

# Der Einfluss zellulärer Interaktoren des E2-Proteins von Hochrisiko-HPV auf den viralen Lebenszyklus

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Janis Renner

aus Tübingen

Tübingen

2024

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 02.07.2024

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Iftner  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schindler

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis .....	1
2	Zusammenfassung.....	3
3	Einleitung.....	4
3.1	Klinische Relevanz .....	4
3.2	Die Genomorganisation von HPV .....	5
3.3	Der virale Lebenszyklus .....	6
3.4	Die viralen Proteine .....	8
3.4.1	Die viralen E6 und E7 Onkoproteine .....	8
3.4.2	Die Kapsidproteine L1 und L2.....	8
3.4.3	Die E1 Helikase .....	8
3.4.4	Das regulatorische E2-Protein .....	9
3.5	BRD4 .....	10
3.6	Fam133B.....	12
3.7	Das Zinkfingerprotein ZC3H4.....	12
3.8	Zielsetzung.....	13
4	Material und Methoden .....	15
4.1	Material .....	15
4.1.1	Chemikalien .....	15
4.1.2	Lösungen und Puffer .....	15
4.1.2.1	Medien zur Bakterienkultivierung.....	17
4.1.2.2	Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	17
4.1.2.3	Zum Gebrauch fertige Reaktionssysteme und Reagenzien.....	18
4.1.3	Geräte.....	19
4.1.4	Verbrauchsmaterial .....	20
4.1.5	Oligonukleotide .....	21
4.1.6	Verwendete Plasmide .....	23
4.1.7	Primäre Antikörper.....	27
4.1.8	Sekundäre Antikörper .....	28
4.1.9	Bakterienstämme .....	28
4.1.10	Eukaryotische Zellen.....	28
4.1.11	Für diese Arbeit hergestellte Zelllinien.....	29
4.2	Methoden.....	29
4.2.1	Mikrobiologische Methoden .....	29
4.2.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	29

4.2.1.2	Transformation von DNA in kompetente Bakterien .....	29
4.2.1.3	Kultivierung von Bakterien zur Vervielfältigung und Isolation von Plasmid-DNA.....	30
4.2.2	Zellkultur-Methoden .....	30
4.2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	30
4.2.2.2	Behandlung von NIH3T3-J2, NIH3T3-J2-NHP Maus-Fibroblasten mit Mitomycin C .	30
4.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	31
4.2.2.4	Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen .....	31
4.2.2.5	Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen .....	31
4.2.2.6	Retrovirale Infektion.....	32
4.2.2.7	Erzeugung HPV-haltiger Zelllinien .....	32
4.2.2.8	Differenzierung humaner Keratinozyten in Methylcellulose .....	32
4.2.2.9	Organotypische Zellkulturen (3D) .....	33
4.2.3	DNA-Methoden .....	33
4.2.3.1	Standardmethoden .....	33
4.2.3.2	Amplifikation von Gensequenzen durch PCR.....	33
4.2.3.3	Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienzellen .....	34
4.2.3.4	DNA-Fragment-Elution aus Agarosegelen.....	34
4.2.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase .....	34
4.2.3.6	Sequenzierung.....	35
4.2.3.7	ExonukleaseV-Resistenz qPCR-Assay .....	35
4.2.3.8	DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen .....	35
4.2.4	RNA-Methoden.....	35
4.2.4.1	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen .....	35
4.2.4.2	Synthese von copy-DNA (cDNA).....	35
4.2.4.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	36
4.2.4.4	RNA-Sequenzierung.....	37
4.2.5	Proteinmethoden .....	37
4.2.5.1	Zelllyse zur Proteinextraktion.....	37
4.2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
4.2.5.3	Western Blot.....	38
4.2.5.4	Ko-Immunpräzipitation (CoIP).....	38
4.2.5.5	Durchflusszytometrie-basierte FRET-Analyse (FACS/FRET) .....	39
4.2.5.6	Indirekte Immunfluoreszenz .....	40
4.2.5.7	Markierung proximaler Proteine via BioID.....	40
4.2.5.8	LC-MS/MS-Analyse .....	40

4.2.5.9	Luciferase-Assay .....	42
4.2.5.10	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	42
4.2.5.11	Anfertigung von Kryoschnitten.....	42
5	Ergebnisse.....	43
5.1	E2 Proteine von Hochrisiko $\alpha$ -HPV-Typen interagieren mit der PDID-Region von BRD4.....	43
5.2	BRD4S ist auf dem viralen Genom angereichert .....	46
5.3	Die Interaktion von HPV31 E2 mit BRD4 hat keinen Einfluss auf das Transkriptom von undifferenzierten Keratinozyten .....	48
5.4	Die Bindung von E2 an BRD4 ist wichtig für die Transkription der späten viralen Gene in differenzierten Zellen .....	50
5.5	<i>Proximity-Labeling</i> mittels BioID zeigt potentielle Interaktoren von E2 .....	52
5.6	Fam133B interagiert mit HPV16 und 31 E2.....	55
5.7	HPV16 E2 aktiviert den späten viralen Promotor in Abhängigkeit von Fam133B.....	57
5.8	Der Knockdown von Fam133B führt zu einer reduzierten E2- Proteinmenge.....	60
5.9	Der Knockdown von Fam133B beeinflusst die Transkription der späten viralen Gene.....	61
5.10	ZC3H4 ko-lokalisiert mit HPV16 E2.....	63
5.11	HPV16 E2 aktiviert den späten viralen Promotor in einer von ZC3H4 abhängigen Weise ...	65
5.12	Die Interaktion von BRD4 mit HPV16 E2 trägt zur Aktivierung des späten Promotors bei...	67
5.13	ZC3H4 wird an HPV16-DNA rekrutiert.....	68
5.14	ZC3H4 ko-lokalisiert mit E2-Foci in HPV16 positiven Keratinozyten.....	70
5.15	Der Knockdown von ZC3H4 reduziert die Expression später viraler Gene, sowie die Anzahl der Genomkopien in differenzierten Keratinozyten .....	72
5.16	Der Knockdown von ZC3H4 reduziert die Transkriptmenge der späten viralen Gene in HPV31 wt, aber nicht in HPV31 E2:IL73 positiven Keratinozyten.....	74
6	Diskussion.....	76
6.1	<i>Proximity-Labeling</i> zur Identifizierung neuer potenzieller Interaktionspartner von E2 .....	77
6.1.1	Fam133B interagiert mit verschiedenen HPV E2 .....	77
6.1.2	ZC3H4 trägt zur E2-bedingten Aktivierung des späten viralen Promotors bei .....	78
7	Abbildungsverzeichnis.....	83
8	Literaturverzeichnis.....	84
9	Akademischer Lebenslauf.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
10	Publikationen.....	92
11	Danksagung .....	93

# 1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti oder alpha
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	basal cell carcinoma
BD1/2	Bromodomäne
BFP	blue fluorescent protein
BID	basic residue-enriched interaction domain
Bp	Basenpaar/e
BRD4	Bromodomänen-enhaltendes Protein 4
BSA	Bovines Serum Albumin
BS	Bindestelle
CAPS	Cyclohexaminopropansulfonsäure
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
cDNA	copy-DNA
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
CK2	Casein Kinase2
CMV	cytomegalovirus
CRPV	Cottontail rabbit papillomavirus
CS	Kälberserum
C-Ter	C-Terminus
CTM	C-terminal motif
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles minimal essentielles Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ET	Extra-Terminal
F	Forward (Primer)
Fam133B	Family With Sequence Similarity 133 Member B
FACS	fluorescent activated cell sorting
FKS	Fötales Kälberserum
FRET	Försters Resonanz-Energietransfer
HA	Hämagglutinin
HPV	Humanes Papillomvirus
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
LB	lysogeny broth - Komplexes Medium zur Bakterienkultur
mAb	Monoclonal antibody
MCS	Multiple cloning site
mt	Mutante
mRNA	Messenger RNA

c-Myc	Myc Proto-Onkogen Protein
NHK	Normale humane Keratinozyten
NPS	N-terminal cluster of phosphorylation sites
ORF	Open reading frame
Ori	Replikationsursprung
o/n	Over night; über Nacht
pAb	Polyclonal antibody
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDID	phosphorylation dependent interaction domain
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PV	Papillomvirus
P-TEFb	positive transcription elongation factor b
qRT-PCR	Qualitative real time PCR
R	Reverse (Primer)
SEM	Standard error of the mean
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interferingRNA
SOC	SOB („Super Optimal Broth“) plus Glukose -komplexes Nährmedium zur Transformation kompetenter Bakterien
SYFP	Super yellow fluorescent protein
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
URR	Upstream regulatory region
WB	Western Blot
w/v	Gewichtprozent
ZC3H4	zinc finger CCCH-type containing 4

Außerdem wurden SI-Einheiten und allgemein gebräuchliche Präfixe verwendet.

## 2 Zusammenfassung

Hochrisikotypen von humanen Papillomviren (HPV), allen voran HPV16, sind für die Entstehung von Krebserkrankungen im Anogenital- und Oropharynxbereich verantwortlich. HPV haben ihren Lebenszyklus an den Differenzierungszustand der infizierten Zellen angepasst. Der späte HPV-Promotor, im Falle von HPV16  $P_{670}$  genannt, wird bei der Differenzierung stark induziert und steuert die Expression der viralen Kapsidproteine, die für die Produktion infektiöser Virionen erforderlich sind. Gegenwärtig werden differenzierungsregulierte Transkriptions- und Elongationsfaktoren des Wirts mit der Induktion des späten Promotors in Verbindung gebracht, nicht jedoch von HPV kodierte Transkriptionsfaktoren. Das HPV E2-Protein aktiviert die Transkription überwiegend durch die Interaktion mit dem zellulären BRD4-Protein.

