

Die Rolle der Interaktion des zellulären Koaktivators p300 mit den E2- und E6- Proteinen von Papillomviren bei der Regulation der viralen Genexpression

In 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

Andreas Müller

aus Bergisch Gladbach

2003

Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Pfister
Prof. Dr. Jürgen Dohmen

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Beisitzerin: Dr. Gertrud Steger

Tag der Disputation: 9. Juli 2003

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Papillomviren - Klassifizierung und Onkogenese.....	1
1.2	Kapsidaufbau und Genomorganisation	3
1.3	Der Lebenszyklus von Papillomviren.....	4
1.4	Funktionen der viralen Genprodukte.....	6
1.4.1	E5, E6 und E7.....	6
1.4.2	E1 und E2.....	8
1.4.3	E4 , L1 und L2.....	10
1.5	Die nicht-kodierende Region (NCR).....	10
1.6	Bedeutung des E2-Proteins für die virale Transkription.....	12
1.7	Der zelluläre Koaktivator p300.....	14
1.8	Ziele der Arbeit.....	15
2.	Material.....	17
2.1	Bakterienstämme.....	17
2.2	Eukaryotische Zellen.....	17
2.3	Patientenmaterial.....	17
2.4	Nukleinsäuren.....	18
2.4.1	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide.....	18
2.4.2	Prokaryote Expressionsvektoren.....	20
2.4.3	Eukaryote Expressionsvektoren.....	20
2.4.4	Reporterplasmide.....	20
2.4.5	Rekombinante Plasmide.....	21
2.4.6	DNA-Längenstandards.....	26
2.4.7	Sonstige Nukleinsäuren.....	26
2.5	Radioaktivität.....	26
2.6	Proteine.....	26
2.6.1	Enzyme.....	26
2.6.2	Größenstandards.....	27
2.6.3	Antiseren.....	27
2.7	Reagenzien.....	27
2.7.1	Reagenziensysteme (Kits).....	27
2.7.2	Puffer und Lösungen.....	27
2.7.3	Sonstige Chemikalien und Materialien.....	30
2.8	Medien und Lösungen für die Zellkultivierung.....	32
3.	Methoden.....	33
3.1	Bakterienkultur.....	33
3.1.1	Erzeugung transformationskompetenter Bakterien.....	33
3.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	33
3.1.3	Langzeitlagerung von Bakterien.....	33
3.2	DNA-Methoden.....	34
3.2.1	Plasmidisolierung aus Bakterien.....	34
3.2.2	Plasmidpräparationen.....	34
3.2.3	DNA-Standardmethoden.....	34
3.2.4	DNA-Sequenzierung.....	35
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.2.6	<i>In vitro</i> -Mutagenese.....	35
3.3	Zellkulturmethoden.....	36
3.3.1	Kultivierung von RTS3b, C33A, HeLa, 293T und Cos7-Zellen.....	36
3.3.2	Einfrieren und Lagerung von Zellen.....	36
3.3.3	Kultivierung von NHEK (primäre Keratinocyten).....	37
3.3.4	Transfektion eukaryoter Zellen	37

3.3.4.1	Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation	38
3.3.4.2	Transfektion mittels „FuGENE“	38
3.3.4.3	Ernte der transfizierten Zellen mittels physikalischen Zellaufschluss.....	38
3.3.4.4	Ernte der transfizierten Zellen mittels chemischen Zellaufschluss.	39
3.3.4.5	Luciferase-Test	39
3.3.5	Erzeugung von Ganzzellextrakten	39
3.3.6	Erzeugung von Kernextrakten	40
3.3.7	Immunofluoreszenzanalysen	40
3.4	Proteinmethoden.....	40
3.4.1	Proteinaufreinigung.....	40
3.4.1.1	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	40
3.4.1.2	Aufreinigung von Proteinen mit Histidin-Epitopen.....	41
3.4.2	<i>In vitro</i> -Translation	42
3.4.3	Protein-Protein Interaktionsstudien.....	42
3.4.4	Western-Blot	43
3.4.5	Quantitative Proteinbestimmung.....	43
3.4.6	Gelretardierungsanalysen „EMSA“	44
3.5	Immunohistochemische Färbung von Hautschnitten	44
4.	Ergebnisse.....	45
4.1	HPV8 E2 und p300 interagieren direkt miteinander.....	45
4.2	Überexprimiertes p300 hat keinen Einfluss auf die Aktivität des CMV-Promotors	47
4.3	8E2 und p300 aktivieren synergistisch den späten Promotor von HPV8... 48	
4.4	8E2 benötigt für die Kooperation mit p300 keine sequenzspezifische DNA-Bindung.....	51
4.4.1	Der Synergismus von 8E2 und p300 bleibt auch nach der Mutation von E2-Bindestellen innerhalb der 8NCR erhalten	51
4.4.2	Erzeugung einer DNA-bindungsdefekten Punktmutante von 8E2	53
4.4.3	8E2-mt429 aktiviert synergistisch mit p300 die HPV8-Genexpression.....	55
4.4.4	Die 8E2-AD ist ausreichend und notwendig für den Synergismus mit p300	56
4.5	8E2 bindet p300 über seine AD, Hinge und DBD	58
4.6	Die Hinge und/oder die DBD von 8E2 vermitteln Kooperativität zwischen p300 und einer heterologen AD	62
4.7	Die Expression von p300 in der Haut wird während der Keratinozyten- Differenzierung induziert.....	66
4.8	8E6 stimuliert die Kooperation von 8E2 und p300 in primären Keratinocyten.....	68
4.9	8E6 bindet direkt an p300.....	69
4.10	8E6 und 16E6 interagieren mit 8E2.....	70
4.11	Die Bindedomänen von 8E6 und 16E6 innerhalb von p300-4B sind identisch.....	71
4.11.1	8E2, 8E6 und 16E6 binden nicht an die TRAM-Region von p300.....	71
4.11.2	8E6 und 16E6 zeigen ein identisches Bindungsverhalten an p300-4B	75
4.12	Sowohl der N- als auch der C-Terminus von 8E6 interagieren mit p300... 77	
4.13	Der C-Terminus von 8E6 stimuliert den Synergismus von 8E2 und p300 bzgl. der HPV8-Genexpression	79
4.13.1	Der N-Terminus von 8E6 hat einen leicht reprimierenden Einfluss auf den Synergismus von 8E2 und p300	79
4.13.2	Der C-Terminus von 8E6 stimuliert 8E2- und p300-vermittelte Transkription	80
4.14	Eine p300-bindungsdefekte Mutante von 8E6 verliert die Fähigkeit Transkription zu aktivieren	81
4.15	Nur der C-Terminus von 16E6 bindet an p300	83
4.16	Der C-Terminus von 16E6 inhibiert den Synergismus von 8E2 und p300	

	bzgl. der HPV8-Genexpression	84
4.16.1	16E6-N hat keinen Einfluss auf die 8E2- und p300-vermittelte Aktivierung	85
4.16.2	Der C-Terminus von 16E6 reprimiert 8E2- und p300-vermittelte Transkription	85
4.17	Die Aminosäuren 123-127 von 16E6 sind wichtig für die reprimierende Funktion in 16E6-C	86
4.18	Das PDZ-Domänen-Bindemotiv von 16E6 ist in der Modulation von Transkription involviert.....	88
4.18.1	Bindung von 16E6-C -ETQL an p300	88
4.18.2	Die PDZ-Bindedomäne von 16E6 vermittelt Repression	89
4.19	Die PDZ-Bindedomäne kann die aktivierende Funktion von 8E6-C inhibieren	91
4.19.1	Bindung von 8E6-C +ETQL an p300	91
4.19.2	Aktivierung der Transkription durch 8E6-C wird nach dessen Fusion mit einem PDZ-Bindemotiv inhibiert.....	92
4.20	Der N-Terminus von 16E6 enthält eine vom PDZ-Bindemotiv unabhängige reprimierende Funktion	93
4.21	Die reprimierenden Funktionen von 16E6 wirken auch auf die 16E2-vermittelte Genexpression der 16LCR	94
4.22	Die reprimierende Funktion im N-Terminus von 16E6 ist unabhängig von E6-AP-Bindung	95
4.23	Die reprimierende Funktion im N-Terminus von 16E6 ist in 8E6 nicht vorhanden	97
4.24	16E6-C reprimiert nicht die p53-vermittelte Aktivierung.....	99
5.	Diskussion.....	101
6.	Literaturverzeichnis.....	115
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	131
8.	Zusammenfassung	134
9.	Abstract	135
10.	Danksagung	136
11.	Erklärung	137
12.	Lebenslauf.....	138

1. Einleitung

1.1 Papillomviren - Klassifizierung und Onkogenese

Papillomviren (PV) sind DNA-Tumor-Viren und bilden die eigene Familie Papillomaviridae. Neben humanen wurden auch animale PV aus Säugern (Rind, Primaten), Vögeln und Reptilien isoliert (DE VILLIER, 2001). Humane PV (HPV) sind die häufigsten sexuell übertragenen, viralen Infektionserreger (GARLAND, 2002). Sie infizieren die Basalzellen der Haut und Schleimhaut und induzieren dort Hyperproliferationen des Epithels. Sie weisen dabei eine hohe Wirts- und Gewebespezifität auf (ZUR HAUSEN und DE VILLIERS, 1994). Infektionen resultieren in primär benignen Tumoren wie Warzen, Papillomen und Kondylomen. Sie sind in der Regel harmlos, da sie ein begrenztes Wachstum aufweisen und sich, vermutlich in Folge einer zellvermittelten Immunantwort, spontan zurückbilden (SHAH und HOWLEY, 1996). Infektionen mit bestimmten HPV bergen jedoch ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung.

Bis zum Jahr 2000 wurden die Genome von über 80 humanpathogenen PV vollständig sequenziert und ca. 120 weitere potentielle Typen über Teilsequenzen identifiziert (ZUR HAUSEN, 2000). Die Definition eines PV-Typs beruht auf einem Vergleich der Nukleotidsequenzen des konservierten L1-Gens. Liegt die Homologie unter 90%, wird ein neuer Typ definiert. Auf Grund von Sequenz-Homologien werden PV in Subgruppen zusammengefasst. Eine große Subgruppe (A) bilden die schleimhautinfizierenden PV mit über 40 Typen. Die bekanntesten Vertreter sind hier HPV16 und HPV18. Kutane PV bilden die Subgruppe B, in der HPV, die aus Läsionen von Patienten mit *Epidermodysplasia verruciformis* isoliert wurden, eine große Untergruppe (B1) darstellen. Hier sind HPV5 und HPV8 die bedeutendsten Typen. In weiteren Subgruppen befinden sich vor allem animale PV wie zum Beispiel das bovine PV Typ 1 (BPV1), das vor allem als Modellvirus für viele molekularbiologische Studien herangezogen wird. (DE VILLIERS, 2001)

Schleimhautassoziierte HPV werden aus Tumoren der anogenitalen und orolaryngealen Mukosa isoliert. Warzen des Anogenitaltrakts (*Condylomata acuminata*) werden häufig von HPV6 oder HPV11 hervorgerufen (BROWN *et al.*, 1999). Diese werden als Niedrigrisiko-Typen bezeichnet, da die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung gering ist. Von großer klinischer Bedeutung ist die Ausbildung zervikaler intraepithelialer Neoplasien (CIN). In gutartigen HPV-induzierten Tumoren sind noch alle Schichten des differenzierten Epithels vorhanden. Im Verlauf der malignen Entartung kommt es jedoch

zu einem zunehmenden Verlust der normalen Differenzierung. Je nach Anteil der abnormen Zellen am Gesamtepithel unterscheidet man zunächst zwischen milden (CIN I) und moderaten Neoplasien (CIN II), in denen bis zu 2/3 des Epithels undifferenziert sind. Beide sind Vorstufen von schweren Dysplasien (CIN III) bzw. des Karzinoma *in situ*, die sich in 10-30% der Fälle zu einem invasiven Zervixkarzinom, der zweithäufigsten Krebsform bei Frauen (10%) weltweit, weiterentwickeln können (WALBOOMERS *et al.*, 1999; EINSTEIN UND GOLDBERG, 2002). In den niedergradigen Läsionen fand man ein breiteres Spektrum an HPV-Typen als in höhergradig entarteten Neoplasien. Neuere Studien belegen, dass über 99% der invasiven Zervixkarzinome HPV-DNA enthalten. HPV16 wird dabei mit 53% am häufigsten isoliert, gefolgt von HPV18 mit 15% (MUNOZ, 2000). Diese und andere HPV-Typen, die man vorwiegend in Karzinomen findet und die augenscheinlich ein höheres onkogenes Potential haben, werden als Hochrisiko-Typen bezeichnet.

HPV-DNA konnte auch aus Tumoren des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) isoliert werden. Vor allem in Oropharynx- (45%) und Tonsillenkarzinomen (58%) fand man eine hohe HPV-Prävalenz. HPV 16 wurde hier in 84% aller HPV-positiven HNSCC mit Abstand am häufigsten identifiziert (KLUSSMANN *et al.*, 2001).

Kutane Niedrigrisiko-HPV-Typen (z.B. HPV 1, 2, und 3) induzieren Hautwarzen unterschiedlicher Morphologie (SHAH und HOWLEY, 1996). Einige kutane Hochrisiko-Typen sind mit der seltenen, autosomal rezessiv vererbten Hautkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis (Ev)* assoziiert, bei der sich am ganzen Körper makulöse Hautläsionen und flache Warzen entwickeln. In 30-60% der Fälle können diese nach langer Persistenz (10-30 Jahre), meist an sonnenlichtexponierten Stellen maligne entarten und zu Plattenepithelkarzinomen führen, in denen zu 90% DNA von HPV5 oder HPV8 gefunden wird (FUCHS und PFISTER, 1996). Bislang ist der zu Grunde liegende Mechanismus, wie diese HPV zur malignen Entartung der Haut führen, nicht geklärt. Neue Kartierungsstudien in fünf unabhängigen Familien mit *Ev*-Patienten konnten die Gene *EVER1* und *EVER2*, die für zwei integrale Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums kodieren, als Loci für *Ev*-Empfänglichkeit identifizieren (RAMOZ *et al.*, 2002). Deren Funktion ist jedoch noch unbekannt. *Ev*-assoziierte HPV wurden darüber hinaus in Plattenepithelkarzinomen von Organtransplantatempfängern, aber auch in Hauttumoren immunkompetenter Patienten, gefunden (PFISTER und TER SCHEGGET, 1997).

1.2 Kapsidaufbau und Genomorganisation

PV sind ikosaedrische, nicht umhüllte Viren, deren Kapsid einen Durchmesser von ca. 55 nm hat und sich aus 72 Kapsomeren zusammensetzt. Das Genom der PV besteht aus ringförmig geschlossener, doppelsträngiger DNA mit 7200 - 8000 Basenpaaren (bp) (PFISTER, 1984). Die DNA ist mit zellulären Histonen assoziiert und bildet nukleosomenähnliche Strukturen aus (FAVRE *et al.*, 1977).

Das PV-Genom umfasst mindestens fünf offene Leseraster (ORF) für frühe (E, *early*) regulatorische Proteine und zwei ORFs für späte (L, *late*) Strukturproteine sowie eine nicht-kodierende Region (NCR), bzw. „long control region“ (LCR), die Kontrollelemente für die Regulation der viralen Transkription und Replikation enthält. Abbildung 1 zeigt die Genomorganisation von HPV8 und HPV16. Alle ORFs liegen auf demselben DNA-Strang und sind trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen PV-Typen in ihrer Funktion, Größe und Anordnung innerhalb der PV gut konserviert. (PFISTER und FUCHS, 1987)

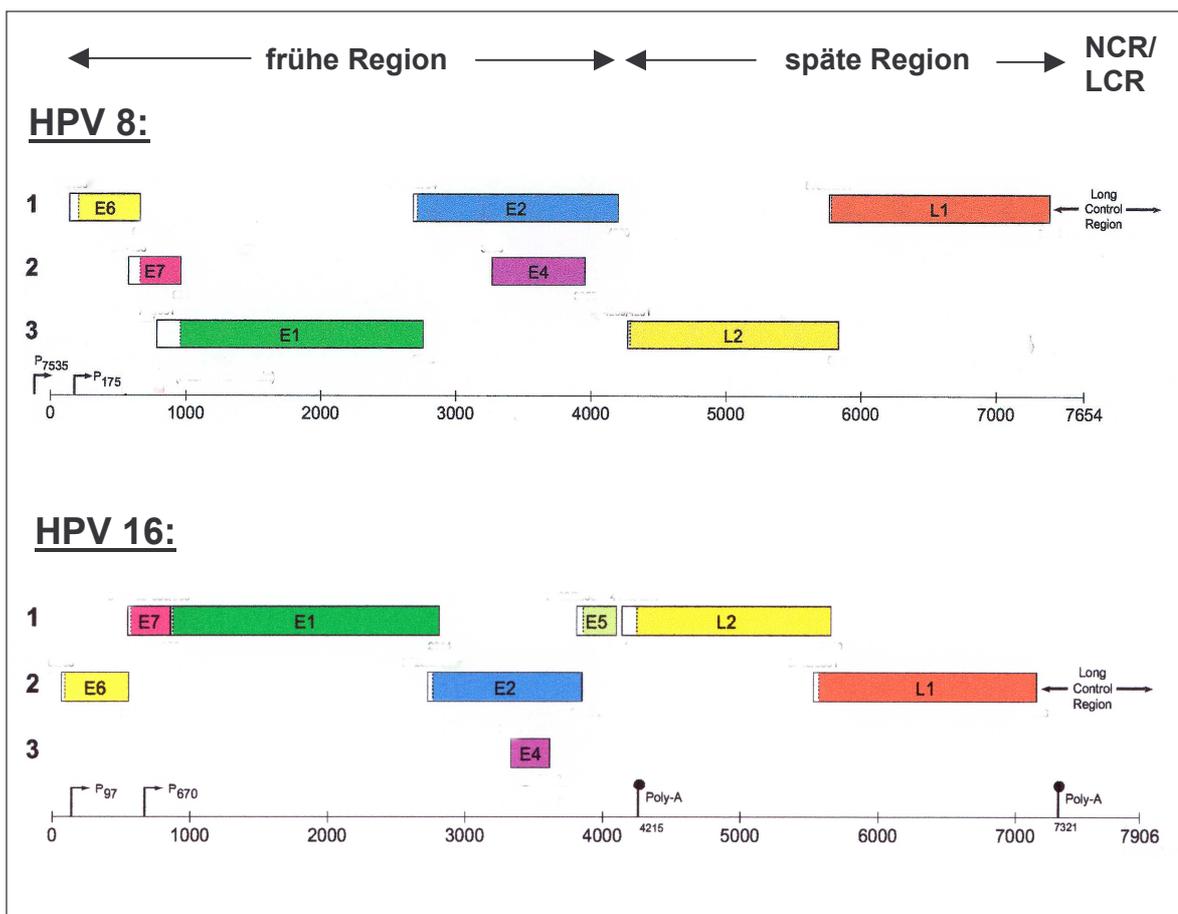


Abb. 1 Genomorganisation von HPV8 und HPV16

Das Genom von HPV unterteilt sich in die frühe, späte und nicht-kodierende Region (NCR/LCR). Dargestellt sind die relative Lage der einzelnen ORF in den drei Leserastern und die Positionen der Promotoren und Poly-Adenylierungssignale. Das zirkuläre Genom wurde innerhalb der NCR/LCR geöffnet (nach: BAKER und CALEF, 1995, 1996).

Die Transkription der polycistronischen mRNA erfolgt über mindestens zwei Promotoren. Durch alternatives Spleißen entsteht eine Vielzahl von Transkripten, die neben den vollständigen Proteinen auch für Fusionsproteine und verkürzte Formen kodieren können (BAKER, 1993). In der Regel erzeugt der frühe Promotor Transkripte für E6, E7, E1 und E2. Der späte Promotor steuert die Expression für L1 und L2 sowie ebenfalls für E1 und E2 (STUBENRAUCH und LAIMINS, 1999). Polyadenylierungssignale befinden sich hinter dem E5- und dem L1-Leserahmen (TERHUNE *et al.*, 1999).

1.3 Der Lebenszyklus von Papillomviren

Der produktive Lebenszyklus aller PV ist eng an die Keratinozytendifferenzierung gekoppelt (Abb. 2). PV infizieren die Zellen in der Basalschicht der Epidermis, die sie über Mikrotraumata der Haut und Schleimhaut erreichen. Der erste Virus-Zell-Kontakt erfolgt vermutlich über das L1-Hauptkapsidprotein und das auf der Wirtszelle exponierte Heparan-Sulfat, gefolgt von der endosomalen Internalisierung des Virus (SELINKA *et al.*, 1999). Alternativ wird auch das Oberflächenmolekül $\alpha 6\beta 4$ -Integrin als allgemeiner PV-Rezeptor erörtert (EVANDER *et al.*, 1997). Über einen bislang nicht geklärten Mechanismus transloziert die virale DNA in den Kern, wo die virale Replikation und die Reifung der neuen Virionen erfolgen.

In den Basalzellen findet eine geringe Expression der frühen viralen Gene statt und die PV-Genome etablieren in niedriger Kopienzahl als extrachromosomale Elemente im Kern. Die virale DNA wird bei der Mitose der Basalzellen vermutlich über Kopplung an die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt (SKIADOPOULOS und MCBRIDE, 1998). Nach der Zellteilung löst sich eine Tochterzelle von der Basalmembran und beginnt sich zu differenzieren. Da die Virusreifung auf differenzierende Zellen beschränkt ist, werden die Zellen der Basalschicht nicht durch Virusproduktion geschädigt und proliferieren weiter. Auf diese Weise können infizierte Zellen mehrere Jahre in der Basalschicht persistieren (STUBENRAUCH und LAIMINS, 1999). Die differenzierungsabhängige Expression der viralen Proteine wird vermutlich über zelluläre Transkriptionsfaktoren gesteuert, die differenziell im Epithel exprimiert werden (TUREK, 1994). In den Zellen des *Stratum spinosum* nimmt die Expression der regulatorischen Proteine zu und es beginnt die vegetative Replikation der viralen DNA. PV benötigen hierfür zelluläre Replikationsfaktoren, die in den differenzierenden suprabasalen Zellen nicht mehr vorliegen. Daher wird der Zellzyklusblock der in der G₁-Phase arretierten Keratinozyten über die viralen Proteine E6 und E7 aufgehoben, und die Zellen werden wieder in die S-Phase geführt (THOMAS *et al.*, 1998). In den obersten Zellen des *Stratum spinosum* beginnt die Expression der späten Proteine L1 und L2. Im *Stratum granulosum* findet neben der vegetativen Replikation eine

starke Expression der Strukturproteine statt. Die gereiften infektiösen Virionen werden schließlich beim Zerfall des *Stratum corneum* freigesetzt (DOORBAR, 1998). Durch die verzögerte Differenzierung und verstärkte Proliferation der infizierten Keratinozyten kommt es zu einer lokalen vertikalen Ausdehnung des Gewebes, die sich makroskopisch in Form von Warzen, Papillomen und Kondylomen äußert.

In Karzinomen wird in der Regel eine erhöhte Expression der viralen Onkogene E6 und E7 beobachtet. Verantwortlich für die gesteigerte Expression ist meistens eine ungerichtete Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle. Durch die Integration gerät die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 außer Kontrolle und wird gesteigert (TUREK, 1994). Dies führt zu einer Störung der genetischen Stabilität der Zelle und somit zu einer Anhäufung von Mutationen und der Aktivierung von Onkogenen. Für die Entstehung von Krebs sind jedoch noch weitere zelluläre Veränderungen und/oder genetische Prädispositionen notwendig (GALLOWAY und MCDUGALL, 1996; MAGNUSON und GYLLENSTEN, 2000).

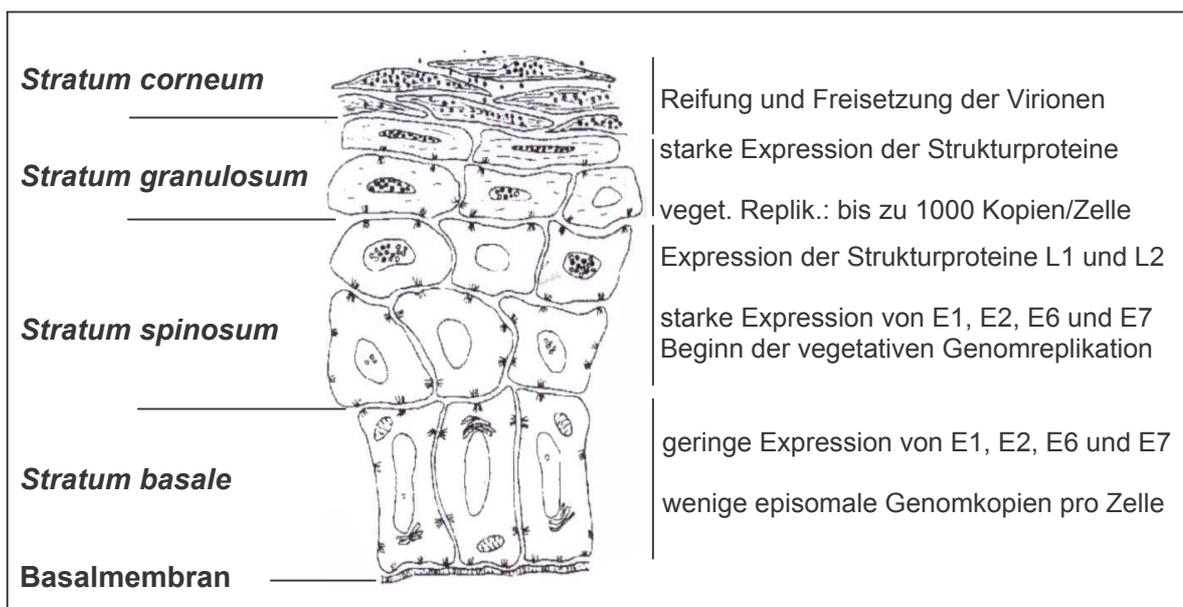


Abb. 2 Aufbau der Epidermis und Lebenszyklus von PV

Dargestellt ist ein Querschnitt der Epidermis mit der Unterteilung in die einzelnen Schichten sowie die in ihnen stattfindenden viralen Prozesse (Zeichnung verändert nach MODROW, 1998).

1.4 Funktionen der viralen Genprodukte

1.4.1 E5, E6 und E7

Die Hauptfunktion der onkogenen E5-, E6- und E7-Genprodukte ist die Aufhebung des G₁-Zellzyklusblocks und die Induktion der S-Phase in suprabasalen, differenzierenden Zellen, um somit die virale Replikation zu ermöglichen. Alle drei Proteine besitzen keine intrinsische Enzymaktivität, so dass sie ihre Funktionen über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren ausüben. (SMOLA-HESS und PFISTER, 2002)

E6 und E7 von genitalen Hochrisiko-HPV sind notwendig und ausreichend für die effiziente Immortalisierung primärer epithelialer Zellen (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1989). Beide Proteine sind außerdem in der Lage unabhängig voneinander immortalisierte Zellen zu transformieren (SEDMAN *et al.*, 1991; PHELBS *et al.*, 1988). Bei *Ev*-assoziierten HPV kann nur das E6-Protein immortalisierte Zellen transformieren, während das E7-Protein ein schwaches immortalisierendes Potential gegenüber primären Keratinozyten aufwies (IFTNER *et al.*, 1988; SCHMITT *et al.*, 1994).

E7 ist 11 kDa groß, besitzt ein Zinkfinger-Motiv, mit dem es Dimere bilden kann, und ist hauptsächlich im Nukleus aber auch im Cytoplasma lokalisiert (ZWERSCHKE *et al.*, 1996; SATO *et al.*, 1989; SMOTKIN und WETTSTEIN, 1987). E7 besitzt große strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten mit Adenovirus-E1A und SV40-T-Antigen (VOUSDEN und JAT, 1989). E7-Proteine von Hochrisiko-HPV-Typen binden Mitglieder der Retinoblastom-Familie (pRB, p107 und p130) und beschleunigen deren Degradation über den Ubiquitin-abhängigen Abbau, worauf das transformierende Potential von E7 maßgeblich zurückgeführt wird (GONZALES *et al.*, 2001; JONES und MÜNGER, 1997). Über eine kompetitive Bindung an pRB und dessen Proteolyse wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt, der in ruhenden Zellen mit hypophosphoryliertem pRB assoziiert ist. E2F aktiviert daraufhin die Expression von Proteinen für die DNA-Synthese (Thymidin-Kinase, Dihydrofolat-Reduktase, DNA-Polymerase α) und von Zellzyklusregulatoren (Zyklin A und E), die den G₁/S-Übergang steuern. Darüber hinaus bindet E7 die zyklinabhängige-Kinase (CDK)-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1}, die die Replikation verhindern, und inhibiert deren Funktion (TUREK *et al.*, 1994; SCHULZE *et al.*, 1995; OHTANI *et al.*, 1995; zusammengefasst in MÜNGER *et al.*, 2001). Durch diese Ereignisse werden Zellen, in denen E7 exprimiert wird, in die S-Phase geleitet und optimale Bedingungen für die vegetative Replikation der viralen DNA geschaffen.

Um die Homeostase aufrechtzuerhalten, kommt es in verstärkt proliferierendem Gewebe zu p53-abhängiger Apoptose. Dieser wirkt E6 durch das Ausschalten der p53-Funktion entgegen.

E6 ist ein 18 kDa großes Phosphoprotein und lokalisiert im Nukleus sowie in nicht nukleären Membranen (GROSSMAN *et al.*, 1989; GAO *et al.*, 2000). Es bildet zwei Zinkfinger aus, die mit jeweils 29-30 Aminosäuren (As) ungewöhnlich groß sind (Abb. 3). Sie sind wichtig für die Proteinstabilität und -aktivität (SMOLA-HESS und PFISTER, 2002). E6-Proteine von Hochrisiko-HPV-Typen binden spezifisch an kruziforme DNA und sind in der Lage unter bestimmten Konditionen Dimere auszubilden (RISTRANI *et al.*, 2000; DANIELS *et al.*, 1997). E6-Proteine liegen in der Zelle nur in geringen Mengen vor und haben im Fall von 16E6 eine Halbwertszeit von 30 min bis 4 h in transformierten Zellen (ANDROPHY *et al.*, 1987a).

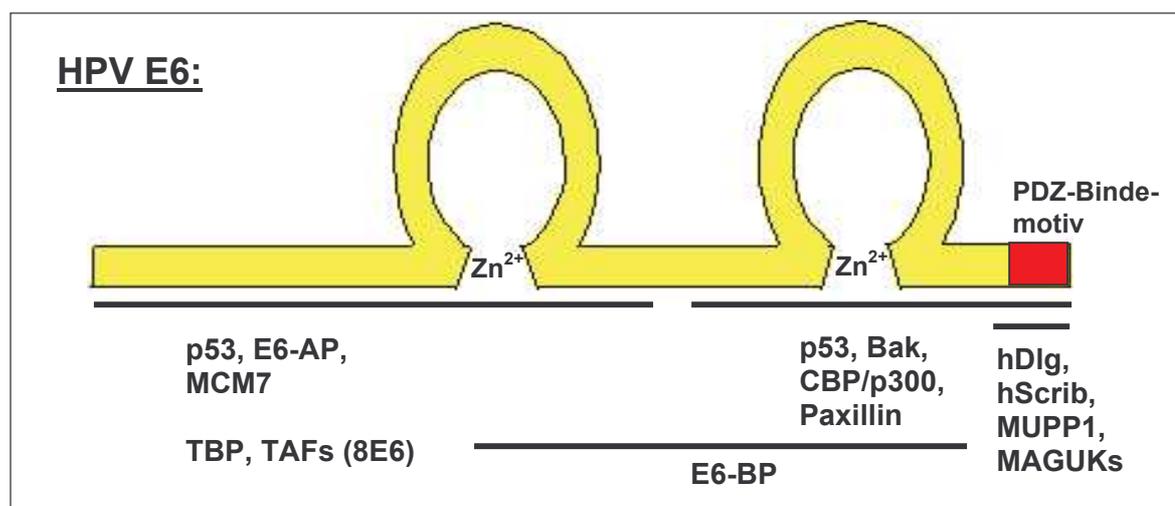


Abb. 3 Schematische Darstellung von E6

Dargestellt ist das E6-Protein mit seinen zwei Zinkfingern und dem PDZ-Bindemotiv (nur bei Hochrisiko-E6-Proteinen) sowie eine Auswahl an Interaktionspartnern von 16/18E6 (sofern nicht anders angegeben) mit ihren Bindedomänen (verändert nach SMOLA-HESS und PFISTER, 2002).

Die Hauptfunktion des E6-Proteins für die Aufhebung der Zellzykluskontrolle und Inhibition von Apoptose ist die Inaktivierung von p53, das normalerweise bei DNA-Schäden als Transkriptionsfaktor aktiv wird und durch Aktivierung von p21^{CIP1} den Zellzyklus anhält. Liegen in der Zelle irreparable DNA-Schäden vor, löst p53 Apoptose aus. Das Ausschalten von p53 führt daher zu genetischer Instabilität mit dem erhöhten Risiko einer Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen (SOMASUNDARAM, 2000). Muköse Hochrisiko-E6-Proteine können p53 binden und ubiquitinabhängig degradieren. Dazu wird ein ternärer Komplex mit der Ubiquitin-Ligase E6-AP (*E6 associated protein*) gebildet (SCHEFFNER *et al.*, 1990, 1993). Muköse Niedrigrisiko-E6-Proteine binden mit geringerer Affinität an p53 und können dieses nicht degradieren. E6 von *Ev*-assoziierten HPV hat ebenfalls onkogenes Potential, bindet aber nicht an p53 (ELBEL *et al.*, 1997; STEGER und PFISTER, 1992). Diese E6-Proteine transformieren Zellen folglich auf einem anderen Weg, über den jedoch bisher noch wenig bekannt ist.

Eine weitere Möglichkeit von E6 die p53-Aktivität zu beeinflussen ist die Wechselwirkung mit dem zellulären Koaktivator p300/CBP. Dieser wird von p53 für die spezifische Aktivierung seiner Zielgene rekrutiert. Es wird vermutet, dass muköse Hochrisiko-E6-Proteine über kompetitive Bindung an p300 die p53-vermittelte Transaktivierung seiner Zielgene inhibieren können. Diese Funktion scheint dabei nicht nur auf p53 beschränkt zu sein, da auch für NF- κ B und Mitglieder der AP-1-Familie eine Repression der transkriptionellen Aktivität durch E6 über Bindung an p300/CBP gezeigt werden konnte. (PATEL *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2002)

Eine Interferenz mit p300/CBP-abhängiger Aktivierung konnte auch für eine Bindung von mukösen E6-Proteinen an AMF-1/Gps2 gezeigt werden. AMF-1/Gps2 ist imstande als Koaktivator die Bindung von p53 oder auch von PV E2-Proteinen an p300/CBP zu verstärken (BREIDING *et al.*, 1997; PENG *et al.*, 2000; 2001) und kann von mukösen Hochrisiko-E6-Proteinen degradiert und dadurch in seiner Funktion geschwächt werden (DEGENHARDT und SILVERSTEIN, 2001). In vielen Studien wurde 16E6 aber auch als ein Aktivator von Transkription beschrieben. So aktiviert E6 z.B. die Telomerase hTERT-, c-myc- und eine Reihe heterologer Promotoren (VELDMAN *et al.*, 2001; KINOSHITA *et al.*, 1997; DESAINTEs *et al.*, 1992; SHIRASAWA *et al.*, 1994).

Ein strukturelles Motiv mit der Konsensussequenz X-S/T-X-V/L befindet sich im C-Terminus von mukösen Hochrisiko-E6-Proteinen. Mit diesem so genannten PDZ-Bindemotiv kann E6 eine Anzahl von Proteinen mit PDZ-Domänen (hDLG, hScrib, MUPP1, MAGUKs) binden und in die Proteolyse führen (GARDIOL *et al.*, 1999; NAKAGAWA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000b; THOMAS *et al.*, 2002). Das Motiv scheint unabhängig von der p53-Inaktivierung für das onkogene Potential der E6-Proteine eine wichtige Rolle zu spielen (KIYONO *et al.*, 1997).

E5 ist ein 40-99 Aminosäuren großes hydrophobes Polypeptid und ist hauptsächlich im Golgi-Apparat und in Plasmamembranen lokalisiert (BURKHARDT *et al.*, 1989; CONRAD *et al.*, 1993). E5 ist innerhalb der PV-Familie nur wenig konserviert. Bei HPV8 fehlt sogar ein E5 ORF (FUCHS *et al.*, 1986). E5 aktiviert ligandenunabhängig Transmembranrezeptoren der Wachstumsfaktoren PDGF (*platelet-derived growth factor*) sowie EGF (*epidermal growth factor*) und stimuliert somit die entsprechenden Signaltransduktionswege (PIM *et al.*, 1992; LEECHANACHAI *et al.*, 1992).

1.4.2 E1 und E2

E2 ist ein 45-56 kDa großes, multifunktionales, nukleäres Phosphoprotein. Es weist einen modularen Aufbau auf und besitzt eine N-terminale Aktivierungsdomäne (AD) sowie eine C-terminale Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne (DBD), mit der E2 als Dimer an die palindromische Konsensussequenz ACC(N₆)GGT bindet. Beide Domänen sind innerhalb

der PV gut konserviert (35% Homologie; MCBRIDE und MYERS, 1996) und werden von einer flexiblen Linkerdomäne (Hinge) verbunden, die Kernlokalisierungssignale enthält, aber nur wenig konserviert ist und in ihrer Größe stark variiert (GIRI und YANIV, 1988; ANDROPHY *et al.*, 1987b; ZOU *et al.*, 2000; HADASCHIK, 2002). Besonders die Hinge-Region von E2 der *Ev*-assoziierten HPV ist vergleichsweise groß und erfüllt Funktionen bei der Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren sowie vermutlich beim Spleißprozess (STEGER *et al.*, 2002; LAI *et al.*, 1999).

E2 ist ein Modulator der viralen Transkription und fungiert dabei sowohl als Aktivator als auch als Repressor, worauf später noch näher eingegangen wird (vgl. Kapitel 1.6). Überexpressionsstudien in HPV-positiven Zelllinien (Hela, SiHa, Caski) zeigten, dass E2 das Zellwachstum in der G₁-Phase blockieren sowie Zellalterung und Apoptose über p53 und Caspase 8 auslösen kann. Somit könnte E2 die von E6 und E7 gestörte Zellzykluskontrolle in den oberen Epithelschichten wiederherstellen. Der hierfür zu Grunde liegende Mechanismus ist noch unklar (DESAINTE *et al.*, 1997, 1999; DOWHANICK *et al.*, 1995; WELLS *et al.*, 2000; WEBSTER *et al.*, 2000; DEMERET *et al.*, 2003). BPV1 E2 kann über seine AD an mitotisches Chromatin binden und somit die an der DBD gebundene virale DNA bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilen (SKIADOPOULOS und MCBRIDE, 1998). Darüber hinaus erfüllt E2 Funktionen bei der Verpackung von Virus-DNA in Kapside (DAY *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu E2-Proteinen von genitalen Hochrisiko-HPV wurde für HPV8 E2 (8E2) gezeigt, dass es zelltransformierendes Potential besitzt (IFTNER *et al.*, 1989). Der Mechanismus hierfür ist noch nicht geklärt. Eine weitere wichtige Funktion von E2 ist die effiziente Aktivierung der Replikation des viralen Genoms im Zusammenspiel mit E1 (MOHR *et al.*, 1990).

E1 ist ein ca. 70 kDa großes nukleäres Phosphoprotein. Es bindet nur mit schwacher Affinität an den Replikationsursprung im PV-Genom. Die Bindung von E1 an die DNA wird stabilisiert, indem E1 einen Komplex mit E2 bildet, welches an benachbarte E2-Erkennungssequenzen bindet (FRATTINI und LAMINS, 1994). Nach der Bindung an die DNA lagern sich weitere E1-Proteine an, während E2 aus dem Komplex entlassen wird. Der hexamere E1-Komplex besitzt Helikase- und ATPase-Aktivität und rekrutiert für die DNA-Synthese zelluläre Replikationsfaktoren (SANDERS und STENLUND, 1998; WILSON *et al.*, 2002).

1.4.3 E4 , L1 und L2

Die Funktion von **E4** ist nur wenig verstanden. Durch alternatives Spleißen wird hauptsächlich ein E1^{E4}-Transkript gebildet, welches jedoch nur wenige Nukleotide des E1-Leserahmens enthält. Es kodiert für ein 17 kDa großes Zinkfingerprotein (ROBERTS *et al.*, 1994), das erst spät im viralen Lebenszyklus exprimiert wird. E4 lokalisiert cytoplasmatisch und ist mit Cytokeratin assoziiert. Es wird vermutet, dass es dadurch den Kollaps des Cytokeratin-Netzwerks induzieren und damit die Freisetzung der reifen Virionen begünstigen kann (DOORBAR *et al.*, 1991).

L1 und **L2** bilden als Strukturproteine das Viruskapsid. L2 ist zusätzlich in der Lage sowohl L1 als auch E2 zu PODs (*PML oncogenic domains*) zu rekrutieren. Diese haben eine potentielle Bedeutung für die virale Replikation (HEINO *et al.*, 2000).

1.5 Die nicht-kodierende Region (NCR)

Die meisten cis-aktiven Kontrollelemente für die komplexe virale Transkription und für die Replikation befinden sich innerhalb der NCR/LCR von PV, die sich zwischen dem L1- und E6-Leserahmen befindet (Abb. 4). Während sich die Kontrollregionen eng verwandter PV sehr ähneln, gibt es große Unterschiede zwischen Vertretern mit unterschiedlicher Gewebespezifität. So ist die NCR von *Ev*-assoziierten HPV mit 400 bp nur etwa halb so groß wie die der mukösen Typen (FUCHS *et al.*, 1993). Der frühe Promotor von HPV8 (P₁₇₅) befindet sich, wie auch bei anderen PV (HPV16: P₉₇), am 3'-Ende der NCR unmittelbar vor dem E6-ORF. Die Lage des späten Promotors ist nicht konserviert. Bei genitalen PV liegt er in der Regel im E7-Leserahmen (HPV16: P₆₇₀), bei HPV8 jedoch zentral innerhalb der NCR (P₇₅₃₅). (vgl. Abb. 1)

Die Kontrollregion enthält neben Bindestellen für das virale E2-Protein zahlreiche Erkennungssequenzen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, die unter anderem ein gewebespezifisches Verstärkerelement (Enhancer) bilden, das nur in epithelialen Zellen aktiv ist. Von den an die NCR bindenden Faktoren haben einige einen transaktivierenden (AP-1, NF-1, PEF-1, TEF-1, Oct1, Sp1), andere einen reprimierenden (YY1, CDP) Einfluss. Die meisten Studien zu diesen Faktoren wurden in mukösen HPV durchgeführt (DESAINTE und DEMERTET, 1996; O'CONNOR 1996; FUCHS und PFISTER, 1994).

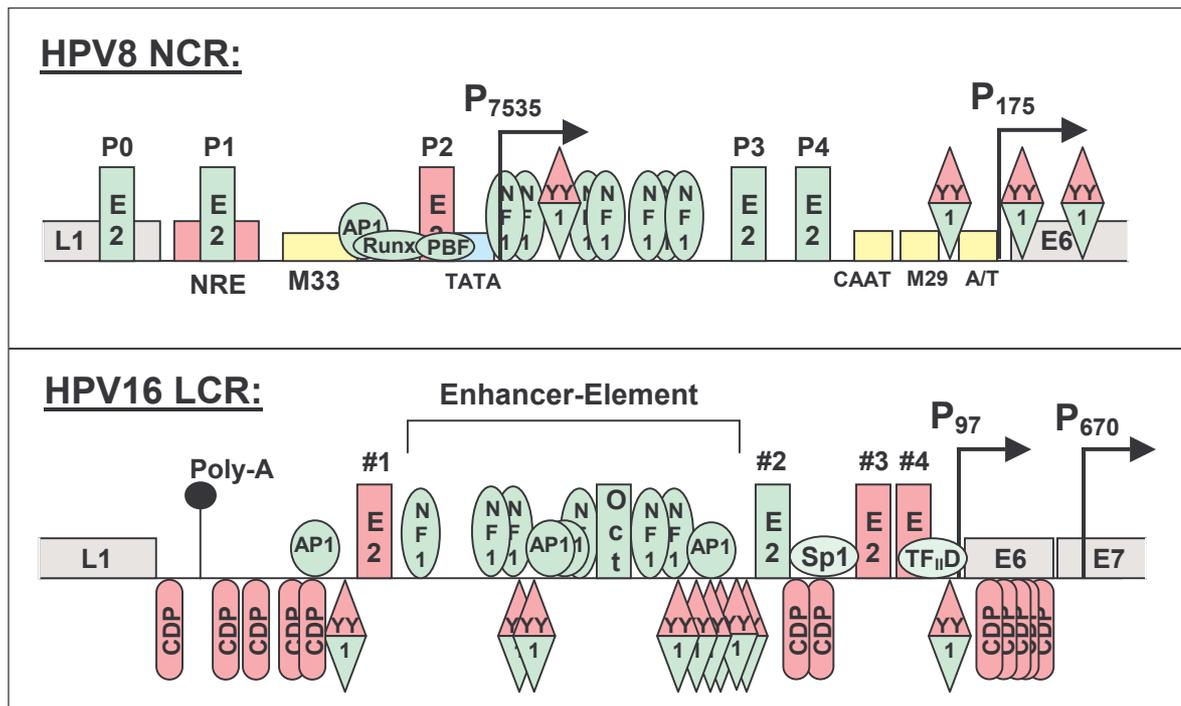


Abb. 4 Schematische Darstellung der NCR von HPV8 und der LCR von HPV16

HPV8: Dargestellt sind die innerhalb der *Ev*-assoziierten HPV konservierten E2-Bindestellen (P0-P4) und Sequenzmotive (M33, CAAT, M29 und A/T-reiche Region), das negativ regulierende Element (NRE) sowie Bindestellen einiger zellulärer Transkriptionsfaktoren. Aktivierende Elemente sind in grün, reprimierende in rot dargestellt. Die Initiationsorte der Transkription sind als Pfeile angezeigt. Der Index der Promotorkennung entspricht der Nukleotidposition (nach FUCHS und PFISTER, 1996).

HPV16: Die LCR von HPV16 enthält am 5'-Ende ein Transkriptions-Terminationssignal (poly-A) und in zentraler Position ein gewebespezifisches Enhancer-Element. Außerdem sind die E2-Bindestellen (#1-#4) sowie Bindestellen einiger zellulärer Transkriptionsfaktoren dargestellt (nach O'CONNOR *et al.*, 1996; BERNARD, 2000).

Bei der Funktion des gewebespezifischen Enhancers dürfte AP-1 eine wichtige Rolle spielen. AP-1 ist ein Heterodimer-Komplex aus Faktoren der Jun- und Fos-Familie, deren Gewebeverteilung und Expressionsmuster im Verlauf der Keratinozyten-Differenzierung variieren. AP-1 führt so bei HPV18 zusammen mit HMG-I(Y), einem Chromatin-bindenem Gerüstprotein, zur Aktivierung des frühen Promotors (THIERRY *et al.*, 1992 ; BOUALLAGA *et al.*, 2000). Bei HPV8 wird die späte virale Genexpression von AP-1, das hier ein integraler Bestandteil des M33/AP-1 Enhancer-Motivs ist, aktiviert (HORN *et al.*, 1993). Dieses und weitere Sequenzmotive wie das CAAT- und M29-Motiv sowie eine A/T-reiche Region sind wie die Anzahl und Lage der E2-Bindestellen P0-P4 innerhalb der *Ev*-assoziierten HPV konserviert (FUCHS und PFISTER, 1996). Die P1-Bindestelle bei HPV8 überlappt mit einem negativ regulierenden Element (NRE), das einen reprimierenden Einfluss auf die Aktivität des späten Promotors hat. Dieser wird nach Bindung von E2 aufgehoben (MAY *et al.*, 1994).

Die virale DNA ist mit Nukleosomen assoziiert und deren Positionierung ist für die Regulation der viralen Genexpression und Replikation ebenfalls von Bedeutung. Nukleosomen können im deacetylierten Zustand Bindestellen für Transkriptionsfaktoren blockieren und somit den Promotor reprimieren. Hierbei spielt der Faktor CDP (*CCAAT displacement protein*) eine Rolle. CDP ist mit Histon-Deacetylasen (HDAC) assoziiert und besitzt Bindestellen innerhalb der LCR von genitalen PV. Hier könnte CDP in der Lage sein mittels überlappender Bindestellen Faktoren wie zum Beispiel E1 zu verdrängen oder über die HDAC Histone zu deacetylieren. In differenzierenden Zellen nimmt die Aktivität von CDP und somit auch sein reprimierender Einfluss ab. (O'CONNOR *et al.*, 2000)

1.6 Bedeutung des E2-Proteins für die virale Transkription

Eine wichtige Funktion des E2-Proteins ist die Modulation der viralen Transkription. E2 bindet hierfür an seine Erkennungssequenzen innerhalb der NCR. Diese besitzen durch variable Nukleotide im Zentrum der Bindestelle unterschiedliche Affinitäten zu E2 (STUBENRAUCH *et al.*, 1994). Für die Aktivierung der Transkription interagiert E2 vermutlich über seine N-terminale AD mit zellulären Transkriptionsfaktoren wie TBP, TFIIB, Sp1, AMF-1/Gps2 und p300/CBP (LI *et al.*, 1991; RANK und LAMBERT *et al.*, 1995; STEGER *et al.*, 1995; BENSON *et al.*, 1997; BREIDING *et al.*, 1997; YAO *et al.*, 1998a; MÜLLER, 1999; LEE *et al.*, 2000a; PENG *et al.*, 2000). Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch noch ungeklärt. N-terminal verkürzte Formen von E2 reprimieren die Transkription. Im Fall von BPV1 E2 bilden diese entweder Homodimere und kompetieren mit dem Wildtyp-E2 um die DNA-Bindung oder es entstehen inaktive Heterodimere mit dem vollständigen E2-Protein (MCBRIDE *et al.*, 1991). Das molare Verhältnis der Wildtyp-Form zu der deletierten Variante wird zellzykluspezifisch reguliert (YANG *et al.*, 1991) und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Regulation der viralen Genexpression. Des Weiteren sind E2-Formen beschrieben, bei denen durch alternatives Spleißen die AD durch einen kleinen E8-Anteil ersetzt wird (E8^ΔE2). Diese können nach Bindung an promotordistale Bindestellen als Transrepressor fungieren. Der Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt (STUBENRAUCH *et al.*, 2001).

E2-Proteine können heterologe Promotoren mit zwei oder mehr E2-Bindestellen synergistisch aktivieren (GAUTHIER, 1991). Die natürlichen HPV-Promotoren innerhalb der NCR werden abhängig von der Lage der E2-Bindestellen aktiviert oder reprimiert (GARRIDO-GUERRO *et al.*, 1996). E2 beeinflusst zudem die Genexpression dosisabhängig. Im Fall von HPV18 bindet E2 bei niedrigen Konzentrationen an eine hochaffine promotordistale Erkennungssequenz und aktiviert die virale Transkription, während bei hohen E2-Mengen auch die niedrigaffinen proximalen Bindestellen erkannt werden,

wodurch die Genexpression dann reprimiert wird (STEGER und CORBACH, 1997). Bei HPV16 und HPV18 überlappen die zum frühen Promotor proximalen E2-Bindestellen mit Erkennungssequenzen für Sp1 und TBP. Es wird spekuliert, dass durch die Bindung von E2 die Sp1-Bindung und/oder die Ausbildung des Prä-Initiationskomplexes (PIK) sterisch behindert und der Promotor somit reprimiert wird (THIERRY, 1993). Ein analoger Mechanismus wird bei HPV8 vermutet, wo E2 über Bindung an die hochaffinen P0-, P1-, P3- und P4-Bindestellen den späten Promotor (P_{7535}) aktiviert. Hier überlappt die niedrigaffine promotorproximale P2-Bindestelle mit Erkennungssequenzen für die zellulären Faktoren RUNX1 und PBF, die beide die Basalaktivität des späten Promotors positiv regulieren (SCHMIDT *et al.*, 1997; BOECKLE *et al.*, 2002). Die Bindung von E2 an P2 führt zu einer negativen Rückkopplung, da der späte Promotor auch die Expression des E2-Proteins reguliert (STUBENRAUCH *et al.*, 1996).

E2 kann auch heterologe und zelluläre Promotoren ohne E2-Bindestellen aktivieren. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die AD von BPV1 E2 dafür ausreichend ist. Der Mechanismus hierfür ist noch wenig untersucht, aber es ist wahrscheinlich, dass E2 über Wechselwirkungen mit zellulären Transkriptionsfaktoren an zelluläre Promotoren gebracht wird (HEIKE *et al.*, 1989; HAUGEN *et al.*, 1988). So ist z.B. Sp1 imstande HPV8 E2 an den Promotor von $p21^{WAF1/CIP1}$ zu rekrutieren, der daraufhin aktiviert wird (STEGER *et al.*, 2002).

Die Regulation der Transkription durch E2 ist vermutlich auch auf chromatinmodulierende Eigenschaften zurückzuführen. So wurde beobachtet, dass die Aktivierung der Transkription durch E2 mit einer Auflockerung des Chromatins stromaufwärts der E2-Bindestellen korreliert (LEFEBVRE *et al.*, 1997). Des Weiteren benötigt E2 seine AD für eine effiziente Bindung der promotorproximalen Bindestellen in der chromatinverpackten HPV16 LCR (NISHIMURA *et al.*, 2000). Aber auch der Zustand des Chromatins selbst hat einen Einfluss auf die Aktivität von E2. So kann 16E2 den P_{97} -Promotor reprimieren, wenn HPV im Wirtsgenom integriert ist, nicht aber wenn die virale DNA episomal vorliegt, was mit einer dichteren Chromatin-Verpackung der episomalen DNA korreliert wird (BECHTOLD *et al.*, 2003). Insgesamt impliziert dies direkte oder indirekte Interaktionen der AD mit chromatinmodulierenden Faktoren wie z.B. den Histon-Acetyl-Transferasen p300/CBP oder p/CAF (LEE *et al.*, 2000a; 2002), mit denen E2 den inhibitorischen Effekt der Nukleosomen aufheben könnte.

1.7 Der zelluläre Koaktivator p300

p300 und das homologe CBP (*CREB Binding Protein*) sind ca. 270 kDa große, ubiquitär exprimierte Phosphoproteine, die als Koaktivatoren der Transkription an vielen physiologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind (GOODMAN und SMOLIK, 2000). p300 und CBP teilen eine Anzahl konservierter Domänen (Abb. 5). Hierzu gehören drei cystein- und histidinreiche Regionen (C/H1, C/H2 und C/H3) sowie eine KIX-Domäne, die wichtige Funktionen bei Protein-Protein-Interaktionen ausüben und an die eine Vielzahl von zellulären und viralen Faktoren bindet (CHAN und THANGUE, 2001). Eine wichtige enzymatische Funktion ist die Histon-Acetyl-Transferase-(HAT)-Aktivität (OGRYZKO *et al.*, 1996). Hiermit ist p300 in der Lage sowohl Histone als auch Nicht-Histon-Proteine zu acetylieren. Des Weiteren besitzt p300 eine Bromodomäne, die als Acetyl-Lysin-Bindedomäne bei einer Anzahl von zellulären Koaktivatoren konserviert ist. Man vermutet, dass durch sie verschiedene Muster acetylierter Nukleosomen erkannt werden können (ZENG und ZHOU, 2002).

