °C geerntet und bei -70°C gelagert wurden. Die Pellets der 1 ml-Aliquots wurden in 100 μ l 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert, 5 min bei 95 °C denaturiert, und 20 μ l des Ansatzes auf ein 10 %-PAA-Gel geladen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese entweder für den Western Blot eingesetzt oder in Coomassie-Blau gefärbt und in H₂O durch Kochen (Mikrowelle, 5 min 600 Watt) entfärbt. Dieser Schritt diente zur Überprüfung der Induktion der Expression des gewünschten Proteins.

Im Kühlraum (4 °C) wurden 0,7 ml Nickel-NTA-Agarose (Säulenvolumen (SV) = 350 μ l) in eine Plastiksäule gefüllt, 2 x mit 10 ml kaltem, sterilem Wasser gewaschen und mit 4 ml (>10 SV) HSLB / 5 mM Imidazol equilibriert. Die Pellets der 40 ml-Kulturen wurden in 1 ml HSLB \oplus resuspendiert, viermal je 30 sec sonifiziert und 1 min auf Eis gestellt, es folgte eine Zentrifugation (10 min, 10.000 upm, 4 °C). Der Überstand wurde nach Entnahme einer 20 μ l-Probe („Beladung“), die bei -80 °C eingefroren wurde, auf die Säule gegeben, und die Fließgeschwindigkeit auf 2-3 Tropfen/min eingestellt. Der Durchfluß wurde erneut auf die Säule geladen und aufgefangen, ein 20 μ l-Aliquot wurde entnommen und bei -80 °C verwahrt. Nach einem Waschschriff mit 400 μ l HSLB \oplus folgten zwei Waschschriffe mit 2 SV A₁₀₀₀₋₀ und >20 SV A₃₀₀₋₂₀. Die Elution erfolgte mit fünfmal 1 SV A₁₈₀₋₁₅₀, die jeweils in drei Fraktionen gesammelt wurden. Vor dem Einfrieren bei (-80 °C), wurde ein 10 μ l-Aliquot entnommen. Die zur Überprüfung der einzelnen Schritte entnommenen Proben wurden zum mit 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und wie oben beschrieben behandelt.

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentration der Proteine wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Hierfür wurde 1 µl der proteinhaltigen Lösung in 1 ml einer 1:5-Verdünnung des BioRad Protein Assay Reagens gegeben. Anschließend wurde die OD₅₉₅ im Spektralphotometer bestimmt. Mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe als Eichkurve, konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Um Unterschiede in der Zellzahl der Transfektionsansätze auszugleichen, wurden 2 µl der Extrakte mit 100 µl des 1:5 verdünnten Protein Assay Reagens in einer ELISA-Platte vermischt und gemessen. Der Quotient aus Luciferase- und Proteinwert ergab die relative Aktivität der einzelnen Ansätze.

3.7.4 Gelretardierungsexperiment ("EMSA")

Der EMSA dient der Überprüfung der Bindungsfähigkeit eines Proteins *in vitro*. Die Menge an eingesetztem Kompetitor ist in der jeweiligen Abbildung angegeben, die Proteinmenge konnte je nach Aufgabenstellung variieren. Für Bindungsstudien mit Kernextrakten wurden meistens 15 µg Extrakt (bis 9 µl bzw. add 9 µl mit Puffer C für Kernextrakte) sowie 5 µl Salzlösung eingesetzt. EMSA mit aufgereinigten Proteinen enthielten 1 µl Protein und 9-10 µl des 2 x Bindungspuffers. Die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten sind im Materialteil unter 2.11 (2 x Bindungs-Puffer, Endkonzentration) angegeben. Die Ansätze wurden 15 min auf Eis inkubiert, bevor 250 pg des radioaktiv markierten Oligonukleotids dazugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei RT, dann wurden die Proben auf ein 5%-PAA-Gel geladen, das bei 160 V 1 h 30 min laufen gelassen wurde. Nachdem das Gel für 15 min in 10 % Methanol / 10 % Essigsäure fixiert und für eine Stunde bei 80 °C getrocknet wurde, konnte ein Röntgenfilm aufgelegt werden. Ansätze die einen Antikörper enthielten, wurden die gesamte Zeit auf Eis inkubiert, und die Gele liefen bei 4 °C und 160 V 2 h 30 min.

3.7.5 Western-Blot

Die Proteinextrakte wurden mit der entsprechenden Menge an 2 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und auf ein PAA-Gel aufgetragen. Das Gel lief 30 min bei 200 V. Das Gel wurde dann 15 min in Transferpuffer gewaschen. Dann wurde eine luftblasenfreie Schichtung aus Transferpuffer-getränkten Schwämmen, Whatman-Papieren sowie dem Gel und dem Filter im Zentrum, aufgestapelt, zwischen zwei Plastikplatten mit Druck fixiert und in die Blot-Kammer eingesetzt. Über Nacht wurde eine Spannung von 30 V so angelegt, daß sich der Filter zwischen dem Gel und der Anode befand. Der Transfer der Proteine wurde durch 2 min Färbung des Filters in Ponceau-Lösung überprüft. Die Banden der Proteinleiter

konnten mit Kugelschreiber nachgezeichnet werden, bevor die Membran in TBST entfärbt, eine Stunde in Abblocklösung auf dem Taumler inkubiert und mit TBST 10 min gewaschen wurde. Die Membran wurde mit 1-1,5 ml einer Antikörper-Verdünnung (meistens 1:5000) überschichtet und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschstschritte mit TBST (je 10 min). Der aus Kaninchen gewonnene Antikörper konnte nach seiner Bindung an das Antigen mit einem an Peroxidase gekoppelten Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert werden. Dafür wurde die Membran in 15 ml einer 1:7500-Verdünnung des 2. Antikörpers unter Taumeln 1 h inkubiert. Dann wurde 5 x 10 Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde auf Parafilm gelegt und 2 min mit 1,25 ml BM Chemiluminescent Blotting Substrat (Boehringer) überschichtet. Diese Lösung enthält Luminol, das durch die Peroxidase in einer Oxidationsreaktion umgesetzt wird, so daß das entstandene Zwischenprodukt unter Emission von Licht zerfällt. Auf die zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Kassette fixierte Membran wurde in der Dunkelkammer für einige Sekunden ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt. Bei Einsatz des Nickel-NTA-Konjugates entfiel die Inkubation mit einem zweiten Antikörper.

3.7.6 GST-Proteine

Der Expressionsvektor pGEX-2T/PBF bzw. pGEX-2T wurde in *E. coli* BL21(D3)pLysS transformiert, so daß die Bakterien nach Induktion ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und PBF bzw. nur GST bildeten. Die Behandlung der Bakterienkulturen und deren Induktion erfolgte wie unter 4.7.2 für Histidin-Fusionsproteine beschrieben. Nach der Ernte einer 200 ml-Kultur, wurde das Pellet in 10 ml 500 mM LSDB[⊕] aufgenommen und im Kühlraum 4 x 30 sec sonifiziert und zwischendurch jeweils 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde auf 2 ml-Eppendorfgefäße verteilt und 15 min bei 4°C und 15.300 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Eine 50 µl- und eine 250 µl-Probe wurden zur Überprüfung der Bildung der GST-Proteine auf ein PAA-Gel aufgetragen.

3.7.7 *In vitro* Translation

Das „TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System“ (Promega) ermöglicht die eukaryote *in vitro* Translation und radioaktive Markierung von Proteinen unter Verwendung von Plasmiden die einen T7 RNA Polymerase Promotor besitzen. Für einen 25 µl-Ansatz wurden

benötigt:	Plasmid-DNA (250 ng/µl)	4 µl
	Reaction Buffer	1 µl
	AS-Mix ohne Methionin	0,5 µl

RNAsin (40 U/ μ l)	0,5 μ l
Rabbit Reticulocyte-Lysate	12,5 μ l
³⁵ S-Methionin	1 μ l
T7 RNA-Polymerase	0,5 μ l
H ₂ O	5 μ l

Der Ansatz wurde 90 min bei 30 °C inkubiert, ein 2 μ l-Aliquot auf einem Proteingel aufgetragen, um das Ergebnis der Reaktion zu überprüfen, und der Rest eingefroren.

3.8 Interaktionsversuche

Zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen wurden pro Ansatz 50 μ l einer homogenen Glutathione-SepharoseTM-Lösung in ein Eppendorfgesäß gegeben, durch Invertieren mit 1 ml Wasser gewaschen und 1 min bei 3500 upm und RT in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml 500 mM LSDB, bevor Bakterienextrakt (häufig 50 μ l GST bzw. 250 μ l PBF/GST) zugegeben wurde. Die Ansätze wurden 1 h bei 4 °C im Rollinkubator gedreht und dann 1 min bei 3500 upm und RT zentrifugiert. Um unspezifische Wechselwirkungen zu lösen, wurde 4 x mit 1 ml 1 M LSDB und 2 x mit 100 mM LSDB gewaschen und zwischendurch wie oben beschrieben zentrifugiert. Zu jedem Pellet wurden 200 μ l 100 mM LSDB und 12 μ l das *in vitro* translatierten Proteins dazugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 4 °C im Rollinkubator, wurden die Proben 4 x mit je 1 ml 100 mM LSDB gewaschen. Nun wurde jede Probe mit 10 μ l 4 x SDS Probenpuffer vermischt, 5 min bei 94 °C gekocht und auf einem Proteingel 35 min bei 160 V aufgetrennt. Nach je 20 min Fixierung und Amplifizierung wurde das Gel 1 h bei 80 °C getrocknet und die radioaktiven Proteine mit Hilfe eines Röntgenfilms nachgewiesen.

3.9 Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden in 24-Lochplatten ausgesät und wie unter 4.4.2 bzw. 4.4.3 beschrieben mit den Expressionsvektoren transfiziert. Nach 48 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und in 500 μ l 2 % Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Es folgten zwei Waschschriften von 5 min mit je 1 ml 1 x PBS. Dann wurde 20 min mit PBS / 10 % FCS inkubiert, 150 μ l einer 1:200-Verdünnung (in 1 x PBS + 10 % FCS + 0,1 % Saponin) des PBF-Antiserums hinzugegeben, und der Ansatz 1 h bei RT inkubiert. Nach drei Waschschriften von je 5 min mit 1 ml PBS / 10 % FCS wurden 150 μ l einer 1:50-Verdünnung des zweiten Antikörpers (Ziege-Anti-Kaninchen-FITC, dianova) auf die Zellen pipettiert, und 1 h inkubiert. Die Zellen wurden 3 x mit 1 ml PBS / 10 % FCS gewaschen, mit 500 μ l 1 x PBS bedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

3.10 FACS-Analyse

Das FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) wurde für die Messung fluoreszierender RTS3b-Zellen nach Transfektion mit dem Expressionsplasmid pEGFP-C1, das für das Enhanced Green Flourescent Protein (EGFP) kodiert, bzw. mit pEGFP-C1/PBF, das für das Fusionsprotein EGFP/PBF kodiert. eingesetzt.

Die RTS3b-Zellen wurden wie unter 4.4.3 beschrieben in Sechsllochplatten ausgesät, transfiziert und nach der angegebenen Zeit geerntet und fixiert. Hierfür wurden die Zellen mit 1 ml kaltem 1 x PBS gewaschen, in 400 µl Accutase abgelöst (15 min, 37 °C), mit 400 µl 1 x PBS vermischt und pelletiert (4 min, RT, 3000 upm in einer Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 300 µl 1,5 % Paraformaldehyd resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Messung wurde in einem FACSCalibur-Gerät der Firma Bektom/Dickinson (BD Sciences) mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Parameter	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Lin
P2	SSC	340	1.00	Lin
P3	FL1 (grün)	407	1.00	Log
P4	FL2 (rot)	319	1.00	Log
P5	FL3	650	1.00	Lin

Threshold:	Primary Parameter:	FSC
	Value:	52
Compensation:	FL2 -10,8 % FL1	
Flow Rate:	low	

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung des PBF 5`Endes

Die Repression des P₇₅₃₅ aus HPV8 durch das virale E2-Protein beruht auf der Bindung von E2 an die Bindestelle P2. Mutationen in P2 verhindern nicht nur die Repression durch E2, sondern reduzieren auch die Aktivität des P₇₅₃₅ (Stubenrauch und Pfister, 1994). Dies läßt vermuten, daß zelluläre Faktoren, die für die Basalaktivität des Promotors mit verantwortlich sind, dort binden (Stubenrauch *et al.*, 1996). In meiner Diplomarbeit konnte ich mit Hilfe des Hefe-One-Hybrid-Systems aus einer cDNA-Bank, hergestellt aus HaCat-Zellen, die cDNA eines unbekanntes Faktors isolieren, der an die E2-Bindestelle P2 von HPV8 bindet. Die Sequenz weist keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen auf, jedoch sind identische cDNAs aus verschiedenen Geweben und Zelllinien isoliert worden (z.B. aus Lungenkarzinom, Hoden, Jurkat T- und HeLa-Zellen). Sequenzvergleiche der in der Datenbank gefundenen cDNAs, die mit einander überlappen, ergaben eine Sequenz, die homolog ist zu der mittels Hefe-One-Hybrid-System gefundenen cDNA. Das längste cDNA-Insert wurde aus dem Hefeklon Nr. 57 isoliert und ist 1390 bp lang. Es konnte ein durchgehender ORF von Nukleotid 1 bis 1200 identifiziert werden, gefolgt von einer 190 bp langen 3` untranslatierten Region (3`UTR). Der ORF kodiert für ein Protein von etwa 45 kDa, das prolinreich ist und ein Zinkfingermotiv vom Typ TFIIIA enthält. Die DNA-Bindung des unbekanntes Faktors wurde in Gelretardierungsexperimenten (EMSA) verifiziert. Hierzu wurde ein mittels PCR aus der cDNA des Klon 57 amplifiziertes Fragment, über die XhoI-Schnittstelle in pET14b ligiert, ein prokaryotes Expressionsplasmid, das in seinem 5`Linker-Bereich für sechs Histidine kodiert, die dem Protein bei seiner Synthese vorangestellt werden. Dieses in Bakterien exprimierte, gereinigte rekombinante Protein band in EMSAs spezifisch an die reprimierenden E2-Bindestellen P2 von HPV8 und BS-1 von BPV1 (Boeckle, 1998).

Da der ORF der cDNA aus Klon 57, der mit dem Hefe-One-Hybrid-System gefunden wurde, kein ATG enthielt, sollten mit der „5`RACE“-Methode (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds, Invitrogen) weiter stromaufwärts liegende Sequenzen sowie ein Startcodon identifiziert werden. Hierfür wurden auf der Grundlage der bekannten Sequenz drei zueinander versetzte Primer (**g**ene **s**pecific **p**rimer; GSP1-3) synthetisiert, die zur kodierenden Sequenz der cDNA aus Klon 57 komplementär sind und in Richtung 5` des Gens verlängert werden können (Abb. 4). Aus HaCat-Zellen isolierte RNA und der am weitesten 3` liegende GSP1 wurden für die Synthese der cDNA eingesetzt. Nach zwei geschachtelten (nested) PCRs mit dem Abridged

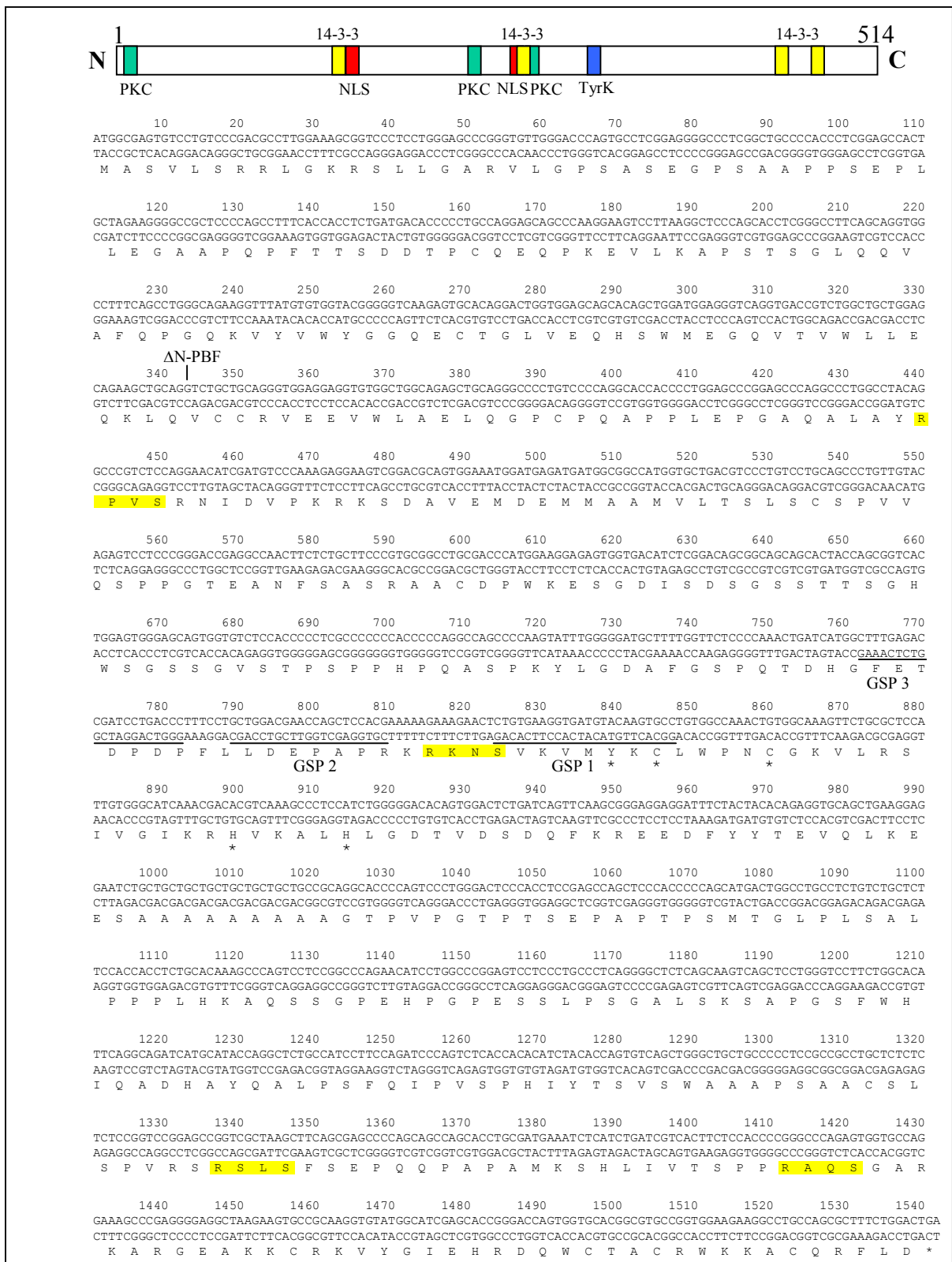


Abb. 4 Die Sequenz von PBF
 Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von PBF. Die den Zinkfinger ausbildenden AS sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die für die 5' RACE eingesetzten Primer (GSP1-3) sind unterstrichen. Die Lage der Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C (grün) und Tyrosinkinase (blau), mögliche 14-3-3 Bindestellen (gelb) sowie Kernlokalisierungssignale (rot) sind eingezeichnet. Der Beginn des ORF von ΔN-PBF ist markiert.

Anchor Primer und GSP2 bzw. dem AUAP (Abridged Universal Amplification Primer; enthält eine SallI-Schnittstelle) und dem innersten Primer (GSP3/SphI), konnten zwei Produkte von ~850 bp bzw. ~1,2 kb aufgereinigt werden. Nach deren Spaltung mit SphI/SallI wurden die Fragmente jeweils über die selben Schnittstellen in das Plasmid pUC18 kloniert.

Mit Hilfe der Sequenzierung eines 850 bp und eines 1,2 kb großen cDNA-Klons durch die Firma Qiagen (Hilden), konnten zusätzliche 342 bp mit einem „in frame“ liegenden ATG stromaufwärts der bereits bekannten Sequenz identifiziert werden. Das 1,2 kb große cDNA-Fragment enthielt zusätzlich eine 336 bp lange 5'UTR. Die Sequenz, zusammengesetzt aus der des cDNA-Klons 57 und des 1,2 kb-Inserts, ergab einen 1542 bp langen ORF, der in Abb. 4 dargestellt ist (Genbank Acc. Nr.: AF263928). Vergleiche mit den im Rahmen des „Human Genome Project“ ermittelten Sequenzen ergaben, daß das Gen im humanen Genom auf Chromosom 8p21+1 (Locus NT_007988+9) lokalisiert ist und aus 10 Exons besteht, die sich über 36.854 kb verteilen. Das kodierte Protein wurde von uns Papillomavirus Binding Factor (PBF) genannt, die ursprünglich isolierte cDNA aus Klon 57 als Δ N-PBF bezeichnet. Das gesamte Protein besitzt ein Molekulargewicht von ~55 kDa und den bereits genannten Zinkfinger aus zwei Cysteinen und zwei Histidinen (Typ TFIIIA) an Position 282-305, der stromaufwärts von einer basischen Region und stromabwärts von sauren Aminosäuren flankiert wird. Computeranalysen ergaben die mögliche Ausbildung einer α -Helix zwischen AS 299 und 344. PBF ist reich an Prolin, Serin und Alanin (jeweils etwa 11%). Es enthält mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen, sechs für Casein Kinase II, eine für die Tyrosinkinase an Position 316-323 und drei für Proteinkinase C (AS 6-8, 238-240 und 275-277). Auch mögliche Bindemotive für das 14-3-3 Protein wurden gefunden.

4.2 Rekombinantes PBF und Herstellung eines spezifischen Antikörpers

Für die Untersuchung einer Rolle von PBF bei der Regulation der Genexpression von Papillomviren, sollte ein Antikörper gegen PBF hergestellt werden. Um rekombinantes PBF für *in vitro* Bindungsstudien und die Immunisierung eines Kaninchens in Bakterien zu produzieren, wurde der gesamte ORF in den prokaryoten Expressionsvektor pET14b kloniert. Hierfür wurde das bereits beschriebene Plasmid pET14b/ Δ N-PBF (Boeckle, 1998), das das 3'Ende von PBF enthält, mit XhoI und BstXI geschnitten, so daß drei Fragmente entstanden: das XhoI linearisierte Plasmid pET14b, ein 400 bp-Fragment (das unvollständige 5'Ende bis zur BstXI-Schnittstelle an Position 723 des vollständigen ORF) und das 3'-Ende von der BstXI-Schnittstelle bis zum 3'Ende (inklusive der 3'UTR). Die Fragmente wurden über ein

Agarosegel aufgetrennt und das Plasmid sowie das PBF 3'-Ende aufgereinigt. Das PBF 5'-Ende wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert, wobei pUC18 (Klon 6) als Matrize und die Primer PBF-5'/XhoI und PBF3' eingesetzt wurden. Das 760 bp große Produkt, das das 5'-Ende bis 23 bp stromabwärts der BstXI-Schnittstelle enthielt, wurde mit BamHI und BstXI geschnitten und gereinigt. Durch eine Ligation des linearisierten Plasmids mit den Fragmenten, die das PBF 5'- bzw. 3'-Ende enthielten, konnte der gesamte Leserahmen in pET14b zusammengesetzt werden (pET14b/PBF). Dieses Plasmid exprimiert PBF fusioniert mit sechs Histidinen (rPBF).

Für die Expression wurde PBF/pET14b in den *E. coli* Stamm BL21pLysS transformiert. Die Bakterien wurden bebrütet, mit 0,5 mM IPTG induziert, und nach dem Aufschluß das gebildete Protein mittels Affinitätschromatographie über Komplexbildung der Histidine mit Nickel-Agarose auf einer Säule angereichert. Nach Waschschritten mit Puffern unterschiedlicher Salzkonzentration, wurde das rPBF mit 180 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die so gewonnenen Proteinfractionen wurden unter anderem für die Herstellung eines Antikörpers durch die Firma PINEDA (Berlin) eingesetzt. Für die Immunisierung zweier Kaninchen wurde der Firma etwa 1 mg bakteriell exprimiertes, gereinigtes Protein (3 µg/µl) in Elutionspuffer (A₁₅₀₋₁₈₀) ohne Proteaseinhibitoren zur Verfügung gestellt. Es erfolgten eine Immunisierung und eine Auffrischung am 61. Tag nach Beginn der Immunisierung, da das an diesem Tag entnommene Serum keinen ausreichenden Titer zeigte. Das aus Kaninchen gewonnene PBF-Antiserum (αPBF), entnommen am 90. Tag nach Beginn der Immunisierung, wurde im Western Blot analysiert. Die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine rPBF, das auch zur Immunisierung verwendet worden war, und rPEBP2αA1, rekombinantes 6xHis-PEBP2αA1 als Negativkontrolle, wurden mit einer Verdünnungsreihe des Antiserums inkubiert. Wie in Abb. 5 dargestellt reagiert das Serum bei einer Verdünnung von 1:5000 deutlich mit rPBF (Spur 2), während rPEBP2αA1 (Spur 1) nicht gebunden wurde. In den Spuren 3 und 4 wurden jeweils 10 µl der aufgereinigten Proteine aufgetragen. In der PBF-Fraktion waren neben der zwischen 66 und 95 kDa laufenden Bande des vollständigen PBF auch kleinere Proteine gegenwärtig, die Degradationsprodukte von PBF oder bakterielle Proteine sein könnten, die bei der Aufreinigung mit eluiert wurden. Da diese Proteine auch in der für die Immunisierung verwendeten Fraktion enthalten waren, kann die Reaktion des Antiserums im unteren Bereich des Western Blots von einer Reaktion mit einem Antikörper gegen ein bakterielles Protein stammen. Das Kaninchen wurde am 110. Tag nach Beginn der Immunisierung ausgeblutet.

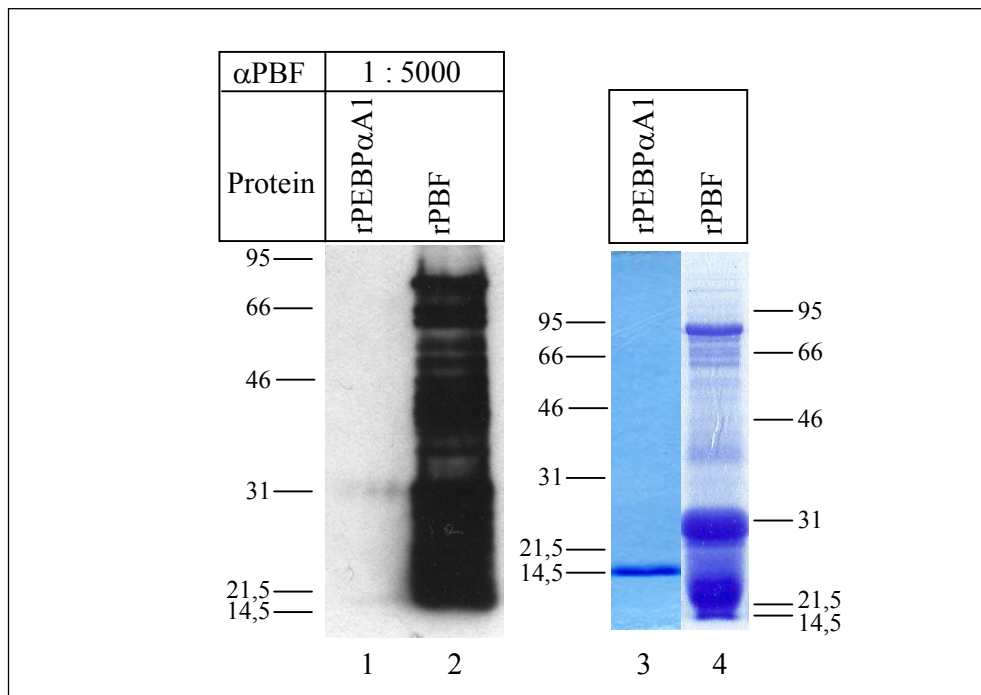


Abb. 5 Nachweis der Spezifität des Antiserums gegen PBF mittels Western Blot

Die bakteriell exprimierte und gereinigte Proteine rPEBP α A1 (Negativkontrolle) und rPBF (r = rekombinant) wurden auf einer Nitrozellulosemembran fixiert und mit einer 1:5000-Verdünnung des Antiserums gegen PBF (α PBF) inkubiert. Bei dieser Verdünnung bindet das Serum deutlich an rPBF und möglicherweise an dessen Degradationsprodukte. Die Spuren 3 und 4 zeigen Proteingele, auf denen je 10 μ l der 6xHis-Proteine nach der Reinigung über Nickel-Agarose aufgetragen wurden. Der Größenmarker (in kDa) ist jeweils eingezeichnet.

4.3 Lokalisierung von PBF

Die Lokalisation von PBF in eukaryoten Zellen sollte mit Hilfe eines Immunfluoreszenztests mit Zellen überprüft werden, die mit einem Expressionsplasmid für PBF transient transfiziert worden waren. Dafür wurde der PBF-Leserahmen in die eukaryoten Expressionsvektoren pXJ41 und pCEP4 kloniert.

Der ORF von Δ N-PBF wurde mit EcoRI und BamHI aus pET14b/ Δ N-PBF ausgeschnitten, das Plasmid pXJ41 mit XhoI und BglIII geschnitten (die Überhänge von BamHI und BglIII sind komplementär). Die aufgereinigten Fragmente und ein synthetisches Oligonukleotid mit einem ATG sowie einem XhoI- und einem EcoRI-Überhang als Verbindungsstück (Linker, siehe Material) wurden miteinander ligiert. Das entstandene Plasmid hieß pXJ41/ Δ N-PBF. Um den gesamten PBF-Leserahmen in pXJ41 zu klonieren, wurde pXJ41/ Δ N-PBF mit BamHI, das stromaufwärts zum ORF für Δ N-PBF in der MCS schneidet, und BstXI, das an Position 723 in PBF schneidet, verdaut, und das Vektor-Fragment mit den 3' zur BstXI-Schnittstelle gelegenen PBF-Sequenzen isoliert. Der Klon, der das PBF-5' Ende in pUC18

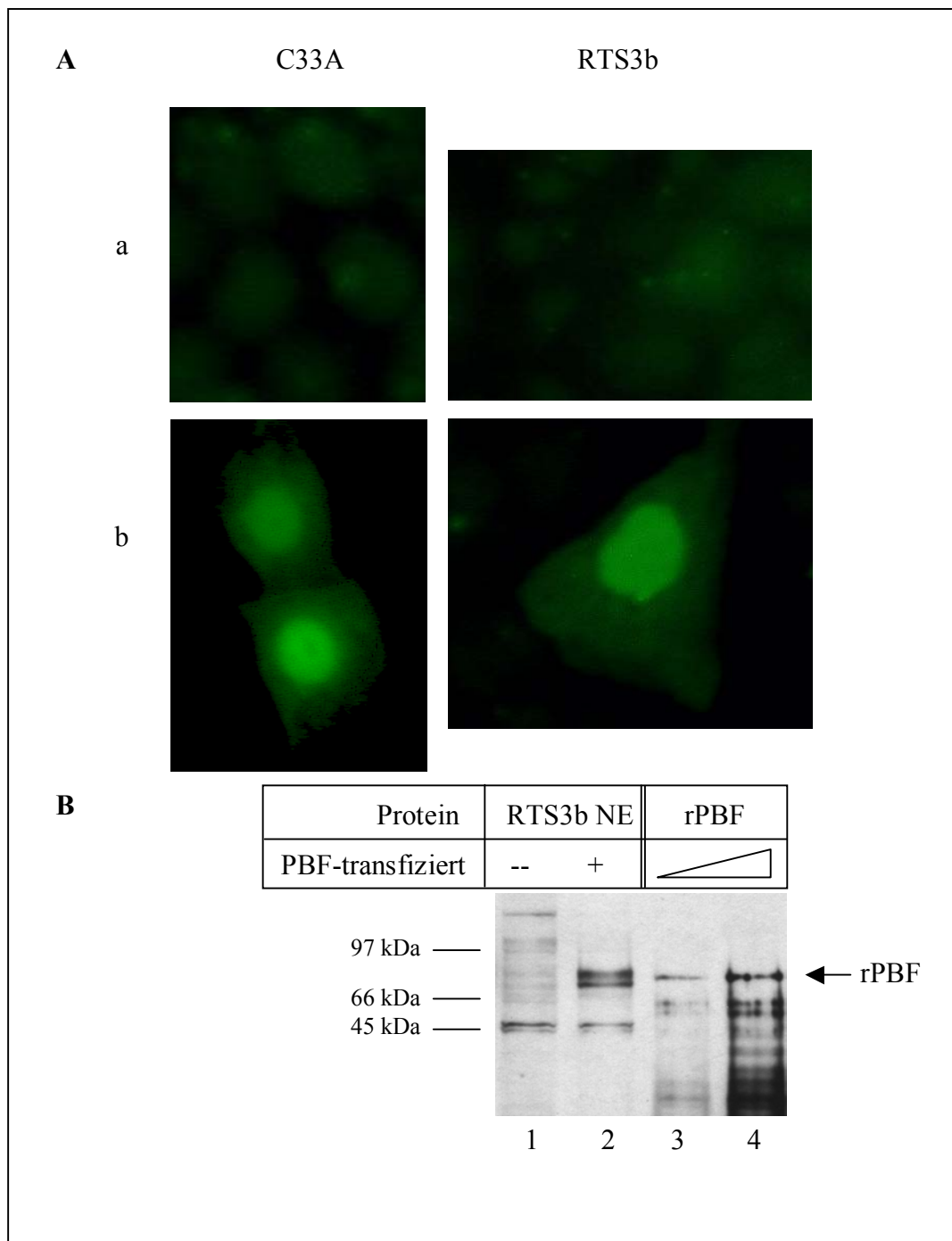


Abb. 6 PBF ist ein nukleäres Protein

(A) Immunfluoreszenztests mit PBF-Antiserum. In der oberen Reihe (a) sind RTS3b- und C33A-Zellen abgebildet, die mit dem pCEP4-Leervektor transient transfiziert worden waren. Die untere Reihe (b) zeigt die gleichen Zelllinien nach Transfektion mit dem PBF-kodierenden Vektor pCEP4/PBF.