Mithilfe eines Biotin-Proximity-Ligations-Screens sollten neue potentielle Interaktionspartner von E2 untersucht werden, dabei wurden die Wirtszellproteine Fam133B und ZC3H4 als mögliche neue Interaktoren von HPV16 E2 identifiziert. Fam133B ist bisher weitgehend uncharakterisiert und daher ist über dessen Funktion nur wenig bekannt. ZC3H4 ist Teil eines Transkriptionsterminations-Kontrollpunkts für zelluläre lange nicht-kodierende RNAs und deren anschließenden Abbau, wurde aber bisher nicht mit der viralen Genexpression in Verbindung gebracht. Die Daten zeigen überraschenderweise, dass E2 spezifisch den späten Promotor  $P_{670}$  aktiviert und Fam133B, sowie ZC3H4 diese Aktivierung modulieren. Fam133B scheint dabei in undifferenzierten Zellen eine positive Wirkung auf die Transaktivierung zu haben, wobei dies keine wichtige Rolle mehr zu spielen scheint, nachdem die Zelle in die terminale Differenzierung eintritt. ZC3H4 bindet in vivo an HPV16-Chromatin und ko-lokalisiert mit E2 in viralen Replikationsfoci, was darauf hindeutet, dass ZC3H4 direkt auf die virale Genexpression oder Replikation wirkt. Die ZC3H4-Proteinkonzentration wird durch Differenzierung induziert, und ein Knockdown von ZC3H4 in differenzierten HPV16-positiven Zellen reduziert spezifisch die von  $P_{670}$  abgeleiteten Transkripte. Darüber hinaus gab es, im Gegensatz zum Wildtyp, keine Unterschiede in der Transkriptmenge der späten viralen Gene nach Knockdown von ZC3H4 in einer HPV31-Mutante mit BRD4-bindungsdefizientem E2 (E2:IL73). Dem folgend zeigte die RNA-Sequenzierung mit differenzierten HPV31-Zelllinien eine deutlich höhere Transkription des späten L1-Gens im Wildtyp, als die E2:IL73-Mutante.

Die Aktivierung des späten viralen Promotors scheint durch verschiedene Proteine komplex reguliert zu werden. So ist die Rekrutierung von BRD4 durch E2 von Bedeutung. Zusätzlich unterstützt ZC3H4, welches durch Differenzierung induziert wird, die Aktivität von  $P_{670}$ . Im Gegensatz dazu erweisen sich BRD4S und Fam133B als Inhibitoren der differenzierungsabhängigen Aktivierung des späten viralen Promotors.

## 3 Einleitung

Papillomviren (PV), sind unbehüllte DNA-Viren. Von den bisher über 450 identifizierten PV-Typen werden über 220 den humanen Papillomaviren (HPV) zugeordnet ([pave.niaid.nih.gov](http://pave.niaid.nih.gov), Stand Januar 2024). Diese werden in die 5 verschiedenen Genera alpha-, beta-, gamma-, mu- and nu-HPV eingeteilt. Das ca. 8000 Basenpaare große doppelsträngig zirkuläre DNA-Genom wird von einem ikosaedrischen Kapsid, bestehend aus 72 Kapsomeren, umgeben und bildet so virale Partikel mit einem Durchmesser von 55 nm [1].

### 3.1 Klinische Relevanz

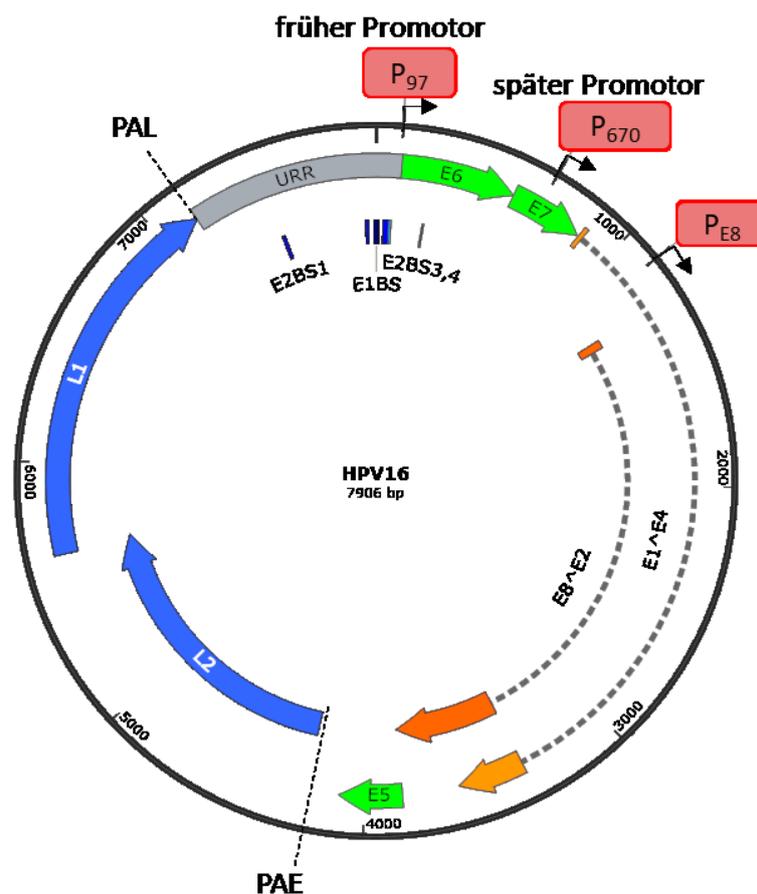
Persistente Infektionen mit Hochrisikotypen der alpha-HPV sind für die Entstehung von Krebserkrankungen im Anogenital- und Oropharynxbereich verantwortlich [2]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stuft die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 derzeit als sicher karzinogen ein. Dabei sind für die Entstehung von ungefähr 70 % aller Zervixkarzinome die Hochrisikotypen HPV16 und 18 alleine verantwortlich. Infektionen mit Niedrigrisikotypen wie HPV 6 und 11 können zu Genitalwarzen führen. HPV wird vor allem durch sexuellen Kontakt übertragen. Für 2018 wurden weltweit schätzungsweise 2,2 Millionen infektionsbedingte Krebsfälle diagnostiziert, was rund 13 % aller jährlichen Krebserkrankungen ausmacht. Davon wird rund ein Drittel der Fälle auf eine HPV-Infektion zurückgeführt [2].

Circa 90 % der neu erworbenen HPV-Infektionen klingen innerhalb von 1 bis 2 Jahren ohne Intervention ab und sind dann nicht mehr nachweisbar [3]. Bei ca. 10 % der Neuinfektionen kommt es zu persistierenden Infektionen und Präkanzerosen, die in der Regel innerhalb von 5-10 Jahren auftreten [3]. Bis zu der Entstehung von invasivem Krebs können mehrere Jahre bis Jahrzehnte vergehen. Bei einer Infektion mit einem Hochrisikotyp gibt es derzeit keine Therapiemöglichkeit.

Seit 2006 ist eine Impfung gegen HPV in Deutschland möglich. Derzeit sind zwei verschiedene Impfstoffe erhältlich, die beide gegen eine Infektion mit Hochrisikotypen schützen. Der Impfstoff Cervarix® schützt vor Infektionen mit HPV 16 und 18, - und durch Kreuzprotektion auch gegen HPV 31 und 45 - Gardasil®9 vor Infektionen mit den Hochrisiko-HPV 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, die in etwa 90 % der Zervixkarzinome zu finden sind, sowie vor HPV 6 und 11. Die STIKO empfiehlt seit 2007 Mädchen und seit 2018 auch Jungen im Alter zwischen 9 und 14 Jahren gegen HPV zu impfen. Dennoch lag 2019 die Impfquote bei den 15-jährigen Mädchen unter 51 % und bei den 15-jährigen Jungen nur bei etwa 17 % [4].

## 3.2 Die Genomorganisation von HPV

Das virale Genom von HPV besteht aus einem zirkulären DNA-Doppelstrang mit ca. 8000 Basenpaaren. Es enthält neben den beiden Leserahmen für die frühen und späten Gene zusätzlich eine nicht-kodierende Region. Die *Upstream Regulatory Region* (URR) ist essentiell für die transkriptionelle Regulation der viralen Gene. Die URR besitzt Bindestellen für verschiedene virale und zelluläre Proteine, sowie den Promotor für die Transkription der frühen Gene [5]. Außerdem enthält die URR den Replikationsursprung (Ori), der für die Replikation der viralen Genome von entscheidender Bedeutung ist und eine große Ähnlichkeit mit den autonom replizierenden Sequenzen von Säugetieren aufweist [6, 7]. Die frühe Region besitzt offene Leserahmen (ORF) für die frühen viralen Gene (E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8) welche vom frühen viralen Promotor (P<sub>97</sub> für HPV16 und HPV31), welcher sich in der URR befindet, reguliert werden [8, 9]. Die späte Region besitzt Leserahmen für die späten viralen Gene (L1, L2). Diese werden differenzierungsabhängig vom späten viralen Promotor (P<sub>670</sub> für HPV16) reguliert [8, 10].



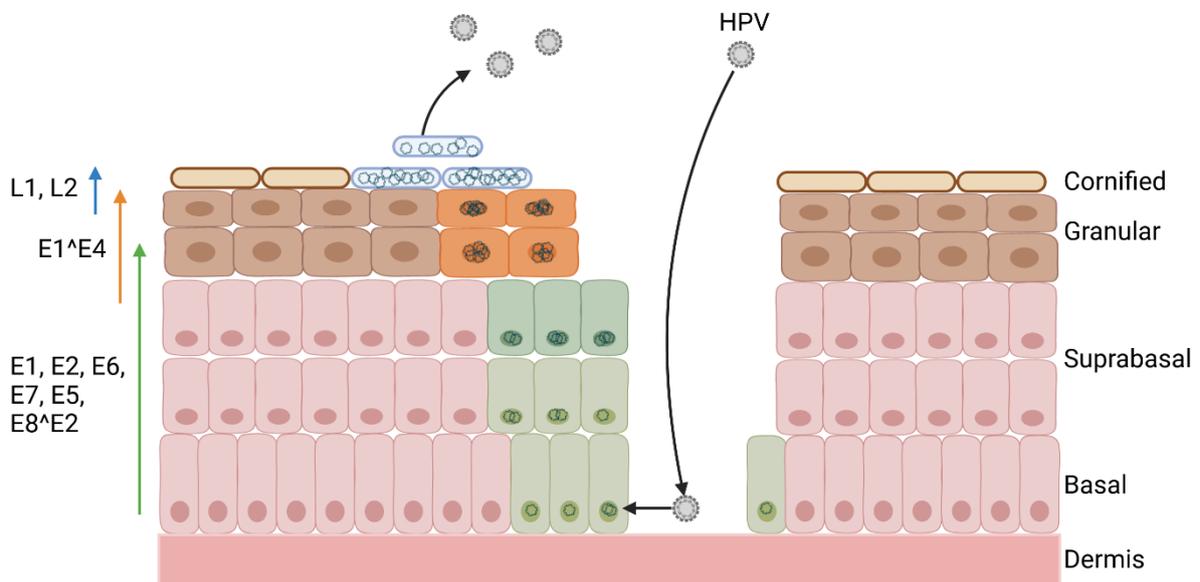
**Abbildung 1:** Struktur des Genoms von HPV16. Dargestellt ist die URR (grau) mit den E1- und E2-Bindestellen. Der frühe (P<sub>97</sub>), der späte (P<sub>670</sub>), sowie der E8-Promotor sind als Eckpfeile dargestellt. Die frühen Gene sind in grün und die späten Gene in blau, sowie die Spleißprodukte E1<sup>E4</sup> und E8<sup>E2</sup> in orange dargestellt. Das frühe und späte Polyadenylierungssignal sind als gestrichelte Linie dargestellt. Erstellt mit SnapGene.