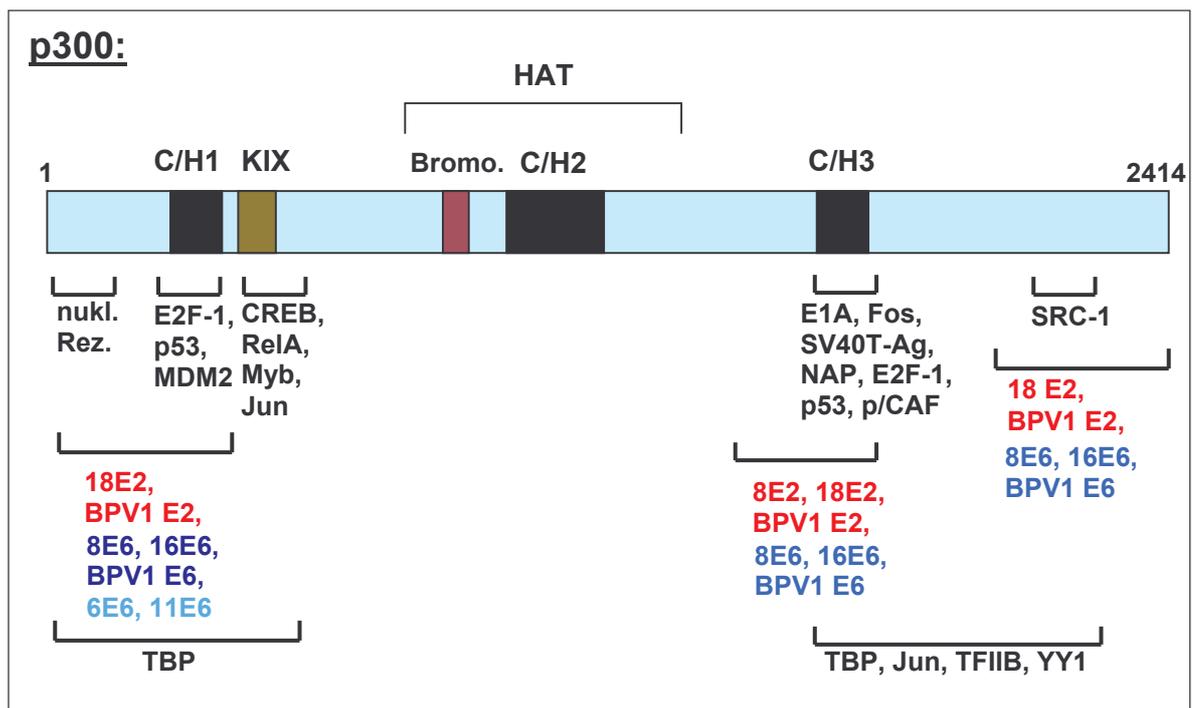


Abb. 5 Schematische Darstellung von p300

Die funktionellen Domänen von p300 sind angezeigt: die cystein-/histidinreichen Domänen (C/H1, C/H2 und C/H3), die KIX- und die Bromodomäne (Bromo.). Die Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) befindet sich in einer zentralen Position. Eine Auswahl von Faktoren, die mit p300 interagieren, inklusive der PV E2- und E6-Proteine, ist mit der Lage ihrer Bindedomänen dargestellt.

p300 stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um als Koaktivator Transkription zu aktivieren. Die Einleitung der Transkription benötigt in der Regel sequenzspezifische DNA-bindende Transkriptionsfaktoren und die basale Transkriptions-Maschinerie. Es wird

daher angenommen, dass p300 als Brückenprotein Effekte zwischen beiden vermittelt, indem es einerseits mit DNA-bindenden Transaktivatoren und andererseits mit Faktoren des PIKs wie TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIIF und RHA interagiert (CHAN und THANGUE, 2001; NAKAJIMA *et al.*, 1997). Diese Faktoren könnten dann über p300 effizienter an den Zielpromotor rekrutiert und innerhalb des PIKs stabilisiert werden. Außerdem könnte p300 als Gerüst für die Zusammenschaltung verschiedener DNA-bindender Transkriptionsaktivatoren dienen, wodurch es die relative Konzentration dieser Faktoren in der Promotorregion erhöhen und deren Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen erleichtern würde. Solche p300-abhängigen Verstärkerkomplexe (*Enhanceosome*) wurden z.B. für die Regulation der TNF α -Genexpression beschrieben (BARTHEL *et al.*, 2003).

Neben seiner intrinsischen HAT-Aktivität besitzt p300 durch Bindung an p/CAF, SRC1 und ACTR auch assoziierte HAT-Aktivität (YAO *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1997a). Hiermit ist p300 imstande, die N-terminalen Lysin-Reste von Histonen in Nukleosomen zu acetylieren. Hyper-Acetylierung von Chromatin wird aus mehreren Gründen mit transkriptioneller Aktivierung korreliert: 1) Transkriptionsfaktoren könnten besser an ihre Erkennungssequenzen binden, da die Acetylierung die positive Ladung der Histone neutralisiert und diese daraufhin ihre Affinität zur DNA verlieren (VETTESSE-DADEY *et al.*, 1998). 2) Acetylierung könnte internukleosomale Interaktionen schwächen und somit geordnete Chromatin-Strukturen destabilisieren (TSE *et al.*, 1998). 3) Es könnte die Prozessivität der RNA-Polymerase durch die mit Nukleosomen assoziierte DNA erhöhen (NIGHTINGALE *et al.*, 1998).

Wie bereits erwähnt werden auch Nicht-Histon-Proteine von p300 acetyliert. Hierzu gehören sowohl Transaktivatoren (z.B. p53, E2F-1) als auch Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie (TFIIE, TFIIIF und TAF(I)68). Die Acetylierung der Transaktivatoren verstärkt in den meisten Fällen ihre DNA-Bindungsaffinität. (zusammengefasst in: CHAN und THANGUE, 2001)

1.8 Ziele der Arbeit

Die für 8E2, 18E2 und BPV1 E2 demonstrierten Interaktionen mit p300 konnten mit einer Aktivierung von synthetischen Promotoren mit E2-Bindestellen korreliert werden (MÜLLER, 1999; LEE *et al.*, 2000a). Die Bedeutung für die virale Genexpression wurde jedoch noch nicht analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einfluss der Wechselwirkung von 8E2 mit p300 für die HPV8-Genexpression untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Rolle der einzelnen Domänen von 8E2 für die Interaktion und den Synergismus mit p300 geklärt werden.

Wie bereits erwähnt, interagieren auch die E6-Proteine von HPV mit p300. 16E6 bindet an den N- und C-Terminus sowie an die C/H3-Domäne von p300. Es wurde vorgeschlagen, dass eine kompetitive Bindung an ein 19 Aminosäuren großes Modul (TRAM - *transcriptional adapter motif*) innerhalb der C/H3-Region für die Inhibition von p300-Koaktivator-Funktionen (z.B. bei p53) verantwortlich ist. Dieses Bindemotiv wird von Niedrigrisiko-E6-Proteinen der HPV-Typen 6 und 11 nicht erkannt. Sie binden nur schwach an den N-Terminus von p300 (PATEL *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999). Kürzlich konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass das E6-Protein von HPV16, analog zu p53, auch die von 8E2 und p300 vermittelte Aktivierung der Transkription inhibieren kann. 8E6, das wie 16E6 an den N- und C-Terminus sowie die C/H3-Domäne von p300 bindet, konnte jedoch p300-vermittelte Aktivierung über E2 und p53 zusätzlich stimulieren (BECKMANN, 2001). Daher war das Ziel im zweiten Teil der Arbeit, die dem gegenteiligen Effekt zugrunde liegenden Mechanismen dieser doch relativ konservierten Proteine aufzuklären.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

- *Epicurian coli* **XL1-Blue** - Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)] (Stratagene, La Jolla, USA) - für Klonierungen
- *Epicurian coli* **BL21(DE3)pLysS** - Genotyp : B, F-, dcm, ompT, hsdS(r_B-m_B), gal, λ(DE3), [pLysS Cam^r] (Stratagene, La Jolla, USA) - für Proteinexpression

2.2 Eukaryotische Zellen

- **RTS3b**: Humane Plattenepithelkarzinom-Zelllinie aus einer *Ev*-ähnlichen Läsion eines Nieren-Transplantat Empfängers; ursprünglich HPV5 und HPV8 positiv, nach mehreren Passagen HPV-negativ (PURDIE *et al.*, 1993).
- **C33A** (ATCC: HTB-31): Spontan immortalisierte humane Zervixkarzinom-Zelllinie ohne HPV-Genom und mit epithelialer Morphologie (AUERSPERG, 1969; DEL VECCHIO, 1992).
- **HeLa** (ATCC: CCL-2): Humane epitheliale Zelllinie aus einem zervikalen Adenokarzinom, aneuploid, HPV18-positiv (GEY *et al.*, 1952; MINCHEVA *et al.*, 1987).
- **293T** (ATCC: CRL-1573): Humane embryonale, renale Epithelzelllinie, über Adenovirus transformiert, exprimiert E1A und das SV40 T-Antigen (NUMA *et al.*, 1995).
- **COS-7** (ATCC : CRL-1651): SV40-transformierte Fibroblasten-Zelllinie aus CV-1 Affennierenzellen (*African green monkey*) (GLUZMAN, 1981).
- **NHEK-neo** (Normale humane epidermale Keratinozyten - neonatal): „gepoolte“ primäre Keratinozyten der 1. Passage (Bio-Whittaker, Walkersville, USA).

2.3 Patientenmaterial

5 µm Kryoschnitte von gesunder Haut, entnommen aus Randbezirken einer Läsion am Oberarm (RITZKOWSKY, pers. Mitteilung).

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Folgende HPLC-gereinigten Oligonukleotide wurden von Eurogentec (Brüssel, Belgien), Interactiva (Ulm) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Die Positionsangaben beziehen sich jeweils auf die veröffentlichten Sequenzen von p300 (ECKNER *et al.*, 1994), HPV8 (FUCHS *et al.*, 1986), HPV16 (SEEDORF *et al.*, 1985) und TEF-1 (XIAO *et al.*, 1991). Enzymschnittstellen sowie Punktmutationen sind fett unterstrichen. Start- und Stopcodons sind kursiv dargestellt.

- Oligonukleotide für die Klonierung von HPV8 E2-Konstrukten:

Name:	Sequenz:	Position:
HPV8E2oPr1	GG GGTACC AAGAAGACGAGGGCGAACATG	2687-2707
HPV8E2HPr2	GGTAC AAGCTT GGGGGGGGTGGAGCTGG	3316-3300
8E2pETBamup	GATCGA GGATCC TTACAGTAGTCTTCCAAGTCGCCCT	3931-3910

- Oligonukleotide für die Klonierung von HPV E6-Konstrukten:

FLAGHind/Bam5'	AGCTT GGACCATGGACTACAAGGACGACGATGATAAGGG CGGG	
FLAGHind/Bam3'	GATCC CCGCCCTTATCATCGTCGTCTTGTAGTCCATGGT CCA	
HPV8E6pET5'	CC GGATCC GATGGACGGGCAGGACAAGGCTTC	197-219
8E6-NdoEco	CGGATC GAATTC TTATAGCACAGTTTGCTCATAATATTC	475-452
8E6-CupBam	GGGATC GGATCC GGGCAGAGATATTGAATTAGCTACAGG	476-501
HPV8E6pET3'	CC GGATCC TTACCAATCATGATACAAATGCTTAC	661-639
HPV16E6-Bamup	GGTCGT GGATCC GATGTTTCAGGACCCACAGGAG	104-124
16E6-NdoEco	CGGATC GAATTC TTAATACAACTATAACAATAATGTCTATAC	355-328
16E6-CupBam	CGGATC GGATCC GGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	356-382
HPV16E6Bamdo	GGACGA GGATCC TTACAGCTGGGTTTCTCTACG	556-539
16E6dETQLEcodo	CGGATC GAATTC TTATCTACGTGTTCTTGATGATCTGC	544-522
8E6+ETQLEcodo	CGGATC GAATTC TTACAGCTGGGTTTCCAATCATGATAC AAATGCTTACAAAGCC	661-633
8E6-NdoHind	CGGATC AAGCTT TAGCACAGTTTGCTCATAATATTC	475-452
8E6-CupHind	GGGATC AAGCTT GGCAGAGATATTGAATTAGCTACAGG	476-501
16E6-NdoHind	CGGATC AAGCTT ATACAACTATAACAATAATGTCTATAC	355-328
16E6-CupHind	CGGATC AAGCTT GGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC	356-382

- Oligonukleotide für die Klonierung von p300-Fragmenten:

Name:	Sequenz:	Position:
p3004B-6102up	CGCTAG GGATCC AGGGACAAGCACCTGGAGTTCTCTTCAC	6102-6129
p3004B-6506do	CGCTAG GAATTC CCTTGGTATGCTGCACAACCCGCTTCATC	6506-6479
p3004B-6507up	GGGTAC GGATCC GGTTGCAAACGGAAAACCAATGGCGGG	6507-6533
p3004B-6563do	GGGTAC GAATTC GAGGGCAATGAGCTGCTTGCAGATGGG	6563-6537
p3004B-6564up	GGGATC GGATCC TGCTGCTACCATGCCAAGCACTGCCAGG	6564-6591
p3004B-6584do	CGGATC GAATTC GTGCTTGGCATGGTAGCAGCAGAGGGC	6584-6558
p3004B-6585up	GGGATC GGATCC TGCCAGGAGAACAAATGCCCGGTGCCG	6585-6611
p3004B-6641do	GGGATC GAATTC CCGGAGCTTCTGCTTGATGTTTAGGCAG	6641-6614
p3004B-6642up	GGGATC GGATCC CAGCAACAGCTGCAGCACCGACTACAG	6642-6668
p3004B-6860do	GGGATC GAATTC CAAGTAGGGTGGCATGCTATTGGGAGGG	6860-6833
p3004782Xhoup	CCG CTCGAG CAGAACAGGTATCATTT(T)CTGTGA *)	4782-4804
p3006482Xhodo	GGC CTCGAG CATCTTCTGGCAGGATGGCAGTGA	6482-6459

*) fehlerhaft (s.u)

- Oligonukleotide für die Klonierung von TEF-1-Konstrukten:

TEF1-PMBamup	GGTCGT GGATCC CCGAGCCCAGCAGCTGGAGCGGCAGT GAG	544-567
TEF1-PMBamdo	GGTCGT GGATCC GTCTTTACAAGCCTGTAAATATGATG	1818-1792
TEF1ADNLSc	GATGGAG GGATCC TCATACCTTTCTCTCTTTTTGGAGGTC CTCCTGGGTCCTTTACAAGCCTGTAAATATGATGTTG	1818-1792
TEF1ADEcoup	CATGGAG GAATTC ATGGAGCCCAGCAGCTGGGGC	544-567

- Oligonukleotide für *in vitro*-Mutagenesen:

8E2mt430C-R	GGGGAGGCAAACACATTA AAA C GCTTTTCGCAACAGAGCT	3968-4006
8E2mt430C-R	AGCTCTGTTGCGAAAGC G TTTTAATGTGTTTGCCTCCCC	4006-3968
p300HATok5'	CAGAACAGGTATCATTT^CTGTGAGAAGTGTTTCAATGAGATCC	4782-4824
p300HATok3'	GGATCTCATTGAAACACTTCTCACAG^AAATGATACCTGTTCTG	4824-4782
16E6del123-127A	GACATCTGGACAAAAAG^ATAAGGGGTCGGTGGACCGG	453-504
16E6del123-127B	CCGGTCCACCGACCCCTTAT^CTTTTTGTCCAGATGTC	504-453
8E6del132-136A	GATTGCTGTGGGAGAGGC^GTTAGAGGAGGCTGGAAAGGAG	572-626
8E6del132-136B	CACTTTTCCAGCCTCCTC(A)AAC^GCCTCTCCACAGCAATC *)	626-572
16E6 SDmt 5'	GTTACTGCGACG C GAG C TATATGACTTTGCTTTTCGGG	211-248
16E6 SDmt 3'	CCCGAAAAGCAAAGTCATATAG C T C CGT C GCAGTAAC	248-211
M29E2mutA	TTTGCCTGT C T G GTTTTTCGATCACACCATA	92-121
M29E2mutB	TATGGTGTGATCGAAAAC C AG A CAGGCAAA	121-92

*) fehlerhaft

- Oligonukleotid für EMSA:

P2C	AACCGACCGCAAACGGTACATAAAGGTGAGT	7487-7517
-----	---------------------------------	-----------

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

2.4.2 Prokaryote Expressionsvektoren

- **pET14b** (4,7 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit einem Epitop aus sechs Histidinresten fusioniert sind, unter der Kontrolle eines T7-Promotors (Novagen, Madison, USA).
- **pGEX2T** (4,9 kb) erlaubt die Expression von Proteinen, die N-terminal mit der Glutathion-S-Transferase (~28 kDa) fusioniert sind, unter der Kontrolle eines tac-Promotors (IPTG induzierbar) (Amersham Biosciences, Freiburg).

2.4.3 Eukaryote Expressionsvektoren

- **pXJ41** (4,3 kb) ist ein von J.H. XIAO (1990) konstruierter Expressionsvektor mit einem CMV- und einem T7-Promotor sowie Ampicillin- und Tetracyclinresistenz.
- **pCB6** (6,2 kb) ermöglicht die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Stinski, unveröffentlicht).
- **pCDNA 3.1+** (5,4 kb) erlaubt die Expression unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Er enthält ausserdem einen SV40-Replikationsursprung und eine Neomycin-Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe).
- **pM** (3,5 kb) ermöglicht die Expression eines Proteins, das N-terminal an die Gal4-DBD fusioniert ist, unter der Kontrolle des SV40-Promotors (Clontech, Heidelberg).
- **pCMV2FLAG** (4,7 kb) erlaubt die Expression eines Proteins mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop unter Kontrolle des CMV-Promotors (Kodak, New Haven, USA).
- **pCMV1** (4,8 kb), mit einem CMV-Promotor, und **pUC18** (2,7 kb) wurden zum Auffüllen von DNA-Mengen in Transfektionsansätzen verwendet (Invitrogen, Karlsruhe).

2.4.4 Reporterplasmide

- **pALuc** (5,2 kb) ermöglicht den Einbau eines Promotors stromaufwärts des *firefly*-Luciferasegens (DONG *et al.*, 1994).
- **pNCR8-Luc**: Die NCR von HPV8 mit Teilen der flankierenden L1- und E6-Leserahmen (Position 7077-558) wurde als HindIII/BglIII-Fragment aus NCR8-CAT (STUBENRAUCH *et al.*, 1992) in die HindIII/BamHI-Schnittstellen von pALuc kloniert (LEMME, 1998).
- **pNCR8-Luc-mt P01, -mt P2, -mt P34**: Die NCR von HPV8 mit den entsprechenden mutierten E2-Bindestellen wurde jeweils als HindIII/BglIII-Fragment aus

NCR8-Cat-mt P01, -mt P2 bzw. -mt P34 (STUBENRAUCH *et al.*, 1994) in die HindIII/BamHI-Schnittstelle von pALuc kloniert.

- **pNCR8-Luc mt P0-P5** enthält die NCR von HPV8 mit mutierter P0-, P1-, P2-, P3-, P4- und P5-Bindestelle. Zunächst wurde ein HindIII/BglII-Fragment aus NCR8-Cat mtP0-P4 (STUBENRAUCH *et al.*, 1994) in die HindIII/BamHI-Schnittstelle von pALuc kloniert. Anschließend wurde über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden M29E2mutA und M29E2mutB die Bindestelle P5 (AKGÜL, 2002) mutiert.
- **p16LCR-E7-Luc** enthält ein BamHI/KpnI-Fragment aus pBR322HPV16 (bp 6150-885) mit der LCR von HPV16 vor dem Luciferasegen (STEGER, pers. Mitteilung).
- **pC18Luc** enthält vier 18E2-1 Bindestellen vor dem Adenovirus-MLP. Diese wurden als PCR-Fragment über HindIII/BamHI in pALuc kloniert (STEGER, pers. Mitteilung).
- **p53CON** wurde abgeleitet von pGUP.PA.8 und enthält eine p53-Bindestelle vor dem minimalen basalen Promotor von hsp70 und dem Luciferasegen (FUNK *et al.*, 1992).

2.4.5 Rekombinante Plasmide

E2-Konstrukte:

- **pCB6-8E2** kodiert für den ORF von 8E2. Ein BclI/BglII-Fragment aus pAM2-HPV8 (bp 2682-4220) wurde über BglII in pCB6 kloniert (STUBENRAUCH *et al.*, 1994).
- **pCB6-8E2-mt429** kodiert für 8E2 mit einer Mutation in nt 1285, die zu einem Austausch der Aminosäure in Position 429 von Cystein nach Arginin führt. Das Konstrukt wurde über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 8E2mt430C-R5' und 8E2mt430C-R3' hergestellt.
- **pCB6-8E2-N** kodiert für die AD von 8E2 (As 1-204). Das über PCR mit den Oligonukleotiden HPV8E2oPr1 und HPV8E2HPr2 amplifizierte Fragment wurde über KpnI/HindIII in pCB6 kloniert.
- **pCB6-8E2-ΔC** kodiert für die AD und die Hinge von 8E2 (As 1-409). Das über PCR mit den Oligonukleotiden HPV8E2oPr1 und 8E2pETBamup amplifizierte Fragment wurde über KpnI/BamHI in pCB6 kloniert.
- **pCB6-8E2-ΔN** kodiert für die die Hinge und die DBD von 8E2 (As 205-499). Das über PCR amplifizierte Fragment wurde über KpnI/BamHI in pCB6 kloniert (STEGER, pers. Mitteilung).
- **CMV2FLAG-BPV1 E2** kodiert für den ORF von BPV1 E2. Ein PCR-Fragment wurde über EcoRI/BamHI in CMV2FLAG kloniert (STEGER, pers. Mitteilung).
- **CMV2FLAG-8E2-ΔN** kodiert für die Hinge und die DBD von 8E2 (As 205-499) mit N-terminal fusioniertem FLAG-Epitop (STEGER *et al.*, 2002).

- **pET14b-8E2-N, -8E2-H, -8E2-C** kodieren für die AD (As 1-204), die Hinge (As 205-409) bzw. die DBD (As 410-499) von 8E2. Entsprechende PCR-Fragmente wurden jeweils über BamHI in pET14b kloniert (STEGER *et al.*, 2002).
- **pET14b-8E2-C mt429** kodiert für die DBD von 8E2 (As 410-499) mit einer Mutation in nt 1285 von 8E2, die zu einem Aminosäureaustausch in Position 429 von Cystein nach Arginin führt. Das Konstrukt wurde über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 8E2mt430C-R5' und 8E2mt430C-R3' hergestellt.
- **pET14b-8E2-ΔN, -ΔC, -ΔH** kodieren für eine N-terminal verkürzte (As 205-499) bzw. eine C-terminal verkürzte Form (As 1-409) von 8E2 sowie eine E2-Mutante mit deletierter Hinge (As 1-204/410-499) (STEGER, pers. Mitteilung).
- **pGEX2T-8E2** kodiert für 8E2. Der ORF von 8E2 wurde über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert (ENZENAUER *et al.*, 1998).
- **pGEX2T-8E2-N, -8E2-H, -8E2-C** kodieren für die AD (1-204), die Hinge (205-409) bzw. die DBD (410-499) von 8E2. Entsprechende PCR-Fragmente wurden über BamHI in pGEX2T kloniert (STEGER *et al.*, 2002).
- **pGEX2T-18E2-N, -18E2-H, -18E2-C** kodieren für die AD (As 1-208), die Hinge (As 209-284), bzw. die DBD (As 285-365) von 18E2. Entsprechende PCR-Fragmente wurden über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert (STEGER *et al.*, 2002).

E6-Konstrukte:

- **pCDNA-8E6:** Der ORF von 8E6 wurde über BamHI in pCDNA 3.1+ kloniert (SMOLA, pers. Mitteilung).
- **pCDNA-16E6:** Der ORF von 16E6 wurde über Ddel aus pBR322-HPV16 (bp 24-654) isoliert und über EcoRV in pCDNA3.1+ kloniert (SMOLA, pers. Mitteilung).
- **pCDNA 3.1+ FLAG** exprimiert Proteine die N-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert sind unter dem T7- und dem CMV-Promotor. Hierfür wurden die komplementären Oligonukleotide FLAG-Hind/Bam5' und FLAG-Hind/Bam3' über HindIII/BamHI in pCDNA3.1+ kloniert.
- **pCDNA-FLAG-8E6** kodiert für 8E6. Ein mit den Oligonukleotiden HPV8E6pET5' und HPV8E6pET3' amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI in pCDNA 3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-16E6** kodiert für 16E6. Ein mit den Oligonukleotiden HPV16E6Bamup und HPV16E6Bamdo amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI in pCDNA 3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-8E6-N** kodiert für die As 1-93 von 8E6. Ein mit den Oligonukleotiden HPV8E6pET5' und 8E6-NdoEco amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI/EcoRI in pCDNA 3.1+FLAG kloniert.

- **pCDNA-FLAG-8E6-C** kodiert für die As 94-155 von 8E6. Ein mit den Oligonukleotiden 8E6-CupBam und HPV8E6pET3' amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI in pCDNA 3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-16E6-N** kodiert für die As 1-84 von 16E6. Ein mit den Oligonukleotiden HPV16E6Bamup und 16E6NdoEco amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI/EcoRI in pCDNA 3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-16E6-C** kodiert für die As 85-151 von 16E6. Ein mit den Oligonukleotiden 16E6CupBam und HPV16E6Bamdo amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI in pCDNA 3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-8E6 Δ 132-136** kodiert für 8E6 mit einer Deletion (As 132-136) im zweiten Zinkfinger. Das Konstrukt wurde hierfür über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 8E6del132-136A und 8E6del132-136B hergestellt.
- **pCDNA-FLAG-8E6-C Δ 132-136** kodiert für die As 94-155 von 8E6 mit einer Deletion im Zinkfinger (As 132-136). Das Konstrukt wurde hierfür über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 8E6del132-136A und 8E6del132-136B hergestellt.
- **pCDNA-FLAG-16E6 Δ 123-127** kodiert für 16E6 mit einer Deletion (As 123-127) im zweiten Zinkfinger. Das Konstrukt wurde hierfür über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 16E6del123-127A und 16E6del123-127B hergestellt.
- **pCDNA-FLAG-16E6-C Δ 123-127** kodiert für die As 85-151 von 16E6 mit einer Deletion im Zinkfinger (As 123-127). Das Konstrukt wurde hierfür über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 16E6del123-127A und 16E6del123-127B hergestellt.
- **pCDNA-FLAG-16E6-ETQL** kodiert für 16E6 mit einer C-terminalen Deletion von vier Aminosäuren (As 1-147). Ein mit den Oligonukleotiden HPV16E6Bamup und 16E6-ETQLEcodo amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI/EcoRI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-16E6-C-ETQL** kodiert für die As 85-147 von 16E6. Ein mit den Oligonukleotiden 16E6CupBam und 16E6-ETQLEcodo amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI/EcoRI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-8E6-C+ETQL** kodiert für die As 94-155 von 8E6, an die C-terminal die As 148-151 von 16E6 (ETQL) fusioniert wurden. Ein mit den Oligonukleotiden 8E6CupBam und 8E6+ETQLEcodo amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür über BamHI/EcoRI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-16E6L50G -ETQL** kodiert für ein C-terminal um vier Aminosäuren verkürztes 16E6 (As 1-147) mit einer Punktmutation, die zu einem Austausch der Aminosäure in Position 50 von Leucin nach Glycin führt. Ein mit den Oligonukleotiden HPV16E6Bamup und 16E6dETQLEcodo amplifiziertes PCR-Fragment wurde hierfür

über BamHI/EcoRI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert. Als Matrize diente pXJ4016E6L50G (ZIMMERMANN *et al.*, 1999).

- **pCDNA-FLAG-8E6N/16E6C** kodiert für ein Hybrid-Protein aus den As 1-93 von 8E6 und As 85-151 von 16E6. Die Teilfragmente wurden über PCR mit den Oligonukleotiden HPV8E6pET5' und 8E6-NdoHind (8E6N) sowie 16E6-CupHind und HPV16E6Bamdo (16E6C) amplifiziert und über HindIII fusioniert. Das Konstrukt wurde schließlich über BamHI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-8E6N/16E6C-ETQL** kodiert für ein Hybrid-Protein aus den As 1-93 von 8E6 und As 85-147 von 16E6. Die Teilfragmente wurden über PCR mit den Oligonukleotiden HPV8E6pET5' und 8E6-NdoHind (8E6N) sowie 16E6-CupHind und 16E6dETQLEcodo (16E6C-ETQL) amplifiziert und über HindIII fusioniert. Das Konstrukt wurde schließlich über BamHI/EcoRI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert.
- **pCDNA-FLAG-16E6N/8E6C** kodiert für ein Hybrid-Protein aus den As 1-84 von 16E6 und As 94-155 von 8E6. Die Teilfragmente wurden über PCR mit den Oligonukleotiden HPV16E6Bamup und 16E6-NdoHind (16E6N) sowie 8E6-CupHind und HPV8E6pET3' (8E6C) amplifiziert und über HindIII fusioniert. Das Konstrukt wurde schließlich über BamHI in den Vektor pCDNA3.1+FLAG kloniert.

p300-Konstrukte:

- **pCMVβ-p300HA:** p300 wurde über NotI/HindIII in den Expressionsvektor pCMVβ kloniert. C-terminal wurde über eine NheI-Schnittstelle ein Hämagglutinin-Epitop angefügt, weswegen 108 bp im C-Terminus von p300 wegfielen (ECKNER *et al.*, 1994).
- **pGEX2T-p300-1, -2, -3, -4, -5, -4A,-4B** kodieren für Fragmente von p300, die für die As 1-438, As 439-1038, As 1039-1452, As 1453-1887, As 1888-2378, As 1453-1634 bzw. As 1635-1887 kodieren. Entsprechende PCR-Fragmente wurden über BamHI (1, 4, 5, 4A, 4B) oder SmaI (2,3) in pGEX2T kloniert (MÜLLER, 1999).
- **pGEX2T-p300-4B-1:** Ein Fragment von p300, das für die As 1635-1769 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6102up und p300-4B-6506do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-2:** Ein Fragment von p300, das für die As 1635-1788 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6102up und p300-4B-6563do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-TR:** Ein Fragment von p300, das für die As 1770-1788 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6507up und p300-4B-6563do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.

- **pGEX2T-p300-4B-4:** Ein Fragment von p300, das für die As 1770-1887 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6507up und p300-4B-6860do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-5:** Ein Fragment von p300, das für die As 1789-1887 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6564up und p300-4B-6860do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-TR+7:** Ein Fragment von p300, das für die As 1770-1795 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6507up und p300-4B-6584do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-TR+26 :** Ein Fragment von p300, das für die As 1770-1814 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6507up und p300-4B-6641do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-5-7:** Ein Fragment von p300, das für die As 1796-1887 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6585up und p300-4B-6860do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pGEX2T-p300-4B-5-26:** Ein Fragment von p300, das für die As 1815-1887 kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden p300-4B-6642up und p300-4B-6860do über PCR amplifiziert und über BamHI/EcoRI in pGEX2T kloniert.
- **pET14b-p300HAT:** Die HAT-Domäne von p300 wurde mit den Oligonukleotiden p300-4782Xhoup und p300-6482Xhodo über PCR amplifiziert und über XhoI in pET14b kloniert. Ein Fehler in p300-4782Xhoup (1 Basen-Insertion) wurde über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden p300HATok5' und p300HATok3' korrigiert.

weitere Konstrukte:

- **pXJ42-TEF1-AD/8E2HC:** enthält die AD von TEF-1 ($\Delta 55-121/\Delta 143-204$) fusioniert an die As 329-499 von 8E2 (MAY, pers. Mitteilung).
- **pXJ42-TEF1-AD/8E2HC mt429:** wie zuvor mit zusätzlicher Mutation in nt 1285 von 8E2, die zu einem Austausch der Aminosäure in Position 429 von Cystein nach Arginin führt. Das Konstrukt wurde über *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden 8E2mt430C-R5' und 8E2mt430C-R3' hergestellt.
- **pCMV2FLAG-TEF1AD-NLS** kodiert für die AD von TEF-1 ($\Delta 55-121/\Delta 143-204$) mit C-terminal fusioniertem Kernlokalisationssignal (NLS). Hierfür wurde ein Bst1107I/SmaI-Fragment aus pXJ41-TEF1AD-NLS über Bst1107I/SmaI in pCMV2FLAG-TEF kloniert.
- **pMTEF-AD** kodiert für die AD von TEF-1 ($\Delta 55-121/\Delta 143-204$). Das Fragment wurde mit den Oligonukleotiden pMTEFBamup und pMTEFBamdo über PCR amplifiziert und über BamHI in den Vektor pM kloniert.

- **pCp53-wt** wurde abgeleitet von pCMV-Neo-BAM und enthält den p53-ORF (nt 66-1794) (NIGRO *et al.*, 1989).

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

2.4.6 DNA-Längenstandards

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

2.4.7 Sonstige Nukleinsäuren

- sss-DNA (*sonicated salmon sperm DNA*) (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Desoxynukleotide (dNTPs) (Roche Diagnostics, Mannheim)

2.5 Radioaktivität

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

2.6 Proteine

2.6.1 Enzyme

- Restriktionsendonukleasen wurden von folgenden Firmen verwendet:
New England BioLabs, Schwalbach; Invitrogen, Karlsruhe; Roche Diagnostics, Mannheim; MBI, St.Leon-Rot
- Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Diagnostics, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (New England BioLabs, Schwalbach)
- T4 Polynucleotidkinase (New England BioLabs, Schwalbach)
- Pwo DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* (Roche Diagnostics, Mannheim)
- RNase A (Qiagen, Hilden)

2.6.2 Größenstandards

- SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker, nieder- und hochmolekular farblos und vorgefärbt (alle: BioRad, München)

2.6.3 Antiseren

p300 (Ab1): monoklonaler Antikörper gegen p300 aus Maus	(Calbiochem, Schwalbach)
CBP (C-1): monoklonaler Antikörper gegen CBP aus Maus	(Santa Cruz, Heidelberg)
H10 α YY1: monoklonaler Antikörper gegen YY1 aus Maus	(Santa Cruz, Heidelberg)
M5- α -FLAG: monoklonaler Antikörper gegen FLAG aus Maus	(Kodak, New Haven, USA)
Ni ²⁺ -NTA (α -His) : mit HRP konjugierter Antikörper gegen His ₆	(Qiagen, Hilden)
FITC- α -Maus: FITC-gekoppeltes α -Maus IgG aus Ziege	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
α -Maus/Kaninchen POD: POD-gekoppelter Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-IgG	(Roche, Mannheim)

2.7 Reagenzien

2.7.1 Reagenziensysteme (Kits)

- QIAGEN Plasmid Midi und Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- *Concert high purity plasmid maxiprep system* (Invitrogen, Karlsruhe)
- QIAprep Spin /QIAprep 8 Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden)
- QIAquick *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden)
- QuickChangeTM *Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA)
- TNT *Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega, Madison, USA)
- T4-Rapid DNA-Ligase (Promega, Madison, USA)
- BM *Chemiluminescence Western Blotting Kit* (Roche, Mannheim)
- Biotin-Streptavidin *Super Sensitive Nachweissystem* (BioGenex, San Ramon, USA)

2.7.2 Puffer und Lösungen

Für Proteinaufreinigung:

- | • Puffer A für Kernextrakte | | • Puffer C für Kernextrakte | |
|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| HEPES pH 7.9 | 10 mM | HEPES pH 7.9 | 20 mM |
| KCl | 10 mM | NaCl | 400 mM |
| EDTA | 0,1 mM | EDTA | 1 mM |
| EGTA | 0,1 mM | EGTA | 1 mM |
| DTT | 1 mM | DTT | 1 mM |
| PMSF | 0,5 mM | PMSF | 1 mM |

- **LSDB (Low Salt Dilution Buffer) -**

0 - 1000 mM

Glycerin	20%
Tris/Cl pH 7.9	50 mM
DTT	1 mM
NP40	0,1%
KCl	0 - 1000 mM

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

Glycerin	10%
Tris/Cl pH 7.9	20 mM
NaCl	500 mM
β -Mercaptoethanol	10 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	10 μ g/ml
Pepstatin	10 μ g/ml
Aprotinin	10 μ g/ml
Imidazol	5 mM

- **Puffer A_{x-y}** (verschiedene Puffer für die Affinitätschromatographie)

Glycerin	10%
Tris/Cl pH 7.9	20 mM
KCl	x mM
Imidazol	y mM
PMSF	1 mM
β -Mercaptoethanol	10 mM

Für Proteingele:

- **4x Tris/Cl-SDS, pH 8.8**

Tris/Cl pH 8.8	1,5 M
SDS	0,4%

- **4x Tris/Cl-SDS, pH 6.8**

Tris/Cl pH 8.8	500 mM
SDS	0,4%

- **SDS-Polyacrylamidgel (PAG)**

Trenngel :

Acrylamid/Bisacrylamid	7,5-15% /
	0,2-0,4%
Tris/Cl-SDS pH 8.8	25%
Ammoniumpersulfat	0,03%
TEMED	0,1%

Sammelgel:

Acrylamid/Bisacrylamid	3,9% / 0,1%
Tris/Cl-SDS pH 8.8	25%
Ammoniumpersulfat	0,05%
TEMED	0,1%

- **SDS-Elektrophoresepuffer**

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

- **2x SDS-Proben-Puffer**

Tris/Cl pH6.8	125 mM
Glycerin	20%
SDS	2%
β -Mercaptoethanol	2%
Bromphenol-Blau	15 μ M

- **Coomassie-Blau - Färbelösung**

Methanol	50%
Essigsäure	10%
Coomassie	0,05%

- **Entfärbelösung**

Methanol	5%
Essigsäure	7%

Für Western-Blots:

- **Transferpuffer**

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	20%
- **TBST** (*Tris Buffered Saline + Tween*)

Tris/Cl pH 8.0	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05%
- **Abblocklösung** (in TBST)

BSA	2%
Milchpulver	2%

Für EMSA:

- **5 % Polyacrylamid-Gel**

Acrylamid/Bisacrylamid	5% / 0,267%
TBE	0,5x
Ammoniumpersulfat	0,04%
TEMED	0,2%
- **Bindungs-Puffer**

Glycerin	10%
HEPES pH 7.9	12 mM
EDTA	0,5 mM
MgCl ₂	4 mM
KCl	60 mM
NP40	0,1%
BSA	50 ng/μl
DTT	2 mM
Spermidin	4 mM
sssDNA	25 ng/μl
poly dl/dc	50 ng/μl

Für Luciferase-Tests:

- **KPO₄-Puffer 1M**

K ₂ HPO ₄	915 mM
KH ₂ PO ₄	85 mM
- **Luciferase-Extraktions-Puffer**

KPO ₄ -Puffer, pH 7.8	100 mM
DTT	1 mM
- **Reportersol-Puffer**

KPO ₄ -Puffer, pH 7.8	100 mM
DTT	1 mM
NP40	0,5%
- **Luciferase-Reaktions-Puffer**

KPO ₄ -Puffer, pH 7.8	100 mM
MgSO ₄	15 mM
ATP	50 mM
DTT	1 mM
- **ATP-Stammlösung**

ATP	100 mM
Tris/Cl, pH7.9	192 mM
- **Luciferin-Stock (50x)**

D-Luciferin	100 mg
-------------	--------

In 7140 μl Luciferase-Reaktions-Puffer

Sonstige Puffer:

- **TSB** (*Transformation and Storage Buffer*) in LB-Medium

PEG (MW = 3350)	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*)

Tris/Cl pH 8.0	50 mM
EDTA	62,5 mM
LiCl	2,5 M
TritonX 100	0,4 %

- **2x HBS**

NaCl	280 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	1,5 mM
HEPES pH7,05	50 mM

- **Fixierer**

Methanol	10%
Essigsäure	10%

2.7.3 Sonstige Chemikalien und Materialien

Alle hier nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad „reinst“ oder „zur Analyse“ von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Roth (Karlsruhe), Difco (Detroit, USA), ICN (Aurora, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim).

- Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)
- Agarose, höchster Reinigungsgrad (BioRad, München)
- Albumin Fraktion V (Applichem, Darmstadt)
- Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Amplifizierer (*Amplify Fluographic Reagent*) (Amersham, Freiburg)
- Aprotinin (Serin-Protease-Inhibitor) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Aquatex (Merck, Darmstadt)
- Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- D-Luciferin, freie Säure (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Fötale Kälberserum (FCS) (Invitrogen, Karlsruhe)
- FuGENE6 (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Glutathion-Sepharose™ 4B (Amersham, Freiburg)
- Hematoxilin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- LB-Agar (USB, Cleveland, USA)
- LB-Broth (USB, Cleveland, USA)
- Leupeptin (Serin-, Thiol-Protease-Inhibitor) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Lysozym aus Hühnereiweiß (Serva, Heidelberg)
- Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)
- Pepstatin A (Aspartat-Protease-Inhibitor) (AppliChem, Darmstadt)
- PMSF (Serin-, Cystein-Protease-Inhibitor) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ponceau-Rot (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- *Protein Assay Reagens* (BioRad, München)
- Rifampicin (AppliChem, Darmstadt)
- RNAsin (Promega, Madison, USA)
- Saponin (Fluka, Deisenhofen)
- Spermidin, freie Base (N-[3-Aminopropyl]-1,4-butandiamin) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylendiamin) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Western Blot Membranen aus Nitrocellulose 0,45/0,2 μ m (BioRad, München)
- β -Mercaptoethanol (14,1 M) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Plastikwaren wurden von den Firmen Falcon BD (Heidelberg), Greiner (Solingen), Sarstedt (Nürnbrecht) und TPP (Trasadingen, Schweiz).

Der Chemilumineszenz-Nachweis sowie Autoradiographien erfolgten mit ECL-Hyperfilmen (Amersham-Pharmacia, Freiburg).

2.8 Medien und Lösungen für die Zellkultivierung

- **Dulbecco's MEM** (*Modified Eagle Medium*) (Invitrogen, Karlsruhe)

mit Glutamax, 4500 mg Glucose, Pyridoxin, ohne Natriumpyruvat

Zusätze:

FCS	7,5 % (für C33A- und HeLa-Zellen)	
	10 % (für Cos7- und 293T-Zellen)	
Streptomycinsulfat	120 mg/l	
Penicillin	120 mg/l	(alle Invitrogen, Karlsruhe)

- **E-Medium** (für RTS3b-Zellen)

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

- Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe)
- PBS (Invitrogen, Karlsruhe)
- KGM-2 Medium für NHEK-neo (Bio Whittaker, Walkersville, USA)
- HBBS für NHEK-neo (Bio Whittaker, Walkersville, USA)
- Trypsin für NHEK-neo (Bio Whittaker, Walkersville, USA)
- TNS (Neutralisierungslösung) für NHEK-neo (Bio Whittaker, Walkersville, USA)

- **Einfriermedium:**

für NHEK-neo:

DMSO	10%	10%
FCS	90%	60%
Medium	-	30%

3. Methoden

3.1 Bakterienkultur

3.1.1 Erzeugung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente XL1-Blue- und BL21-pLysS-Bakterien wurden nach der Methode von CHUNG und MILLER (1988) hergestellt. 100 ml LB-Medium wurden in einem 1 Liter Erlenmeyerkolben mit 2,5 ml einer frischen Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Mit 20 ml dieser Kultur wurden nun weitere 100 ml LB-Medium angeimpft und die wiederum bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert. Bei BL21-Bakterien wurde das Medium zur Selektion auf das pLysS-Plasmid zusätzlich mit 170 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Der Kolben mit den Bakterien wurde dann für 10 min auf Eis gestellt und die Bakterien anschließend 10 min bei 0°C und 3000g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Bakterien in 5 ml eiskaltem TSB resuspendiert, erneut 10 min auf Eis inkubiert, anschließend in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu je 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

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

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter XL1-Blue- und BL21-pLysS-Bakterien wurden 1 ng DNA bzw. die DNA eines Ligationsansatzes mit 100 µl Bakterien 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem 45 sekündigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Zugabe von 400 µl LB/10 mM Glukose erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37°C unter Schütteln, um das Resistenzgen zu exprimieren. Die Bakterien wurden dann auf selektive LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.3 Langzeitlagerung von Bakterien

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

3.2 DNA-Methoden

3.2.1 Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Plasmidisolierung wurden Bakterien aus Vorkulturen oder von einer LB-Agar-Platte in LB-Medium mit geeigneten Selektionsmarkern überimpft und bei 37°C unter Schütteln über Nacht dicht wachsen gelassen. Für eine analytische Plasmidisolierung wurden 5 ml LB-Medium in einem 13 ml PE-Röhrchen (Sarstedt) und für eine präparative Plasmidisolierung bis zu 200 ml in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben angeimpft.

3.2.2 Plasmidpräparationen

Präparative Plasmidisolierungen (Mini-, Midi-, Maxipräparationen, Gel-Extraktionen, PCR-Produktaufreinigungen) wurden mit Reagenzsystemen der Firma QIAGEN (Hilden) und der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Sie basieren auf der alkalischen Extraktionsmethode nach BIRNBOIM & DOLY (1979) und der Bindung der DNA an Anionen-Austauscher-Säulen (Quarzel). Die DNA wurde zum Schluss in 10 mM Tris pH 8.0 aufgenommen.

Analytische Plasmid-Präparationen wurden nach der TELT-Methode durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 4 ml Bakterienkultur für 1 min bei 17500g pelletiert und in 200 µl TELT-Puffer und 20 µl Lysozym (10 µg/µl) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurden die Ansätze für 1 min bei 95°C und anschließend 3 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden über eine 10-minütige Zentrifugation bei 17500g pelletiert und der Überstand in 100 µl Isopropanol aufgenommen. Die DNA wurde nun über einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 17500g über 10 min präzipitiert und anschließend in 200 µl 70%-igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 40 µl 10 mM Tris/Cl pH 8.0 aufgenommen.

Der DNA-Gehalt wurde spektrometrisch bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt.

3.2.3 DNA-Standardmethoden

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

- Phenolaufreinigung von DNA
- Ethanol-fällung von DNA
- Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen
- Phosphorylierung von DNA mit T4-Polynukleotidkinase
- Ligation von DNA mit T4-Ligase
- Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA
- Reinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion von DNA

3.2.4 DNA-Sequenzierung

Jeweils 3-10 pmol Primer und 400 ng DNA-Matrize in einem Gesamtvolumen von 6 μ l wurden auf einem ABI-Prism 377-Sequenzierer (Applied Biosystems, Perkin Elmer) im Servicelabor des ZMMK der Universität zu Köln sequenziert. Die Auswertung erfolgte über das Programm Edit View Vers. 1.0.2 (Perkin Elmer).

3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen, die über die Bindung von zwei Oligonukleotiden, die in entgegengesetzter Orientierung an eine DNA-Matrize binden, definiert werden (MULLIS *et al.*, 1987).

Amplifikationen für präparative Zwecke wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l durchgeführt. Als Matrize wurden 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zwei Oligonukleotide, die zu je einem DNA-Strang komplementär waren und dort das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzten, dienten als Primer und wurden jeweils in einer Menge von 1 μ g hinzugefügt. Alle Amplifikationen wurden mit einer Mg^{2+} -Konzentration von 1.875 mM und je 25 μ M der vier Desoxynukleotide durchgeführt. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Nach Zugabe von 0.5 μ l Pwo-Taq-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in das auf 94°C vorgeheizte PCR-Gerät (T3-Thermocycler, Biometra, Göttingen) gestellt und die Temperaturzyklen nach folgendem Basisschema gestartet.

1.	94°C	2 min	
2.	94°C	15 sec	(Denaturierung)
	52°C	30 sec	(Hybridisierung)
	72°C	1-3 min	(Polymerisierung)
3.	72°C	20 min	

Der 2. Schritt wurde insgesamt 25 mal wiederholt. Je nach unterschiedlicher Beschaffenheit der Oligonukleotide und Größe der zu amplifizierenden Bereiche wurden die Hybridisierungstemperatur und die Extensionszeit des Basisprotokolls angepasst. Die Größe und die Menge der amplifizierten DNA wurde anschließend auf einem Agarose-Gel überprüft.

3.2.6 *In vitro*-Mutagenese

Punktmutationen, sowie Deletionen von ein und mehreren Aminosäuren wurden mit Hilfe des „Quick Change Site-Directed Mutagenesis System“ (Stratagene, La Jolla, USA) eingeführt. Hierfür wurde das zu mutierende Plasmid mit zwei zueinander

komplementären Oligonukleotiden, die jeweils die gewünschte Mutation enthielten, in einer PCR-Reaktion nach folgendem Schema eingesetzt:

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

PCR-Bedingungen:

1x	95°C	30 sec
18x	95°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	12 min
1x	68°C	15 min

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Sequenz der Oligonukleotide und Größe des Plasmids angepasst. Die parentale nicht mutierte Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 µl DpnI 1 h bei 37 °C verdaut. Für die Transformation in *E.coli* wurden jeweils 1 µl des Ansatzes und 50 µl XL-1-Bakterien verwendet.

3.3 Zellkulturmethoden

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

3.3.1 Kultivierung von RTS3b, C33A, HeLa, 293T und Cos7-Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA je nach Zelllinie für 2-6 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden zu lösen. Durch leichtes Schlagen der Kulturflaschen gegen die Handfläche wurden noch nicht abgelöste Zellen suspendiert. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und danach in neue Gewebekulturgefäße je nach Bedarf 1:3 bis 1:12 gesplittet.

3.3.2 Einfrieren und Lagerung von Zellen

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

Trypsin/EDTA vom Boden abgelöst und anschließend in 9 ml Medium aufgenommen. Danach wurden sie 5 min bei 200g pelletiert, das Pellet in 4.5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1.5 ml in Einfrierröhrchen aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.3.3 Kultivierung von NHEK (primäre Keratinozyten)

Die NHEK-Zellen wurden nach der Lieferung sofort aufgetaut und auf 25 cm²-Gewebekulturflaschen zu je 3500 Zellen/cm² verteilt. Hierfür wurde das Kryo-Gefäß mit den gefrorenen Zellen für 1-2 min in einem 37°C-Wasserbad inkubiert. Nachdem das letzte Eis gerade geschmolzen war, wurden die Zellen vorsichtig mit einer 1000 µl-Pipette resuspendiert und auf die mit je 5 ml KGM-2-Medium gefüllten Zellkulturflaschen verteilt. Das verwendete Medium wurde vor dem Einsatz stets mindestens 30 min im Brutschrank erwärmt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 5 ml HBSS gewaschen und 5 ml frisches Medium hinzugefügt. Danach erfolgte der Mediumwechsel alle zwei Tage.

Bei einer Konfluenz von 60-80% wurden alle Zellen bis auf die einer Flasche weggefroren. Hierfür wurde das Medium abgenommen, 2,5 ml Trypsin hinzugegeben und die Zellen 5 min im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde die Reaktion mit 2,5 ml TNS gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Restliche Zellen wurden in 5 ml HBSS aufgenommen und ebenfalls in das Röhrchen überführt, in dem die Zellen anschließend 5 min bei 200g pelletiert wurden. Der Überstand wurde dann bis auf ca. 200 µl verworfen und die Zellen durch „anschnippsen“ resuspendiert. Danach wurden sie in jeweils 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen, in 2 ml-Kryogefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

Die Zellen einer Flasche wurden weiter kultiviert. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und pelletiert. Das Pellet wurde dann aber in 20 ml Medium aufgenommen und in eine 150 cm²-Gewebekulturflasche überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, der danach alle zwei Tage durchgeführt wurde. Bei einer Konfluenz von 60-80% wurden die Zellen 1:6 gesplittet und nach dieser 3. Passage erneut weggefroren. Hier wurden die Zellen einer 150 cm²-Flasche auf vier Einfrier-Röhrchen verteilt.

Beim Auftauen der NHEK wurden Zellen aus der 1.Passage auf eine 150 cm²-Flasche und Zellen aus der 3. Passage auf eine 150 cm²- und eine 75 cm²-Flasche ausgesät.

3.3.4 Transfektion eukaryoter Zellen

Für analytische transiente Transfektionsanalysen wurden zwischen 0,8-2,0 x 10⁵ Zellen 24 h vor der Transfektion in 6-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion zu 40-50% konfluent waren. Für präparative Transfektionen wurden

entsprechend Zellen in Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm oder 15 cm ausgesät.

Für die Transfektion von NHEK wurden Zellen aus der 3. Passage aufgetaut. Am nächsten Tag (Tag 2) und an Tag 4 erfolgte ein Mediumwechsel. Am 5. Tag wurden die Zellen zu $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz in 6-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium vor der Transfektion gewechselt und die Zellen mittels „FuGENE“ transfiziert. Für die Zellzahl-Bestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

3.3.4.1 Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation

Für präparative Transfektionen von eukaryoten Zellen wurde die Calciumphosphat-Methode angewandt (AUSUBEL *et al.*, 1992). Die folgenden Angaben beziehen sich auf Transfektionen in 10 cm-Schalen. Je nach Zelltyp wurden $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde vier Stunden vor der Transfektion das Medium abgenommen und durch frisches ersetzt. Die zu transfizierende DNA wurde mit H_2O auf 426 μ l aufgefüllt. Kurz vor der Transfektion wurden 489 μ l 2xHBS hinzugegeben. Unter der Sterilbank erfolgte dann die Zugabe von 63 μ l 2M $CaCl_2$, woraufhin die Probe sofort 10 sec auf dem Vortexer gemixt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde das Präzipitat dann vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Die Schalen wurden leicht geschwenkt und dann über Nacht in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Morgen wurde das Medium mit dem Präzipitat abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 ml frischem Medium hinzugefügt. Die Ernte erfolgte 48 h nach der Transfektion.

3.3.4.2 Transfektion mittels „FuGene“

Für die Transfektion mit „FuGene“ wurden je Ansatz 100 μ l serumfreies Medium mit 2 μ l „FuGene“-Transfektionsreagenz pro μ g DNA für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 μ l des Gemisches zu der DNA gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsansätze wurden dann vorsichtig auf die Zellen gegeben, die Platten danach leicht geschüttelt und bis zur Ernte für 40-48 h in den Brutschrank gestellt.

3.3.4.3 Ernte der transfizierten Zellen mittels physikalischen Zellaufschluss

Für die Zellernte bei analytischen Transfektionen wurden die Zellen in 6-Loch-Platten zunächst mit PBS gewaschen, anschließend in 1 ml PBS mit einem Gummischaber vom Boden abgekratzt, in ein Eppendorfgefäß auf Eis überführt und 3 min bei $4^\circ C$ und 7500g pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 50 μ l Luciferase-Extraktions-Puffer resuspendiert und über vier Zyklen aus je 1-minütigem Einfrieren im Trockeneis-gekühlten Ethanolbad, 2-minütigem Auftauen im $37^\circ C$ -Wasserbad und anschließendem Mixen auf dem Vortexer aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden dann

über 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 17500g pelletiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß auf Eis überführt.

3.3.4.4 Ernte der transfizierten Zellen mittels chemischen Zellaufschluss

Im Laufe der Arbeit konnte beobachtet werden, dass Zellen, die besonders fest am Boden haften (RTS3b, NHEK), während des Abkratzens mit dem Gummischaber beschädigt werden und dadurch einen Großteil ihrer Luciferase-Aktivität verlieren. Dieser Effekt konnte durch einen chemischen Zellaufschluss mit NP40 verhindert werden.

Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Danach wurden 300 µl Reportersol auf die Zellen gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Der Überstand konnte nach Abzentrifugation von Zellresten direkt für die Luciferaseanalysen eingesetzt werden.

3.3.4.5 Luciferase-Test

Zunächst wurden je Ansatz 300 µl und für zwei Waschschrte 3600 µl Luciferase-Reaktions-Puffer hergestellt und dieser 1:100 mit D-Luciferin versetzt. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte im Lumat LB9501 (Berthold, Wildbad). Nach zwei Waschschrten mit dem Puffer wurde, je nach Aktivität des Reporterkonstruktes, ein Aliquot des Zellextraktes in ein 5 ml-Messröhrchen (Sarstedt) gegeben, welches unmittelbar danach in den Lumat gestellt wurde. Nach Injektion von 300 µl Luciferase-Reaktions-Puffer wurde die Lichtemmission über einen Zeitraum von 10 sec gemessen. Der ermittelte Wert (RLU) war proportional zur Aktivität der exprimierten Luciferase.