(B) Western Blot. 15 µg Kernextrakte (NE) aus untransfizierten (--) und mit einem Expressionsplasmid für PBF transfizierten (+) RTS3b-Zellen (Spuren 1 und 2) wurden auf einer Membran fixiert und mit einer 1:5000-Verdünnung des Antiserums gegen PBF inkubiert. Die Spuren 3 und 4 enthalten rekombinantes PBF (rPBF; mit einem Pfeil markiert) in zwei unterschiedlichen Mengen.

enthielt, wurde als Matrize für eine PCR mit dem PBF-5'/XhoI- und dem PBF3'-Primer, der zu Sequenzen stromabwärts zur BstXI-Schnittstelle komplementär ist, verwendet. Das mit XhoI/BstXI gespaltene Fragment, das für das PBF 5' Ende kodiert, wurde dann in das Plasmid ligiert, so daß ein kompletter PBF-Leserahmen entstand (pXJ41/PBF). Dieser PBF-Leserahmen wurde dann in pCEP4 über NotI/XhoI umklontiert (pCEP4/PBF).

Für den Immunfluoreszenztest wurden C33A- bzw. RTS3b-Zellen mit 50 ng pCEP4/PBF bzw. pCEP4-Leervektor, wie in Methoden beschrieben, transient transfiziert und fixiert. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungen und Permeabilisierung der Zellen, wurden die Ansätze mit einer 1:200-Verdünnung des Antikörpers gegen PBF (α PBF) inkubiert und gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit einem 1:50 verdünnten, an FITC (fluorescein isothiocyanate) gekoppelten Antikörper gegen Kaninchen. In Abb. 6 sind Aufnahmen von Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt. Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert (Abb. 6 (A), Reihe a) oder mit dem Präimmenserum inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt), zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop einen schwach grünen Hintergrund. Zellen, die dagegen mit pCEP4/PBF transfiziert wurden, wiesen eine deutliche Anfärbung des Zellkerns auf (Reihe b). Um einen weiteren Beweis für die Lokalisierung von PBF im Zellkern zu erhalten, wurden aus C33A- und RTS3b-Zellen, die mit pCEP4/PBF oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert worden waren, Kernextrakte (NE) hergestellt, und ein Western Blot mit einer 1:5000-Verdünnung des PBF-Antiserums durchgeführt. In Abb. 6 (B) sieht man zwei zusätzliche Banden in der Spur der transfizierten RTS3b-Zellen (Spur 2), im Vergleich zu den Extrakten aus untransfizierten Zellen (Spur1). Die obere Bande läuft etwas langsamer als rPBF und könnte eine modifizierte Form von PBF darstellen. Da der Histidin-Anhang des rPBF zu einer geringfügigen Verzögerung des Laufverhaltens führt läuft es höher als die zweite Bande, die PBF enthält. Diese Experimente zeigen, daß PBF im Zellkern lokalisiert, wie es für einen Transkriptionsfaktor zu erwarten war.

4.4 Charakterisierung der PBF-Bindestelle

Es konnte bereits früher gezeigt werden, daß r Δ N-PBF nicht an den 5' Bereich der HPV8 E2-Bindestelle P2 (und somit die RUNX1-Bindestelle) bindet, sondern an das 3' Ende (Boeckle, 1998). Mit Hilfe von EMSAs sollte geprüft werden, ob die Bindeeigenschaften des vollständigen rPBF der N-terminal verkürzten Variante r Δ N-PBF entsprechen. Weiterhin sollte die Erkennungssequenz von PBF besser charakterisiert werden. Die in Abb. 7 dargestellten Sequenzen doppelsträngiger Oligonukleotide, die für P2 aus HPV8 (P2TATA)

Oligonukleotide für den EMSA

P2TATA*	5` -	AACCGACCGCAC CCGG TACATAAAAGGTGAGT	- 3`
P2C1	5` -	-----A-----	- 3`
P2C	5` -	----- AA -----	- 3`
P2D	5` -	----- AA -----	- 3`
P2F	5` -	----- T -----	- 3`
P2E1	5` -	-----C-----	- 3`
P2E	5` -	-----CG-----	- 3`

Oligo*	P2TATA*		P2C1*		P2C*		P2D*		P2F*		P2E1*		P2E*	
rPBF	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+	--	+

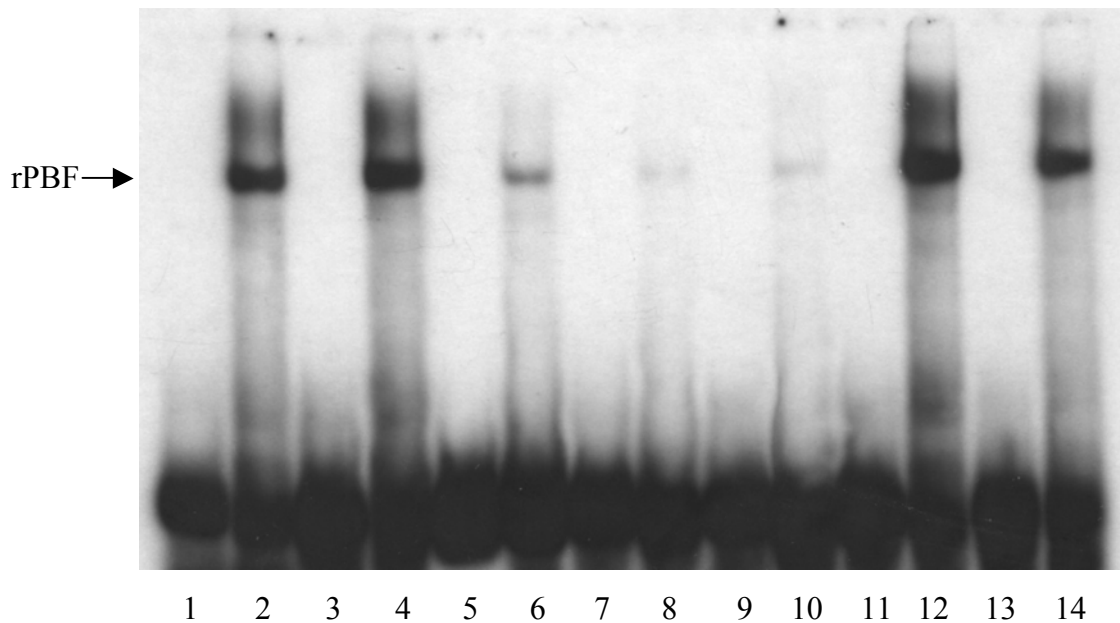


Abb. 7 Rekombinantes PBF bindet an das Sequenzmotiv CCGG

Je 250 pg radioaktiv (*) markierte Oligonukleotide, deren Sequenzen oben angegebenen sind, wurden in Abwesenheit oder in Gegenwart von rPBF inkubiert. Der Pfeil markiert den Komplex aus DNA und gebundenem rPBF. In den Spuren 6, 8 und 10 ist nur eine ganz schwache Bindung von rPBF an die Oligonukleotide P2C, P2D und P2F zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurden die Oligonukleotide P2C1 (Spur 4) und P2E1 (Spur 12) von rPBF gebunden. Die Nukleotide CCGG, die für die PBF-Bindung essentiell sind, wurden in der Sequenzdarstellung durch Fettdruck hervorgehoben.

bzw. für mutierte Versionen von P2 kodierten, wurden mit Polynukleotidkinase und ^{32}P - γ ATP radioaktiv markiert und alleine oder in Anwesenheit von rPBF inkubiert. Die Radiographie zeigt, daß die Austausche in den Oligonukleotiden P2C, P2D und P2F zu einem Verlust der Bindung von rPBF an P2 führten. Hingegen wurden die Oligonukleotide P2C1, P2E1 und P2E noch gebunden, was bedeutet, daß die Nukleotide CCGG essentiell für die Bindung von PBF bzw. ΔN -PBF sind. Das Experiment zeigt, daß die Spezifität der Bindung von PBF durch die N-terminalen 114 Aminosäuren nicht beeinflußt wurde, da beide Formen von PBF an das

gleiche Motiv banden. Gegenüber der während der Diplomarbeit ermittelten Sequenz CCCGGT (Boeckle, 1998), konnten nun die für die Bindung von PBF essentiellen Nukleotide auf CCGG eingeschränkt werden. Aus zeitlichen Gründen konnte hier leider nicht gezeigt werden, daß weitere, der PBF-Bindestelle benachbarte Nukleotide einen Einfluß auf die Bindung ausüben.

4.5 PBF bindet nicht an die methylierte Bindestelle P2

Ein Mechanismus in Eukaryoten Gene transkriptionell zu inaktivieren, beruht auf der Methylierung von CG-Palindromen (^mCpG). Die sogenannten CpG-reichen Inseln, die in Promotornähe liegen, werden im methylierten Zustand spezifisch von Repressorproteinen gebunden, die die Initiation der Transkription hemmen. Gleichzeitig verhindert die Methylierung die Bindung von Transkriptionsaktivatoren in diesem Bereich, weshalb CpG-Inseln vor inaktiven Promotoren häufig methyliert sind (Razin, 1998). Nachdem die zentralen Nukleotide, die von PBF gebunden werden, als CCGG identifiziert wurden, stellte sich die

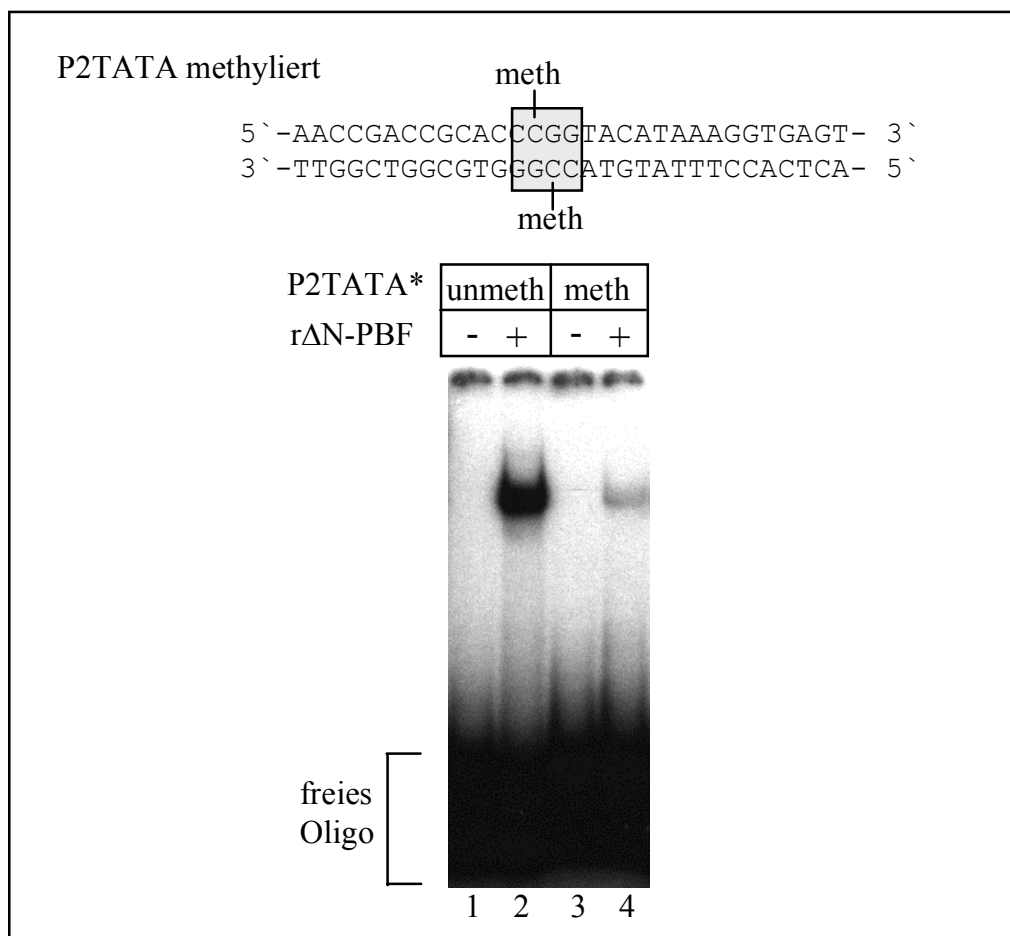


Abb. 8 PBF bindet nicht an methylierte DNA

Der EMSA zeigt die Bindung von rΔN-PBF an Oligonukleotide, die HPV8 P2 nicht methyliert (P2TATA unmeth., Spuren 1 und 2) bzw. mit einem 5-Methyl-Cytosin an Stelle des zweiten Cytosins im CCGG-Motiv (meth., Spuren 3 und 4) enthalten. Es wurden 250 pg Oligonukleotide eingesetzt.

Frage, ob dieses Motiv auch dann von PBF gebunden wird, wenn es CpG-methyliert ist. Der EMSA in Abb. 8 zeigt, daß im Vergleich zu dem von rPBF gebundenen Wildtyp-Oligonukleotid P2TATA (Spur 2), das Oligonukleotid, das ein 5-Methyl-Cytosin anstelle des zweiten Cytosins enthält, nicht in einem Komplex mit PBF vorliegt (Spur 4), d.h. das 5-Methyl-Cytosin verhindert die effektive Bindung von PBF an HPV8 P2. Daraus wird ersichtlich, daß das zweite C im CCGG-Motiv für die spezifische Bindung von PBF an die DNA notwendig ist.

4.6 PBF bildet Dimere oder Multimere

Proteine, die an palindromische Erkennungssequenzen binden, gehen eine stabile Wechselwirkung mit der DNA ein, indem sie in der Regel als Dimere binden. Um zu testen, ob PBF mit sich selbst interagieren kann, wurde der ORF von PBF mittels PCR aus pET14b/PBF amplifiziert und über BamHI in das prokaryote Expressionsplasmid pGEX-2T „in frame“ mit dem offenen Leserahmen der Glutathion-S-Transferase (GST) kloniert. Das bakteriell exprimierte GST/PBF-Fusionsprotein bzw. GST wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und jeweils mit 10 µl ³⁵S-markiertem PBF oder ΔN-PBF inkubiert. In Abb. 9 ist zu sehen, daß radioaktives PBF und ΔN-PBF von GST-PBF präzipitiert wurden (Spuren 2 und 5), nicht aber von GST (Spuren 3 und 6). Um die Qualität der Interaktion abschätzen zu können, wurden zum Vergleich in einer Spur 10 % des eingesetzten *in vitro* Translationsansatzes aufgetragen. In beiden Fällen wurden weit über 10 % der eingesetzten Menge an radioaktiv markiertem Protein gebunden. PBF-Moleküle sind in der Lage *in vitro* miteinander zu interagieren, wobei der N-Terminus für diese Interaktion nicht bzw. nicht ausschließlich verantwortlich zu sein scheint, da auch GST-PBF und ΔN-PBF aneinander gebunden haben.

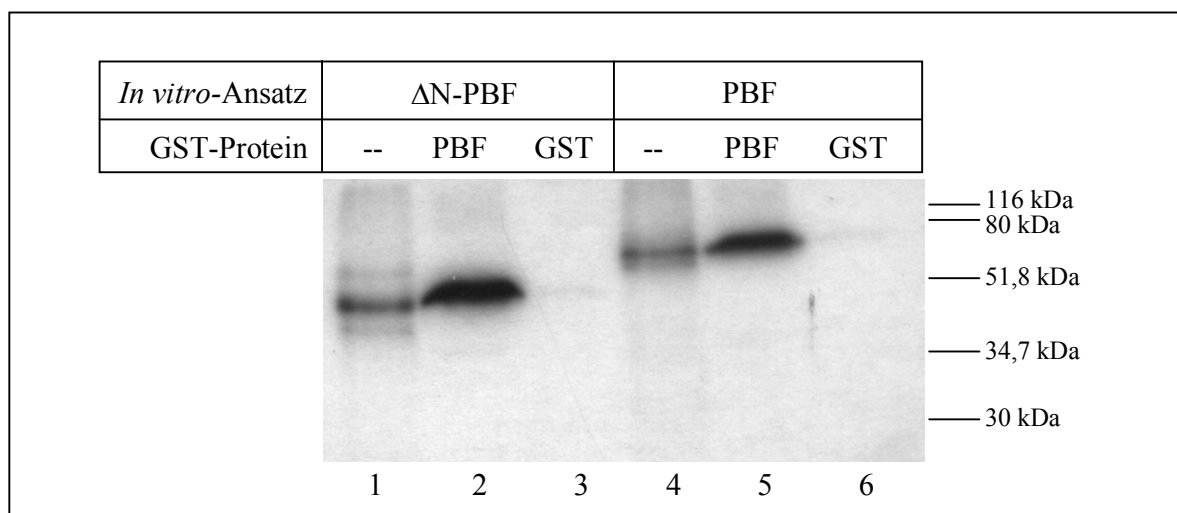


Abb. 9 Die Dimerisierung von PBF-Molekülen

An Sepharose gebundenes GST-PBF (PBF) bzw. GST alleine, als Negativkontrolle, wurde mit *in vitro* translatiertem, radioaktivem PBF oder der N-terminal verkürzten Form (ΔN-PBF) inkubiert. In den Spuren 1 und 4 waren jeweils 10 % der für den Versuch eingesetzten Menge radioaktiven Proteins aufgetragen.

4.7 Die Untersuchung der Rolle des Zinkfingers

Da PBF ein bisher unbekannter Faktor ist und keine Homologien zu bekannten Proteinen aufweist, sollte durch die Mutation des Zinkfingers mehr über die Funktion dieser Protein-

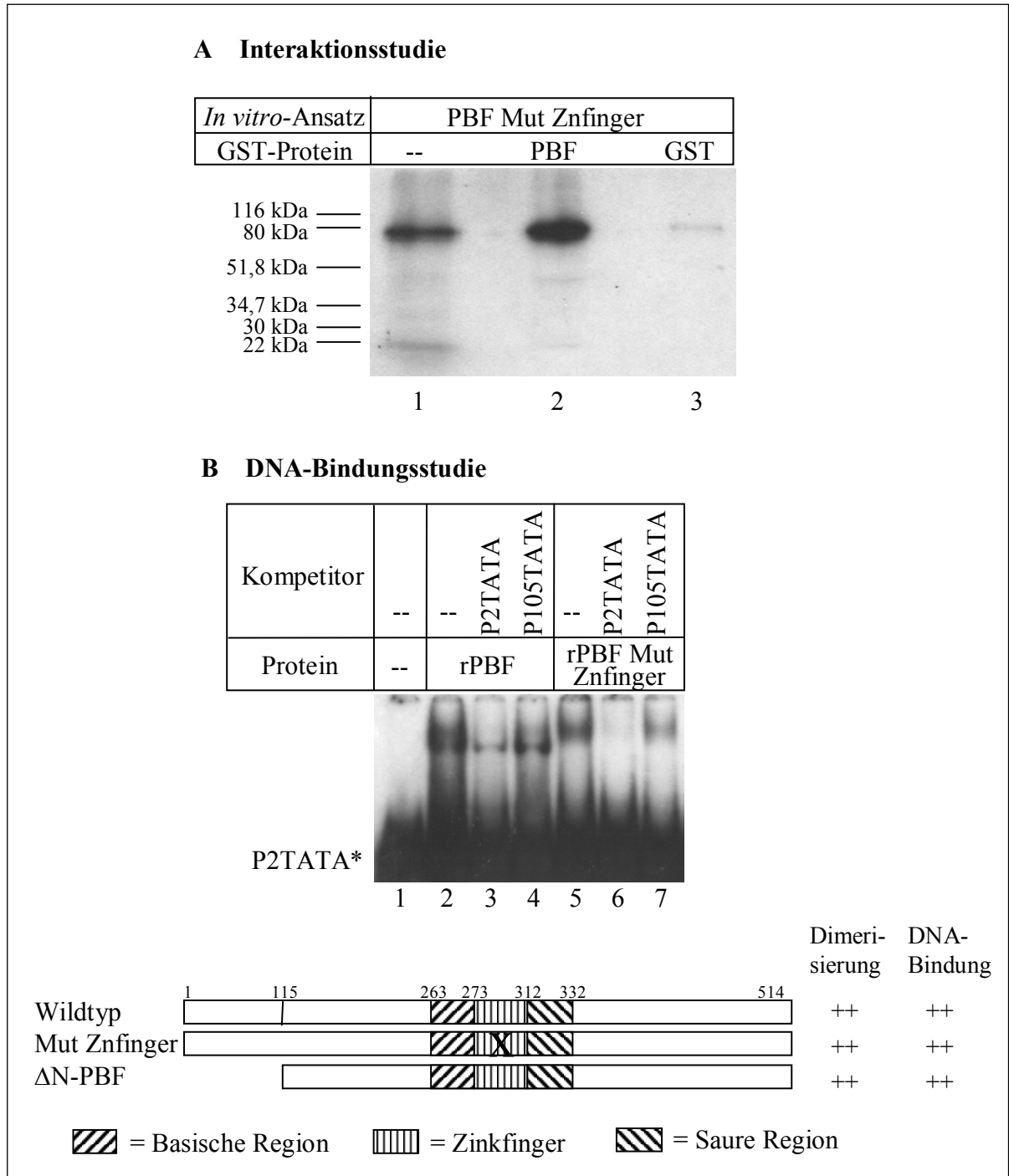


Abb. 10 Die Funktion des Zinkfingers von PBF

(A) Interaktionsstudie. An Sepharose gebundenes GST-PBF (PBF) bzw. GST alleine, als Negativkontrolle, wurden mit der *in vitro* translatierten PBF-Mutante, deren Zinkfingermotiv zerstört wurde (Mut Znfinger) inkubiert. In Spur 1 wurden 10% der für den Versuch eingesetzten Menge radioaktiven Proteins aufgetragen.

(B) DNA-Bindungsstudien. Ein EMSA mit rPBF (Spuren 2-4) und bakteriell exprimiertem, gereinigtem PBF Mut Znfinger (spuren 5-7). Zusätzlich ist die Größe der unterschiedlichen PBF-Formen sowie die Lage des Zinkfingers und der basischen und sauren Region angegeben.

Struktur und über PBF in Erfahrung gebracht werden. Mit Hilfe von *in vitro* Mutagenese und dem Primerpaar PBF/Mut Znfinger A und B wurden die beiden Cysteine an Position 282 und 287 in Alanine umgewandelt und somit eine Ausbildung des Zinkfingers verhindert. Mit dieser *in vitro* translatierten Mutante wurde dann, wie bereits für die Dimerisierung beschrieben, ein Interaktionsversuch durchgeführt (Abb. 10). Demnach hat die Zerstörung des Zinkfingermotivs keinen Einfluß auf die Fähigkeit von PBF zu dimerisieren, was bedeutet, daß die Interaktion nicht oder nicht ausschließlich in diesem Bereich stattfindet. Weiterhin sollte geklärt werden, ob der als DNA-Bindemotiv beschriebene Zinkfinger für die Bindung von PBF an DNA notwendig ist. Hierzu wurde die Deletionsmutante, wie bereits beschrieben, als Histidin-Fusionsprotein in *E. coli* BL21pLysS gebildet und aufgereinigt. Das rekombinante PBF mit dem mutierten Zinkfinger bindet an DNA (Abb. 10). Es ist nicht geklärt, welcher Bereich von PBF für die Dimerisierung bzw. die DNA-bindende Funktion verantwortlich ist, und ob der Zinkfinger eventuell bei anderen Wechselwirkungen eine Rolle spielt.

4.8 PBF und RUNX1 binden gemeinsam an die E2 Bindestelle P2 aus HPV8

Da die Bindestellen von RUNX1 im 5'-Bereich und PBF am 3'-Ende der E2 Bindestelle P2 nicht zu überlappen scheinen, wurde ein EMSA durchgeführt, um zu prüfen, ob beide Proteine gleichzeitig an P2TATA binden können. Limitierende Mengen (50 pg) des radioaktiv markierten Oligonukleotids P2TATA wurden, wie in Abb. 11 dargestellt, mit der α - und/oder β -Untereinheit (UE) von RUNX1 alleine oder in Anwesenheit von r Δ N-PBF inkubiert, und die entstandenen Komplexe im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei der verwendeten α -Untereinheit handelte es sich um eine verkürzte Mutante der PEBP2 α A1-UE, der die inhibitorische Domäne fehlt, so daß sie in der Lage ist, auch ohne die β -UE effizient an DNA zu binden (Spur 3) (Ogawa *et al.*, 1993). In der Radiographie ist zu erkennen, daß die β -Untereinheit (CBF β) alleine nicht in der Lage war, DNA zu binden (Spur 2), sondern daß sie nur mit der α -UE zusammen einen höher laufenden Komplex formte (Spur 4). In Spur 6 wurde deutlich, daß der Komplex aus r Δ N-PBF und P2TATA* nicht von CBF β gebunden wurde. Eine Retardierung des Δ N-PBF-DNA-Komplexes durch die relativ kleine α -UE war nur schwer zu erkennen (Spur 7). Durch die Zugabe von CBF β wurde jedoch eine stärkere Retardierung erzeugt (Spur 8). Dies zeigt, daß die RUNX1 α - UE und CBF β im Komplex mit r Δ N-PBF vorlagen. In Spur 9 ist ein Ansatz aufgetragen, in dem die drei Proteine vor Zugabe des radioaktiv markierten Oligonukleotids mit dem Antiserum gegen PBF (α PBF) inkubiert wurden. Der Antikörper retardierte den Komplex aus r Δ N-PBF und DNA bzw. den höher

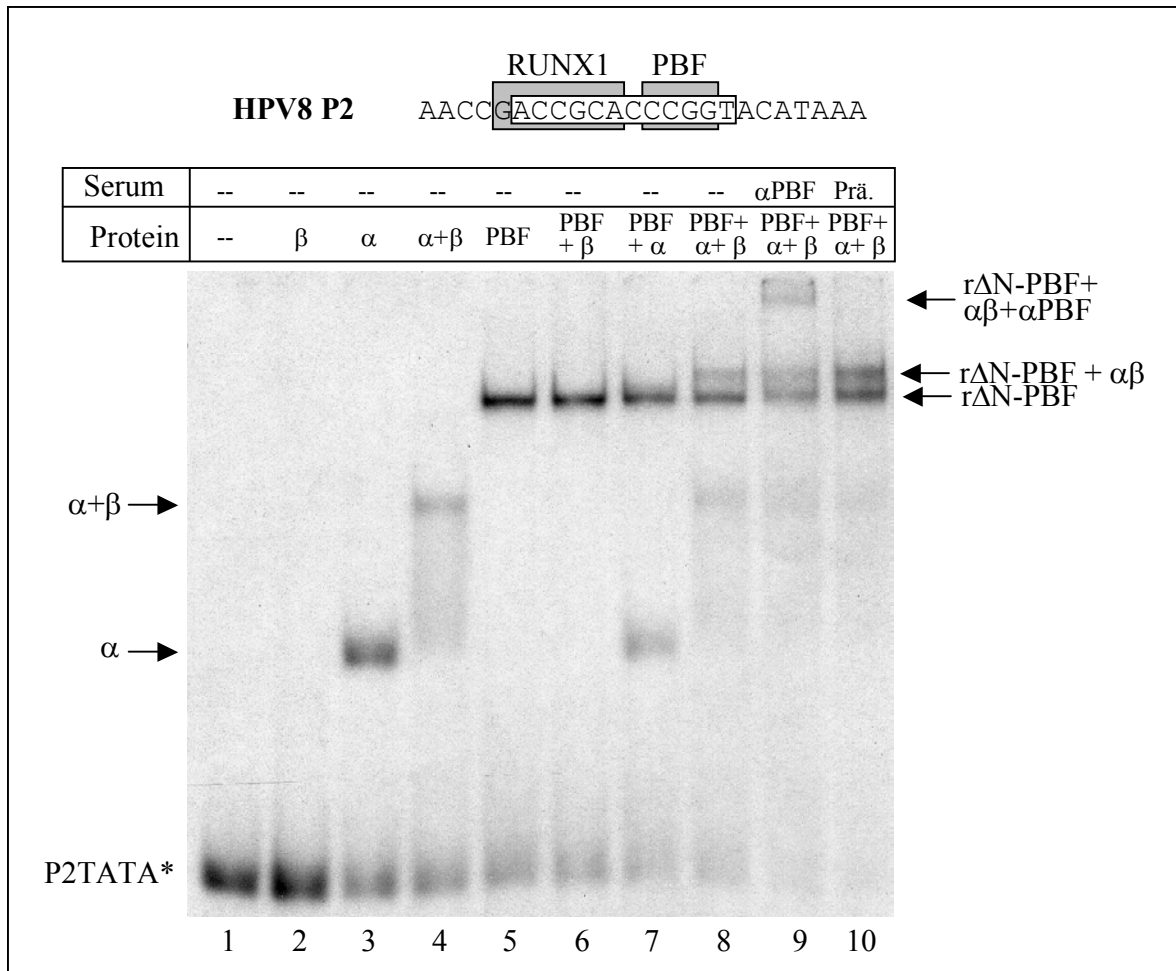


Abb. 11 RUNX1 und rΔN-PBF binden gleichzeitig an P2TATA

50 pg radioaktiv (*) markiertes P2TATA wurden mit der RUNX1 α- Untereinheit (α) und/oder CBFβ (β) in Abwesenheit oder in Gegenwart von rΔN-PBF inkubiert. Die Pfeile markieren die jeweils entstandenen Komplexe. Die β-UE band nicht an DNA (Spur 2). Spur 3 zeigt den Komplex aus P2TATA* und der DNA-bindenden Variante der α-UE (mit einer Deletion der inhibitorischen Domäne), die nach Bindung der β-UE in Spur 4 weiter retardiert wurde. Bei Inkubation von P2TATA mit rΔN-PBF entstand ein Komplex (Spur 5), der minimal höher lief in Gegenwart der α-UE (Spur 7), und der noch weiter retardiert wurde, wenn auch die β-UE hinzugegeben wurde (Spur 8). Nach Inkubation mit dem Antiserum gegen PBF (αPBF) trat ein zusätzlicher Komplex auf (Spur 9), der nicht gebildet wurde, wenn mit dem Präimmunserum (Prä.) inkubiert wurde (Spur 10).

laufenden Komplex, der zusätzlich die α- UE und CBFβ enthält. Das Präimmunserum übte keinen Einfluß auf das Laufverhalten aus (Spur 10). Der EMSA zeigt, daß die RUNX1 α-UE und CBFβ gemeinsam mit PBF an die E2 Bindestelle P2 aus HPV8 binden.

4.9 Mutationen in der HPV8 E2-Bindestelle P2 reduzieren die P₇₅₃₅-Aktivität

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, binden RUNX1 und PBF gemeinsam an die E2-BS P2 aus HPV8. Nun sollte untersucht werden, ob die Bindung beider Faktoren an diese Bindestelle *in vivo* für die Basalaktivität des späten Promotors P₇₅₃₅ von HPV8 notwendig ist. Hierfür wurden die bereits existierenden Luciferase-Reporterkonstrukte 8/P₇₅₃₅-Luc

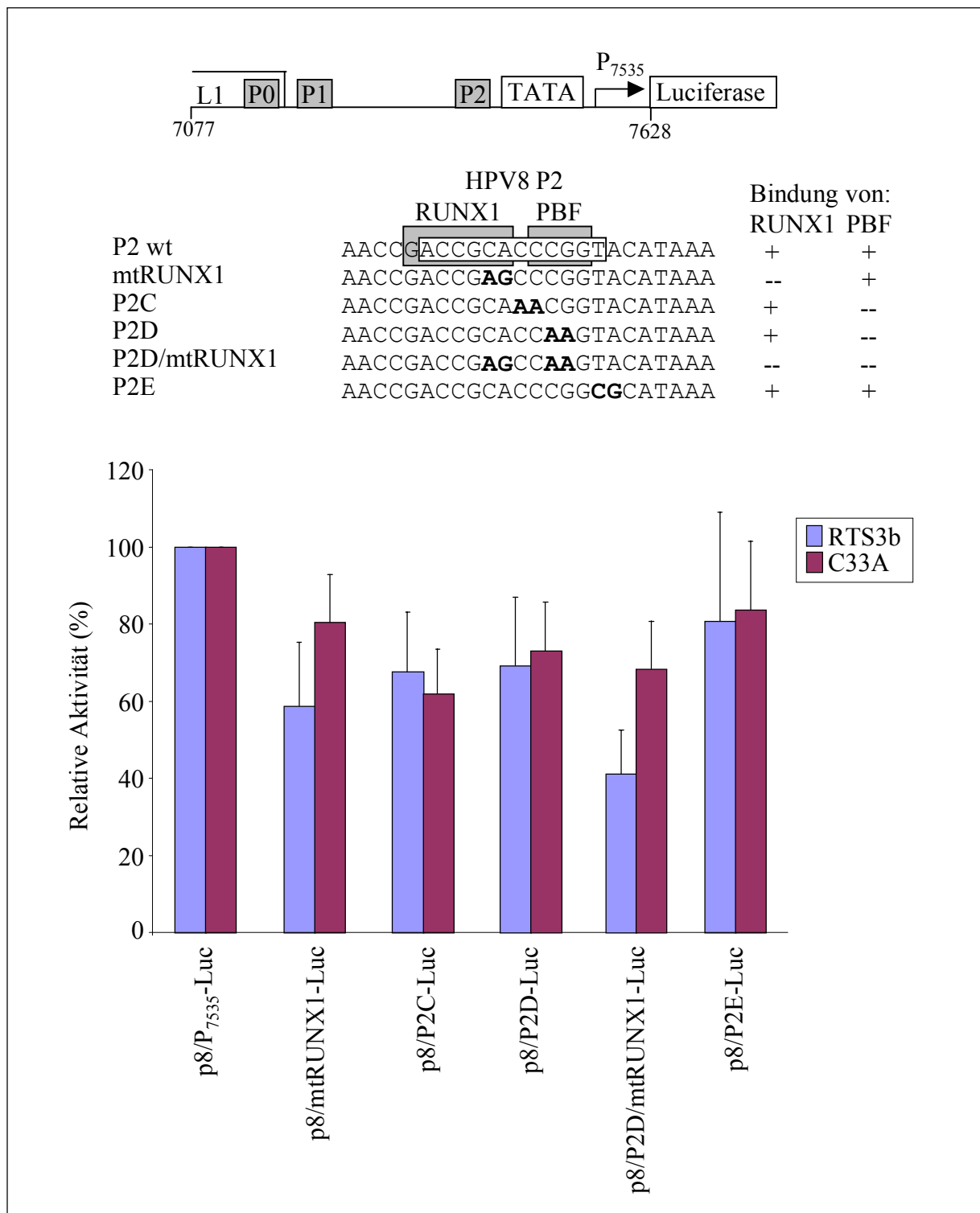


Abb. 12 Mutationen in HPV8 E2-BS P2 reduzieren die P₇₅₃₅-Aktivität

Das skizzierte Reporterkonstrukt p8/P₇₅₃₅-Luc enthält einen Teil der HPV8 NCR mit der E2-BS P2 oder mit den gezeigten Mutationen mtRUNX1, P2C, P2D, P2D/mtRUNX1 und P2E vor der TATA-Box des P₇₅₃₅ und dem Luciferasegen. RTS3b- und C33A-Zellen wurden mit je 300 ng bzw. 2 µg der unterschiedlichen Plasmide sowie 500 ng bzw. 1 µg pRSV-βGal zur Verrechnung der Transfektionseffizienz (RLU/βGal) transient transfiziert. Die relative Aktivität des Wildtyp-Konstruktes wurde als 100 % gesetzt. Die Eigenschaft von rekombinantem RUNX1 bzw. PBF *in vitro* an die einzelnen Oligonukleotide zu binden ist oben angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus acht (RTS3b) bzw. vierzehn (C33A) unabhängigen Transfektionen.