Zusätzlich werden das Spleißprodukt E1<sup>E4</sup>, sowie E5 vom späten Promotor, welcher sich im E7 ORF befindet, reguliert. Außerdem wird das Fusionsprotein E8<sup>E2</sup> von einem zusätzlichen Promotor (P<sub>E8</sub>) im E1 Leserahmen exprimiert [11].

Die frühe und die späte Region werden durch das frühe Polyadenylierungssignal (PAE) separiert. Außerdem befindet sich ein spätes Polyadenylierungssignal (PAL) zwischen dem späten Leserahmen L1 und der URR [12]. Alle ORFs befinden sich auf demselben Strang des doppelsträngigen viralen Genoms, was zur Folge hat, dass die Transkription von PV unidirektional und nur von einem Strang des viralen Genoms erfolgt [7].

### 3.3 Der virale Lebenszyklus

HPV vermehren sich in Keratinozyten, dem primären Zelltyp des Haut- und Schleimhautepithels, und haben ihren Replikationszyklus an den Differenzierungszustand der infizierten Zelle angepasst [13, 14]. In basalen Keratinozyten durchlaufen HPV einen nicht-produktiven, persistenten Replikationszyklus, der durch eine geringe virale Genexpression und Genomreplikation gekennzeichnet ist [13, 14]. Wenn infizierte Zellen in die suprabasale Schicht wandern, treten sie wieder in den Zellzyklus ein und beginnen ihr terminales Differenzierungsprogramm, das für die produktive Replikation erforderlich ist [13, 14].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Lebenszyklus von HPV. HPV infiziert die undifferenzierte Basalzellschicht durch Mikroläsionen der Haut. Nach Durchwanderung der verschiedenen Epithelzellschichten werden neue Viruspartikel, durch Ablösen von verhornten Zellen, freigesetzt. Die farbigen Pfeile geben die Expression der viralen Proteine in den unterschiedlichen Zellschichten an. Die Abbildung wurde mit BioRender.com angefertigt.

Die produktive Replikation findet in der oberen Stachelzellschicht des Epithels (*Stratum spinosum*) statt und ist durch die Amplifikation der viralen DNA-Genome und die Aktivierung des viralen späten Promotors im E7-Gen gekennzeichnet, der bei HPV16 mit P<sub>670</sub> und bei HPV31 mit P<sub>742</sub> bezeichnet wird [8, 9]. Die Aktivierung von P<sub>670</sub> führt zu einer Expression eines gespleißten E1<sup>E4</sup>-Transkripts, das zu einer starken Expression des E1<sup>E4</sup>-Proteins führt, einem Marker für eine produktive Replikation [15]. Schließlich kodieren P<sub>670</sub>-Transkripte, die am späten Polyadenylierungssignal enden, die L1- und L2-Kapsidproteine, was die Bildung infektiöser Virionen in der *Stratum granulosum* ermöglicht [16].

Im Gegensatz zum wichtigsten frühen Promotor P<sub>97</sub>, der die Expression der Onkogene E6 und E7 antreibt, ist die Regulierung des späten Promotors noch nicht vollständig geklärt. Die extrachromosomale Aufrechterhaltung der viralen Genome ist für seine Aktivität bei der Differenzierung erforderlich [17]. Die Aktivierung des späten HPV31-Promotors P<sub>742</sub> in differenzierten Zellen erfolgt jedoch auch, wenn die Genomamplifikation blockiert ist [18, 19]. Dies macht es wahrscheinlich, dass die differenzierungsabhängige Aktivierung des späten Promotors der Genomamplifikation vorausgeht. Die Aktivität des späten Promotors wird durch Sequenzen in E7 gesteuert, die die Startstellen des späten Promotors und die virale *Upstream Regulatory Region* (URR) umgeben, die wiederum transkriptionelle Enhancer-Elemente, den frühen Hauptpromotor, den Replikationsursprung und DNA-Bindungsstellen für virale E1-, E2- und E8<sup>E2</sup>-Proteine beherbergt [18, 20].

Während zahlreiche zelluläre Transkriptionsfaktoren nachweislich in differenzierungsabhängiger Weise an virale Genome binden [21, 22], wurde bisher nur für C/EBP-beta und KLF4 eine funktionelle Beteiligung an der Kontrolle der späten Promotoraktivität nachgewiesen [10, 23, 24]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HPV16 P<sub>670</sub> auf differenzierungsabhängige Weise auf der Ebene der Transkriptionselongation aktiviert wird, an der die Proteine CDK8, CDK9 und BRD4 mitwirken [20]. CDK8 ist eine Komponente des Mediator-Kinase-Moduls, das die Transkription der RNA-Polymerase II kontrolliert [25]. CDK9 ist Teil des positiven transkriptionellen Elongationsfaktors beta (P-TEFb), der für den Übergang von der frühen zur produktiven Elongation der Transkription durch die RNA-Polymerase II erforderlich ist [26]. P-TEFb wird von BRD4 rekrutiert, um die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der Polymerase II zu fördern [27].

Die Beobachtung, dass replizierende virale Genome, aber nicht das Amplifikationsereignis an sich, für die Induktion des späten Promotors in differenzierenden Zellen erforderlich sind, könnte darauf hindeuten, dass extrachromosomale Genome bevorzugt Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle rekrutieren, die für die Aktivität des späten Promotors erforderlich sind, oder dass virale Proteine, die an der Genomreplikation beteiligt sind, ebenfalls zur Aktivität des späten Promotors beitragen.

## **3.4 Die viralen Proteine**

### **3.4.1 Die viralen E6 und E7 Onkoproteine**

Die Haupttreiber der HPV-vermittelten Entstehung von Gebärmutterhalskrebs sind die Onkoproteine E6 und E7 der Hochrisikotypen [28]. Gemeinsam bewirken sie eine Deregulierung des Zellzyklus, die Umgehung der zellulären Immunantwort, eine Verzögerung der Differenzierung und eine Hemmung der Apoptose in der Keratinozyten-Wirtszelle, um ein für die virale Replikation günstiges Umfeld zu schaffen [14, 28]. E7 bindet an das Retinoblastom-Protein und bewirkt dadurch dessen Abbau, was dazu führt, dass die Wirtszelle wieder in die S-Phase eintritt [29-31]. Das Tumorsuppressor-Protein p53 wird bei einer Vielzahl von zellulären Stressfaktoren wie DNA-Strangbrüchen, hyperproliferativen Signalen oder oxidativem Stress aktiviert [32]. Es reguliert in Folge darauf verschiedene Zellantworten, wie die zelluläre Seneszenz und Apoptose [32]. Um dies zu unterdrücken interagiert E6 von Hochrisikotypen mit p53 und dem E6-assoziierten Protein (E6-AP) [33, 34]. Die Ubiquitinierung von p53 zum Beispiel durch die E3 Ubiquitin-Ligase E6-AP führt zur Degradation von p53 durch das Proteasom [33, 35].

### **3.4.2 Die Kapsidproteine L1 und L2**

L1 und L2 bilden zusammen das virale Kapsid, welches das HPV-Genom umschließt [36]. L1 ist das Hauptkapsidprotein von HPV und ist in der Lage sich spontan zu virusähnlichen Partikeln zusammenzusetzen [37]. Das virale Kapsid besteht aus 72 L1-Pentameren und circa einem Fünftel aus L2-Proteinen, die vor allem die Innenseite des Kapsids auskleiden [36, 37]. Durch seine Wechselwirkungen mit Heparansulfat (HS)-Proteoglykanen auf der Zellmembran ist L1 für den Eintritt und die Infektion der Wirtszelle hauptverantwortlich. Das L2-Protein unterstützt die Verpackung der viralen DNA und trägt zur Stabilität des Kapsids bei [36, 38].

### **3.4.3 Die E1 Helikase**

Das E1-Protein ist eine ATP-abhängige Helikase und ist essentiell für die Replikation von HPV. Es bindet an den viralen Replikationsursprung und entwindet die virale DNA, um die Replikation einzuleiten [39]. E1 interagiert mit E2, welches die Rekrutierung von E1 an den Replikationsursprung und so die Initiation der HPV-DNA-Replikation unterstützt [40, 41].

Außerdem stellt E1 den größten und am höchsten konservierten offenen Leserahmen (ORF) des PV-Genoms dar [40]. Für seine Aktivität als Helikase bildet E1 Hexamere, welche ATPase-Aktivität aufweisen, die für die Entwindung der DNA-Stränge benötigt wird [42, 43]. Durch zelluläre Proteine wie die DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase, Topoisomerase I und dem Replikationsprotein A wird die virale DNA dann repliziert [40]. Das virale Genom besitzt im Replikationsursprung (Ori) sechs überlappende

E1-Bindestellen, welche sowohl in der Sequenz als auch in der Position in anderen Papillomavirus-Ori konserviert sind [44].

### 3.4.4 Das regulatorische E2-Protein

Ein wichtiger Regulator des Lebenszyklus von HPV ist das virale E2-Protein. Es besteht aus einer konservierten N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), einer konservierten C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (DBD), sowie der variablen *Hinge*-Domäne, welche als Linker dient und in ihrer Länge stark zwischen den verschiedenen HPV Typen variiert [45, 46].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des E2-Proteins von HPV. E2 wird in die N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) und die C-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne eingeteilt, die von der variablen Hinge, als Linker verbunden sind.

Die C-terminale DBD vermittelt die Dimerisierung und die spezifische Erkennung von ACCN<sub>6</sub>GGT-DNA-Sequenzen [47]. Die N-terminale Domäne ist für die Aktivierung der Replikation, die Modulation der Transkription und die Bindung von PV-Genomen an mitotische Chromosomen erforderlich [46]. Diese Funktionen werden durch Interaktionen mit dem viralen E1-Protein sowie mit Wirtsproteinen vermittelt, die hauptsächlich an die N-terminale Domäne von E2 binden [46].