3.3.5 Erzeugung von Ganzzellextrakten

Für das Herstellen von Ganzzellextrakten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit einem Gummischaber abgekratzt. Die Zellen wurden über eine fünfminütige Zentrifugation bei 200g pelletiert und das Pellet je nach Größe in 200-500 µl 100 mM LSDB aufgenommen. Anschließend wurden sie über vier Zyklen aus je 1-minütigem Einfrieren im mit Trockeneis gekühltem Ethanolbad, 2-minütigem Auftauen im 37°C-Wasserbad und anschließendem Mixen auf dem Vortexer aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden dann über 5-minütige Zentrifugation bei 4°C und 17500g pelletiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß auf Eis überführt. Da in den Zellresten auch die größtenteils unversehrten Zellkerne enthalten waren, wurden diese in 50-100 µl Puffer C resuspendiert und 30 min auf einem Rüttler im Kühlraum inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 17500g wurde der Überstand abgenommen und mit dem zuvor gewonnenem Überstand vereint. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.3.6 Erzeugung von Kernextrakten

Kernextrakte wurden nach SCHREIBER *et al.* (1989) hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend unter PBS mit einem Gummischaber abgekratzt. Anschließend wurden sie über eine fünfminütige Zentrifugation bei 200g pelletiert, in 400 µl Puffer A resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl 10% NP40 wurde sofort 10 sec auf dem Vortexer gemixt und anschließend 30 sec bei RT und 17500g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer C aufgenommen und 30 min im Kühlraum auf einem Rüttler inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 17500g wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.7 Immunfluoreszenzanalysen

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden zunächst je nach Zellart $0,2-0,4 \times 10^5$ Zellen in 24-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit der DNA, die für das zu untersuchende Protein kodiert, mittels „FuGENE“ transfiziert. Die DNA-Menge wurde mit pUC18 als Träger-DNA auf 400 ng aufgefüllt. Nach ca. 40 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 500 µl 2% Formaldehyd 10 min bei RT fixiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1 ml PBS für je 15 min. Die Zellen wurden daraufhin mit 500 µl PBS/10% FCS für 20 min blockiert. Der 1. Antikörper wurde 1:200 in PBS/10% FCS/0,1% Saponin verdünnt und 5 min bei 17500g zentrifugiert um unlösliche Präzipitate zu entfernen. Von der Antikörperverdünnung wurden je 200 µl auf die Zellen gegeben und 1 h inkubiert. Danach wurde dreimal mit 1 ml PBS/ 10% FCS gewaschen. Der FITC-konjugierte 2. Antikörper wurde wie zuvor 1:200 verdünnt und die Zellen wurden mit 200 µl 1 h inkubiert. Anschließend wurden sie erneut dreimal mit 1 ml PBS/ 10% FCS gewaschen und dann mit 500 µl PBS überschichtet. Die Zellen konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen) betrachtet werden.

3.4 Proteinmethoden

3.4.1 Proteinaufreinigung

3.4.1.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden in BL21-pLysS-Bakterien exprimiert. Für die Isolierung der Fusionsproteine wurden 200 ml LB-Medium 1:100 mit einer dichten Vorkultur der Bakterien angeimpft. Zur Selektion wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Zellen wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0.6-0.9 inkubiert. An diesem Punkt wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die

Expression der Proteine erfolgte über einen Zeitraum von 2 h. Anschließend wurden die Bakterien durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 3000g pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml 500 mM LSDB aufgenommen. Danach wurden die Zellen viermal 30 sec bei 100 Watt auf Eis sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden in 10 min bei 4°C und 17500 g abzentrifugiert und der Überstand in 2 ml Aliquots bei -80°C eingefroren.

Die im Zellextrakt befindlichen GST-Fusionsproteine wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Hierbei wird das an der Oberfläche der Sepharose exponierte Glutathion sehr effizient und spezifisch von dem GST-Fusionsanteil gebunden. 30 µl Sepharose wurden mit 1 ml H₂O und anschließend mit 1 ml 500 mM LSDB gewaschen und equilibriert. Bei jedem Waschschrift wurden die Sepharosekügelchen für 1 min bei 1000 g pelletiert und der Überstand entfernt.

Für eine Testaufreinigung wurden 500 µl Zellextrakt auf die Sepharose-Matrix gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde anschließend insgesamt viermal mit 1 M LSDB und zweimal mit 100 mM LSDB gewaschen. Die aufgereinigten Proteine wurden dann durch Zugabe von 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5-minütige Inkubation bei 95°C von den Sepharosekügelchen gelöst und über ein SDS-PAG aufgetrennt. Für die Visualisierung erfolgte nach der Auftrennung der Proteine eine 30-minütige Inkubation in einem Coomassie-blau-Bad. Der Hintergrund wurde im Entfärbebad über Nacht entfernt. Das Gel wurde schließlich im Gelrockner getrocknet.

3.4.1.2 Aufreinigung von Proteinen mit Histidin-Epitopen

Die Aufreinigung in BL21-pLysS exprimierter Proteine mit einem Epitop aus sechs Histidinresten erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Ni²⁺-NTA-Agarose.

200 ml ampicillinhaltiges LB-Medium wurden 1:100 mit einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0.6 - 0.9 bei 37°C inkubiert. Die Expression der Proteine erfolgte über die in den BL21-Zellen enthaltene T7-Polymerase, deren Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert wurde. Nach 1 h wurde die Aktivität der bakteriellen Polymerasen durch Zugabe von 1 mM Rifampicin inhibiert. Die Zellen wurden schließlich nach insgesamt 2 h über eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000g und 4°C geerntet.

Im Kühlraum (4°C) wurden 400 µl Ni²⁺-NTA-Agarose-Suspension (Säulenvolumen (SVo) = 200 µl) in eine Plastiksäule gefüllt, die unten verschlossen war und, nachdem die Agarose sedimentiert war, geöffnet wurde. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml kaltem und sterilem H₂O gewaschen und mit 10 SVo HSLB equilibriert.

Das Pellet der geernteten Bakterien wurde in 5 ml HSLB resuspendiert, viermal für 30 sec bei 100 Watt auf Eis sonifiziert und die Zelltrümmer über 10-minütige Zentrifugation bei 17500g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde nun auf die equilibrierte Säule gegeben und die Fließgeschwindigkeit auf 2-3 Tropfen/min eingestellt. Der Durchfluß wurde

aufgefangen und erneut auf die Säule gefüllt. Um den Rest der Zellextrakte aus der Säule zu entfernen, wurde anschließend 1 SVo HSLB auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit 2 SVo A₁₀₀₀₋₀ und 20 SVo A₃₀₀₋₂₀ gewaschen, bevor die Proteine über insgesamt 4 SVo A₁₈₀₋₄₀₀ eluiert wurden. Das Eluat wurde in insgesamt 8 Fraktionen zu je 2 Tropfen (~ 100 µl) aufgefangen. Um den Gehalt des aufgereinigten Proteins in jeder Fraktion zu überprüfen, wurden 5 µl jeder Fraktion in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine über ein SDS-PAG aufgetrennt. Die Identifikation des Proteins erfolgte nach einem Western Blot mit einem Antikörper, der gegen das Histidin-Epitop gerichtet war. Der Rest wurde bei –80°C gelagert.

3.4.2 *In vitro*-Translation

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

3.4.3 Protein-Protein Interaktionsstudien

Für Interaktionsstudien wurden GST-Fusionsproteine entweder mit *in vitro* translatierten Proteinen, mit über ein Histidin-Epitop bakteriell aufgereinigten Proteinen oder mit Zellextrakten inkubiert.

Die GST-Fusionsproteine wurden, wie oben beschrieben, aufgereinigt und in 200 µl 100 mM LSDB vorgelegt. Hierzu wurden nun entweder 10 µl des *in vitro*-Translationsansatzes mit dem exprimierten und ³⁵S-markierten Protein oder 2-10 µg des aufgereinigten His₆-Proteins oder 100 µg Zellextrakte gegeben. Das Gemisch wurde zwei Stunden auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Um unspezifische Interaktionen zu minimieren wurde der Ansatz anschließend drei- bis fünfmal mit 100-250 mM LSDB und anschließend einmal mit 100 mM LSDB gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurden die Proben 2 min unter leichtem Schütteln inkubiert, dann 1 min bei 1000g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Sepharose-Kügelchen mit den gebundenen Proteinen wurden dann in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die im Probenpuffer gelösten Proteine wurden 5 min bei 95°C denaturiert und über ein SDS-PAG aufgetrennt.

Für den Nachweis gebundener *in vitro* translaterter Proteine wurde das Gel 30 min im Fixierbad fixiert, anschließend zur Verstärkung des Signals 25 min in Amplifizierer inkubiert und zum Schluss eine Stunde im Geltrockner getrocknet. Das Gel wurde schließlich über Nacht bei –80°C in einer Autoradiographie-Kassette auf einen radiosensitiven Film exponiert.

Für den Nachweis von Proteinen mit einem Histidin-Epitop wurde ein Western Blot durchgeführt.

3.4.4 Western-Blot

Für Western-Blot-Analysen wurden die über ein SDS-PAG aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde eine luftblasenfreie Schichtung aus zwei in Transfer-Puffer getränkten Schwämmen, dazwischen pro Seite zwei Whatman-Papieren sowie dem Gel und der Membran im Zentrum aufgestapelt, zwischen zwei Plastikplatten mit Druck fixiert und in die Blot-Kammer eingesetzt. Über Nacht wurde dann eine Spannung von 30 Volt so angelegt, dass sich die Membran zwischen dem Gel und der Anode der Kammer befand.

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst in H₂O eingeweicht. Es folgte eine Anfärbung der Proteine mit einer Ponceau-Rot-Lösung. Durch Waschen mit H₂O wurde die Hintergrundfärbung entfernt. Anschließend wurden die Markerproteinbanden mit einem Stift nachgezeichnet und die Membran mit einem Skalpell zurecht geschnitten. Die Membran wurde danach mit 15 ml TBST wieder vollständig entfärbt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die proteinfreien Stellen der Membran zu verhindern, wurde sie eine Stunde in 50 ml Abblocklösung auf dem Taumler inkubiert und dann 10 min mit 15 ml TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran auf Parafilm gelegt, mit 1,5-2 ml einer Verdünnung (TBST + 0,2% BSA) des 1. Antikörpers überschichtet und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschritte, von je 10 min Länge, mit jeweils 15 ml TBST. Danach wurde der Filter wieder auf Parafilm mit 1,5-2 ml einer Verdünnung des 2. Antikörpers überschichtet und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 10 min in 15 ml TBST gewaschen und anschließend auf Parafilm mit 2 ml „BM Chemiluminescent Blotting Substrate“ (20 µl Lösung A + 1980 µl Lösung B), welches eine halbe Stunde zuvor angesetzt wurde, für 60 sec überschichtet. Das in der Lösung enthaltene Luminol, wurde nun von der Peroxidase unter Lichtemission umgesetzt. Der Filter wurde auf Whatman-Papier abgetropft und zwischen zwei Klarsichtfolien in einer Exposition-Kassette fixiert, worin anschließend ein ECL-Film mit der Membran belichtet wurde.

3.4.5 Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt. 2 µl der proteinhaltigen Lösung wurden in 96-Loch-Platten mit 150 µl des 1:5 verdünnten Protein-Assay-Reagens (BioRad) versetzt. Zusätzlich wurde auf dieser Platte eine BSA-Verdünnungsreihe als Eichkurve angelegt. Anschließend wurde die OD₆₂₀ in einem Spektralphotometer (Spectra, Tecan, Crailsheim) bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

3.4.6 Gelretardierungsanalysen „EMSA“

Der EMSA dient der Analyse der Bindungsfähigkeit eines Proteins an DNA *in vitro*. Die zu untersuchenden Proteine wurden mit 250 pg des radioaktiv markierten Oligonukleotids in 20 µl Bindungspuffer 20 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben auf ein 5%-PAG geladen und eine Spannung von 160 V angelegt. Das Gel wurde 15 min fixiert und 1 h bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde es auf einem Röntgenfilm exponiert.

3.5 Immunhistochemische Färbung von Hautschnitten

Die hier gezeigten 5 µm Kryo-Hautschnitte wurden mit dem *Biotin-Streptavidin-Super-Sensitive* Nachweissystem von BioGenex gefärbt. Zunächst wurden die Schnitte 30 min luftgetrocknet und anschließend in einer Inkubationswanne für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Um die Inkubationsmengen zu reduzieren, wurden die Schnitte mit einem DAKO-Fettstift umkreist. Dann wurden sie 5 min in PBB (PBS + 0,5% BSA) gewaschen. Die Objektträger mit den Schnitten wurden in eine Feuchtkammer plaziert und die umkreisten Schnitte mit 200 µl der Antikörperverdünnung (1,5 µg/ml) 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für 5 min in der Inkubationswanne mit PBB gewaschen. Es folgte nun nacheinander eine 20-minütige Inkubation der Schnitte mit zwei Tropfen eines Link-Antikörpers und zwei Tropfen des „Label“-Enzyms, jeweils gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBB. Schließlich wurden 100 µl des DAB-Substrats auf die Schnitte gegeben. Die Reaktion wurde nach 5 min bei RT durch Waschen der Objektträger in H₂O gestoppt. Es folgte eine fünfminütige Gegenfärbung der Kerne im Hematoxilin-Bad (nach Mayer) und erneutes Waschen in H₂O. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckelt.

4. Ergebnisse

4.1 HPV8 E2 und p300 interagieren direkt miteinander

PV E2-Proteine kooperieren mit dem zellulären Koaktivator p300 bei der Aktivierung der Transkription. Der Synergismus konnte mit einer Bindung der E2-Proteine an p300 korreliert werden (MÜLLER, 1999; LEE *et al.*, 2000a; PENG *et al.*, 2000). In meiner Diplomarbeit wurde p300 für Interaktionsanalysen in fünf Fragmente (p300-1 bis -5) unterteilt: p300-1 (As 1-438) enthält die C/H1-Domäne. Innerhalb von p300-2 (As 439-1038) befindet sich die sogenannte KIX-Region. p300-3 (As 1039-1452) beinhaltet die C/H2-Domäne, die Bromodomäne und einen großen Anteil des Bereiches, dem die HAT-Aktivität zugeschrieben wird. p300-4 (As 1453-1887) besitzt die C/H3-Domäne und den C-terminalen Anteil der HAT-Aktivität, und in p300-5 (As 1888-2378) ist die glutaminreiche Region lokalisiert (MÜLLER, 1999). Mit diesen Fragmenten konnte eine Bindung von HPV8 E2 (8E2) an p300-4 nachgewiesen werden, während 18E2 und BPV1 E2 zusätzlich auch p300-1 und p300-5 erkannten (Abb. 5). Bei einer näheren Analyse wurden zwei Bindedomänen für 8E2 innerhalb von p300-4 identifiziert, wobei 8E2 eine deutlich höhere Affinität zu den As 1528-1634 zeigte, als zu den As 1635-1887 (MÜLLER, 1999). Die Interaktionsanalysen wurden mit E2-Proteinen, die im Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert wurden, und mit bakteriell gereinigten GST-fusionierten p300-Fragmenten durchgeführt. *In vitro*-Translationsansätze enthalten neben den zu analysierenden Faktoren noch weitere zelluläre Proteine, so dass bei diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Interaktion zwischen E2 und p300 über einen dritten Faktor vermittelt wird und somit nicht direkt ist.

Für den Nachweis einer direkten Interaktion wurde ein Fragment von p300, das für die HAT-Domäne (As 1195-1761) kodiert und damit auch die hochaffine 8E2-Bindedomäne enthält, mit einem Histidin-Epitop (His₆) fusioniert, in Bakterien exprimiert und über eine Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule spezifisch aufgereinigt (Abb. 6 Spur 8). Jeweils 2 µg bakteriell gereinigtes GST-8E2 und GST wurden an eine Glutathion-Sepharose-Matrix gekoppelt und mit 10 µg His₆-p300-HAT inkubiert. Unspezifische Wechselwirkungen wurden über vier Waschschriffe in LSDB mit bis zu 250 mM KCl entfernt. Gebundene Proteine wurden über ein 10%-Polyacrylamid-Gel (PAG) aufgetrennt und nach einem Western Blot mit einem Ni²⁺-NTA-konjugierten Antikörper, der das Histidin-Epitop erkennt, detektiert. Spur 1 in Abbildung 6 zeigt 10% des eingesetzten His₆-p300-HAT. GST-8E2 (2) war in der Lage His₆-p300-HAT zu präzipitieren, während GST alleine (4) kein Signal erzeugte. Um Kreuzreaktionen des Antikörpers mit GST-8E2 zu erkennen, wurde dieses in Spur 3 alleine ohne die Zugabe von His₆-p300-HAT aufgetragen.

Da vermutet wird, dass p300 ebenfalls an DNA binden kann (RIKITAKE und MORAN, 1992), wäre es theoretisch möglich, dass die Interaktion zwischen 8E2 und p300 über Nukleinsäure-Verunreinigungen der gereinigten Proteine vermittelt wurde. Um den Einfluss von Nukleinsäuren auszuschließen, wurden den Interaktionsansätzen entweder 100 µg/ml RNase A (6) oder 50 µg/ml Ethidiumbromid (7) zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und führt dadurch zu einer Überstreckung der DNA, so dass DNA-bindende Faktoren nicht mehr binden können. Die Wechselwirkung von His₆-p300-HAT an GST-8E2 wurde jedoch weder von RNase A noch von Ethidiumbromid beeinflusst. Dieses Experiment konnte erstmals beweisen, dass die Interaktion von 8E2 mit p300 direkt ist und nicht von anderen Faktoren vermittelt wird.

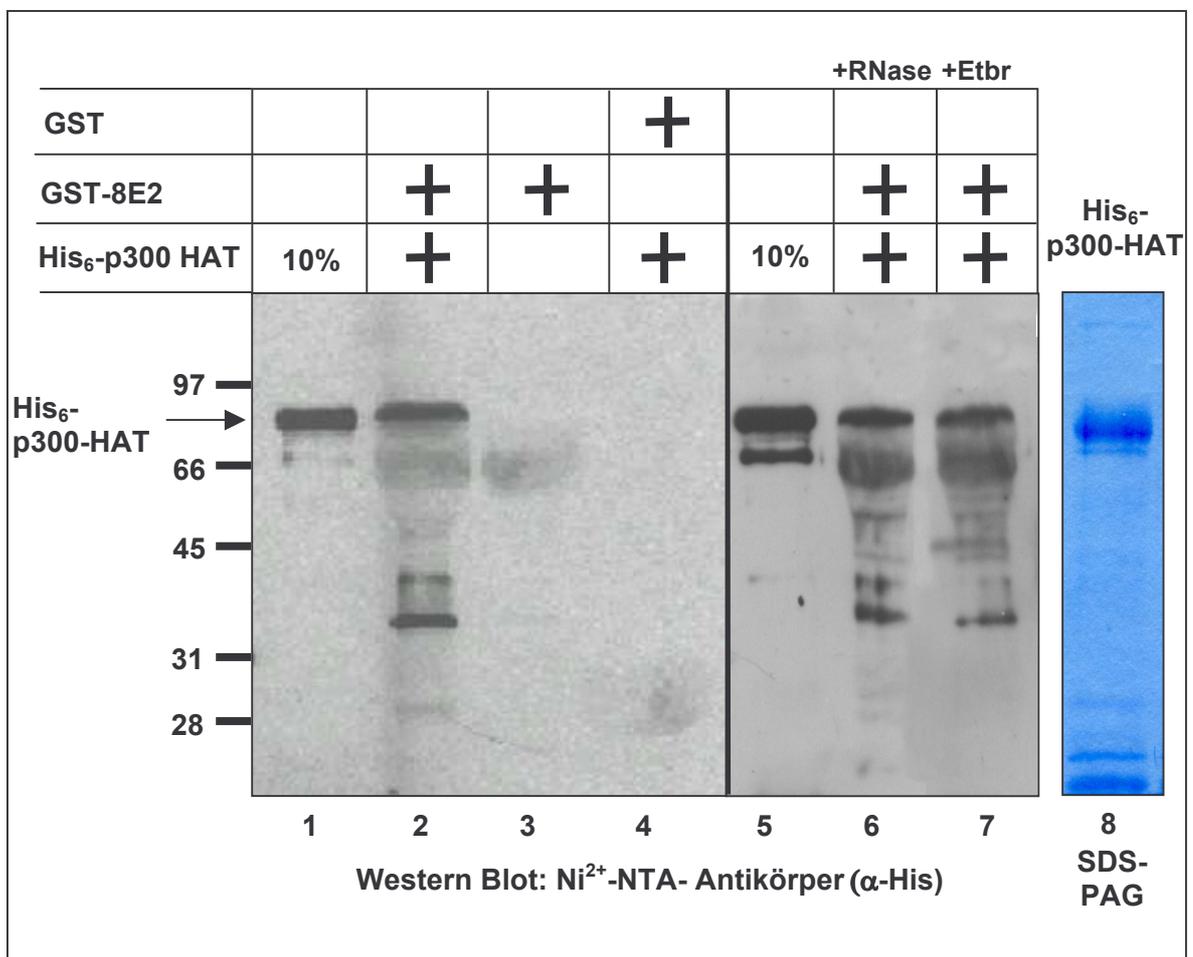


Abb. 6 8E2 bindet direkt an p300

Interaktionsstudie mit bakteriell exprimiertem und aufgereinigtem His₆-p300-HAT und GST-8E2. 2 µg GST-8E2 (Spur 2, 6 und 7) und GST (4) wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µg His₆-p300-HAT inkubiert und anschließend viermal mit bis zu 250 mM LSDB gewaschen. Spur 1 und 5 zeigen 10% des eingesetzten His₆-p300-HAT. Für den Nachweis potentieller Kreuzreaktionen des Antikörpers, wurde GST-8E2 in Spur 3 alleine aufgetragen. Um eine Vermittlung der Interaktion über Nukleinsäuren auszuschließen, wurden den Interaktionsansätzen in Spur 6 und 7 100 µg/ml RNase A bzw. 50 µg/ml Ethidiumbromid (Etbr) zugesetzt. Gebundene Proteine wurden über ein 10%-PAG aufgetrennt und nach einem Western Blot mit einem Ni²⁺-NTA-konjugierten Antikörper detektiert. Spur 8 zeigt ein mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-PAG mit His₆-p300-HAT.

4.2 Überexprimiertes p300 hat keinen Einfluss auf die Aktivität des CMV-Promotors

Da die Menge an p300 innerhalb der eukaryoten Zelle limitiert ist (YAO *et al.* 1998b), führte überexprimiertes p300, nach transienter Transfektion eines entsprechenden Expressionsvektors, zu einer Stimulierung der 8E2-vermittelten Aktivierung eines synthetischen Promotorkonstruktes (MÜLLER, 1999). Bei dem in diesen Versuchen eingesetzten Expressionsvektor stand das 8E2-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. p300 könnte, als Koaktivator der Transkription, auch den CMV-Promotor stimulieren und so zu einer Erhöhung der E2-Expression beitragen, was ebenfalls eine Ursache für die gesteigerte E2-vermittelte Aktivierung der Transkription gewesen sein könnte. Hierfür lagen bisher noch keine Daten vor. Es wurde daher zunächst überprüft, ob sich die Konzentration eines E2-Proteins, das unter der Kontrolle des CMV-Promotors in der Zelle exprimiert wird, bei gleichzeitiger Überexpression von p300 quantitativ ändert. Jeweils 5 µg CMV2FLAG-BPV1 E2, ein Expressionsvektor der BPV1 E2 fusioniert mit dem FLAG-Epitop exprimiert, wurden alleine oder zusammen mit 5 µg bzw. 10 µg pCMVβ-p300HA in C33A-Zellen kotransfiziert. Nach 40 h wurden Kernextrakte hergestellt, und FLAG-BPV1 E2 wurde nach einem Western Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop detektiert (Abb. 7). Spur 1 zeigt die Negativ-Kontrolle, in der nur p300 aber kein FLAG-BPV1 E2 überexprimiert wurde. Die Menge an BPV1 E2 (2) in den Extrakten der transient transfizierten Zellen änderte sich nach Koexpression von p300 nicht (3,4).

Um dieses Resultat in einem sensitiveren System zu bestätigen, wurde der Einfluss von überexprimiertem p300 auf ein Reporterkonstrukt untersucht, in dem das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand. 500 ng pCMV-Luc wurden alleine und zusammen mit 50 ng bis 500 ng pCMVβ-p300HA in C33A-Zellen kotransfiziert. Auch hier konnte keine nennenswerte Aktivierung des CMV-Promotors durch p300 beobachtet werden.

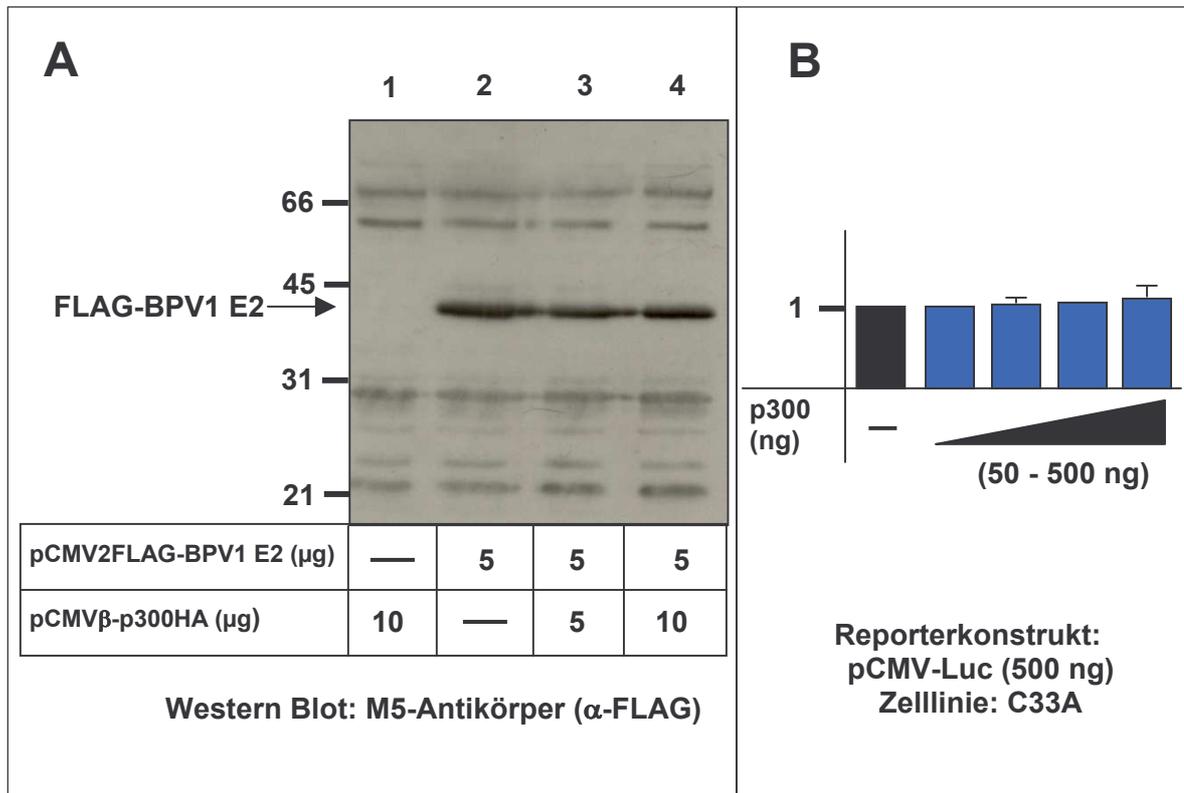


Abb. 7 Der CMV-Promotor wird durch überexprimiertes p300 nicht aktiviert

(A) Western Blot. C33A-Zellen wurden wie angegeben mit pCMVβ-p300HA (5 µg und 10 µg) sowie pCMV2FLAG-BPV1 E2 (5 µg) transfiziert. 10 µg Kernextrakte wurden über ein 10%-PAG aufgetrennt und FLAG-BPV1 E2 nach einem Western Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop (M5-α-FLAG) detektiert. (B) Transiente Transfektionsanalysen. 500 ng des Reporterkonstruktes pCMV-Luc wurden mit steigenden Mengen pCMVβ-p300HA (50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng) in C33A-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Transfektionen. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.3 8E2 und p300 aktivieren synergistisch den späten Promotor von HPV8

Die Verwendung eines synthetischen Promotorkonstruktes ist geeignet, um erste Hinweise auf eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktoren zu erhalten. Dies lässt jedoch keine Aussage über ihre Bedeutung in einer natürlichen Promotorkonstellation zu. Daher wurde der Effekt von überexprimiertem p300 auf die 8E2-vermittelte Aktivierung der HPV8-Promotoren untersucht. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass 8E2 die HPV8-Genexpression dosisabhängig reguliert. Geringe E2-Konzentrationen führten zu einer 3,5-fachen Aktivierung, durch Bindung von E2 an die hochaffinen Erkennungssequenzen P0, P1, P3 und P4 innerhalb der 8NCR. Höhere E2-Konzentrationen reprimierten die Genexpression über Bindung von 8E2 an die niedrigaffine promotorproximale P2-Bindestelle, wo E2 zelluläre Aktivatoren verdrängt (STUBENRAUCH *et al.*, 1996; SCHMIDT *et al.*, 1997; BOECKLE *et al.*, 2002).

Das hier verwendete Luciferase-Reporterkonstrukt (NCR8-Luc) beinhaltet die 8NCR von Position 7077 bis 558 vor dem Luciferase-Gen (vgl. Abb. 8A). Die 8NCR wird in diesem Konstrukt im 5'- und 3'-Bereich von einem Teil des L1- bzw. des E6-Leserahmens flankiert und beinhaltet sowohl den späten Promotor in Position 7535 als auch den frühen Promotor in Position 175. Dieser ist relativ schwach, und es wird angenommen, dass die dosisabhängige Regulation der HPV8-Genexpression hauptsächlich den späten Promotor betrifft (STUBENRAUCH *et al.*, 1992, 1996).

Bei den in dieser Arbeit präsentierten Transfektionen wurden Ansätze mit jeweils variablen Mengen gleicher Expressionsvektoren stets mit entsprechenden Leervektoren ergänzt, um immer dieselbe Menge an Gesamt-DNA zu transfizieren. Außerdem lag so für zelluläre DNA-bindende Faktoren in allen Ansätzen eine vergleichbare Anzahl an Promotoren vor. Im Fall des pCMV β -p300HA-Expressionsvektors wurde jedoch nur zu 1/3 mit pCMV1 ergänzt, da pCMV1 mit 4,8 kb etwa nur etwa 1/3 der Größe des p300-Expressionsvektors aufweist. Um die Gesamtmenge an DNA konstant zu halten, wurde in diesen Fällen zusätzlich 2/3 der Menge mit pUC18-DNA aufgefüllt.

In Vorversuchen stellte sich heraus, dass die als interner Standard zur Verfügung stehenden β -Galaktosidase-Konstrukte durch die Überexpression von 8E2 oder p300 ebenfalls beeinflusst werden und somit nicht geeignet waren (MÜLLER, 1999). Daher wurden die ermittelten Luciferase-Werte mit der Protein-Menge der jeweiligen Ansätze standardisiert.

Für die transienten Transfektionsanalysen (Abb. 8B) wurde die HPV-negative Keratinozyten-Zelllinie RTS3b verwendet, die aus einem Plattenepithelkarzinom der Haut isoliert wurde (PURDIE *et al.*, 1993). Um das gesamte Aktivierungsspektrum von 8E2 abzudecken, wurden zwischen 5 ng und 500 ng pCB6-8E2 entweder alleine oder zusammen mit 1 μ g pCMV β -p300HA sowie 500 ng des Reporters NCR8-Luc kotransfiziert. 8E2 stimulierte die Genexpression alleine maximal 4-fach bei 20 ng pCB6-8E2. Höhere E2-Konzentrationen reprimierten den Promotor. Die Überexpression von p300 alleine aktivierte 4,5-fach. Die Koexpression von p300 zusammen mit nicht saturierenden Mengen von 8E2 (10 ng pCB6-8E2) führte zu einer 28-fachen Stimulation. Die 8E2-Aktivierung wurde somit durch koexprimiertes p300 um den Faktor sieben gesteigert. Dies deutet auf eine starke Kooperation von 8E2 und p300 bezüglich der 8E2-vermittelten Aktivierung der HPV8-Genexpression hin. In Gegenwart von höheren E2-Mengen nahm der Synergismus wieder ab, bis er bei 500 ng pCB6-8E2 nicht mehr nachzuweisen war. Daher unterliegt auch die kooperative Aktivierung der HPV8-Genexpression durch 8E2 und p300 der dosisabhängigen Regulation.

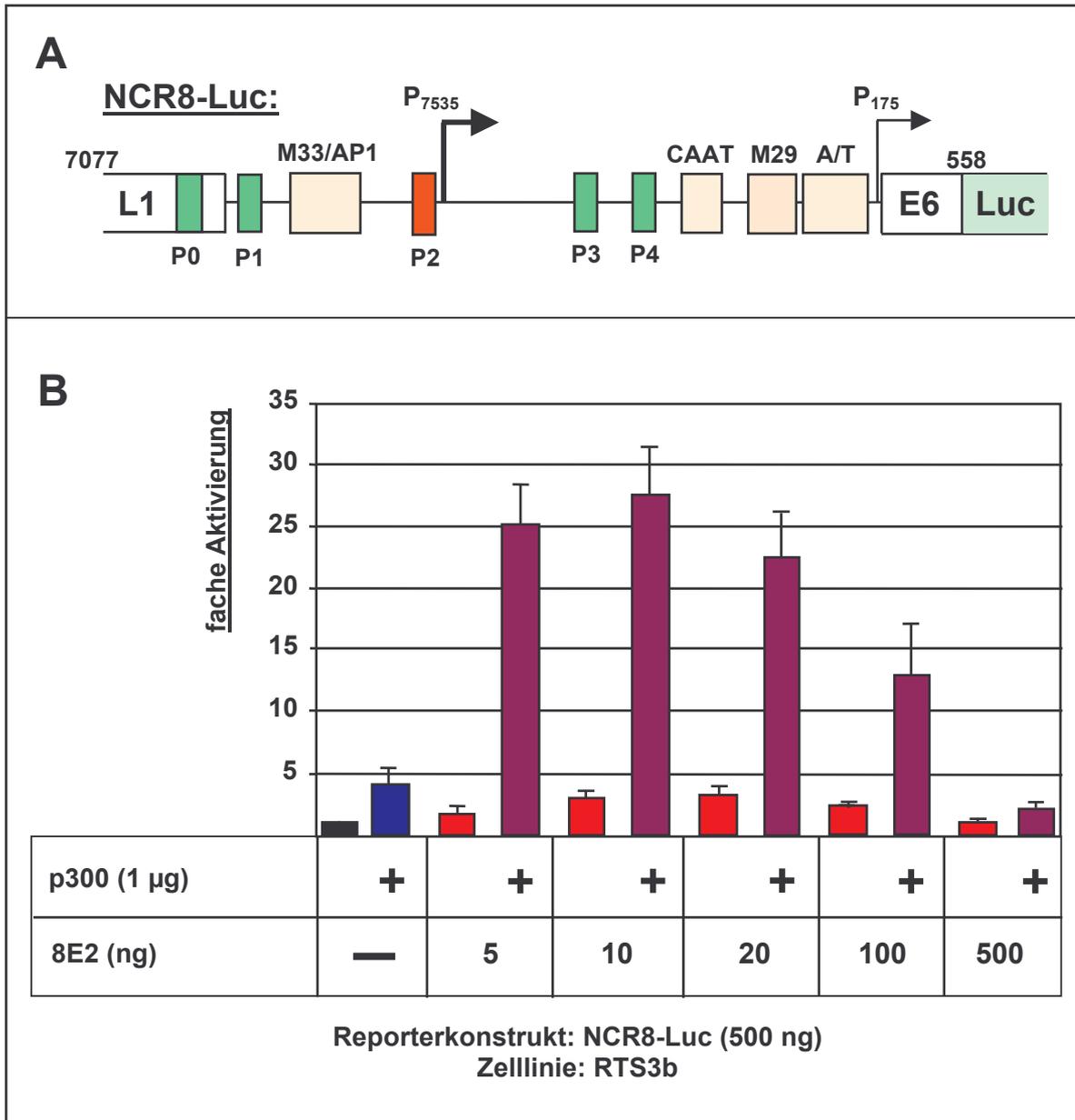


Abb. 8 8E2 und p300 kooperieren bei der Aktivierung der HPV8-Genexpression

(A) Schematische Darstellung des Reporterkonstruktes NCR8-Luc. Angegeben sind die unter den *Ev*-assoziierten HPV konservierten E2-Bindestellen (P0-P4), die Sequenzmotive M33/AP1, CAAT, M29 und die A/T-reiche Region sowie der späte (P_{7535}) und frühe Promotor (P_{175}).

(B) Transiente Transfektionsanalysen. 500 ng des Reporterkonstruktes NCR8-Luc wurden wie angegeben mit 5 ng bis 500 ng pCB6-8E2 und 1 µg pCMV β -p300HA in RTS3b-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.4 8E2 benötigt für die Kooperation mit p300 keine sequenz-spezifische DNA-Bindung

4.4.1 Der Synergismus von 8E2 und p300 bleibt auch nach der Mutation von E2-Bindestellen innerhalb der 8NCR erhalten

Die E2-Bindestellen innerhalb der 8NCR haben, wie bereits erwähnt, verschieden starke Affinitäten zu 8E2 und dadurch für die Regulation der HPV8-Genexpression unterschiedliche Bedeutungen. Transaktivierung wird hauptsächlich durch Bindung von 8E2 an die hochaffinen P0- und P1-Bindestellen vermittelt. P3 und P4 werden weniger gut erkannt und spielen auch für die Aktivierung durch 8E2 nur eine untergeordnete Rolle. Die P2-Erkennungssequenz hat die geringste Affinität zu E2 und führt bei hohen E2-Konzentrationen zu einer negativen Regulation der E2-vermittelten Aktivierung (STUBENRAUCH *et al.*, 1994).

Um die E2-Bindestellen zu bestimmen, über die der Synergismus von 8E2 und p300 vermittelt wird, wurden die E2-Konsensussequenzen entweder einzeln oder in verschiedenen Kombinationen mutiert. Innerhalb der 8NCR bindet 8E2 neben den bekannten Erkennungssequenzen P0 - P4 *in vitro* auch an eine von der Konsensussequenz abweichende Region von Position 101-112 (AKGÜL, 2002). Diese P(5)-Bindestelle wurde in den Analysen ebenfalls berücksichtigt. Für alle hier verwendeten Mutationen an den Bindestellen war ein Verlust der 8E2-Bindung *in vitro* bereits gezeigt worden (STUBENRAUCH *et al.* 1994; AKGÜL, 2002).

Um den Effekt dieser Mutationen auf die Kooperation von 8E2 und p300 zu untersuchen, wurden transiente Transfektionsanalysen in RTS3b-Zellen durchgeführt (Abb. 9). Auch in diesen Experimenten kooperierten 8E2 und p300 beim Einsatz des Wildtyp-NCR8-Reporterkonstruktes (1). Die Überexpression beider Proteine aktivierte die Genexpression hier 14-fach, während 8E2 4-fach und p300 3,5-fach aktivierte. Eine Punktmutation in der Repression vermittelnden P2-Bindestelle (2) verstärkte sowohl die E2-Aktivierung alleine (11-fach) als auch die Kooperation mit p300 (22-fach). Die Stimulation durch p300 alleine ging jedoch auf 2,5-fach zurück. Bei einer Mutation der P0- und der P1-Bindestelle (3) aktivierte 8E2 nur 2-fach und in Kooperation mit p300 7-fach. Der Effekt von p300 alleine wurde hier nicht beeinflusst. Mutationen der P3- und P4-Erkennungssequenzen hatten hingegen kaum einen Einfluss auf die Aktivierung durch 8E2 und die Kooperation von 8E2 und p300.

Diese Daten zeigen, dass auch die synergistische Aktivierung der HPV8-Genexpression durch 8E2 und p300 hauptsächlich über die P0- und P1-Bindestellen vermittelt wird, während die P2-Erkennungssequenz hierauf einen negativ regulierenden Einfluss hat.

Entgegen den Erwartungen konnte die Promotoraktivität eines NCR8-Reporterkonstruktes, in dem alle sechs bekannten E2-Bindestellen mutiert waren, immer noch 4-fach von 8E2 stimuliert werden. Ebenso konnten E2 und p300 zusammen in Kooperation 12-fach aktivieren. Die Aktivierung durch überexprimiertes p300 alleine ging auf 2,5-fach zurück. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass 8E2 auch ohne die Bindung an die bekannten E2-Erkennungssequenzen die HPV8-Genexpression alleine und synergistisch mit p300 aktivieren kann.

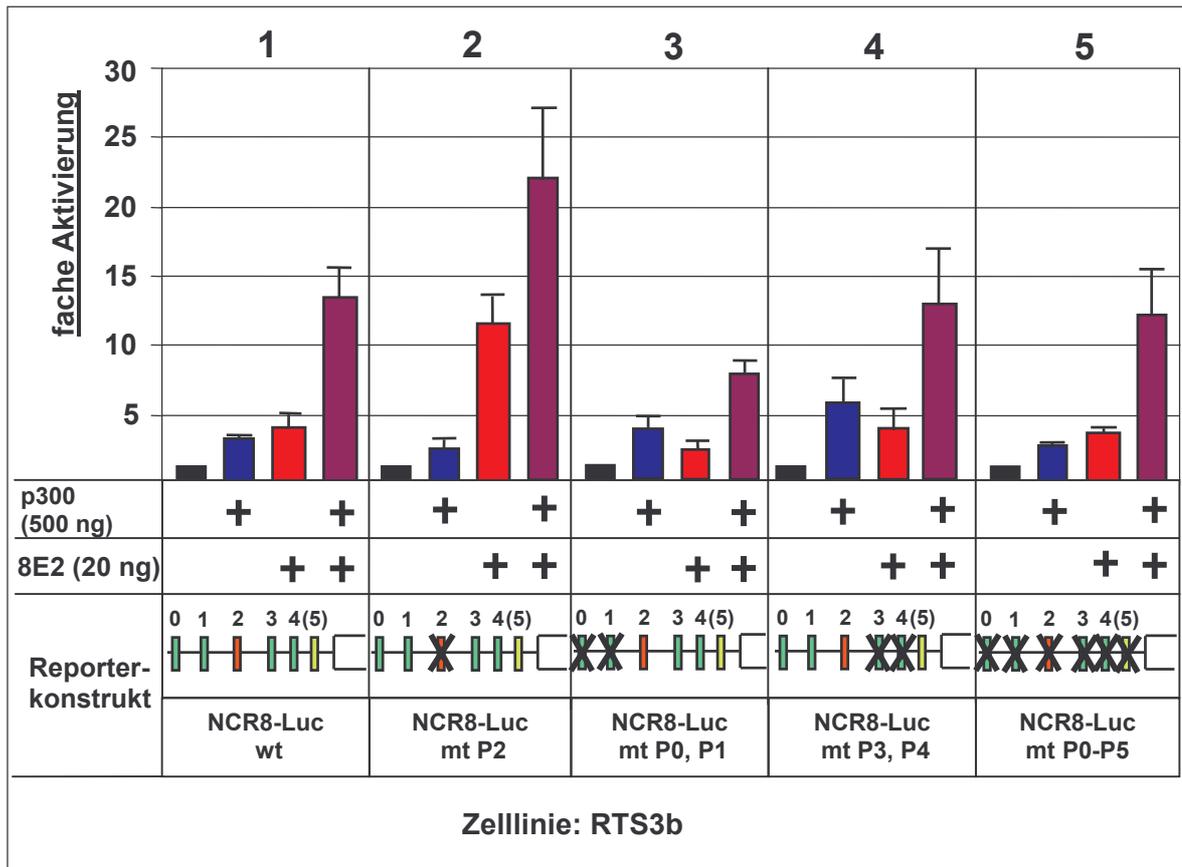


Abb. 9 Die Rolle der E2-Bindestellen für den Synergismus von 8E2 und p300

Transiente Transfektionsanalysen. Reporterkonstrukte, die entweder die Wildtyp-Form der 8NCR (NCR8-Luc wt), die 8NCR mit einer Punktmutation in der E2-Bindestelle P2 (NCR8-Luc mt P2), in P0 und P1 (NCR8-Luc mt P0,P1) bzw. in P3 und P4 (NCR8-Luc mt P3,P4) oder mit Punktmutationen in allen sechs bekannten E2-Bindestellen (NCR8-Luc mt P0-P5) beinhalten, wurden wie angegeben mit 20 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCMV β -p300HA in RTS3b-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.4.2 Erzeugung einer DNA-bindungsdefekten Punktmutante von 8E2

Die Kooperation von 8E2 und p300 in dem vorangegangenen Experiment könnte theoretisch auch von weiteren bislang unbekanntem E2-Bindestellen vermittelt worden sein. Die E2-Erkennungssequenzen innerhalb der NCR von HPV8 wurden auf Grund ihrer Konsensussequenz identifiziert. Allgemein wurde jedoch schon neben der P(5)-Bindestelle eine weitere E2-Erkennungssequenz identifiziert, die von der Konsensussequenz abweicht (NEWHOUSE und SILVERSTEIN, 2001). Auch eine potentielle Restbindung von 8E2 an die mutierten Bindestellen konnte nicht völlig ausgeschlossen werden. Um zu bestätigen, dass 8E2 auch ohne direkte DNA-Bindung zusammen mit p300 die HPV8-Genexpression aktivieren kann, wurde eine DNA-bindungsdefekte Punktmutante von 8E2 hergestellt.

Die C-terminale DBD von E2 ist innerhalb der PV-Familie gut konserviert. Für BPV1 E2 wurde an Position 340 ein Austausch des Cysteins gegen ein Arginin beschrieben, mit dem E2 weiterhin dimerisieren kann, aber nicht mehr in der Lage ist an DNA zu binden (PRAKASH *et al.*, 1992). Dieses Cystein ist in PV E2-Proteinen konserviert und befindet sich bei 8E2 an der Position 429 (GIRI und YANIV, 1988). Das Cystein wurde mittels *in vitro*-Mutagenese ebenfalls in ein Arginin ausgetauscht (8E2-mt429) und die Mutante zunächst auf ihre Fähigkeit zur DNA-Bindung untersucht. Da es nicht möglich war, das vollständige 8E2 in Bakterien zu exprimieren und aufzureinigen, wurde die C-terminale DBD von 8E2 in der Wildtyp-Form sowie mit der Mutation in Position 429 in Bakterien exprimiert und über ein N-terminal fusioniertes His₆-Epitop aufgereinigt (His₆-8E2-C-mt429).

In einem Gel-Retardierungsexperiment (EMSA) wurde ein Oligonukleotid, das die hochaffine E2-Bindestelle P2C enthält, radioaktiv markiert und jeweils mit 0,037 ng, 0,11 ng, 0,33 ng und 1 ng der aufgereinigten Proteine inkubiert. In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass nur die Wildtyp-Form der 8E2-DBD an P2C binden konnte. 8E2-C-mt429 zeigte auch bei der höchsten Konzentration keine DNA-Bindung.

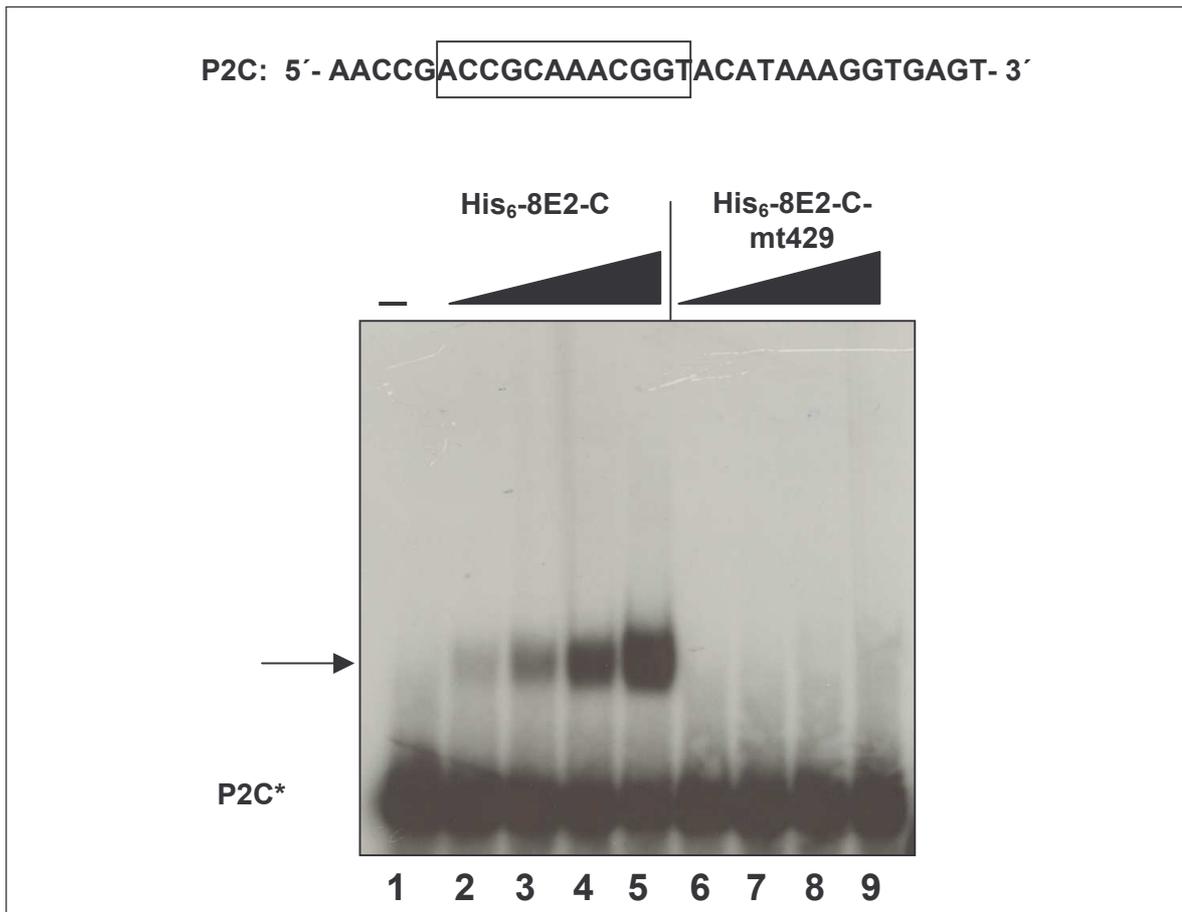


Abb. 10 8E2-C-mt429 bindet nicht an die hochaffine E2-Bindestelle P2C

Je 250 pg radioaktiv markiertes P2C (1), dessen Sequenz oben angegeben ist (E2-BS ist eingerahmt), wurden jeweils mit 0,037 ng, 0,11 ng, 0,33 ng und 1 ng His₆-8E2-C (2 - 5) bzw. His₆-8E2-C-mt429 (6 - 9) inkubiert. Der Pfeil markiert den Komplex aus DNA und gebundenem Protein.

Eine fehlende DNA-Bindung des gesamten 8E2-mt429 wurde über transiente Transfektionen bestätigt (Abb. 11). Das Reporterkonstrukt C18-Luc, das vier hochaffine E2-Bindestellen vor dem Adenovirus-*major late*-Promotor (MLP) enthält, wurde mit steigenden Mengen von pCB6-8E2 bzw. pCB6-8E2-mt429 kotransfiziert. Während 8E2 den Promotor über 5-fach aktivierte, kam es durch die Mutante zu keiner nennenswerten Aktivierung der Transkription. Die Expression und Kernlokalisierung der Mutante wurde über Immunfluoreszenz mit einem entsprechenden Protein, das mit einem Flag-Epitop fusioniert war, bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die C429R-Mutation verhindert somit effizient eine Bindung von 8E2 an seine Erkennungssequenzen.

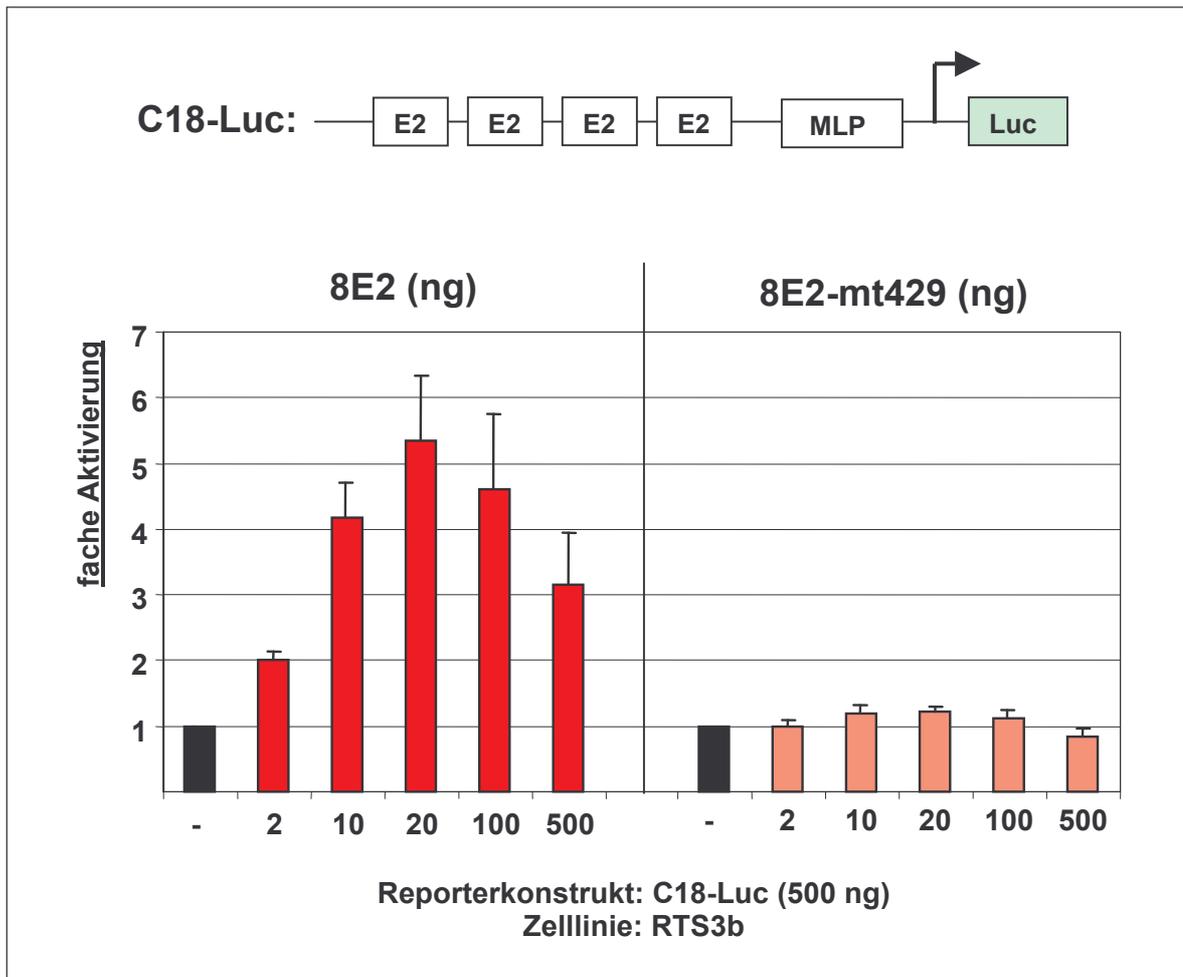


Abb. 11 Ein Reporterkonstrukt mit vier E2-Bindestellen wird von 8E2-mt429 nicht aktiviert
 Transiente Transfektionsanalysen. Ein Reporterkonstrukt mit vier E2-Bindestellen (C18-Luc - 500 ng) wurde jeweils mit steigenden Mengen (2 ng - 500 ng) pCB6-8E2 oder pCB6-8E2-mt429 in RTS3b-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben. Die Struktur von C18-Luc ist im oberen Teil dargestellt.