(entspricht: pA7535-Luc; Stubenrauch und Pfister, 1994) und die durch *in vitro* Mutagenese davon abgeänderten Konstrukte p8/P2C-Luc (Stubenrauch *et al.*, 1996), p8/mtRUNX-Luc (pP2MTPEBP, Schmidt *et al.*, 1997), p8/P2D-Luc und p8/P2E-Luc (Boeckle, 1998) für die transiente Transfektion eingesetzt. Wie in Abb. 12 dargestellt, enthält das Reporterplasmid einen Abschnitt der HPV8NCR mit dem P₇₅₃₅ und den E2-Bindestellen P1 und P2, die unmittelbar vor der TATA-Box des späten Promotors lokalisiert ist. Zusätzlich wurde mit Hilfe von *in vitro* Mutagenese ein weiteres Konstrukt erstellt (p8/P2D/mtRUNX1-Luc), in dem die Bindestellen beider Proteine, PBF und RUNX1, in P2 mutiert waren. Die Konstrukte wurden wie in Methoden beschrieben transfiziert, zusammen mit einem β -Galaktosidasekodierenden Plasmid zur Verrechnung der Transfektionseffizienz. Die relative Aktivität des p8/P₇₅₃₅-Luc wurde als 100% gesetzt, und die Aktivitäten der anderen Konstrukte dagegen verrechnet. Das Diagramm in Abb. 12 zeigt die ermittelten Werte aus acht (RTS3b) bzw. vierzehn (C33A) unabhängigen Transfektionen.

Wie schon früher gezeigt, reduzierten die Mutationen in P2 die Basalaktivität des P₇₅₃₅ (Stubenrauch *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Boeckle, 1998). In beiden Zelllinien führten die Mutationen, die *in vitro* einen Verlust der PBF-Bindung zur Folge haben, zu einer Promotoraktivität von etwa 65 % (pP2C) bzw. 70 % (pP2D), während pP2E, an das sowohl RUNX1 als auch PBF binden, über 80 % Aktivität aufwies. Das Konstrukt, das Mutationen in beiden Bindestellen besaß, wurde in RTS3b-Zellen stärker reprimiert (41 %) als in C33A-Zellen (68 %). Auch der Verlust der RUNX1-Bindung führte zu einer geringeren Promotoraktivität, die in RTS3b-Zellen niedriger war (59 %) als in C33A-Zellen (80 %). Zusammenfassend zeigte sich, daß der Verlust der RUNX1- bzw. PBF-Bindung *in vitro* mit einem Absinken der Promotoraktivität *in vivo* korrelierte, wobei die Repression des P₇₅₃₅ durch die Mutation in der RUNX1-Bindestelle in RTS3b-Zellen stärker war als in C33A-Zellen.

4.10 Vergleich der Repression vermittelnden E2 Bindestellen von HPV 8 und BPV 1

Ein Sequenzvergleich der Repression vermittelnden E2 Bindestellen P2 von HPV8 und Bindestelle 1 (BS-1) von BPV1 ist in Abb. 13 dargestellt. Die relative Lage dieser E2 Bindestellen im Verhältnis zum Promotor ist in beiden PV-Typen unterschiedlich, da sie in HPV8 unmittelbar vor der TATA-Box des späten Promotors liegt während sie in BPV1 stromabwärts lokalisiert ist. Beide enthalten die Erkennungssequenz des Transkriptionsfaktors RUNX1 im 5' Bereich und die Nukleotide CCGG an ihrem 3' Ende. In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, daß PBF auch an die Repression vermittelnde E2 BS-1 von BPV1 bindet (Boeckle, 1998).

Nun sollte mittels EMSA geprüft werden, ob die Einführung von Mutationen in das CCGG-Motiv, wie bei HPV 8 P2, einen Verlust der Bindung von rPBF an die BS-1 von BPV1 zur Folge hat. Es wurden die in Abb. 13 dargestellten Oligonukleotide, die für die Wildtypsequenz der Bindestelle (BPV1 E2 BS-1 wt) bzw. für zwei mutierte Versionen (mt3 und mt4) kodierten, eingesetzt. In den Spuren 1-3 sind die ³²P-markierten Oligonukleotide

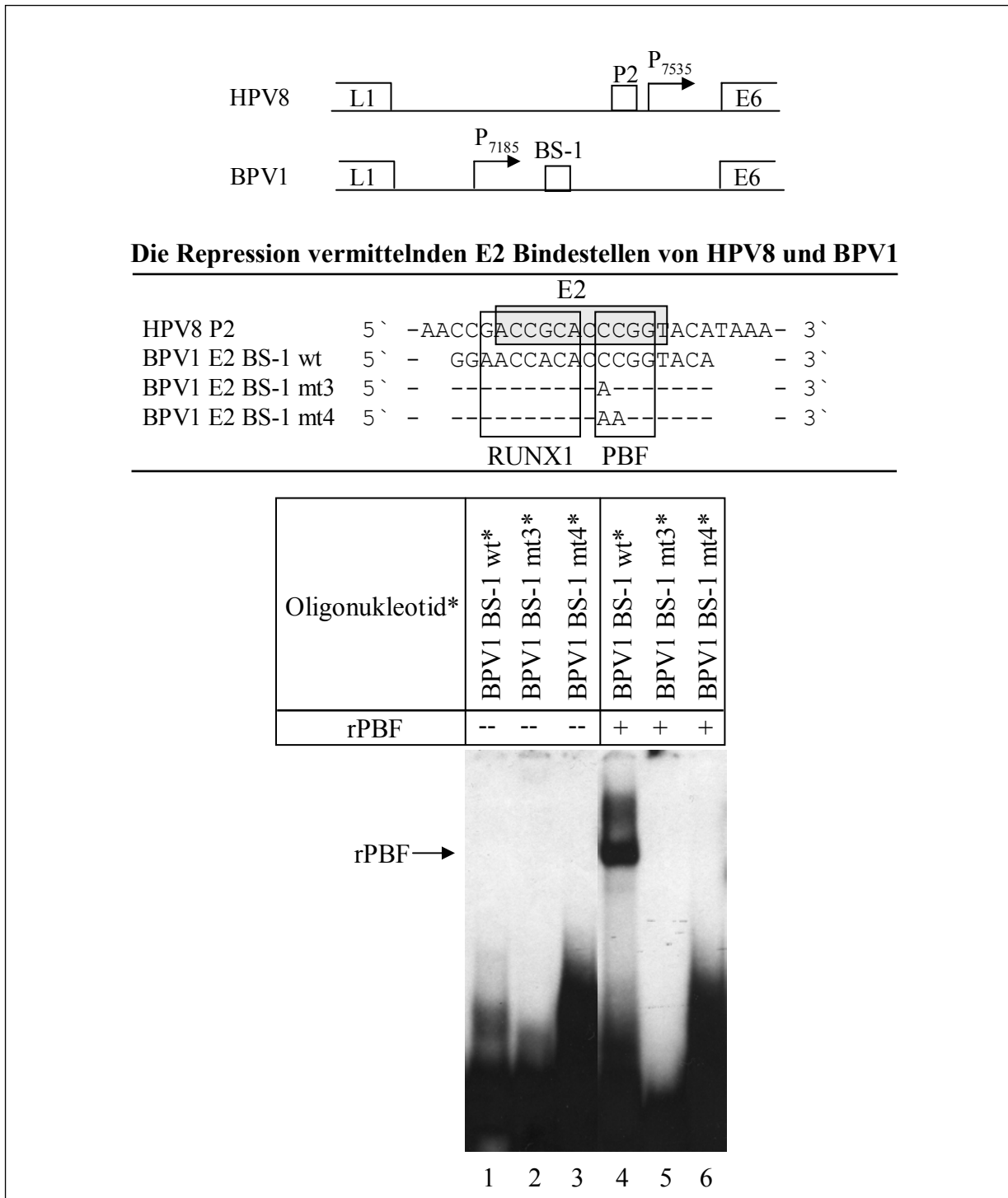


Abb. 13 PBF bindet nicht an BPV1 BS-1 mit Mutationen im CCGG-Motiv

Die Skizze zeigt einen Vergleich der Lage der Repression vermittelnden E2 Bindestellen in HPV8 und BPV1. Für den EMSA wurden je 250 pg radioaktiv (*) markiertes Oligonukleotid mit den oben angegebenen Sequenzen in Abwesenheit (Spuren 1-3) oder in Gegenwart von rPBF (Spuren 4-6) inkubiert. Der Pfeil markiert den Komplex aus rPBF und gebundenem Oligonukleotid.

alleine, in den Spuren 4-6 nach Inkubation mit rPBF zu sehen. Die Radiographie zeigt, daß rPBF an BPV1 E2 BS-1 binden konnte (Spur 4), jedoch die Austausche von C nach A in mt3 (Spur 5) bzw. von CC nach AA in mt4 (Spur 6) einen Verlust der Bindung von rPBF *in vitro* zur Folge hatten. Somit scheint PBF bei BPV1 E2 BS-1 an ähnliche Sequenzen zu binden wie bei HPV8 P2.

4.11 Mutationen im CCGG-Motiv von BPV1 E2 BS-1 reduzieren die P₇₁₈₅-Aktivität

Um zu prüfen, ob der Verlust der Bindung von PBF an BPV1 E2 BS-1 einen Einfluß auf die Aktivität des Promotors P₇₁₈₅ hat, ähnlich wie im Fall von HPV8, wurden die Mutationen, die die Bindung von rPBF an BS-1 *in vitro* verhindern, in ein Reporterkonstrukt eingeführt. Es enthält den Abschnitt der BPV1 LCR von n 7145 bis 7276 inklusive des Promotors an Position 7185 (P₇₁₈₅) und der zum Promotor abwärts gelegenen E2 BS-1 vor dem Luciferasegen. Zur Erstellung der Reporterkonstrukte mit mutierter PBF-Bindestelle (mt4) bzw. (mt1/4), wurde pBPV1/P₇₁₈₅-Luc mit dem Primerpaar BPV-BS1mt4 A und B

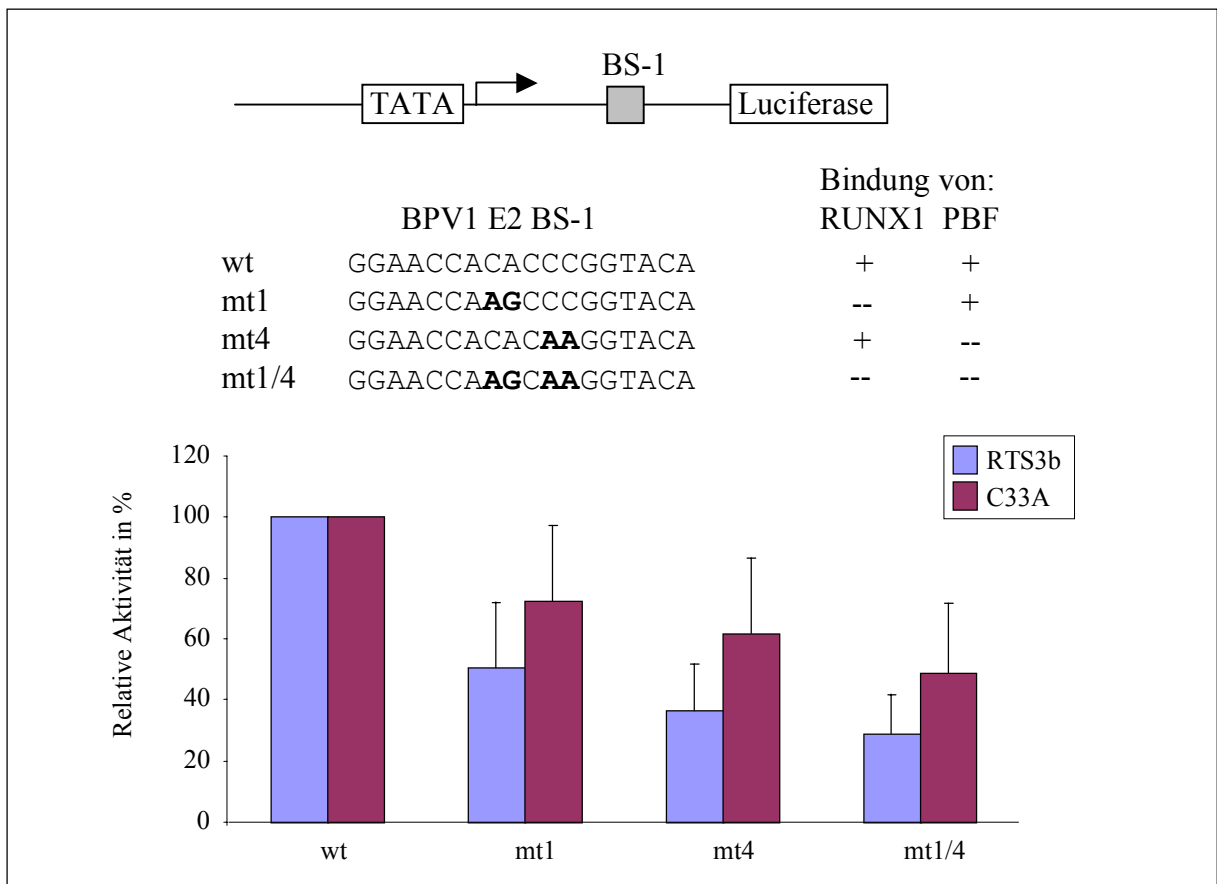


Abb. 14 Mutationen in BPV1 BS-1 reduzieren die P₇₁₈₅-Aktivität

Das oben skizzierte Reporterkonstrukt pBPV1/P₇₁₈₅-Luc mit der BPV1 E2 BS-1 oder mit den mutierten Versionen mt1, mt4 und mt1/4 zwischen dem P₇₁₈₅ und dem Luciferasegen, wurden in RTS3b- und C33A-Zellen transient transfiziert. Die Eigenschaft von rekombinantem RUNX1 bzw. PBF, *in vitro* an die einzelnen Oligonukleotide zu binden, ist oben angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils neun unabhängigen Transfektionen.

pBPV1/P₇₁₈₅ mt4-Luc) bzw. mt1/4 A und B (pBPV1/P₇₁₈₅ mt1/4-Luc) für die *in vitro* Mutagenese eingesetzt. Ein weiteres Konstrukt pBPV1/P₇₁₈₅ mt1-Luc, dessen Mutation im 5'-Bereich der BS-1 die Bindung von RUNX1 verhindert, lag vor (Schmidt *et al.*, 1997). Die Konstrukte wurden jeweils mit konstanten Mengen des Plasmids pRSV-βGal zur Verrechnung der Transfektionseffizienz in die Zelllinien C33A und RTS3b transient transfiziert und die Zellen nach 48 Stunden geerntet. In Abb. 14 sind die Ergebnisse von jeweils neun unabhängigen Transfektionen zusammengefaßt. Die relative Aktivität des Wildtyp-Konstrukts wurde als 100 % festgesetzt, und alle anderen Werte dazu relativiert. In C33A-Zellen sank die Promotoraktivität der RUNX1-bindungsdefizienten Mutante mt1 auf 72 %, die der PBF-bindungsdefizienten Mutante mt4 auf 62 % bzw. mt1/4 auf 49 % der Wildtypaktivität. In RTS3b-Zellen verursachte die Mutation mt1, die *in vitro* einen Verlust der Bindung von RUNX1 zur Folge hat, einen Abfall der P₇₁₈₅-Aktivität auf 50 %. Die Mutationen mt4 und mt1/4 besaßen eine relative Aktivität von 36 bzw. 29 %. Es gibt eine Korrelation zwischen dem Verlust der RUNX1- bzw. PBF-Bindung an BPV1 E2 BS-1 *in vitro*, und einem Absinken der P₇₁₈₅-Aktivität *in vivo*. Die Effekte sind in beiden Zelllinien ähnlich, jedoch ist die Repression in RTS3b-Zellen etwas stärker als in C33A-Zellen.

4.12 BPV1 E2 verdrängt PBF von BPV1 E2 BS-1

Die Bindung von E2 an HPV8 P2 und BPV1 BS-1 führt zur Repression von P₇₅₃₅ und P₇₁₈₅. Es wird vermutet, daß der zugrunde liegende Mechanismus auf der Verdrängung positiv agierender zellulärer Faktoren durch E2 beruht. Da die Bindestellen von E2 und PBF überlappen, wurde ein EMSA durchgeführt (Abb. 15), um zu prüfen, ob PBF durch BPV1 E2 von der E2 BS-1 verdrängt wird. Konstante Mengen an rΔN-PBF wurden zusammen mit 50 pg des radioaktiv markierten Oligonukleotids BPV1 E2 BS-1 wt 10 min vorinkubiert, und anschließend ansteigende Mengen an bakteriell exprimiertem, gereinigtem BPV1 E2 in die jeweiligen Ansätze gegeben. Die Abb. 15 zeigt, daß ansteigende Mengen BPV1 E2 (Spuren 2-5) in der Lage waren an BPV1 E2 BS-1 wt* gebundenes rΔN-PBF (Spur 6) aus seinem Komplex zu verdrängen (Spuren 7-10). Die Bande, die den Komplex aus rΔN-PBF und DNA darstellte wurde bei Zunahme des E2-DNA-Komplexes schwächer. Da keine neue, höher laufende Bande zu sehen war, konnte gezeigt werden, daß PBF und BPV1 E2 nicht gleichzeitig an die DNA binden. Es wäre also möglich, daß PBF auch *in vivo* durch E2 verdrängt wird, und dies zu einer Verringerung der Promotoraktivität führt.

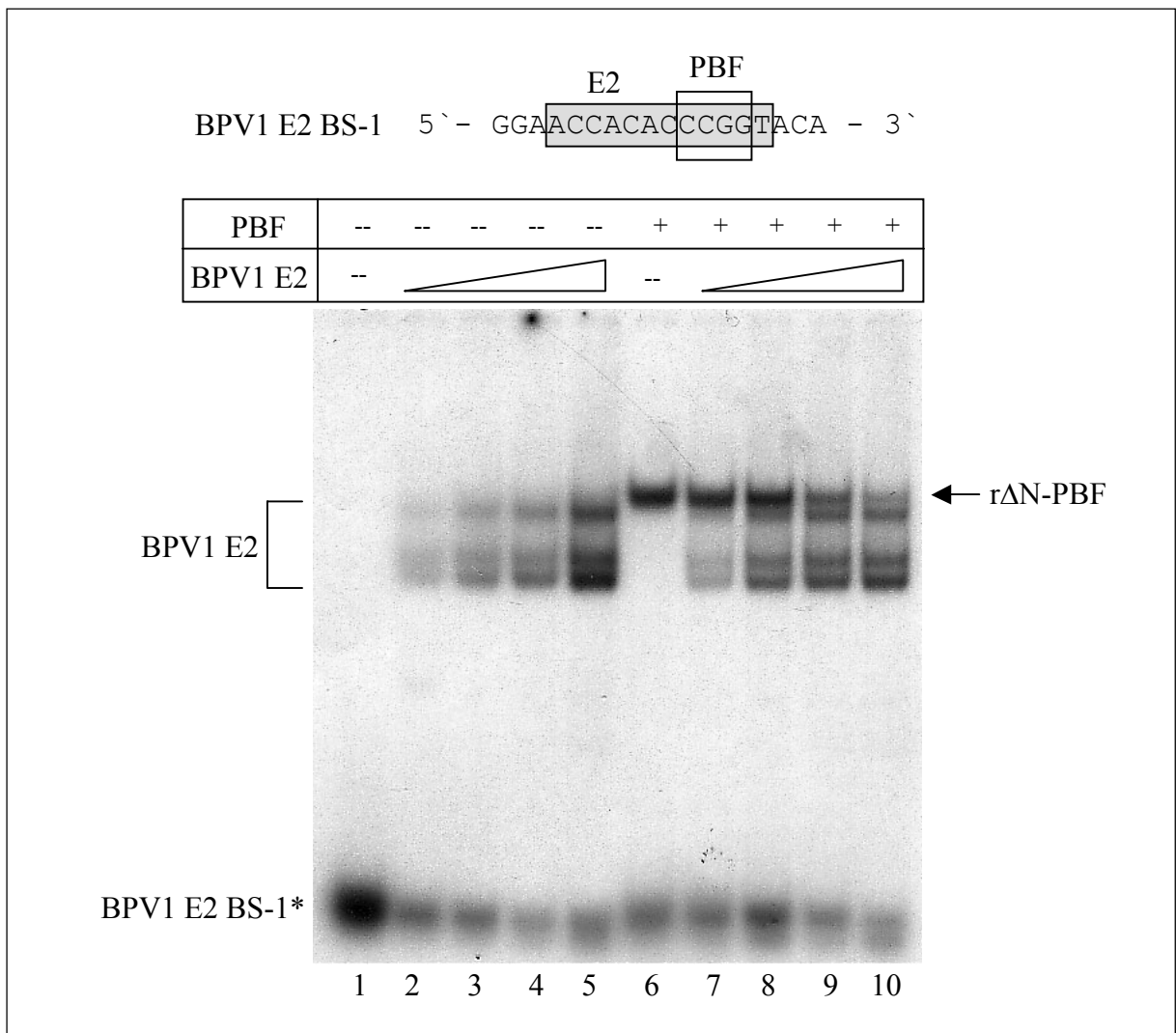


Abb. 15 BPV1 E2 verdrängt rΔN-PBF von BPV1 E2 BS-1

50 pg radioaktiv (*) markierte BPV1 E2 BS-1 wurden mit ansteigenden Mengen bakteriell exprimiertem und gereinigtem BPV1 E2 alleine (Spuren 2-5) oder in Gegenwart einer konstanten Menge an rΔN-PBF inkubiert (Spuren 7-10). Der in Spur 6 gebildete mit einem Pfeil markierte Komplex aus rΔN-PBF und Oligonukleotid, wurde mit Zunahme der E2-Konzentration immer schwächer. Es ist keine zusätzliche, höher laufende Bande zu erkennen.

4.13 Der Nachweis von endogenem PBF

Die Experimente haben gezeigt, daß rekombinantes, gereinigtes PBF an die Repression vermittelnden E2 Bindestellen P2 von HPV8 und BS-1 von BPV1 bindet. Ein Verlust der Bindung *in vitro* korreliert mit einer Reduktion der Promotoraktivität *in vivo*. Um zu prüfen, ob endogenes PBF in den für die Experimente verwendeten Zelllinien vorhanden ist und ob es an P2 bindet, wurde ein EMSA durchgeführt. Hierfür wurden 15 µg NE aus RTS3b-Zellen mit 250 pg des Oligonukleotids mit der Wildtypsequenz von P2 (P2TATA*) sowie mit 200 ng der in Abb. 16 A genannten Oligonukleotide als Kompetitoren inkubiert. In der Radiographie sind zwei unterschiedliche Komplexe zu erkennen: ein schneller migrierender (8/A), der in allen Spuren mehr oder weniger deutlich zu sehen ist, und ein langsamerer (8/B),

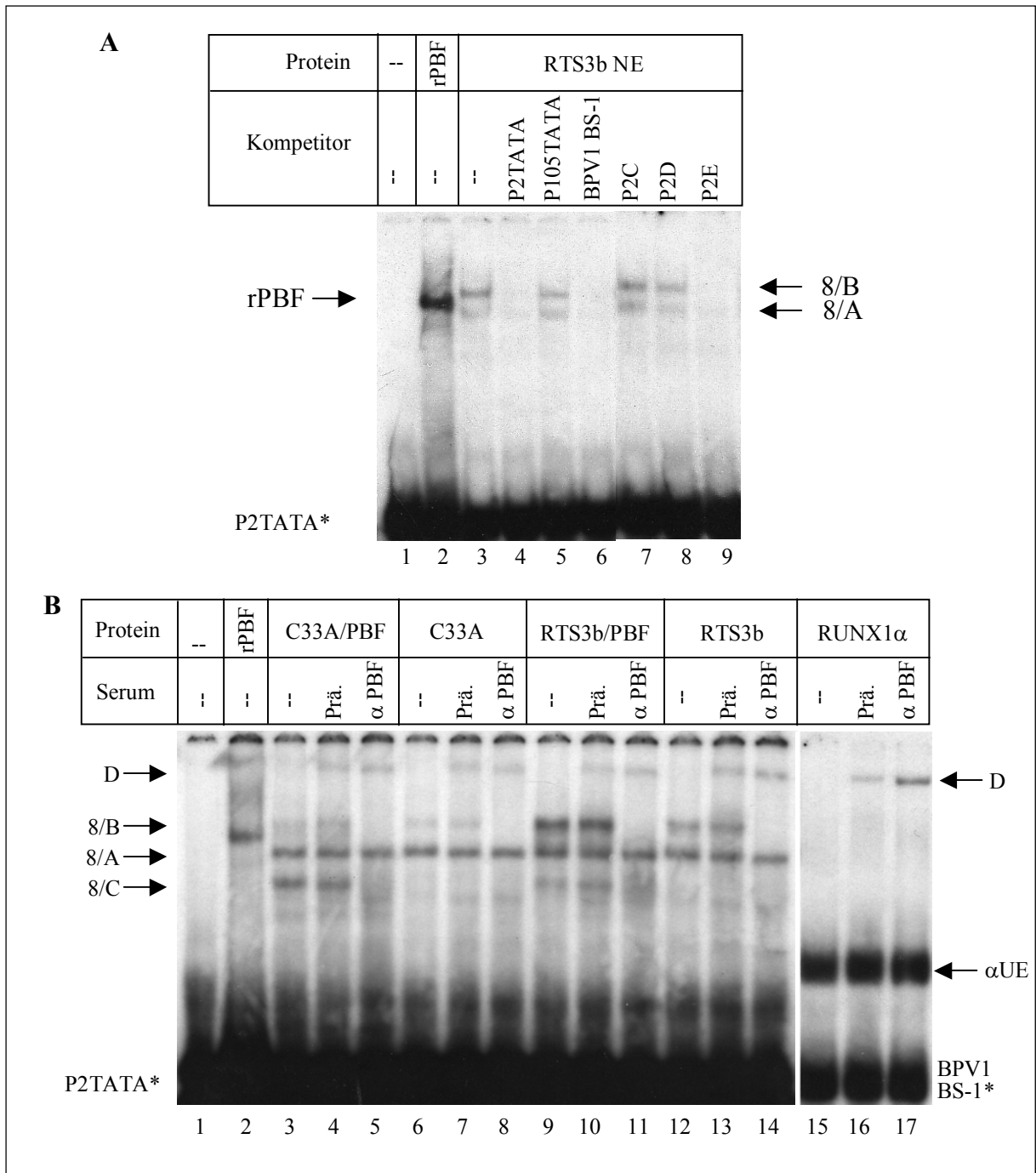


Abb. 16 Endogenes PBF bindet an P2 aus HPV8

(A) 15 μ g RTS3b-Kernextrakte wurden mit P2TATA* und einem 250 fachen Überschuß der angegebenen Kompetitoren (Sequenzen s.a Abb. 7) inkubiert. Spur 2 enthält rPBF. Der PBF-enthaltende Komplex 8/B zeigte das gleiche Wettbewerbsschema wie rekombinantes PBF. Komplex 8/A ist in allen Spuren enthalten, in manchen allerdings nur schwach.

(B) 15 μ g Kernextrakte aus C33A- und RTS3b-Zellen, die mit pXJ41/PBF transfiziert worden waren (/PBF) bzw. untransfizierten Zellen, wurden mit 250 pg P2TATA* und 3 μ l PBF-Antiserum (α PBF) bzw. Präimmunsereum (Prä.) inkubiert. Spur 2 enthielt rPBF. Die Entstehung des Komplexes 8/C (Spuren 3 und 4 sowie 9 und 10) wurde durch α PBF verhindert. Komplex 8/A wurde durch Inkubation mit dem Prä- bzw. Antiserum nicht beeinflusst. Komplex 8/B wurde durch Inkubation mit α PBF spezifisch inhibiert (Spuren 5, 8, 11 und 14). Komplex 8/D ist in allen Ansätzen, die ein Serum enthalten, zu erkennen. Da er auch in den Spuren 15 bis 17, die bakteriell exprimierte, gereinigte Deletionsmutante der RUNX1 α -UE, BPV1 E2 BS-1* sowie das Präimmun- bzw. PBF-Antiserum enthielten, gebildet wurde, ist er auf eine unspezifische Reaktion des Serums zurückzuführen.

der spezifisch kompetiert wurde. Die Identität der unteren Bande ist noch unklar. Die obere Bande weist das gleiche Kompetitionsmuster auf wie ein Komplex aus DNA und rPBF, da die PBF-bindenden Oligonukleotide BPV1 E2 BS-1 wt (Spur 6) und P2E (Spur 9) kompetierten, während die Oligonukleotide P2C und P2D (Spuren 7 und 8) mit Austausch im CCGG-Motiv nicht kompetierten. Um die Anwesenheit von PBF in dem höher laufenden Komplex zu beweisen, wurde ein EMSA mit 15 µg Kernextrakten von Zellen die mit dem Expressionsvektor für PBF (pXJ41/PBF) transfiziert worden waren (C33A/PBF bzw. RTS3b/PBF), und Kernextrakten von untransfizierten C33A- und RTS3b-Zellen durchgeführt. Die Ansätze wurden 15 min mit 3 µl des Präimmunserums (Prä.) bzw. PBF-Immunsersums (α PBF) inkubiert, bevor die radioaktiv markierte DNA zugegeben wurde. In Abb. 16 B sieht man, daß in den Spuren 3 und 4 bzw. 9 und 10 mit Kernextrakten aus C33A/PBF- bzw. RTS3b/PBF-Zellen gegenüber den Kernextrakten aus untransfizierten Zellen (Spuren 6 und 7 sowie 12 und 13) ein zusätzlicher Komplex 8/C zu erkennen ist. Der mit 8/B bezeichnete Komplex, der etwas höher lief als rPBF in Spur 2, ist in den Spuren mit C33A-Kernextrakten schwächer ausgebildet als in denen mit RTS3b-Kernextrakten. Die Ausbildung der Komplexe 8/B und 8/C wurde durch den Antikörper verhindert (Spuren 5, 8, 11 und 14), während die Bande 8/A unverändert blieb. Das Präimmunserum übte keinen Einfluß auf das Laufverhalten der Komplexe 8/A, 8/B und 8/C aus (Spuren 4, 7, 10 und 13). Der als D markierte Komplex trat bei Inkubation sowohl mit dem Präimmun- als auch mit dem Serum auf. Die Negativkontrolle in den Spuren 15-17 mit BPV1 BS-1 wt und der bakteriell exprimierten, gereinigten Deletionsmutante der RUNX1 α -Untereinheit, wies nach Inkubation mit dem Präimmunserum und dem α PBF-Serum ebenfalls eine zusätzliche Bande D auf. Die Ausbildung des, in den Kernextrakten beider Zelllinien nachweisbaren Komplexes 8/B, ließ sich spezifisch durch α PBF inhibieren. Weiterhin war er deutlicher in Kernextrakten aus Zellen, die mit dem PBF-Expressionsvektor transfiziert worden waren. Der Komplex 8/B enthält somit endogenes PBF, das die gleichen Bindungseigenschaften aufweist wie rekombinantes PBF. Der DNA/PBF-Komplex lief langsamer als der Komplex aus DNA und rPBF, was auf einer Modifikation von endogenem PBF (z.B. Phosphorylierung, etc) begründet sein könnte. Ferner könnte PBF zusammen mit einem weiteren zellulären Faktor in diesem Komplex vorliegen. Der Komplex 8/C, der nur mit Kernextrakten aus PBF-Expressionsvektor transfizierten Zellen nachweisbar war, und dessen Bildung ebenfalls durch α PBF verhindert werden konnte, wurde in C33A-Zellen etwas stärker gebildet als in RTS3b-Zellen und lief schneller als rPBF. Er könnte entweder unmodifiziertes PBF oder ein Degradationsprodukt von PBF enthalten.