Die meisten HPV-Typen weisen drei bis 5 konservierte E2-Bindestellen (E2BS) in der URR des viralen Genoms auf [48]. Jede Stelle wird durch eine variable Bindungsaffinität für das E2-Protein unterschiedlich reguliert, was zu unterschiedlichen Replikations- und Transkriptionseffekten während des viralen Lebenszyklus führt [49-51].

So kann die Besetzung der E2-Bindungsstellen durch E2 in Bezug auf den frühen PV-Promotor als repressiver oder aktivierender Transkriptionsfaktor wirken [46, 52]. Zelluläre Faktoren wie Sp1 und TBP, die als Transkriptionsaktivatoren dienen, werden durch die Bindung von E2 an zwei proximalen E2-Bindungsstellen, sterisch daran gehindert an dazu überlappende Promotorelemente im viralen Genom zu binden [47, 53, 54]. Die transkriptionellen Eigenschaften von E2 sind eng mit dessen hochkonservierten Interaktionspartner BRD4 verbunden [55].

Zusätzlich ist E2 an der Segregation des viralen Genoms beteiligt, indem es das Genom an das mitotische Wirtszellchromatin bindet [56]. Durch seine Interaktion mit E1 ist E2 ebenso entscheidend für die Replikation des viralen Genoms [46]. Im Falle von beta- und kappa-PV, die die Haut außerhalb des Anogenitalbereichs infizieren, scheint E2 auch onkogene Aktivitäten zu haben [57, 58]. Darüber hinaus zeigt HPV E2 auch eine starke Transkriptionsaktivierungsfunktion, die bisher aber nur bei

synthetischen Transkriptionseinheiten, die aus multimerisierten E2BS und einem Minimalpromotor bestehen, deutlich wurde [59].

Weiterhin ist die Menge des HPV16 E2-Proteins in suprabasalen, Zellen des Epithels erhöht und ist intrazellulär an Stellen der viralen Genomamplifikation lokalisiert [60]. In Übereinstimmung damit weist ein kleiner Teil der kultivierten HPV16-positiven Zellen eine Anhäufung von HPV16 E2 in Foci im Zellkern auf, welche virale Replikationszentren darstellen [61].

Neben E2 existiert noch eine verkürzte Form, die durch alternatives Spleißen entsteht und E8<sup>E2</sup> genannt wird [46, 62, 63]. Das E8<sup>E2</sup>-Protein hat mit E2 die C-terminale DBD und die Hinge gemeinsam, besteht am N-Terminus aber aus einer kurzen E8-Sequenz [62]. E8<sup>E2</sup> reprimiert sowohl die virale Replikation, als auch die Transkription, indem es an E2BS bindet und NCoR/SMRT-Korepressor-Komplexe an virale Replikationszentren rekrutiert [64-68]. Dem folgend zeigen Zelllinien, welche HPV E8<sup>E2</sup>-Knockout-Genome enthalten, eine deutlich erhöhte Kopienzahl an HPV-Genomen, sowie eine erhöhte virale Transkription [67, 69-72].

### 3.5 BRD4

Einer der am besten charakterisierten Interaktoren von E2 ist das *Bromodomain-containing Protein 4* (BRD4), das zur Familie der BET-Proteine (*Bromodomain and extra-terminal Domain Protein*) gehört [73]. Als Gerüstprotein rekrutiert BRD4 eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Chromatinregulatoren zur Steuerung der Transkription [73, 74]. BRD4 rekrutiert verschiedene zelluläre Faktoren an das Chromatin, dazu gehören der positive Transkriptionelongationsfaktor b (P-TEFb), der Mediator-Komplex, die Arginin-Demethylase JMJD6, die Lysin-Methyltransferase NSD3, ATP-abhängige Chromatin-Remodellierer, sowie DNA-Sequenz-spezifische Transkriptionsregulatoren [27, 73-78].

BRD4 beeinflusst die Transkription durch direkte und indirekte Mechanismen, die zur Phosphorylierung der RNA-Polymerase II (Pol II) führen [79]. Dazu rekrutiert es Transkriptionsinitiations- und Elongationsfaktoren wie P-TEFb oder Top I, die wiederum die Transkription stimulieren, indem sie das Pausieren von Pol II an der promotorexternen Region auflösen [80]. E2 bindet an den extremen C-Terminus von BRD4 innerhalb des C-terminalen Motivs (CTM) und konkurriert dadurch mit P-TEFb um diese Bindungsstelle, was zur Repression des frühen HPV-Promotors beiträgt [81]. Die Bindung von BRD4 an E2 verhindert den Abbau von E2, moduliert die E2-vermittelte Transkription und trägt bei manchen HPV-Typen zur Bindung des viralen Genoms an das mitotische Wirtszellchromatin und somit an die Erhaltung und Verteilung des viralen Genoms während des Zellteilungsprozesses bei [80]. In einem Kaninchenmodell führte eine Mutation im E2-Gen des Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV), welche die Bindung von E2 an BRD4 verhindert, dazu, dass

die Entstehung von Papillomen komplett unterbunden wurde [82]. Der Knockdown von BRD4 hatte denselben Effekt auf die Entstehung von Papillomen im Kaninchenmodell [58].

Neben BRD4 existieren zwei weitere Isoformen, denen beiden das C-terminale Ende und damit die HPV-E2-Interaktionsdomäne in der CTM fehlt. Die Aminosäuren 1-719 sind in allen drei Isoformen identisch. Die Isoform B hat zusätzliche 75 Aminosäuren am C-Terminus und wurde bisher nur in U2OS-Zellen beschrieben [83]. Die Isoform C, auch BRD4S genannt, hat dagegen ein einzigartiges GPA-Sequenzmotiv am C-terminalen Ende und ist in allen bisher untersuchten Zelllinien vorhanden [84].

Wu et al. zeigten, dass E2 von HPV16 und 18 neben der CTM auch über die phosphorylierungsabhängige Interaktionsdomäne (PDID) mit BRD4 interagieren kann [85]. BRD4S enthält ebenfalls die PDID und ist somit ebenfalls in der Lage mit bestimmten E2 zu interagieren [86]. BRD4S wirkt im Gegensatz zu BRD4 hauptsächlich als negativer Regulator der E2-abhängigen Transkription. Interessanterweise führte ein Knockdown von BRD4S in undifferenzierten HPV31-positiven CIN612-9E-Zellen zu einer starken Induktion der späten viralen Gene, was darauf hindeutet, dass BRD4S die Expression des hoch immunogenen L1-Kapsidproteins reduziert [86].

Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass das Verhältnis von BRD4 zu BRD4S für die HPV-Transkription entscheidend ist.

Die Rolle von BRD4 bei der Replikation des PV-Genoms scheint zelltyp- und kontextabhängig zu sein, wie Überexpressionsstudien von viralen Proteinen zeigen. In Abwesenheit von E1 oder E2, oder wenn jedes Protein einzeln exprimiert wird, ist BRD4 in kleinen Punkten im gesamten Zellkern lokalisiert. Wenn E1 und E2 gemeinsam exprimiert werden, wird BRD4 reorganisiert und zusammen mit E1 und E2 in Kernfoci konzentriert [87]. Sobald jedoch die virale Genomamplifikation beginnt, wird BRD4 an die Peripherie der Replikationsfoci verlagert [87]. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass BRD4 eine Rolle beim Wechsel von der anfänglichen Amplifikation zur Aufrechterhaltungsreplikation spielt, aber nicht an der produktiven Amplifikation des viralen Genoms in terminal differenzierten Zellen beteiligt ist [87]. Interessanterweise können HPV31-Genome, die BRD4-CTM-bindungsdefiziente E2-Proteine kodieren (E2 I73L; E2 I73A) in Zelllinien stabil als extrachromosomale Elemente replizieren [87-89]. Im Gegensatz dazu konnte ein vergleichbares HPV16-Mutantengenom (E2 I73A) keine Episomen in menschlichen Keratinozyten aufrechterhalten [88], was darauf hindeutet, dass die E2-BRD4-Interaktion nur für die stabile Replikation einiger PV-Typen erforderlich sein könnte.

Die Interaktion von E2 und BRD4 scheint auch Einfluss auf die zelluläre Transkription zu haben. So konnte gezeigt werden, dass E2 und BRD4 gemeinsam an aktive Promotoren des Wirtszellgenoms binden und so zusammen die Transkription von zellulären Genen regulieren [88, 90, 91].

### 3.6 Fam133B

Fam133B wurde bisher kaum beschrieben und über seine Funktion ist bisher nur sehr wenig bekannt. Ein Paralog von Fam133B, Fam133A ist ein Testis-Antigen und wird ausschließlich in immunprivilegierten Geweben wie den menschlichen Hoden und dem Gehirn exprimiert und ist ein unabhängiger prognostischer Schutzfaktor für Gliompatienten [92, 93]. Bei einer Proteom-weiten Untersuchung wurde Fam133B als mRNA-bindendes Protein identifiziert [94].

### 3.7 Das Zinkfingerprotein ZC3H4

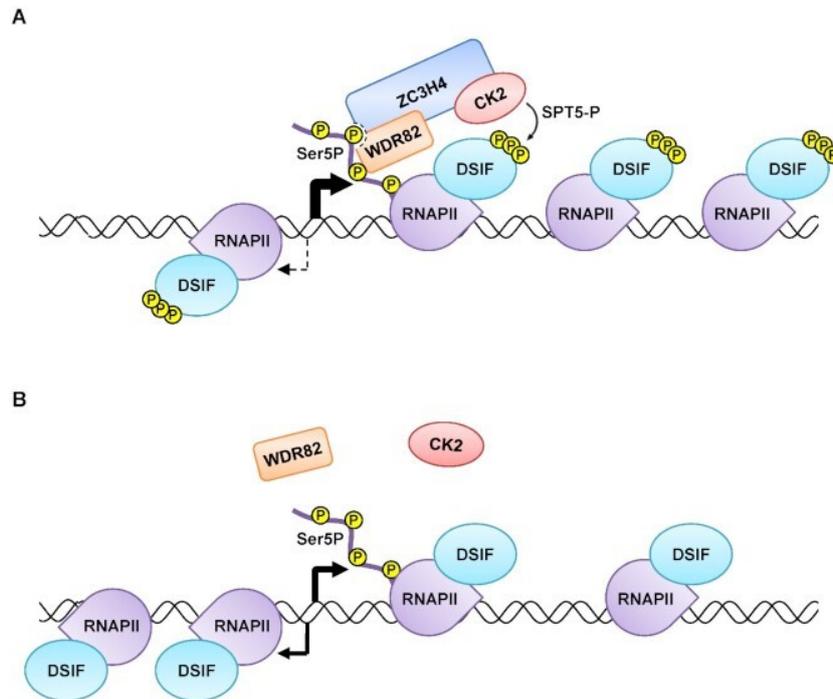
ZC3H4 (Zinc finger CCCH domain-containing protein 4) ist an der Kontrolle der Genexpression beteiligt und Teil eines Kontrollpunkts, der die Transkriptionstermination von langen nicht-kodierenden (lncRNA), Enhancer- (eRNA) und Antisense-Promotor Upstream-Transkripten (PROMPTs) und deren anschließenden Abbau durch das Exosom fördert [95-100].