4.4.3 8E2-mt429 aktiviert synergistisch mit p300 die HPV8-Genexpression

Um zu untersuchen, ob 8E2-mt429 noch in der Lage ist synergistisch mit p300 die HPV8-Genexpression zu stimulieren, wurden die beiden 8E2-Proteine mit dem NCR8-Reporterkonstrukt und überexprimiertem p300 in transienten Transfektionsanalysen getestet (Abb. 12). 20 ng des 8E2-mt429-Expressionsvektors konnten die Genexpression alleine 2-fach und zusammen mit überexprimiertem p300 10-fach aktivieren. Eine dosisabhängige Regulation des Promotorkonstruktes konnte nicht mehr beobachtet werden. 500 ng des 8E2-mt429 Expressionsvektors stimulierten den Promotor 4-fach und zusammen mit p300 14-fach. Dies korreliert mit einer fehlenden DNA-Bindung von 8E2-mt429, das die Repression vermittelnde P2-Bindestelle nicht mehr erkennt. Somit konnte auch eine DNA-bindungsdefekte Mutante von 8E2 mit p300 kooperieren.

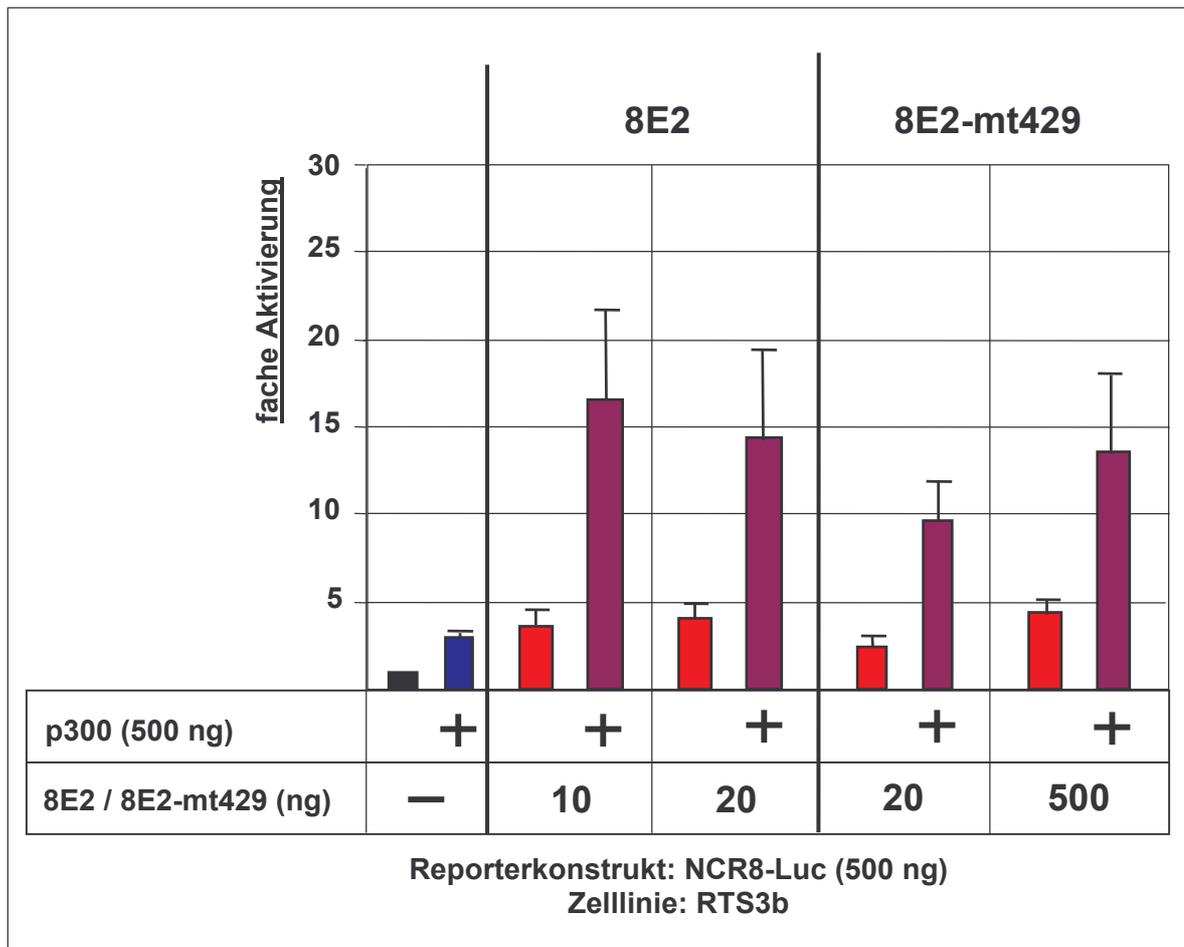


Abb. 12 Eine DNA-bindungsdefekte Mutante von 8E2 aktiviert die NCR8-Genexpression

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA sowie mit 10 ng bzw. 20 ng pCB6-8E2 oder 20 ng bzw. 500 ng pCB6-8E2-mt429 wie angegeben in RTS3B-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.4.4 Die 8E2-AD ist ausreichend und notwendig für den Synergismus mit p300

Für die AD von BPV1 E2 wurde gezeigt, dass sie auch alleine als genereller Transaktivator agieren kann (HAUGEN *et al.*, 1988). Es wird vermutet, dass sie in diesem Fall über Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren an den Zielpromotor rekrutiert wird. Proteine, die hierfür in Frage kommen, wurden noch nicht identifiziert. Um zu klären, ob auch die AD von 8E2 für die Stimulation der HPV8-Genexpression ausreicht und ob p300 für diese Aktivierung als Mediator fungieren könnte, wurden folgende Deletionsmutanten von 8E2 in transienten Transfektionsanalysen analog zu Kapitel 4.4.3 eingesetzt: eine C-terminal verkürzte Form, der die DBD fehlt (8E2- Δ C), eine N-terminal verkürzte Form, der die AD fehlt (8E2- Δ N) sowie die AD alleine (8E2-N). Die Expression und Kernlokalisierung dieser Mutanten wurde über Immunfluoreszenz mit entsprechenden FLAG-Epitop fusionierten Proteinen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

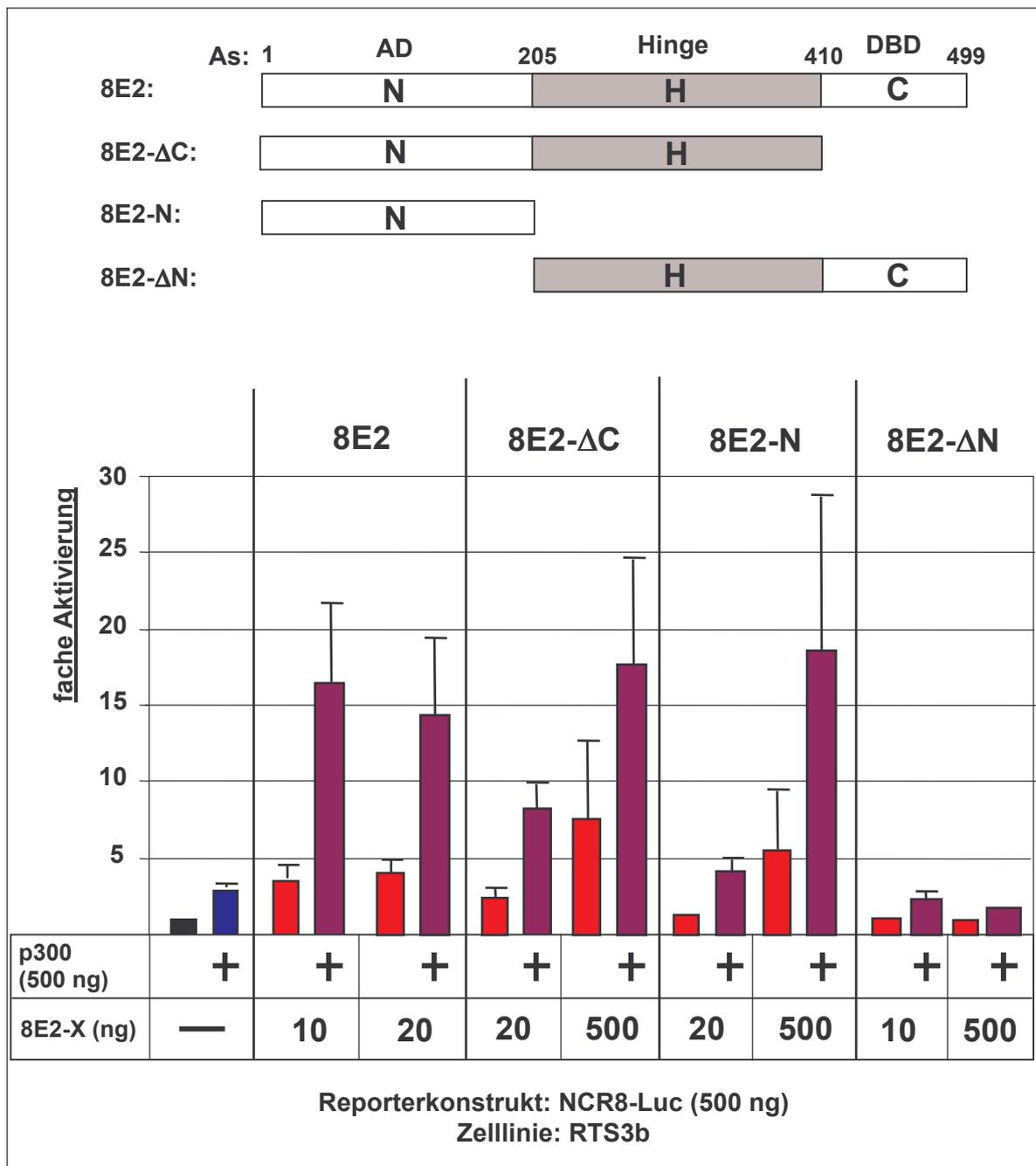


Abb. 13 Die 8E2-AD ist ausreichend und notwendig für die Aktivierung von Transkription

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMVβ-p300HA sowie mit den angegebenen Mengen an Expressionsvektoren für 8E2 oder 8E2-Derivate, die für den N-Terminus kodieren (pCB6-8E2-N) oder denen entweder die C-terminale DBD (pCB6-8E2-ΔC) bzw. die N-terminale AD (pCB6-8E2-ΔN) fehlen, in RTS3B-Zellen kotransfiziert. Die Struktur der verwendeten Proteine ist im oberen Teil der Abbildung angegeben. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Die 2-fache Aktivierung der HPV8-NCR durch 20 ng des 8E2-ΔC Expressionsvektors wurde durch Koexpression von p300 auf 8-fach erhöht. Auch die 7,5-fache Stimulation durch höhere Mengen an 8E2-ΔC (500 ng Expressionsvektor) wurde mit überexprimiertem p300 mehr als 2-fach gesteigert (Abb. 13). Dieses Experiment

unterstützt daher die Beobachtung, dass eine DNA-Bindung von 8E2 für die Aktivierung und die Kooperation mit p300 nicht essentiell ist.

8E2-N alleine hatte in geringen Mengen kaum Einfluss auf die Expression des Reporters. 500 ng des 8E2-N-Expressionsvektors aktivierten die Genexpression jedoch 5,5-fach und zusammen mit p300 18-fach. Die AD von 8E2 ist somit für die Aktivierung und die Kooperation mit p300 ausreichend.

8E2-ΔN war hingegen in allen getesteten Konzentrationen nicht in der Lage die Genexpression zu aktivieren. Ebenso kam es zu keiner Kooperation mit p300. Somit ist die AD von 8E2 nicht nur ausreichend, sondern auch essentiell für die Aktivierung der HPV8-Genexpression.

4.5 8E2 bindet p300 über seine AD, Hinge und DBD

Die Daten aus dem vorangegangenen Experiment implizieren eine funktionelle Wechselwirkung der AD von 8E2 mit p300. Um zu prüfen, ob dies mit einer Bindung *in vitro* korreliert, wurden bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine der AD, der Hinge-Region sowie der DBD von 8E2 über Glutathion-Sepharose aufgereinigt (STEGER *et al.*, 2002) und mit *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem His₆-p300-HAT inkubiert. Abbildung 14 zeigt, dass p300-HAT von der C-terminalen DBD (4) und mit hoher Affinität von der Hinge-Region (3) gebunden wird, während die AD nur eine schwache Bindung (2) und GST alleine nur ein Hintergrund-Signal aufweist (5).

Eine geringe Bindungsaffinität zu p300 wurde auch für die AD von BPV1 E2 beschrieben (PENG *et al.*, 2000) und könnte daher unter den E2-Proteinen konserviert sein. Um dies zu bestätigen wurden zusätzlich entsprechende GST-Fusionsproteine von HPV18 E2 (18E2) (STEGER *et al.*, 2002) getestet, für das eine Interaktion mit einem Bereich innerhalb von p300-HAT ebenfalls bereits gezeigt werden konnte (MÜLLER, 1999). Auch hier interagiert die AD (7) im Vergleich zur DBD (9) deutlich schwächer mit p300-HAT. Interessanterweise konnte keine Interaktion der Hinge-Domäne von 18E2 (8) mit p300-HAT beobachtet werden. Somit könnte die Interaktion der nicht konservierten Hinge-Region mit p300 spezifisch für 8E2 sein.

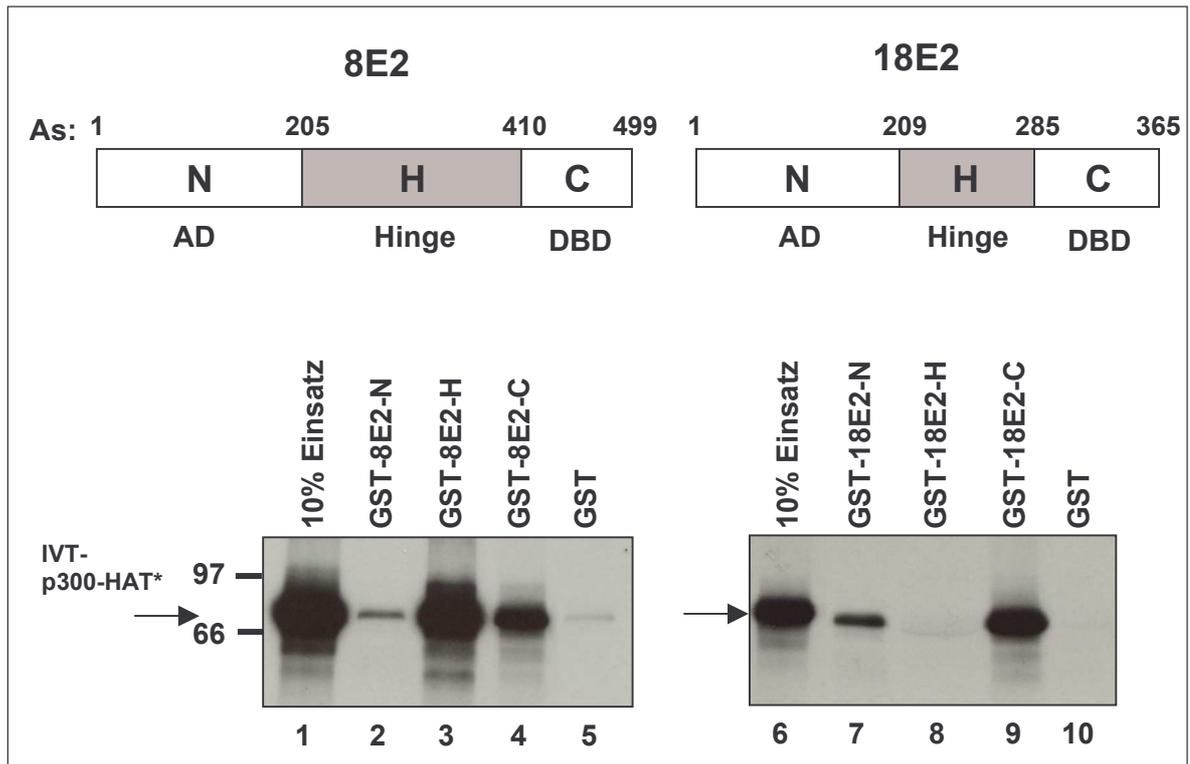


Abb. 14 8E2 bindet an p300 über seine AD, Hinge und DBD

Interaktionsstudie. 2 µg GST-Fusionsproteine der AD (2, 7), der Hinge (3, 8) und der DBD (4, 9) von 8E2 bzw. 18E2 sowie GST alleine (5, 10) wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem p300-HAT (10 µl) inkubiert und jeweils viermal mit 100 mM LSDB gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Spur 1 und 6 zeigen 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes. Schematische Darstellungen der E2-Domänen, die an GST fusioniert wurden, sind im oberen Teil gezeigt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass 8E2 über mindestens drei Domänen mit p300 interagieren kann. Um auszuschließen, dass die Beschaffenheit der Fusionsproteine bzw. des p300-HAT-Fragmentes zu diesem Ergebnis geführt hat, wurden *vice versa* Experimente mit *in vitro* translatierten 8E2-Konstrukten und bakteriell exprimierten GST-p300-Fragmenten durchgeführt (Abb. 15). Um die Wahrscheinlichkeit artifizierlicher Bindungen weiter zu minimieren, wurden für 8E2 nicht nur die Einzeldomänen getestet (8E2-N,-H,-C), sondern zusätzlich auch noch drei Deletionsmutanten, denen entweder die AD, die Hinge oder die DBD fehlten (8E2-ΔN, -ΔH, -ΔC). Als p300-Fragmente wurden das an 8E2 bindende GST-p300-4 und als Negativkontrolle GST-p300-2, das nicht mit 8E2 interagiert, verwendet (MÜLLER, 1999).

Auch in diesen Experimenten konnte eine schwache Interaktion von 8E2-N (1) sowie eine vergleichsweise stärkere von 8E2-H und -C mit GST-p300-4 beobachtet werden, obwohl die Hinge-Domäne hier regelmäßig stark degradiert war. Auch die Deletionsmutanten interagierten alle mit GST-p300-4 (4-6), wobei 8E2-ΔN im Vergleich zum 10%-Einsatz des *in vitro*-Translationsproduktes (jeweils in Spur 1) die stärkste Interaktion aufwies. Keines der eingesetzten 8E2-Konstrukte interagierte spezifisch mit GST-p300-2, mit Ausnahme

von 8E2-C, das hier ebenfalls ein schwächeres Signal erzeugte. Insgesamt bestätigt dies, dass auch Regionen außerhalb der N-terminalen Transaktivierungsdomäne mit p300 interagieren.

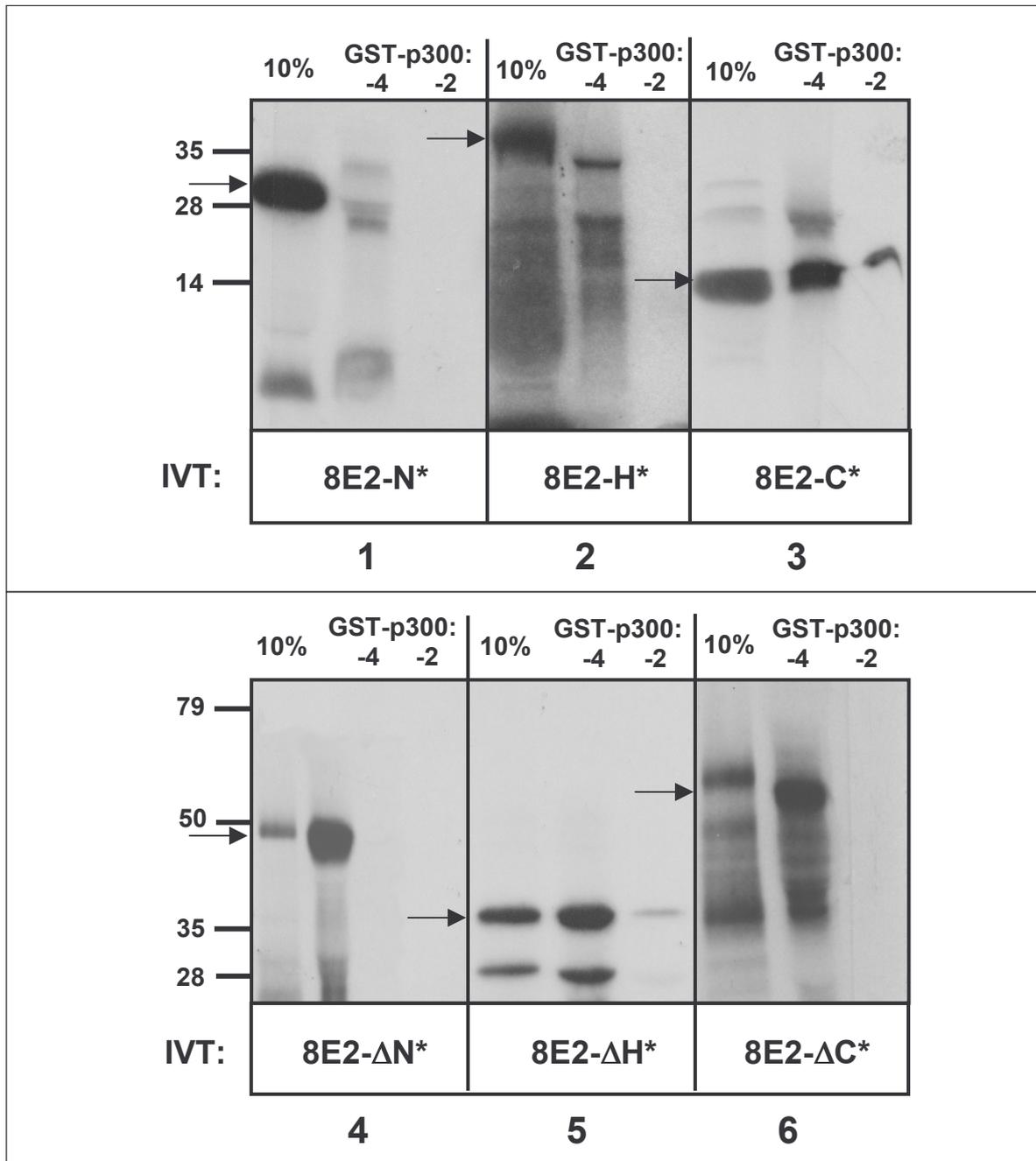


Abb. 15 p300-4 bindet an die AD, Hinge und DBD von 8E2

Interaktionsstudie. Je 2 µg GST-p300-4 und GST-p300-2 wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E2-N (1), 8E2-H (2), 8E2-C (3), 8E2-ΔN (4), 8E2-ΔH (5) bzw. 8E2-ΔC (6) inkubiert und viermal mit bis zu 250 mM LSDB gewaschen. 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind jeweils in der 1. Spur gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%- (1-3) bzw. 10%-PAG (4-6) aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Die vollständigen *in vitro*-Translationsprodukte sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Der Nachweis einer Interaktion von 8E2 und p300 *in vivo* über Koimmunopräzipitation aus Extrakten von Zellen, die mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert wurden, schlug fehl. In Vorversuchen war bakteriell exprimiertes GST-8E2 jedoch in der Lage zelluläres p300 aus Kernextrakten zu präzipitieren (MÜLLER *et al.*, 2002). Um umgekehrt zu überprüfen, ob ein GST-p300-Fragment imstande ist auch zellulär exprimiertes 8E2 zu binden, und um die p300-Bindung an Regionen außerhalb der AD von 8E2 noch auf einem weiteren Weg zu bestätigen, wurden Ganzzellextrakte aus mit pCMV2FLAG-8E2- Δ N oder mit pCMV2FLAG transient transfizierten 293T-Zellen hergestellt. Aufgereinigtes GST-p300-4A (As 1453-1634) bzw. GST alleine wurden mit je 100 μ g dieser Zellextrakte inkubiert und anschließend sechsmal mit bis zu 200 mM LSDB gewaschen. Gebundenes FLAG-8E2- Δ N wurde nach einem Western-Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop detektiert (Abb. 16). Nur GST-p300-4A (3) und nicht GST (5) präzipitierte FLAG-8E2- Δ N aus den Zellextrakten. Um die Spezifität des Antikörpers zu bestätigen, wurde GST-p300-4A (4) mit Zellextrakten inkubiert, die nur mit pCMV2FLAG transfiziert wurden. Spur 1 und 2 zeigen jeweils 10 μ g der Extrakte von Zellen, die entweder mit pCMV2FLAG-8E2- Δ N oder dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden.

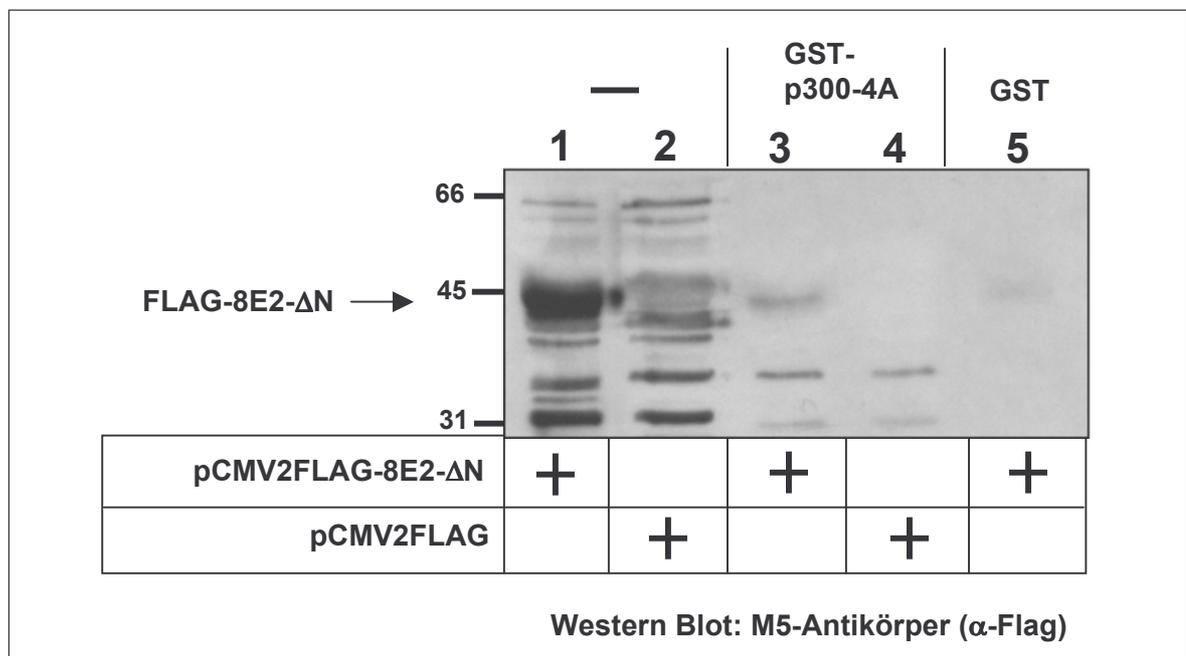


Abb. 16 GST-p300-4A präzipitiert 8E2- Δ N aus Zellextrakten

Interaktionsstudie. 293T-Zellen wurden mit 15 μ g pCMV2FLAG-8E2- Δ N bzw. pCMV2FLAG transfiziert. Nach 40 h wurden Ganzzellextrakte präpariert. 2 μ g GST-p300-4A (Spur 3, 4) oder GST alleine (Spur 5) wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und mit jeweils 100 μ g der Zellextrakte inkubiert. Spur 1 und 2 zeigen 10 μ g der jeweiligen Zellextrakte. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%-PAG aufgetrennt und FLAG-8E2- Δ N nach einem Western Blot mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop detektiert. Der Pfeil markiert FLAG-8E2- Δ N.

4.6 Die Hinge und/oder die DBD von 8E2 vermitteln

Kooperativität zwischen p300 und einer heterologen AD

Wie oben gezeigt, ist die AD von 8E2 notwendig und hinreichend für die Kooperation von 8E2 und p300, was mit einer schwachen Bindung der AD an p300 korreliert. Es konnten daher keine Rückschlüsse gezogen werden, ob auch Regionen, die C-terminal von der 8E2-AD liegen, an dem Synergismus mit p300 beteiligt sind, oder ob er ausschließlich über die AD vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem die AD und ein Teil der Hinge von 8E2 durch die heterologe AD von TEF-1 (TEF-1- Δ 55-121/ Δ 143-204 (XIAO *et al.*, (1991)) ersetzt wurde (TEF-1-AD/8E2HC). TEF-1 (*Transcriptional enhancer factor-1*) ist ein sequenzspezifischer Aktivator der Transkription, der p300 nicht als Koaktivator verwendet (SLEPAK *et al.*, 2001).

Um zu verifizieren, dass die TEF-1-AD und p300 nicht miteinander interagieren, wurden zunächst die GST-p300-Fragmente 1 - 5, die das gesamte p300 abdecken (vgl. MÜLLER, 1999), mit der *in vitro* translatierten und ³⁵S-markierten TEF-1-AD inkubiert (Abb. 17 Spur 2-7). Als Positivkontrolle wurde GST-p300-4 mit *in vitro* translatiertem 8E2 inkubiert (8). TEF-1-AD zeigte keine Bindung an irgendein GST-p300-Fragment, so dass eine Bindung an p300 zumindest für die hier verwendeten p300-Fragmente ausgeschlossen werden kann.

Mit TEF-1-AD/8E2HC stand also ein Konstrukt zur Verfügung, das mit seinem C-terminalen 8E2-Anteil an p300 binden und mit einer heterologen AD p300-unabhängig Transkription aktivieren kann.

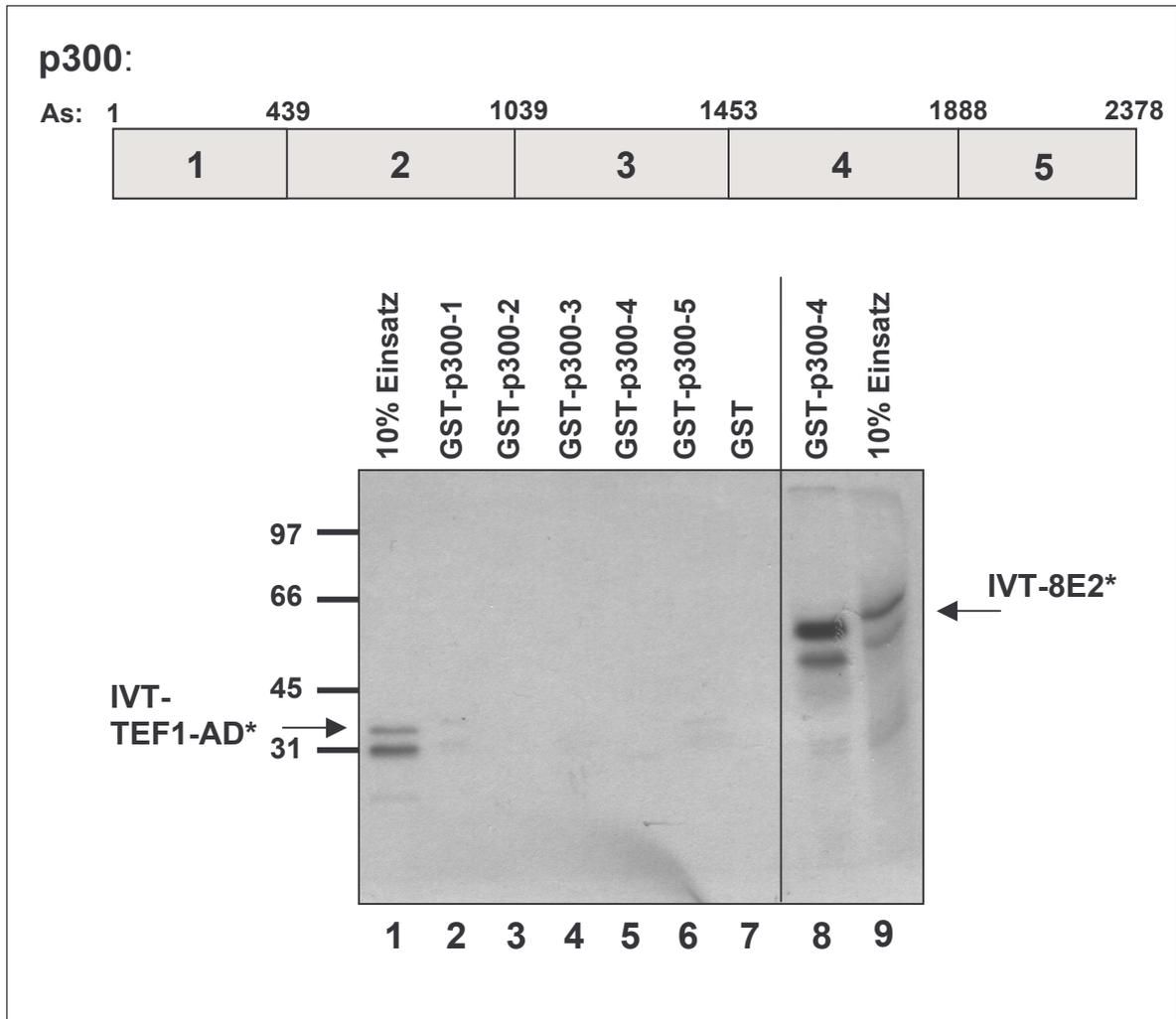


Abb. 17 Die AD von TEF-1 bindet nicht an p300

Interaktionsstudie. 2 µg der GST-p300 Fragmente 1 - 5 sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und mit 10 µl der *in vitro* translatierten und ³⁵S-markierten TEF-1-AD inkubiert (Spur 2-7). Als Positivkontrolle wurde GST-p300-4 mit 10 µl *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E2 inkubiert (Spur 8). Die Ansätze wurden jeweils viermal mit 100 mM LSDB gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Je 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind in Spur 1 bzw. Spur 9 gezeigt. Die Pfeile markieren jeweils das vollständige *in vitro* translatierte Protein.

TEF-1-AD/8E2HC sowie TEF-1-AD als Negativkontrolle wurden nun in transienten Transfektionsanalysen in RTS3b-Zellen getestet. Um zu gewährleisten, dass TEF-1-AD in den Zellkern gelangt, wurde sie zusätzlich mit dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) des SV40-T-Antigen fusioniert. Die Expression und Kernlokalisierung von TEF-1-AD-NLS wurde über Immunfluoreszenz verifiziert (Daten nicht gezeigt).

TEF-1-AD/8E2HC aktivierte die Genexpression des Reporterkonstruktes NCR8-Luc alleine 2,5-fach und in Gegenwart von überexprimiertem p300 7,5-fach (siehe Abb. 18). Auch eine DNA-bindungsdefekte Mutante (TEF-1/8E2HC-mt429) aktivierte alleine 2-fach und kooperierte leicht mit p300. Im Gegensatz dazu war die TEF-1 AD weder alleine noch mit koexprimiertem p300 in der Lage das Reporter gen zu aktivieren.

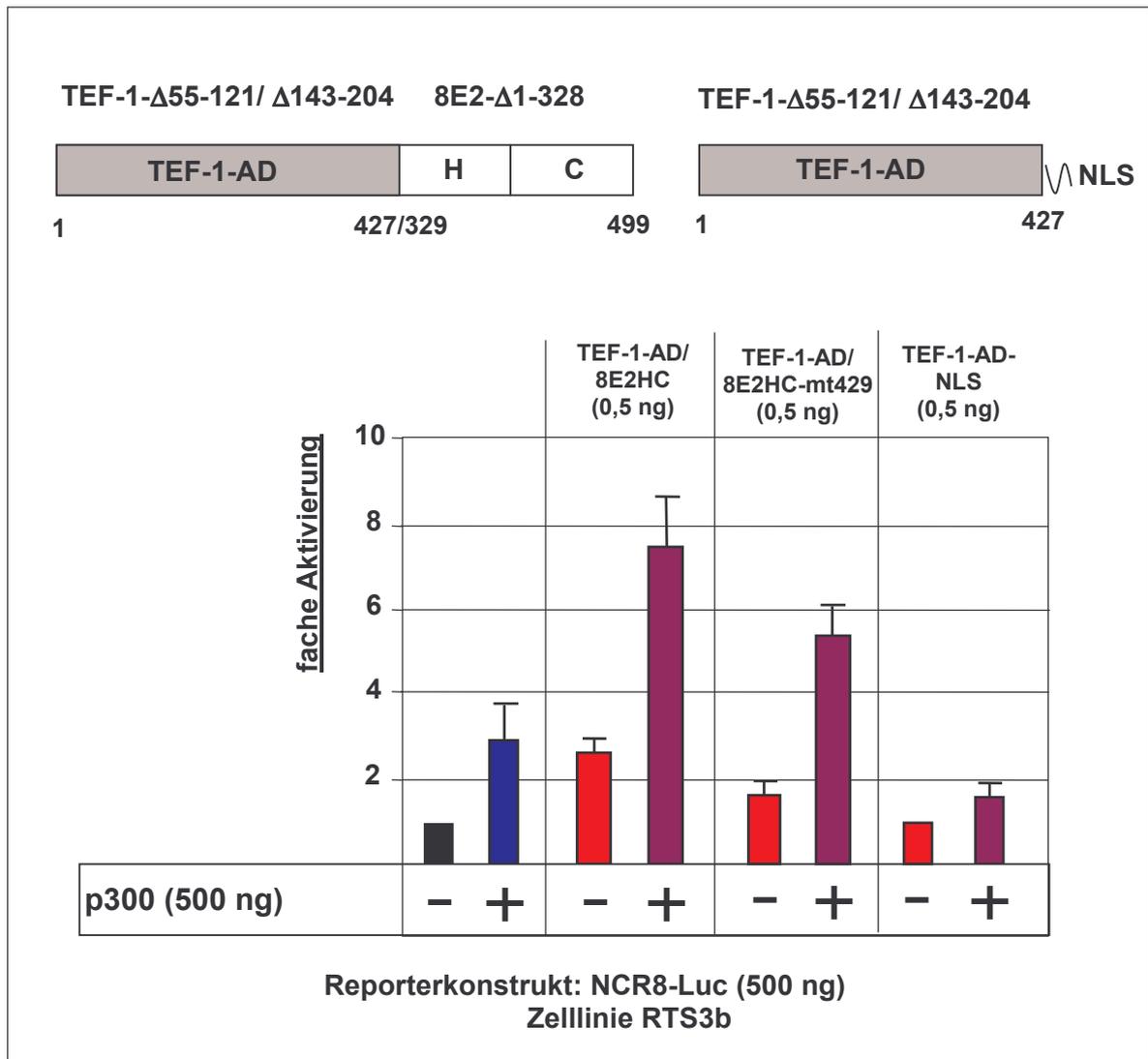


Abb. 18 Regionen außerhalb der AD von 8E2 sind an dem Synergismus mit p300 beteiligt
 Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA sowie mit 0,5 ng von pXJ41 abgeleiteten Expressionsvektoren für TEF-1-AD/8E2HC, TEF-1-AD/8E2HC-mt429 und TEF-1-AD-NLS in RTS3B-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die in den RTS3b-Zellen beobachteten Effekte waren vergleichsweise schwach. Ein Grund dafür könnte sein, dass die TEF-1-AD in RTS3b Zellen nicht das entsprechende zelluläre Milieu vorfindet, um Transkription effizient zu aktivieren. TEF-1 kommt in fast allen Zelltypen vor, mit Ausnahme von Lymphoidzellen. Dort kann auch exogen eingebrachtes TEF-1 nicht aktivieren. In anderen Zelllinien, wie auch in Keratinozyten, führt die Überexpression von TEF-1 schnell zu „Squelching“. Man vermutet in diesem Fall einen nur limitiert vorhandenen Koaktivator, wie zum Beispiel TIF (*Transcriptional Intermediary Factor*), der von hohen Konzentrationen an TEF-1 austitriert wird. (XIAO *et al.*, 1991; ISHII *et al.*, 1992)

In Vorversuchen zeigte TEF-1-AD, fusioniert mit einer Gal4-Bindedomäne (pM-TEF-1-AD), in Cos7-Zellen einen wesentlich stärkeren aktivierenden Effekt auf ein Gal4-responsives Promotorkonstrukt als in RTS3b-Zellen. Auch in diesen Ansätzen wurde keine Kooperation mit p300 festgestellt (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die transienten Transfektionen mit dem Reporterkonstrukt NCR8-Luc in Cos7-Zellen wiederholt (Abb. 19).

Überexprimiertes p300 zeigte hier alleine keinen Effekt. 5 ng des TEF-1-AD/8E2HC-Expressionsvektors aktivierten die Genexpression 5-fach. Zusammen mit p300 kam es zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung auf über 40-fach. Auch die DNA-bindungsdefekte Mutante (TEF-1-AD/8E2HC-mt429) aktivierte die Reporter-Expression alleine 2,5-fach und zusammen mit p300 22-fach. 5 ng pM-TEF-1-AD, die hier als Negativ-Kontrolle eingesetzt wurden, zeigten, ebenso wie weitere getestete Konzentrationen (Daten nicht gezeigt), keinen Effekt und es kam auch zu keiner Kooperation mit p300.

Diese Ergebnisse implizieren, dass auch die Hinge und/oder die DBD von 8E2 an der Kooperativität mit p300 beteiligt sein könnten.

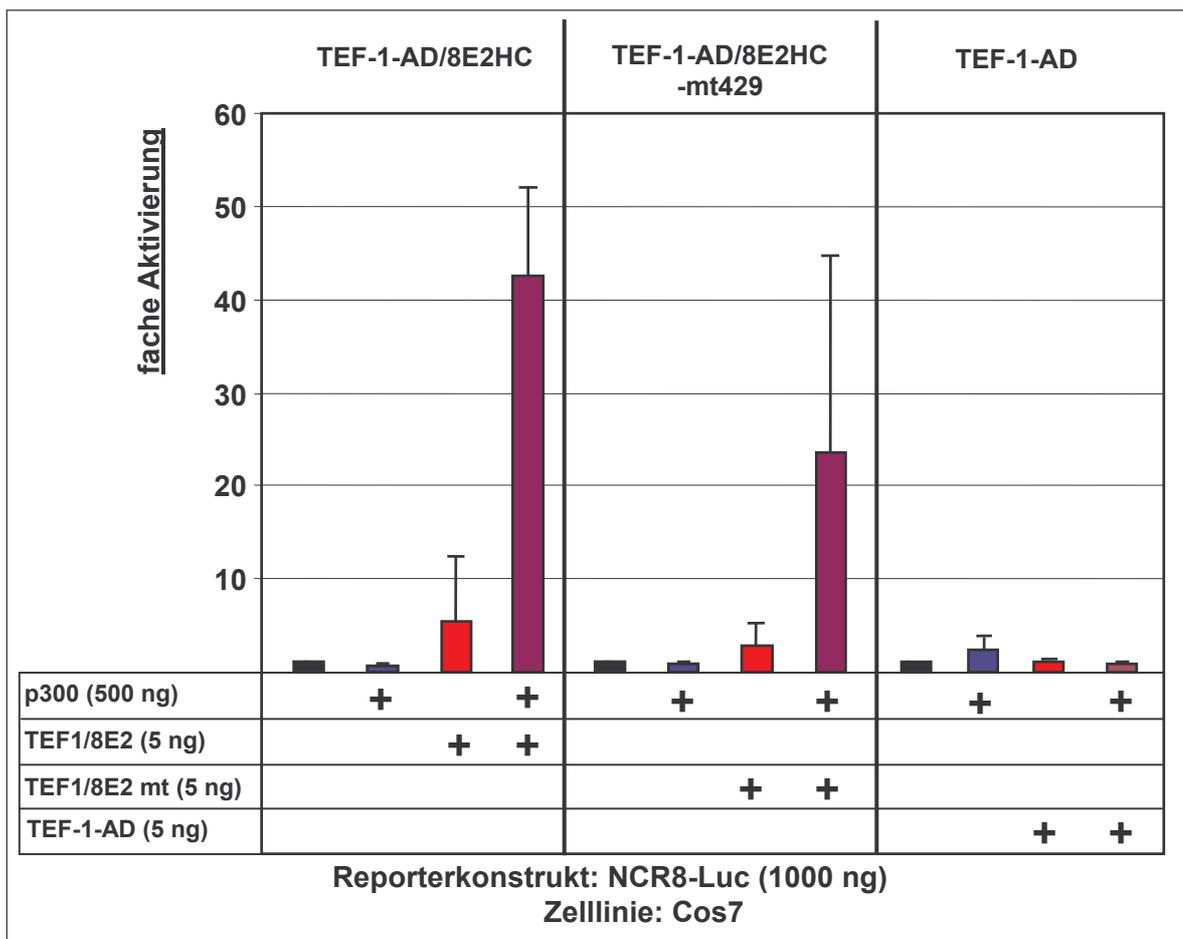


Abb. 19 Kooperation von TEF1-AD-8E2HC mit p300 in Cos7

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (1000 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA sowie mit 5 ng pXJ41-TEF-1-AD-8E2HC, pXJ41-TEF-1-AD-8E2HC-mt429 oder pM-TEF-1-AD in Cos7-Zellen kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.7 Die Expression von p300 in der Haut wird während der Keratinozyten-Differenzierung induziert

Die Transfektionsdaten aus Kapitel 4.3 deuten darauf hin, dass 8E2 hohe Mengen an p300 benötigt, um den späten Promotor von HPV8 effizient zu aktivieren. p300 und CBP werden ubiquitär exprimiert, trotzdem wurden gewebespezifische Änderungen der p300-Expression beschrieben (PARTANEN *et al.*, 1999). Es wurde bereits gezeigt, dass p300 für die Differenzierung von Keratinozyten der Maus benötigt wird, indem es die Expression des zyklinabhängigen Kinase-Inhibitors p21^{CIP1/WAF1} induziert (MISSERO *et al.*, 1995). Das Expressionsmuster von p300 in humaner Haut wurde bislang noch nicht untersucht. Um dies zu analysieren, wurden 5 µm Kryo-Schnitte von gesunder Oberarm-Haut immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen p300 gefärbt (Abb. 20).

Der p300-Antikörper (A) färbte die Kerne der Basalzellen schwach. Eine starke Färbung konnte in den obersten intakten Zellen, die zum Stratum granulosum gehören, festgestellt werden. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen CBP beobachtet (B). Auch hier war die Expression von CBP in den oberen Zellschichten deutlich stärker. Durch das Negativ-Kontrollserum (C) wurden die Zellen nicht gefärbt. Ebenso zeigte ein weiterer Kontroll-Antikörper gegen YY1 (D) ein anderes Expressionsverhalten, das auch schon in früheren Studien gezeigt wurde (ADAM, 2001). Die Expression von p300 wird also im Verlauf der Keratinozyten-Differenzierung induziert. p300 liegt somit in jenen Zellschichten in hohen Konzentrationen vor, in denen auch die Gene für die Strukturproteine von HPV8 über den späten Promotor exprimiert werden.

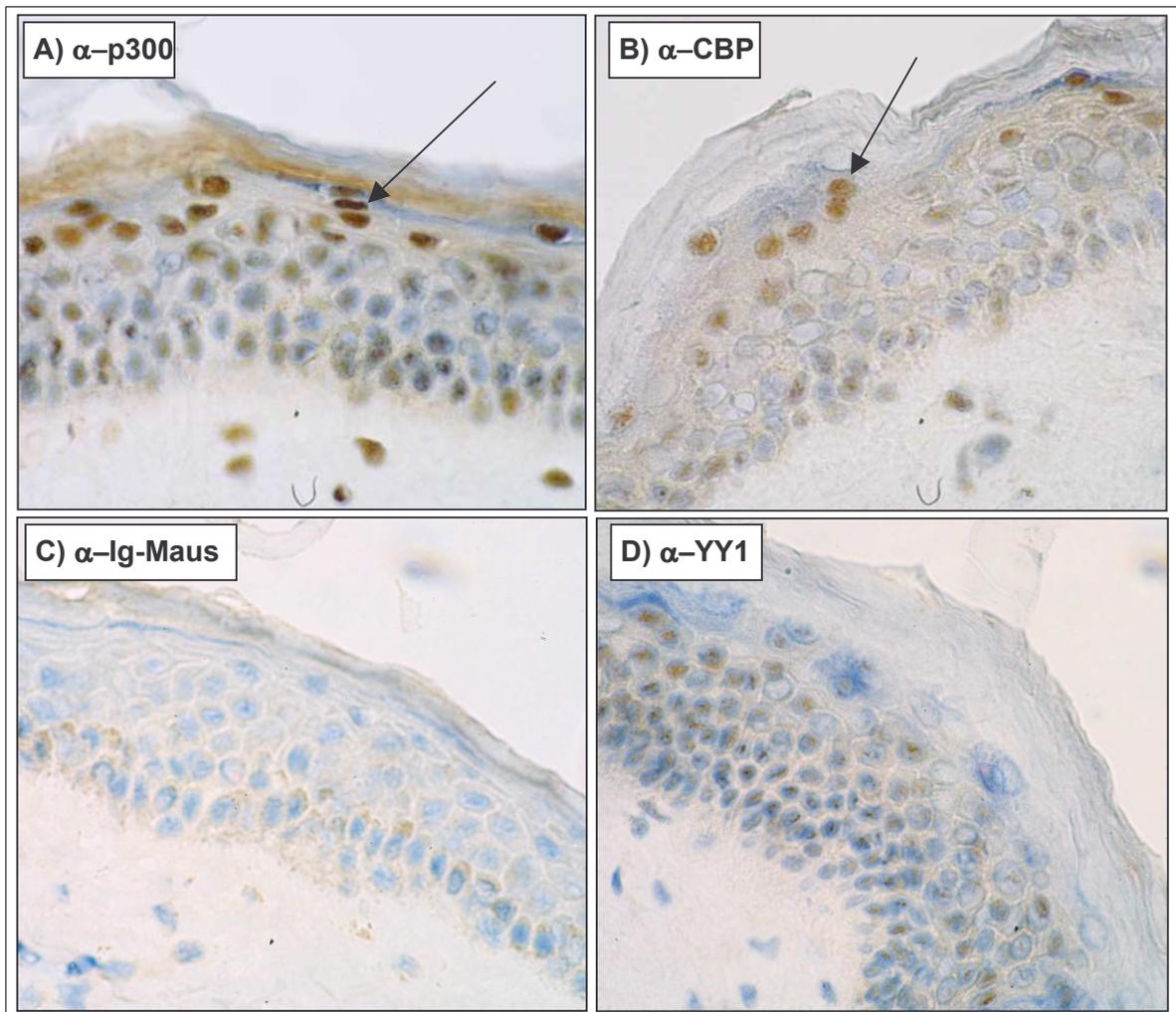


Abb. 20 Die Expression von p300 wird während der Keratinozyten-Differenzierung induziert
5 μ m Kryoschnitte von gesunder Oberarm-Haut wurden mit jeweils 1,5 μ g/ml monoklonalen Antikörpern gegen p300 (A), CBP (B) und YY1 (D) gefärbt. Die Färbung durch ein negativ-Ig-Maus Kontrollserum ist in (C) gezeigt.

4.8 8E6 stimuliert die Kooperation von 8E2 und p300 in primären Keratinozyten

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass 8E2 und p300 bei der Aktivierung der HPV8-Genexpression eine wichtige Rolle spielen. Mit dem E6-Protein von HPV ist zumindest ein weiterer viraler Faktor bekannt, der gleichzeitig mit E2 in der Wirtszelle exprimiert wird und ebenfalls in der Lage ist mit p300 zu interagieren. Im Fall von BPV1 E6 bzw. 16E6 wurde eine Inhibition der Koaktivator-Funktion von p300/CBP bezüglich der p53-, AP-1- oder NF- κ B-vermittelten Transaktivierung demonstriert (ZIMMERMANN *et al.*, 1999, 2000; PATEL *et al.*, 1999; HUANG und McCANCE, 2002). Innerhalb der PV-Familie ist zwar die Struktur der E6-Proteine konserviert, nicht aber ihre Aminosäuresequenz. Gerade zwischen 8E6 und 16E6 gibt es große funktionelle Unterschiede (SMOLA-HESS und PFISTER, 2002). Es lag daher nahe, den Einfluss von 8E6 auf die von 8E2 und p300 vermittelte Transaktivierung zu analysieren. In Vorversuchen konnte eine Interaktion zwischen 8E6 und p300 bereits gezeigt werden. J. Beckmann hat diese in ihrer Diplomarbeit weiter untersucht und konnte mittels transienter Transfektionsanalysen in RTS3b-Zellen zeigen, dass 8E6 die HPV8-Genexpression alleine und auch den Synergismus von 8E2 und p300 stimulieren kann. Im Gegensatz dazu inhibierte 16E6 die Kooperation von 8E2 und p300 (BECKMANN, 2001). RTS3b-Zellen kommen den Zielzellen von HPV sehr nahe, trotzdem weisen sie als immortalisierte Zelllinie ein anderes zelluläres Milieu auf als gesunde Keratinozyten. So sind RTS3b-Zellen zum Beispiel p53-negativ. Die 8NCR enthält jedoch Bindestellen für p53, und diese spielen möglicherweise für die Regulation der HPV8-Genexpression ebenfalls eine Rolle (AKGÜL, 2002). Um die Effekte von 8E2, p300 und den beiden E6-Proteinen in normalen Keratinozyten zu testen, wurden die Transfektionen daher in primären humanen Keratinozyten (NHEK), die den natürlichen Zielzellen von HPV entsprechen (FRATTINI *et al.*, 1997), wiederholt. In Vorversuchen stellte sich heraus, dass sich die NHEK-Zellen bis zur 5. Passage morphologisch nicht wesentlich veränderten und gut transfizieren ließen. Alle folgenden Transfektionen wurden daher in Zellen nach der 4. Passage durchgeführt.

In diesen Experimenten beeinflussten 10 ng pCB6-8E2 den 8NCR-Promotor kaum (Abb. 21). Die Überexpression von p300 stimulierte die Genexpression 2-fach und die Koexpression von 8E2 und p300 resultierte hier in einer 4-fachen Aktivierung. Diese konnte durch zusätzliche Kotransfektion von 500 ng pCDNA-8E6 auf 16-fach gesteigert werden. Während 8E6 bereits alleine schon 3-fach aktivierte, reprimierte 16E6 hingegen die Basalaktivität und hob den Synergismus von E2 und p300 auf. Obwohl die Werte quantitativ von den entsprechenden Experimenten in den RTS3b-Zellen abweichen,

zeigen sie doch qualitativ den gleichen Effekt. 8E6 kann die 8E2- und p300-vermittelte Aktivierung weiter stimulieren, während 16E6 sie reprimiert.