4.14 Die an BS-1 bindenden zellulären Faktoren sind Aktivatoren der Transkription

Bisher konnte gezeigt werden, daß PBF *in vitro* an HPV8 P2 und BPV1 BS-1 bindet. Mutationen, die die Bindung von PBF *in vitro* verhindern, führen zur Reduktion der

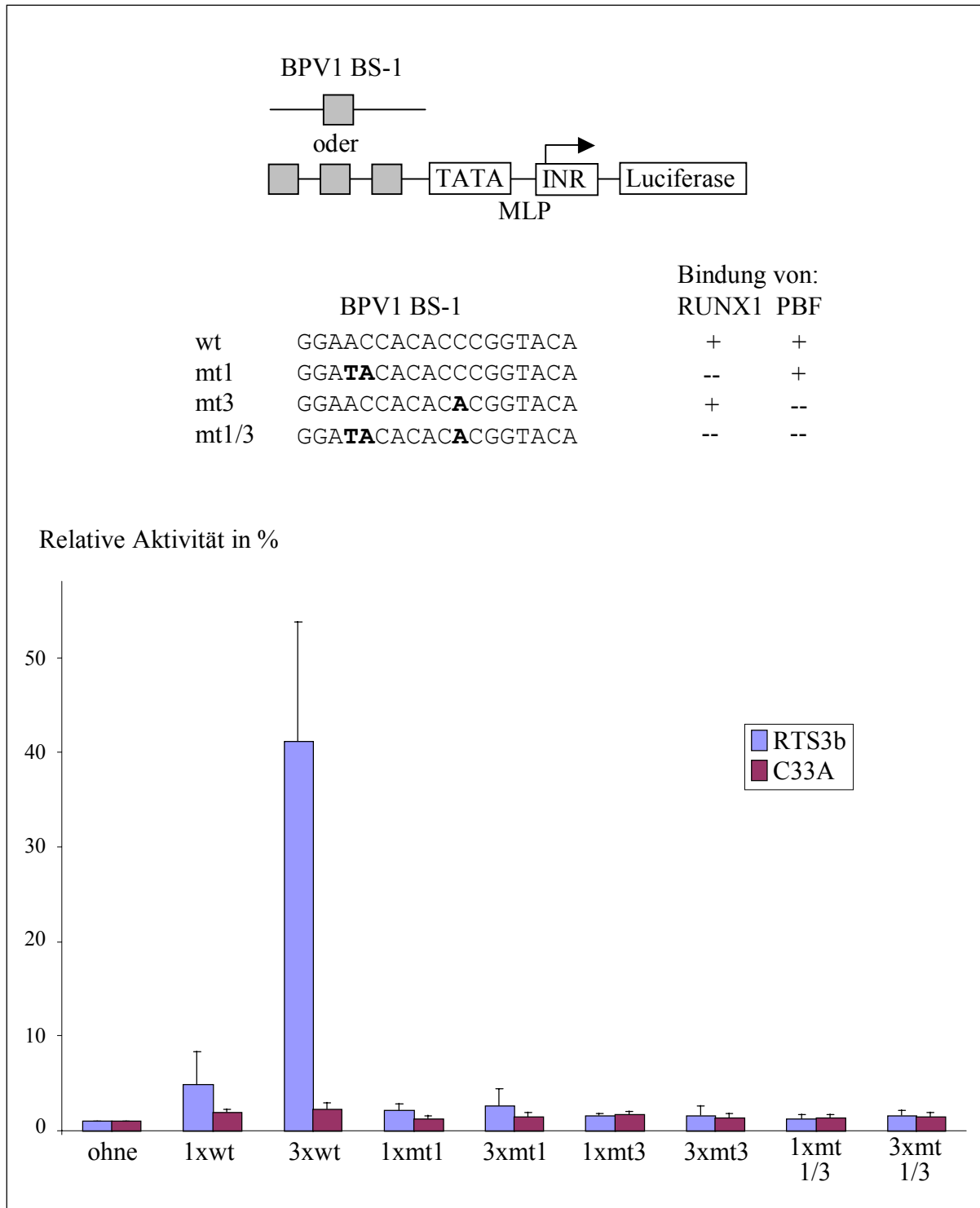


Abb. 17 Die zellulären Faktoren, die an BPV1 BS-1 binden, sind Aktivatoren der Transkription 300 ng der oben skizzierten Reporterkonstrukte mit der BPV1 E2 BS-1, BS-1 mt1, mt3 oder mt1/3 jeweils in einfacher oder dreifacher Anzahl vor dem Adenovirus MLP wurden in RTS3b- und C33A-Zellen transient transfiziert. Die Eigenschaft von rekombinantem RUNX1 bzw. PBF *in vitro* an die einzelnen Oligonukleotide zu binden ist oben angegeben. Die Aktivität des MLP ohne BS-1 wurde als Eins gesetzt.

Promotoraktivität *in vivo*. Es sollte zusätzlich bestätigt werden, daß die zellulären Faktoren, die an P2 und E2 BS-1 binden, Aktivatoren der Transkription sind. Aktivatoren zeigen einen Synergismus in Gegenwart von zwei bzw. mehreren Bindestellen. Oligonukleotide mit der Wildtypsequenz von BPV1 E2 BS-1 bzw. mutierten Versionen davon wurden in ein- oder dreifacher Anzahl vor den minimalen Adenovirus Major Late Promotor (MLP), der die Expression des Luciferasegens (Luc) kontrolliert, kloniert. Die Mutation mt1 verhindert *in vitro* die Bindung von RUNX1 (Schmidt *et al.*, 1997) und mt3 die Bindung von PBF an das jeweilige Oligonukleotid (siehe Abb. 13). RTS3b- und C33A-Zellen wurden mit den Konstrukten transient transfiziert und nach 48h geerntet. Die relative Aktivität eines Konstruktes ohne BS-1 vor dem MLP wurde als Eins gesetzt. In Abb. 17 sind die Ergebnisse aus drei (C33A) bzw. vier (RTS3b) unabhängigen Versuchen zusammengefaßt. In RTS3b-Zellen wurde der MLP durch eine Wildtyp-Bindestelle fünffach aktiviert. Dies erhöhte sich auf 41-fach, wenn drei Kopien der BS-1 vor dem Promotor vorhanden waren. Eine Mutation in der RUNX1-Bindestelle (mt1) verringerte die Aktivierung durch eine Bindestelle auf 2,1-fach bzw. auf 2,6-fach durch drei Bindestellen BS-1 mt1. Eine Mutation im PBF-Bindemotiv führte zu einer 1,5-fach erhöhten Aktivität gegenüber dem Referenzwert, unabhängig von der Anzahl der vorhandenen Bindestellen. Dies zeigt, daß in RTS3b-Zellen, die an BPV1 BS-1 bindenden zellulären Faktoren den Promotor synergistisch stimulieren, wie es für Aktivatoren üblich ist. Der Synergismus ging verloren, sobald eine der beiden Bindestellen mutiert wurde. Dies läßt darauf schließen, daß beide Faktoren, RUNX1 und PBF, für die effiziente Aktivierung des Promotors notwendig sind, und daß RUNX1 oder PBF alleine nicht in der Lage ist zu aktivieren. In C33A-Zellen wurde die Promotoraktivität durch Bindestellen mit Wildtypsequenz etwa zweifach erhöht. Eine Mutation reduzierte dies auf 1,3- bis 1,6-fach. Das bedeutet, daß es in C33A-Zellen nicht zum Synergismus zwischen mehreren Bindestellen kommt. Früher konnte bereits gezeigt werden, dass C33A-Zellen nur geringe Mengen an RUNX1 enthalten (Schmidt *et al.*, 1997). Möglicherweise reichen diese Mengen nicht für eine kooperative Aktivierung mit PBF aus. Eventuell liegen in C33A-Zellen auch geringere Konzentrationen an endogenem PBF vor, die zusätzlich zur Reduktion des Synergismus mit RUNX1 führen.

4.15 PBF bindet an die Repression vermittelnde E2 BS#4 aus HPV16

Die Sequenz CCGG, die von PBF gebunden wird, enthält einen Teil des E2-Palindroms ACCN₆GGT. Ein Sequenzvergleich zeigte, daß es neben HPV8 P2 und BPV1 BS-1 E2-Bindestellen weiterer HPV-Typen gibt, die das CCGG-Motiv enthalten: HPV 16, 26, 42, 52, 54 und 58. Um zu klären, ob PBF auch an eine dieser Bindestellen bindet und ob es einen

konservierten Mechanismus der Repression durch E2 bei den kutanen und die Schleimhaut infizierenden Papillomviren gibt, wurde die Repression vermittelnde Promotor proximale E2 Bindestelle vier (BS#4) von HPV16 untersucht.

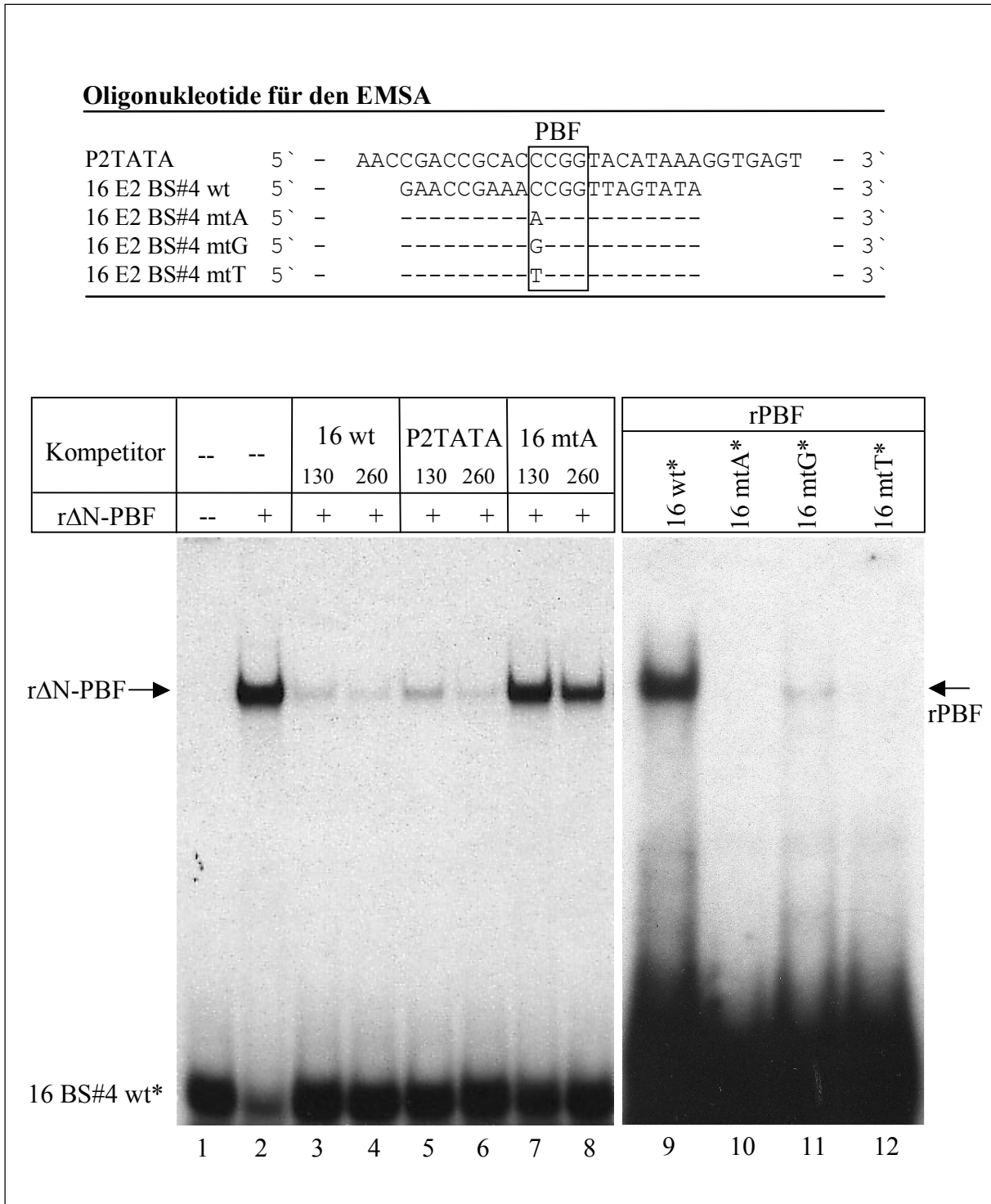


Abb. 18 PBF bindet an HPV16 BS#4

250 pg radioaktiv markiertes Oligonukleotid 16 E2 BS#4 wt wurden mit rekombinantem ΔN-PBF und 200 ng des jeweils angegebenen Kompetitors inkubiert (Spuren 1-8). In den Spuren 9-12 wurden die Ansätze, die jeweils das angegebene radioaktiv markierte Oligonukleotid und rPBF enthielten, aufgetragen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind aufgeführt. Die Pfeile markieren die Komplexe aus DNA und Protein.

Wie in Abb. 18 dargestellt, enthält die BS#4 die Sequenz CCGG im 3`Bereich, aber kein Bindungsmotiv am 5`Ende für RUNX1, wie in P2 und BS-1. Mittels des abgebildeten EMSA konnte gezeigt werden, daß rΔN-PBF *in vitro* an die reprimierende E2 BS#4 von HPV16 bindet (Spur 2). Die Komplex aus rΔN-PBF und BS#4 ließ sich homolog kompetieren (Spuren 3 + 4), wie auch durch P2TATA (HPV8 P2) (Spuren 5 + 6), nicht aber durch das Oligonukleotid 16 E2 BS#4 mtA, das einen Austausch im CCGG-Motiv nach ACGG enthielt (Spuren 7 + 8). Um systematisch zu prüfen, welche Bindestellen von PBF *in vitro* gebunden werden, wurde das erste C des CCGG-Motivs in ein A, G oder T mutiert. Rekombinantes PBF konnte nicht an die radioaktiv markierten 16 E2 BS#4-Mutanten mtA und mtT (Spuren 10 und 12) binden und nur schwach an ein Oligonukleotid mit einem Austausch von C nach G (mtG, Spur 11). Es verhält sich somit wie gegenüber den entsprechenden Mutanten aus HPV8 und BPV1. Zusätzlich zu den E2-BS, die ein CCGG-Motiv enthalten, könnten auch Sequenzen von PBF schwach gebunden werden, die ein GCGG-Motiv enthalten: z.B. HPV 3, 10, 28, 29 und 40. Viele E2-Bindestellen enthalten ein A oder T anstelle des C, so daß PBF dort nicht binden würde.

4.16 Eine Mutation, die die Bindung von PBF an HPV16 E2 BS#4 *in vitro* verhindert, reduziert *in vivo* die P₉₇-Aktivität

Um zu prüfen, ob die Einführung einer Mutation, die den Verlust der Bindung von PBF an BS#4 zur Folge hat, ähnlich wie bei BPV1 E2 BS-1, einen Einfluß auf die Aktivität des Promotors an Position 97 (P₉₇) hat, wurde Mutation mtA, die die Bindung von PBF *in vitro* verhindert, mittels *in vitro* Mutagenese in den Hintergrund der HPV16 LCR eingefügt. Das Plasmid p16LCR-Luc enthält den Promotor P₉₇ stromaufwärts des Luciferasegens (Abb. 19). C33A-, HeLa- und RTS3b-Zellen wurden transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Die relative Luciferase-Aktivität des Wildtyp-Konstruktes wurde auf 100% gesetzt. Im Vergleich dazu erreichte die Mutante p16LCR BS#4 mtA-Luc in den Zelllinien HeLa und C33A eine Aktivität von etwa 80 %, in RTS3b-Zellen von 66 %. Die P₉₇-Aktivität wurde in allen Zelllinien durch die Mutation mtA leicht reduziert.

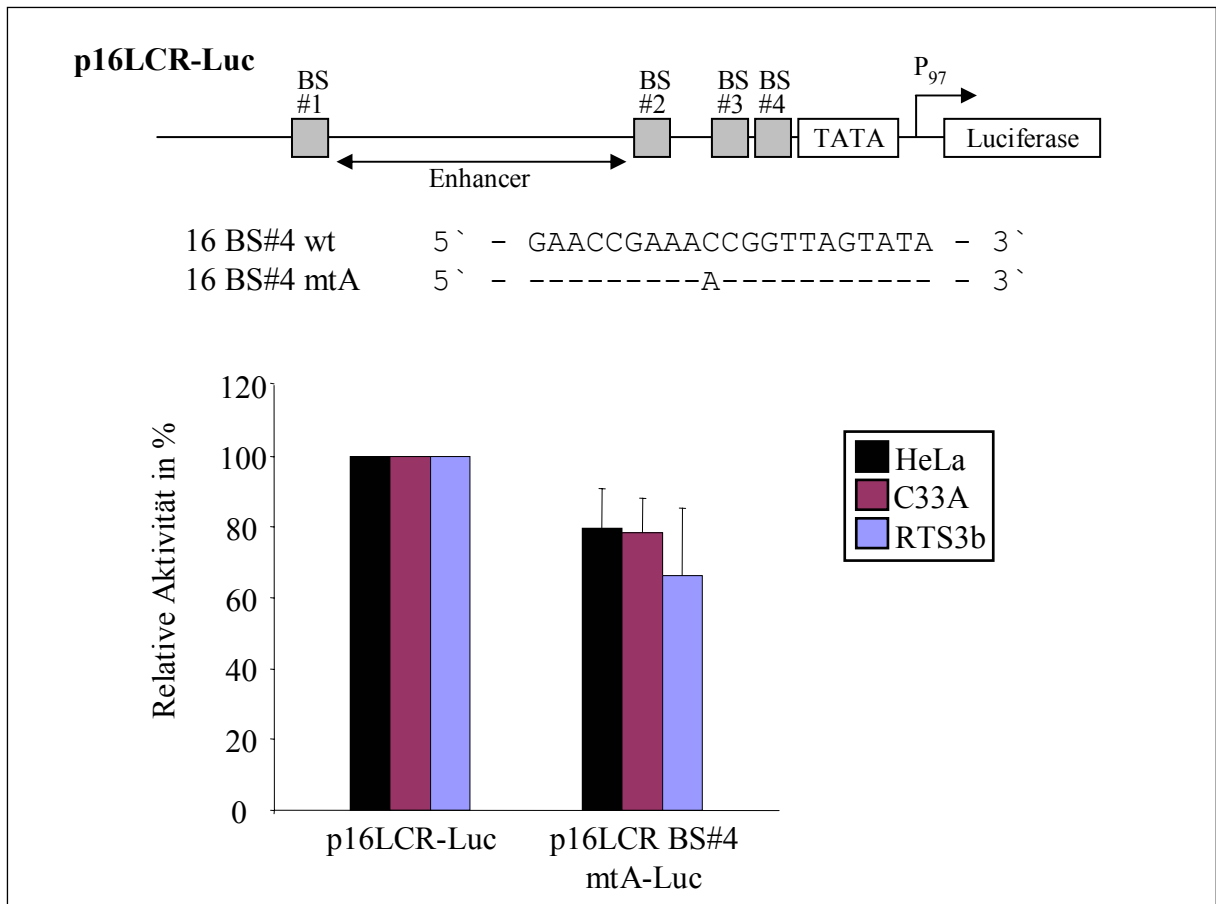


Abb. 19 Eine Mutation, die die PBF-Bindung *in vitro* verhindert, reduziert die P₉₇-Aktivität *in vivo*

Die Konstrukte p16LCR-Luc, die die LCR von HPV16 mit dem Promotor an Position 97 (P₉₇) und vier E2-Bindestellen sowie dem Luciferasegen als Reporter enthalten, wurden in drei verschiedene Zelllinien transient transfiziert. Die relative Aktivität (RLU/βGal) des Promotors im Wildtyp-Konstrukt (wt) wurde als 100 % gesetzt. Die Aktivität des Promotors der Mutante (mtA; mit der *in vitro* getesteten Mutation im CCGG-Motiv der BS#4), wurde dazu in Relation gesetzt.

4.17 Die an HPV16 E2 BS#4 bindenden zellulären Faktoren aktivieren die Transkription

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch an HPV16 E2 BS#4 Aktivatoren binden, die bei einer Multimerisierung der E2 Bindestelle, genau wie bei BPV1 E2 BS-1, Transkription aktivieren. Ein bzw. drei Kopien eines Oligonukleotids, das jeweils für 16 E2 BS#4 mit der Wildtyp-Sequenz bzw. der Sequenz mtA kodierten, wurden wie in Abb. 19 dargestellt, vor den Adenovirus MLP eingefügt, um den Effekt des Verlustes der PBF-Bindung in transienten Transfektionen zu untersuchen. Die Einführung einer Bindestelle, ob mit Wildtyp- oder mutierter Sequenz, bewirkte eine dreifache Aktivierung. Waren drei Wildtypbindestellen vorhanden, wurde der Promotor 19-fach (also mehr als additiv) aktiviert. Drei Bindestellen mtA vor dem MLP vermittelten eine sechsfache Aktivierung, so daß sich diese Bindestellen additiv verhielten.

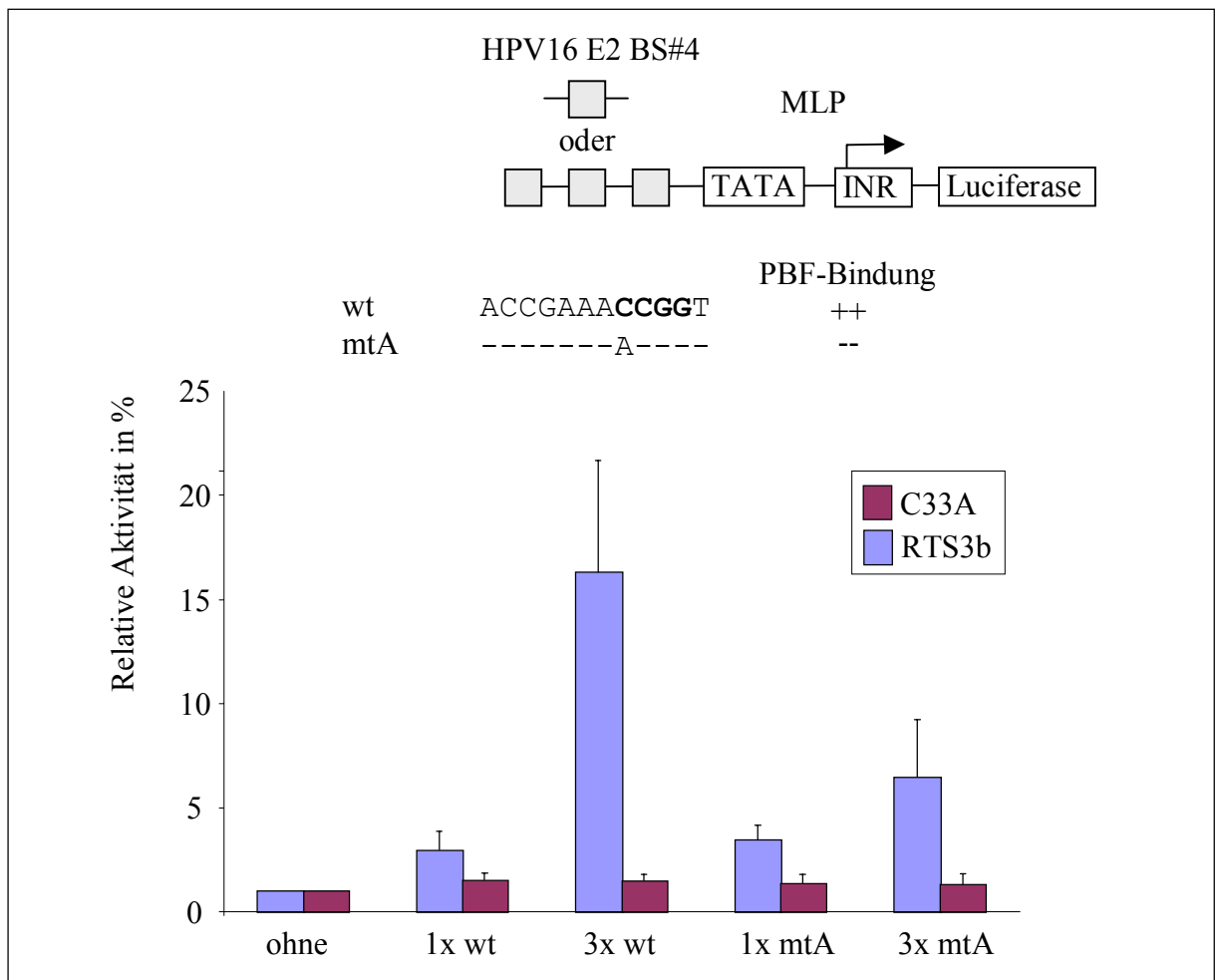


Abb. 20 Zelluläre Aktivoren binden an HPV 16 E2 BS#4

Ein Oligonukleotid, das für die HPV16 E2 BS#4 (wt) kodiert oder einem Austausch von C nach A im CCGG-Motiv (mtA) enthält, wurde in ein- oder dreifacher Kopie vor den MLP aus Adenovirus kloniert. Die Konstrukte wurden zusammen mit einem β Gal-kodierenden Plasmid in C33A- und RTS3b-Zellen transient transfiziert. Die relative Aktivität (RLU/ β Gal) des Konstrukts ohne BS wurde als Eins gesetzt und die Aktivitäten der anderen Konstrukte dazu in Relation gesetzt. Der Durchschnittswert wurde aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt. Die Bindeeigenschaften von rPBF an die Oligonukleotide sind angegeben.

In C33A-Zellen hatten die Bindestellen keine Auswirkung auf den Promotor. So ergab die Einführung einer oder dreier Bindestellen zwar eine leicht erhöhte Aktivität des MLP, im Fall der Wildtypsequenz um 1,5-fach und bei der Mutante 1,3-fach, jedoch traten kaum Unterschiede in Gegenwart einer oder dreier Bindestellen auf. Weiterhin hatte die Einführung der Mutation keinen Einfluß. Somit war die Aktivierung in C33A-Zellen wesentlich schwächer als in RTS3b-Zellen, und ein Synergismus zwischen drei benachbarten Bindestellen konnte nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Korrelation zwischen der Bindung von PBF *in vitro* und einer synergistischen Aktivierung mehrerer E2 BS#4 in RTS3b-Zellen besteht. Der Verlust der Bindung durch mtA führte zu einer

Schwächung, jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der Kooperativität zwischen drei Bindestellen, im Gegensatz zu BPV1 E2 BS-1, bei der die Promotoraktivität in Konstrukten mit einer und drei mutierten Bindestellen gleich war. Somit gibt es wohl einen Unterschied bei der Bindung von zellulären Faktoren an 16 E2 BS#4 und BPV1 E2 BS-1 bzw. HPV8 P2.

4.18 Endogenes PBF bindet an HPV16 BS#4

Nun sollte mit Hilfe eines EMSA geprüft werden, ob endogenes PBF an die HPV16 BS#4 bindet. In Abb. 21 erkennt man nach Inkubation von HPV16 BS#4* mit RTS3b-NE eine schwache Bande, 16/A, die in allen Ansätzen unverändert blieb, und eine deutliche Bande, 16/B (Spur 1). Der Komplex 16/B blieb nach Zugabe des Präimmunsersums unverändert (Spur 2). Durch die Inkubation mit dem PBF-Antiserum wurde er schwächer, und ein neuer Komplex, 16/C, entstand. Das PBF-Antiserum beeinflusste den Komplex spezifisch, womit gezeigt wurde, daß endogenes PBF an HPV16 BS#4 bindet. Da sich der Komplex nach Zugabe des Antiserums lediglich veränderte und nicht auflöste, könnte noch ein weiterer Faktor mit PBF in 16/B vorliegen.

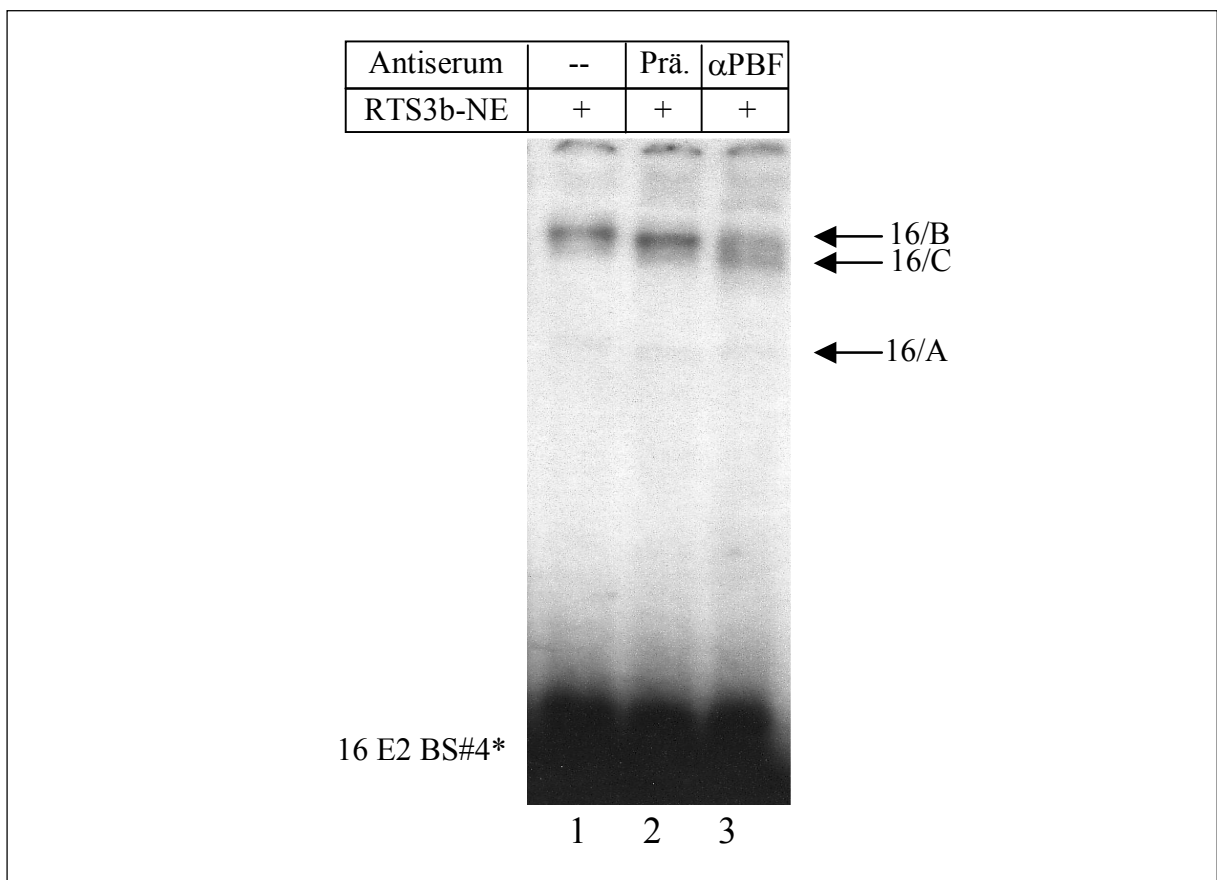


Abb. 21 Endogenes PBF bindet an HPV16 E2 BS#4

250 pg radioaktiv markiertes Oligonukleotid HPV16 E2 BS#4 wurden mit 11 μ g RTS3b-NE und 2 μ l unverdünntem PBF-Antiserum (α PBF) bzw. Präimmunsersum (Prä.) inkubiert. Die entstandenen Komplexe wurden als 16/A, 16/B und 16/C bezeichnet. Durch die Zugabe von α PBF wurde die Ausbildung des Komplexes 16/B vermindert.

4.19 Untersuchungen zur Rolle von PBF bei der Regulation der Transkription

Um direkt zu prüfen, ob der während dieser Arbeit klonierte ORF für einen Faktor kodiert, der an die E2 Bindestelle bindet, und dort einen Einfluß auf die Transkription hat, wurden ansteigende Mengen eines PBF-Expressionsvektors zusammen mit einem Reporterkonstrukt transient transfiziert. In Abb. 22 (A) ist exemplarisch ein Transfektionsergebnis mit dem pBPV1/3xBS-1wt/MLP-Konstrukt und zunehmenden Mengen an pXJ41/PBF in RTS3b-Zellen dargestellt. Neben einer 4,2-fachen Repression der Luciferase-Werte durch den Leervektor pXJ41 alleine, wurde auch die Expression des β Gal-kodierenden Plasmids pRSV- β Gal, um die Hälfte reprimiert. Wurden zu den Ansätzen ansteigende Mengen pXJ41/PBF gegeben, so sank der Luciferase-Wert um das 391-fache und die β -Galaktosidasewerte um das 24-fache.

Um den Einfluß von PBF in einem anderen Kontext zu untersuchen, wurden die Reporter p16/3xBS#4wt/MLP bzw. mtA, die *in vitro* PBF-bindungsdefiziente Mutante, eingesetzt. Damit der Effekt der Repression, der durch die Konkurrenz von Transkriptionsfaktoren um die in den transient transfizierten Expressionsvektoren vorhandenen Promotoren entsteht, ausgeglichen wird, wurden in allen Ansätzen die gleichen Vektormengen eingesetzt (Abb. 22 B). Zum Abgleich der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pSV40- β Gal (mit dem SV40-Promotor vor dem lacZ-Gen) eingesetzt. In Abb. 22 C ist der Mittelwert aus fünf unabhängigen Kotransfektionen von RTS3b-Zellen mit dem genannten Reporterplasmid und 0, 12,5 bzw. 25 ng PBF/pCEP4 (jeweils auf 25 ng mit dem pCEP4-Leervektor aufgefüllt) dargestellt. Das Wildtypkonstrukt wurde durch die Kotransfektion von 12,5 ng PBF/pCEP4 leicht aktiviert, während dies bei der Mutante nach Zugabe gleicher Mengen an PBF-kodierendem Plasmid nicht zu erkennen war.