Verschiedene Studien zeigen, dass ZC3H4 an Transkriptionsstartstellen aktiver zellulärer Gene vorhanden ist und mit der RNA-Polymerase II ko-lokalisiert [95, 97, 99].

Zusammen mit dem *WD40 repeat domain 82* -Protein (WDR82) bildet ZC3H4 einen Komplex, der eine vorzeitige Transkriptionstermination von instabiler nicht-kodierender RNA bewirkt [95, 96, 98, 99].

ZC3H4 reguliert jedoch nicht nur nicht-kodierende, sondern auch proteinkodierende RNAs [97-99], aber der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht vollkommen geklärt.

Park et al. zeigen, dass ZC3H4 zusätzlich zu WDR82 mit der Caseinkinase 2 (CK2) einen Komplex (ZWC) bildet und so divergente Antisense-Transkription reguliert [99]. Dabei binden sowohl ZC3H4, als auch WDR82 an das N-terminale Ende der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II. Dadurch wird CK2 an den *DRB sensitivity-inducing factor* (DSIF) rekrutiert und phosphoryliert dort die SPT5-Untereinheit von DSIF. DSIF ist wichtig für die Prozessivität der RNA Polymerase II während der frühen und produktiven Elongationsphasen [99, 101]. Park et al. vermuten, dass die Phosphorylierung von SPT5 den Übergang von der frühen zur produktiven Elongation in Richtung der Sense-Transkription erleichtern könnte [99]. In Abwesenheit von ZC3H4 ist der ZWC-Komplex destabilisiert, und CK2 ist nicht in der Lage, SPT5 zu phosphorylieren. Wenn die N-terminale Domäne von SPT5 nicht phosphoryliert wird, kann SPT5 den Übergang von der frühen zur produktiven Elongation in Richtung der Sense-Transkription nicht vollständig unterstützen. Dies erhöht die RNAPII-Population, die sich in die entgegengesetzte Richtung bewegt, und führt zu einer erhöhten divergenten Antisense-Transkription und einer verringerten Sense-Transkription [99].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Phosphorylierung von SPT5 durch den ZWC-Komplex. **A)** ZC3H4 und WDR82 binden gemeinsam an das phosphorylierte Serin 5 am C-terminalen Ende der RNA Polymerase II. Dadurch wird CK2 von ZC3H4 an DSIF rekrutiert und kann so dessen SPT5-Untereinheit phosphorylieren. **B)** In Abwesenheit von ZC3H4 wird die SPT5-Untereinheit durch CK2 nicht mehr phosphoryliert und somit der Übergang zur produktiven Elongation in Sense-Richtung nicht mehr vollständig unterstützt. Dies führt zu einer erhöhten Elongation der RNA Polymerase II in Antisense-Richtung. (Nach Park K. et al. 2022 [99])

### 3.8 Zielsetzung

Das virale E2-Protein spielt sowohl für die virale Replikation, als auch die transkriptionelle Regulierung eine wichtige Rolle [45, 46, 102, 103]. Dabei interagiert es mit viralen und zellulären Genen und rekrutiert diese an die virale DNA [46, 86, 104-106]. So bindet E2 an den Transkriptions- und Elongationsfaktor BRD4, sowie an die verkürzte Spleißvariante BRD4S und hat so großen Einfluss auf die virale Replikation und Transkription [55, 85, 86, 107]. Verschiedene Studien zeigten bereits, dass E2 als Transkriptionsmodulator sowohl im viralen, als auch zellulären Kontext aktiv ist [91, 108, 109]. Es sollte untersucht werden, inwiefern die Interaktion von E2 und BRD4 Einfluss auf die zelluläre, wie virale Transkription ausübt. Dazu sollte via RNA-Sequenzierung das Transkriptom von HPV31 positiven Keratinozyten mit BRD4-bindungsdefizientem E2, mit dem von HPV31-Wildtyp-Zelllinien verglichen werden. Zusätzlich sollte über den Knockdown von BRD4 und BRD4S die durch die Interaktion regulierten Gene spezifisch identifiziert werden.

Darüber hinaus sollten neue potentielle Interaktionspartner von E2 identifiziert und deren Rolle für den viralen Lebenszyklus untersucht werden. Dafür wurde ein *BioID-Proximity-Labeling* mit E2 von

verschiedenen HPV-Typen durchgeführt. Mittels Immunfluoreszenz und Ko-Immunpräzipitation sollten dann potentielle Interaktionspartner näher untersucht werden. Anschließend sollte die Funktionalität dieser Interaktion mit E2 charakterisiert werden. Da E2 vor allem eine wichtige Rolle in der viralen Replikation, sowie der Transkription spielt, sollte vor allem der Einfluss der potentiellen Interaktionspartner darauf untersucht werden. So ist die Transkription der frühen viralen Gene durch die Aktivierung des frühen viralen Promotors P<sub>97</sub> gut untersucht, aber die differenzierungsabhängige Aktivierung des späten Promotors noch weitestgehend unklar, eine Rolle von E2 dabei aber sehr wahrscheinlich. Dies sollte sowohl mit Hilfe von Reporterassays, als auch zusätzlich im Kontext von replizierenden HPV-Genomen bewerkstelligt werden und so neues Licht auf die differentiell abhängige Aktivierung des späten viralen Promotors geworfen werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem, BioRad, Biozym Scientific, Carl Roth, Fluka (Honeywell), Medac, Merck, PJK, Roche, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific und VWR. Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „*pro analysis*“ (sofern nicht anders angegeben).

#### 4.1.2 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung	Verwendung
CAPS-Puffer	10 mM CAPS 10 % (v/v) Methanol pH 10,3	Western-Blot
DNA Ladepuffer (10x)	20 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) SDS 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0) 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol	zur DNA-Auftrennung im Agarosegel
Ethidiumbromidlösung	0,025 % (250 µg/mL) fertige Lösung	Anfärben der DNA im Agarosegel
Firefly-Luciferasepuffer	100 mM K-PO <sub>4</sub> (pH 7,8) 15 mM MgSO <sub>4</sub> 5 mM ATP 1 mM D-Luciferin	Luciferase-Assay
Luciferase-Lysepuffer	100 mM K-PO <sub>4</sub> (pH 7,8) 1 % (v/v) Triton-X-100 1 mM DTT	Lysieren der Zellen für den Luciferase-Assay
PBS (10x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,2)	Waschpuffer
PBS-T	PBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween®20	Waschpuffer
RIPA	1 % (v/v) IGEPAL CA-630 1 % (v/v) Natriumdesoxycholat	Lysepuffer für Western Blot

	0,1 % (v/v) SDS 150 mM NaCl 10 mM Natriumphosphat (pH 7,2) 2 mM EDTA 50 mM Natriumfluorid 1x Complete EDTA-freier Protease Inhibitor 1x PhosStop	
ROTI-Load 1 (4x)	fertig angesetzte Lösung	SDS-Gel
Blockier-Puffer	3 % (w/v) BSA fraction V in PBS	Western Blot
SDS-Laufpuffer (5x)	125 mM Tris-HCl 960 mM Glycin 17,3 mM SDS	SDS-Gel
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA (pH 8,0)	Agarosegel
Sammelgel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	SDS-Gel
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	SDS-Gel
Puffer zur Antikörperverdünnung	1x PBS 1 % (w/v) BSA fraction V 0,3 % (v/v) Triton-X 100	Immunfluoreszenz
Blockier-Puffer	1x PBS 5 % (v/v) normales Ziegen-/Eselserum 0.3 % (v/v) Triton-X 100	Immunfluoreszenz
CoIP-Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 6.8) 50 mM DTT 1 % SDS 1 mM EDTA 0,005 % Bromphenolblau 10 % Glycerin	Ko-Immunpräzipitation
Einbettmedium	25 % (v/v) Glycerin 10 % (w/v) Mowiol 4-88 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)	Immunfluoreszenz
Renilla-Luciferasepuffer	Gaussia-Juice 1 mM Coelenterazin	Luciferase-Assay

#### 4.1.2.1 Medien zur Bakterienkultivierung

Name	Zusammensetzung	Hersteller
Bakterien-Einfriermedium	65 % (v/v) Glycerin 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 2,5 mM Tris (pH 8,0)	
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	25 g/L LB-Medium 100 µg/mL Ampicillin oder 30 µg/mL Kanamycin bei Bedarf hinzugeben	Carl Roth
LB-Agar	25 g/L LB-Medium 12 g/L Select Agar 100 µg/mL Ampicillin oder 30 µg/mL Kanamycin bei Bedarf hinzugeben	Carl Roth Invitrogen
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glukose (pH 7)	

#### 4.1.2.2 Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Name	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + FKS	Fertiglösung 50 mg/L Gentamycin 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Gibco Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + CS	Fertiglösung 50 mg/L Gentamycin 10 % (v/v) Kälberserum (CS)	Thermo Fisher PAA Laboratories
E-Medium	50 % DMEM 50 % DMEM/Ham's F12 1:1 5 % Fötales Kälberserum (HyClone, HC) 1,8 nM Adenin 417 µg/mL Hydrocortison 50 µg/mL Insulin 50 µg/mL Transferrin 20 pM Trijodthyronin T3 10 nM Choleratoxin 5 ng/µL epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Thermo Fisher Thermo Fisher Cytiva