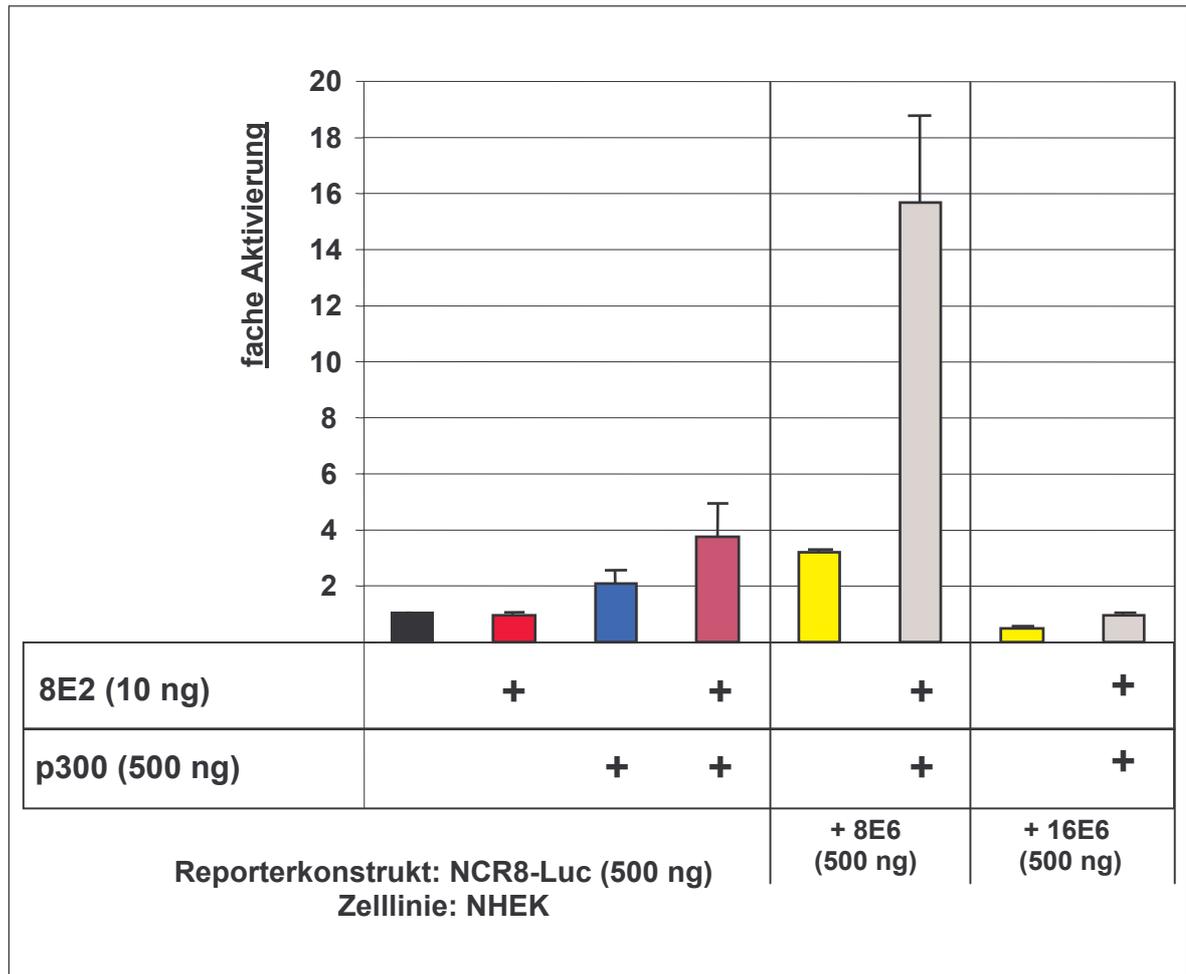


Abb. 21 8E6 und 16E6 beeinflussen die Aktivierung durch 8E2 und p300 unterschiedlich
 Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-8E6 bzw. -16E6 wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.9 8E6 bindet direkt an p300

Eine direkte Interaktion von 8E6 mit p300 wurde bislang noch nicht bewiesen, da 8E6 in früheren Interaktionsanalysen mit p300 stets *in vitro* translatiert wurde (BECKMANN, 2001). Für 16E6 konnte bereits eine direkte Bindung an p300 demonstriert werden (PATEL *et al.*, 1999). Um dies auch für 8E6 zu bestätigen, wurde 8E6 N-terminal mit einem Epitop aus sechs Histidin-Resten fusioniert (His₆-8E6), in Bakterien exprimiert und spezifisch aufgereinigt. Komplexe aus bakteriell gereinigtem GST-p300-4 und His₆-8E6 wurden über Glutathion-Sepharose präzipitiert und 8E6 nach einem Western Blot mit einem Antikörper gegen das Histidin-Epitop detektiert (Abb. 22). GST-p300-4 war im Gegensatz zu GST imstande His₆-8E6 zu präzipitieren, so dass 8E6 innerhalb von p300-4 direkt an p300 bindet.

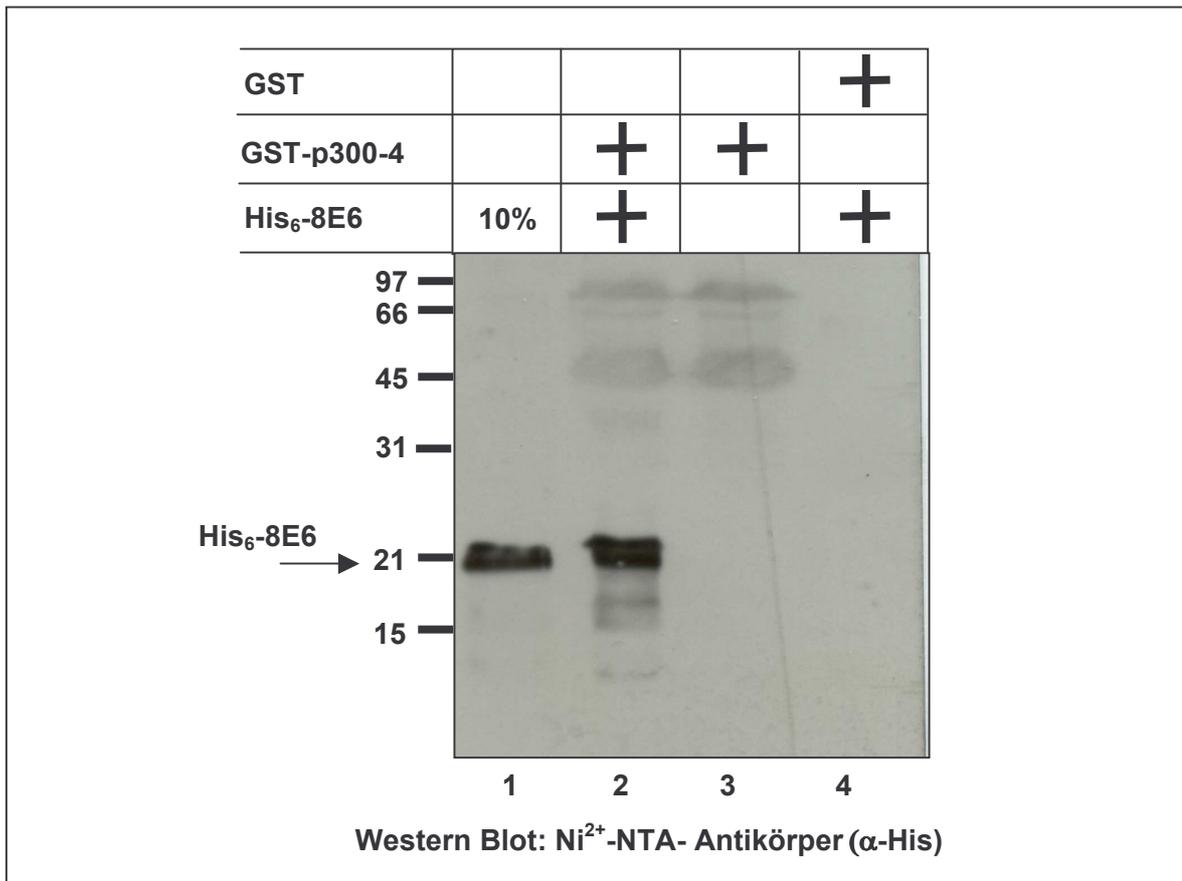


Abb. 22 8E6 bindet direkt an p300

Interaktionsstudie mit bakteriell exprimierten und aufgereinigten His₆-8E6 und GST-p300-4. 2 µg GST-p300-4 (2, 3) und GST (4) wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit ca. 2 µg His₆-8E6 inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen. Spur 1 zeigt 10% des eingesetzten His₆-8E6. Um potentielle Kreuzreaktionen des Antikörpers zu erkennen wurde in Spur 3 GST-p300-4 alleine aufgetragen. Gebundenes 8E6 wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und nach einen Western Blot mit einem Ni²⁺-NTA Antikörper detektiert.

4.10 8E6 und 16E6 interagieren mit 8E2

Bei den unterschiedlichen Effekten von 8E6 und 16E6 auf die 8E2- und p300-vermittelte Aktivierung der Transkription könnte theoretisch auch eine Wechselwirkung der E6-Proteine mit 8E2 eine Rolle spielen. Um zu überprüfen, ob die E6-Proteine in der Lage sind 8E2 zu binden, wurden Interaktionsanalysen mit GST-8E2 und den *in vitro* translatierten E6-Proteinen durchgeführt. GST-8E2 (2,5) war im Gegensatz zu GST (3,6) in der Lage sowohl *in vitro* translatiertes 8E6 als auch 16E6 zu präzipitieren (Abb. 23). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde jedoch aus Zeitgründen nicht weiter auf die Interaktion zwischen 8E2 und E6 eingegangen.

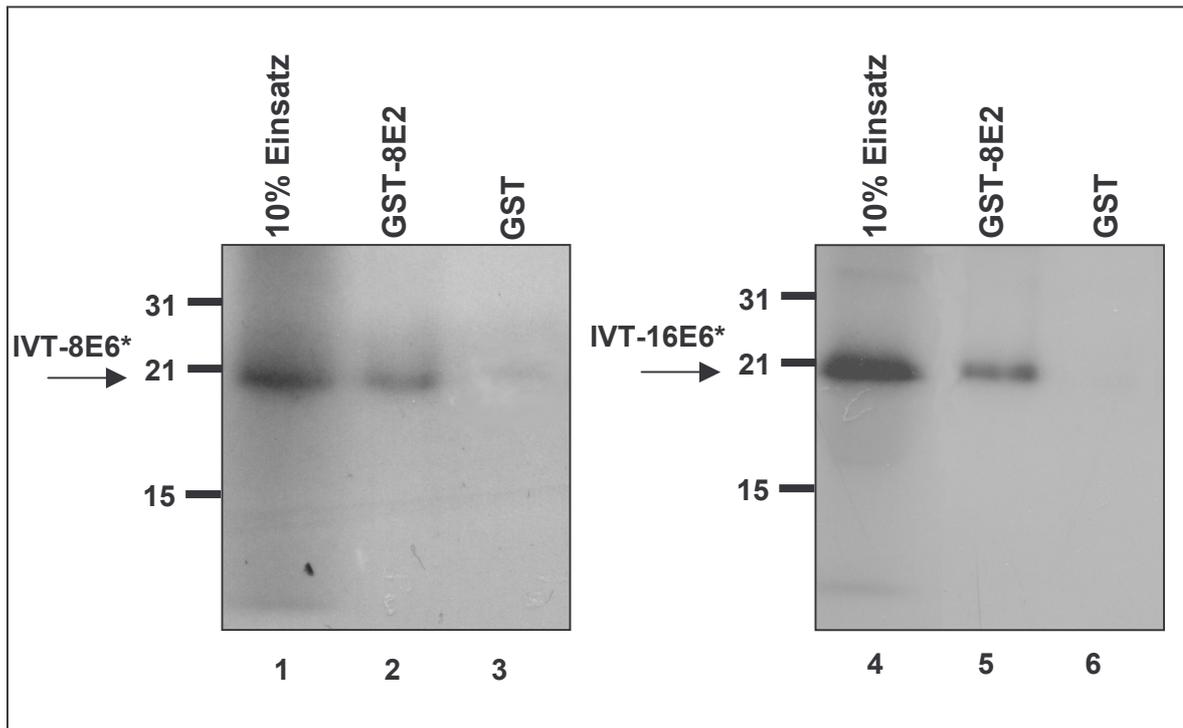


Abb. 23 8E6 und 16E6 binden an 8E2

Interaktionsstudie. 2 µg GST-8E2 (2,5) sowie GST (3,6) wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, jeweils mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E6 bzw. 16E6 inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen. 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind jeweils in Spur 1 und 4 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

4.11 Die Bindedomänen von 8E6 und 16E6 innerhalb von p300-4B sind identisch

4.11.1 8E2, 8E6 und 16E6 binden nicht an die TRAM-Region von p300

Die starke Aktivierung der Transkription durch 8E6 steht in einem starken Gegensatz zu 16E6, das die E2- und p300-vermittelte Transaktivierung reprimiert. In früheren GST-Interaktions-Analysen zeigten beide E6 Proteine eine vergleichbare Bindung an p300. Sie interagierten mit dem N-terminalen p300-1, dem C-terminalen p300-5 und mit zwei Domänen innerhalb von p300-4 (p300-4A, (As: 1453-1634) und p300-4B, (As: 1635-1887)). Eine genauere Untersuchung von p300-4A ergab, dass die Bindedomänen beider E6-Proteine innerhalb der As 1528-1634 von p300-4A liegen und mit der von 8E2 überlappen (BECKMANN, 2001; MÜLLER, 1999).

Für die Repression der p53- und CBP-vermittelten Aktivierung wurde eine kompetitive Bindung von 16E6 mit p53 an CBP vermutet. Als Interaktionsort wurde das 19 Aminosäuren große TRAM-Modul identifiziert (ZIMMERMANN *et al.*, 1999). Bei p300 liegt diese Domäne innerhalb von p300-4B, das bislang noch nicht genauer bezüglich der Bindestellen von 8E2, 8E6 und 16E6 kartiert wurde. Die TRAM-Region von p300 wird von As 1770-1788 kodiert und unterscheidet sich von der von CBP um eine Aminosäure (Isoleucin statt Valin) (Abb. 24).

TRAM:	Aminosäuresequenz:
CBP (1808-1826):	GCKRKTNGGCP <u>V</u> CKQLIAL
p300 (1770-1788):	GCKRKTNGGCP <u>I</u> CKQLIAL

Abb. 24 Vergleich der TRAM-Domänen von CBP und p300

8E2 bindet exklusiv an p300-4A und p300-4B. Falls eine kompetitive Bindung von 8E2 und 16E6 an p300 die Grundlage für die 16E6-vermittelte Repression sein sollte, so muss sie innerhalb dieser Fragmente erfolgen. Ein kompetitiver Mechanismus innerhalb von p300-4A ist als Ursache für die Repression unwahrscheinlich, da die Bindestellen von 8E6 und 16E6 innerhalb von p300-4A identisch sind und man diesen Effekt dann auch mit 8E6 sehen sollte. Es stellte sich daher die Frage, ob die beiden E6-Proteine innerhalb von p300-4B unterschiedliche Bindedomänen besitzen und inwiefern diese dabei mit der von 8E2 überlappen. Ferner sollte die Rolle des TRAM-Motivs von p300 für die Bindung der drei Proteine geklärt werden.

Um dies zu untersuchen, wurde p300-4B zunächst in fünf überlappende Subfragmente unterteilt (p300-4B-1 (As 1635-1769); p300-4B-2 (As 1635-1788); p300-4B-TRAM (As 1770-1788); p300-4B-4 (As 1770-1887); p300-4B-5 (As 1789-1887)), die als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert wurden. Die aufgereinigten Proteine und zum Vergleich GST alleine sind in Abb. 25 dargestellt.

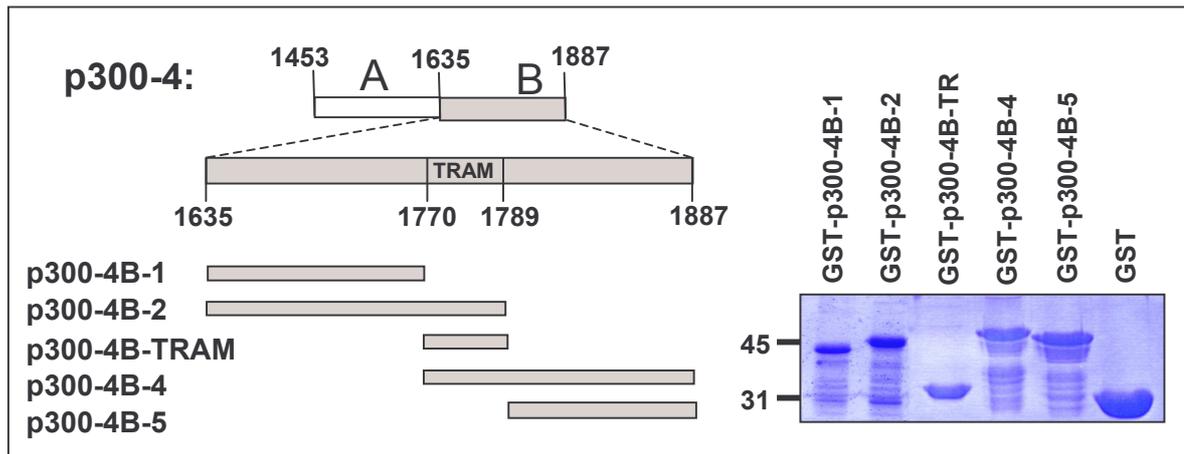


Abb. 25 Unterteilung von p300-4B in fünf überlappende Subfragmente

Eine schematische Darstellung der verwendeten Subfragmente von p300-4B ist links abgebildet. Die Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine in BL21-Bakterien exprimiert, mittels Glutathion-Sepharose spezifisch aufgereinigt und über ein 10%-PAG aufgetrennt. Ein mit Coomassie-Blau gefärbtes Gel ist rechts gezeigt.

Um die Bindung von 8E2, 8E6 und 16E6 an p300-4B zu analysieren, wurden jeweils 2 µg der GST-p300-4B-Subfragmente und GST als Negativkontrolle aufgereinigt und mit *in vitro* translatiertem und ^{35}S -markiertem 8E2, 8E6 bzw. 16E6 inkubiert. In Abbildung 26B ist zu erkennen, dass 8E2 ausschließlich mit Subfragment p300-4B-4 (4) interagiert. Entgegen den Erwartungen konnte sowohl für 8E6 als auch für 16E6 keine Bindung an das TRAM-Modul von p300 (3) festgestellt werden. Beide E6-Proteine interagierten mit p300-4B-4 (4), wobei 8E6 zu diesem Subfragment von 4B eine höhere Affinität aufwies als 16E6. Zusätzlich zeigte 8E6 eine schwache Interaktion mit GST-p300-4B-5 (5), die hier mit 16E6 nicht beobachtet werden konnte.

Diese Daten deuten darauf hin, dass auch innerhalb von p300-4B die Bindedomänen von 8E2, 8E6 und 16E6 überlappen. Die TRAM-Region ist für die Bindung nicht ausreichend, scheint aber an der Interaktion mit 8E6, 16E6 und 8E2, wegen der fehlenden bzw. eingeschränkten Affinität zu GST-p300-4B-5, beteiligt zu sein. Es lässt sich allerdings nicht sicher sagen, ob sich 8E6 und 16E6 in ihrer Bindung an p300-4B qualitativ unterscheiden, da eine Bindung von 16E6 an p300-4B-5, auf Grund einer geringeren Affinität möglicherweise nicht detektierbar war.

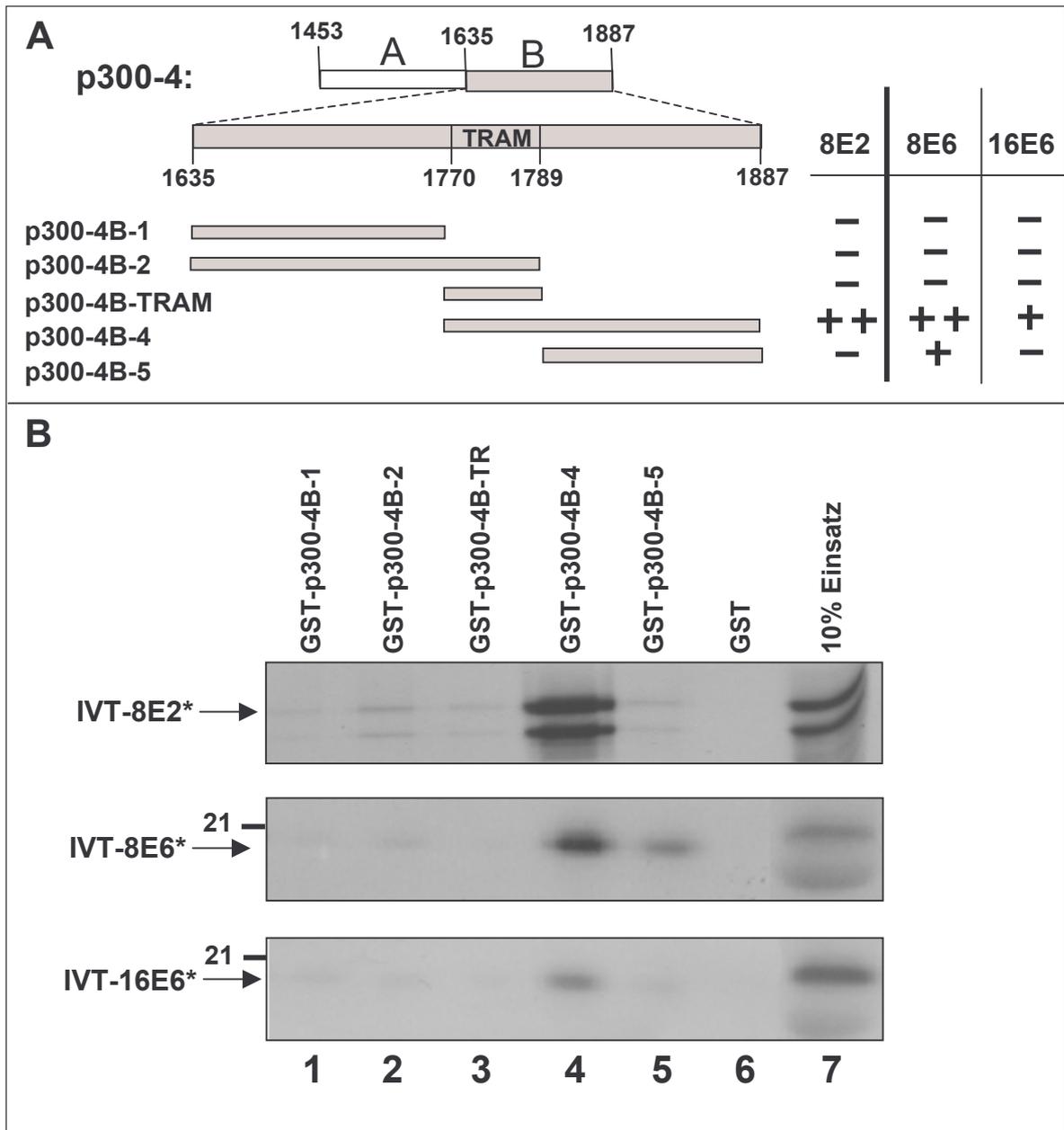


Abb. 26 Die Bindedomänen von 8E2, 8E6 und 16E6 überlappen innerhalb von p300-4B

(A) Schematische Darstellung der untersuchten Subfragmente von p300-4B (links) sowie Bindungsverhalten der eingesetzten 8E2-, 8E6- und 16E6-Proteine an diese Fragmente (rechts). (B) Interaktionsstudien. Jeweils 2 µg GST-p300-4B 1 - 5 und GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E2, 8E6 oder 16E6 inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen (Spur 1-6). 10% der eingesetzten *in vitro*-Translationsprodukte sind jeweils in Spur 7 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%-PAG (8E2) oder ein 15%-PAG (8E6/16E6) aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

4.11.2 8E6 und 16E6 zeigen ein identisches Bindungsverhalten an p300-4B

Da die TRAM-Region von p300 nur um eine Aminosäure von der von CBP abweicht, war es überraschend, dass keine Interaktion mit 16E6 beobachtet wurde. Trotzdem scheint diese Region für die Interaktion mit 8E2, 8E6 und 16E6 eine Rolle zu spielen. Um die Bedeutung des TRAM-Moduls genauer zu analysieren und um der Frage einer potentiell unterschiedlichen Bindung von 8E6 und 16E6 an p300-4B weiter nachzugehen, wurden zusätzliche Subfragmente von p300-4B als GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. Zum einen wurden zwei um 7 bzw. 26 Aminosäuren verlängerte TRAM-Domänen (p300-4B-TR+7, p300-4B-TR+26) und zum anderen zwei entsprechend verkürzte Fragmente von p300-4B-5 (p300-4B-5 -7, p300-4B-5 -26) hergestellt. Die aufgereinigten Proteine und zum Vergleich GST alleine sind in Abb. 27 dargestellt.

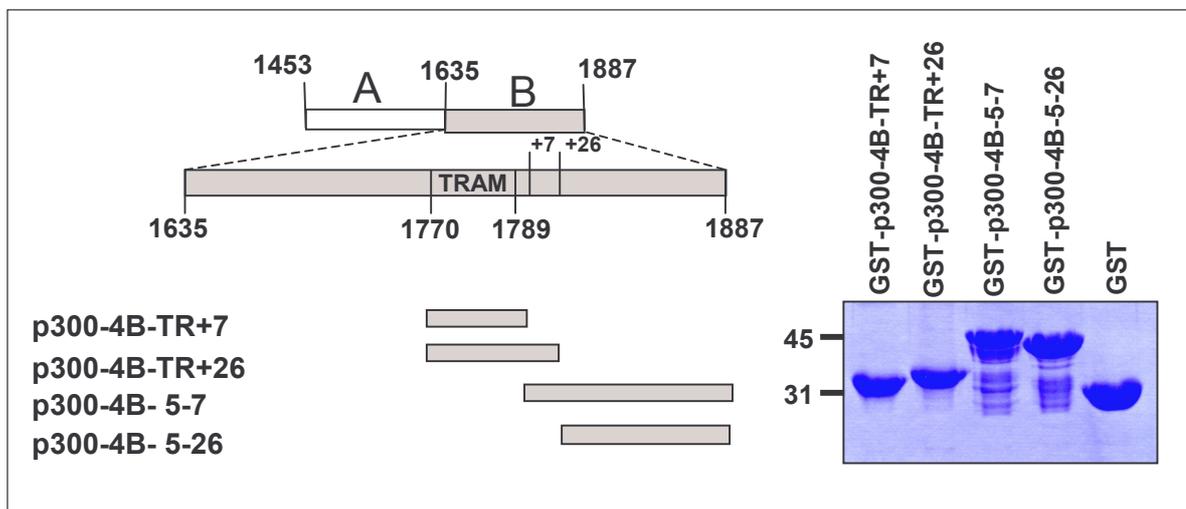


Abb. 27 Unterteilung von p300-4B in weitere Subfragmente

Eine schematische Darstellung der verwendeten Subfragmente von p300-4B ist links abgebildet. Die Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine in BL21-Bakterien exprimiert, über Glutathion-Sepharose spezifisch aufgereinigt und über ein 10%-PAG aufgetrennt. Ein mit Coomassie-Blau gefärbtes Gel ist rechts gezeigt.

Für die Interaktionsanalysen wurden zusätzlich GST-p300-4B-TRAM als Negativkontrolle und GST-p300-4B-4 als Positivkontrolle eingesetzt (Abb. 28). *In vitro* translatiertes 8E2 band weder an die verlängerten TRAM-Fragmente (3, 4) noch an die verkürzten p300-4B-5 Fragmente. Eine Interaktion konnte nur mit der Positivkontrolle GST-p300-4B-4 (7) beobachtet werden. Beide E6-Proteine zeigten hingegen eine schwache Bindung an GST-p300-4B-TR +7 (3) sowie eine stärkere an GST-p300-4B +26 (4). Sowohl 8E6 als auch 16E6 konnten hier an die um 7 Aminosäuren verkürzte Form von GST-p300-4B-5 (6) binden. Die 26 Aminosäuren kürzere Variante (7) wurde jedoch von beiden E6-Proteinen nicht mehr erkannt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die TRAM-Region von p300 für die Interaktion mit beiden hier untersuchten E6-Proteinen nicht notwendig ist. Vielmehr scheinen die Aminosäuren zwischen 1789 und 1814 für die Wechselwirkung relevant zu sein. Für 8E2

hingegen ist die TRAM-Region für die Bindung an p300-4B essentiell. Die Bindedomänen von 8E6 und 16E6 an p300-4B sind daher identisch und überlappen mit der von 8E2.

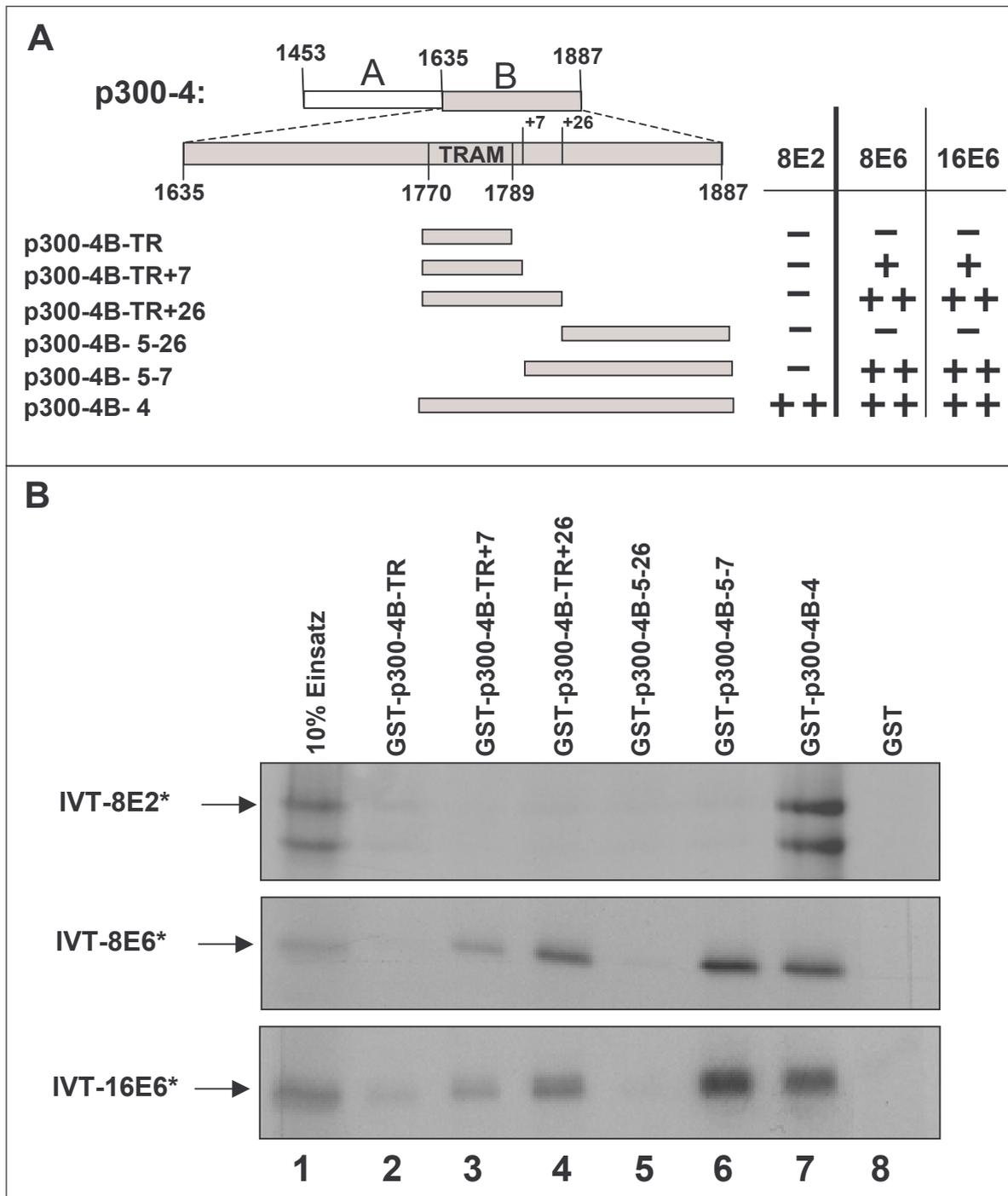


Abb. 28 8E6 und 16E6 zeigen ein identisches Bindungsverhalten an p300-4B

(A) Schematische Darstellung der untersuchten Subfragmente von p300-4B (links) sowie Bindungsverhalten der eingesetzten 8E2-, 8E6- und 16E6-Proteine an diese Fragmente (rechts). (B) Interaktionsstudie. 2 µg GST-p300-4B-TR, -TR+7, -TR+26, -5-7, -5-26 und -4 sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, jeweils mit 10 µl in Retikulozytenlysate *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E2, 8E6 bzw. 16E6 inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen (Spur 2-8). 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind jeweils in Spur 1 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 10%-PAG (8E2) bzw. 15%-PAG (8E6, 16E6) aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

4.12 Sowohl der N- als auch der C-Terminus von 8E6 interagieren mit p300

Wegen der gleichen Bindedomänen von 8E6 und 16E6 innerhalb von p300-4, erschien eine Repression der 8E2-vermittelten Transaktivierung durch eine kompetitive Bindung von 8E2 und 16E6 an p300 unwahrscheinlich. Es wurde daher überlegt, die Ursache für die unterschiedlichen Effekte von 8E6 und 16E6 bei der Modulation der Transkription im E6-Protein zu suchen.

Das E6-Protein enthält zwei Zinkfinger-Strukturen, die maßgeblich an den Funktionen des Proteins beteiligt sind. Im Fall von 16E6 wurde der C-terminale Zinkfinger für die Bindung an p300/CBP verantwortlich gemacht. ZIMMERMANN *et al.* zeigten, dass der C-Terminus alleine die Wechselwirkung mit CBP vermitteln kann und PATEL *et al.* beschrieben 16E6-Mutanten mit kleinen Deletionen im zweiten Zinkfinger, die nur noch eingeschränkt an p300 banden (PATEL *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999).

Für die Identifizierung der Domäne von 8E6, die mit p300 interagiert, wurde 8E6 in zwei Hälften unterteilt: 8E6-N (As 1-93) und 8E6-C (As 94-155). Diese Fragmente sind homolog zu den entsprechenden 16E6-Domänen, die von ZIMMERMANN *et al.* verwendet wurden.

Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in den Expressionsvektor pCDNA-FLAG kloniert, der die Expression von Proteinen mit einem N-terminalen FLAG-Epitop unter der Kontrolle eines T7- und eines CMV-Promotors erlaubt. Somit konnten dieselben Vektoren sowohl für *in vitro*-Translationen als auch für transiente Transfektionen eingesetzt werden. Das N-terminale FLAG-Signal erlaubte außerdem den Nachweis der zellulär exprimierten Proteine über Immunfluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Alle in dieser Arbeit folgenden E6-Derivate wurden in diesen Vektor kloniert.

Um die Bindung von 8E6-N und 8E6-C an p300 zu analysieren, wurden für Interaktionsanalysen jene GST-p300-Fragmente eingesetzt, für die eine Bindung an 8E6 gezeigt wurde: GST-p300-1, -4, -5, -4A und -4B (BECKMANN, 2001). In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass der N-Terminus in diesen Ansätzen vor allem mit Fragment 5 und 4B interagiert (4, 6). Zu den anderen Fragmenten war die Bindung deutlich schwächer (2, 3, 5), aber im Vergleich zu GST alleine (7) noch vorhanden. Auch der C-Terminus interagiert mit p300 und zwar hauptsächlich über p300-4B (6). Die Bindung an die übrigen Fragmente war hier ebenfalls deutlich weniger ausgeprägt, aber noch nachweisbar (2 - 5). 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind jeweils in Spur 1 gezeigt. Da die beiden Teilfragmente von E6 mit 8-10 kDa relativ klein waren, komigrierten diese hier mit einem Globin-Protein aus dem Retikulozytenlysat (FA. PROMEGA, persönl. Mitteilung). Daher wurde vor allem bei 8E6-C das Laufverhalten der

Vergleichsprobe beeinflusst, so dass sich keine scharfe Bande auszeichnen konnte. Trotzdem zeigen die Analysen, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von 8E6 an der Interaktion mit p300 beteiligt ist.

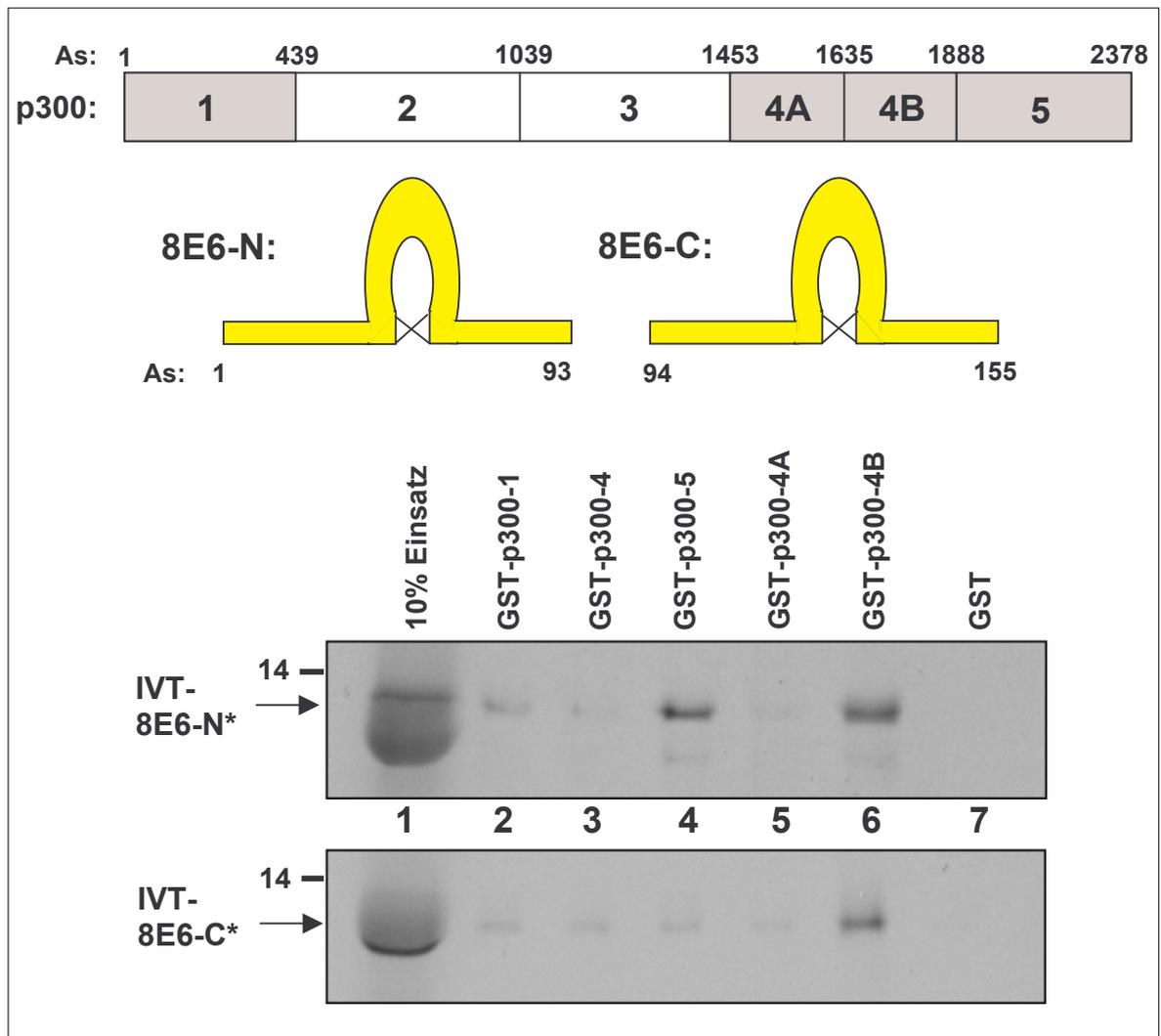


Abb. 29 8E6 bindet mit seinem N- und C-Terminus an p300

Interaktionsstudie. 2 µg der GST-p300 Fragmente 1, 4, 5, 4A und 4B sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt und mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E6-N bzw. 8E6-C inkubiert (jeweils Spur 2 - 7). Jeweils 10% der eingesetzten *in vitro*-Translationsprodukte sind in Spur 1 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Der obere Teil zeigt schematische Darstellungen der eingesetzten Proteine.

4.13 Der C-Terminus von 8E6 stimuliert den Synergismus von 8E2 und p300 bzgl. der HPV8-Genexpression

Nachdem gezeigt wurde, dass beide Fragmente von 8E6 mit p300 interagieren, lag es nahe über transiente Transfektionsanalysen zu prüfen, inwiefern transkriptionsmodulierende Eigenschaften in den separierten Domänen erhalten bleiben.

Für die folgenden Transfektionsanalysen wurden immer 100 ng, 250 ng und 500 ng Expressionsvektoren für die jeweiligen E6-Derivate mit 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCMV β -p300HA, alleine oder in Kombinationen, zusammen mit 500 ng des Reporter-konstruktes NCR8-Luc in NHEK-Zellen kotransfiziert. Nur die maximalen Effekte, die stets mit 500 ng des jeweiligen E6-Expressionsvektors beobachtet wurden, sind hier gezeigt.

4.13.1 Der N-Terminus von 8E6 hat einen leicht reprimierenden Einfluss auf den Synergismus von 8E2 und p300

Der N-Terminus von 8E6 hatte alleine kaum Einfluss auf die basale Aktivität der 8NCR (Abb. 30). Die 1,8-fache Aktivierung durch 8E2 wurde durch koexprimiertes 8E6-N leicht

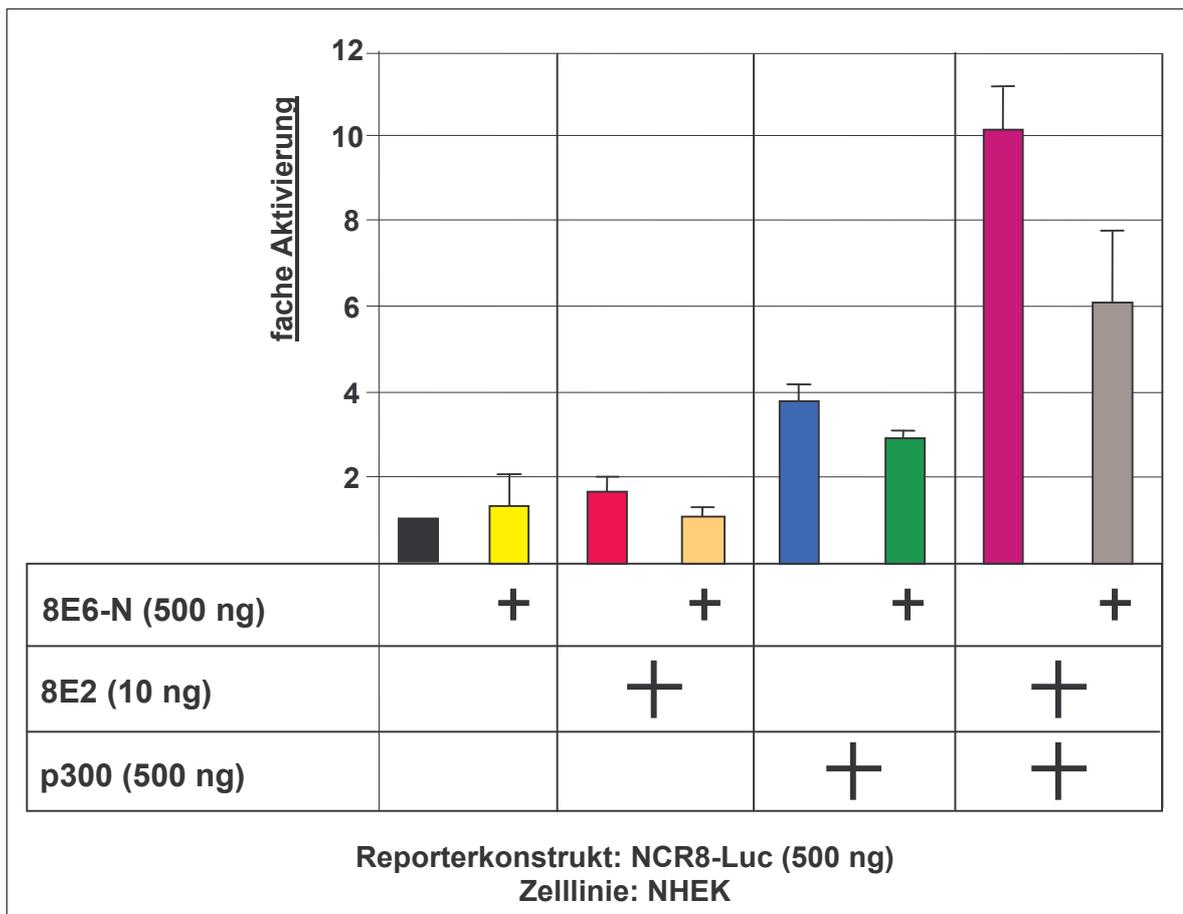


Abb. 30 8E6-N reprimiert die E2- und p300-vermittelte HPV8-Genexpression leicht

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-8E6-N wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von 8E6 mit p300 interagieren können. Hierbei hat jedoch nur der C-terminale Anteil von 8E6 einen deutlichen Einfluss auf die 8E2- und p300-vermittelte Transkription. 8E6-C ist imstande die HPV8-Genexpression alleine und in Kooperation mit 8E2 und p300 stark zu aktivieren.

4.14 Eine p300-bindungsdefekte Mutante von 8E6 verliert die Fähigkeit Transkription zu aktivieren

Für 16E6 wurde eine Deletionsmutante beschrieben (16E6- Δ 123-127), die nur noch sehr schwach an p300 bindet (PATEL *et al.*, 1999). In Transfektionsanalysen war diese Mutante nicht mehr in der Lage den NF- κ B-abhängigen Interleukin8-Promotor zu inhibieren und

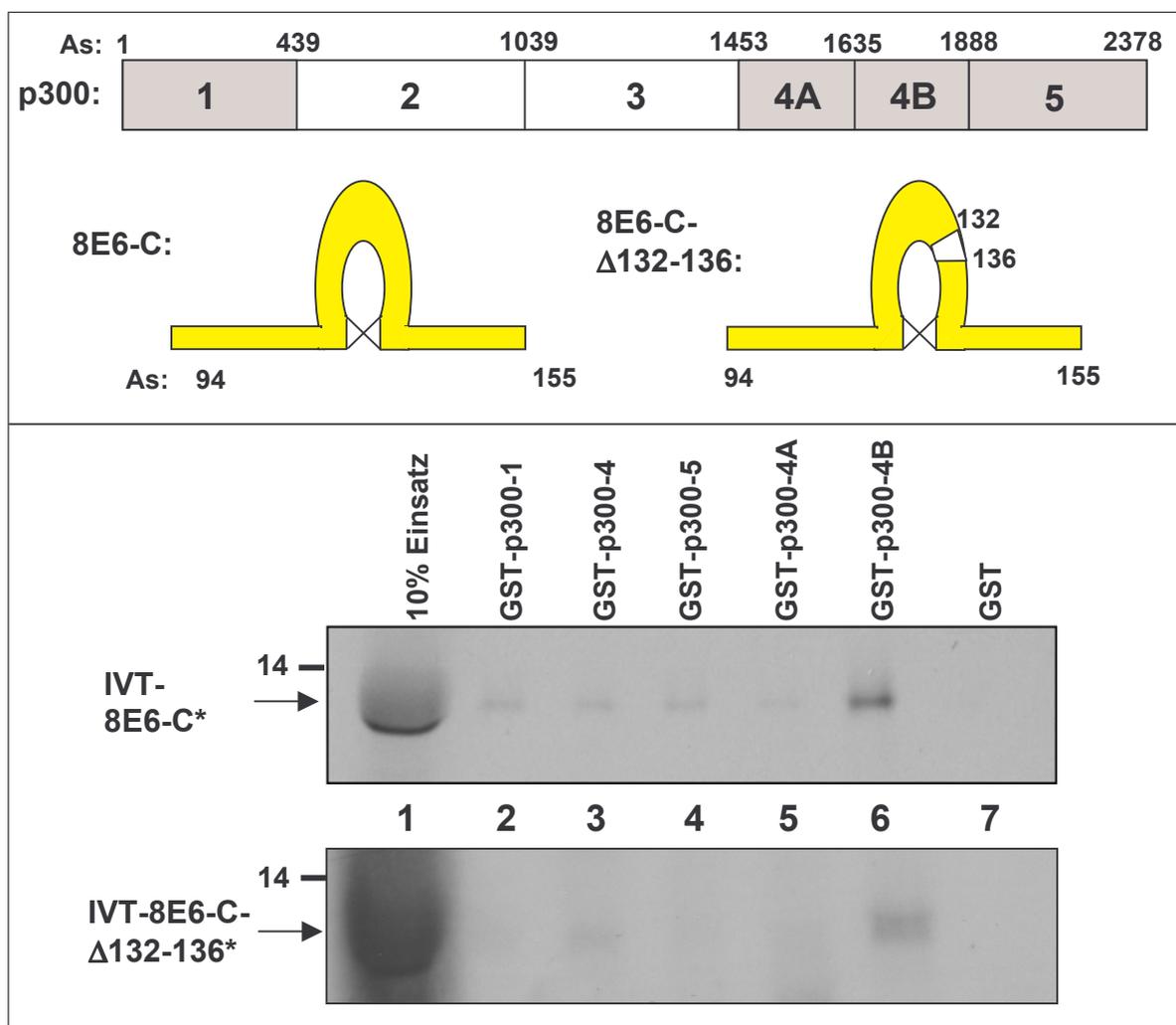


Abb. 32 8E6-C Δ 132-136 bindet nur noch eingeschränkt an p300

Interaktionsstudie. 2 μ g der GST-p300 Fragmente 1, 4, 5, 4A und 4B sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 μ l in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E6-C bzw. 8E6-C- Δ 132-136 inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen (jeweils Spur 2 - 7). 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind jeweils in Spur 1 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Der obere Teil zeigt schematische Darstellungen der eingesetzten Proteine.

man korrelierte dies mit der eingeschränkten Bindung der 16E6-Deletionsmutante an p300 (HUANG und MCCANCE, 2002). Um zu überprüfen, ob die entsprechenden Aminosäuren von 8E6 ebenfalls essentiell für eine Bindung an p300 und die Aktivierung der Transkription sind, wurde eine homologe Deletionsmutante von 8E6 und 8E6-C hergestellt. Nach Sequenzvergleich mit 16E6 wurden hierfür die As 132-136 innerhalb des zweiten Zinkfingers von 8E6 deletiert.

In vitro translatiertes 8E6-C- Δ 132-136 wurde zunächst auf seine Fähigkeit an p300 zu binden untersucht (Abb. 32). Zum Vergleich ist das Bindeverhalten von 8E6-C dargestellt. Nur bei sehr langer Exposition konnte noch eine schwache Restbindung mit p300-4B (6) festgestellt werden.

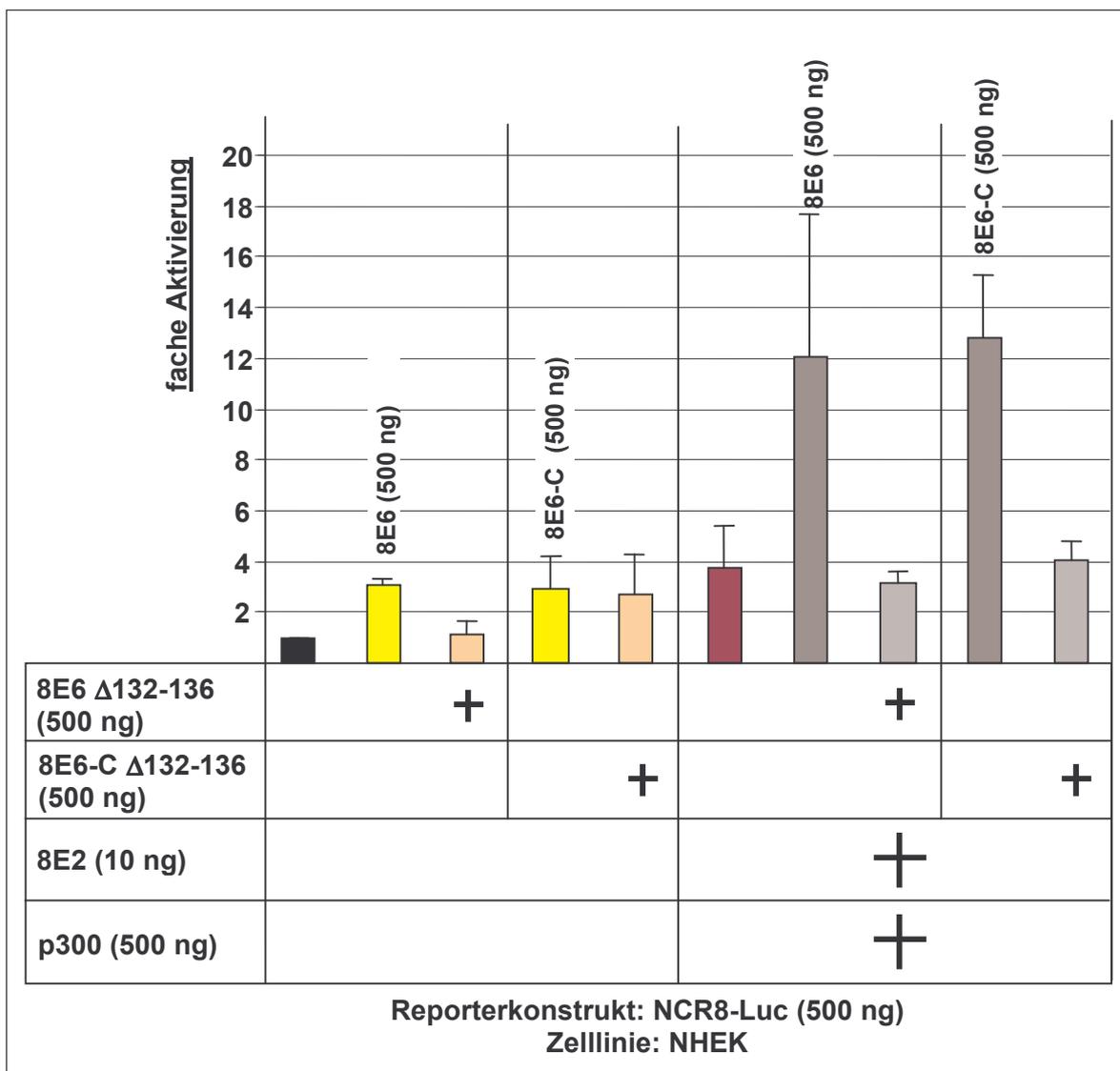


Abb. 33 Die As 132-136 sind essentiell für die Kooperation von 8E6 mit 8E2 und p300

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-8E6- Δ 132-136 bzw. 500 ng pCDNA-FLAG-8E6-C- Δ 132-136 wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Kontrollen wurden je 500 ng pCDNA-FLAG-8E6 und pCDNA-FLAG-8E6-C verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Um zu überprüfen, ob das eingeschränkte Bindevmögen der 8E6-Deletionsmutanten an p300 auch funktionelle Auswirkungen hat, wurden sie in transienten Transfektionsanalysen eingesetzt (Abb. 33). Die 4-fache Aktivierung durch 8E2 und p300 zusammen, wurde im Gegensatz zu den entsprechenden Wildtyp-Proteinen (auf jeweils 12-fach) von keiner der beiden Deletionsmutanten beeinflusst. Die Aminosäuren 132-136 innerhalb von 8E6 sind somit für die Kooperation mit 8E2 und p300 essentiell.

4.15 Nur der C-Terminus von 16E6 bindet an p300

Als nächstes wurde die Region von 16E6 bestimmt, die für die Repression der 8E2- und p300-vermittelten Aktivierung verantwortlich ist. Hierfür wurde 16E6 zunächst ebenfalls in eine N- (As 1-84) und eine C-terminale Domäne (As 85-151) unterteilt. Eine Interaktion von 16E6-C mit einem Fragment von CBP, das mit den As 1683 - 1839 von p300 homolog ist, wurde bereits von ZIMMERMANN *et al.* gezeigt. Eine Bindung von 16E6-N an dieses Fragment konnten sie nicht beobachten. Weitere Regionen von CBP wurden mit 16E6 nicht getestet (ZIMMERMANN *et al.*, 1999).

Für die hier durchgeführten Interaktionsanalysen wurden die Fusionsproteine GST-p300-1,-4,-5,-4A und -4B verwendet. Diese p300-Fragmente waren bereits in früheren Experimenten von 16E6 gebunden worden (BECKMANN, 2001). 16E6-N wurde von keinem dieser GST-p300-Fragmente präzipitiert (Abb. 34). Der C-Terminus hingegen band an GST-p300-4, -5, -4A und -4B (3-6). Im Gegensatz zu 8E6 interagiert bei 16E6 nur der C-Terminus mit p300.