4.20 PBF vermittelt Repression

Um zu überprüfen, welchen Effekt PBF unabhängig von seiner DNA-bindenden Eigenschaft auf einen Promotor ausübt sollte PBF fusioniert an die Gal4-DBD in Zellen exprimiert und der Einfluß auf ein Reporterkonstrukt gemessen werden. Hierfür wurde der ORF von PBF mittels PCR amplifiziert, und das entstandene Fragment mit den Enzymen EcoRI und XhoI gespalten. Über die Schnittstellen EcoRI und Sall wurde das Fragment in den eukaryoten Expressionsvektor pM ligiert, um den ORF für PBF an das 3`Ende des ORF für die Gal4-DBD zu fusionieren (pM/PBF). Ansteigende Mengen dieses Konstruktes wurden in RTS3b-Zellen zusammen mit pG5Luc, das fünf Kopien der Gal4-Bindestelle vor dem E1b-Promotor besitzt, transient transformiert. Die Anzahl der Zellen in den einzelnen Ansätzen wurde nach

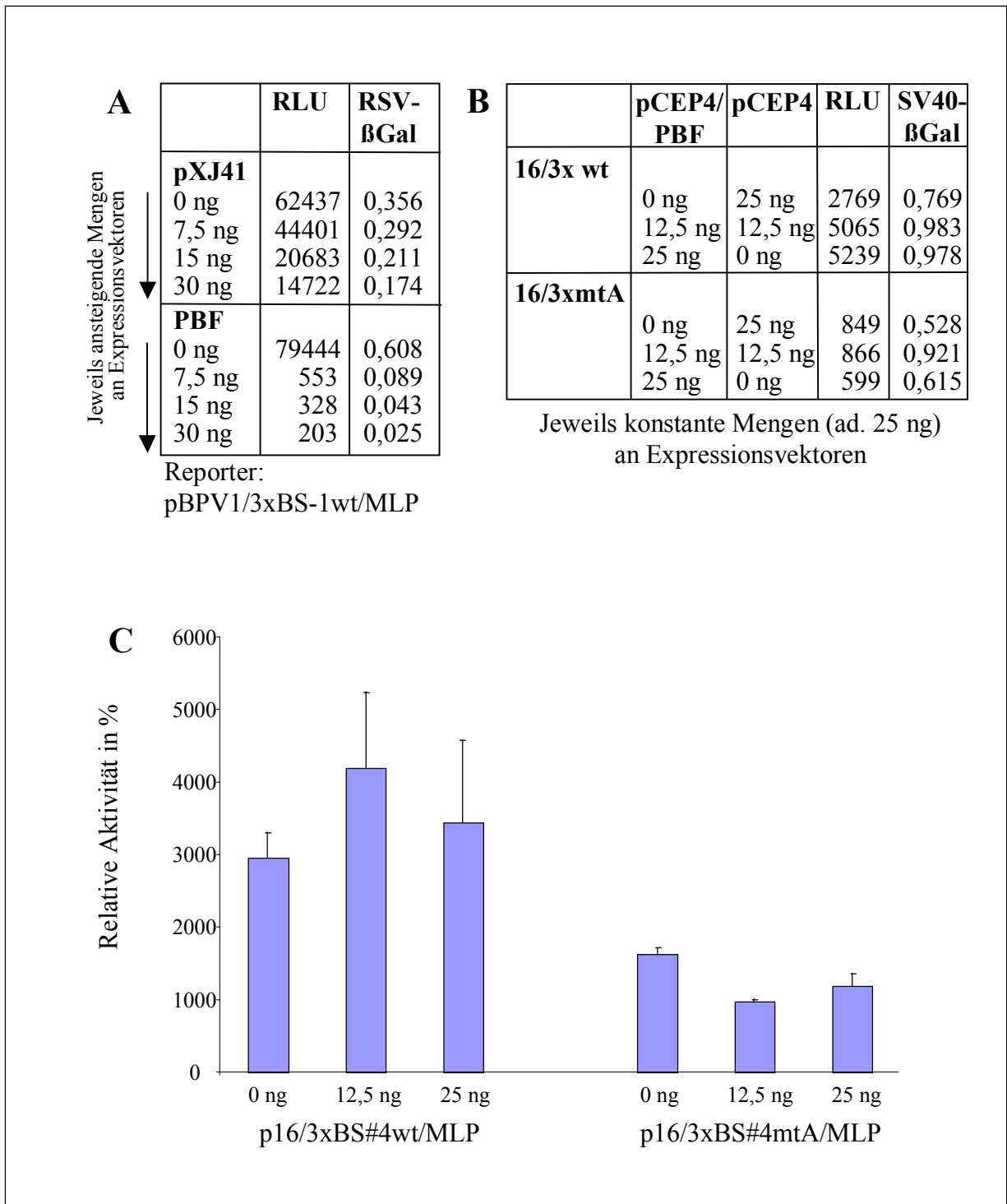


Abb. 22 Überexpression von PBF

(A) Die Tabelle zeigt die β Galaktosidase- und RLU-Werte einer Transfektion mit pBPV1/3xBS-1wt/MLP und ansteigenden Mengen pXJ41/PBF bzw. pXJ41 in RTS3b-Zellen. Die β Gal-Expression, unter Kontrolle des RSV-Promotors, wurde von pXJ41 um die Hälfte reprimiert, der Luciferase-Wert sank um das 4,2fache. pXJ41/PBF reprimierte die β Galaktosidase-Aktivität um das 24fache, die RLU-Werte sanken um das 391fache.

(B) In der Tabelle sind die Werte einer Kotransfektion von p16/3xBS#4wt/MLP bzw. mtA mit PBF/pCEP4 bzw. dem Leervektor pCEP4 aufgeführt. Der Ausgleich der Transfektionseffizienz wurde durch Kotransfektion mit pSV40- β Gal ermittelt.

(C) Mittelwert aus fünf unabhängigen Kotransfektionen von RTS3b-Zellen mit p16/3xBS#4wt/MLP bzw. mtA und den angegebenen Mengen an pCEP4/PBF. Zur Verrechnung der Transfektionseffizienz wurde SV40- β Gal eingesetzt.

der Zellernte durch Proteinbestimmung relativiert. In Abb. 23 ist gezeigt, daß sich mit ansteigenden Mengen an Gal4-DBD/PBF eine zunehmende Repression entwickelte, so daß die Werte bis auf 4 % der Wildtypaktivität sanken. Dieses Experiment deutet darauf hin, daß PBF als Repressor der Transkription auftreten kann. Allerdings ist unklar über welchen Mechanismus die Regulation geschieht.

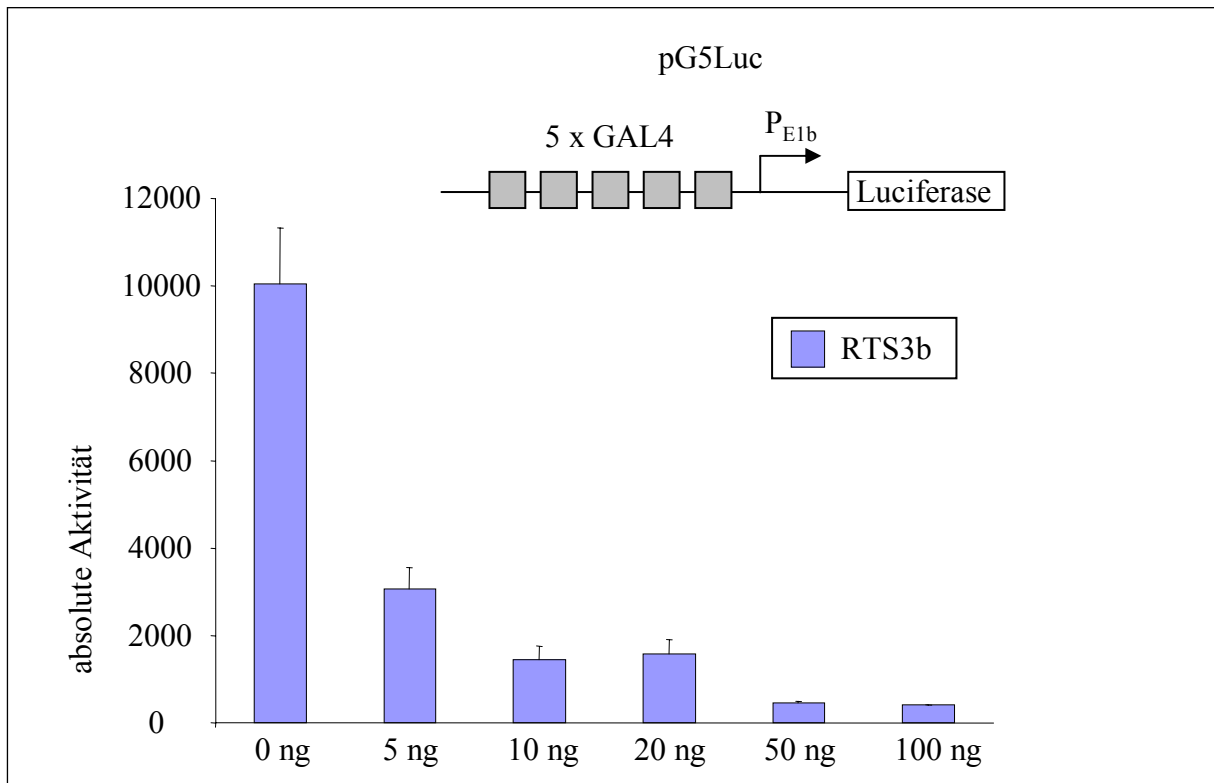


Abb. 23 PBF-vermittelte Repression

RTS3b-Zellen wurden mit einer konstanten Menge des Reporters pG5Luc und den oben angegebenen Mengen eines Expressionsplasmids, das PBF fusioniert mit der Gal4 DNA-bindenden Domäne exprimiert, kotransfiziert. Eine Skizze des Reporterplasmids mit fünf Gal4-Bindestellen und dem minimalen Promotor E1b aus Adenovirus ist abgebildet. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte aus zwei Transfektionen. Die Anzahl der Zellen nach der Ernte wurde durch Proteinbestimmung ermittelt.

4.21 Überexpression von PBF in RTS3b- und C33A-Zellen führt zur Reduktion der Zellzahl

Nach der Transfektion eines PBF-kodierenden Plasmids konnte gegenüber dem Leervektor eine stärkere Abnahme der Zellzahl beobachtet werden. Um den Einfluß der Überexpression von PBF auf die Zellen zu bestätigen, wurde das bereits beschriebene Plasmid pCEP4/PBF eingesetzt. Durch die Lokalisierung des PBF-Gens und der Hygromycinresistenz auf einem Plasmid nahmen die Zellen zusammen mit dem offenen Leserahmen für PBF gleichzeitig einen Selektionsmarker auf.

C33A- und RTS3b-Zellen wurden mit dem PBF-exprimierenden Plasmid oder dem

entsprechenden Leervektor (C33A-Zellen) bzw. mit pCEP4/PBFantisense (das Plasmid enthält den PBF-ORF in 3' → 5'-Orientierung) transfiziert. Nach zweitägigem Wachstum in Normalmedium, wurden die Zellen in 24-Lochplatten verteilt und in hygromycinhaltigem Medium (150 µg/ml für C33A-Zellen und 50 µg/ml für RTS3b-Zellen) weiter inkubiert. Als Negativkontrolle wurden pUC18-transfizierte Zellen ebenso behandelt. Nach vier Tagen in hygromycinhaltigem Medium waren die pUC18-transfizierten Zellen alle tot. Bei den RTS3b-Zellen, die mit pCEP4/PBFantisense transfiziert worden waren, hatten viele Zellen überlebt; die Zellen, die ein PBF-kodierendes Plasmid aufgenommen hatten, waren fast alle gestorben. Ein ähnliches Ergebnis war bei C33A-Zellen zu beobachten. Der Selektionsvorteil, der durch die Hygromycinresistenz vermittelt wurde, wurde durch die PBF-Überexpression wieder aufgehoben.

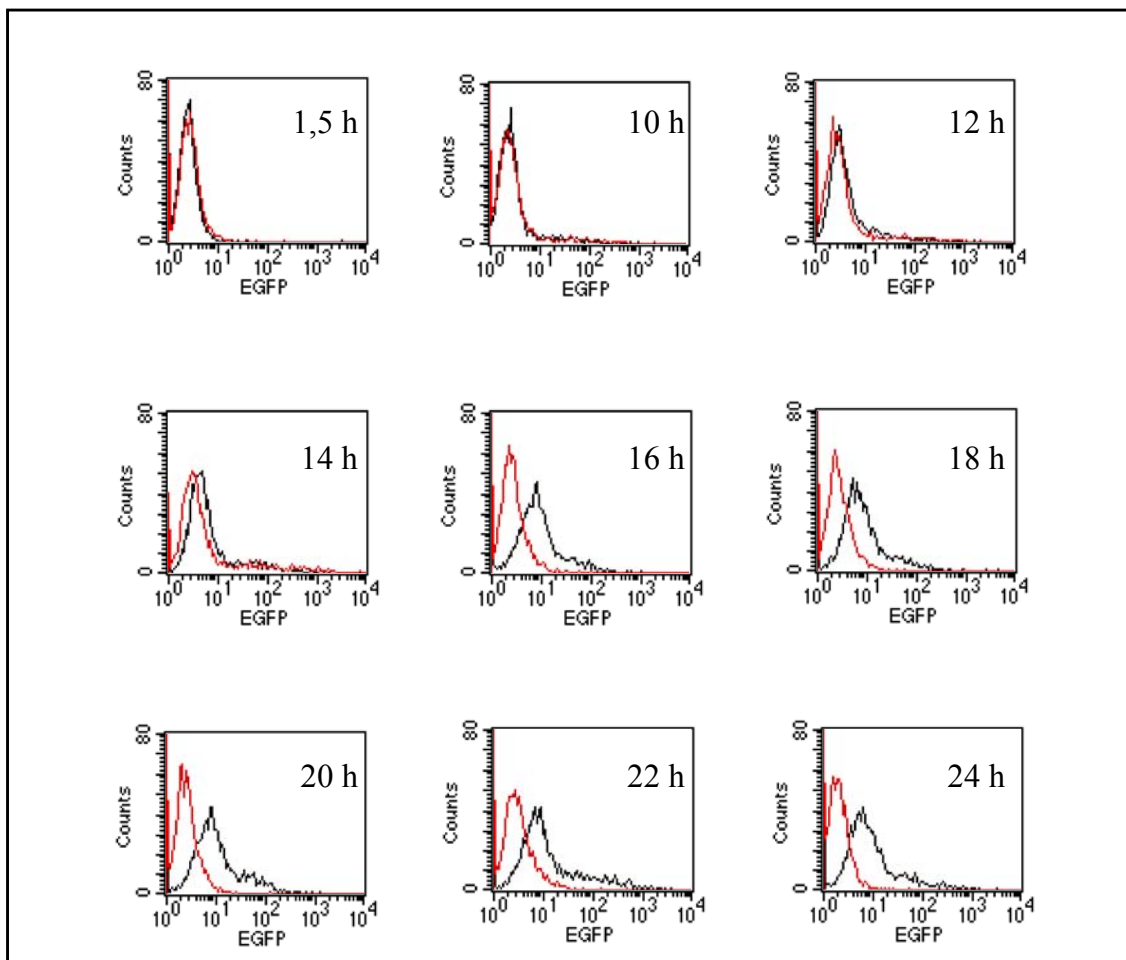


Abb. 24 PBF wird im Vergleich zu EGFP in RTS3b-Zellen schwach exprimiert

RTS3b-Zellen wurden jeweils zu dem im Graph angegebenen Zeitpunkt nach Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-C1/PBF (rot), das das enhanced green fluorescent protein fusioniert mit PBF exprimiert, bzw. mit dem Plasmid pEGFP-C1 (schwarz) fixiert. Die Zellen wurden im FACS-Gerät gemessen und die grüne Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. Die Kurve 1,5 h nach Transfektion stellt die Hintergrundfluoreszenz dar. Eine Verschiebung der Kurve nach rechts entspricht einer Zunahme der Fluoreszenz.

Um die beobachtete Abnahme der Zellzahl in einer Population die mit einem PBF-Expressionsvektor transfiziert wurde zu quantifizieren, wurde eine FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) durchgeführt. Der Leserahmen von PBF wurde mit BamHI aus pGEX-2T/PBF ausgeschnitten und an das 5'Ende des Leserahmens für eine modifizierte Form des grün fluoreszierenden Proteins (enhanced green fluorescent protein, EGFP) in pEGFP-C1 ligiert, so daß in den transfizierten Zellen das Fusionsprotein EGFP/PBF gebildet werden konnte. RTS3b-Zellen wurden mit pEGFP-C1/PBF oder mit dem Leervektor transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Die Überstände, mit den durch die Transfektion abgestorbenen Zellen, wurden verworfen. Die Diagramme der Abb. 24 zeigen die Anzahl der Zellen, die EGFP/PBF (rote Kurven) oder EGFP (schwarze Kurven) nach der Transfektion bildeten, wie sie anhand der Fluoreszenz im FACS-Gerät (BD Sciences) gemessen wurden. Es ist jeweils die Menge an Fluoreszenz (= Intensität) gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. 1,5 h nach Transfektion war noch keine Bildung von EGFP zu beobachten. Beginnend bei 14 h sieht man eine Verschiebung der Kurve der EGFP-bildenden Zellen im Gegensatz zu denen, die EGFP/PBF produzierten. Nach 16 h ist der Unterschied deutlich zu erkennen und er blieb bis zu 24 h nach Transfektion unverändert. Dieses Experiment verdeutlicht, daß die Zellen, die ein PBF-kodierendes Plasmid aufgenommen haben, eine deutlich niedrigere EGFP-Expression aufweisen als Zellen, die nur den Leervektor besitzen. RTS3b-Zellen scheinen nicht in der Lage zu sein, größere Mengen an PBF zu bilden.

4.22 Die Suche nach möglichen Interaktionspartnern von PBF

Die bisherigen Ergebnisse zeigen nicht eindeutig, ob PBF ein Aktivator oder Repressor ist und lassen vermuten, daß PBF in Wechselwirkung mit anderen zellulären Faktoren seine Aktivitäten erfüllt. Um herauszufinden, mit welchen Proteinen PBF interagiert und darauf aufbauend Rückschlüsse auf seine mögliche zelluläre Funktion ziehen zu können, wurde das Hefe-Two-Hybrid-System der Firma Clontech (Heidelberg) eingesetzt.

Für die Musterung einer HaCaT-cDNA-Bank nach PBF-Bindungspartnern, wurde ein Expressionsplasmid hergestellt, das PBF fusioniert an die Gal4-DBD exprimiert. Hierfür wurde der ORF von PBF mit Hilfe einer PCR aus pET14b/PBF amplifiziert, das Fragment mit EcoRI/XhoI geschnitten und in die EcoRI/SalI-Schnittstellen des Plasmids pGBT9 ligiert, stromabwärts des Leserahmens der Gal4-DBD (pGBT9/PBF). Die cDNA-Bank aus HaCaT-Zellen war in den Vektor pACT2 kloniert, der die Expression der zellulären Proteine fusioniert mit der Gal4-AD erlaubt. Für die Selektion in Hefe enthielt pGBT9 das Tryptophan-Gen und die cDNA-Plasmide das Leucin-Gen (Clontech). Die Versuche wurden

mit dem Hefestamm HF7c (Phänotyp: His⁻, Leu⁻ und Trp⁻) durchgeführt, der das HIS3-Gen stromabwärts des Gal1 regulatorischen Elements sowie das lacZ-Gen stromabwärts dreier Gal4 Bindestellen und des Cyclin-Promotors (P_{cyc}) in seinem Genom integriert enthält. HF7c wurde laut Protokoll der Firma Clontech kompetent gemacht und transformiert. Von den 4 x 10⁵ Zellen die auf Platten mit SD-Agar ohne Tryptophan, Leucin und Histidin ausplattiert worden waren erhielten 36 Klone durch die verstärkte Transkription des HIS3-Gens einen Selektionsvorteil, so daß sie stärker wuchsen und deutliche Kolonien formten. Sechs dieser Klone wiesen in einem Filtertest auch eine Aktivierung des lacZ-Reportergens auf, so daß aus ihnen die Plasmid-DNA isoliert und mittels Elektroporation in *E. coli* KC8 transformiert wurde. Unter Selektionsdruck auf das Leucingen gelang es insgesamt zwölf Kolonien (bei einigen Transformationen wuchsen zwei oder mehr Kolonien) mit cDNA-Plasmid-tragenden Bakterien zu isolieren. Die Sequenzierung zeigte, daß es sich bei den cDNAs aus fünf Hefeklonen um den Leserahmen für das 14-3-3 β Protein handelte, und daß ein Hefeklon eine Mischung aus 14-3-3 β Protein- und SAP30-kodierenden cDNA-Plasmiden enthielt. Um die Bindung von PBF an diese Proteine zu bestätigen, müssen noch *in vitro*-Interaktionsstudien durchgeführt werden, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr möglich war.

4.23 Ein zellulärer Faktor moduliert die Bindungseigenschaften von PBF an 16 BS#4

Die in den Kapiteln 4.17 und 4.18 beschriebenen Experimente ließen die Schlußfolgerung zu, daß ein weiterer zellulärer Faktor an 16 E2 BS#4 bindet. Um dies näher zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid 16 BS#4 wt* und RTS3b-Kernextrakten durchgeführt. Wie in der Radiographie in Abb. 25 zu sehen, bildeten sich nach Inkubation der Kernextrakte mit dem Oligonukleotid ein Komplex 16/A und ein Komplex 16/B (Spur 7), der höher lief als rPBF (Spur 1). Rekombinantes PBF ließ sich durch einen 400-fachen Überschuß unmarkierter Oligonukleotide, die für P2 aus HPV8 (Spur 3) bzw. BS#4 aus HPV16 (Spur 4) kodierten, kompetieren. In den Spuren 7-12 ist gezeigt, daß sich der schneller migrierende Komplex 16/A von P105TATA, P2TATA und HPV16 BS#4 wt, und der höher laufende Komplex 16/B nur von dem homologen Oligonukleotid kompetieren ließ (Spur 10). Der Komplex 16/B besitzt somit ein anderes Kompetitionsmuster als rPBF. Bei diesem als „RTS3b-Faktor“ bezeichneten, zellulären Protein handelt es sich nicht um SP1 (Spur 12), da es nicht durch die hochaffine Sp1-Bindestelle kompetiert wurde.

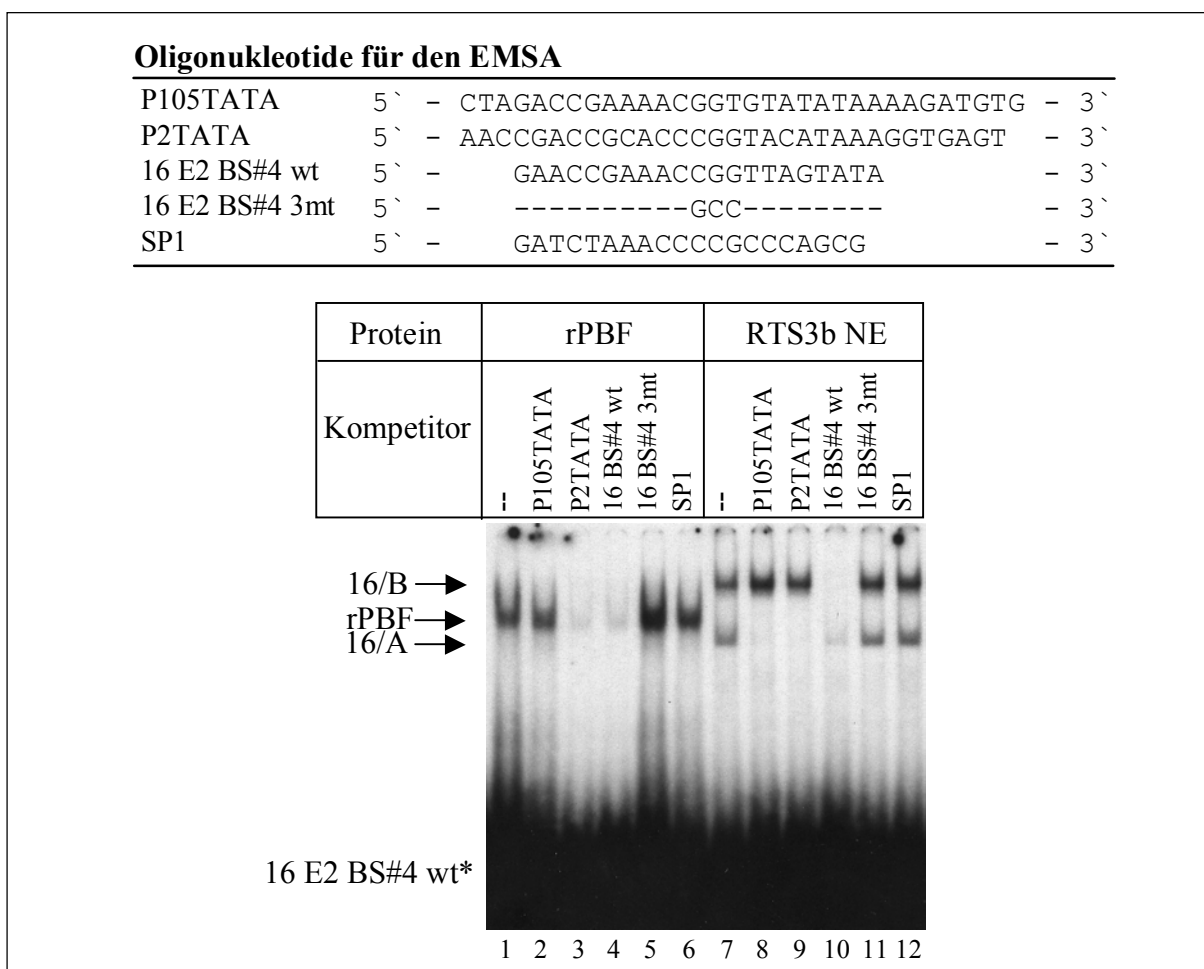


Abb. 25 Zelluläre Faktoren aus RTS3b-Kernextrakten binden an HPV16 BS#4

250 pg radioaktiv markiertes Oligonukleotid HPV16 E2 BS#4* wurden mit RTS3b- Kernextrakten bzw. rPBF und je 100 ng der abgebildeten Kompetitoren inkubiert. Die Pfeile 16/A und 16/B markieren die Komplexe, die durch Bindung zellulärer Faktoren an die DNA entstanden sind. Der Pfeil weist auf das rekombinante PBF (rPBF). Die Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotide sind angegeben. SP1 = Oligonukleotid, das eine hochaffine Sp1-Bindestelle enthält.

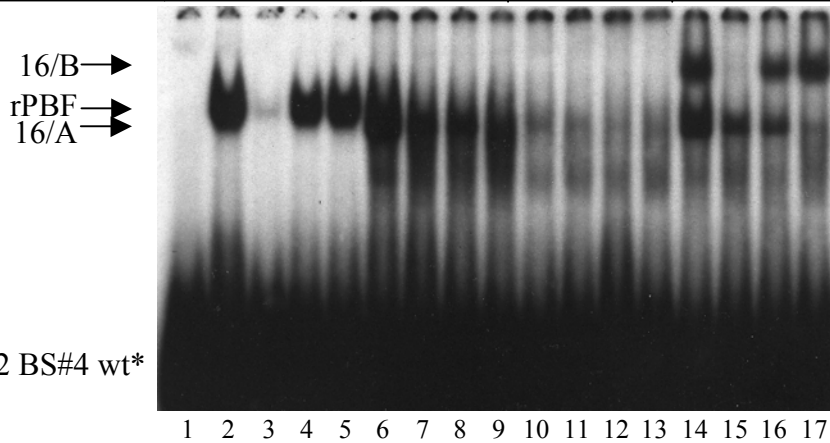
4.24 Der Faktor aus RTS3b-Zellen konnte in weiteren Zelllinien nachgewiesen werden

Um herauszufinden in welchen Zelllinien der im Komplex 16/B vorhandene „RTS3b-Faktor“ noch vorkommt, wurde der in Abb. 26 abgebildete EMSA mit der HPV16 BS#4 wt* und Kernextrakten aus verschiedenen Zelllinien und primären Keratinozyten durchgeführt. Der als 16/A markierte Komplex wurde durch P105TATA, P2TATA und homolog kompetiert. Die Identität dieses Komplexes ist bisher ungeklärt (eventuell könnte es sich um TBP handeln). Der 16/B-Komplex, der sich nur homolog kompetieren ließ, war in den Extrakten von RTS3b, HaCaT und schwach auch in primären Keratinozyten nachweisbar. HPV16 BS#4 mtA mit der Mutation im CCGG-Motiv, P105TATA und P2TATA waren nicht in der Lage den Faktor zu binden. In Kernextrakten aus C33A-, C127i-, HeLa- und Cos7-Zellen war dieses Protein nicht vorhanden. Dies zeigt, daß der Faktor in humanen Zelllinien enthalten ist, die aus der Haut isoliert worden waren, sowie in primären Keratinozyten. All diesen Zellen ist gemein, daß sie

Oligonukleotide für den EMSA

P105TATA	5` -	CTAGACCGAAAACGGTGTATATAAAAAGATGTG	-	3`
P2TATA	5` -	AACCGACCGCACCCGGTACATAAAAGGTGAGT	-	3`
16 E2 BS#4 wt	5` -	GAACCGAAACCGGTTAGTATA	-	3`
16 E2 BS#4 mtA	5` -	-----A-----	-	3`

Kompetitor	--	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA
Kernextrakt	--	rPBF	C33A	C127i	RTS3b



Kompetitor	--	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA	16 BS#4 wt 16 BS#4 mtA P105TATA	--	16 BS#4 wt P2TATA	16 BS#4 wt P2TATA
Kernextrakt	--	HeLa	HaCaT	Cos7	--	RTS3b	Kerat.

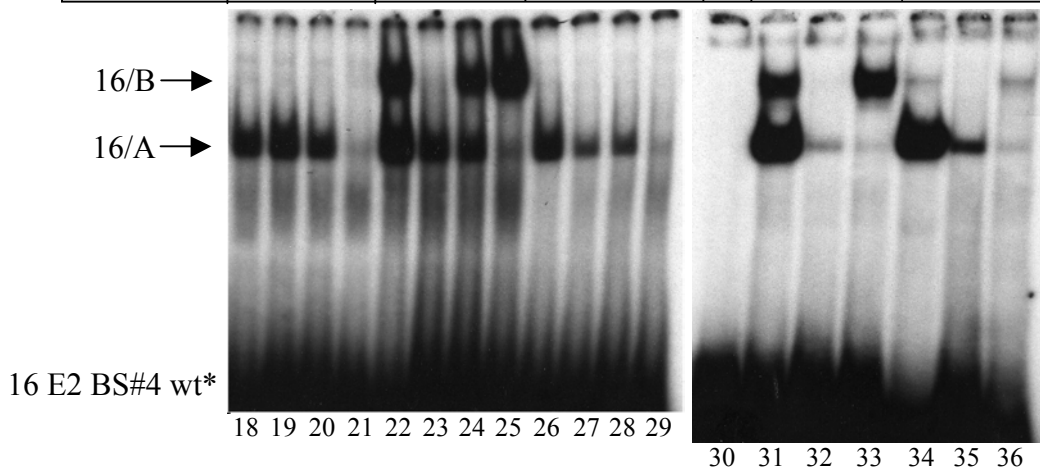


Abb. 26 Der Komplex aus zellulären Faktoren und 16 E2 BS#4 wt* konnte in RTS3b-, HaCaT- und primären Keratinozyten nachgewiesen werden

250 pg radioaktiv markiertes Oligonukleotid HPV16 E2 BS#4* wurde mit 15 µg der oben angegebenen Kernextrakte bzw. rPBF und je 100 ng der abgebildeten Kompetitoren inkubiert. Die Pfeile 16/A und 16/B markieren die Komplexe, die durch Bindung eines Faktors aus Kernextrakten an die DNA entstanden sind, ein Pfeil markiert rekombinantes PBF (rPBF). Kerat. = primäre Keratinozyten. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind angegeben.

noch in der Lage sind, *in vitro* zu differenzieren. Der Faktor wurde nicht in Zelllinien nachgewiesen die aus Karzinomen des Schleimhautepithels stammen sowie in c127i (Brustdrüsenkarzinom der Maus) und Cos7 Affen-Nierenzellen.

4.25 Charakterisierung der Bindeeigenschaften des „RTS3b-Faktors“

Die Bindeeigenschaften des „RTS3b-Faktors“ sollten näher charakterisiert und mit denen von rPBF verglichen werden. Hierfür wurden die in Abb. 27 dargestellten Oligonukleotide, die die Wildtypsequenzen der reprimierenden E2 Bindestellen aus HPV8, HPV16 und BPV1 enthielten sowie einige Oligonukleotide die für die HPV16 BS#4 mit Mutationen im CCGG-Motiv kodierten, getestet. In beiden Gelen wurden je 250 pg radioaktiv markierte Oligonukleotide jeweils alleine und in Anwesenheit von RTS3b-Kernextrakten (oberes Gel) oder rPBF (unteres Gel) inkubiert. In den Radiographien sind die folgenden Komplexe zu erkennen: Der Komplex „A“ der sowohl durch die Bindung zellulärer Proteine an P2TATA, BPV1 BS-1, als auch an HPV16 BS#4 wt gebildet wurde und eventuell die gleichen Faktoren enthält. Komplex 8/B der die Bindung eines Faktors an P2TATA und BPV1 E2 BS-1 darstellt, und die Bande 16/B, die die Bindung des „RTS3b-Faktors“ bezeichnet. Die Protein-DNA-Komplexe 8/B und 16/B enthalten PBF wie in den Abb. 16 und 21 gezeigt wurde. Neben der Wildtypsequenz von HPV16 BS#4 war der Komplex 16/B auch mit BPV1 E2 BS-1 und ganz schwach mit der Mutante G1 nachweisbar. Es handelt sich bei dem Faktor nicht um C-myb, da in Spur 12 auf entsprechender Höhe keine Bande detektiert werden konnte. Im Vergleich dazu band rPBF, markiert durch einen Pfeil in der unteren Radiographie, schwach an die Mutante mtG2 von HPV16 BS#4. Die Bindungsmuster von rPBF und dem unbekanntem Protein aus RTS3b-Extrakten unterscheiden sich geringfügig. Während PBF schwach an mtG2 bindet, zeigt der „RTS3b-Faktor“ eine leichte Interaktion mit mtG1.