	100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	
Keratinocyten-serumfreies Medium (KFSM)	Serumfreies Medium zur Kultivierung von Keratinocyten Zusatz von Rinderhypophysenextrakt und EGF (13028-014/10450-013) 50 mg/L Gentamycin	Thermo Fisher
OptiMEM	Serumreduziertes Medium mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin)	Thermo Fisher
Mitomycin-C	0,4 mg/mL in PBS	Medac
PBS Dulbecco's	Fertiglösung ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat	Invitrogen
Trypsin-EDTA	0,5 g Trypsin 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter PUCK's Salzlösung A	Invitrogen

#### 4.1.2.3 Zum Gebrauch fertige Reaktionssysteme und Reagenzien

Name	Verwendung	Hersteller
FuGENE®HD Transfection Reagent	Transfektion von Plasmid-DNA	Promega
Gaussia Juice Big Kit	Renilla-Luciferase-Aktivität im Luciferaseassay	PJK
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Standard für die DNA-Elektrophorese	Thermo Fisher
LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix	Real-Time qPCR	Roche
Lipofectamin RNAiMAX	Transfektion von siRNA	Invitrogen
PageRuler Prestained Protein Ladder	Proteinelektrophorese-Standard	Thermo Fisher
QIAprep®Spin Miniprep Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAgen®Plasmid Midi Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen
QIAgen®Plasmid Maxi Kit	Isolation von Plasmid-DNA	Qiagen

QIAgen® Gel extraction Kit		DNA-Gelextraktion	Qiagen
QIAshredder® Kit		Homogenisierung des Zelllysats	Qiagen
QuantiTect® Transcription Kit	Reverse	cDNA-Synthese	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit		Ligation von DNA	Thermo Fisher
RNeasy® Mini Kit		Isolation von RNA	Qiagen
DNeasy Blood & Tissue Kit		Extraktion von DNA	Qiagen
SimpleChIP® Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	Enzymatic	Chromatinimmunpräzipitation	Cell Signaling

### 4.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoclav	ZIRBUS Technology
Biophotometer Spectrophotometer	Eppendorf
Biorobot EZ1® DSP Workstation	Qiagen
Certomat IS Shaking Incubator b.	Braun Biotech
CO2 Inkubator C200	LaboTect
Durchlichtmikroskop	DM IRB Leica Camera
Herasafe Sterile Werkbank	Thermo Fisher
Intas Gel iX20 Imager Intas	Science Imaging Instruments
Kelvitron® T Inkubator	Heraeus
LI-COR Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences
Lightcycler® 480 Instrument	Roche
MACS Quant Analyzer VYB Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec
Milli-Q UF Plus	Merck
Mini-, Wide-, Sub Cell GT Agarose-Gelelektrophorese- Kammern	Bio-Rad Laboratories
Mr. Frosty Einfrierbox	Thermo Fisher
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher
Neubauer Zählkammer 0,100 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht
PCT 200 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories

pH-Meter WTW pH 526	Xylem
PIPETMAN Classic TM p10/20/200/1000	Gilson
Pipettierhilfe, easypet® 100	Eppendorf
Pipettor Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Powerpac 200 Bio-Rad	Laboratories
Präzisionswaage GJ und 770	KERN + SOHN
Reax Top Vortexer	Heidolph Instruments
Research® Pro Elektronische Pipette 5 - 100 µl	Eppendorf
SonoPuls Sonifier UW 2200	Bandelin electronic
Sprout Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermostat plus	Eppendorf
Trans-Blot Cell Blotkammer	Bio-Rad Laboratories.
Tristar2s	Berthold Technologies
UV Transilluminator NU-72 KL	Konrad Benda Laborgeräte
Vacunsafe Vacuum-Absaugungsvorrichtung	INTEGRA Biosciences
Wasserbad WB10	Memmert
Zentrifugen 5417R, 5424R, 5804R, 5810R	Eppendorf

#### 4.1.4 Verbrauchsmaterial

Material/ Gerät und Bezeichnung	Hersteller
Blue Cap Reaktionsgefäße, 15 mL und 50 mL	Greiner bio-one
Deckgläschen 24x36 mm	R.Langenbrinck
Einweg-Skalpelle	B.Braun Biotech
Gel-Blotting-Filterpapier	Whatman
Multiwell 6 well (non-tissue culture treated)	Falcon
Nitrozellulose-Membran, protran (0,22 µm)	GE healthcare
PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2 mL	Biozym®
Plastikpipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Thermo Fisher
Pipettenspitzen gestopft (10, 20, 200, 1000 µL), ART®	Molecular Bio Products
Aerosol Resistant Tips	
Pipettenspitzen 0,5-10 µL	Biozym®
Pipettenspitzen 20-1000 µL	Greiner
Reaktionsgefäße: 1,5 mL; 2 mL	Eppendorf

Röhrchen für Bakterienkulturen, PP-Tube 14 mL steril	Greiner
Real-Time Platten, LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
Röhrchen für Bakterienstock, Cryotube 3,5 mL SI	Thermo Fisher
Röhrchen für FACS basierten FRET-Assay 5 mL Polystyrene	Falcon®
Round Bottom Tube	
Röhrchen für Luciferase-Messung, 5 mL	Sarstedt
Sterilfilter: 0,2 µm und 0,44 µm	Millipore
Transfektionsröhrchen: 3,5 mL	Sarstedt
Zellkulturplatten: 24x10 mm; 12x22 mm; 6x35 mm	Nunc
Zellschaber	Corning

#### 4.1.5 Oligonukleotide

Primername	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
		Klonierung
Kpn2I HPV5-β-E2-F	ATGCTCCGGAATGGAGAATCTCAG	pmTAG-BFP-HPV5-E2 N-Ter
BamHI HPV5-β-E2-R	ATGCGGATCCTTAAAGACTGTCCAGG	
Kpn2I HPV8-β-E2-F	TATATCCGGAATGGAGAATCTCAGCGAGCG	pmTAG-BFP-HPV8-E2 N-Ter
BamHI HPV8-β-E2-R	GCATGGATCCTTATAGACTGTCC	
Kpn2I HPV38-β-E2-F	TATATCCGGAATGGAAACTCTCAGCGC	pmTAG-BFP-HPV38-E2 N-Ter
Sall HPV38-β-E2-R	GCGCGTTCGACCTATAAATCATCAAATTG	
BglII HPV49-β-E2-F	GCATAGATCTATGGAGGCACTCAACG	pmTAG-BFP-HPV49-E2 N-Ter
EcoRI HPV49-β-E2-R	GCGCGCGAATTCTTAAAGCTTATCAAATT	
Kpn2I CRPV-E2-HA-F	TATATCCGGAGAGGCACTGTCTCAGAGGCT	pmTAG-BFP-HPVCRPV-E2 N-Ter
Sall CRPV-E2_HA-R	TATACCGGATCCGATGATGTCGA	
Kpn2I HPV58-alpha-E2-F	GCGCTCCGGAATGGAGGAAATATCA	pmTAG-BFP-HPV58-E2 N-Ter
BamHI HPV58-alpha-E2-R	GCGCGGATCCTTACAATGACATAACAC	
Kpn2I HPV59-alpha-E2-F	TAGCTCCGGAATGCAGACAGTGATG	pmTAG-BFP-HPV59-E2 N-Ter
BamHI HPV59-alpha-E2-R	GCGCGGATCCTTACACACTCATATACC	
Kpn2I HPV2-alpha-E2-F	TATATCCGGAATGGAAACTGGCG	pmTAG-BFP-HPV2-E2 N-Ter
BamHI HPV2-alpha-E2-R	GCGCGGATCCTTATACAAATGCAGAC	
Kpn2I HPV27-alpha-E2-F	GCATTCCGGAATGGAAACTAGC	pmTAG-BFP-HPV27-E2 N-Ter
BamHI HPV27-alpha-E2-R	GCATGGATCCCTATACAAAGGCAGAC	
Kpn2I HPV82-alpha-E2-F	TAGCTCCGGAATGGAGACCCTATGT	pmTAG-BFP-HPV82-E2 N-Ter
BamHI HPV82-alpha-E2-R	GCGCGGATCCTTACTACTGCATAATACC	

Kpn2I HPV197-β-E2-F	TATATCCGGAATGGAGTGGCTG	pmTAG-BFP-HPV197-E2 N-Ter
Sall HPV197-β-E2-R	GCGCGCGTCTGACTTACAATCTATCTAA	
Kpn2I HPV18 E2 F	GCATTCCGGAATGCAGACACCGAA	pmTAG-BFP-HPV18-E2 N-Ter
BamHI HPV18 E2 R	GCGCGGATCCTTACATTGTCATGTAT	
Kpn2I HPV56E2co F	ATACTCCGGAATGGAAACCCTGTC	pmTAG-BFP-HPV56co-E2 N-Ter
BamHI HPV56E2 R	GACGGGATCCTTAGGGAAA	
Kpn2I Oligo BioID F	AAGAAGCCTCGAGCGGCCCATCCGGACT	Myc BioID-MCS (Kpn2I)
	GTGCTGGATATC	
Primer BioID R	ACAAGCTCCCGGGAGCTTTTTGC	
16E7 ATG NcoI R	ATATATCCATGGATTACAGCTGGGTT	HPV16 E7 ATG-Luc
16E6 BmgBI F	ACAGTACTGCGACGTG	
BRD4 seq 1643 F	TCATCGTCCAGACCCCTGTC	Sequenzierung
Luc 1703 R	TCCAGCGGATAGAATGG	Sequenzierung
HPV16 E1E4 3440 R	AGGCGACGGCTTTGGTATG	qPCR
HPV16 E1E4 880/3358 F	TGGCTGATCCTGCAGCAGC	qPCR
HPV16 E4L1 3503 F	CCCTGCCACACCACTAAGTT	qPCR
HPV16 E4L1 5690 R	CTGGGACAGGAGGCAAGTAG	qPCR
HPV16 E6Star 226/409 F	ACAGTACTGCGACGTGAGATG	qPCR
HPV16 E6Star 445 R	TTCTTCAGGACACAGTGG	qPCR
Mito F	GAGGAACAGCTCTTTGGACA	qPCR
Mito R	CAATTGGGTGTGAGGAGTTC	qPCR
HPV31 7770F	CAGTGCTGGCTTTTGCAC	qPCR
HPV31 7893R	TTGTA AAACTGTAACCGAAAACG	qPCR
HPV31 E6* 192 F	AATTGTGTCTACTGCAAAGGTGTA	qPCR
HPV31 E6* 508 R	CCAACATGCTATGCAACGTC	qPCR
HPV31 E1^E4 804 F	TGTTAATGGGCTCATTGGAA	qPCR
HPV31 E1^E4 3373 R	GGTTTTGGAATTCGATGTGG	qPCR
HPV31 E2N 2875 F	CTGTTGTGGAAGGGCAAGTT	qPCR
HPV31 E2N 2996 R	TCCCAGCAAAGGATATTTTCG	qPCR
HPV31 E4^L1 3528 F	CATGCACAAACCAACAAGG	qPCR
HPV31 E4^L1 5651 R	GCACTGCCTGCGTGATAATA	qPCR
BRD4shortC F	TCAGATCTCGAGCTATGTCTGCGGAGAGC	qPCR
BamHI BRD4S R	GGATCCTTAGGCGGGCCTGTTTCGGA	qPCR
Fam133B(V2) 110 F	GGGACAATCGGGTGGTACTG	qPCR
Fam133B(V2) 261 R	ACCCCTTGATCTCGCCATTG	qPCR