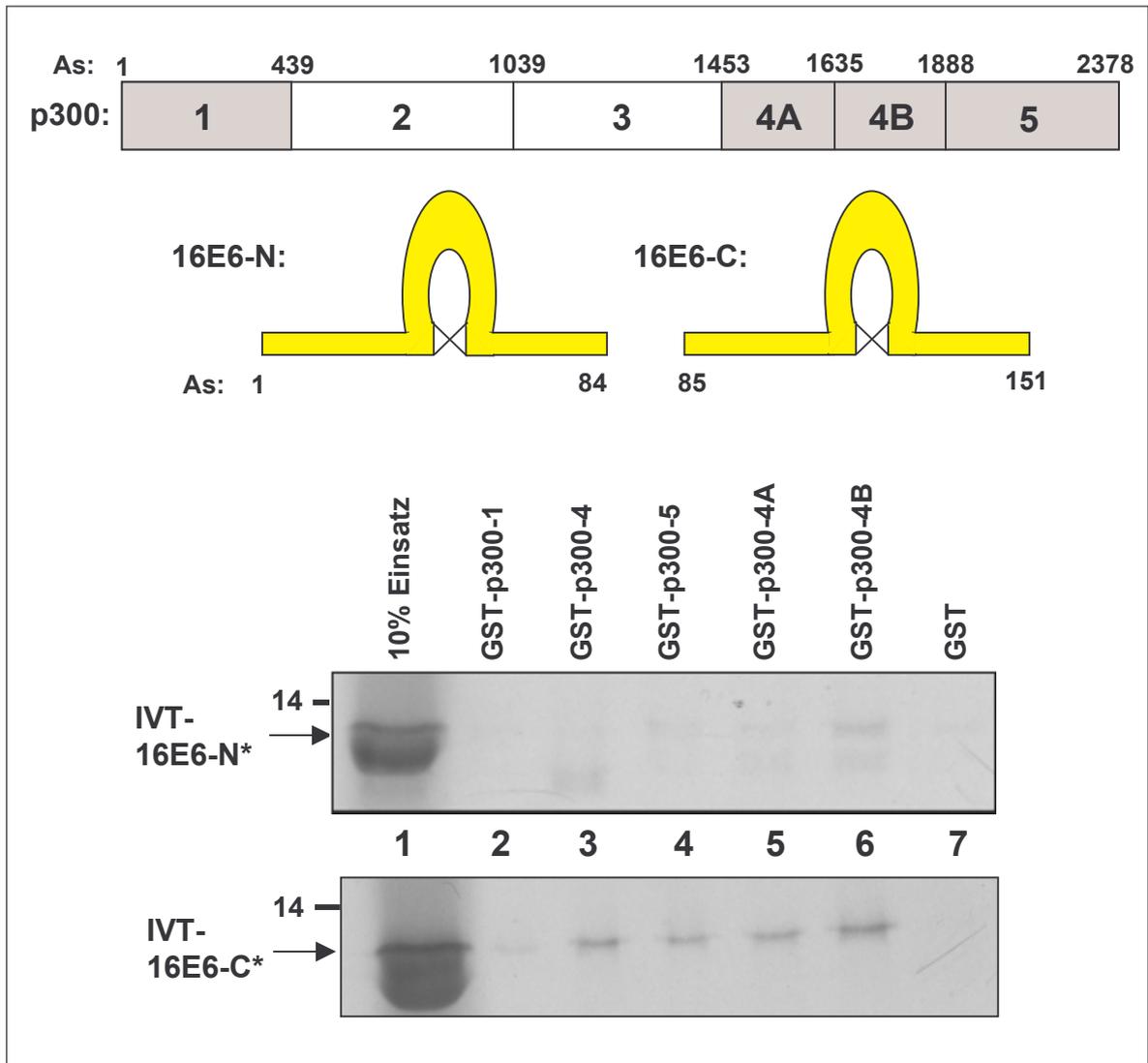


Abb. 34 16E6 bindet nur mit seinem C-Terminus an p300

Interaktionsstudie. 2 µg der GST-p300 Fragmente 1, 4, 5, 4A und 4B sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 16E6-N bzw. 16E6-C inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen (jeweils Spur 2 - 7). 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind jeweils in Spur 1 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Der obere Teil zeigt schematische Darstellungen der eingesetzten Proteine.

4.16 Der C-Terminus von 16E6 inhibiert den Synergismus von 8E2 und p300 bzgl. der HPV8-Genexpression

Wie bereits erwähnt konnten ZIMMERMANN *et al.* zeigen, dass der C-Terminus von 16E6 ausreicht, um p53-vermittelte Transaktivierung zu reprimieren. Die N-terminale Domäne hatte hingegen keinen Einfluss auf die Modulation der Genexpression. Um diese Beobachtung auch für die 8E2-vermittelte Aktivierung der Transkription zu überprüfen, wurden die beiden 16E6-Fragmente analog zu Kapitel 4.13 in transienten Transfektionsanalysen eingesetzt.

4.16.1 16E6-N hat keinen Einfluss auf die 8E2- und p300-vermittelte Aktivierung

16E6-N erzeugte hier mit keiner der getesteten Konzentrationen, weder alleine noch in Kombination mit 8E2 und p300, einen nennenswerten Effekt (Abb. 35). Das Ergebnis korreliert somit mit einer fehlenden Bindung von 16E6-N an p300.

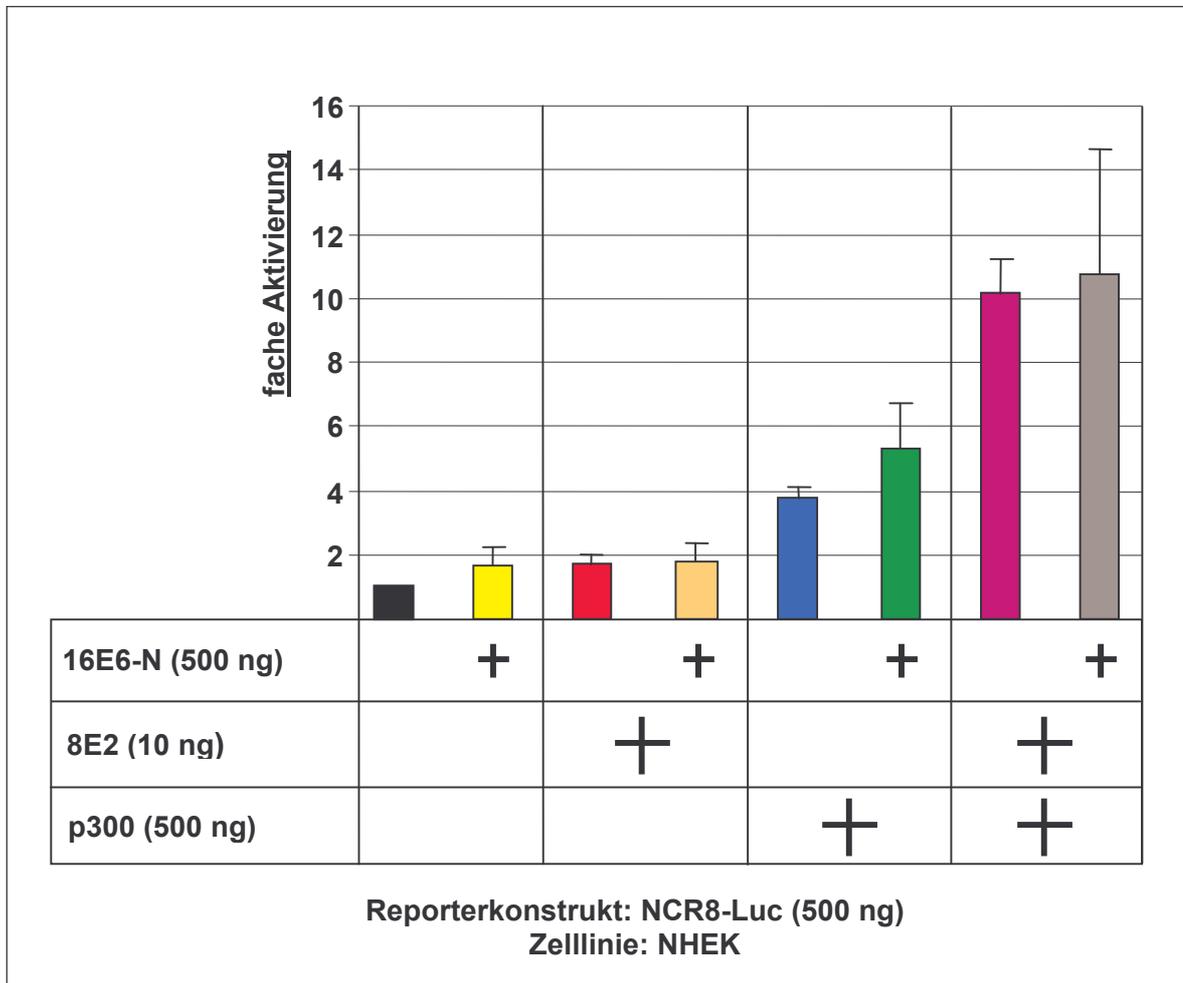


Abb. 35 16E6-N hat keinen Einfluss auf die 8E2- und p300-vermittelte HPV8-Genexpression

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-N wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.16.2 Der C-Terminus von 16E6 reprimierte 8E2- und p300-vermittelte Transkription

Der C-Terminus von 16E6 reprimierte bereits alleine die basale Promotoraktivität sowie die 8E2- und die p300-vermittelte Aktivierung um 50% (Abb. 36). Der Synergismus von 8E2 und p300 (10-fach) wurde durch 16E6-C auf 3-fach gesenkt. Diese Daten zeigen, dass der C-Terminus von 16E6 auch im Fall der 8E2- und p300-vermittelten Transaktivierung für eine Repression ausreicht.

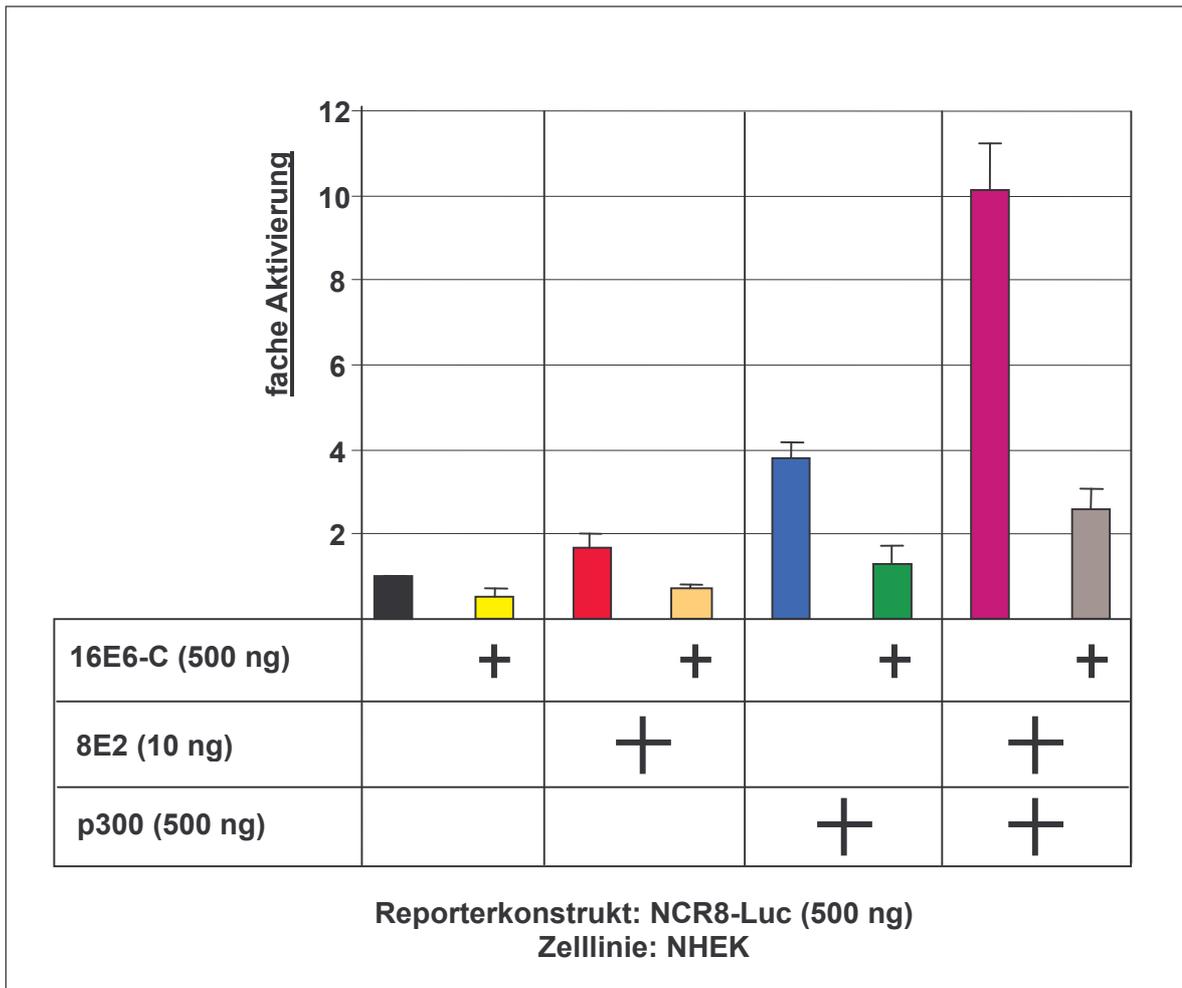


Abb. 36 16E6-C reprimiert die von 8E2 und p300 vermittelte HPV8-Genexpression

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.17 Die Aminosäuren 123-127 von 16E6 sind wichtig für die reprimierende Funktion in 16E6-C

Um die Ursache der reprimierenden Funktion in der C-terminalen Domäne von 16E6 zu identifizieren, wurde zunächst die bereits erwähnte 16E6- Δ 123-127-Deletionsmutante getestet. Die Deletion der As 123-127 schwächt die Interaktion von 16E6 mit p300 deutlich ab (PATEL *et al.*, 1999). *In vitro* translatiertes 16E6-C- Δ 123-127 zeigte hier ebenfalls eine eingeschränkte Affinität zu p300 (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich daher die Frage, ob die Deletion im C-Terminus von 16E6 auch dessen reprimierende Funktion beeinflusst.

Während 16E6- Δ 123-127 vergleichbar zu 16E6 und 16E6-C bereits die basale Promotoraktivität von NCR8-Luc reprimierte, beeinflusste 16E6-C- Δ 123-127 sie kaum

(Abb. 37). Auch die kooperative Aktivierung durch 8E2 und p300 wurde durch 16E6- Δ 123-127 ähnlich wie durch 16E6 reprimiert. 16E6-C- Δ 123-127 senkte die Aktivierung durch 8E2 und p300 zwar ebenfalls, doch war die Repression nicht so ausgeprägt wie mit 16E6-C. Die reprimierende Funktion im C-Terminus wird durch die Deletion der As 123-127 geschwächt, was mit einer geringeren Bindungsaffinität zu p300 korreliert. Die Mutation hat jedoch im vollständigen E6-Protein keine Bedeutung. Dies impliziert, dass auch der N-Terminus unabhängig von einer Bindung zu p300 zur Repression der 8E2- und p300-vermittelten Aktivierung beitragen kann.

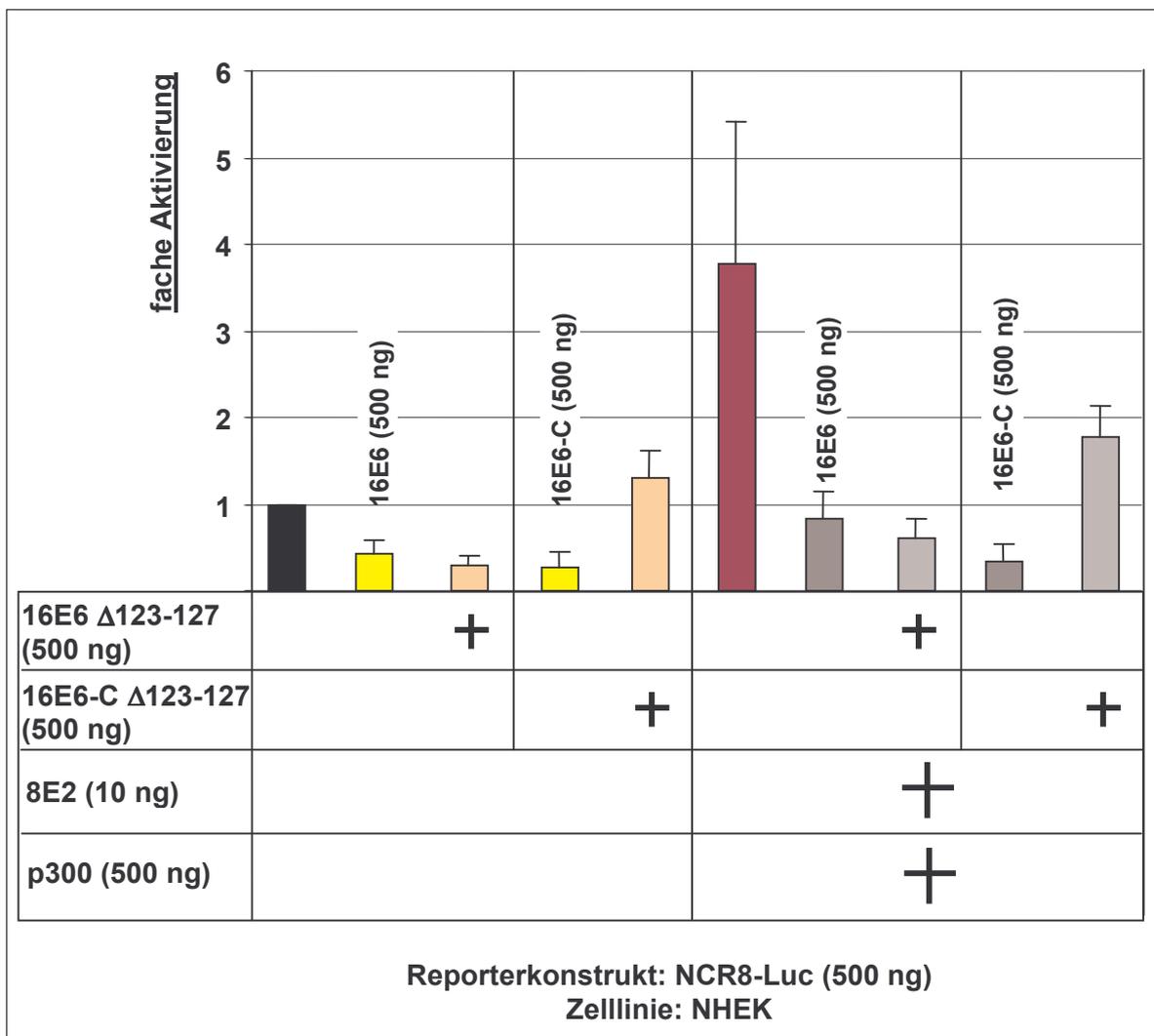


Abb. 37 Die As 123-127 sind wichtig für die reprimierende Funktion in 16E6-C

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-16E6- Δ 123-127 bzw. 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C- Δ 123-127 wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Kontrollen wurden jeweils 500 ng pCDNA-FLAG-16E6 und pCDNA-FLAG-16E6-C verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.18 Das PDZ-Domänen-Bindemotiv von 16E6 ist in der Modulation von Transkription involviert

Die bislang gezeigten Daten deuten darauf hin, dass eine Bindung an p300 für die jeweilige Funktion im C-Terminus der E6-Proteine notwendig ist. Da jedoch beide E6-Proteine dieselben Regionen von p300 erkennen, sollte es in ihrem C-Terminus mindestens eine unterschiedliche Funktion geben, wodurch die jeweiligen Effekte zu erklären sind. Im C-Terminus unterscheiden sich die beiden E6-Proteine in einem wesentlichen Merkmal. 16E6 besitzt an seinem C-terminalen Ende mit den Aminosäuren E-T-Q-L ein PDZ-Domänen-Bindemotiv (Konsensussequenz: X-S/T-X-V/L). Bei 8E6 fehlt ein solches Motiv. Die Bedeutung des PDZ-Bindemotivs von mukösen Hochrisiko-E6-Proteinen wird erst seit kurzem erforscht. Bisherige Daten zeigen, dass verschiedene PDZ-Proteine (hDLG, hScrib, MUPP1 und MAGUKs) über dieses Motiv gebunden und zum Teil in die ubiquitinabhängige Proteolyse geführt werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv zum transformierenden Potential der E6-Proteine beiträgt (KIYONO *et al.*, 1997; GARDIOL *et al.*, 1999; NAKAGAWA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2000b; THOMAS *et al.*, 2002). Ein Einfluss dieses Motivs auf die Modulation von Transkription wurde bislang noch nicht untersucht.

4.18.1 Bindung von 16E6-C -ETQL an p300

Um eine potentielle Rolle des PDZ-Bindemotivs von 16E6 bei der Modulation der Transkription zu klären, wurde zunächst eine C-terminal um vier Aminosäuren verkürzte Deletionsmutante (-ETQL) von 16E6-C hergestellt. ZIMMERMANN *et al.* konnten zeigen, dass diese Deletion keinen Einfluss auf die Bindung zur C/H3-Domäne von CBP hat. *In vitro* translatiertes 16E6-C -ETQL interagiert auch hier genau wie 16E6-C (vgl. Kapitel 4.15) mit den GST-p300-Fragmenten 4, 5, 4A und 4B (3 - 6) (Abb. 38). Die Deletion der ETQL-Domäne von 16E6 beeinflusst daher die Bindung an p300 nicht.

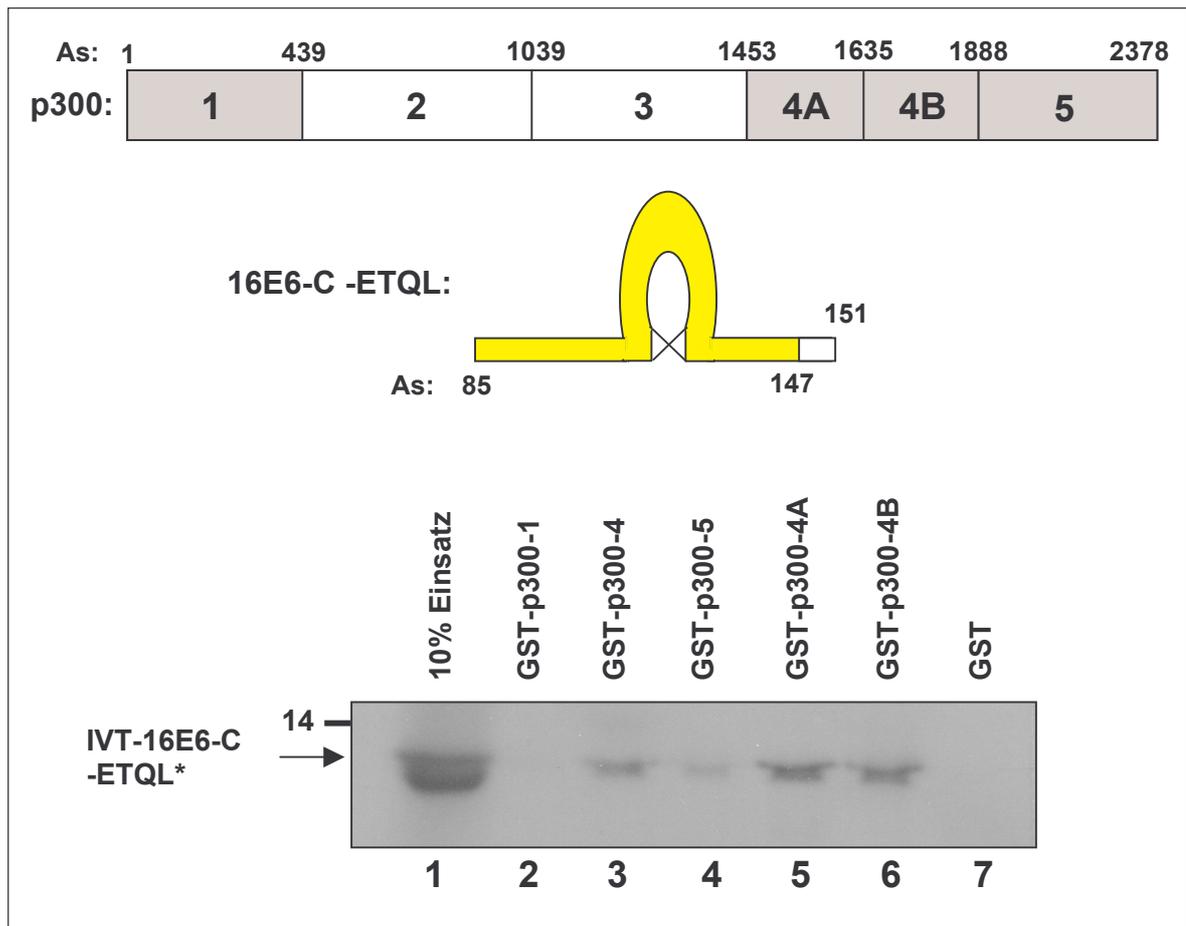


Abb. 38 16E6-C -ETQL bindet an p300

Interaktionsstudie. 2 µg der GST-p300 Fragmente 1, 4, 5, 4A und 4B sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 16E6-C-ETQL inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen (Spur 2-7). 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind in Spur 1 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Der obere Teil zeigt schematische Darstellungen der eingesetzten Proteine.

4.18.2 Die PDZ-Bindedomäne von 16E6 vermittelt Repression

Anschließend wurde die Auswirkung der Deletion des ETQL-Motivs auf die Kooperation von 8E2 und p300 untersucht (Abb. 39). Während 16E6-C auch in diesen Ansätzen sowohl alleine als auch in Kombination mit 8E2 und p300 effektiv die Transkription reprimierte, zeigte hingegen 16E6-C -ETQL keine Repression mehr. Die 8E2-vermittelte Aktivierung und der Synergismus von 8E2 und p300 wurden nur wenig beeinflusst, während die p300-vermittelte Aktivierung leicht von 3-fach auf 4,5-fach gesteigert wurde.

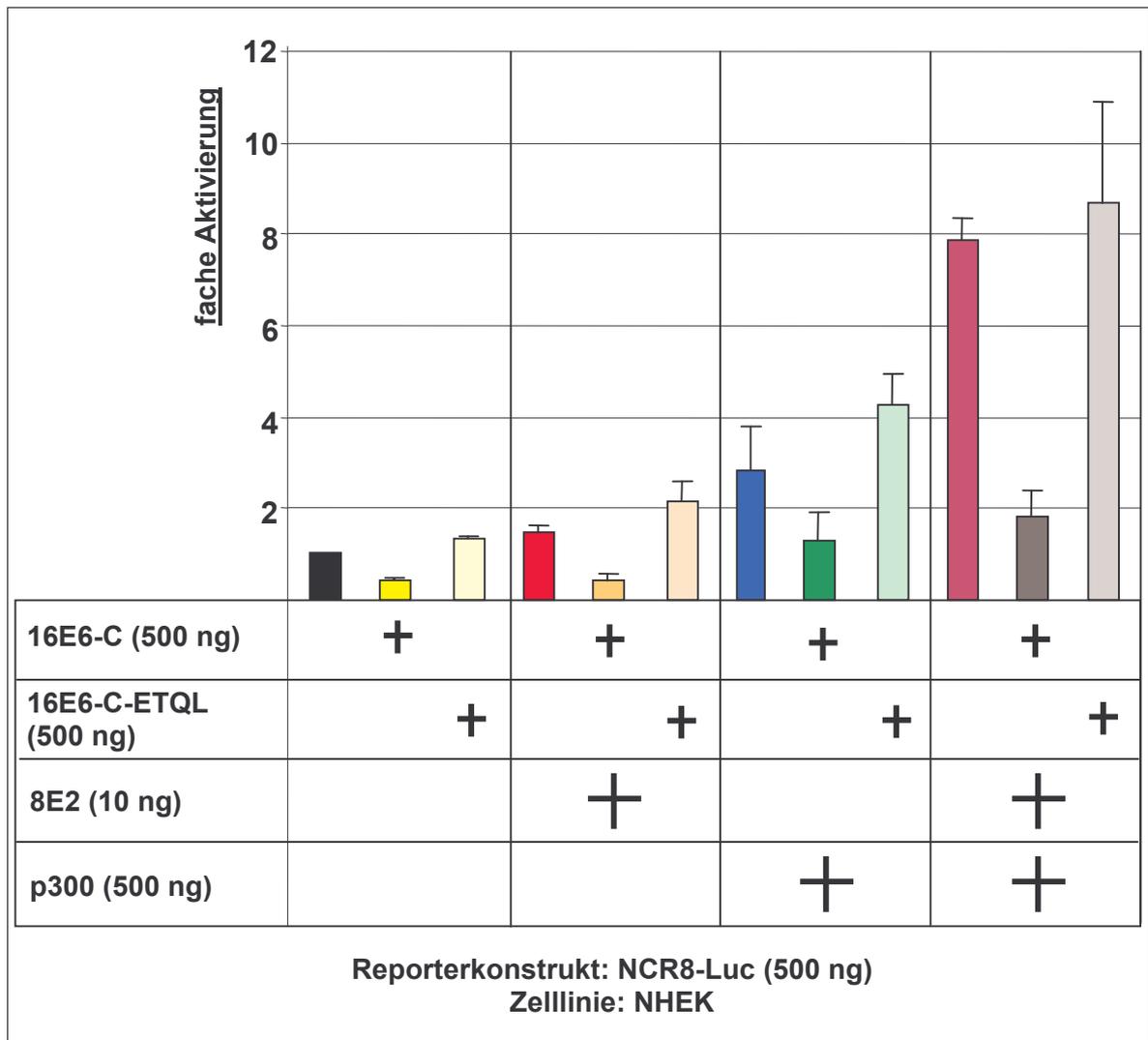


Abb. 39 Das ETQL-Motiv von 16E6 reprimiert 8E2- und p300-vermittelte Transkription

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C-ETQL wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Kontrolle wurden 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Diese Daten demonstrieren, dass bei der Repression der 8E2- und p300-vermittelten Genexpression durch den C-Terminus von 16E6 das PDZ-Bindemotiv eine wichtige Rolle spielt. Eine Deletion dieses Motivs hat keinen Einfluss auf die Bindung an p300, hebt aber die Repression durch 16E6-C auf.

4.19 Die PDZ-Bindedomäne kann die aktivierende Funktion von 8E6-C inhibieren

Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Fusion der PDZ-Bindedomäne von 18E6 an den C-Terminus von E6-Proteinen, die nicht über solch ein Motiv verfügen, diese ebenfalls zur Bindung von PDZ-Proteinen befähigen. Für eine entsprechende 8E6-Chimäre wurde eine Interaktion mit hDlg und MAGI-1 gezeigt. Darüber hinaus war 8E6 mit dieser Domäne imstande hDlg *in vivo* leicht zu degradieren (PIM *et al.*, 2002).

Um zu überprüfen, ob das PDZ-Bindemotiv von 16E6 für die Repression ausreichend ist, wurde das ETQL-Motiv von 16E6 an den C-Terminus von 8E6-C fusioniert, das sich zuvor als starker Aktivator der HPV8-Genexpression erwiesen hatte (vgl. Kapitel 4.13.2).

4.19.1 Bindung von 8E6-C +ETQL an p300

Auch hier wurde zunächst das Bindeverhalten von 8E6-C +ETQL an p300 überprüft (Abb. 40). 8E6-C +ETQL zeigte kein anderes Bindemuster und interagierte wie 8E6-C hauptsächlich mit GST-p300-4B (6) (vgl. Kapitel 4.12).

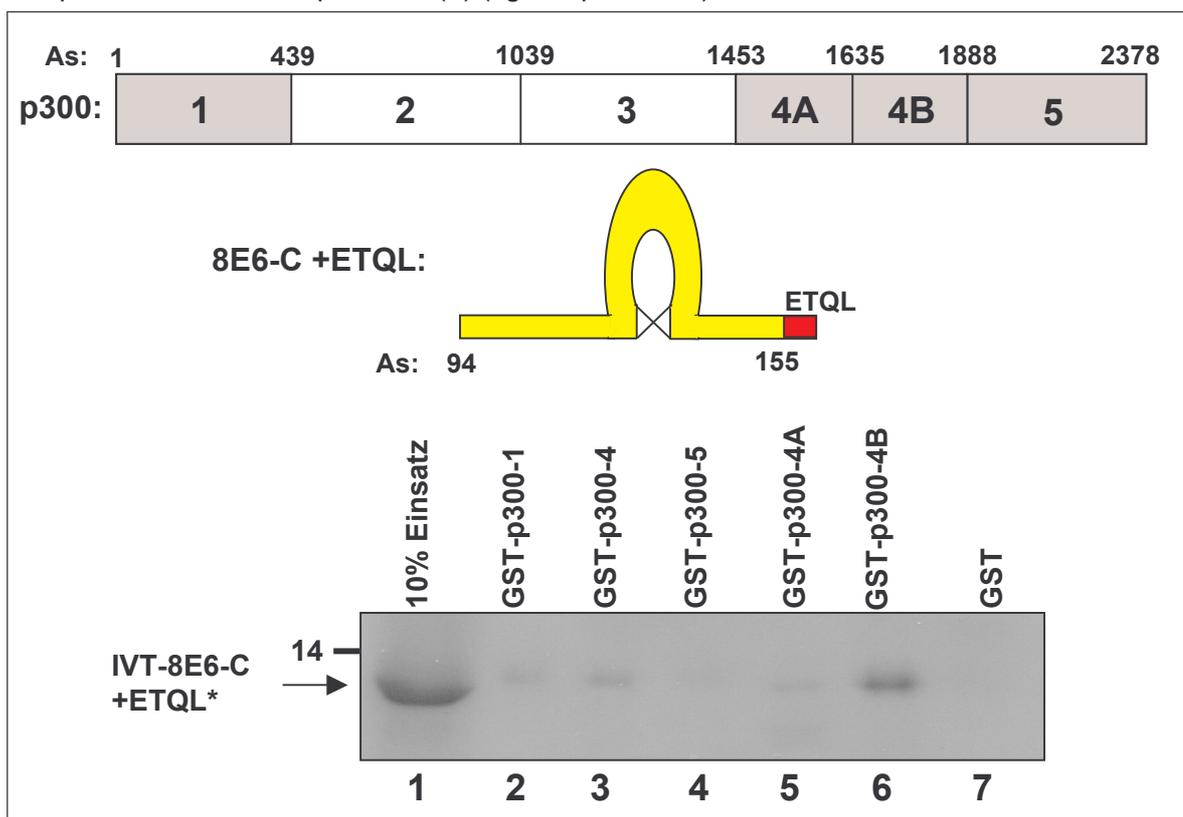


Abb. 40 8E6-C +ETQL bindet an p300

Interaktionsstudie. 2 µg der GST-p300 Fragmente 1, 4, 5, 4A und 4B sowie GST wurden über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mit 10 µl in Retikulozytenlysat *in vitro* translatiertem und ³⁵S-markiertem 8E6-C +ETQL inkubiert und anschließend viermal mit 100 mM LSDB gewaschen (Spur 2 - 7). 10% des eingesetzten *in vitro*-Translationsproduktes sind in Spur 1 gezeigt. Die gebundenen Proteine wurden über ein 15%-PAG aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert. Der obere Teil zeigt schematische Darstellungen der eingesetzten Proteine.

4.19.2 Aktivierung der Transkription durch 8E6-C wird nach dessen Fusion mit einem PDZ-Bindemotiv inhibiert

8E6-C +ETQL war im Gegensatz zur Positivkontrolle 8E6-C in keiner der hier getesteten Konzentrationen in der Lage die Genexpression zu aktivieren (Abb. 41). Ebenso kam es durch 8E6-C +ETQL zu keiner nennenswerten Beeinflussung der 8E2- und der p300-vermittelten Stimulation. Die PDZ-Bindedomäne reichte somit aus, um die Aktivierung der Transkription durch 8E6-C zu inhibieren.

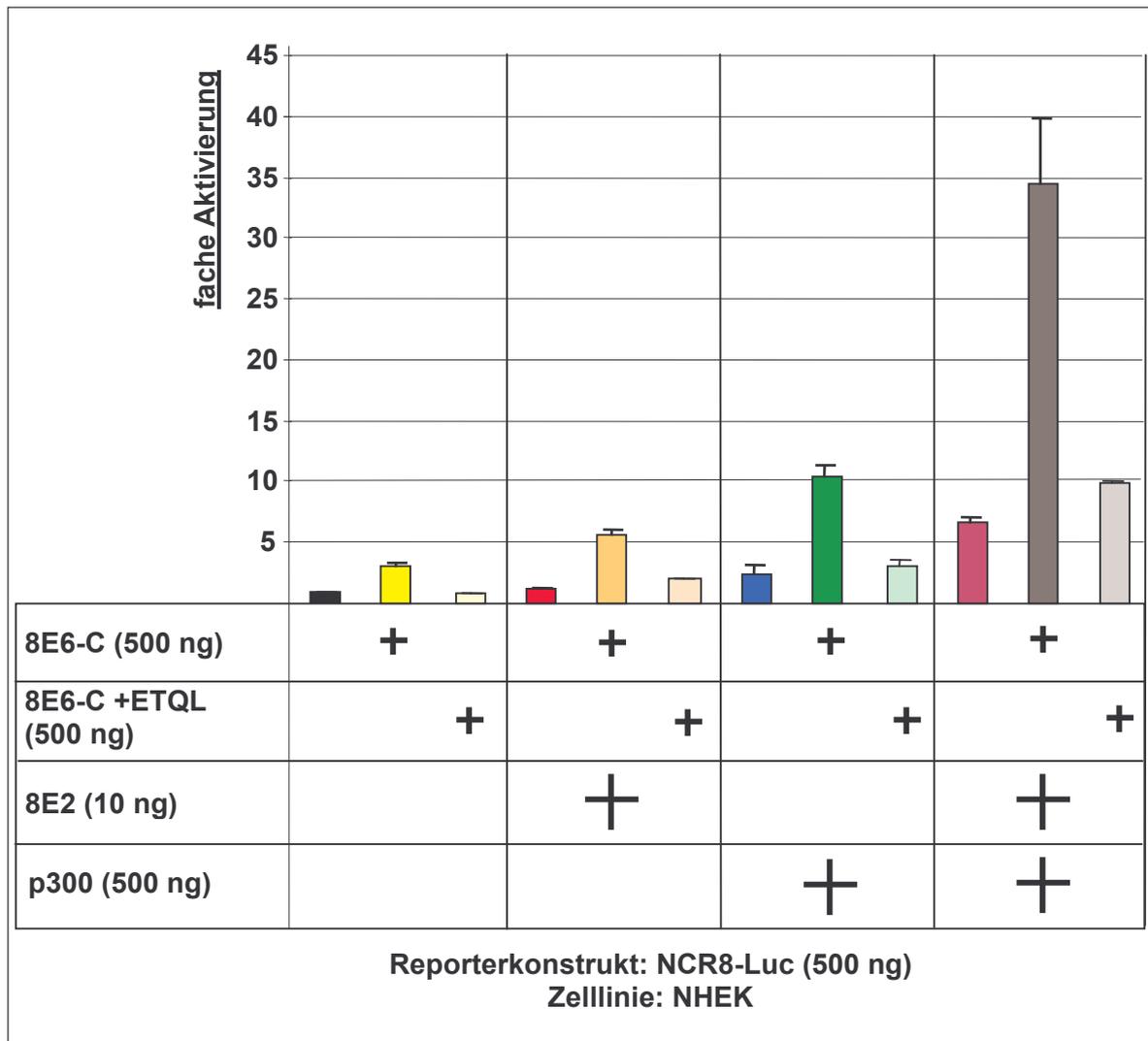


Abb. 41 Die ETQL-Domäne von 16E6 reprimiert Aktivierung durch 8E6-C

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-8E6-C +ETQL wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Positivkontrolle wurden 500 ng pCDNA-FLAG-8E6-C verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.20 Der N-Terminus von 16E6 enthält eine vom PDZ-Bindemotiv unabhängige reprimierende Funktion

Bisher wurde der Einfluss der PDZ-Bindedomäne nur mit dem C-Terminus von 16E6 getestet. Dies lässt noch keine Rückschlüsse auf ihre Funktion im vollständigen 16E6 zu. Mit E6-AP, E6-BP, AMF-1/Gps2 und p53 sind Proteine beschrieben, für deren Bindung sowohl Aminosäuren im N- als auch im C-Terminus von 16E6 benötigt werden (LIU *et al.*, 1999; DEGENHARDT und SILVERSTEIN, 2001). Die Gesamtstruktur von E6 ist also bedeutend für viele Protein-Protein-Interaktionen und somit auch für wichtige Funktionen. Daher wurde eine C-terminal um vier Aminosäuren verkürzte Deletionsmutante von 16E6 (16E6 -ETQL) hergestellt und ebenfalls in Transfektionsanalysen untersucht (Abb. 42).

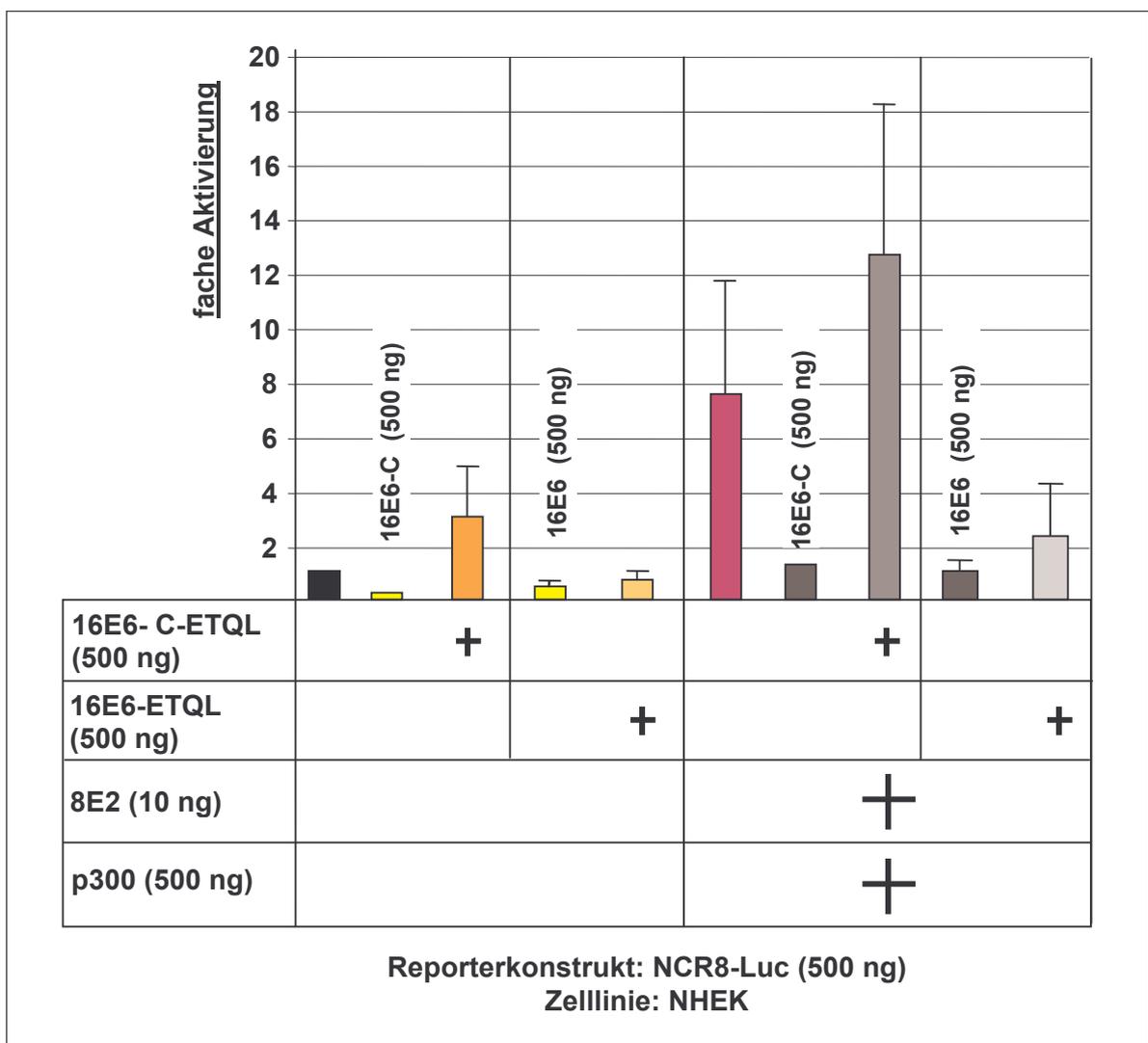


Abb. 42 Der N-Terminus von 16E6 enthält eine reprimierende Funktion

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C -ETQL bzw. 500 ng pCDNA-FLAG-16E6 -ETQL wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Kontrollen wurden jeweils 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C und pCDNA-FLAG-16E6 verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Im Gegensatz zu 16E6-C -ETQL reprimierte 16E6 -ETQL in diesen Ansätzen die Transkription. Die basale Genexpression wurde zwar nur wenig beeinflusst, aber die 8E2- und p300-vermittelte Aktivierung wurde von 7,5-fach auf knapp 2-fach reduziert. Dies impliziert, dass auch im N-Terminus eine reprimierende Funktion vorhanden ist, die erst in Gegenwart des C-Terminus wirkt und unabhängig von dem PDZ-Bindemotiv ist.

4.21 Die reprimierenden Funktionen von 16E6 wirken auch auf die 16E2-vermittelte Genexpression der 16LCR

Um sicherzustellen, dass die beobachteten reprimierenden Funktionen von 16E6 nicht auf die Promotorsituation der 8NCR bzw. auf das 8E2-Protein zurückzuführen sind, wurden entsprechende Transfektionsanalysen mit dem Reporterkonstrukt 16LCRE7-Luc und 16E2 wiederholt. Mittlerweile konnte eine Bindung von 16E2 an p300 über die Fragmente p300-1, p300-4 und p300-5 gezeigt werden (KRÜPPEL, pers. Mitteilung). Das 16LCR-Reporterkonstrukt beinhaltet die komplette HPV16-LCR von Position 6150 bis 885. Somit ist auch der späte Promotor in Position 670 enthalten. In Vorversuchen konnte auch mit diesem Konstrukt eine synergistische Aktivierung durch 16E2 und p300 beobachtet werden. Ebenso konnte 8E6 auch diesen Synergismus zusätzlich stimulieren, während es mit 16E6 zu einer Repression kam (Daten nicht gezeigt).

Die Effekte mit den C-terminalen Deletionsmutanten von 16E6 und 16E6-C waren vergleichbar zu den Transfektionen mit NCR8-Luc und 8E2 (Abb. 43). 16E6-C -ETQL hatte alleine kaum Einfluss auf die basale Promotoraktivierung. Während die 16E2-vermittelte Aktivierung leicht gehemmt wurde, konnte 16E6-C -ETQL die Stimulation der Genexpression durch p300 von 4-fach auf 8-fach verdoppeln. Die synergistische Aktivierung durch 16E2 und p300 wurde wiederum nicht beeinflusst. 16E6 -ETQL reprimierte sowohl die basale Promotoraktivität als auch die Aktivierung durch 16E2 und p300. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die beobachteten Effekte der 16E6-Derivate nicht spezifisch für die 8NCR oder für 8E2 sind.

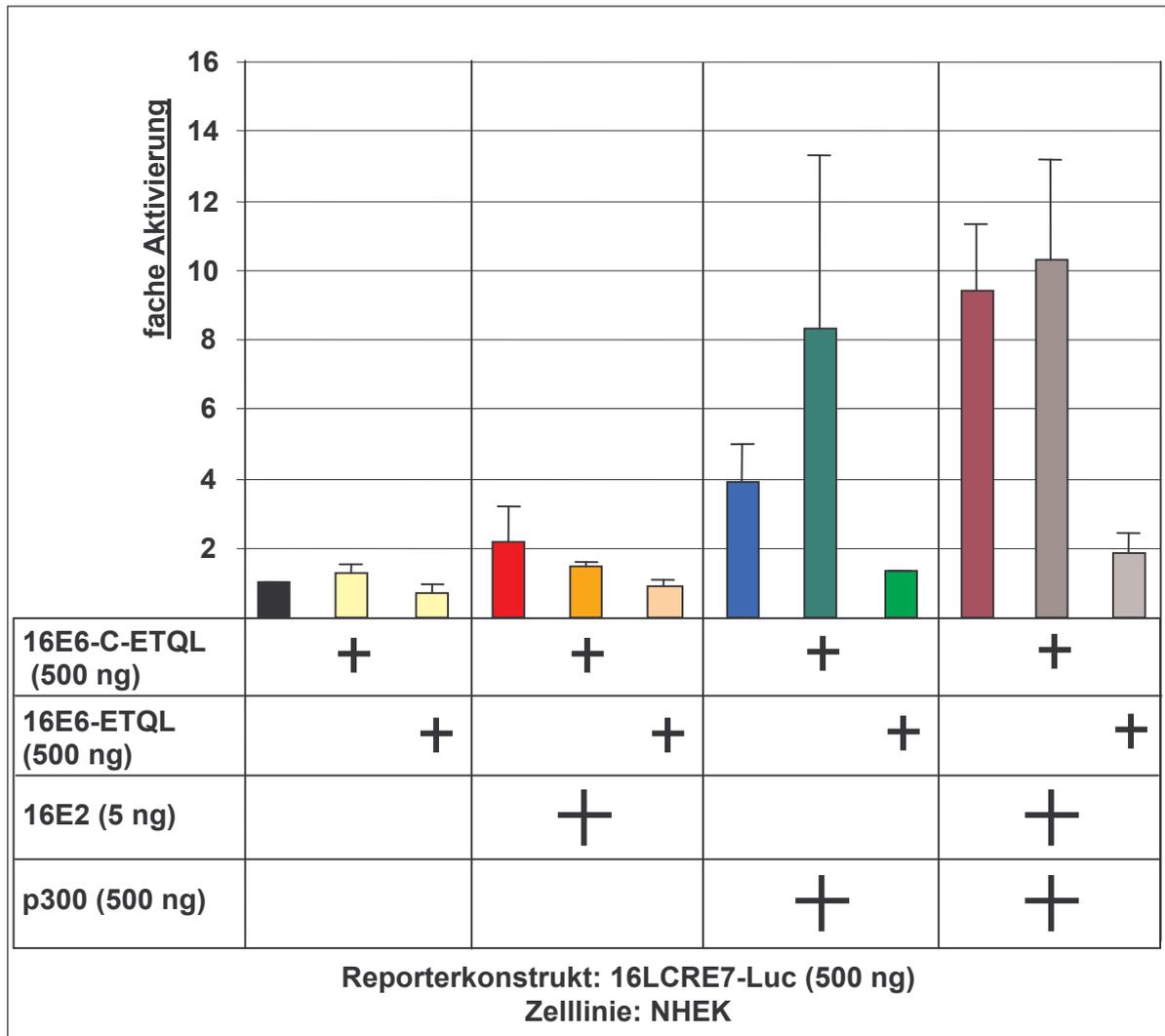


Abb. 43 16E6 -ETQL reprimiert auch die 16E2- und p300-vermittelte Aktivierung der 16LCR
 Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt 16LCRE7-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 5 ng pCMV-16E2 sowie 500 ng pCDNA-FLAG-16E6-C-ETQL bzw. 500 ng pCDNA-FLAG-16E6 -ETQL wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.22 Die reprimierende Funktion im N-Terminus von 16E6 ist unabhängig von E6-AP-Bindung

Die reprimierende Domäne im N-Terminus von 16E6 benötigt für ihre Funktion den C-terminalen Anteil von E6. Die Ubiquitin-Ligase E6-AP bindet an den N-Terminus. Über Bildung eines trimeren Komplexes mit p53, wird p53 in die ubiquitinabhängige Proteolyse geführt (SCHEFFNER *et al.*, 1993). Für diesen Prozess sind auch Aminosäuren im C-terminalen Bereich wichtig (NAKAGAWA *et al.*, 1995). Durch Proteolyse von p53 kann E6-AP somit auch p53-abhängige Transkriptionsprozesse indirekt beeinflussen. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine 16E6-Mutante, die nicht mehr E6-AP bindet (16E6-L50G),

weiterhin p53-vermittelte Aktivierung reprimieren kann (ZIMMERMANN *et al.*, 1999). Um zu testen, ob für die Repression der 8E2-vermittelten Aktivierung durch den N-Terminus von 16E6 eine Bindung von E6-AP benötigt wird, wurde eine entsprechende Punktmutation in 16E6 -ETQL eingeführt (16E6L50G -ETQL).

In transienten Transfektionsanalysen (Abb. 44) zeigte sich, dass auch 16E6L50G -ETQL die Genexpression des Reporters NCR8-Luc alleine und auch den Synergismus von 8E2 und p300 reprimierte, so dass die Bindung von E6-AP für die reprimierende Funktion im N-Terminus im Fall der 8E2-vermittelten Aktivierung wohl keine Rolle spielt.

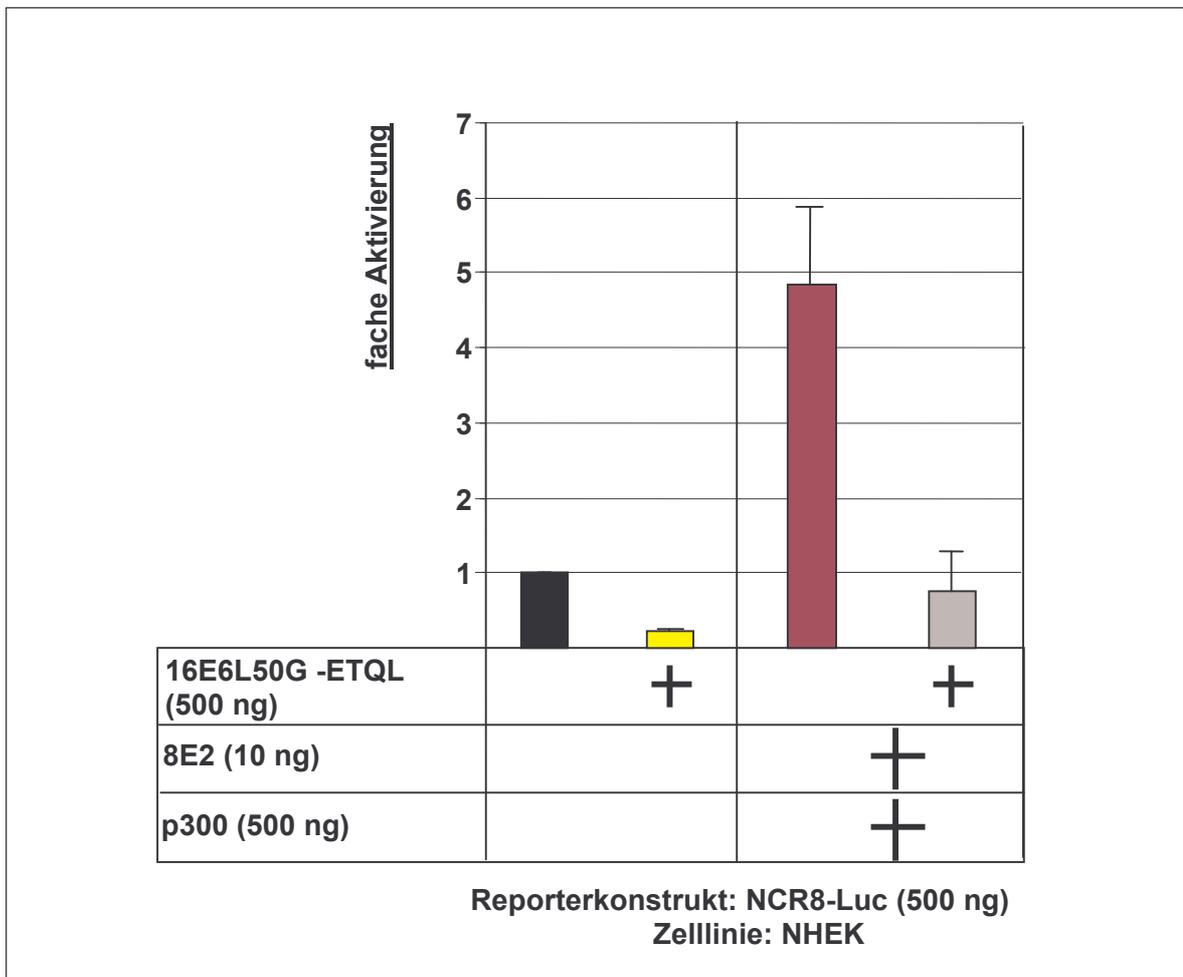


Abb. 44 Repression über den N-Terminus von 16 E6 ist unabhängig von E6-AP-Bindung
 Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 sowie 500 ng pCDNA-FLAG-16E6L50G -ETQL wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.23 Die reprimierende Funktion im N-Terminus von 16E6 ist in 8E6 nicht vorhanden

Die N-Termini von 8E6 und 16E6 sind zu ca. 20% konserviert. Um die reprimierende Funktion des N-Terminus zu bestätigen, wurden E6-Hybridproteine hergestellt. Hierfür wurde der N-Terminus von 8E6 (As 1-93) mit dem C-Terminus von 16E6 (As 84-151) oder mit 16E6-C -ETQL (As 84-147) fusioniert sowie der N-Terminus von 16E6 (As 1-83) mit dem C-Terminus von 8E6 (As 94-155) (Abb. 45).