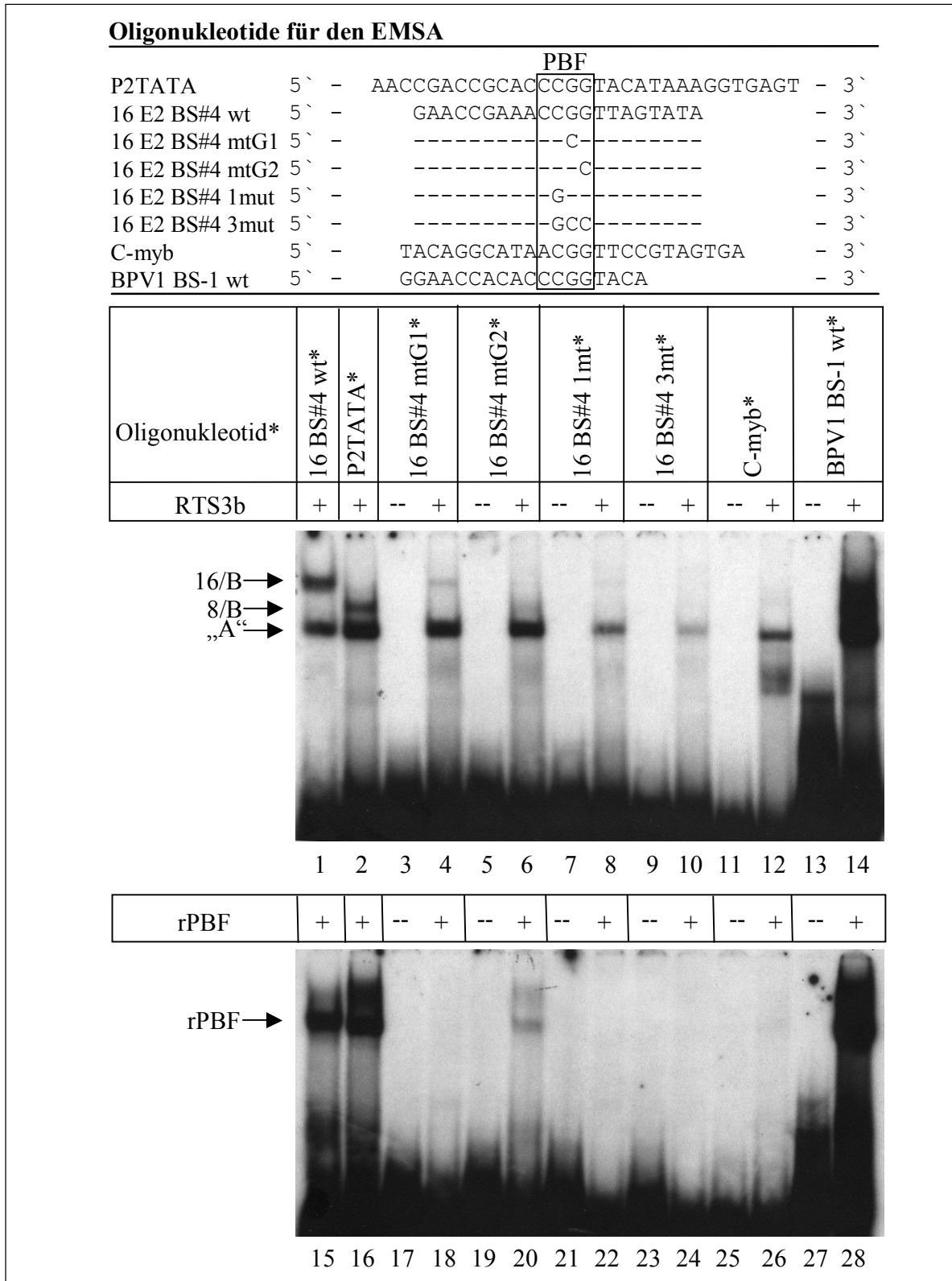


Abb. 27 Unterschiede zwischen den Bindungseigenschaften von RTS3b NE und rPBF

250 pg radioaktiv markiertes Oligonukleotid (*) mit den oben abgebildeten Sequenzen wurde jeweils alleine oder mit RTS3b-Kernextrakten (RTS3b NE) im oberen Bild bzw. mit rekombinantem PBF (rPBF; unterer EMSA) inkubiert. In den Spuren 1 und 15 ist HPV16 BS#4 wt und in Spuren 2 und 16 P2TATA aus HPV8 als Kontrolle aufgetragen. Die Pfeile markieren die Komplexe („A“, evtl. der gleiche Komplex bei P2TATA und 16 E2 BS#4; 8/B und 16/B) bzw. das gebundene rekombinante PBF.

4.26 Die Suche nach einem HPV16 E2 BS#4-bindenden Faktor mit Hilfe des Hefe-One-Hybrid-Systems

Die Ergebnisse aus den Bindungsstudien mit der HPV 16 E2 BS#4 zeigen, daß der PBF-enthaltende Proteinkomplex der in RTS3b- und HaCaT-Zellen vorkommt gegenüber rPBF eine leicht veränderte Bindungseigenschaft besitzt. Um ein zelluläres Protein zu finden, das an die Repression vermittelnde E2 BS#4 von HPV16 bindet und eine Rolle bei der Promotoraktivität spielt, wurde eine Hefe-One-Hybrid-Suche durchgeführt. Dieses System und die HaCat-cDNA-Bank wurden von der Fima Clontech (Heidelberg) bezogen. Nähere Einzelheiten zu den verwendeten Komponenten sind dem Material- bzw. Methodenteil zu entnehmen.

Um mit dem Hefe-One-Hybrid-System einen Faktor zu finden, der an die BS#4 von HPV16 bindet, wurden fünf Kopien eines Oligonukleotids mit dieser Bindestelle über EcoRI vor den Promotor und das HIS3-Gen in den Vektor pHISi-1 kloniert (16/pHISi-1). Zusätzlich wurde das gleiche Oligonukleotid in sechsfacher Kopie vor den minimalen Promotor des Cyclin-Promotor (P_{cyc}) aus Hefe kloniert, der die Expression des lacZ-Gens kontrolliert (16/pLacZi). Für die Herstellung des Hefe-Reporterstammes wurden die Plasmide 16/pHISi-1 und 16/pLacZi mit XhoI bzw. NcoI im Selektionsgen linearisiert und durch Rekombination in das Genom des kompetenten Hefestammes YM4271 integriert. Der so hergestellte Reporter-Hefestamm hieß YM16HISi-1/LacZi und wuchs in Selektionsmedium ohne Uracil und Histidin. Um das durch die schwache Aktivität des Histidin-Promotors hervorgerufene Hintergrundwachstum des Reporterstammes während des Hefe-One-Hybrid-Versuches gerade zu unterdrücken, wurde der Stamm auf SD-Agarplatten ohne Histidin, Leucin und Uracil sowie unter Zusatz von 75 mM 3-AT inkubiert. Von $3,4 \times 10^6$ ausplattierten Klonen waren 108 in der Lage auf Selektivmedium zu wachsen. Nach Vereinzelung der Klone zeigten 68 von ihnen in einem β Gal-Filter-Test eine starke Blaufärbung. Aus diesen Hefeklonen wurde nach Protokoll die Plasmid-DNA isoliert und in *E. coli* XL1Blue transformiert, um sie dort zu vermehren. Nach ihrer Isolierung aus den Bakterien wurden die Plasmide mit EcoRI verdaut, die herausgetrennten cDNA-Inserts aufgereinigt und mit dem häufig schneidenden Restriktionsenzym AluI in kleine Fragmente zerlegt. Die so gewonnenen Schnittmuster aller Klone wurden in Gruppen eingeteilt und einige Vertreter sequenziert. Eine Übersicht ist in Abb. 28 dargestellt. Die am häufigsten gefundene cDNA kodierte für RAI (RelA Associated Inhibitor; Yang *et al.*, 1999) (45 von 68 Klonen). Weiterhin wurden cDNAs die für Nup160 und ein „DKFZ hypothetisches Protein“ kodierten isoliert.

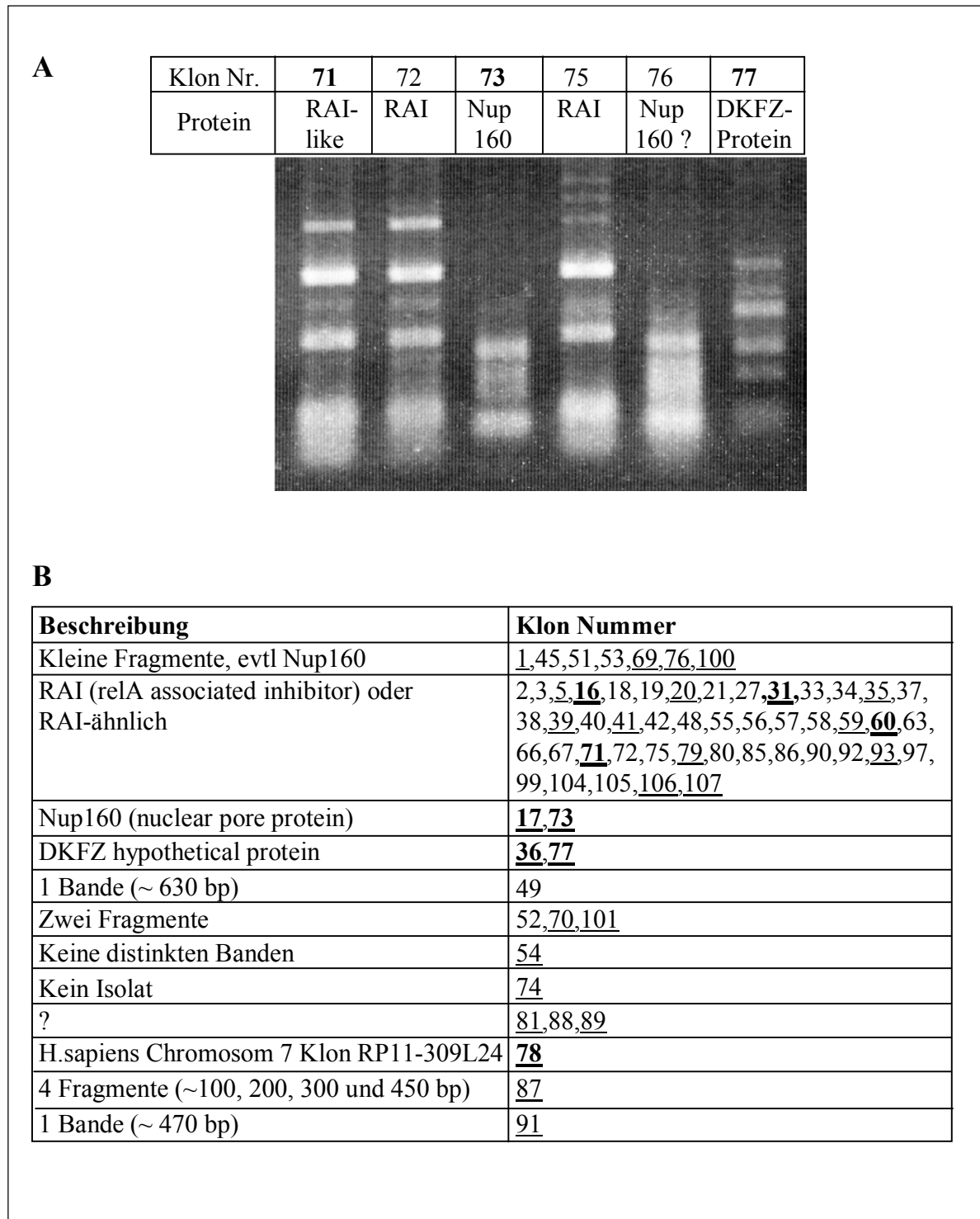


Abb. 28 Ergebnisse der cDNA-Bank Musterung

(A) Restriktionsverdau mit AluI einiger repräsentativer cDNA-Fragmente aus positiven Hefe-Klonen. (B) Liste aller der mit der Hefe-One-Hybrid-Suche gefundenen cDNA-Klone. Die fett gedruckten Klone sind sequenziert worden, die restlichen Klone wurden anhand der entstandenen Banden nach dem AluI-Verdau der cDNA-Fragmente klassifiziert. Die unterstrichenen Nummern stehen für Klone, die in einem der beiden durchgeführten ONPG-Tests untersucht wurden. Von den 68 isolierten cDNAs kodierte 45 für RAI oder RAI-ähnliches Protein.

4.27 ONPG-Test

Um falsch positive Klone zu eliminieren, wurden einzelne Vertreter der Gruppen, die aufgrund des Bandenmusters nach dem AluI-Verdau der cDNAs gebildet wurden, bezüglich ihrer Aktivierung des LacZ-Reportergens quantitativ analysiert. Um einen Bezugswert für den Test zu erhalten wurde der Hefestamm YM4271 mit den von der Firma Clontech gelieferten Plasmiden transformiert. Als positive Kontrolle für die lacZ-Expression wurde der Stamm 53Blue/53m (integriertes p53Blue sowie pGAD53m) eingesetzt, als negative Kontrolle diente der Stamm 53Blue/424 mit integriertem p53Blue sowie pGAD424 (Boeckle, 1998). Für den Test wurden die Klone und die Kontrollstämme in 5 ml Selektivmedium ohne Histidin, Leucin und mit 75 mM 3-AT bis zur stationären Phase wachsen gelassen, verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Pro Klon wurden zwei Mal 1,5 ml der Kultur entnommen und wie unter Methoden beschrieben behandelt. Die Abb. 29 zeigt das Ergebnis eines ONPG-Tests. Die Negativkontrolle zeigte keine β Gal-Aktivität im Gegensatz zur Positivkontrolle die aber nicht als Referenz benutzt werden konnte da der Reporterstamm YM16HISi-1/LacZi eine stärkere Hintergrundaktivität aufwies als der Kontrollstamm. Um einen Bezugspunkt für die gemessenen Aktivitäten zu erhalten, wurde daher die Aktivität der Hefe mit dem niedrigsten Wert (Klon 54) als Eins gesetzt. Im Vergleich dazu erreichten die verschiedenen

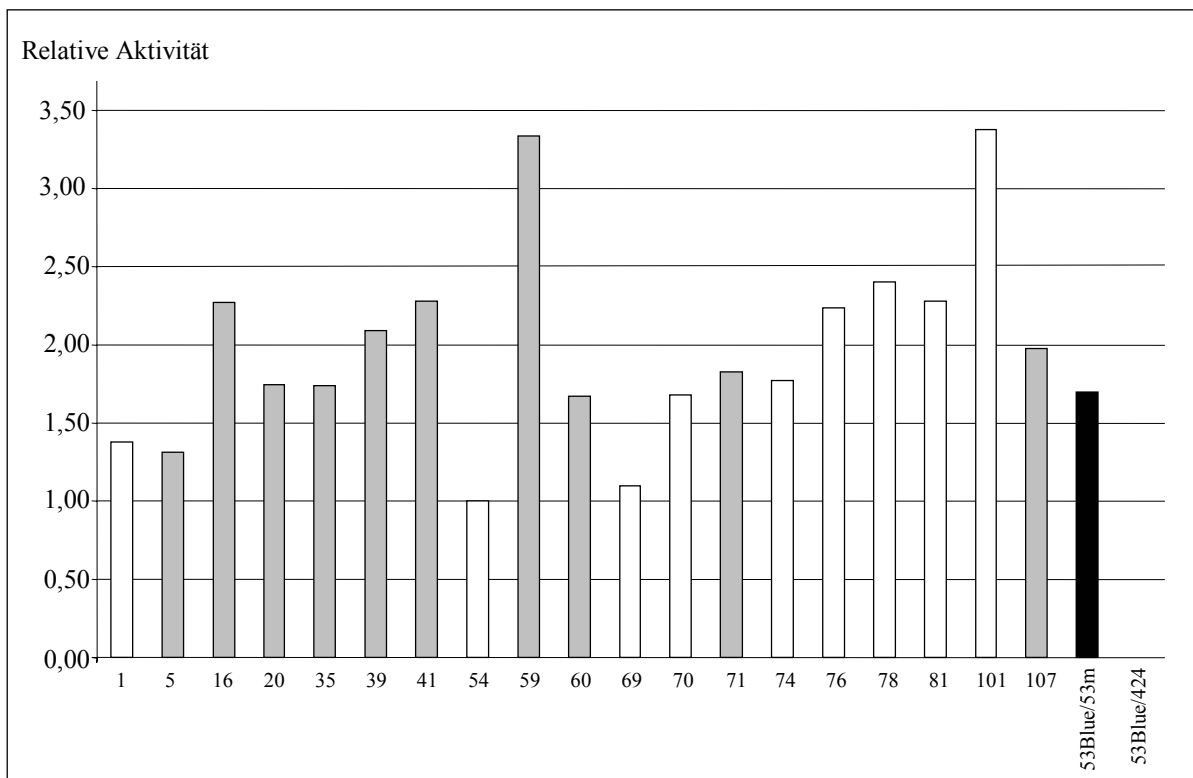


Abb. 29 Ergebnis des ONPG-Tests

Der Graph zeigt die relative Aktivität (OD_{420}/OD_{600}) der genannten Hefeklone bzw. Kontrollstämme. Da die Negativkontrolle 53Blue/424 den Wert Null hatte, wurde als Referenz für die relative Aktivität der Klon mit der niedrigsten Aktivität (Klon 54) als Eins gesetzt. Die RAI-Klone sind grau dargestellt, und die Positivkontrolle schwarz.

RAI-Klone (Nr. 5, 16, 20, 35, 39, 41, 59, 60, 71 und 107) etwa die doppelte bis dreifache Aktivität (Klon 59). Die zwei getesteten „DKFZ hypothetisches Protein“- (Nr. 36 und 77) und die beiden Nup160-Klone (17 und 73) besaßen einen höheren Wert als Klon 54 (Daten nicht gezeigt).

4.28 Hefe-Retransformation

Zwei Drittel aller gefundenen cDNA-Klone kodierten für den Leserahmen von RAI. Um zu prüfen, ob die Aktivierung des lacZ-Reportergens auf die RAI-kodierenden Plasmide zurückgeführt werden konnte wurden die cDNAs zweier verschiedener RAI-Klone (Nr. 16 und 60), die während meiner Diplomarbeit isolierte cDNA von PBF (ebenfalls in pACT2) sowie der bereits beschriebene Vektor pGAD424 als negative Kontrolle jeweils in drei

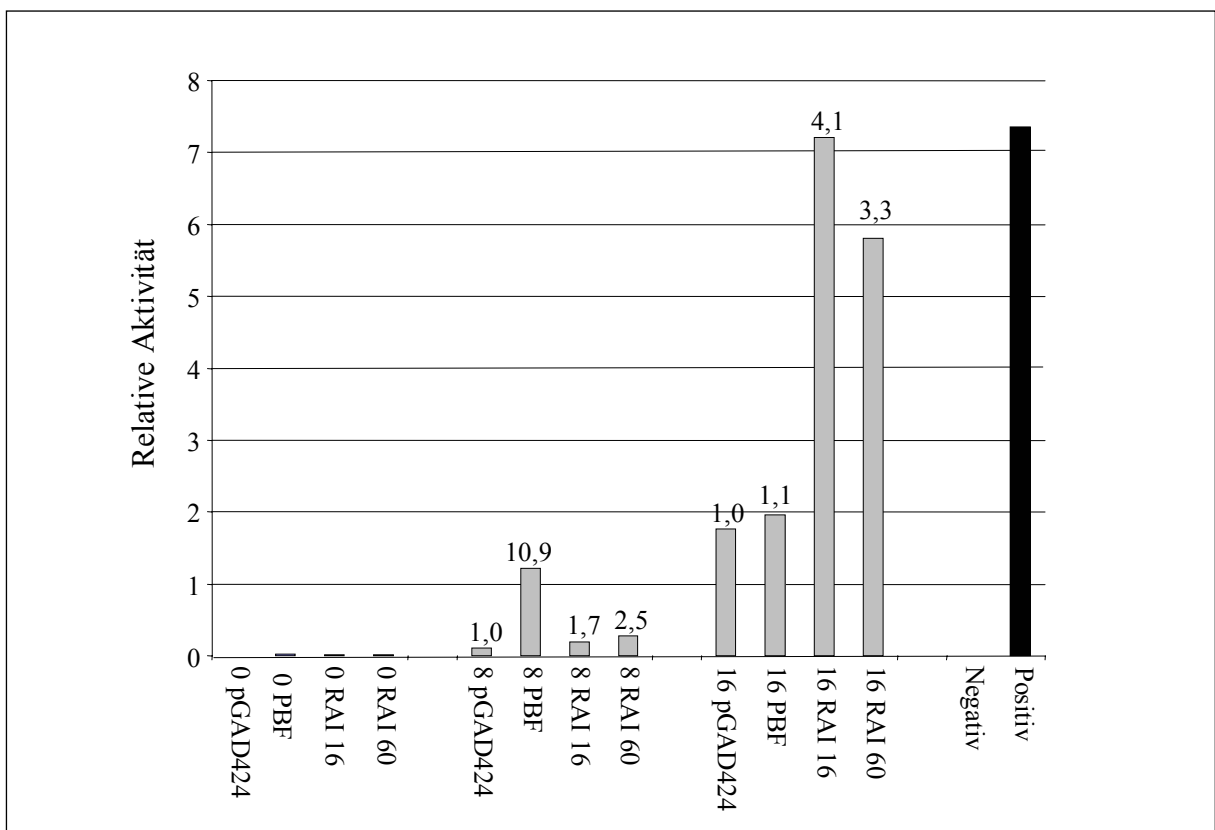


Abb. 30 Aktivierung der Hefe-Reporterstämme durch PBF und RAI

Der Graph zeigt die relative Aktivität der Hefestämme mit integrierten pLacZi-Reporterkonstrukten, die die angegebenen Bindestellen (0 = ohne, 8 = HPV8 P2 und 16 = BS#4 aus HPV16) vor dem lacZ-Gen enthielten. Jeder Stamm wurde mit pGAD424 (= Gal4-AD alleine), pACT2/PBF sowie pACT2/RAI Klon 16 oder Klon 60 transformiert. Die Negativkontrolle 53Blue/pGAD424 besaß den Wert Null. Als Positivkontrolle diente 53Blue/pGAD53m. Die Balken stellen die relative Aktivität dar (OD_{420}/OD_{600}), die Zahlen geben jeweils die Aktivierung gegenüber dem Stamm an, der pGAD424 enthielt. Die Aktivität des Stammes ohne Bindestellen war in allen Fällen unter 0,02. Der Stamm mit den HPV16 Bindestellen, der für die cDNA-Bank-Durchsuchung eingesetzt wurde, wies bereits eine relativ hohe Aktivität in Gegenwart der Gal4-AD (1,77) auf.

verschiedene YM4271-Hefestämme retransformiert. Diese Hefen enthielten jeweils eines der folgenden pLacZi- Reporterkonstrukte:

1. 0pLacZi (ohne Bindestelle; = Negativkontrolle)
2. 8pLacZi (mit fünf Kopien der Bindestelle P2 aus HPV8)
3. 16pHISi-1/pLacZi (der Originalstamm, der für die cDNA-Suche eingesetzt wurde mit sechs Kopien von HPV16 BS#4 vor dem lacZ-Gen).

Mit den zwölf hergestellten Hefestämmen, den beiden Kontrollen 53Blue/pGAD424 (Negativkontrolle) und 53Blue/pGAD53m (Positivkontrolle) wurde ein ONPG-Test wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Hefen wuchsen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7. Die Ergebnisse sind in Abb. 30 graphisch dargestellt. Der Hefestamm YM4271 der das Reporterkonstrukt ohne Bindestellen enthielt (0pLacZi) zeigte kaum Aktivität, auch dann nicht, wenn er mit einem der vier Expressionsplasmide transformiert wurde. Dies zeigt, daß PBF/Gal4-AD und RAI/Gal4-AD den Promotor nicht über die Bindung an die Vektorsequenzen aktivieren konnten. Die Gegenwart der HPV8 P2-Bindestellen führte zu einer 11-fach erhöhten Aktivität gegenüber der Negativkontrolle (8 pGAD424), wenn die Hefen das Expressionsplasmid für PBF besaßen (8 PBF), im Vergleich zu den RAI-kodierenden Plasmiden (1,7- und 2,5-fach). Dies bedeutet, daß RAI nicht oder nur schwach an P2 gebunden hatte. Bei dem Stamm mit den HPV16-Bindestellen war es umgekehrt. PBF/Gal4-AD war nicht in der Lage den Promotor stärker zu aktivieren als die Gal4-AD alleine (1,1-fach), die einen sehr hohen Hintergrund (1,77). RAI/Gal4-AD aktivierte den Promotor 4,1- (Klon 16) und 3,3-fach (Klon 60). Damit konnte eine Bindung von PBF an P2 aus HPV8 und von RAI an BS#4 aus HPV16 nach Retransformation der entsprechenden cDNA-Plasmide in Hefe bestätigt werden.

Die Bindung von RAI an HPV16 BS#4 *in vitro* und eine mögliche Rolle bei der Regulation der P₉₇-Aktivität konnten nicht mehr untersucht werden. Ebenso ist unklar ob RAI der „RTS3b-Faktor“ ist.

5. Diskussion

Das vollständige virale E2-Protein ist ein Aktivator und Repressor der Genexpression der Papillomviren. Die Repression kommt häufig dadurch zustande, daß die E2-Bindestellen mit Bindestellen zellulärer Transkriptionsfaktoren überlappen, so daß E2 diese, für die Promotoraktivität notwendigen Faktoren verdrängt (Stenlund und Botchan, 1990; Vande Pol und Howley, 1990; Dostatni *et al.*, 1991; Dong *et al.*, 1994 a; Stubenrauch und Pfister, 1994; Tan *et al.*, 1994; Jackson und Campo, 1995; Stubenrauch *et al.*, 1996; Demeret *et al.*, 1997). Daher bietet die Isolierung von Faktoren, die an die Repression vermittelnden E2-Bindestellen binden, eine Möglichkeit, Wirtszellproteine zu identifizieren, die an der Genexpression von Papillomviren beteiligt sind. In einer früheren Arbeit konnte ich mit Hilfe des Hefe-One-Hybrid-Systems aus einer cDNA-Bank einen Teil eines unbekanntes Faktors isolieren, der an die Repression vermittelnde E2-BS P2 aus HPV8 bindet (Boeckle, 1998).

5.1 Charakterisierung von PBF

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der 5'RACE-Methode der vollständige 1542 Nukleotide umfassende Leserahmen dieses Proteins isoliert und kloniert werden. Der bisher unbekanntes Faktor wurde PBF genannt. Einzelne Teile des Leserahmens sind zu cDNAs homolog, die aus verschiedenen menschlichen Geweben bzw. humanen Zelllinien isoliert wurden. Daraus kann man schließen, daß PBF kein keratinozyten-spezifischer Faktor ist, sondern ubiquitär exprimiert wird. Es ist daher unwahrscheinlich, daß PBF eine direkte Rolle beim Epithelzelltropismus der PV spielt. Durch computergestützte Analysen der Aminosäuresequenz konnten folgende Proteinstrukturen für PBF vorausgesagt werden: ein Zinkfinger vom Typ TFIIIA, eine α -Helix, Phosphorylierungsmotive für verschiedene Proteinkinasen, Kernlokalisierungssignale, und mögliche Bindestellen für das 14-3-3-Protein. Wahrscheinlich handelt es sich bei den für PBF vorhergesagten 14-3-3-Protein-Erkennungssequenzen um funktionale Bindemotive, da das 14-3-3-Protein im Hefe-Two-Hybrid-System als Interaktionspartner von PBF identifiziert wurde. Eine Phosphorylierung von PBF könnte die Ursache für das leicht verzögerte Laufverhalten im Western Blot des eukaryot exprimierten, in Kernextrakten nachgewiesenen Proteins gegenüber dem bakteriell exprimierten, gereinigten PBF sein (Abb. 6). Mit Hilfe von Kernextrakten, die im Western Blot eingesetzt wurden, und Immunfluoreszenz-Experimenten mit einem gegen rekombinantes PBF gerichteten Antikörper konnte gezeigt werden, daß nach transienter Transfektion das rekombinante PBF im Zellkern lokalisiert (Abb. 6). Dies ist ein Hinweis

darauf, daß es sich bei PBF um einen Transkriptionsfaktor handeln könnte.

Die spezifische Bindung von PBF an P2 konnte *in vitro* mittels EMSA und bakteriell exprimiertem, gereinigtem PBF nachgewiesen werden (Abb. 7). Durch die Konkurrenz mit Oligonukleotiden, die unterschiedliche Mutationen enthielten, wurden die Nukleotide CCGG als für die DNA-Bindung von PBF essentiell bestimmt. Dieses Motiv ist in der 3'-Hälfte von P2 aus HPV8, BS-1 aus BPV1 und BS#4 aus HPV16 enthalten, und wurde in allen drei Fällen von PBF gebunden, wie ebenfalls im EMSA gezeigt werden konnte. Austausch des ersten C gegen ein A oder T in BS#4, führten zu einem vollständigen Verlust der Bindung, während ein G an dieser Position eine schwache Bindung von PBF an das entsprechende Oligonukleotid zuließ. Welche Bindestellen von PBF *in vivo* gebunden werden, könnte auch von den umliegenden Nukleotiden und dem DNA-Kontext abhängen. Es ist bekannt, daß die Affinität einer Bindestelle größtenteils über die an der Bindung beteiligten Nukleotide festgelegt wird, jedoch konnte z.B. für BPV1-E2 gezeigt werden, daß auch benachbarte Nukleotide und wahrscheinlich die Struktur der DNA nach der Bindung des Proteins, die Affinität der Bindestelle mitbestimmen (Li *et al.*, 1989). Den Einfluß, den die umgebenden Nukleotide auf die Bindungsaffinität von PBF an dieses Motiv ausüben, und eine umfassende Konsensussequenz müssen noch durch weitere Mutationsanalysen oder zusätzliche Experimente (z.B. Binding Site Selection) ermittelt werden.

Die hier gezeigten Daten deuten darauf hin, daß auch endogenes PBF an P2 bzw. BS-1 bindet. Die Vorbehandlung von RTS3b-Kernextrakten mit dem Antikörper verhinderte im EMSA die Bindung eines zellulären Proteins an beide Bindestellen, so daß es sich bei dem Faktor um endogenes PBF handelte. Die Inkubation mit dem Antiserum führte nicht zur Bildung eines höher laufenden Komplexes, was dadurch verursacht worden sein könnte, daß der Antikörper im Bereich der DNA-Bindedomäne an PBF gebunden hatte, und dadurch die DNA-Bindung kompetierte. Kernextrakte aus RTS3b-Zellen, die zuvor mit einem Expressionsplasmid für PBF transient transfiziert worden waren, bildeten den im EMSA mit P2TATA nachgewiesenen Komplex 8/B stärker aus als untransfizierte Zellen (Abb. 16 B). Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, daß der Faktor, der von dem klonierten Gen exprimiert wird, mit dem an P2 bzw. BS-1 bindenden zellulären Faktor identisch ist.

Die Methylierung des zweiten Cysteins im CCGG-Motiv verhinderte die PBF-Bindung an ein entsprechendes Oligonukleotid. Dies zeigt, daß der Kontakt zu diesem Nukleotid essentiell für

die Interaktion von PBF mit der DNA ist, und daß die Bindung an das CCGG-Motiv sequenzspezifisch zu sein scheint. Die schwache Bindung von PBF, die in diesem EMSA zu beobachten war (Abb. 8), könnte über ein GCGG-Motiv vermittelt worden sein, das zusätzlich in P2TATA vorhanden war. Wie für HPV16 BS#4 gezeigt wurde, kann diese Sequenz schwach von rPBF gebunden werden. Es ist sinnvoll, daß PBF als Transkriptionsfaktor nicht an methylierte CpG-Inseln bindet, da ein Mechanismus der Inaktivierung von Genen deren Methylierung und Verpackung in kondensiertes Chromatin ist (Razin, 1998). Auch fremde DNA, die in das Wirtsgenom integriert, wird *de novo* methyliert (Doerfler, 1991). Deshalb können z.B. virale Promotoren nach der Integration eine veränderte Transkription aufweisen, da die Methylreste direkt die Bindung zellulärer Faktoren (List *et al.*, 1994) oder viraler Proteine, z.B. HPV16 E2 (Thain *et al.*, 1996) an die DNA verhindern. Es wird vermutet, daß die DNA-Methylierung einen zusätzlichen Faktor bei der HPV-assoziierten Karzinogenese darstellt (Rösl *et al.*, 1993). So konnte beispielsweise in *in vitro*-Methylierungsstudien eine selektive Repression der Transkription von HPV18 bzw. 16 gezeigt werden (Rösl *et al.*, 1993; List *et al.*, 1994). PBF könnte einer der Faktoren sein der bei der Repression der viralen Transkription durch Methylierung der DNA eine Rolle spielt.

Die DNA-Bindung von PBF wird nicht über die 114 N-terminalen Aminosäuren vermittelt, da die Bindungseigenschaften von r Δ N-PBF denen des gesamten PBF entsprechen. Der zentrale Bereich von PBF enthält einen einzelnen Zinkfinger, der bereits als DNA-Bindemotiv beschrieben worden ist. Obwohl DNA-bindende Proteine meistens drei oder mehr Zinkfinger motive enthalten (z.B.: TFIIIA, Sp1 und YY1) existieren DNA-bindende Proteine mit einzelnen Zinkfingern. Zum Beispiel besitzt der GAGA-Faktor aus *Drosophila melanogaster* als DNA-bindende Domäne einen einzelnen Zinkfinger vom Typ TFIIIA, dem stromaufwärts zwei basische Regionen vorangestellt sind, und dessen spezifische DNA-bindenden Eigenschaften experimentell belegt wurden (Omichinski *et al.*, 1997). Es wurde auch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren in Pflanzen identifiziert (Dof-Proteine = DNA-binding with one finger), die über vier Cysteine einen einzelnen Zinkfinger ausbilden, der unter anderem für die Bindung an DNA verantwortlich ist (Yanagisawa, 1997). Im Fall von PBF spielt der Zinkfinger bei der DNA-Bindung wahrscheinlich keine Rolle, da eine Mutante, in der der Zinkfinger zerstört wurde, ebenfalls an die DNA binden konnte (Abb. 10 B). Somit besitzt PBF ein anderes DNA-bindendes Motiv, und der Zinkfinger ist wohl an einer anderen Funktion, z.B. der Protein-Protein-Interaktion, beteiligt.