Fam133B(V1) 110 F	GGGACAATCGGGTGGCCTA	qPCR
Fam133B(V1) 219 R	GGTAGGCCTTGGTCGATTCA	qPCR
ZC3H4 430-449 F	AATCCAAGCACAAACGCCAT	qPCR
ZC3H4 652-633 R	TCGTAGTCCTCGTACATGCC	qPCR
HPV16 URR 7456 F	GAATTCGGTTGCATGCTTTT	ChIP
HPV16 URR 7576 R	TCAGGAAAACAGGGATTTGG	ChIP
HPV16 E6 103 F	AATGTTTCAGGACCCACAGG	ChIP
HPV16 E6 251 R	AATCCCGAAAAGCAAAGTCA	ChIP
HPV16 E7 651 F	CAGCTCAGAGGAGGAGGATG	ChIP
HPV16 E7 765 R	GCACAACCGAAGCGTAGAGT	ChIP

#### 4.1.6 Verwendete Plasmide

Name	Verwendungszweck/ Herkunft
pmTagBFP-C1	Expressionsplasmid, exprimiert mTagBFP, enthält C – terminale MCS [110].
pSYFP2-C1	Expressionsplasmid, exprimiert SYFP, enthält C – terminale MCS [110].
pmTagBFP-SYFP2	Expressionsvektor, exprimiert ein Fusionsprotein aus mTagBFP – SYFP2; Positivkontrolle für FACS – FRET –[110]
pmTAG-BFP-HPV2-E2 N-Ter	HPV2 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV5-E2 N-Ter	HPV5 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV8-E2 N-Ter	HPV8 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV16-E2 N-Ter	HPV16 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV18-E2 N-Ter	HPV18 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET

pmTAG-BFP-HPV27-E2 N-Ter	HPV27 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTagBFP-HPV31 E2co N-Ter	Codon-optimiertes HPV31 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert [86]
pmTAG-BFP-HPV38-E2 N-Ter	HPV38 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV49-E2 N-Ter	HPV49 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV56co-E2 N-Ter	Codon-optimiertes HPV56 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV58-E2 N-Ter	HPV58 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV59-E2 N-Ter	HPV59 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV82-E2 N-Ter	HPV82 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTAG-BFP-HPV197-E2 N-Ter	HPV197 E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pmTag-BFP-CRPV2-HA	CRPV E2 C-terminal in pmTagBFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET
pSYFP-BRD4 PDID	PDID (287-530) von BRD4, SV40 NLS getagged, C-terminal in pSYFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET [86]
pSYFP-BRD4 CTM	CTM-Domäne (1224-1365) von BRD4, SV40 NLS getagged, C-terminal in pSYFP-C1 kloniert, eingesetzt für FACS-FRET. [86]
pGL31URR-Luc (E6 ATG-Luc)	Luciferase-Reporterplasmid, enthält den frühen Promotor P <sub>97</sub> mit der regulatorischen Region von HPV31 (HPV31 Nt. 7068 - 106) [111]
pSG5	Eukaryontes Expressionsplasmid. Enthält SV40-Promotor für die Expression des eingefügten Gens (Stratagene).

pcDNA3.1	Eukaryontes Expressionsplasmid, enthält CMV-Promotor für die Expression des eingefügten Gens (Thermofisher Scientific). [86]
pSX31 E2-HA	HPV31 E2 intern mit HA getagged, in pSG5 Expressionsplasmid.
pcDNA3.1-Flag-BRD4S	BRD4S N-terminal mit FLAG getagged, in pcDNA3.1 Expressionsplasmid, [86]
pLSXN-31E6/E7	HPV31 E6/E7 in pLSXN Plasmid kloniert (Clontech) [112]
pUK-HPV31	HPV31-Genom in pUK19 Vektor kloniert [113]
pUK-HPV31-E2:IL73	HPV31-Genom mit Mutation in E2:IL73 in pUK19 Vektor kloniert [89]
pLXSN-Neo	Leervektor für retrovirale Infektion mit Neomycin Resistenz (Clontech).
Myc BioID-MCS (Kpn2I)	Der Myc-BioID2-MCS Expressionvektor war ein Geschenk von Kyle Roux [114]. Zusätzlich wurde eine Kpn2I-Schnittstelle in die MCS eingefügt.
Myc-BioID-HPV2 E2	HPV2 E2 in Myc BioID-MCS (Kpn2I) eingefügt; für BioID-Proximity-Labeling
Myc-BioID-HPV8 E2	HPV8 E2 in Myc BioID-MCS (Kpn2I) eingefügt; für BioID-Proximity-Labeling
Myc-BioID-HPV16 E2	HPV16 E2 in Myc BioID-MCS (Kpn2I) eingefügt; für BioID-Proximity-Labeling
Myc-BioID-HPV18 E2	HPV18 E2 in Myc BioID-MCS (Kpn2I) eingefügt; für BioID-Proximity-Labeling
Myc-BioID-HPV56 E2co	HPV56 E2co in Myc BioID-MCS (Kpn2I) eingefügt; für BioID-Proximity-Labeling
Myc-BioID-HPV82 E2	HPV82 E2 in Myc BioID-MCS (Kpn2I) eingefügt; für BioID-Proximity-Labeling
pSG 16 E2	HPV16 E2 in pSG5-Expressionsplasmid kloniert; Proteinexpression [115]

pSG 16 E2 HA	HPV16 E2 intern mit HA getagged, in pSG5-Expressionsplasmid kloniert; Proteinexpression [115]
pSG 16 E8^E2C HA	HPV16 E8^E2C intern mit HA getagged, in pSG5-Expressionsplasmid kloniert; Proteinexpression [115]
pCI-Neo-RLuc	Kodiert Codon-optimierten Renilla-Luciferase-Reporter, in pGL4.72 Vektor kloniert; für Luciferase-Assay (Promega).
pC18-Sp1-Luc	Artifizielles Reporterplasmid mit vier synthetischen E2-Bindungsstellen und zwei SP1-Bindungsstellen 5' von dem Initiator-Element des späten Adenovirus-Hauptpromotors und der TATA-Box; für Luciferase-Assay [66]
pGL3 HPV 16 URR (E6 ATG-Luc)	Luciferase-Reporterplasmid, enthält den frühen Promotor P <sub>97</sub> mit der regulatorischen Region von HPV16 (HPV16 Nt. 7154-106); Luciferase-Assay [115]
HPV16 E7 ATG-Luc	Luciferase-Reporterplasmid, enthält den frühen Promotor P <sub>97</sub> mit der regulatorischen Region von HPV16, sowie E6 (HPV16 Nt. 7154-565) Insertion eines C nach Nt. 561 nicht codiert in HPV16; Luciferase-Assay
pGL16 7154/868 (E1 ATG Luc)	Luciferase-Reporterplasmid, enthält den frühen und späten Promotor P <sub>97</sub> und P <sub>670</sub> mit der regulatorischen Region von HPV16, sowie E6 und E7 (HPV16 Nt. 7154-868); Luciferase-Assay [11]
hsFAM133B_pUC57	Von GenScript synthetisiert (Order No: U1977GD280)
pcMVneo-3xFlag-Fam133B	Fam133B (GenScript) in pcMVneo-3xFlag kloniert; Proteinexpression
pCDNA3.1-ZC3H4-eGFP	Das pCDNA3.1-ZC3H4-eGFP Expressionsplasmid war ein Geschenk von Steve West [97]
pEGFP-C2	eGFP-Expressionsvektor

pSG HPV31 E1co 3xflag

Codon-optimiertes HPV31 E1, N-terminal in PSG5-3xFLAG kloniert. [67]

pSG 16E2 R37A I73A

HPV16 E2 mit Punktmutationen R37A und I73A in pSG5-Expressionsplasmid kloniert; Proteinexpression [116]

pSG16 E1co

Codon-optimiertes HPV16 E1 in pSG

#### 4.1.7 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller (Katalonummer)	Verdünnung/Menge		
			WB	IF	ChIP
HSP90	Maus mAb	Santa Cruz (sc-69703)	1:2000		
$\alpha$ -Tubulin	Maus mAb	Calbiochem (CP06)	1:1000		
HA	Kaninchen mAb	Cell Signaling (3724S)	1:1000	1:800	10 $\mu$ L
HA	Maus mAb	Cell Signaling (2367S)	1:1000	1:100	
DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag)	Kaninchen mAb	Cell Signaling (14793S)	1:1000	1:400	10 $\mu$ L
DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag)	Maus mAb	Cell Signaling (8146S)	1:1000	1:1000	
eGFP	Maus mAb	Santa Cruz (sc-9996)	1:1000	1:500	10 $\mu$ L
c-Myc	Maus mAb	Santa Cruz (sc-40)	1:1000	1:500	
BRD4 (E2A7X)	Kaninchen mAb	Cell Signaling (13440S)	1:1000	1:1000	
Fam133B	Kaninchen pAb	Sigma-Aldrich (HPA069513)	1:500	1:25	
ZC3H4	Kaninchen pAb	Sigma-Aldrich (HPA040934)	1:1000	1:100	
pan-specific E1 <sup>E4</sup>	Maus mAb	Erhalten von J. Doorbar [117]		1:100	
16E2 22-E2 B9	Maus mAb	Erhalten von A. Wieland [118]		1:200	
Involucrin	Kaninchen mAb	Abcam (181980)		1:100	