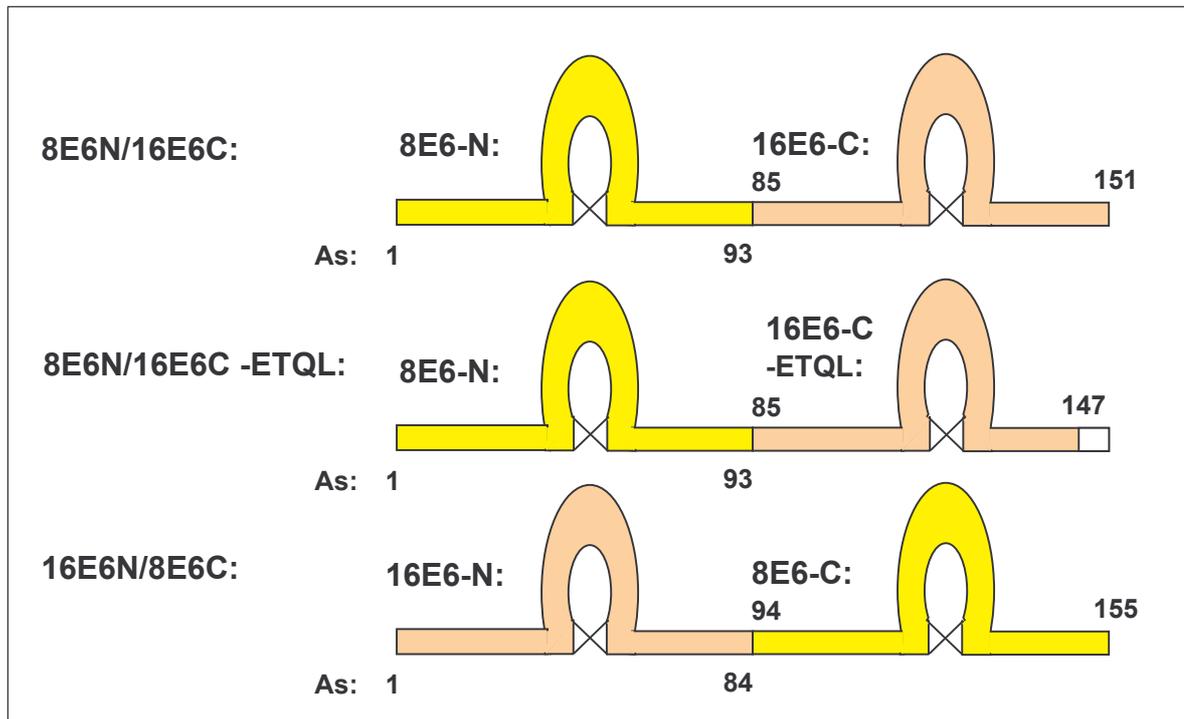


Abb. 45 Schematische Darstellung der E6-Hybridproteine

Die Rolle der Chimären wurde in Transfektionsanalysen zusammen mit 8E2, p300 und dem Reporterkonstrukt NCR8-Luc in NHEK-Zellen getestet. Als Kontrollen wurden jeweils 500 ng Expressionsvektoren für 16E6 und 16E6-C bzw. 8E6 und 8E6-C eingesetzt. Sowohl 8E6N/16E6C als auch 8E6N/16E6C -ETQL beeinflussten die basale Promotoraktivität alleine nur wenig (Abb. 46). Die Aktivierung durch 8E2 und p300 wurde von 8E6N/16E6C leicht reprimiert. 8E6N/16E6C -ETQL zeigte hingegen keinen Effekt. Dies bedeutet, dass 8E6-N im Gegensatz zu 16E6-N keine reprimierende Funktion in Gegenwart des C-Terminus von 16E6 besitzt und darüber hinaus den inhibitorischen Einfluss im C-Terminus von 16E6 abschwächt.

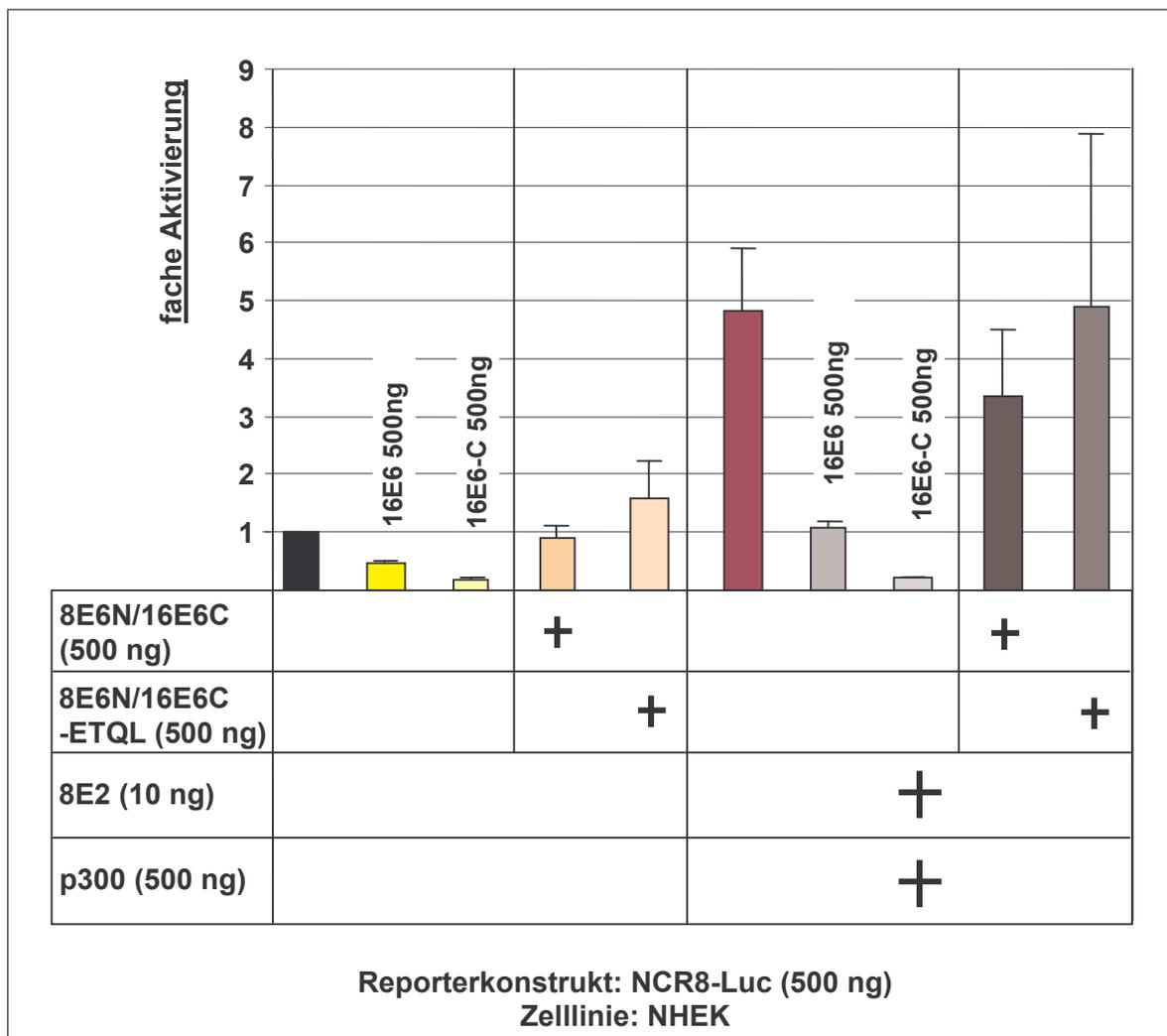


Abb. 46 Die reprimierende Funktion im N-Terminus von 16E6 ist bei 8E6-N nicht konserviert
 Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-8E6N/16E6C bzw. pCDNA-FLAG-8E6N/16E6C -ETQL wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Kontrollen wurden jeweils 500 ng pCDNA-FLAG-16E6 und pCDNA-FLAG-16E6-C verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

Im umgekehrten Fall hob die Fusion von 16E6-N an 8E6-C die aktivierende Funktion von 8E6-C auf (Abb. 47). Im Vergleich zu 8E6 und 8E6-C konnte 16E6N/8E6C die Reporter-gen-Aktivierung alleine nicht mehr erhöhen und die Genexpression durch 8E2 und p300 nicht weiter stimulieren.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die reprimierende Funktion im N-Terminus unter den E6-Proteinen nicht konserviert ist.

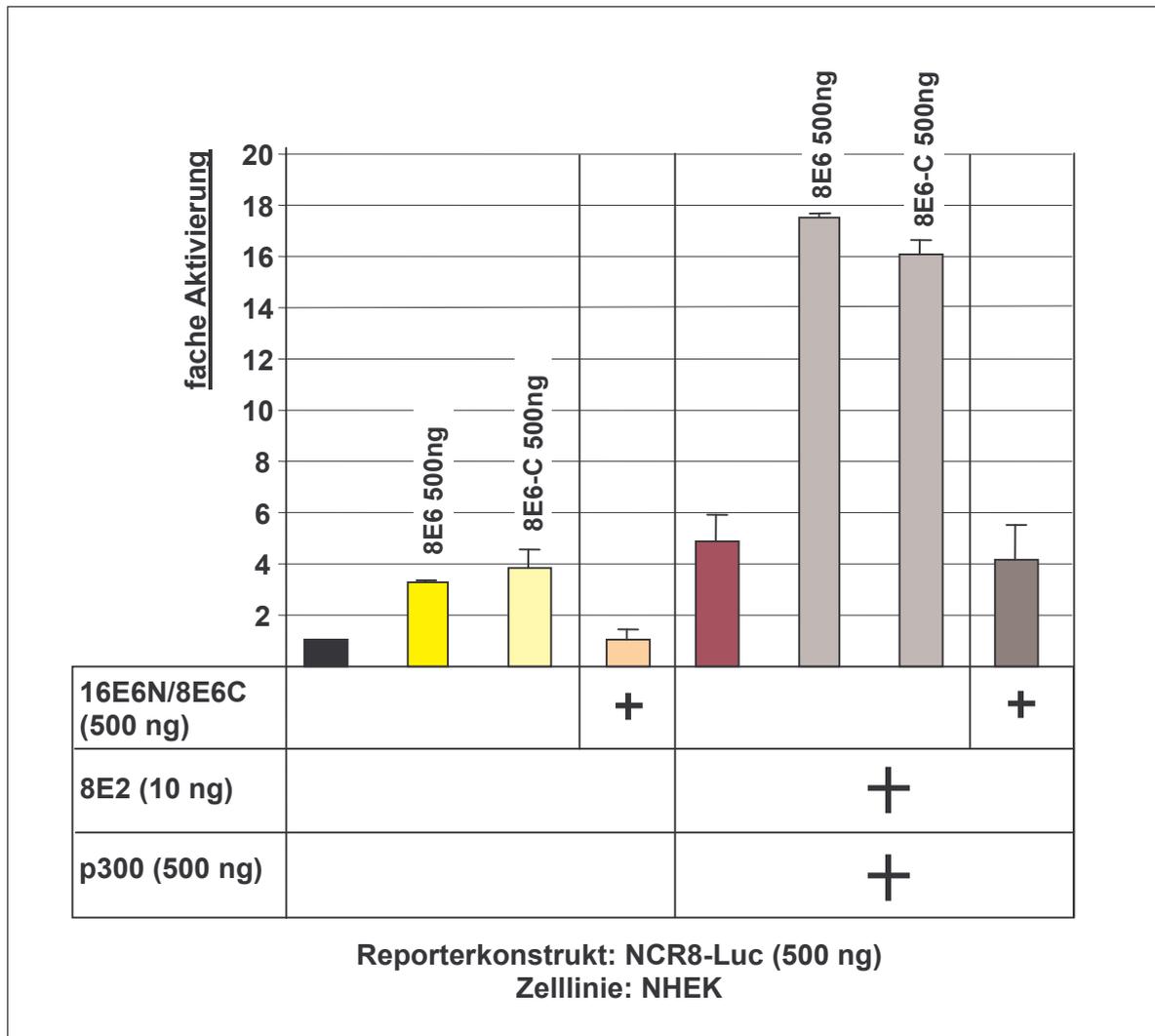


Abb. 47 16E6N reprimiert Aktivierung über 8E6-C

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt NCR8-Luc (500 ng) wurde zusammen mit 500 ng pCMV β -p300HA, 10 ng pCB6-8E2 und 500 ng pCDNA-FLAG-16E6N/8E6C wie angegeben in NHEK kotransfiziert. Als Kontrollen wurden jeweils 500 ng pCDNA-FLAG-8E6 und pCDNA-FLAG-8E6-C verwendet. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

4.24 16E6-C reprimiert nicht die p53-vermittelte Aktivierung

Wie bereits erwähnt, konnten ZIMMERMANN *et al.* zeigen, dass der C-Terminus von 16E6 ausreicht, um p53-vermittelte Aktivierung eines p53-responsiven Promotors zu reprimieren. Ob das PDZ-Bindemotiv dabei eine Rolle spielt, wurde nicht untersucht. Um dies zu testen, wurden transiente Transfektionen mit einem Reporterkonstrukt, das eine p53-Bindestelle vor dem basalen Promotor des hsp70-Gens enthält, durchgeführt (Abb. 48).

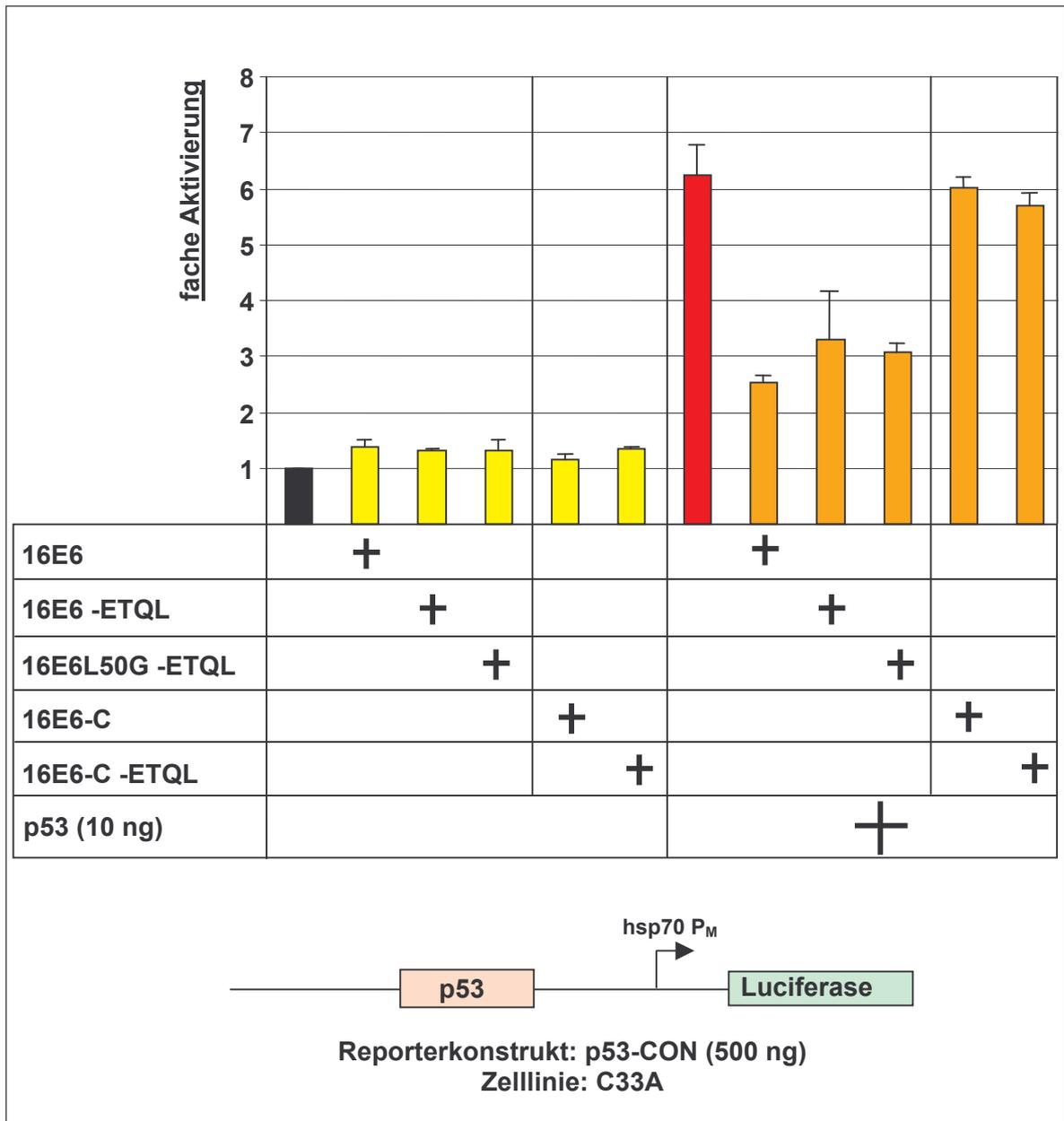


Abb. 48 16E6-C ist nicht an der Repression der p53-vermittelte Aktivierung beteiligt

Transiente Transfektionsanalysen. Das Reporterkonstrukt p53-CON (500 ng), das den basalen Promotor des hsp70-Gens und eine p53-Bindestelle enthält, wurde zusammen mit 10 ng pCp53-wt sowie jeweils 500 ng pCDNA-FLAG-16E6, -16E6 -ETQL, -16E6L50G -ETQL, -16E6-C und -16E6-C -ETQL wie angegeben in C33A kotransfiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen sind angezeigt.

10 ng des p53-Expressionsvektors aktivierten den Promotor 6-fach. Die getesteten E6-Proteine hatten alleine keinen nennenswerten Einfluss auf die basale Promotoraktivität. Die p53-vermittelte Aktivierung wurde von 16E6-wt, 16E6 -ETQL und 16E6L50G -ETQL um etwa 50% reduziert. 16E6-C und 16E6-C -ETQL zeigte hier hingegen beide keinen inhibitorischen Effekt. Dies deutet darauf hin, dass der C-Terminus von 16E6 in diesem System, weder über die von ZIMMERMANN *et al.* postulierte kompetitive Bindung mit p53 an p300 noch über das PDZ-Bindemotiv eine reprimierende Funktion ausübt.

5. Diskussion

Die zellulären Koaktivatoren p300 und CBP spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Sie sind integrale Bestandteile des RNA-Polymerase II-Holoenzym und darüber hinaus in der Lage Chromatin zu modulieren, um reprimierende Effekte durch Nukleosomenstrukturen aufzuheben. Über Interaktionen mit einer Reihe von zellulären Transkriptionsaktivatoren sind sie an wichtigen Signalprozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass p300 auch von HPV8 benötigt wird, um die virale Genexpression zu regulieren. Mit E2 und E6 sind mindestens zwei Proteine von HPV8 imstande mit p300 zu interagieren und die Aktivierung der viralen Genexpression zu stimulieren. Innerhalb der PV-Familie scheint jedoch die Funktion des E6-Proteins bezüglich der Modulation der viralen Promotoraktivität unterschiedlich zu sein, da im Fall von 16E6 eine starke Repression der E2- und p300-vermittelten Aktivierung beobachtet werden konnte.

In meiner Diplomarbeit durchgeführte Transfektionsstudien zur funktionellen Wechselwirkung zwischen 8E2 und p300 bezogen sich auf ein synthetisches Reporterkonstrukt mit vier E2- und zwei Sp1-Bindestellen. Durch Überexpression von p300 konnte die E2-vermittelte Transaktivierung um den Faktor 1,5 gesteigert werden (MÜLLER, 1999). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist der Synergismus von 8E2 und p300 in der natürlichen Promotorumgebung von HPV8 wesentlich stärker. Die Aktivierung durch 8E2 konnte mit zusätzlich überexprimiertem p300 um den Faktor sieben stimuliert werden. Anders als beim Reporter CMV-Luc konnte p300 bereits alleine die HPV8-Genexpression aktivieren. Dies impliziert, dass auch bestimmte zelluläre, an die NCR von HPV8 bindende Faktoren p300 zur Aktivierung der HPV8-Genexpression rekrutieren. Die NCR von HPV8 enthält eine Reihe von Bindestellen für zelluläre Transaktivatoren wie AP-1, NF-1, YY1, RUNX-1/AML-1 und p53 (MAY *et al.*, 1991; PAJUNK *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1997; AKGÜL, 2002), von denen einige ebenfalls p300 binden und als Koaktivator verwenden (LEE *et al.*, 1996; KITABAYASHI *et al.*, 1998; LILL *et al.*, 1997). Es ist daher vorstellbar, dass einer oder mehrere dieser Faktoren zusammen mit 8E2 einen p300-abhängigen Verstärker-Komplex bilden. Hierbei könnten die DNA-Bindungen bzw. Protein-Protein-Interaktionen dieser Proteine über p300 am Zielpromotor stabilisiert werden, so dass die Transkription effizienter eingeleitet wird. Solche p300-assoziierten Verstärker-Komplexe wurden schon mehrfach beschrieben und ein derartiges Modell wird aktuell auch für die Aktivierung der frühen HPV18-Genexpression diskutiert (MINK *et al.*, 1997; BARTHEL *et al.*, 2003; BOUALLAGA *et al.*, 2003).

Früher wurde bereits gezeigt, dass die E2-vermittelte Aktivierung der HPV8-Genexpression hauptsächlich den späten Promotor in Position 7535 betrifft, der von 8E2 dosisabhängig reguliert wird. Hohe E2-Mengen reprimieren den Promotor über die Bindung von E2 an die niedrigaffine P2-Bindestelle (STUBENRAUCH *et al.*, 1996). Auch die Kooperation von 8E2 und p300 wird bei höheren E2-Mengen schwächer, bis die Aktivität mit der höchsten hier eingesetzten E2-Konzentration fast ganz reprimiert wird. Bei dieser Beobachtung handelt es sich nicht um einen „Squelching“-Effekt. Hierbei würden hohe E2-Mengen limitiert vorhandene zelluläre Faktoren für die Aktivierung der Transkription austitrieren und somit zu einer geringeren Transkriptionsaktivität führen. Dieser Effekt wurde bereits bei anderen Transkriptionsfaktoren beobachtet (GILL und PTASHNE, 1988). Da jedoch die DNA-bindungsdefekte 8E2-mt429-Mutante selbst in den höchsten hier getesteten Mengen keinen reprimierenden Effekt zeigte, ist es naheliegend, dass die Repression über die Bindung von 8E2 an P2 vermittelt wird und somit auch der Synergismus von 8E2 und p300 den späten Promotor von HPV8 betrifft. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass eine Mutation der P2-Bindestelle zu einer Erhöhung der Aktivität durch 8E2 und der Kooperation von 8E2 und p300 führte.

Mit allen getesteten 8NCR-Konstrukten, in denen die P2-Bindestelle mutiert war, zeigte p300 alleine eine etwas geringere Aktivierung der basalen Promotoraktivität. Dies könnte darin begründet sein, dass durch die Mutation der P2-Bindestelle auch die Erkennungssequenz von RUNX-1/AML-1 betroffen ist. Dieser für die Basalaktivität des späten Promotors wichtige Faktor bindet ebenfalls an p300 (KITABAYASHI *et al.*, 1998) und könnte daher ein integraler Bestandteil eines p300-abhängigen Verstärker-Komplexes für die HPV8-Genexpression sein.

Die Mutationsanalyse der E2-Bindestellen innerhalb der 8NCR ergab, dass P0 und P1, die maßgeblich an der Aktivierung durch E2 alleine beteiligt sind (STUBENRAUCH *et al.*, 1994), auch für den Synergismus mit p300 benötigt werden, während die P3- und die P4-Erkennungssequenz nur eine untergeordnete Rolle spielen. Dies impliziert, dass bereits für die moderate Aktivierung durch E2 alleine endogenes p300 von Bedeutung ist.

Die Genexpression eines NCR8-Konstruktes, in dem alle bekannten E2-Bindestellen mutiert waren, konnte immer noch von 8E2 alleine und in Kooperation mit p300 aktiviert werden. Hierfür waren weder eine restliche DNA-Bindung von 8E2 noch bislang nicht identifizierte Erkennungssequenzen verantwortlich, da eine Punktmutante von 8E2, die nicht mehr an DNA binden kann, vergleichbare Effekte aufwies. Dies impliziert, dass 8E2 auch über Protein-Protein-Interaktionen an den Promotor rekrutiert werden kann. Hierfür kommen neben p300 auch andere DNA-bindende Aktivatorproteine in Frage, die

Bindestellen innerhalb der 8NCR besitzen und zusätzlich mit 8E2 interagieren, wie zum Beispiel YY1 (PAJUNK *et al.*, 1997; ADAM, 2001).

Da 8E2 und überexprimiertes p300 kooperieren, scheint die Menge an endogenem p300 ein limitierender Faktor für die Aktivierung durch 8E2 in den hier verwendeten Keratinozyten zu sein. In der Tat wird vermutet, dass p300 unter physiologischen Bedingungen nur in begrenzten Mengen vorhanden ist (YAO *et al.*, 1998b). Da p300 in sehr vielen, teilweise auch antagonistischen Signalwegen involviert ist, wird angenommen, dass viele Transaktivatoren um einen begrenzten „Pool“ von p300 kompetieren und dadurch physiologische Prozesse reguliert werden (CHAN und THANGUE, 2001). PV E2-Proteine könnten daher zusätzlich in dieses empfindliche System eingreifen und p300-abhängige zelluläre Prozesse zu Gunsten des Virus beeinflussen.

8E2 könnte über die DNA-unabhängige Bindung an p300 außerdem in der Lage sein spezifisch zelluläre, über p300 regulierte Promotoren zu erreichen, um dort die Genexpression der Zielgene zu beeinflussen. Die von E6 und E7 gestörte Zellzykluskontrolle könnte über diesen Weg wiederhergestellt werden, indem 8E2 zum Beispiel die p300-abhängigen Differenzierungsprozesse zusätzlich stimuliert. p300 muss auch in diesem Fall nicht die einzige Plattform darstellen, da 8E2 beispielsweise auch über Bindung an Sp1 den p21^{WAF1/CIP1}-Promotor aktivieren kann (STEGER *et al.*, 2002).

Es wurden bereits früher zelluläre, virale und synthetische Promotoren beschrieben, die keine putativen E2-Bindestellen enthalten, aber von BPV1 E2 aktiviert werden konnten. p300 könnte hierbei ein Mediator gewesen sein. So wurde zum Beispiel für die beiden viralen Promotoren RSV-LTR (Rous Sarkomavirus-*long terminal repeat*) und MSV (Moloney murine Sarcomavirus)-LTR demonstriert, dass beide von C-terminal verkürzten, DNA-bindungsdefekten E2-Proteinen aktiviert werden können (HAUGEN *et al.*, 1988). Beide Promotoren werden auch in Abhängigkeit von p300 reguliert. So rekrutiert BRCA1 am RSV-Promotor p300 für eine effiziente Aktivierung der Transkription und Ets-1, das ebenfalls p300 für seine spezifische Aktivität benötigt, bindet an den MSV-Promotor (PAO *et al.*, 1999; GUNTHER *et al.*, 1990; YANG *et al.*, 1998).

Die AD von 8E2 war in hohen Konzentrationen ausreichend, um die HPV8-Genexpression zu stimulieren. Außerdem war sie imstande mit p300 zu kooperieren, obwohl die Wechselwirkung mit p300 *in vitro* nur sehr schwach war. Es ist jedoch denkbar, dass die Interaktion *in vivo* durch weitere Faktoren verstärkt wird. So kann zum Beispiel AMF-1/Gps2 die Bindung der AD von BPV1 E2 an p300 verstärken (PENG *et al.*, 2000). Andererseits wäre es möglich, dass die AD nur als Dimer effektiv mit p300 interagiert, ähnlich wie CREB, das als Monomer nicht mehr in der Lage ist an CBP zu binden (WU

und MCMURRAY, 2001). Unterstützend für diese Annahme könnte die Beobachtung sein, dass es innerhalb von p300-4 zwei unabhängige benachbarte Bindedomänen für 8E2 gibt (MÜLLER, 1999), so dass 8E2 hier theoretisch als Dimer binden könnte. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum die 8E2-AD erst in sehr hohen Konzentrationen Transkription aktivierte. Eine Deletionsmutante, der nur die C-terminale DBD fehlte, konnte die Genexpression schon in geringeren Mengen aktivieren. Diese Mutante kann zwar ebenfalls keine Dimere ausbilden, jedoch zeigte die Hinge-Domäne eine sehr starke *in vitro*-Interaktion mit p300, die daher vielleicht auch *in vivo* eine Rolle spielt. Allerdings lokalisierte die AD sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär (Daten nicht gezeigt; Hadaschik, 2002), so dass auch eine weniger strikte nukleäre Lokalisation der AD, in der noch keine NLS-Signale identifiziert wurden, eine Rolle spielen könnte.

Die Interaktion der Hinge-Domäne mit p300 könnte spezifisch für 8E2 sein, da eine entsprechende Interaktion mit der 18E2-Hinge nicht beobachtet wurde. 8E2 enthält in seiner Hinge-Region viele Arginin/Serin (RS)-Domänen, für die eine Beteiligung am Spleiß-Prozess vermutet wird (LAI *et al.*, 1999). RS-Domänen sind in der Lage Protein-Protein-Interaktionen mit anderen RS-Proteinen zu vermitteln und sind möglicherweise auch für die Wechselwirkung mit p300 relevant, obwohl in p300 keine definierten RS-Regionen vorhanden sind (BOUCHER *et al.*, 2001). Über Phosphorylierungen könnte die Interaktion zudem einer Regulation unterliegen.

Über Interaktionsanalysen mit bakteriell exprimierten und spezifisch aufgereinigten 8E2- und p300-HAT-Proteinen, konnte erstmals eine direkte Interaktion zwischen 8E2 und p300 bewiesen werden. Da eukaryotisch exprimierte Proteine posttranslationalen Modifikationsprozessen unterliegen können, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Bindungsverhalten dieser Proteine in der Zelle gegenüber den hier durchgeführten *in vitro*-Analysen unterscheidet. Daher ist die Koimmunopräzipitation ein wichtiger Nachweis für eine Komplexbildung *in vivo*. Es war nicht möglich die Interaktion auf diesem Weg zu bestätigen. Die Ursache hierfür könnte eine zu geringe Expression oder Stabilität beider Proteine, besonders von 8E2, in transfizierten Zellen sein. Für 18E2 wurden zum Beispiel Halbwertszeiten von 1 h in verschiedenen Zelllinien beschrieben (BELLANGER *et al.*, 2001). Andererseits könnte die Interaktion zwischen den beiden Proteinen in solch einem Ansatz zu schwach sein. So sind auch Interaktionen der Transaktivatoren CREB und VP16 mit bestimmten TAFs vergleichsweise schwach und konnten über Koimmunopräzipitation nicht bestätigt werden (ASAHARA *et al.*, 2001; UESUGI *et al.*, 1997). Es gelang jedoch schon vor Beginn dieser Arbeit mit GST-8E2 endogenes p300 aus HeLa-Kernextrakten zu präzipitieren (MÜLLER *et al.*, 2002) und

umgekehrt, wie hier gezeigt, 8E2- Δ N über ein GST-p300-Fragment aus transient transfizierten 293T-Zellen.

Die N-terminale Deletionsmutante 8E2- Δ N zeigte, dass eine Bindung von 8E2 an p300 alleine nicht ausreicht, um Transkription zu aktivieren. Obwohl die Hinge und die DBD von 8E2 *in vitro* stark mit p300 interagierten und diese Mutante in der Lage ist an die E2-Konsensussequenz zu binden (STEGER *et al.*, 2002), war sie nicht imstande Transkription alleine oder in Kooperation mit p300 zu aktivieren. Dies impliziert, dass die AD von 8E2 möglicherweise zentrale Funktionen in der p300-abhängigen Aktivierung der Transkription übernimmt, wie dies auch für p65 im Verstärkerkomplex des IFN β -Promotors postuliert wird. Die AD von p65 bindet hier über eine synergismusspezifische Region CBP sowie benachbarte Transaktivatoren, und mit einer weiteren Domäne interagiert sie mit Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie. Über diesen Mechanismus werden verschiedene aktivierende Funktionen miteinander vernetzt. Fehlt die synergismusspezifische Region in p65 wird die Aktivität des Verstärkerkomplex deutlich abgeschwächt (MERIKA *et al.*, 1998).

Eine Beteiligung der Hinge und/oder der DBD von 8E2 bei der synergistischen Aktivierung der Transkription mit p300 konnte mit einem Hybrid-Protein gezeigt werden, das aus einem C-terminalen Anteil der Hinge und der DBD von 8E2 sowie der heterologen AD von TEF-1 zusammengesetzt wurde (TEF-1-AD/8E2HC). Für TEF-1 wurde bereits gezeigt, dass es nicht mit p300 kooperiert (SLEPAK *et al.*, 2001), und auch hier konnte weder eine Interaktion noch eine synergistische Aktivierung mit p300 festgestellt werden. Somit mussten bei der beobachteten Kooperation von TEF-1-AD/8E2HC mit p300 die Effekte über den C-terminalen 8E2-Anteil des Konstruktes vermittelt werden. Auch in diesem Experiment war eine DNA-Bindung für die Kooperation mit p300 nicht essentiell. Die Effekte in RTS3b-Zellen waren relativ schwach. Die Ursache hierfür dürfte in einem in Keratinozyten nur limitiert vorhandenen Koaktivator für TEF-1 liegen (ISHIJI *et al.*, 1992). Die Affennieren Zelllinie Cos7 erwies sich in Vorversuchen für die TEF-1-Aktivität als besser geeignet und hier war der Synergismus zwischen TEF-1-AD/8E2HC und p300 ausgeprägter.

p300 kann die Transkriptionsaktivität verschiedener Faktoren, wie z.B. p53 und E2F, durch deren Acetylierung beeinflussen (GU und ROEDER, 1997; MARTINEZ-BALBAS *et al.*, 2000). Hierdurch wird in den meisten Fällen die Affinität zu ihren DNA-Bindestellen erhöht, was in einer verstärkten Aktivierung der Transkription resultiert. Eine Acetylierung der E2-Proteine von HPV8 und HPV18 durch das HAT-Fragment von p300 konnte hier *in vitro* nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies schließt jedoch nicht aus, dass

E2 von einer mit p300 assoziierten HAT acetyliert wird, die hier nicht gesondert analysiert wurden.

Die Qualität der Aktivierungen von 8E2 und p300 variierte in den verschiedenen transienten Transfektionsanalysen. Es fiel dabei auf, dass in Zellen höherer Passagen überexprimiertes p300 kaum noch aktivierte, was sich auch in einer geringeren Kooperation mit 8E2 widerspiegelte und zudem mit einer höheren basalen Promotoraktivität korrelierte. Es ist möglich, dass diese Zellen eine größere Menge endogenes p300 enthalten und somit der Effekt von zusätzlich überexprimiertem p300 maskiert wird. Die potentiellen Umstände, die die p300-Expression in den Keratinozyten-Zelllinien beeinflussen, konnten nicht geklärt werden. Die Ursache ist nicht nur auf das Alter der Zellen zurückzuführen, da phasenweise auch frisch aufgetaute Zellen vergleichbare Effekte aufwiesen. In primären Keratinozyten waren die Aktivierungen durch E2 und p300 stabiler. Dies war auch ein Grund, warum die späteren Experimente in NHEK durchgeführt wurden.

Beim Anfärben von RTS3b-Zellen und primären Keratinozyten mit einem monoklonalen Antikörper gegen p300 fiel auf, dass die Zellen in den jeweiligen Ansätzen p300 nicht in vergleichbaren Mengen enthielten. Es gab Zellen mit einer sehr starken Färbung und solche, in denen p300 deutlich geringer exprimiert wurde. Die stärkere Expression von p300 ist hierbei wahrscheinlich nicht in einem erhöhten Differenzierungsgrad der Zellen begründet, da Kofärbungen in NHEK-Zellen keine Korrelation mit der Expression der Differenzierungsmarker Involukrin und Filaggrin ergaben (Daten nicht gezeigt). Insgesamt deuten die Beobachtungen an, dass es auch in Zellkultur Einflüsse gibt, die sich auf die endogene Expression von p300 auswirken.

Bei der dosisabhängigen Aktivierung der HPV-Genexpression wurden die E2-Proteine bislang nur als moderate Aktivatoren der viralen Promotoren beschrieben (STUBENRAUCH *et al.*, 1996; STEGER und CORBACH, 1997). Die hier präsentierten Daten deuten darauf hin, dass die in RTS3b-Zellen beobachtete leichte Aktivierung des späten Promotors von HPV8 (STUBENRAUCH *et al.*, 1996), darauf zurückzuführen ist, dass in den nicht differenzierten Zellen p300 nur in limitierten Mengen vorhanden ist. So zeigen die vorliegenden Daten eine wesentlich stärkere Aktivierung des Promotors durch geringe 8E2-Mengen, wenn p300 überexprimiert wird. Im Laufe der Keratinozyten-Differenzierung wird die Expression von p300 induziert. In der Haut wurden die höchsten p300-Konzentrationen in den Zellen des *Stratum granulosum* gefunden. Die Überexpression von p300 in RTS3b-Zellen könnte daher diesbezüglich dem Zustand in differenzierter Haut entsprechen. Der späte Promotor exprimiert neben E2-spezifischen Transkripten

auch jene für die Strukturproteine, die bei Papillomviren erst in den oberen Zellen des *Stratum spinosum* und im *Stratum granulosum* gefunden werden (STUBENRAUCH und LAIMINS, 1999). Dies korreliert mit dem Expressionsmuster von p300 in gesunder Haut.

Die Regulation der Transkription bei PV unterliegt vielen verschiedenen Kontrollmechanismen. Hierzu gehören auch reprimierende Effekte, die z.B. die Promotoraktivität in den Basalzellen, wo kaum virale Genexpression stattfindet, unterbinden. Daher müssen für eine Promotoraktivierung in suprabasalen Zellen gleichzeitig auch die reprimierenden Einflüsse aufgehoben werden. Man könnte spekulieren, dass p300 auch hierbei eine Rolle spielt. So wurde für CDP gezeigt, dass es eine Reihe von Bindestellen innerhalb der LCR von mukösen PV besitzt und dort wahrscheinlich über kompetitive DNA-Bindung mit dem viralen E1-Protein und über Modifikation der Chromatinstruktur mittels einer assoziierten Histon-Deacetylase die virale Transkription und Replikation reprimiert (PATTISON *et al.*, 1997; O'CONNOR *et al.*, 2000). In differenzierten Zellen geht die CDP-Aktivität verloren. Dies korreliert mit einer fehlenden Bindung von CDP an die DNA (AI *et al.*, 1999). Sowohl CBP als auch p/CAF sind in der Lage CDP zu acetylieren, was eine Inhibition der DNA-Bindung von CDP zur Folge hat (LI *et al.*, 2000). p300 besitzt in der Zervix-Schleimhaut ein vergleichbares Expressionsmuster wie in kutaner Haut (BALDUS, pers. Mitteilung) und könnte somit bei einer erhöhten Expression in den differenzierten Hautschichten auch den negativen Einfluss von CDP aufheben. Bei kutanen PV wurde eine potentielle Rolle von CDP für die virale Genexpression bislang noch nicht untersucht.

Neben 8E2 und p300 könnte auch 8E6 zur differenzierungsabhängigen Aktivierung des späten Promotors von HPV8 beitragen, da es es ebenfalls mit 8E2 und p300 kooperierte und, wie für HPV5 E6 gezeigt, in den differenzierten Epithelschichten exprimiert wird (HALLER *et al.*, 1995). Falls die späte virale Genexpression durch E2, E6 und p300 aktiviert wird, scheint dies bei HPV16 nicht konserviert zu sein, da 16E6 die Kooperation zwischen E2 und p300 inhibierte. Die gegensätzlichen Funktionen der beiden E6-Proteine sind nicht spezifisch für die E2-vermittelte Aktivierung, da vergleichbare Effekte auch mit p53 beobachtet werden konnten (BECKMANN, 2001). In der Literatur wurden bereits zelluläre Aktivatoren wie p53, AP-1 und NF- κ B beschrieben, die p300/CBP als Koaktivator verwenden und deren Aktivität durch 16E6 reprimiert wird. Im Fall von p53 wird hierbei eine kompetitive Bindung von 16E6 und p53 an die C/H3-Domäne von CBP vermutet. Die Inhibition NF- κ B-vermittelter Aktivierung wurde hingegen mit einer Verdrängung von NF- κ B sowie SRC-1 durch 16E6 am N- bzw. C-Terminus von p300 korreliert (PATEL *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999; HUANG und MCCANCE, 2002).

Für 16E6 wurde bereits eine direkte Interaktion mit p300 gezeigt (PATEL *et al.*, 1999). Diese konnte nun auch für 8E6 und Fragment 4 von p300 bestätigt werden. 8E2 bindet exklusiv an einen N- und einen C-terminalen Anteil von p300-4 (MÜLLER, 1999). Diese beiden Fragmente (p300-4A und p300-4B) wurden neben dem N- und dem C-Terminus von p300 auch als Binderegionen für 8E6 und 16E6 identifiziert (BECKMANN, 2001). Falls für die Repression der 8E2-vermittelten Aktivierung, ähnlich wie bei p53, ein kompetitiver Mechanismus eine Rolle spielt, sollte 8E6 anders an p300-4 binden als 16E6. Es wurde bereits früher nachgewiesen, dass die Bindung der beiden E6-Proteine an p300-4A gleich ist (BECKMANN, 2001). Wie hier gezeigt wurde, ist innerhalb von p300-4B die Bindedomäne von 8E6 und 16E6 ebenfalls identisch. Für beide Proteine sind die 26 As von 1789 bis 1814 in p300 essentiell. Diese Domäne befindet sich damit unmittelbar C-terminal der TRAM-(*Transcriptional adapter motif*)-Region, die bei CBP als Bindedomäne für 16E6 und einer Reihe weiterer Faktoren wie E1A, p53, TFIIB und E2F identifiziert wurde (O'CONNOR *et al.*, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999). Die TRAM-Region von CBP unterscheidet sich von der entsprechenden in p300 nur um eine Aminosäure (Valin statt Isoleucin). Entweder ist diese Position für die Interaktion relevant oder die Ursache für die abweichende Bindedomäne liegt in der Verwendung unterschiedlicher Vektoren für die Expression von GST-Fusionsproteinen. ZIMMERMANN *et al.* haben in ihren Interaktionsanalysen die CBP-Fragmente ebenfalls in pGEX2T kloniert, den Vektor jedoch mit einem neuen Polylinker modifiziert. Hier könnten unterschiedliche Enzymschnittstellen zwischen dem GST-Anteil und dem p300-Fragment für abweichende Aminosäuren kodieren, die die Interaktion beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Binderegion der E6-Proteine an p300-4B sowohl N- als auch C-terminal eingegrenzt, so dass ein artifizielles Ergebnis unwahrscheinlich ist. Für die Bindung von 8E2 an p300-4B sind die Aminosäuren der TRAM-Region jedoch essentiell. Insgesamt müsste daher geprüft werden, ob die Definition des TRAM-Moduls von CBP auch für p300 gilt oder ob sie nur im Fall von 16E6 abweicht.

Die vergleichbare Bindung von 8E6 und 16E6 innerhalb von p300-4 impliziert, dass eine Repression durch Konkurrenz mit E2 oder auch mit anderen Faktoren wie TFIIB unwahrscheinlich ist. Andererseits könnten die hier gezeigten Daten auf eine Bedeutung der unterschiedlichen Affinitäten von 8E6 und 16E6 zu p300-4A bzw. p300-4B hindeuten. 16E6 zeigt wie 8E2 eine höhere Affinität zu p300-4A, während 8E6 stärker an p300-4B bindet (MÜLLER, 1999; BECKMANN, 2001). Allerdings ist bei den Interaktionsstudien aufgefallen, dass man über die Qualität der Bindung *in vitro* keine absolute Aussage machen kann. Während zum Beispiel 8E2 nur eine schwache Wechselwirkung mit GST-p300-4B zeigte (MÜLLER, 1999), so war die Interaktion mit dem Subfragment GST-p300-

4B-4 im Vergleich wesentlich stärker. Ebenso wies 16E6 nur eine sehr schwache Affinität zu p300-4B-5 auf, jedoch eine wesentlich stärkere zum N-terminal um sieben Aminosäuren kürzeren p300-4B-5 -7. Dies zeigt, dass zur Bindestelle benachbarte Aminosäuren die Affinität zum Interaktionspartner z.B. durch eine veränderte Faltung oder über ihre chemischen und elektrostatischen Eigenschaften wesentlich beeinflussen können.

Die Modulation der 8E2- und p300-vermittelten HPV8-Genexpression durch 8E6 und 16E6 wurde in früheren Studien in der immortalisierten Keratinozyten-Zelllinie RTS3b studiert und konnte in dieser Arbeit in primären Keratinozyten, die den natürlichen Zielzellen von PV entsprechen, qualitativ bestätigt werden. Jedoch war die beobachtete Aktivierung durch 8E2 und p300 alleine vergleichsweise niedriger als in den vorangegangenen Ansätzen in RTS3b-Zellen ohne E6-Protein. Neben den Einflüssen durch ein unterschiedliches zelluläres Milieu, kann dies zwei Gründe haben: Um die aktivierenden Effekte von 8E6 analysieren zu können, wurden nicht-saturierende Mengen an 8E2 und p300 eingesetzt, die *per se* nicht zur maximalen Aktivierung führten. Es wurden daher auch wegen der Vergleichbarkeit der Experimente, für alle Transfektionen 10 ng 8E2- sowie 500 ng p300-Expressionsvektor eingesetzt und das jeweilige E6-Protein titriert. Des Weiteren zeigte in Vorversuchen schon die Kotransfektion des für die Klonierung der E6-Proteine verwendeten Leervektors (pCDNA-FLAG) einen negativen Effekt auf die basale Genexpression sowie auf die Aktivierungen durch 8E2 und p300 (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt konnte auch mit anderen CMV-Vektoren beobachtet werden (REHTANZ, persönliche Mitteilung). Es ist daher denkbar, dass durch eine erhöhte Menge an CMV-Promotoren zelluläre Faktoren austitriert werden, die für die Aktivierung der HPV8-Genexpression und/oder für die Kooperation von 8E2 und p300 eine Rolle spielen. Die Effekte der jeweils getesteten E6-Proteine konnten aber trotz der reduzierten Aktivität von 8E2 und p300 gut studiert werden.

Um die unterschiedlichen Funktionen der beiden E6-Proteine zu analysieren, wurden sie zunächst jeweils in eine N- und eine C-terminale Hälfte unterteilt. Es ist wahrscheinlich, dass bei einer Trennung der beiden Zinkfingerdomänen zumindest partiell Funktionen des Proteins erhalten bleiben, da gezeigt werden konnte, dass sich der N-Terminus von 16E6 unabhängig vom C-Terminus falten und Zink binden kann (LIPARI *et al.*, 2001). Des Weiteren ist zumindest der C-Terminus von 16E6 imstande auch separat Funktionen wie zum Beispiel DNA-Bindung auszuüben (RISTRANI *et al.*, 2001).

Die Interaktionsanalysen mit den E6-Derivaten wurden unter erschwerten Bedingungen durchgeführt. Das jeweilige Fragment komigrierte wegen seiner geringen Größe im

Vergleichsansatz mit einem Globin-Protein aus dem Retikulozyten-Lysat (FA. PROMEGA, pers. Mitteilung). Dies verhinderte eine klare Kontrollbande und daher eine Aussage über die Qualität der Wechselwirkung. Außerdem konnten die Fragmente wegen ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht effizient radioaktiv markiert werden. Trotzdem konnten Unterschiede in der Bindung der beiden E6-Proteine an p300 gezeigt werden. Im Gegensatz zu 16E6 ist der N-Terminus von 8E6 an einer Interaktion mit p300 beteiligt. Während 8E6-N alleine die Wechselwirkung mit p300-5 vermitteln kann, können beide Hälften von 8E6 an p300-4B binden. Für die Bindung an p300-1 und p300-4A wird offensichtlich das vollständige 8E6-Protein benötigt. 16E6-C war ausreichend für die Interaktion mit p300-4, -4A, -4B und -5. Auch hier wird p300-1 nur von dem gesamten 16E6 effizient gebunden.

Initial deuteten transiente Transfektionsanalysen an, dass die C-Termini der E6-Proteine für die beobachteten Effekte ausreichend waren. 8E6-C kooperierte sowohl mit 8E2 als auch mit p300 in der Aktivierung der HPV8-Genexpression. Die Aktivität durch 8E6-C schien im Vergleich zu Wildtyp-8E6 ausgeprägter zu sein. Da jedoch für beide Proteine bei den Transfektionsanalysen keine maximale Aktivierung ermittelt werden konnte, ist es fraglich, ob eine unterschiedliche Expression oder Stabilität der beiden Proteine hierfür verantwortlich ist oder ob die schwach reprimierende Funktion im N-Terminus von 8E6 eine negativ regulierende Funktion ausübt.

Die Deletion der Aminosäuren 132-136 im zweiten Zinkfinger von 8E6 führte zu einer deutlich schwächeren Bindung des C-Terminus an p300 und zu einem vollständigen Verlust der Koaktivatorfunktion bezüglich der 8E2- und p300-vermittelten Aktivierung. Die Interaktion des C-Terminus mit p300 scheint somit für die effiziente Koaktivator-Funktion von 8E6 notwendig zu sein, obwohl durch die Deletion noch weitere Funktionen von 8E6 beeinflusst sein könnten, die für die Aktivierung der Transkription notwendig sind. Die Rolle der Bindung des N-Terminus an p300 ist momentan unklar.

Auffällig war, dass der Synergismus von 8E6-C, 8E2 und p300 zusammen (48-fach) bezüglich der jeweiligen kooperativen Aktivierung durch 8E2 und p300 (10-fach), 8E6-C und 8E2 (8-fach) sowie 8E6-C und p300 (14-fach) mehr als additiv war. Dies deutet darauf hin, dass die drei Proteine die Aktivierung der Transkription auf demselben Weg stimulieren. Diesbezüglich könnte es von Bedeutung sein, dass 8E6 sowohl an 8E2 als auch an p300 binden kann. Es wäre denkbar, dass 8E6 dadurch den Komplex zwischen 8E2 und p300 stabilisiert. Da 8E6 jedoch auch ohne 8E2 die p300-vermittelte Aktivierung weiter stimuliert, könnte an p300 gebundenes 8E6 zum Beispiel auch über direkte Kontakte zur basalen Transkriptionsmaschinerie oder zu anderen Transkriptionsfaktoren positive Effekte auf die Ausbildung und Stabilität des PIKs übertragen. Für 8E6 wurden

bereits *in vitro*-Interaktionen mit hTAF_{II}20, hTAF_{II}28, hTAF_{II}ΔN135 und TBP beschrieben (ENZENAUER *et al.*, 1998). In transienten Transfektionsanalysen zeigte sich allerdings weder für die TAFs noch für TBP ein synergistischer Effekt mit 8E6-C (Daten nicht gezeigt), so dass sie für die Aktivierung der Transkription durch den C-Terminus von 8E6 hier möglicherweise keine Rolle spielen. Da es aber wahrscheinlich ist, dass 8E6-C für die effiziente Aktivierung der Transkription mindestens mit einem weiteren zellulären Faktor interagiert, sollte in folgenden Projekten mit 8E6-C über ein Hefe-2-Hybrid-System nach diesem Faktor gesucht werden.

Der C-Terminus von 16E6 war separat in der Lage die E2- und p300-vermittelte Transkription zu reprimieren. Die Deletion der Aminosäuren 123-127 in 16E6-C, die zu einer eingeschränkten Affinität zu p300 führt (PATEL *et al.*, 1999), zeigte immer noch Repression, jedoch war diese nicht so ausgeprägt wie beim nicht mutierten C-Terminus. Die niedrigere Affinität zu p300 kann hierfür eine Rolle spielen, muss aber nicht der Hauptgrund sein. Viele Mutationen in E6 beeinträchtigen oft nicht nur eine Funktion, sondern mehrere gleichzeitig. Eine zu 16E6-Δ123-127 homologe 18E6-Deletionsmutante ist zum Beispiel nicht mehr in der Lage p53 oder hDIg zu degradieren (CHEN *et al.*, 1997b; PIM *et al.*, 1994; 2000). Da diese Aminosäuren bei mukösen Hochrisiko-E6-Proteinen konserviert sind, ist es also wahrscheinlich, dass bei einer Deletion der As 123-127 neben der eingeschränkten p300-Bindung noch weitere Funktionen verloren gehen, die vielleicht ebenfalls für die reprimierenden Effekte verantwortlich sein könnten.

Auf der Suche nach weiteren Regionen innerhalb von 16E6-C, die die Repression der E2-vermittelten Aktivierung erklären könnten, wurde das bei 8E6 fehlende PDZ-Bindemotiv näher betrachtet. Die Bindung an p300 wurde durch dessen Deletion nicht beeinflusst, jedoch zeigte der C-Terminus von 16E6 ohne dieses Motiv keinen reprimierenden Effekt mehr, was bestätigt, dass ein kompetitiver Mechanismus für die Repression unwahrscheinlich ist. Die PDZ-Bindedomäne scheint somit in der Modulation der Transkription involviert zu sein. Dies wird unterstrichen von einem 8E6-C-Konstrukt, dessen aktivierende Funktion durch das Anfügen eines PDZ-Bindemotivs an den C-Terminus aufgehoben wurde. Die bislang bekannte Funktion der PDZ-Bindedomäne von 16E6 und 18E6 ist die Bindung diverser PDZ-Proteine und die Induktion ihrer ubiquitinabhängigen Proteolyse. Mit hDIg ist zumindest ein Faktor bekannt, für dessen Degradation, wie bereits erwähnt, auch konservierte Aminosäuren im C-terminalen Zinkfinger von genitalen Hochrisiko-E6-Proteinen benötigt werden, so dass eine Deletion dieser Aminosäuren auch die reprimierende Funktion des PDZ-Bindemotivs betreffen könnte. Es wird vermutet, dass im Fall von hDIg eine weitere bislang nicht identifizierte

E6-AP-unabhängige Ubiquitin-Ligase involviert ist (PIM *et al.*, 2000), die vielleicht auch für die reprimierende Funktion der PDZ-Domäne von Bedeutung ist. Zusammenfassend korreliert der reprimierende Einfluss von 16E6-C auf die E2- und p300-vermittelte Transaktivierung folglich eher mit einer bislang unbekanntem transkriptionsmodulierenden Funktion der PDZ-Bindedomäne als mit einer kompetitiven Bindung von 16E6 und E2 an p300.