Viele an palindromische DNA-Motive bindende Proteine gehen eine stabile Interaktion mit der DNA ein, indem sie als Dimere binden, z.B. E2-Proteine (McBride *et al.*, 1989) oder ELK-1 (Drewett *et al.*, 2000). Hier konnte gezeigt werden, daß auch PBF-Moleküle *in vitro* miteinander interagieren, d. h. in der Lage sind Dimere oder Oligomere zu bilden. Durch Interaktionsexperimente mit der PBF-Deletionsmutante Δ N-PBF wurde herausgefunden, daß die für die Interaktion notwendigen AS nicht im N-terminalen Bereich des Proteins enthalten sind. Auch die Mutante mit dem zerstörten Zinkfinger konnte an PBF binden, so daß dieses Motiv auch bei dieser Protein-Protein-Interaktion keine Rolle zu spielen scheint. Wie die Interaktionsdomäne aufgebaut ist und wo sie lokalisiert ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Weiterhin ist unklar, ob die Dimerisierung der PBF-Moleküle für die DNA-bindende Funktion notwendig ist. Jedoch hätte man aufgrund der Tatsache, daß PBF in der Lage ist Dimere zu bilden, vermutet, daß mit dem durchgeführten Hefe-Two-Hybrid-System auch PBF-kodierende cDNAs isoliert würden, was aber nicht der Fall war. Es könnte sein, daß durch die Fusion des PBF mit der Gal4 DNA-bindenden- bzw. Aktivierungsdomäne aus sterischen Gründen eine Interaktion verhindert wurde. Außerdem könnte die Interaktion mit dem 14-3-3 Protein stärker sein als die Bildung von Homodimeren, so daß die 14-3-3-exprimierenden Klone das stärkste Wachstum erzielten und selektioniert wurden.

5.2 Die Rolle von PBF bei der PV-Genexpression

Die gezeigten Daten weisen darauf hin, daß die Bindung von PBF für die volle Promotoraktivität von P₇₅₃₅ und P₇₁₈₅ nötig ist. Die Rolle von PBF bei der Regulation der PV-Genexpression wurde durch die Einführung von Punktmutationen, die die Bindung von PBF *in vitro* verhindern, in Reporterkonstrukte gezeigt (Abb.12 und 14). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß die Abnahme der Promotoraktivität nicht auf den Verlust der Bindung von PBF zurückzuführen ist, sondern die eingeführten Mutationen die Bindung von anderen, an der Aktivierung des Promotors beteiligten, Faktoren betreffen. Zum Beispiel könnten Punktmutationen, die unmittelbar vor der TATA-Box des P₇₅₃₅ liegen, die Bindung des Transkriptionsfaktors TFIIB verhindern. Es wurde gezeigt, daß die Sequenz stromaufwärts der TATA-Box die Fähigkeit von TFIIB, in den Transkriptionskomplex einzutreten, beeinflußt, und zwar werden offensichtlich bis zu sieben Nukleotide mit der Konsensussequenz G/C,G/C,G/A,CGCC stromaufwärts von TFIIB kontaktiert. Die effiziente Bindung von TFIIB korreliert mit einer erhöhten Basalaktivität des Promotors *in vitro* (Lagrange *et al.*, 1998). Die in das HPV8-NCR-Reporterkonstrukt eingeführten Nukleotidaustausche liegen unmittelbar vor der TATA-Box des P₇₅₃₅ (Abb. 12). Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, daß die Mutationen die Bindung von TFIIB an die DNA schwächen,

da die eingeführten Nukleotidaustausche die Affinität von TFIIB an die DNA vermutlich noch erhöhen. Zusätzlich würde man annehmen, daß die der TATA-Box benachbarten Nukleotide einen stärkeren Einfluß auf die Bindung ausüben, als weiter stromaufwärts liegende Nukleotide. Der Verlust der P₇₅₃₅-Aktivität in den Konstrukten mit den weiter stromaufwärts eingeführten Mutationen ist jedoch stärker als bei dem Konstrukt p8/P2E-Luc, das Mutationen enthält, die unmittelbar vor der TATA-Box lokalisiert sind (Abb. 12). Das Absinken der P₇₅₃₅-Aktivität könnte daher im Verlust der Bindung eines zellulären Faktors begründet sein. Des weiteren liegen die in den BPV1-Reporterkonstrukten eingeführten Mutationen stromabwärts der TATA-Box (Abb. 14), so daß hier ein Einfluß auf die Bindung des TFIIB auszuschließen ist.

Im Fall von BPV1 verursachte der Verlust der Bindung von PBF an die BS-1 einen größeren Abfall der P₇₁₈₅-Aktivität in RTS3b-Zellen als in C33A-Zellen (Abb.14). Dieser Unterschied trat noch deutlicher bei der Verwendung der synthetischen Reporterkonstrukte hervor (Abb. 17). Während in RTS3b-Zellen ein starker Synergismus bei der Aktivierung des MLP zwischen drei BS-1 auftrat, konnte dies in C33A-Zellen nicht beobachtet werden. Schon früher konnten Unterschiede bei der Regulation des BPV1 P₇₁₈₅ in diesen beiden Zelllinien beobachtet werden (Schmidt *et al.*, 1997). Zum Beispiel reduzierte eine Mutation in BS-1 (mt1), die die RUNX1-Bindung *in vitro* verhindert, die P₇₁₈₅-Aktivität eines Luciferase-Konstruktes in C33A-Zellen nur unwesentlich, während sie in RTS3b-Zellen um die Hälfte absank. Diese Unterschiede konnten mit sehr geringen Mengen an endogenem RUNX1 in C33A-Zellen korreliert werden (Schmidt *et al.*, 1997). Falls PBF RUNX1 zur Aktivierung der Transkription benötigt, wäre die stärkere Reduktion der Promotoraktivität in RTS3b-Zellen aufgrund der Mutation im PBF-Element eine Folge der höheren Menge an endogenem RUNX1 in dieser Zelllinie (Schmidt *et al.*, 1997). Über die Menge an endogenem PBF in diesen beiden Zelllinien läßt sich noch keine abschließende Aussage treffen, jedoch scheinen RTS3b-Zellen mehr PBF zu besitzen als C33A-Zellen, worauf der EMSA in Abb. 16 B hindeutet. Das Modell, daß die beiden Faktoren, RUNX1 und PBF, miteinander kooperieren, wird durch die Daten unterstützt, die mit den synthetischen Reporterkonstrukten, bestehend aus mehreren Kopien der E2 BS-1 vor dem MLP, gewonnen wurden (Abb. 17). Der Verlust der Aktivierung aufgrund der eingeführten Mutationen in das RUNX1-Motiv weist darauf hin, daß PBF alleine nicht in der Lage ist, den Promotor zu aktivieren, sondern auf RUNX1 als Kooperationspartner angewiesen ist. Eine Mutation in der PBF-Bindestelle eliminiert ebenfalls die Aktivierung, was nahelegt, daß auch RUNX1 mit PBF kooperieren muß, um

effizient zu aktivieren. Es konnte bereits früher gezeigt werden, daß RUNX1 nicht in der Lage ist, über multimerisierte Bindestellen zu aktivieren (Bruhn *et al.*, 1997). Zudem ist RUNX1 bekannt dafür, die Transkription durch Kooperation mit anderen zellulären Faktoren zu regulieren, z.B. Ets-1, c-Myb, C/EBP α , MITF und Smads (Zaiman *et al.*, 1998; zusammengefaßt in: Ito, 1999). Dies weist darauf hin, daß PBF ein weiterer neuer Kooperationspartner von RUNX1 ist.

Die Möglichkeit der Kooperation zwischen PBF und RUNX1 wird auch durch die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse bestätigt. Im EMSA wurde gezeigt, daß beide Proteine gleichzeitig an P2 binden konnten und sich nicht gegenseitig verdrängten (Abb. 11). Der Mechanismus der gemeinsamen Aktivierung ist noch nicht geklärt. Es konnte jedoch in EMSA-Experimenten mit gereinigten, bakteriell exprimierten Proteinen eine kooperative Bindung von RUNX1 und PBF an die DNA nachgewiesen werden. Eine direkte Interaktion zwischen RUNX1 und PBF könnte die Grundlage hierfür sein (Eva Weyhing, persönliche Mitteilung).

Obwohl RUNX1 *in vivo* an P2 bindet, konnte im Rahmen der mit P2TATA und Kernextrakten durchgeführten EMSA-Experimente kein Komplex detektiert werden, der der Bindung von RUNX1 an P2 entspräche. Es ist bekannt, daß RUNX1 an diese Sequenz bindet, da EMSA-Experimente mit der Bindestelle PEA2 des Polyoma Virus Enhancer, an die RUNX1 mit hoher Affinität bindet, gezeigt haben, daß die Bindung von RUNX1 an PEA2 mit einem Überschuß an P2TATA gut kompetiert werden konnte (Schmidt *et al.*, 1997). In einem hier durchgeführten EMSA konnte unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur eine schwache Bindung von RUNX1 an PEA2 nachgewiesen werden, und die Konkurrenz durch P2TATA war sehr gering (Daten nicht gezeigt). Es könnte deshalb sein, daß RUNX1 im Komplex mit P2 vorliegt, aber die endogene Menge an RUNX1 so klein ist, daß sie im EMSA wegen der verminderten Affinität zu P2 und BS-1 (Schmidt *et al.*, 1997) keinen sichtbaren Komplex formt.

PBF wurde über dessen Eigenschaft an die Repression vermittelnde E2 BS P2 zu binden isoliert. Die völlige Überlappung der beiden Erkennungssequenzen impliziert bereits, daß die Bindung von E2 und PBF nicht gleichzeitig stattfinden kann, was experimentell belegt wurde (Abb. 15). In Anbetracht der großen Sequenzhomologie zwischen dem PBF- und E2-Bindungsmotiv existiert eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß die beiden Bindestellen kolokalisieren. In BPV1 enthalten fünf der insgesamt 17 E2-Bindestellen eine mögliche PBF

BS und zwar: BS-1, BS-3, BS-9, BS-11 und BS-17. Die meisten dieser Bindestellen vermitteln keine Repression durch E2. Zum Beispiel spielt BS-9 eine essentielle Rolle im „E2 responsive enhancer I“ und ist dort für die Aktivierung der Promotoren an Position 7940 und 89 verantwortlich (Spalholz *et al.*, 1987). Da jedoch noch ungeklärt ist, wie die dem CCGG-Motiv benachbarten Nukleotide die PBF-Bindung beeinflussen, könnte es sein, daß PBF diese Bindestellen nicht bindet, oder in Ermangelung eines Kooperationspartners, bei der Regulation der Transkription dort nur eine untergeordnete Rolle spielt.

PBF bindet *in vitro* auch an die HPV16 E2 BS#4, nicht aber an ein Oligonukleotid mit einer Mutation im CCGG-Motiv (mtA; Abb. 18). Eine Bindung von PBF *in vitro* und *in vivo* an BS#4 wird zum einen durch den EMSA mit dem Antiserum gegen PBF (Abb. 21) sowie durch eine schwache, aber spezifische Aktivierung des MLP, vermittelt durch PBF-Überexpression, untermauert. Die Einführung der mtA vor den Promotor P₉₇ in ein Reporterkonstrukt mit der HPV16-LCR, verursachte einen Abfall der Aktivität auf 66 % in RTS3b-Zellen und 80 % in C33A-Zellen. Im Vergleich zu den Werten der entsprechenden BPV1-Konstrukte (36 % bzw. 62 %) war dieser Effekt in beiden Zelllinien schwächer. Dies deutet darauf hin, daß PBF im Fall von HPV16 einen geringeren Einfluß auf die Basalaktivität ausübt als bei BPV1. Diese Vermutung wird auch durch die Transfektionsergebnisse mit den Konstrukten, die mehrere Kopien der BS#4 vor dem MLP enthielten, unterstützt. Während bei BPV1 BS-1 in RTS3b-Zellen der Synergismus dreier Bindestellen durch die Einführung der Mutation, die *in vitro* die Bindung von PBF verhindert, ganz verloren ging, wies das entsprechende Konstrukt mit drei Kopien der HPV16 BS#4 mtA, eine doppelt so hohe Aktivität auf wie das Konstrukt mit einer Bindestelle (Abb. 20). Das bedeutet, daß durch den Verlust der PBF-Bindung der Synergismus zwischen drei Bindestellen reduziert, aber nicht völlig aufgehoben wird. Der Bindestelle von PBF ist in BS#4 keine RUNX1- oder eine Bindestelle anderer bekannter Transkriptionsfaktoren benachbart. Dies bedeutet, daß die basale Promotoraktivität von einem unbekanntem Protein zusätzlich beeinflußt wird. Dieser hypothetische Faktor kooperiert mit PBF, zeigt aber alleine eine stärkere Aktivierung des Promotors als RUNX1 im Fall von BPV1. Da in RTS3b-Zellen nicht aber in C33A-Zellen ein Synergismus zwischen drei BS#4 mit Wildtypsequenz beobachtet wurde, könnte es sein, daß dieser unbekanntem Faktor in C33A-Zellen nicht vorhanden ist. Wie bereits erwähnt wird die Repression des Onkogen-Promotors P₉₇ unter anderem durch die Bindung von 16 E2 an die Promotor proximalen BS#3 und BS#4 und die daraus resultierende Verdrängung von Sp-1 bzw. TFIID vermittelt (Bernard, 2000). Die

vorliegenden Daten belegen, daß weitere Faktoren an HPV16 E2 BS#4 binden, die wahrscheinlich von E2 verdrängt werden.

Um mehr über den Einfluß von PBF auf die Transkription zu erfahren, wurde PBF in C33A- und RTS3b-Zellen überexprimiert. Dabei kam es in beiden Zelllinien zu einer Repression der Promotoren HPV8 P₇₅₃₅ und BPV1 P₇₁₈₅ in den entsprechenden Reporterkonstrukten (Daten nicht gezeigt). Die Repression geschah unabhängig von der Art der zu untersuchenden Bindestelle (d.h. egal ob Wildtyp, RUNX1-, PBF- oder RUNX1/PBF-bindungsdefizient). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Repression nicht sequenzspezifisch ist. Der zu Grunde liegende Mechanismus könnte zum Beispiel „Squelching“ sein, das heißt, daß erhöhte Mengen an PBF in der Zelle einen Faktor binden könnten, RUNX1 oder einen Kofaktor, der von RUNX1 und PBF gebunden wird, der dadurch weggefangen würde und für die Aktivierung der durch diesen Faktor regulierten Promotoren nicht mehr zur Verfügung stünde. Die Beobachtung, daß der Promotor des Rous Sarkoma Virus in dem zum Ausgleich der Transfektionseffizienz eingesetzten Plasmid pRSV-βGal stark reprimiert wurde, im Gegensatz zum SV40-Promotor, würde diese These stützen, denn die Promotorregion des Rous Sarkoma Virus enthält eine RUNX1-Bindestelle. Eine Beteiligung von RUNX1 bei der durch PBF-Überexpression vermittelten Repression, könnte auch eine Grundlage für die viel stärkeren repressiven Effekte in RTS3b-Zellen im Vergleich zu C33A-Zellen sein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß PBF eine reprimierende Wirkung ausübt, wenn es als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne von Gal4 exprimiert wurde. Steigende Mengen an PBF/Gal4DBD-Expressionsplasmid verursachten eine deutliche Repression des Reporters, der mehrere Gal4-Bindestellen enthielt. Dies deutet darauf hin, daß PBF Repression vermitteln kann. Ein Mechanismus hierfür könnte in der Interaktion mit SAP30 und der damit assoziierten Histon-Deacetylase-Aktivität zu finden sein. So wurde berichtet, daß SAP30, das an den Promotor geholt wird, die Transkription reprimiert, und daß dieser Effekt zumindest teilweise von der Histon-Deacetylaseaktivität abhängig ist (Zhang *et al.*, 1998). Die Interaktion zwischen PBF und SAP30 konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig bestätigt werden.

Andererseits konnte mit Hilfe von Transfektion kleiner Mengen an PBF-kodierendem Plasmid eine geringe Aktivierung des MLP beobachtet werden, wenn drei Kopien der 16BS#4 vorhanden waren. Diese Aktivierung ging in Gegenwart von drei PBF-

bindungsdefizienten Bindestellen (mtA) verloren. Einen weiteren Hinweis, daß PBF als Aktivator fungieren kann, liefern die Ergebnisse der Transfektionen mit den pBPV1/P₇₁₈₅-Luc- bzw. 8/P₇₅₃₅-Luc-Konstrukten. Hier besteht eine Korrelation zwischen dem Verlust der PBF-Bindung *in vitro* und dem Absinken der Promotoraktivität *in vivo*. Wie weiter oben bereits diskutiert wurde, benötigt RUNX1 PBF als Kooperationspartner bei der Aktivierung der Transkription.

Beispiele von Transkriptionsfaktoren, die als Aktivatoren und Repressoren fungieren sind bekannt. Auch RUNX1 kann die Transkription aktivierend oder reprimierend beeinflussen. Der spezifische Effekt wird bestimmt durch die Interaktion mit Korepressoren, z.B. Groucho/TLE/R-esp (Javed *et al.*, 2000) oder Koaktivatoren, z.B. p300 (Kitabayashi *et al.*, 1998). Dies könnte auch für PBF zutreffen, das dann durch Interaktion mit anderen Faktoren die Expression von Genen herauf- (z.B. mit p300) (C. Schnabel und G. Steger, persönliche Mitteilung) oder herunterregulieren könnte (z.B. mit SAP30). Allerdings ist vollkommen ungeklärt, wie die Interaktion mit einem Ko-Repressor bzw. Ko-Aktivator reguliert sein könnte. In der Literatur gibt es Beispiele der Regulation von Transkriptionsfaktoren durch Acetylierung bzw. Deacetylierung. Es wurde gezeigt, daß z.B. YY1 durch Interaktion mit p300 und Histon Deacetylasen (HDACs) an mehreren Stellen im Protein entsprechend modifiziert wurde, so daß sich die Eigenschaften von YY1 in Bezug auf DNA-Bindung und Assoziation mit HDAC veränderten. Dadurch wurde auch die Aktivität des von YY1 regulierten Promotors positiv oder negativ beeinflusst (Yao *et al.*, 2001).

Der beschriebene reprimierende Effekt von PBF auf die untersuchten Promotoren scheint nicht nur auf Transkriptionsebene stattzufinden. So wurde deutlich, daß Zellen (insbesondere RTS3b-Zellen), die ein PBF- bzw. EGFP/PBF-kodierendes Plasmid aufgenommen hatten, dies weniger stark exprimierten, als Zellen, die mit der gleichen Menge an Leervektor transfiziert worden waren. Durch den Hygromycin-Test konnte belegt werden, daß die Überexpression von PBF einen negativen Einfluß auf das Überleben der transfizierten Zellen hatte. Es war deutlich, daß eine große Anzahl an Zellen, die mit dem „leeren“ Plasmid transfiziert worden waren, unter der Hygromycin-Selektion weiterwuchsen. Jedoch gab es fast keine Zellen, die durch die Aufnahme des gleichen Plasmids, das zusätzlich den offenen Leserahmen für PBF enthielt, in hygromycinhaltigem Medium überleben konnten. Auf welchem Weg PBF die Zellen beeinflusst ist nicht geklärt, es könnte aber Apoptose induzieren. Der Versuch, PBF-induzierte Apoptose mittels FACS-Analyse in RTS3b-Zellen,

die mit einem Expressionsplasmid für PBF transient transfiziert worden waren, nachzuweisen, gelang leider nicht.

Um mehr über die Funktion von PBF zu lernen, wurde mit dem Hefe-Two-Hybrid-System nach Interaktionspartnern von PBF gesucht. Ein auf diesem Weg identifizierter Faktor ist das 14-3-3-Protein. Die 14-3-3-Familie besteht aus hoch konservierten Proteinen, die in allen untersuchten Eukaryoten exprimiert werden. In Säugetieren existieren sieben verschiedene Isoformen β , γ , ϵ , η , σ , τ und ζ (Rosenquist *et al.*, 2000), in *S. cerevisiae* gibt es zwei essentielle Isoformen (van Heusden *et al.*, 1995). Der im Rahmen dieser Arbeit isolierte Leserahmen kodiert für die β -Isoform. Für 14-3-3 Proteine wurden *in vivo* über 100 zelluläre Bindungspartner nachgewiesen (zusammengefaßt in: van Hemert *et al.*, 2001), die *in vitro* an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind: z.B. an der Signaltransduktion der stressvermittelten Zellantwort durch Raf (Freed *et al.*, 1994), der Kontrolle des Zellzyklus über p53 (Waterman *et al.*, 1998) und Cdc25C (Peng *et al.*, 1997), der Apoptose (Masters and Fu, 2001), der Organisation des Zytoskeletts und der Regulation der Transkription (zusammengefaßt in: Tzivion *et al.*, 2001). Ein Mechanismus dieser Kontrolle beruht auf der, durch 14-3-3-Proteine geregelten, unterschiedlichen Lokalisation von Proteinen in der Zelle (Grozinger and Schreiber, 2000; Eckardt, 2001). Die verschiedenen Eigenschaften der 14-3-3-Proteine werden auf deren Fähigkeit, an spezifische Phosphoserin/Threonin-Reste zu binden zurückgeführt. Sie interagieren vorzugsweise mit phosphorylierten Proteinen, die häufig eines der für 14-3-3-Proteine identifizierten Bindemotive enthalten: RSXpSXP (Modell 1) oder RXXXpSXP (Modell 2) (Yaffe *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung dieser Motive wird zum Beispiel von den Proteinkinasen A, B und C katalysiert (Tzivion and Avruch, 2002). Die Aminosäuresequenz von PBF weist mehrere Abschnitte auf, in denen ein Serin in dem beschriebenen Kontext vorhanden ist. Besonders am 3'-Ende sind zwei mögliche 14-3-3 Bindemotive in räumlicher Nähe enthalten. Es konnte gezeigt werden, daß das von dem isolierten Leserahmen kodierte 14-3-3 β Protein *in vitro* mit PBF interagiert (Eva Weyhing, persönliche Mitteilung). 14-3-3 Proteine, die insgesamt einen inhibitorischen Effekt auf das Fortschreiten des Zellzyklus und der Apoptose ausüben (Masters and Fu, 2001; van Hemert *et al.*, 2001), könnten durch die unphysiologisch hohe Menge an PBF, die sich durch Überexpression in der Zelle bildet, austitriert werden, so daß 14-3-3 Protein nicht mehr für andere Aufgaben, wie z.B. die Inhibition der Apoptose (Masters and Fu, 2001) zur Verfügung stünde. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das Absterben der C33A- und RTS3b-Zellen nach Transfektion mit einem PBF-kodierenden Plasmid.

Ein weiterer Faktor, der mit PBF interagieren könnte und Aufschluß über dessen zelluläre Funktion geben könnte, ist SAP30. Es handelt sich um ein in Eukaryoten konserviertes Protein, das Mitglied eines Histon-Deacetylase-Komplexes ist (Zhang *et al.*, 1998). Das SAP30-kodierende Plasmid wurde zusammen mit einem 14-3-3 Protein-kodierenden Plasmid aus einem einzelnen Hefeklon isoliert. Daher ist es fraglich, ob SAP30 die Aktivierung des Reporters verursacht hatte oder ob sie, wie in den restlichen Hefeklonen geschehen, über das 14-3-3 Protein erfolgte. Um dies zu prüfen, müßte das SAP30-kodierende Plasmid in Hefe retransformiert werden, was aus zeitlichen Gründen leider nicht mehr möglich war. Inzwischen gibt es jedoch Hinweise auf eine mögliche Interaktion von PBF und SAP30 *in vitro*. Weiterhin wurde computergestützt nach Proteinen gesucht, die mit PBF verwandt sein könnten oder gemeinsame Merkmale aufweisen. Ein solcher Faktor ist der aus der Maus stammende GLUT4 (adipose-/muscle specific glucose transporter 4) enhancer factor. Dieses Protein weist 35% Homologie zu PBF auf, bindet an das GGCC-Element im GLUT4-Promotor und kooperiert mit MEF2 (myocyte enhancer factor 2) bei der GLUT4-Transkription (Oshel *et al.*, 2000). Beide Faktoren scheinen ähnliche Bindungseigenschaften für G/C-reiche Sequenzen zu besitzen und kooperieren mit einem weiteren Faktor bei der Regulation der Transkription.

5.3 Der RTS3b-Faktor

Die vorliegenden Experimente weisen auf die Existenz eines weiteren Faktors hin, der an die Repression vermittelnde BS#4 von HPV16 bindet und in Kernextrakten aus RTS3b-Zellen nachgewiesen wurde. Im EMSA-Experiment mit der radioaktiv markierten HPV16 E2 BS#4 und Kernextrakten aus RTS3b-Zellen wurde der Komplex 16/B durch die Inkubation mit dem PBF-Antiserum schwächer, während ein neuer Komplex 16/C entstand (Abb. 21). Dies bedeutet, daß der Komplex 16/B neben PBF wahrscheinlich einen weiteren zellulären Faktor enthält. Der Vergleich der Komplexe 16/B und 8/B zeigt, daß deren Zusammensetzungen unterschiedlich sind. Im Gegensatz zu Komplex 16/B migrierte 8/B schneller (Abb. 27), und die Entstehung dieses Komplexes wurde durch α PBF verhindert. Das bedeutet, daß in 8/B PBF für die Bindung an die DNA entscheidend ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß auch hier noch ein weiterer Faktor beteiligt ist. Eventuell könnte auch eine Modifikation von PBF in eukaryoten Zellen der Grund für das langsamere Laufverhalten von 8/B gegenüber prokaryot exprimiertem PBF sein.

Untersuchungen des Komplexes 16/B ergaben, daß dessen Bindungseigenschaften an BS#4 größtenteils mit denen von rPBF übereinstimmen. Es gibt jedoch kleine Unterschiede in der

Affinität zu den Mutanten mtG1 (wurde von den zellulären Proteinen gebunden) und mtG2 (hier band rPBF schwach). Der Hauptunterschied besteht darin, daß sich der Komplex 16/B, im Gegensatz zu rPBF, nicht durch einen Überschuß an HPV8 P2 kompetieren ließ (Abb. 27). Falls PBF in dem Komplex 16/B vorhanden ist und eine Rolle bei der DNA-Bindung spielt, worauf die hier gezeigten Daten hinweisen, würde dies bedeuten, daß die Affinität von PBF zu P2 durch die Gegenwart eines weiteren zellulären Faktors aus RTS3b-Kernextrakten vermindert würde. Wie bereits oben erwähnt enthielte der Komplex 8/B nicht die gleichen Proteine wie Komplex 16/B. Es kann im Moment auch nicht ausgeschlossen werden, daß PBF *in vitro* zwar an 16 BS#4 binden kann, *in vivo* aber keinen Zugang zur DNA hat, da die Bindestelle bereits von einem anderen Faktor besetzt ist. Die Ergebnisse des ONPG-Tests mit dem retransformierten cDNA-Plasmid von Δ N-PBF in verschiedene Hefestämme, weisen darauf hin, daß PBF in Hefe nicht an HPV16 BS#4 bindet. Während PBF das integrierte Reporterkonstrukt über mehrere HPV8 P2-Bindestellen stark aktivierte, zeigte 16pLacZi nach der Transformation mit dem Δ N-PBF-kodierenden Plasmid keine erhöhte Aktivität gegenüber der Kontrolle. Das bedeutet, daß Δ N-PBF in Hefen funktional ist, da es an P2 bindet, und obwohl es *in vitro* an BS#4 bindet, scheint es zu dieser Bindestelle in Hefe nur eine geringe Affinität zu besitzen.

Dieser in RTS3b-Kernextrakten enthaltene Faktor ist auch in HaCat-Zellen und in geringen Mengen in primären Keratinozyten vorhanden, nicht aber in C33A-, HeLa-, SiHa- oder COS7-Zellen sowie wahrscheinlich nicht in C127i-Zellen. Alle diese Zellen bzw. Zelllinien sind humanen Ursprungs, außer C127i (Maus) und COS7 (Affe). Die menschlichen Zelllinien, die den unbekanntem Faktor nicht enthalten, wurden alle aus Karzinomen der Zervix isoliert und sind nicht mehr in der Lage zu differenzieren. Die Zelllinien hingegen, die den in RTS3b-Zellen gefundenen Faktor enthalten, stammen aus der Haut, sind epithelial und voll differenzierungsfähig (prim. Keratinozyten, HaCat) oder besitzen ein eingeschränktes Differenzierungspotential (RTS3b-Zellen; Sigrun Smola, persönliche Mitteilung). Somit korreliert der Nachweis des Komplex 16/B mit der Differenzierungsfähigkeit und mit der kutanen Abstammung der Zellen. Da es sich bei HPV16 um einen genitalen HPV-Typ handelt wäre es interessant, die Gegenwart dieses Komplexes in Kernextrakten aus nicht malignen, zervikalen Keratinozyten zu überprüfen. Dieser „RTS3b-Faktor“ muß noch identifiziert werden, um ihm eventuell eine Rolle bei der Regulation der Papillomviren sowie bei der Differenzierung der Keratinozyten zuordnen zu können. Seine Expression korreliert mit dem Auftreten von Synergismus zwischen mehreren HPV16 BS#4 bei der Aktivierung des MLP in

RTS3b-Zellen und nicht in C33A-Zellen.

Eventuell handelt es sich bei diesem Faktor um RAI, der im Hefe-One-Hybrid-System der am häufigsten gefundene Faktor war. RAI (**RelA-associated inhibitor**) wurde ursprünglich mit Hilfe einer Hefe-Two-Hybrid-Suche als Bindungspartner der p65(RelA)-Untereinheit von NF- κ B isoliert, und die mRNA des Inhibitors konnte in Herz, Lunge und Prostata nachgewiesen werden. Das RAI-Gen kodiert ein Protein, das homolog zum C-terminalen Bereich von 53BP2 ist, und vier aufeinanderfolgende Ankyrin-Motive und eine Src-Homologie-Domäne besitzt. RAI kolokalisiert mit TNF- α induziertem endogenem NF- κ B p65 im Kern und inhibiert die Aktivität von endogenem NF- κ B. Durch Kotransfektionsversuche mit p65 und RAI konnte gezeigt werden, daß RAI spezifisch die DNA-Bindung von RelA inhibiert (Yang *et al.*, 1999). In den Datenbanken existieren mehrere RAI-Sequenzen, die aufgrund von Leserasterverschiebungen in Sequenz und Länge variieren. Die Genbank-Zugangsnummer des längeren Klon ist XM030918 (hier nur „XM“ genannt), und die des kürzeren AF078037. Beiden Klonen gemeinsam sind die 717 Nukleotide (= 239 AS) des 3`-Endes und die 3`UTR. Die Leserahmen dreier von uns isolierter Klone kodieren für den XM-Typ. Mittels PCR wurden der XM-Leserahmen bzw. das 3`-Ende amplifiziert, in den prokaryoten Expressionsvektor pET14b ligiert und in Bakterien exprimiert. EMSA-Experimente, die mit den beiden aufgereinigten Proteinen durchgeführt wurden, zeigten keine spezifische Bindung *in vitro* an HPV16 BS#4. Ein Grund hierfür könnten die gewählten Bedingungen im EMSA sein, so daß die Proteine unter den verwendeten Salzkonzentrationen, etc. nicht binden konnten. Es könnte auch sein, daß in der eukaryoten Hefe RAI modifiziert vorliegt, dieser Schritt in Bakterien aber fehlt, so daß RAI deshalb nicht in der Lage sein könnte an die DNA zu binden. Eine weitere Erklärung wäre, daß RAI für die Bindung an die DNA einen Partner benötigt, der in der Hefe vorhanden ist, unter den *in vitro* Bedingungen aber fehlt. RAI bindet in Hefe spezifisch an HPV16 BS#4, wie mit Hilfe der Retransformation von zwei verschiedenen RAI-cDNA-Plasmiden bestätigt wurde.

Zusammenfassend, weisen die gezeigten Daten darauf hin, daß der im Laufe dieser Arbeit identifizierte Faktor PBF durch die Bindung an seine Erkennungssequenz, die mit Repression vermittelnden E2 Bindestellen überlappt, die Transkription von Promotoren in BPV1, HPV8 und HPV16 stimuliert. In allen Fällen scheint PBF mit einem weiteren Protein zu kooperieren, im Fall von BPV1 und HPV8 ist dies RUNX1, bei HPV16 könnte es ein bisher nicht identifiziertes Protein sein. Es konnte jedoch noch nicht gezeigt werden, daß PBF ein

Aktivator der Transkription *per se* ist. Untersuchungen bezüglich der Rolle von 14-3-3 Protein und SAP30 im Zusammenhang mit PBF könnten zu entscheidenden Hinweisen für die Funktion von PBF bei der Regulation der PV-Genexpression sowie in der Zelle führen.