Die hier ermittelten Daten zeigen erstmals einen Einfluss der PDZ-Bindedomäne von E6-Proteinen auf die Modulation der viralen Transkription. Es ist fraglich, ob die Faktoren, für die bereits eine Wechselwirkung mit dem PDZ-Bindemotiv von genitalen Hochrisiko-E6-Proteinen gezeigt wurde, für die reprimierenden Effekte eine Rolle spielen. hDlg, hScrib, MUPP1 und die MAGUKs MAGI-1,-2,-3 sind hauptsächlich als membranassoziierte Proteine in der Organisation der Epithel-Struktur involviert. Allerdings sind sie auch an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt (MANTOVANI und BANKS 2000). Es wurden bereits PDZ-Proteine beschrieben, die u.a. für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wichtig sind. So sind z.B. die MAGUK-Proteine CARD (*Caspase recruitment domain*) 11 und CARD 14 an der spezifischen Aktivierung von NF- κ B beteiligt (BERTIN *et al.*, 2001). Auch im Fall des C-Terminus von 16E6 würde es sich daher anbieten, über ein Hefe-2-Hybrid-System nach weiteren Faktoren zu suchen, deren Bindung an das PDZ-Bindemotiv die Repression verursachen könnte.

Das vollständige E6-Protein reprimierte auch mit deletierter PDZ-Bindedomäne immer noch effizient die E2- und p300-vermittelte Aktivierung der Transkription. Dies impliziert eine von der reprimierenden Funktion im C-Terminus unabhängige zweite inhibitorische Domäne im N-Terminus, die für ihre Funktion die Gesamtstruktur von E6 benötigt, da sie in der separierten N-terminalen Hälfte von 16E6 nicht beobachtet wurde. Die Funktion im N-Terminus ist wahrscheinlich nicht abhängig von einer Bindung an p300, da eine Deletion der As 123-127 im gesamten 16E6 keine Bedeutung hatte und der N-Terminus nicht an p300 bindet. Durch Verwendung der 16E6L50G -ETQL Punktmutante konnte eine Beteiligung von E6-AP an diesem reprimierenden Effekt ausgeschlossen werden.

Für 16E6 sind vier Spleiß-Varianten beschrieben, die alle C-terminal verkürzte E6-Proteine bilden und mit bis zu 90% den größten Anteil der E6-Transkripte in HPV-induzierten Zelllinien und Tumorgewebe darstellen (SMOTKIN *et al.*, 1989; SHIRASAWA *et al.*, 1991). Ein 16E6-Konstrukt ohne PDZ-Bindemotiv und mit einer Mutation im Spleißdonor konnte immer noch effizient reprimieren (Daten nicht gezeigt), so dass eine Beteiligung der Spleiß-Formen an der Repression ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Über den Einsatz von Hybrid-Proteinen konnte gezeigt werden, dass die Funktion,

die im N-Terminus von 16E6 an der reprimierenden Funktion beteiligt sind, in 8E6 nicht vorhanden ist aber andererseits auch mit dem C-Terminus von 8E6 ihre Wirkung entfalten kann.

Der zelluläre Koaktivator Gps2 wurde kürzlich als Interaktionspartner für E6-Proteine identifiziert (DEGENHARDT und SILVERSTEIN, 2001). Wie bereits erwähnt, verstärkt Gps2 die Bindung von E2 an p300 und stimuliert so die E2-vermittelte Aktivierung der Transkription (PENG *et al.*, 2000). Sowohl kutane als auch muköse E6-Proteine binden Gps2, wobei nur für die genitalen Hoch- und Niedrigrisiko-Typen beschrieben wurde, dass sie Gps2, wahrscheinlich unabhängig von E6-AP, in die Proteolyse führen können. Bei 6E6 bindet Gps2 an einen N-terminalen (As 1-36) und einen C-terminalen (As 95-131) Anteil (DEGENHARDT und SILVERSTEIN, 2001). Eine Wechselwirkung mit Gps2 könnte somit für die im N-Terminus von 16E6 vorhandene reprimierende Funktion von Bedeutung sein. Gps2 ist auch ein Koaktivator der p53-vermittelten Aktivierung (PENG *et al.*, 2001), so dass es möglich ist, dass E6 über diesen Weg auch p53-responsive Promotoren inhibiert.

Es ist fraglich, ob die Repression über das PDZ-Bindemotiv spezifisch für die E2-vermittelte Aktivierung ist. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von ZIMMERMANN *et al.* (1999) konnte die C-terminale Hälfte von 16E6 die p53-vermittelte Aktivierung hier auch schon inklusive der PDZ-Bindedomäne nicht reprimieren, so dass keine Aussage über ihre Rolle getroffen werden kann. Eine Inhibition der Transkription wurde nur beobachtet, wenn zusätzlich auch der N-Terminus von 16E6 vorhanden war. Es wurde an dieser Stelle nicht überprüft, ob höhere 16E6-C Mengen in einer Repression resultieren, allerdings konnten gleiche Mengen an 16E6-C die E2-vermittelte Aktivierung effizient reprimieren. Das in dieser Arbeit eingesetzte Promotorkonstrukt enthielt nur eine p53-Konsensussequenz vor dem hsp70-Promotor. ZIMMERMANN *et al.* verwendeten das Konstrukt pG13-CAT, das 13 p53-Bindestellen besitzt (FRIBORG *et al.*, 1999). Es ist daher denkbar, dass die Anzahl der p53-Erkennungssequenzen für die Repression durch 16E6-C bedeutend ist. Dies müsste in künftigen Studien noch geklärt werden.

Ein interessanter Punkt ist, dass das PDZ-Bindemotiv differenzierungsabhängig reguliert werden könnte. Unmittelbar vor dem Motiv befindet sich eine Erkennungssequenz für die Protein-Kinase A (PKA). Durch Phosphorylierung des Serin- bzw. Threoninrestes innerhalb der PDZ-Bindedomäne wird eine Wechselwirkung mit hDIg und somit dessen E6-abhängige Proteolyse unterbunden (KÜHNE *et al.*, 2000). Es ist daher denkbar, dass über eine Phosphorylierung des PDZ-Motivs auch die reprimierende Funktion von 16E6-C beeinträchtigt werden könnte. Die physiologische Bedeutung der PKA in der Epidermis ist

noch nicht ganz klar, aber es gibt Hinweise, dass ihre Aktivität während der Keratinozyten-Differenzierung zunimmt (MITEV und MITEVA, 1999). Da mit 16E6-C -ETQL auch bezüglich der 16LCR und 16E2 keine Repression mehr beobachtet wurde, könnte 16E6 über diesen Mechanismus gezielt die E2- und p300-vermittelte Expression viraler Proteine in den Basalzellen unterbinden und erst in differenzierten Zellen erlauben. Ob dies zutrifft, müssen zukünftige Studien zeigen. Erste Ansätze mit Aktivatoren der PKA in transienten Transfektionsanalysen gaben hierfür noch kein einheitliches Bild (Daten nicht gezeigt). Wenn dies zutrifft, ist es wahrscheinlich, dass auch die reprimierende Funktion im N-Terminus reguliert werden kann, wofür es bislang jedoch noch keine Hinweise gibt.

6. Literaturverzeichnis

Adam, M. (2001). Rolle des zellulären Transkriptionsfaktors YY1 bei der Kontrolle der Replikation und Transkription des humanen Papillomvirus 8. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Ai, W., E. Toussaint und A. Roman (1999). CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J. Virol.*, **73**: 4220-4229.

Akgül, B. (2002). Regulation der Transkription und Replikation von HPV8 und Charakterisierung der transformierenden Eigenschaft des viralen E7-Proteins. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

Androphy, E., N.L. Hubbert, J.T. Schiller und D.R. Lowy (1987a). Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J.*, **6**: 989-992.

Androphy, E., D. R. Lowy und J.T. Schiller (1987b). Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature*, **325**: 70-73.

Asahara, H., B. Santoso, E. Guzman, K. Du, P.A. Cole, I. Davidson und M. Montminy (2001). Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 7892-7900.

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

Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, und K. Struhl (editors). (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc., New York.

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. und C. Calef (1995, 1996). Maps of papillomavirus mRNA transcripts. aus: *Human papillomaviruses: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. HPV Database, *Los Alamos National Laboratory*, Los Alamos, USA.

Barthel, R., A.V. Tsytsykova, A.K. Barczak, E.Y. Tsai, C.C. Dascher, M.B. Brenner und A.E. Goldfeld (2003). Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 526-533.

Bechtold, V., P. Beard und K. Raj (2003). Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J. Virol.*, **77**: 2021-2018.

Beckmann, J. (2001). Charakterisierung der Interaktion der E6-Proteine von Papillomviren mit dem zellulären Koaktivator p300. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.

- Bellanger, S., C. Demeret, S. Goyat und F. Thierry** (2001). Stability of the human papillomavirus type 18 E2 protein is regulated by a proteasome degradation pathway through its amino-terminal transactivation domain. *J. Virol.*, **75**: 7244-7251.
- Benson, J.D., R. Lawande und P.M. Howley** (1997). Conserved interaction of the papillomavirus E2 transcriptional activator protein with human and yeast TFIIIB proteins. *J. Virol.*, **71**: 8041-8047.
- Bernard, H.-U.** (2000). Regulation of the transcription of genital human papillomaviruses by CDP, Nucleosomes and nuclear matrix attachment regions. *Papillomavirus Report*, **11**: 73-80.
- Bertin, J., L. Wang, Y. Guo, M.D. Jacobson, J.-L. Poyet, S.M. Srinivasula, S. Merriam, P.S. DiStefano und E.S. Alnemri** (2001). Card11 and Card14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate Kinase (MAGUK) family members that interact with bcl10 and activate NF- κ B. *J. Biol. Chem.*, **276**: 11877-11882.
- Birnboim, H.C. und J. Doly** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **6**: 1513-1523.
- Boeckle, S., H. Pfister und G. Steger** (2002). A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2. *Virology*, **293**: 103-117.
- Bouallaga, I., S. Massicard, M. Yaniv und F. Thierry** (2000). An enhanceosome containing the JunB/Fra-2 heterodimer and the HMG-I(Y) architectural protein controls HPV18 transcription. *EMBO Rep.*, **1**: 422-427.
- Bouallaga, I., S. Teissier, M. Yaniv und F. Thierry** (2003). HMG-I(Y) and the CBP/p300 coactivator are essential for human papillomavirus type 18 enhanceosome transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 2329-2340.
- Boucher L., C.A. Ouzounis, A.J. Enright und B.J. Blencowe** (2001). A genome-wide survey of RS domain proteins. *RNA*, **7**: 1693-1701.
- 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. Grosse, N. Moscufo, W. Boonchai und E.J. Androphy** (1997). Functional interaction of a novel cellular protein with the papillomavirus E2 transactivation domain. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 7208-7219.
- Brown, D.R., J.M. Schroeder, J.T. Bryan, M.H. Stoler und K.H. Fife** (1999). Detection of multiple human papillomavirus types in Condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 3316-3322.
- Burkhardt, A., M. Willingham, C. Gay, K.T. Jeang und R. Schlegel** (1989). The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology*, **170**: 334-339.
- Chan, H.M. und N.B. La Thangue** (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.*, **114**: 2363-2373.

- Chen, H., R.J. Lin, R.L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M.L. Privalsky, Y. Nakatani und R.M. Evans** (1997a). Nuclear receptor co-activator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**: 569-580.
- Chen, J.J., Y. Hong und E.J. Androphy** (1997b). Mutational analysis of transcriptional activation by the bovine papillomavirus type 1 E6. *Virology*, **236**: 30-36.
- Chung, C. T. und R. H. Miller** (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nuc. Acid. Res.*, **16**: 3580.
- Conrad, M., V.J. Bubb und R. Schlegel** (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.*, **67**: 6170-6178.
- Daniels, P.R., C.M. Sanders, P. Coulson und N.J. Maitland** (1997). Molecular analysis of the interaction between HPV type 16 E6 and human E6-associated protein. *FEBS Letters*, **416**: 6-10.
- Day, P.M., R.B.S. Roden, D.R. Lowy und 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**: 57-63.
- Degenhardt, Y.Y. und S.J. Silverstein** (2001). Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins. *J. Virol.*, **75**: 151-160.
- Del Vecchio, A. M., H. Romanczuk, P.M. Howley und C. Baker** (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J. Virol.*, **66**: 5949-5958.
- Demeret, C., A. Garcia-Carranca und F. Thierry** (2003). Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein. *Oncogene*, **22**: 168-175.
- Desaintes, C., S. Hallez, P. van Alphen und A. Burny** (1992). Transcriptional activation of several heterologous promoters by the E6 protein of human papillomavirus type 16. *J. Virol.*, **66**: 325-333.
- Desaintes, C. und C. Demeret** (1996). Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin. Canc. Biol.*, **7**: 339-347.
- Desaintes, C., C. Demeret, S. Goyat, M. Yaniv und F. Thierry** (1997). Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J.*, **16**: 504-514.
- Desaintes, C., S. Goyat, S. Garbay, M. Yaniv und F. Thierry** (1999). Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells. *Oncogene*, **18**: 4538-4545.
- Dong X.-P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler und H. Pfister** (1994). Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer*, **58**: 803-808.
- Doorbar, J., S. Ely, J. Sterling, C. McLean und L. Crawford** (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, **352**:824-827.

- Doorbar J.** (1998). Late stages of papillomavirus life cycle. *Papillomavirus Report*, **9**: 119-126.
- Dowhanick, J.J., A.A. McBride und P.M. Howley** (1995). Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.*, **69**: 7791-7799.
- Eckner, R., M.E. Ewen, D. Newsome, M. Gerdes, J.A. DeCaprio, J. Bentley-Lawrence und D. M. Livingston** (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.*, **8**: 869-884.
- Einstein, M.H. und G.L. Goldberg** (2002). Human papillomavirus and cervical neoplasia. *Cancer Invest.*, **20**: 1080-1085.
- Elbel, M., S. Carl, S. Spaderna und T. Iftner** (1997). A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology*, **239**: 132-149.
- Enzenauer, C., G. Mengus, A. Lavigne, I. Davidson, H. Pfister und M. May** (1998). Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. *Intervirology*, **41**: 80-90.
- Evander, M., I.H. Frazer, E. Payne, Y.M. Qi, K. Hengst und N.A. McMillan** (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.*, **71**: 2449-2456.
- Favre, M., F. Breitburd, O. Croissant und G. Orth** (1977). Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J. Virol.*, **21**: 1205-1209.
- Frattini, M.G. und 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.
- Frattini, M.G., H.B. Lim und L.A. Laimins** (1997a). In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes of differentiation-dependent late expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 3062-3067.
- Friborg, J., W. Kong, M.O. Hottinger und G.J. Nabel** (1999). p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature*, **402**: 889-894.
- Fuchs, P.G., T. Iftner, J. Weninger und H. Pfister** (1986). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J. Virol.*, **58**: 626-634.
- Fuchs, P. G., S. Horn, T. Iftner, M. May, F. Stubenrauch und H. Pfister** (1993). Molecular biology of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses. In: Virus strategies. Doerfler, W. & Böhm, P. (eds.) (Verlag Chemie, Weinheim): 517-529.
- Fuchs, P. G. und H. Pfister** (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology*, **37**: 159-167.
- Fuchs, P. G. und H. Pfister** (1996). Papillomaviruses in Epidermodysplasia verruciformis. In *Papillomavirus reviews: Current research on papillomaviruses*, S. 253-261. by C. Lacey. Leeds: Leeds University press.

- Fuchs, P.G. und H. Pfister** (1997). Molecular biology of HPV and mechanism of keratinocyte transformation. In: Human papillomavirus infections in dermatovenereology. Herausg.: G. Grossand und G. van Krogh. *CRC Press, Boca Raton*, 15-46.
- Funk, W.D., D.T. Pak, R.H. Karas, W.E. Wright und J.W. Shay** (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 2866-2871.
- Galloway, D.A. und J.K. McDougall** (1996). The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. *Semin. Cancer Biol.*, **7**: 309-315.
- Gao, Q., A. Kumar, S. Srinivasan, L. Singh, H. Mukai, Y. Ono, D.E. Wazer und V. Band** (2000). PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein. *J. Biol. Chem.*, **275**: 14824-14830.
- Gardioli, D., C. Kühne, B. Glaunsinger, S.S. Lee, R. Javier und L. Banks** (1999). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, **18**: 5487-5496.
- Garland, S.M.** (2002). Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology*, **34**: 213-224.
- Garrido-Guerrero, E., E. Carrillo, M. Guido, R. Zamorano, A. Garcia-Carranca und P. Gariglio** (1996). Different arrangement of human papillomavirus E2 binding sites distinguishes cutaneous types from those associated with mucosal lesions. *Arch. Med. Res.*, **27**: 389-394.
- Gauthier, J.M., N. Dostatni, M. Luski und M. Yaniv** (1991). Two DNA-bound E2 dimers are required for strong transcriptional activation and for cooperation with cellular factors in most cells. *The new biologist*, **3**: 498-509.
- Gey, G.O., W.D. Coffman und M.T. Kubicek** (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, **12**: 264-265.
- Gill, G. und M. Ptashne** (1988). Negative effect of the transcriptional coactivator GAL4. *Nature*, **334**: 721-724.
- Giri, I. und M. Yaniv** (1988). Structural and mutational analysis of E2 transactivating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J.*, **7**: 2823-2829.
- Gluzman, Y.** (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**: 175-182.
- Gonzales, S.L., M. Stremlau, X. He, J.R. Basile und K. Münger** (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J. Virol.*, **75**: 7583-7591.
- Goodman, R.H. und S. Smolik** (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.*, **14**: 1553-1577.

- Grossman, S. R., R. Mora und L.A. Laimins** (1989). Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *J. Virol.*, **63**: 366-374.
- Gu, W. und R.G. Roeder** (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**: 595-606.
- Gunther, C.V., J.A. Nye, R.S. Bryner und B.J. Graves** (1990). Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev.*, **4**: 667-679.
- Hadaschik, D.** (2002). Das Papillomvirus E2-Protein: Lokalisation und Modulation der zellulären Transkription. *Dissertation*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.
- Haller, K.F. Stubenrauch und H. Pfister** (1995). Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology*, **214**: 245-255.
- Haugen, T.H., L.P. Turek, F.M. Mercurio, T.P. Cripe, B.J. Olson, R.D. Anderson, D. Seidl, M. Karin und J. Schiller** (1988). Sequence specific and general transcriptional activation by bovine papillomavirus-1 E2 transactivator require an N-terminal amphipathic helix containing E2 domain. *EMBO J.*, **7**: 4245-4253.
- Hawley-Nelson, P., K.H. Vousden, N.L. Hubbert, D.R. Lowy und J.T. Schiller** (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*, **8**: 3905-3910.
- Heike, T., S. Miyatake, M. Yoshida, K. Arai und N. Arai** (1989). Bovine papillomavirus encoded E2 protein activates lymphokine genes through DNA elements, distinct from the consensus motif, in the long control region of its own genome. *EMBO J.*, **8**: 1411-1417.
- Heino, P., J. Zhou und P.F. Lambert** (2000). Interaction of the papillomavirus transcription/replication factor, E2, and the viral capsid protein, L2. *Virology*, **276**: 304-314.
- Horn, S., H. Pfister und P.G. Fuchs** (1993). Constitutive transcriptional activator of Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8. *Virology*, **196**: 674-681.
- Huang, S.-M. und D.J. McCance** (2002). Down regulation of the Interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB Binding Protein/p300 and P/CAF. *J. Virol.*, **76**: 8710-8721.
- Iftner, T., S. Bierfelder, Z. Csapo und H. Pfister** (1988). Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J. Virol.*, **62**: 3655-3661.
- Iftner, T. P. Fuchs und H. Pfister** (1989). Two independently transforming functions of human papillomavirus 8. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **144**: 167-173.
- Ishiji, T., M.J. Lace, S. Parkkinen, R.D. Anderson, T.H. Haugen, T.P. Cripe, J.H. Xiao, I. Davidson, P. Chambon und L.P. Turek** (1992). Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its specific co-activator activate human papillomavirus-16E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.*, **11**: 2271-2281.

- Jones, D.L. und K. Münger** (1997). Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.*, **71**: 2905-2912.
- Joyce, J.G., J.S. Thung, C.T. Przysiecki, J.C. Cook, E.D. Lehman, J.A. Sands, K.U. Jansen und P.M. Keller** (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, **274**: 5810-5822.
- Kinoshita, T., H. Shirasawa, Y. Shino, H. Moriya, L. Desbarats, M. Eilers und B. Simizu** (1997). Transactivation of prothymosin α and c-myc promoters by human papillomavirus 16 E6 protein. *Virology*, **232**: 53-61.
- Kitabayashi, I., A. Yokoyama, K. Shimizu und M. Ohki** (1998). Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.*, **17**: 2994-3004.
- Kiyono, T., A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. Hayashi, T. Akiyama und M. Ishibashi** (1997). Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 11612-11616.
- Klussmann, J.P., S.J. Weissenborn, U. Wieland, V. Dries, J. Kolligs, M. Jungehueling, H.E. Eckel, H.P. Dienes, H. Pfister und P.G. Fuchs** (2001). Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*, **92**: 2875-2884.
- Kühne, C., D. Gardiol, C. Guarnaccia, H. Amenitsch und L. Banks** (2000). Differential regulation of human papillomavirus E6 by protein kinase A: conditional degradation of human discs large protein by oncogenic E6. *Oncogene*, **19**: 5884-5891.
- Lai, M.-C., B.H. Teh und W.-Y. Tarn** (1999). A human papillomavirus E2 transcriptional activator. The interactions with cellular splicing factors and potential function in pre-mRNA processing. *J. Biol. Chem.*, **274**: 11832-11841.
- Lee, J.S., R.H. See, T. Deng und Y. Shi** (1996). Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 4312-4326.
- Lee, D., B.J. Lee, J.H. Kim, D.H. Kim und J. Choe** (2000a). 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, S.S., B. Glaunsinger, F. Mantovani, L. Banks und R.T. Javier** (2000b). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J. Virol.*, **74**: 9680-9693.
- Lee, D., S.G. Hwang, J. Kim und J. Choe** (2002). Functional interaction between p/CAF and human papillomavirus E2 protein. *J. Biol. Chem.*, **277**: 6483-6489.
- Leechanachai, P., L. Banks, F. Moreau und G. Matlashewski** (1992). The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*, **7**: 19-25.

- Lefebvre, O., G. Steger und M. Yaniv** (1997). Synergistic transcriptional-activation by the papillomavirus E2 protein occurs after DNA binding and correlates with a change in chromatin structure. *J. Mol. Biol.*, **266**: 465-478.
- Lemme, W.** (1998). Vergleichende Analyse der Promotoraktivitäten verschiedener Epidermodysplasia verruciformis-assoziiierter humaner Papillomviren. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.
- Li, R., J.D. Knight, S.P. Jackson, R. Tjian und M.R. Botchan** (1991). Direct interaction between Sp1 and the BPV enhancer E2 protein mediates synergistic Activation of transcription. *Cell*, **65**: 493-505.
- Li, S., B. Aufiero, R.L. Schiltz und M.J. Walsh** (2000). Regulation of the homeodomain CCAAT displacement/cut protein function by histone acetyltransferases p300/CREB-binding protein(CBP)-associated factor and CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 7166-7171.
- Lill, N.L., S.R. Grossman, D. Ginsberg, J. DeCaprio und D.M. Livingston** (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature*, **387**: 823-827.
- Lipari, F., G.A. McGibbon, E. Wardrop und M.G. Cordingley** (2001). Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn²⁺-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein. *Biochemistry*, **40**: 1196-1204.
- Liu, Y. J.J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. Hong, C.P. Mansur, V. Band und E. Androphy** (1999). Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalisation of mammary epithelial cells. *J. Virol.*, **73**: 7297-7307.
- Magnussen, P.K. und U.B. Gyllensten** (2000). Cervical cancer risk: is there a genetic component? *Mol. Med. Today*, **6**: 145-148.
- Maniatis, T., J. Sambrook und E.E. Fritsch** (1989). Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York.
- Mantovani, F. und L. Banks** (2000). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, **20**: 7874-7887.
- Martinez-Balbas, M.A., U.-M. Bauer, S.J. Nielsen, A. Brehm und T. Kouzarides** (2000). Regulation of E2F-1 activity by acetylation. *EMBO J.*, **19**: 662-671.
- May, M., V. Helbl, H. Pfister und P.G. Fuchs** (1991). Unique topography of DNA-protein interactions in the non-coding region of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses. *J. Gen. Virol.*, **72** : 2989-2997.
- May, M., K. Grassmann, H. Pfister und P.G. Fuchs** (1994). Transcriptional silencer of the human papillomavirus type 8 late promoter interacts alternatively with the viral trans activator E2 or with a cellular factor. *J. Virol.*, **68**: 3612-3619.
- McBride, A.A., H. Romanczuk und P.M. Howley** (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*, **266**: 18411-18414.
- McBride, A.A. und G. Myers** (1996). The E2 Proteins. Papillomavirus Colloquium, III 15-31.

- Merika, M., A.J. Williams, G. Chen, T. Collins, und D. Thanos** (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN β enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol. Cell*, **1**: 277-287.
- Mincheva, A., L. Gissmann und H. zur Hausen** (1987). Chromosomal integration sites of human papillomavirus DNA in three cervical cancer cell lines mapped by in situ hybridization. *Med. Microbiol. Immunol.*, **176**: 245-256.
- Mink, S., B. Haenig und K.-H. Klempnauer** (1997). Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 6609-6617.
- Missero, C., E. Calautti, R. Eckner, J. Chin, L.H. Tsai, D.M. Livingston und G.P. Dotto** (1995). Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/Waf1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 5451-5455.
- Mitev, V. und L. Miteva** (1999). Signal transduction in keratinocytes. *Exp. Dermatol.*, **8**: 96-108.
- Modrow, S und D. Falke** (1997). Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Mohr, I.J., R. Clark, S. Sun, E.J. Androphy, P. McPherson und 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, A.** (1999). Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen dem zellulären Koaktivator p300 und den viralen E2-Proteinen von HPV8, HPV18 und BPV1. *Diplomarbeit*, Institut für Virologie, Universität zu Köln.
- Müller, A., A. Ritzkowsky und G. Steger** (2002). Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300. *J. Virol.*, **76**: 11042-11053.
- Mullis, K.B. und F.A. Fallona** (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods. Enzym.*, **155**: 335-350.
- Münger, K., J.R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S.L. Gonzales, M. Grace und V.L. Zacny** (2001). Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene*, **20**: 7888-7898.
- Munoz, N.** (2000). Human papillomaviruses and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.*, **19**: 1-5.
- Nakagawa, S., S. Watanabe, H. Yoshikawa, Y. Taketani, K. Yoshiike und T. Kanda** (1995). Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 protein: transforming function for human cells and degradation of p53 in vitro. *Virology*, **212**: 535-542.
- Nakagawa, S. und J.M. Huibregtse** (2000). Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 8244-8253.
- Nakajima, T., C. Uchida, S.F. Anderson, C.-G. Lee, J. Hurwitz, J.D. Parvin und M. Montminy** (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell*, **90**: 1107-1112.

- Newhouse, C.D. und S.J. Silverstein** (2001). Orientation of a novel DNA binding site affects human papillomavirus-mediated transcription and replication. *J. Virol.*, **75**: 1722-1735.
- Nightingale, K.P., R.E. Wellinger, J.M. Sogo und P.B. Becker** (1998). Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila hsp26* gene in chromatin. *EMBO J.*, **17**: 2865-2875.
- Nigro, J.M., S.J. Baker, A.C. Preisinger, J.M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S.H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, T. Glover, F.S. Collins, A. Weston, R. Modali, C.C. Harris und B. Vogelstein** (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, **342**: 705-708.
- Nishimura, A., T. Ono, A. Ishimoto, J.J. Dowhanick, M.A. Frizzell, P.M. Howley und H. Sakai** (2000). Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol.*, **74**: 3752-3760.
- Numa, F., K. Hirabayashi, N. Tsunaga, H. Kato, K. O'Rourke, H. Shao, C. Stechmann-Lebakken, J. Varani, A. Rapraeger und V.M. Dixet** (1995). Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.*, **55**: 4676-4680.
- O'Connor, M.J., S.-Y.Chan und H.-U. Bernard** (1995). Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. In: Human Papillomaviruses. Maters, G., Bernard, H.-U., Delius, H., Icenogel, J., Baker, C., Halpern, A. & Wheeler, C. (eds) (Los Alamos National Laboratory) NM 21-40.
- O'Connor, M.J., S.-H. Tan, C.-H. Tan, und H.-U. Bernard** (1996). YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by squenching AP-1 activity. *J. Virol.*, **7**: 6529-6539.
- O'Connor, M.J., H. Zimmermann, S. Nielsen, H.-U. Bernard und T. Kouzarides** (1999). Characterization of an E1A-CBP interaction defines a novel transcriptional adapter motif (TRAM) in CBP/p300. *J. Virol.*, **73**: 3574-3581.
- O'Connor, M.J., W. Stünkel, C.-H. Koh, H. Zimmermann und H.-U. Bernard** (2000). The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *J. Virol.*, **74**: 401-410.
- Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard und T. Nakatani** (1996). The transcriptional co-activators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, **87**: 1107-1112.
- Othani, K., J. DeGregori und J.R. Nevins** (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 12146-12150.
- Pajunk, H.S., M. May, H. Pfister und 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** : 3287-3295.
- Pao, G.M., R. Janknecht, H. Ruffner, T. Hunter und M. Verma** (1999). CBP/p300 interact with and function as transcriptional coactivators of BRCA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 1020-1025.
- Partanen, A., J. Motoyama und C.C. Hui** (1999). Developmentally regulated expression of the transcriptional cofactors/histone acetyltransferases CBP and p300 during mouse embryogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, **43**: 487-494.

- Patel, D., S.-M. Huang, L.A. Baglia und D.J. McCance** (1999). The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.*, **18**: 5061-5072.
- Pattison, S., D.G. Skalnik und A. Roman** (1997). CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulatory element within the 5' end of the human papillomavirus type 6 long control region. *J. Virol.*, **71**: 2013-2022.
- Peng, Y.-C., D.E. Breiding, F. Sverdrup, J. Richard und E.J. Androphy** (2000). AMF1/Gps2 binds to p300 and enhances its interaction with papillomavirus E2 proteins. *J. Virol.*, **74**: 5872-5879.
- Peng, Y.-C., F. Kuo, D.E. Breiding, Y.F. Wang, C.P. Mansur und E.J. Androphy** (2001). AMF1 (Gps2) modulates p53 activation. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 5913-5924.
- Pfister, H.** (1984). Biology and chemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **99**: 111-181.
- Pfister, H. und P. Fuchs** (1987). Papillomaviruses: particles, genome organisation and proteins. In : Papillomaviruses and human disease. Herausg.: K. Syrjänen, L. Gissmann, L.G. Koss, *et al.*
- Pfister, H.** (1994). Papovaviren. In: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, Brandis H., Eggers H.J., Köhler W., Pulverer G.; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. 762-766.
- Pfister, H. und J. ter Schegget** (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin. Dermatol.*, **15**: 335-347.
- Phelbs, W.C., C.L. Yee, K. Münger und P.M. Howley** (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell*, **53**: 539-547.
- Pim, D., M. Collins und L. Banks** (1992). Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene*, **7**: 27-32.
- Pim, D., A. Storey, M. Thomas, P. Massimi und L. Banks** (1994). Mutational analysis of HPV-18 E6 identifies domains required for p53 degradation in vitro, abolition of p53 transactivation in vivo and immortalisation of primary BMK cells. *Oncogene*, **9**: 1869-1876.
- Pim, D., P. Massimi und L. Banks** (1997). Alternatively spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. *Oncogene*, **15**: 257-264.
- Pim, D., M. Thomas, R. Javier, D. Gardiol und L. Banks** (2000). HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase. *Oncogene*, **19**: 719-725.
- Pim, D., M. Thomas und L. Banks** (2002). Chimaeric HPV E6 proteins allow dissection of the proteolytic pathways regulating different E6 cellular target proteins. *Oncogene*, **21**: 8140-8148.

- Purdie, K.J., C.J. Sexton, C.M. Proby, M.T. Glover, A.T. Williams, J.N. Stables und I.M. Leigh** (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: A role for human pPapillomavirus? *Canc Res.*, **53**: 5328-5333.
- Prakash, S.S., S.R. Grossman, R.B. Pepinsky, L.A. Laimins und E.J. Androphy** (1992). Amino acids necessary for DNA contact and dimerization imply novel motifs in the papillomavirus E2 trans-activator. *Genes Dev.*, **6**: 105-116.
- Rank, N.M. und P.F. Lambert** (1995). Bovine Papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors, TFIID and TFIIB. *J. Virol.*, **69**: 6323-6334.
- Ramoz, N., L.A. Rueda, B. Bouadjar, L.S. Montoya, G. Orth und M. Favre** (2002). Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat. Genet.*, **32**: 579-581.
- Rikitake, Y. und E. Moran** (1992). DNA-binding properties of the E1A-associated 300-kilodalton protein. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 2826-2836.
- Ristriani, T., M. Masson, Y. Nomine, C. Laurent, J.-F. Lefevre, E. Weiss und G. Trave** (2000). HPV oncoprotein E6 is a structure-dependent DNA-binding protein that recognizes four-way junctions. *J. Mol. Biol.*, **296**: 1189-1203.
- Ristriani, T., Y. Nomine, M. Masson, E. Weiss und G. Trave** (2001). Specific recognition of four-way junctions by the C-terminal zinc-binding domain of HPV oncoprotein E6. *J. Mol. Biol.*, **305**: 729-739.
- Roberts, S., I. Ashmole, T.M.T. Sheehan, A.H. Davies und P.H. Gallimore** (1994). Human papillomavirus type 1 E4 is a zinc binding protein. *Virology*, **202**: 865-874.
- Sanders, C.M. und 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.
- Sato, H., S. Watanabe, A. Furuno und K. Yoshiike** (1989). Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in Escherichia coli and monkey COS-1-cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology*, **170**: 311-315.
- Scheffner, M., B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine und P.M. Howley** (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**: 1129-1136.
- Scheffner, M., J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra und P.M. Howley** (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**: 495-505.
- Schmidt, H.-M., G. Steger und 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**: 8029-8034.
- Schmitt, A., J.B. Harry, B. Rapp, F.O. Wettstein und T. Iftner** (1994). Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high- risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7-protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.*, **68**: 7051-7059.

- Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Müller und W. Schaffner** (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 6419.
- Schulze, A., K. Zerfass, D. Spitkovsky, S. Middendorp, J. Berges, K. Helin, P. Jansen-Durr und B. Henglein** (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 11264-11268.
- Schwartz, C., K. Beck, S. Mink, M. Schmolke, B. Budde, D. Wenning und K.H. Klempnauer** (2003). Recruitment of p300 by C/EBPbeta triggers phosphorylation and modulates coactivator activity. *EMBO J.*, **22**: 882-892.
- Sedman, S.A., M.S. Barbosa, W.C. Vass, N.L. Hubbert, J.A. Haas, D.R. Lowy und J.T. Schiller** (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.*, **65**: 4860-4866.
- Seedorf, K., G. Krammer, M. Dürst, S. Suhai und W.G. Rowekamp** (1985). Human papillomavirus type 16 sequence. *Virology*, **145**: 181-185.
- Selinka, H.C., T. Giroglou und M. Sapp** (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology*, **299**: 279-287.
- Shah, K. und P.M. Howley** (1996). Papillomaviruses. In: Fields, Virology, third edition. Herausg. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Shirasawa, H., H. Tanawa, T. Matsunaga und B. Simizu** (1991). Quantitative detection of spliced E6-E7 transcripts of human papillomavirus type 16 in cervical premalignant lesions. *Virology*, **184**: 795-798.
- Shirasawa, H., M.-H. Jin, K. Shimizu, N. Akutsu, Y. Shino und B. Simizu** (1994). Transcription modulatory activity of full-length E6 and E6I proteins of human papillomavirus type 16. *Virology*, **204**: 36-42.
- Skiadopoulos, M.H. und 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.
- Slepek, T.I., K.A. Webster, J. Zang, H. Prentice, A. O'Dowd, M.N. Hicks und N.H. Bishopric** (2001). Control of cardiac-specific transcription by p300 through myocyte enhancer factor 2D. *J. Biol. Chem.*, **276**: 7575-7585.
- Smola-Hess, S. und H. Pfister** (2002). Interaction of papillomaviral oncoproteins with cellular factors. In: Structure-function relationships of human pathogenic viruses. New York, London, Dordrecht, Boston, Moscow. Kluwer Academic/ Plenum Publishers.
- Smotkin, D. und F.O. Wettstein** (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmatic phosphoprotein. *J. Virol.*, **61**: 1686-1689.
- Smotkin, D., H. Prokoph und F.O. Wettstein** (1989). Oncogenic and non-oncogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.*, **63**: 1441-1447.
- Somasundaram, K.** (2000). Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front. Biosci.*, **5**: D424-D437.

Spencer, T.E., G. Jenster, M.M. Burcin, C.D. Allis, J. Zhou, C.A. Mizzen, N.J. McKenna, S.A. Onate, S.Y. Tsai, M.J. Tsai und B.W. O'Malley (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, **389**: 194-198.

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

Steger, G., J. Ham, O. Levebvre und 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.

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

Steger, G., C. Schnabel und H.-M. Schmidt (2002). The hinge region of the human papillomavirus type 8 E2 protein activates the human p21^{WAF1/CIP1} promoter via interaction with Sp1. *J. Gen. Virol.*, **83**: 503-510.

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

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

Stubenrauch, F., I. Leigh und H. Pfister (1996). E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentration by interfering with cellular factors. *J. Virol.*, **70**: 119-126.

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

Stubenrauch, F., T. Zobel und T. Iftner (2001). The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high risk human papillomavirus type 31. *J. Virol.*, **75**: 4139-4149.

Suzuki, T., A. Kimura, R. Nagai und M. Horikoshi (2000). Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of SP1 on and through DNA binding. *Genes Cells*, **5**: 29-41.

Terhune, S.S., C. Milcarek und L.A. Laimins (1999). Regulation of human papillomavirus type 31 polyadenylation during the differentiation-dependent life cycle. *J. Virol.*, **73**: 7185-7192.

Thierry, F., G. Spyrou, M. Yaniv und P.M. Howley (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol.*, **66**: 3740-3748.

Thierry, F. (1993). Proteins involved in the control of HPV transcription. *Papillomavirus Report*, **4**: 27-32.

Thomas, J.T., L.A. Laimins und M.N. Ruesch (1998). Perturbation of cell cycle control by E6 and E7 oncoproteins of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report*, **9**: 59-64.

- Thomas, M., R. Laura, K. Hepner, E. Guccione, C. Sawyers, L. Lasky und L. Banks** (2002). Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*, **21**: 5088-5096.
- Tse, C., T. Sera, A.P. Wolffe und J.C. Hansen** (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 4629-4638.
- Turek, L.P.** (1994). The structure, function, and regulation of papillomavirus genes in infection and cervical cancer. *Adv. Virus Res.*, **44**: 305-356.
- Uesugi, M., O. Nyanguile, H. Lu, A.J. Levine und G.L. Verdine** (1997). Induced alpha helix in the VP16 activation domain upon binding to human TAF. *Science*, **277**: 1310-1313.
- Veldman, T., I. Horikawa, J.C. Barrett und R. Schlegel** (2001). Transcriptional activation of the Telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.*, **75**: 4467-4472.
- Vettesse-Dadey, M., P.A. Grant, T.R. Hebbes, C. Crane-Robinson, C.D. Allis und J.L. Workman** (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.*, **15**: 2508-2518.
- Vousden, K.H. und P.S. Jat** (1989). Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. *Oncogene*, **4**: 153-158.
- Walboomers, J.M., M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A., Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer und N. Munoz** (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.*, **189**: 12-19.
- Webster, K., J. Parish, M. Pandya, P.L. Stern, A.R. Clarke und K. Gaston** (2000). The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**: 87-94.
- Wells, S.I., D.A. Francis, A.Y. Karpova, J.J. Dowhanick, J.D. Benson und P.M. Howley** (2000). Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways. *EMBO J.*, **19**: 5762-5771.
- Wilson, V.G., M. West, K. Woytek und D. Rangasamy** (2002). Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*, **24**: 275-290.
- Wu, X. und C.T. McMurray** (2001). Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **276**: 1735-1741.
- Xiao J.H., I. Davidson, H. Matthes, J.-M. Garnier und P. Chambon** (1991). Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell*, **65**: 551-568.
- Yang, L., I. Mohr, R. Li, T. Nottoli, S. Sun und M. Botchan** (1991). Transcription factor E2 regulates BPV-1 DNA replication in vitro by direct protein-protein interaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **LVI**: 335-46.
- Yang, C., L.H. Shapiro, M. Rivera, A. Kumar und P.K. Brindle** (1998). A role for CREB binding protein and p300 transcriptional coactivators in Ets-1 transactivation functions. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 2218-2229.

- Yao, T.-P., G. Ku, N. Zhou, R. Scully und D.M. Livingston** (1996). The nuclear hormone receptor co-activator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 10626-10631.
- Yao, J.-M., D.E. Breiding und E.J. Androphy** (1998a). Functional interaction of the bovine papillomavirus E2 transactivation domain with TFIIB. *J. Virol.*, **72**: 1013-1019.
- Yao, T.-P.; S. P. Oh, M. Fuchs, N.-D. Zhou, L.-E. Ch'ng, D. Newsome, R.T. Bronson, E. Li, D.M. Livingston und R. Eckner** (1998b). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator CBP/p300. *J. Virol.*, **73**: 6209-6219.
- Zeng, L und M.M. Zhou** (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.*, **513**: 124-128.
- Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H.-U. Bernard und M.J. O'Connor** (1999). The human Papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J. Virol.*, **73**: 6209-6219.
- Zimmermann, H., C.-H. Koh, R. Degenkolbe, M.J. O'Connor, A. Müller, G. Steger, J.J. Chen, Y. Lui, E. Androphy und H.-U. Bernard** (2000). Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J. Gen. Virol.*, **81**: 2617-2623.
- Zou, N., B.Y. Lin, F. Duan, K.-Y. Lee, G. Jin, R. Guan, G. Yao, E.J. Lefkowitz, T.R. Broker und L.T. Chow** (2000). The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localisation and nuclear matrix association. *J. Virol.*, **74**: 3761-3770.
- zur Hausen, H. und E.M. de Villiers** (1994). Human Papillomaviruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, **48**: 427-447.
- zur Hausen, H.** (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**: 690-698.
- Zwerschke, W., S. Joswig und P. Jansen-Durr** (1996). Identification of domains required for transcriptional activation and protein dimerisation in the human papillomavirus type-16 E7 protein. *Oncogene*, **12**: 213-220.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad.	auffüllen auf
AD	Aktivierungsdomäne
AMF-1	<i>Autocrine motility factor-1</i>
AML-1	<i>Acute myeloid leukemia 1</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	<i>BRM-activated killer</i>
bp	Basenpaar
BPV	Bovines Papillomvirus
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CDK	zyklinabhängige Kinase
CDP	<i>CCAAT displacement protein</i>
c/EBP β	<i>CAAT-box/enhancer binding protein</i>
C/H	cystein- und histidinreiche Region
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CMV	Cytomegalovirus
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAB	Diaminobenzidin
DBD	DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
E6-AP	<i>E6 associated protein</i>
E6-BP	<i>E6 binding protein</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylen-Glycol-bis(β -aminoethylether)
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
et al.	und andere
Ev	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Gps2	<i>G protein pathway suppressor 2</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
hDIg	(humanes) Homolog zum <i>Drosophila discs large suppressor</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMG-I	<i>High mobility group-I</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinomas</i>
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomvirus

HRP	Meerrettich-Peroxidase
hScrib	(humanes) Homolog zum <i>Drosophila scribble</i>
HSLB	<i>High salt lysis buffer</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
hsp	<i>Heat shock protein</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IVT	<i>In vitro</i> translatiert
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LCR	<i>Long Control Region</i>
LSDB	<i>Low salt dilution buffer</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
Luc	Luciferase
MAGI	<i>Membrane associated guanylate kinase with inverted orientation</i>
MAGUK	<i>Membrane associated guanylate kinase</i>
MCS	Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MCM7	<i>Minichromosome maintenance protein</i>
MDM2	<i>Murine double minute clone 2</i>
MLP	<i>Major late</i> - Promotor
MSV	Moloney murine Sarcomavirus
MUPP1	<i>Multi-PDZ domain protein</i>
mt	mutiert
NAP	<i>Nucleosome assembly protein</i>
NCR	nicht-kodierende Region
NF-1	<i>Nuclear factor 1</i>
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotid
NTA	Nitrilotriacetat
Oct1	<i>Organic cation transporter 1</i>
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PAG	Poly-Acrylamid-Gel
PBF	<i>Papillomavirus binding factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
p/CAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF R	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PDZ	PSD-95, Dlg, Zo-1
PEF-1	<i>Phosphatase with EF hands 1</i>
PEG	Polyethylenglykol
PIK	Prä-Initiationskomplex
PKA	Protein-Kinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PODs	<i>PML oncogenic domains</i>
pRB	Retinoblastom-Protein
PV	Papillomvirus
RHA	<i>RNA helicase A</i>
RLU	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Arginin/Serin
RSV	Rous Sarkomavirus
RT	Raumtemperatur
RUNX-1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>

Sp1	<i>Specific protein 1</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SRC-1	Steroid receptor coactivator 1
SV	Simian Virus
SVo	Säulenvolumen
TAF	<i>TBP associated factor</i>
TBE	<i>Tris-borate electrophoresis buffer</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TBST	<i>Tris buffered saline + Tween20</i>
TEF-1	<i>Transcriptional enhancer factor-1</i>
TELT	<i>Tris-EDTA-LiCl-Triton</i>
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TFII(x)	<i>Transcription factor II (x)</i>
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TNS	<i>Trypsine neutralization solution</i>
TSB	<i>Transformation and storage buffer</i>
TRAM	<i>Transcriptional adapter motif</i>
wt	wildtyp
YY1	Yin Yang 1
z.B.	zum Beispiel

8. Zusammenfassung

Papillomviren (PV) infizieren die Basalzellen der Haut oder Schleimhaut und induzieren dort die Bildung gutartiger Tumoren, die bei Infektion mit gewissen PV-Typen maligne entarten können. Das humane PV Typ 8 (HPV8) gehört zu den Hochrisiko-PV, die mit der seltenen Hautkrankheit *Epidermodysplasia verruciformis* assoziiert sind. In dieser Studie wurde die Rolle des zellulären Koaktivators p300 bei der Regulation der HPV8-Genexpression durch das virale E2- und E6-Protein untersucht. Hierbei wurde erstmals eine direkte Interaktion des Transkriptionsregulators E2 von HPV8 (8E2) mit p300 bewiesen. In transienten Transfektionsanalysen konnte die moderate Aktivierung des späten Promotors von HPV8 durch geringe 8E2-Konzentrationen nach Koexpression von p300 um den Faktor sieben stimuliert werden. Der Synergismus von 8E2 und p300 könnte eine Rolle bei der differenzierungsabhängigen Aktivierung der PV-Genexpression spielen, da immunhistochemische Färbungen von Hautschnitten zeigten, dass die Expression von p300 in den differenzierten oberen Epithelschichten induziert wird. Die Kooperation mit p300 blieb auch erhalten, nachdem entweder die E2-Bindestellen innerhalb der nicht-kodierenden Region von HPV8 oder die DNA-bindende Domäne (DBD) von 8E2 mutiert wurden, so dass 8E2 auch über Protein-Protein-Interaktionen an den Promotor rekrutiert werden könnte. Transiente Transfektionsanalysen demonstrierten, dass die Aktivierungsdomäne (AD) von 8E2 für den Synergismus mit p300 ausreichend und notwendig ist, obwohl sie *in vitro* nur schwach an p300 bindet. Die Hinge und die DBD von 8E2 interagierten vergleichsweise stärker mit p300 und deren Fusion an eine heterologe AD zeigte in transienten Transfektionsanalysen eine Beteiligung der Hinge und/oder der DBD an der Kooperation mit p300.

Das Onkoprotein E6 von HPV8 (8E6) kann die 8E2- und p300-vermittelte Aktivierung weiter stimulieren. Im Gegensatz dazu führt das onkogene E6 von HPV16 (16E6), das die Schleimhaut infiziert und sehr häufig in Zervix-Karzinomen gefunden wird, zu einer starken Repression. Die gegensätzlichen Effekte der beiden E6-Proteine auf die Modulation der Transkription wurden in dieser Arbeit analysiert. Beide Proteine scheinen identisch an zwei zentrale Domänen von p300 zu binden, von denen eine innerhalb der Aminosäuren 1789-1814 liegt und mit der Binderegion von 8E2 überlappt. Das zuvor definierte TRAM-Modul von p300 (As 1770-1788), das als Interaktionsort für 16E6 vermutet wurde, war für die Bindung von 8E2, 8E6 und 16E6 nicht notwendig. Da wegen des vergleichbaren Bindemusters der beiden E6-Proteine an p300 eine kompetitive Bindung mit 8E2 als Mechanismus für die Repression durch 16E6 unwahrscheinlich erschien, wurden die transkriptionsmodulierenden Funktionen der beiden E6-Proteine näher untersucht. Für 8E6 erwies sich die C-terminale Hälfte als ausreichend für die Koaktivator-Funktion, die mit einer Bindung an p300 *in vitro* korrelierte. Innerhalb von 16E6 konnten zwei voneinander unabhängige Repressionsdomänen identifiziert werden. Eine befindet sich im C-Terminus, korreliert ebenfalls mit einer Bindung an p300 und benötigt zusätzlich die vier C-terminalen Aminosäuren, die als Motiv für die Bindung an PDZ-Proteine bekannt sind. Für diese Region wurde hier erstmals eine transkriptionsmodulierende Funktion gezeigt. Die zweite reprimierende Funktion lokalisiert im N-Terminus, agiert nur in Gegenwart der C-terminalen Hälfte und ist unabhängig von E6-AP.

9. Abstract

Papillomaviruses (PV) infect the basal cells of the skin and mucosal epithelium causing benign and malignant tumors. Human PV type 8 (HPV8) belongs to the oncogenic types specifically associated with the rare skin disease *Epidermodysplasia verruciformis*. In this study the role of the cellular coactivator p300 in regulation of HPV8 gene expression by the viral proteins E2 and E6 was analyzed. A direct interaction between the transcriptional regulator E2 of HPV8 (8E2) and p300 could be demonstrated for the first time. In transient transfection assays the moderate HPV8 late promoter activation by low amounts of 8E2 was stimulated up to sevenfold after coexpression of p300. The synergism between 8E2 and p300 may play a role in differentiation-dependent activation of PV gene expression, since an increased expression level of p300 during keratinocyte differentiation could be detected by immunohistochemical staining of skin sections. Cooperativity was still observed after mutating either the E2 recognition sites within the non-coding region of HPV8 or the DNA binding domain (DBD) of 8E2, indicating that 8E2 may be recruited to the promoter via protein-protein interaction. Transient transfection assays revealed that the activation domain (AD) of 8E2 is necessary and sufficient for cooperative activation with p300 although the AD only weakly binds to p300 *in vitro*. A stronger interaction was observed with the hinge and the DBD of 8E2. Moreover, fusing this part of 8E2 to a heterologous AD showed that the hinge and/or the DBD may contribute to the cooperativity with p300.

The E6 oncoprotein of HPV8 (8E6) further stimulates the 8E2 and p300 mediated activation. In contrast the oncogenic E6 of HPV16 (16E6), which infects the mucosa and is often found in cervical carcinomas, strongly represses gene expression mediated by 8E2 and p300. In this work the opposite effects of 8E6 and 16E6 were analyzed. Both proteins seem to bind two central domains of p300, with one binding domain identified here between aa 1789-1814. 8E2 binds to similar regions as the two E6 proteins. The previously defined TRAM-motif of p300 (aa 1770-1788), which was proposed to function as an adapter modul for 16E6, was not necessary for binding of 8E2, 8E6 or 16E6. Since E6-proteins revealed a comparable binding pattern to p300, a competition for binding to p300 with 8E2 seemed unlikely to be the mechanism of repression by 16E6. Therefore the transcriptional modulation functions of the two E6 proteins were investigated in more detail. The c-terminal part of 8E6 was sufficient for coactivator function, which correlated with a binding to p300 *in vitro*. Within 16E6 two independent repression domains were identified. The first localizes in the c-terminal part. It depends on binding to p300 and on the c-terminal four amino acids, which have been identified as a binding domain for PDZ-proteins. This implies that this motif may play a novel role in E6 modulation of transcription. The second repression domain is within the n-terminal part. It only works in presence of the c-terminus and does not depend on E6-AP.

10. Danksagung

Bei allen, die auf das Zustandekommen dieser Arbeit positiven Einfluss genommen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Allen voran gilt mein Dank Frau Dr. Gertrud Steger für die hervorragende Zusammenarbeit. Die Unterstützung durch ihre menschliche und fachliche Kompetenz war eine ständige Motivation über die gesamte Zeit der Arbeit hinweg.

Bei Herrn Prof. Dr. Herbert Pfister bedanke ich mich für die Betreuung meiner Promotion und die ständige hilfreiche Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jürgen Dohmen und Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner für ihre Bereitschaft die vorliegende Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln zu vertreten.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Andreas Ritzkowsky für die freundliche Bereitstellung der Hautschnitte.

Ich möchte mich sehr herzlich bei meinen Laborkollegen bedanken, die zu einer Arbeitsatmosphäre beigetragen haben, die ich bestimmt vermissen werde: Steffi Boeckle, Manuela Rehtanz, Carsta Schnabel, Julia Beckmann, Eva Weyhing, Ulla Warthorst, Nadine Sichtig und Ulla Krüppel.

Melanie Balduin danke ich für ihre moralische und freundschaftliche Unterstützung und Martin Däumer für die gemeinsamen fachübergreifenden Aktivitäten.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Hilfe bedanken sowie bei Raphaela, die mich mit viel Liebe und Tatkraft im Leben und während meiner Promotion unterstützte.

Die Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

11. Erklärung

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

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

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

Müller, A., A. Ritzkowsky und G. Steger (2002)

Cooperative activation of human papillomavirus type 8 gene expression by the E2 protein and the cellular coactivator p300

J. Virol., **76**: 11042-11053.

Köln, den 07.05.2003

Andreas Müller

12. Lebenslauf

Zur Person:

Name: Andreas Müller
Anschrift: Fahner Weg 24, 51467 Bergisch Gladbach
Geburtsdatum: 27.01.1972
Geburtsort: Bergisch Gladbach
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Sept. 1978 - Juli 1982 Gemeinschaftsgrundschule Schildgen, Bergisch Gladbach
Sept. 1982 - Juli 1992 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Bergisch Gladbach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

Aug.1992 - Okt..1993 Stadt Bornheim

Studium und Beruf:

Okt. 1993 - Mai 1999 Hochschulstudium an der Mathematisch -
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Biochemie und Pharmakologie
Abschluss: Diplom

Seit Juli 1999 Promotionsstudium im Fachbereich Biologie an der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
Experimentelle Arbeit im Institut für Virologie, Kliniken der
Universität zu Köln, Arbeitsgruppe Dr. Gertrud Steger
Betreuer: Prof. Dr. Herbert Pfister

Apr. 1997 - März 1998 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Entwicklungsbiologie
Seit Juli 1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Virologie,
Kliniken der Universität zu Köln