6. Literaturverzeichnis

- Alexandre, C., D.A. Grueneberg, and M.Z. Gilman. 1993. Studying heterologous transcription factors in yeast. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* **5**:147-155.
- Angelos, J.A., E. Marti, S. Lazary, and L.E. Carmichael. 1991. Characterization of BPV-like DNA in equine sarcoids. *Arch. Virol.* **119**:95-109.
- Apt, D., T. Chong, Y. Liu, and H.U. Bernard. 1993. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **67**:4455-4463.
- Auersperg, N. 1964. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*. **32**:135-148.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (Herausg.). 1997. *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 1-3. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Baker, C.C. 1993. The genomes of papillomaviruses. In: S.J. O'Brien (Herausg.), Genetic maps: locus maps of complex genomes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1.134-1.146.
- Baker, C.C. and P.M. Howley. 1987. Differential promoter utilization by the bovine papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO J.* **6**:1027-1035.
- Bartel, P.L., C.-T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: *Cellular interactions in development: A practical approach*. Herausg.: Hartley, D.A., Oxford University Press, Oxford. S. 153-179.
- Benson, J.D., R. Lawande, and P.M. Howley. 1997. Conserved Interaction of the Papillomavirus E2 Transcriptional Activator Protein with Human and Yeast TFIIB Proteins. *J. Virol.* **71(10)**:8041-8047.
- Bernard, H.-U. 2000. Regulation of the Transcription of Genital Human Papillomaviruses by CDP, Nucleosomes and Nuclear Matrix Attachment Regions. Review. *Papillomavirus Report* **11(4)**:73-80.
- Boeckle, S. 1998. Isolierung des zellulären Proteins, das an die CACCC-Sequenz in der NCR von HPV8 bindet und für die basale Aktivität des Promotors P₇₅₃₅ mit verantwortlich ist. *Diplomarbeit*. Institute of Virology, University of Cologne.
- Bouallaga, I., S. Massicard, M. Yaniv, and F. Thierry. 2000. An enhanceosome containing the Jun B/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV18 transcriton. *EMBO Reports* **1(5)**:422-427.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* **106(3)**:761-771.
- Bouvard, V., A. Storey, D. Pim, and L. Banks. 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of *trans*-activation and *trans*-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* **13**:5451-5459.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Bioch.* **72**:248-254.
- Breiding, D.E., F. Sverdrup, M.J. Gressel, N. Moscufo, W. Boonchai, and E.J. Androphy. 1997. Functional Interaction of a Novel Cellular Protein with the Papillomavirus E2 Transactivation Domain. *Mol. Cell. Biol.* **17(12)**:7208-7219.
- Bruhn, L., A. Munnerlyn, and R. Grosschedl. 1997. ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR α enhancer function. *Genes Dev.* **11**:640-653.

- Chan, W.K., T. Chong, H.U. Bernard, and G. Klock.** 1990. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP-1 binding sites. *Nucleic Acids Res.* **18**:763-769.
- Chen, G. and A. Stenlund.** 1998. Characterization of the DNA-binding domain of the bovine papillomavirus replication initiator E1. *J. Virol.* **72**:2567-2576.
- Choo, K.-B., C.-C. Pan, M.-S. Liu, H.-T. Ng, C.-P. Chen, C.-P. Lee, C.-L. Chao, C.-L. Meng, M.-Y. Yeh, and S.-H. Han.** 1987. Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma. *J. Med. Virol.* **21**:101-107.
- Chung, C.T. and R.H. Miller.** 1988. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* **16**:3580.
- Crook, T. and K.H. Vousden.** 1996. In: Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses. Herausg.: C. Lacey, Leeds University Press, Leeds.
- Day, P.M., R.B.S. Roden, D.R. Lowy, and J.T. Schiller.** 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* **72**:142-150.
- de Villiers, E.-M.** 2001. Taxonomic Classification of Papillomaviruses. Review. *Papillomavirus Report* **12(3)**:57-63.
- Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry.** 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* **71**:9343-9349.
- Demeret, C., M. Yaniv, and F. Thierry.** 1994. The E2 transcriptional repressor can compensate for SP1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J. Virol.* **68**:7075-7082.
- Demeter, L.M., M.H. Stoler, T.R. Broker, and L.T. Chow.** 1994 Induction of proliferating cell nuclear antigen in differentiated keratinocytes of human papillomavirus-infected lesions. *Hum. Pathol.* **25(4)**:343-8.
- Doerfler, W.** 1991. Patterns of DNA methylation - evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defence mechanism. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **372**:557-564.
- Dong, G., T.R. Broker, and L.T. Chow.** 1994a. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J. Virol.* **68(2)**:1115-27.
- Dong, X.-P. and H. Pfister.** 1999. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **80**:2097-2101.
- Dong, X.-P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler, and H. Pfister.** 1994b. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* **58**:803-808.
- Dostatni, N., P.F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P.M. Howley, and M. Yaniv.** 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* **5**:1657-1671.
- Drewett, V., S. Muller, J. Goodall, and P.E. Shaw.** 2000. Dimer Formation by Ternary Complex Factor ELK-1. *J. Biol. Chem.* **275(3)**:1757-1762.
- Dürst, M., A. Kleinheinz, M. Hotz, and L. Gissmann.** 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.* **66**:1515-1522.
- Dürst, M., D. Glitz, A. Schneider, and H. zur Hausen.** 1992. Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by *in situ* hybridization. *Virology* **189**:132-140.

- Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger, and E. Harlow.** 1989. The human papillomavirus –16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**:934-937.
- Eckardt, N.A. (Herausg.)** 2001. Transcription Factors Dial 14-3-3 for Nuclear Shuttle. *Plant Cell* **13**:2385-2389.
- Feilotter, H.E., G.J. Hannon, C.J. Ruddel, and D. Beych.** 1994. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**:1502-1503.
- Frattini, M.G. and L.A. Laimins.** 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12398-12402.
- Freed, E., M. Symons, S.G. McDonald, F. McCormick, and R. Ruggieri.** 1994. Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation. *Science* **265**:1713-1716.
- Fuchs, P.G and H. Pfister.** 1996. Papillomaviruses in epidermodysplasia verruciformis. In: Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses. Herausg.: C, Lacey, Leeds University Press, Leeds.
- Fuchs, P.G. and H. Pfister.** 1997. Molecular biology of HPV and Mechanisms of keratinocyte transformation. In: Human papillomavirus infections in dermatovenereology. Herausg.: G. Gross and G. van Krogh. *CRC Press, Boca Raton*; 15-46.
- Gey, G.O., W.D. Coffman, and M.T. Kubicek.** 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**:264-265.
- Gillison, M.L., W.M. Koch, R.B. Capone, M. Spafford, W.H. Westra, L. Wu, et al.** 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**:709-720.
- Gillitzer, E., G. Chen, and A. Stenlund.** 2000. Separate domains in E1 and E2 proteins serve Architectural and productive roles for cooperative DNA binding” *EMBO J.* **19(12)**:3069-3079.
- Giroglou, T., L. Florin, F. Schäfer, R.E. Streeck, and M. Sapp.** 2001. Human Papillomavirus Infection Requires Surface Heparan Sulfate. *J. Virol.* **75(3)**:1565-1570.
- Gloss, B. and H.U. Bernard.** 1990. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *J. Virol.* **64**:5577-5584.
- Grozinger, C.M. and S.L. Schreiber.** 2000. Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *PNAS* **97(14)**:7835-7840.
- Haller, K., F. Stubenrauch, and H. Pfister.** 1995. Differentiation-dependent transcription of the *epidermodysplasia verruciformis*-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* **214**:245-255.
- Ham, J., N. Dostatni, J.M. Gauthier, and M. Yaniv.** 1991. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *TIBS* **16**:440-444.
- Higgins, G.D., D.M. Uzelin, G.E. Philips, P. McEvoy, R. Marin, and C.J. Burrell.** 1992. Transcription pattern of human papillomavirus type 16 in genital intraepithelial differentiation. *J. Gen. Virol.* **73**:2047-2057.
- Hoffman, C.S. and F. Winsten.** 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267-272.

- Horn, S., H. Pfister, and P.G. Fuchs.** 1993. Constitutive Transcriptional Activator of *Epidermodysplasia verruciformis*-Associated Human Papillomavirus 8. *Virology* **196**:674-681.
- Howley, P.** 1996. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, third edition. Herausg.: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Hummel, M., J.B. Hudson, and L.A. Laimins.** 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J.Virol.* **66**:6070-6080.
- IARC.** 1995. *Monograph No. 64, Lyon.*
- Ishiji, T., M.J. Lace, S. Parkkinen, R.D. Anderson, T.H. Haugen, T.P. Cripe, J.-H. Xiao, I. Davidson, P. Chambon, and L.P. Turek.** 1992. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific coactivator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* **11**:2271-2281.
- Ito Y.** 1999. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the *runt* domain transcription factor PEBP2/CBF. Review *Genes to Cells* **4**:685-696.
- Jackson, M.E. and M.S. Campo.** 1995. Both Viral E2 Protein and the Cellular Factor PEBP2 Regulate Transcription via E2 Consensus Sites within the Bovine Papillomavirus Type 4 Long Control Region. *J. Virol.* **69(10)**:6038-6046.
- Jacyk W.K., and E.M. de Villiers.** 1993. Epidermodysplasia verruciformis in Africans. *Int. J. Dermatol.* **32**:806-810.
- Javed, A., B. Guo, S. Hiebert, J.-Y. Choi, J. Green, S.-C. Zhao, M.A. Osborne, S. Stifani, J.L. Stein, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, and G.S. Stein.** 2000. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF α /AML/PEBP2 α) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J. Cell Science* **113**:2221-2231.
- Joyce, J.G., J.-S. Tung, C.T. Przysiecki, J.C. Cook, E.D. Lehman, J.A. Sands, K.U. Jansen, and P.M. Keller.** 1999. The L1 major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 1 Recombinant Virus-like Particles Interact with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274(9)**:5810-5822.
- Kaiser, P. and B. Auser.** 1993. Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to *E. coli*. *Biotechniques* **14**:552.
- Kennedy, I.M., J.K. Haddow, and J.B. Clements.** 1990. Analysis of human papillomavirus type 16 late mRNA 3' processing signals *in vitro* and *in vivo*. *J.Virol.* **64**:1825-1829.
- Kitabayashi, I., A. Yokoyama, K. Shimizu, and M. Ohki.** 1998. Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.* **17**:2994-3004.
- Klingelutz, A.J., S.A. Foster, and J.K. McDougall.** 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**:79-82.
- Klussmann, J.P., S.J. Weissenborn, U. Wieland, V. Dries, J. Kolligs, M. Jungehueling, H.E. Eckel, H.P. Dienes, H. Pfister, and P.G. Fuchs.** 2001. Prevalence, Distribution, and Viral Load of Human Papillomavirus 16 DNA in Tonsillar Carcinomas. *Cancer* **92(11)**:2875-2884.
- Kukimoto, I and T. Kanda.** 2001. Displacement of YY1 by Differentiation-Specific Transcription Factor hSkn-1a Activates the P₆₇₀ Promoter of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* **75(19)**:9302-9311.
- Kyo, S., D.J. Klumpp, M. Inoue, T. Kanaya, and L.A. Laimins.** 1997. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *Gen Virol* **78(Pt 2)**:401-411.

- Kyo, S., M. Inoue, Y. Nishio, K. Nakanishi, S. Akira, S. Inoue, M. Yutsudo, O. Tanizawa, and A. Hakura. 1993. NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region. *J. Virol.* **67**:1058-1066.
- Lagrange, T., A.N. Kapanidis, H. Tang, D. Reinberg, and R.H. Ebright. 1998. New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* **12**:34-44.
- Lee, D., B.J. Lee, J.H. Kim, D.H. Kim, and J. Choe. 2000. CAMP response element binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2 dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **275**:7045-7051.
- Lee, J.S., R.H. See, K.M. Galvin, J. Wang, and Y. Shi. 1995. Functional interactions between YY1 and adenovirus E1A. *Nucleic Acids* **23**:925-931.
- Li, R., J. Knight, G. Bream, A. Stenlund, and M. Botchan. 1989. Specific recognition nucleotides and their DNA context determine the affinity of E2 protein for 17 binding sites in the BPV-1 genome. *Genes Dev.* **3**:510-526.
- Li, R., J.D. Knight, S.P. Jackson, R. Tjian, and M.R. Botchan. 1991. Direct Interaction between Sp1 and the BPV Enhancer E2 Protein Mediates Synergistic Activation of Transcription. *Cell* **65**:493-505.
- List, H.-J., V. Patzel, U. Zeidlers, A. Schopen, G. Rühl, J. Stollwerk, and G. Klock. 1994. Methylation sensitivity of the enhancer from the human papillomavirus type 16. *J. Biol. Chem.* **269**(16):11902-11911.
- Lu, S.Y., M. Rodriguez, and W.S. Liao. 1994. YY1 represses rat serum amyloid A1 gene transcription and is antagonized by NF- κ B during acute-phase response. *Mol. Cell. Biol.* **14**:6253-6263.
- Luo, Y., S. Vijaychander, J. Stile, and L. Zhu. 1996. Cloning and analysis of DNA-binding proteins by yeast one-hybrid and two-hybrid systems. *BioTechniques* **20**:564-568.
- Maniatis, T., J. Sambrook, and E.E. Fritsch. 1989. Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.*
- Mansur, C.P. and E.J. Androphy. 1993. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. *Biochem. Biophys. Acta* **1155**:323-345.
- Masters, S.C. and H. Fu. 2001. 14-3-3 Proteins Mediate an Essential Anti-apoptotic Signal. *J. Biol. Chem.* **276**(48):45193-45200.
- Masterson, P.J., M.A. Stanley, A.P. Lewis, and M.A. Romanos. 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase α -primase p68 subunit. *J. Virol.* **72**:7407-7419.
- May, M., X.-P. Dong, E. Beyer-Finkler, F. Stubenrauch, P.G. Fuchs, and H. Pfister. 1994. The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escape from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *EMBO J.* **13**:1460-1466.
- McBride, A.A., H. Romanczuk, and P. Howley. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. Minireview. *J. Biol. Chem.* **266**(28):18411-18414.
- McBride, A.A., J.C. Byrne, and P.M. Howley. 1989. E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: Transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:510-514.
- Mohr, I.J., R. Clark, S. Sun, E.J. Androphy, P. McPherson, and M.R. Botchan. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**:1694-1699.
- Müller, M., L. Gissmann, R.J. Cristiano, X.Y. Sun, I.H. Frazer, A.B. Jenson, A. Alonso, H. Zentgraf, and J. Zhou. 1995. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J. Virol.* **69**(2):948-954.

- Münger, K. and W.C. Phelps.** 1993. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. *Biochem. Biophys. Acta* **1155**:111-123.
- Münger, K., W.C. Phelps, V. Bubb, P.M. Howley, and R. Schlegel.** 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**:4417-4423.
- Muñoz, N.** 2000. Human papillomaviruses and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* **19**:1-5.
- Myers G., C. Baker, K. Münger, F. Sverdrup, A. McBride, and H.U. Bernard (Herausg.).** 1997. Human Papillomaviruses 1997. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos.
- Natesan, S. and M. Gilman.** 1993. DNA bending and orientation-dependent function of YY1 in c-fos promoter. *Genes Dev.* **7**:2497-2509.
- Natesan, S. and M. Gilman.** 1995. YY1 facilitates the association of serum response factor with the with the c-fos serum response element. *Genes Dev.* **15**:5975-5982.
- O'Connor, M. and H.U. Bernard.** 1995. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* **207**:77-88.
- O'Connor, M.J., S.-H. Tan, C.-H. Tan, and H.-U. Bernard.** 1996. YY1 Represses Human Papillomavirus Type 16 Transcription by Quenching AP-1 Activity. *J. Virol.* **7(10)**:6529-6539.
- Ogawa, E., M. Maruyama, H. Kagoshima, M. Imuzuka, J. Lu, M. Satake, K. Shigesada, and Y. Ito.** 1993. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila runt* gene and the human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6859-6863.
- Omichinski, J.G., P.V. Pedone, G. Felsenfeld, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore.** 1997. The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode. *nature structural bioogy* **4(2)**:122-132.
- Orth, G.** 1987. Epidermodysplasia verruciformis. The Papovaviridae. In: N.P. Salzman, P.M. Howley (Herausg.). *The Papillomaviruses*. Plenum Press, New York. 199-243.
- Oshel, K.M., J.B. Knight, K.T. Cao, M.V. Thai, and A.L. Olson.** 2000. Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **275(31)**:23666-23673.
- Ozbun, M.A. and C. Meyers.** 1998. Temporal usage of multiple promoters during the life cycle of human papillomavirus type 31b. *J. Virol.* **72**:2715-2722.
- Pajunk, H.S., C. May, H. Pfister, and P.G. Fuchs.** 1997. Regulatory interactions of transcription factor YY1 with control sequences of the E6 promoter of human papillomavirus type 8. *J. Gen. Virol.* **78(Pt 12)**:3287-3295.
- Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay.** 1999. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* **80**:827-841.
- Peng, C.Y., P.R. Graves, R.S. Thoma, Z. Wu, A.S. Shaw, and W.H. Piwnica.** 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**:1501-1505.
- Peng, Y.-C., D.E. Breiding, F. Sverdrup, J. Richard, and E.J. Androphy.** 2000. AMF-1/Gps2 Binds p300 and Enhances Its Interaction with Papillomavirus E2 Proteins. *J. Virol.* **74(13)**:5872-5879.
- Pfister, H.** 1992. Human Papillomaviruses and skin cancer. *Seminars in Cancer Biology.* **3**:263-271.
- Pfister, H. and J. ter Schegget.** 1997. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clinics in Dermatol.* **15**:335-347

- Pfister, H. and P.G. Fuchs.** 1987. Papillomaviruses: particles, genome organization and proteins. In: Papillomaviruses and human disease. Herausg.: K. Syrjänen, L. Gissmann, L.G. Koss, *et al.*
- Purdie, K.J., C.J. Sexton, C.M. Proby, M.T. Glover, A.T. Williams, J.N. Stables, and I.M. Leigh.** 1993. Malignant Transformation of Cutaneous Lesions in Renal Allograft Patients: A Role for Human Papillomavirus? *Canc. Res.* **53**:5328-5333. Nov.1.
- Puthenveetil, J.A., S.M. Frederickson, and C.A. Reznikoff.** 1996. Apoptosis in human papillomavirus 16 E7-, but not in E6-immortalized human uroepithelial cells. *Oncogene* **13**:1123-1131.
- Rank, N.M. and P.F. Lambert.** 1995. Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Transcriptional Regulators Directly Bind Two Cellular Transcription Factors, TFIID and TFIIB. *J. Virol.* **69**(10):6323-6334.
- Razin, A.** 1998. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - a three-way connection. Review. *EMBO J.* **17**(17):4905-4908.
- Rosenquist, M., P. Sehnke, R.J. Ferl, M. Sommarin, and C. Larsson.** 2000. Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? *J. Mol. Evol.* **51**:446-458.
- Rösl, F., A. Arab, B. Klevenz, and H. zur Hausen.** 1993. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* **74**:791-801.
- Sanders, C.M. and A. Stenlund,** 1998. Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor. *EMBO J.* **17**:7044-7055.
- Scheffner, M., B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine, and P.M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomaviruses types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**:1129-1136.
- Schmidt, H.-M., G. Steger, and H. Pfister.** 1997. Competitive binding of viral E2 protein and mammalian core binding factor to transcriptional control sequences of human papillomavirus type 8 and bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* **71**(10):8029-8034.
- Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner.** 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**(15):6419.
- Sedman, J. and A. Stenlund.** 1995. Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. *EMBO J.* **14**:6218-6228.
- Selinka, H.C., T. Giroglou, and M. Sapp.** 2002. Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**(2):279-287.
- Shah, K. and P. Howley.** 1996. Papillomaviruses. In: Fields Virology, third edition. Herausg.: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Shrivastava, A., S. Saleque, G.V. Kalpana, S. Sartandi, S.P. Goff, and K. Calmane.** 1993. Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-myc. *Science* **262**:1889-1892.
- Skiadopoulos, M.H. and A.A. McBride.** 1998. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J. Virol.* **72**:2079-2088.
- Spalholz, B.A., P.F. Lambert, C.L. Yee, and P.M. Howley.** 1987. Bovine Papillomavirus Transcriptional Regulation: Localization of the E2-Responsive Elements of the Long Control Region. *J. Virol.* **61**(7):2128-2137.

- Spalholz, B.A., S.B. Vande Pol, and P.M. Howley.** 1991. Characterization of the *cis* Elements Involved in Basal and E2-Transactivated Expression of the Bovine Papillomavirus P₂₄₄₃ Promotor. *J. Virol.* **65(2)**:743-753.
- Steger, G. and S. Corbach.** 1997. Dose dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* **71(1)**:50-58.
- Steger, G., J. Ham, O. Levebvre, and M. Yaniv.** 1995. The bovine papillomavirus 1 E2 protein contains two activation domains: one that interacts with TBP and another that functions after TBP binding. *EMBO J.* **14**:329-340.
- Stenlund, A., and M.R. Botchan.** 1990. The E2 trans-activator can act as a repressor by interfering with a cellular transcription factor. *Genes Dev.* **4**:123-126.
- Storey, A., D. Pim, A. Murray, K. Osborn, L. Banks, and L. Crawford.** 1988. Comparison of the *in vitro* transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.* **6**:1815-1820.
- Stubenrauch, F. and H. Pfister.** 1994. Low affinity E2-binding site mediates downmodulation of E2 transactivation of the human papillomavirus type 8 late promoter. *J. Virol.* **68(11)**:6959-6966.
- Stubenrauch, F. and L.A. Laimins.** 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Seminars in Cancer Biology* **9**:379-386.
- Stubenrauch, F., I.M. Leigh, and H. Pfister.** 1996. E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors. *J. Virol.* **70(1)**:119-126.
- Tan, S.-H., B. Gloss, and H.U. Bernard.** 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp-1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.* **20**:251-256.
- Tan, S.-H., L.E.-C. Leong, P.A. Walker, and H.U. Bernard.** 1994. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* **68**:6411-6420.
- Terhune, S.S., C. Milcarek, and L.A. Laimins.** 1999. Regulation of human papillomavirus type 31 polyadenylation during the differentiation-dependent life cycle. *J. Virol.* **73(9)**:7185-92.
- Thain, A., O. Jenkins, A.R. Clarke, and K. Gaston.** 1996. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J. Virol.* **70(10)**:7233-7235.
- Thierry, F., G. Spyrou, M. Yaniv, and P. Howley.** 1992. Two AP1 Sites Binding JunB Are Essential for Human Papillomavirus Type 18 Transcription in Keratinocytes. *J. Virol.* **66(6)**:3740-3748.
- Thomas, J.T., L.A. Laimins, and M.N. Ruesch.** 1998. Perturbation of cell cycle control by E6 and E7 oncoproteins of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report* **9**:59-64.
- Tzivion, G. and J. Avruch.** 2002. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. Minireview *J. Biol. Chem.* **277(5)**:3061-3064.
- Tzivion, G., Y.H. Shen, and J. Zhu.** 2001. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* **20**:6331-6338.
- Ustav, M. and A. Stenlund.** 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* **10**:4321-4329.
- van Hemert, M.J., H.Y. Steensma, and G.P.H. van Heusden.** 2001. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. Review *BioEssays* **23(10)**:936-946 + supplement.
- van Heusden, G.P.H., D.J Griffiths, J.C. Ford, A.W.-T. Chin, P.A. Schrader, A.M. Carr, and H.Y. Steensma.** 1995. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2

- genes are essential in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and can be replaced by a plant homologue. *Eur. J. Biochem.* **229**:45-53.
- Vande Pol, S.B. and P.M. Howley.** 1990. A bovine papillomavirus constitutive enhancer is negatively regulated by the E2 repressor through competitive binding for a cellular factor. *J. Virol.* **64(11)**:5420-5429.
- Veress, G., K. Szarka, X.-P. Dong, L. Gergely, and H. Pfister.** 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J. Gen. Virol.* **80**:1035-1043.
- Vokes, E.E., R.R. Weichselbaum, S.M. Lippmanand, and W.K. Hong.** 1993. Head and neck cancer. *N. Engl. J. Med.* **328**:184-194.
- Waterman, M.J.F., E.S. Stavridi, J.L.F. Waterman, and T.D. Halazonetis.** 1998. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *nature genetics* **19**:175-178.
- Werness, B.A., A.J. Levine, and P.M. Howley.** 1990. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**:76-79.
- Wilson, V.G., M. West, K. Woytek, and D. Rangasamy.** 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes* **24(3)**:275-290.
- Yaffe, M.B., K. Rittinger, S. Volinia, P.R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, and L.C. Cantley.** 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**:961-971.
- Yang J.-P., M. Hori, T. Sanda, and T. Okamoto.** 1999. Identification of a novel inhibitor of nuclear factor- κ B, RelA-associated inhibitor. *J. Biol. Chem.* **274(22)**:15662-15670.
- Yanagisawa, S.** 1997. Dof DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions. *Eur. J. Biochem.* **250**:403-410.
- Yao, J.-M., D.E. Breiding, and E.J. Androphy.** 1998. Functional Interaction of the Bovine Papillomavirus E2 Transactivation Domain with TFIIB. *J. Virol.* **72(2)**:1013-1019.
- Yao, Y.-L., W.-M. Yang, and E. Seto.** 2001. Regulation of Transcription Factor YY1 by Acetylation and Deacetylation. *Mol. Cell. Biol.* **21(17)**:5979-5991.
- Zaiman, A.L., A. Nieves, and J. Lenz.** 1998. CBF, Myb and Ets binding sites are important for activity of the core I element of the murine retrovirus SL3-3 in T lymphocytes. *J. Virol.* **72(4)**:3129-3137.
- Zhang, Y., Z.-W. Sun, R. Iratni, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. Hampsey, and D. Reinberg.** 1998. SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol. Cell* **1**:1021-1031.
- zur Hausen, H.** 1996. Papillomavirus infections – A major cause of human cancers. *Biochem. Biophys. Acta* **1288**:F55-F78.
- zur Hausen, H.** 2000. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. Review. *J. Nat. Cancer Inst.* **2(9)**:690-698.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad.	auffüllen auf
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
BPV	Rinderpapillomvirus (<u>b</u> ovine <u>p</u> apilloma <u>v</u> irus)
BS	Bindestelle
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
cDNA	copy-DNA
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasien (<u>c</u> ervical <u>i</u> ntraepithelial <u>n</u> eoplasia)
C-terminal	das Säure-Ende eines Proteins
DBD	DNA-bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
<i>et al.</i>	Und andere
<i>E. coli</i>	Bakterium <i>Escherichia coli</i>
EMSA	Gelretardierungsexperiment (<u>E</u> lectrophoretic <u>M</u> obility <u>S</u> hift <u>A</u> ssay)
Ev	Epidermodysplasia verruciformis
FCS	fötales Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
g	Gramm
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HPV	humane Papillomviren
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter

LCR	Kontrollregion (<u>l</u> ong <u>c</u> ontrol <u>r</u> egion) bei genitalen Typen
M	Mol
MCS	Klonierungsstelle (<u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
mt	Mutante
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Nukleotide
ng	Nanogramm
NCR	nicht-kodierende Region (<u>n</u> on <u>c</u> oding <u>r</u> egion) bei HPV8
nm	Nanometer
N-terminal	das Amino-Ende eines Proteins
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (<u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> rame)
ori	Replikationsursprung (<u>o</u> ri <u>g</u> in of replication)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PV	Papillomviren
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
s.u.	siehe unten
SV40	Affenvirus <u>S</u> imian <u>V</u> irus 40
T	Thymidin
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
URR	Kontrollregion der Papillomviren (<u>u</u> pstream <u>r</u> egulatory <u>r</u> egion)
wt	Wildtyp (<u>w</u> ild <u>t</u> ype)
x	fach(e)
xg	fache Erdbeschleunigung (g)

8. Zusammenfassung

Papillomviren (PV) infizieren die Keratinozyten der Haut oder Schleimhaut und sind dort an der Entstehung gutartiger und maligner Tumoren beteiligt. Die Wirtszellspezifität wird durch ubiquitär sowie keratinozytenspezifisch exprimierte Proteine bestimmt, die an ihre Erkennungssequenzen innerhalb der „Long Control Region“ der Viren binden. Weiterhin reguliert der virale Transkriptionsfaktor E2 die Aktivität der PV-Genexpression positiv oder negativ, abhängig vom Kontext der jeweiligen E2-Bindestelle. Repression basiert in der Regel auf der Verdrängung zellulärer Faktoren, deren Bindestellen mit denen von E2 überlappen. Mit Hilfe des Hefe-One-Hybrid-Systems konnte ein Fragment eines neuen, bisher unbekanntes Faktors über dessen Bindung an die Repression vermittelnde E2-Bindestelle P2 aus HPV8 isoliert werden. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Klonierung des vollständigen Leserahmens dieses zellulären, wahrscheinlich ubiquitär exprimierten Proteins, das PBF (**P**apillomavirus **B**inding **F**actor) genannt wurde. Durch Mutationsanalysen wurden die für die DNA-Bindung von PBF essentiellen Nukleotide als CCGG bestimmt. Sowohl rekombinantes als auch endogenes PBF banden *in vitro* an dieses Motiv, das in den Repression vermittelnden E2-Bindestellen BS-1 aus BPV1, P2 aus HPV8 und BS#4 aus HPV16 vorhanden ist. Mutationen, die jeweils die Bindung von PBF an diese Sequenzen *in vitro* verhinderten, führten in entsprechenden Reporterkonstrukten zu einer Reduktion der Aktivität von PV-spezifischen Promotoren in transienten Transfektionsversuchen. Mit Hilfe von synthetischen Reporterkonstrukten, die mehrere Kopien der BPV1 BS-1 bzw. der HPV16 BS#4 enthielten, konnte gezeigt werden, daß die daran bindenden zellulären Faktoren Aktivatoren der Transkription sind. Die Daten weisen darauf hin, daß PBF im Fall von BPV1 mit RUNX1 kooperiert, dessen Erkennungssequenz der PBF-Bindestelle benachbart ist, während im Fall von HPV16 wahrscheinlich ein bisher nicht identifizierter Faktor beteiligt ist. Mittels EMSA konnte gezeigt werden, daß zusätzlich zu PBF ein weiteres zelluläres Protein an HPV16 BS#4 bindet. Um die Rolle von PBF bei der PV-Genexpression und in der Zelle besser zu verstehen, wurde mit Hilfe des Hefe-Two-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern gesucht, und dabei das 14-3-3-Protein als an PBF-bindend identifiziert.

9. Abstract

Papillomviruses (PV) induce benign epithelial tumors of the skin or the mucosa. Infections with certain human PV (HPV) types have a high risk of progressing to carcinomas. Viral gene expression is tightly controlled by ubiquitous and keratinocyte-specific transcription factors binding to their recognition sequences mainly located within the enhancer. The viral transactivator E2 can activate or repress transcription depending on the DNA context of the E2 binding site. Repression by E2 often is mediated by competition with positively acting cellular factors for binding to overlapping recognition sites. To learn more about the life cycle of PV, cellular factors involved in transcriptional regulation are to be identified. Part of a so far unknown protein was isolated by its ability to bind to the repression mediating E2 binding site P2 of HPV8 in a yeast-one-hybrid-screen. This work reports the cloning of the full length open reading frame of this protein, which is now called PBF (**P**apillomavirus **B**inding **F**actor). PBF is ubiquitously expressed and localizes in the nucleus. The sequence bound by PBF could be determined as CCGG. Bacterially expressed, purified as well as endogenous PBF were shown to bind to this motif present in the repression mediating E2 BS-1 of bovine PV type 1 (BPV1), HPV8 P2 and HPV16 BS#4. Mutations, which abolished binding of PBF to these sites *in vitro*, decreased viral promoter activity in respective reporter constructs after transient transfection of two different cell lines. Reporter constructs, containing several copies of BPV1 BS-1 or HPV16 BS#4 in front of the adenovirus major late promoter, showed that the cellular factors binding to these sites were able to stimulate promoter activity synergistically. Point mutations, which abolished binding of PBF *in vitro*, strongly reduced synergism. However, PBF on its own is not able to activate. RUNX1, which binds adjacent to PBF within BS-1, could be found as a cooperation partner for PBF. In HPV16 there is evidence for the existence of another cellular factor binding to HPV16 BS#4 as shown by EMSA. The characterization of the interaction between PBF and 14-3-3 protein, which was detected with the help of a yeast-two-hybrid-screen, might give some further hints on the role PBF plays in the regulation of PV gene expression and in the cell.

10. Lebenslauf

Zur Person

Name: Steffi Boeckle
 Anschrift: Meersburger Str. 38, 50935 Köln
 Geburtsdatum: 31.12.1970
 Geburtsort: Köln
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

Sept. 1977 - Juli 1981 Gemeinschaftsgrundschule Freiligrathstrasse, Köln
 Sept. 1981 - Juli 1990 Hildegard-von-Bingen-Gymnasium, Köln
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium und Beruf:

Sept. 1991 - Juni 1998 Hochschulstudium an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
 Studiengang: Diplom-Biologie
 Hauptfach: Genetik
 Nebenfächer: Zoologie und Biochemie
 Abschluss: Diplom-Biologin

Seit Juli 1998 Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
 Experimentelle Arbeit im Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln, Arbeitsgruppe Dr. G. Steger
 Betreuer: Prof. Dr. Herbert Pfister

Juli 1998 - Mai 2001 Stipendiatin der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
 Seit Juni 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Virologie, Kliniken der Universität zu Köln

Auslandsaufenthalte:

Juni – August 1990 Sprachaufenthalt in Sussex, England
 Sept. 1990 – Juli 1991 Aupair- und Sprachaufenthalt in Versailles, Frankreich
 Zertifikat: Institut Parisien, Niveau: Perfectionnement

11. Erklärung

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

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

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

Boeckle, S., H. Pfister, and G. Steger. 2002.

A New Cellular Factor Recognizes E2 Binding Sites of Papillomaviruses
Which Mediate Transcriptional Repression by E2.

Virology **293**:103-117.

Köln, den 23.10.2002

Steffi Boeckle

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gertrud Steger für die sehr gute Zusammenarbeit und in allen Belangen mehr als hervorragende Betreuung. Die vielen wegweisenden Diskussionen und wertvollen Ratschläge waren immer eine große Unterstützung für mich und meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Herbert Pfister danke ich für die kritischen und anregenden Diskussionen die wesentlich zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Börries Kemper und Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Bereitschaft die vorliegende Arbeit vor dem Biologischen Fachbereich der Universität zu Köln zu vertreten.

Mein Dank gilt auch den Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe Steger die immer für hilfreichen Gespräche, wertvolle Ratschläge und eine tolle Arbeitsatmosphäre gesorgt haben. Ferner ein Dankeschön an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Institus für Virologie für die angenehme Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt ein Dankeschön an die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die freundliche Unterstützung.