Phospho-Rpb1 CTD (Ser5)	Kaninchen mAb	Cell Signaling (13523S)		1:200	
----------------------------	---------------	-------------------------	--	-------	--

#### 4.1.8 Sekundäre Antikörper

Antigen	Spezies	Hersteller (Katalonummer)	Verdünnung	
			WB	IF
Kaninchen IRDye® 680RD	Ziege	LI-COR (926-68071)	1:15000	
Maus IRDye® 800CW	Ziege	LI-COR (926-32210)	1:15000	
Maus Alexa Fluor® 488	Ziege	Thermofisher Scientific (A32723)		1:2000
Kaninchen Alexa Fluor® 488	Esel	Thermofisher Scientific (A32731)		1:2000
Maus Alexa Fluor® 555	Esel	Thermofisher Scientific (A32773)		1:2000
Kaninchen Alexa Fluor® 555	Ziege	Thermofisher Scientific (A21428)		1:2000

#### 4.1.9 Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden genutzt:

Escherichia coli DH5α (Clontech, Heidelberg): Genotyp: endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA (Naly) relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ80dlacΔ(lacZ)M15); Endonukleasen- und Rekombinase-defizienter Bakterienstamm zur DNA-Amplifikation

#### 4.1.10 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Beschreibung
C33A (ATCC-Nr.: HTB-31)	Humane HPV-negative Zervixkarzinom-Zelllinie, weist Mutationen in p53 und pRB auf [119].
CIN612 9E	HPV31-positive Zelllinie aus zervikaler intraepithelialer Neoplasie [9].
NIH3T3 – J2	Murine Fibroblastenzelllinie zur Verwendung als <i>Feeder</i> für HPV positive Keratinozyten [120].
NIH3T3-J2-NHP	NIH3T3 – J2 – Zellen mit Resistenz gegen Neomycin, Hygromycin und Puromycin [121].
NHK	Normale humane Keratinozyten [111].

HPV16 wt NHK	Humane Keratinozyten, die durch das HPV16-Genom immortalisiert wurden [69].
HPV16 E8 <sup>-</sup> NHK	Humane Keratinozyten, die durch das HPV16E8 <sup>-</sup> mutierte Genom immortalisiert wurden [69].

#### 4.1.11 Für diese Arbeit hergestellte Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
HPV31 wt NHK	Humane Keratinozyten, die durch das HPV31-Genom immortalisiert wurden.
HPV31 E2:IL73 NHK	Humane Keratinozyten, die durch das HPV31 E2:IL73 mutierte Genom immortalisiert wurden.
HPV31 E6/E7 NHK	Humane Keratinozyten, die durch HPV31 E6 und E7 immortalisiert wurden.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden *Escherichia coli* des Stammes *DH5α* in LB-Medium bei 37 °C geschüttelt, um diese in eine exponentielle Wachstumsphase zu bringen. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis mit CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> und RbCl<sub>2</sub> behandelt. Dies führt dazu, dass die Bakterien in der Lage sind, zirkuläre Plasmid-DNA aufzunehmen (chemische Kompetenz) [122].

#### 4.2.1.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden zunächst 100 µL kompetenter *DH5α* auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden Menge an Plasmid-DNA für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock ausgesetzt, indem sie für 1 min auf 42 °C erwärmt wurden. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde 900 µL SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 30-45 min bei 37 °C und 400 rpm auf einem Thermo-Cycler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf Agar-Platten, mit entsprechender antibiotischer

Selektion, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelklonkolonien wurden zur Inokulation in Flüssigmedium isoliert.

#### **4.2.1.3 Kultivierung von Bakterien zur Vervielfältigung und Isolation von Plasmid-DNA**

Mit Plasmid-DNA transformierte *DH5α* wurden über Nacht in 5-200 mL mit entsprechendem Antibiotikum versetztem LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Die dadurch vervielfältigte Plasmid-DNA konnte anschließend aufgereinigt werden. Zur langfristigen Aufbewahrung der Plasmid-DNA wurde ein Teil der Bakteriensuspension in einem Kryoröhrchen 1:1 mit Einfriermedium gemischt und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

### **4.2.2 Zellkultur-Methoden**

#### **4.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Die für diese Arbeit verwendeten Zellen wurden als Adhäsionskultur in Kunststoff-Gewebekulturschalen (Nunc) bei 5 % CO<sub>2</sub>-Sättigung, 37 °C und humider Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Konfluente Zellen wurden zuerst mit ca. 10 mL 1x PBS gewaschen und anschließend mit 2 mL Trypsin behandelt. Dazu wurden die Zellen für 2-5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 8 mL des entsprechenden Zellkulturmediums resuspendiert und auf neue Gewebekulturschalen ausgesät.

**C33A:** C33A wurden in DMEM-FKS kultiviert und im maximalen Verhältnis von 1:10 gesplittet.

**CIN-612-9E, NHK:** Humane Keratinozyten wurden in einer Ko-Kultur mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten in E-Medium gehalten. Die Zellen wurden im maximalen Verhältnis von 1:5 auf, durch Mitomycin C-Behandlung, teilungsunfähige NIH3T3-J2 ausgesät.

**NIH3T3-J2, NIH3T3-J2-NHP:** Fibroblasten wurden DMEM-CS kultiviert und in einem maximalen Verhältnis von 1:5 gesplittet.

#### **4.2.2.2 Behandlung von NIH3T3-J2, NIH3T3-J2-NHP Maus-Fibroblasten mit Mitomycin C**

Die Fibroblasten wurden als sogenannte „Feeder“ für die Ko-Kultur mit Keratinozyten eingesetzt. Dafür wurde eine konfluente 10 cm-Gewebekulturschale mit Fibroblasten für 1 h bei 37 °C, mit 100 µL

Mitomycin C in 5 mL CS-Medium inkubiert, und somit Teilungsunfähig gemacht. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um das Mitomycin C zu entfernen.

#### **4.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen**

Für die langfristige Lagerung von eukaryotischen Zellen wurden diese zunächst mittels Trypsins abgelöst und die Reaktion mit serumhaltigem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 250 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 mL Einfriermedium (entsprechendes Medium mit 10 % Serum und 10 % DMSO, bzw. 20 % Glycerin) resuspendiert, jeweils 1 mL in ein beschriftetes Kryoröhrchen überführt und in einer Einfrierbox bei -80 °C tiefgefroren. Nach ca. 24 h wurden die Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung bei -196 °C in den Stickstofftank überführt.

Um Zellen aufzutauen, wurden diese im Kryoröhrchen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Zellsuspension anschließend in 10 mL des entsprechenden Zellkulturmediums, in einer 10 cm-Gewebekulturschale, aufgenommen. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumswechsel durchgeführt.

#### **4.2.2.4 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen**

Zur Transfektion von DNA in humane Zellen wurde der Komplexbildner FuGeneHD (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden zuerst Zellen in der gewünschten Zellzahl und Zellkulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde Opti-MEM in ein Polystyrol-Röhrchen vorgelegt, die zu transfizierende DNA, sowie FuGeneHD (2,5 µL für 1 µg DNA) hinzugegeben und die Suspension, nach 10 s Vortexen, für 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde bei den am Vortag ausgesäten Zellen ein Mediumswechsel durchgeführt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise in das Zellmedium pipettiert. Die Zellen wurden je nach Versuch nach 24 h oder 48 h geerntet und analysiert.

#### **4.2.2.5 Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen**

Zur Transfektion humaner Zellen mit siRNA, wurde RNAiMAX (Thermo Fisher) als Transfektionsreagenz verwendet. Die siRNA wurden mit Opti-MEM und RNAiMAX in einem Polystyrol-Röhrchen nach Angaben des Herstellers gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium, der am Vortag ausgesäten Zellen, gewechselt. Der Transfektionsansatz wurde anschließend in das frische Medium gegeben. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zellen wurden 72 h nach Transfektion zur Analyse geerntet.

#### **4.2.2.6 Retrovirale Infektion**

Für die Verpackung der pLXSN HPV31 E6/E7-Expressionsplasmide, wurden Retrovirus-produzierende Phönixzellen genutzt. Dafür wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Phönixzellen in eine 6 cm-Gewebekulturschale ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 6 µg der Expressionsplasmide transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Zusätzlich wurden die zu infizierenden NHKs auf 6 cm-Gewebekulturplatten ausgesät. 24 h später wurde der infektiöse Überstand der Phönixzellen abgenommen und sterilfiltriert (Millipore, Porengröße: 0,45 µm), 5 mg/mL Polybrene hinzugegeben und dieses Medium auf die NHK gegeben. Nach weiteren 24 h wurden die NHK auf eine 10 cm-Gewebekulturplatte, auf wachstumsgehemmte NIH3T3-J2-NHP, gesplittet. Nach weiteren 3 Tagen wurden die Zellen mit Antibiotikum selektioniert (0,5 µg/mL Puromycin oder 150 µg/mL G418). Zur Kontrolle wurde eine Platte mit untransfizierten NHK ebenfalls selektioniert.

#### **4.2.2.7 Erzeugung HPV-haltiger Zelllinien**

Um NHK stabil mit HPV zu transfizieren, wurde zuerst das virale Genom aus dem bakteriellen Vektor des Ausgangsplasmids enzymatisch herausgespalten, religiert und aufgereinigt. Anschließend wurden NHK mit 4 µg des viralen Genoms zusammen mit 1 µg Neomycin-Selektionsplasmid mit Hilfe von FuGeneHD transfiziert. Die Zellen wurden für ca. 8-10 Tage (bis zum Absterben der untransfizierten Kontrollzellen) mit G418 (150 µg/mL) selektioniert. Nach Beendigung der Selektion wurden die Zellen mit Mitomycin C behandelten NIH3T3-J2-Zellen ko-kultiviert.

#### **4.2.2.8 Differenzierung humaner Keratinozyten in Methylcellulose**

Zur Herstellung von 1,5 % Methylcellulose (Sigma M0512) wurde die entsprechende Menge in einer Glasflasche mit Rührfisch autoklaviert. Anschließend wurde die Hälfte des Endvolumens an E-Medium (ohne EGF und FKS) hinzugegeben und in einem Wasserbad für 20 min auf 60 °C erwärmt. Anschließend wurde die andere Hälfte des E-Mediums hinzugegeben und auf einem Magnetrührer bei 4 °C für mindestens 5 h gerührt. Zuletzt wurden 5 % des Gesamtvolumens FKS hinzugegeben und die Methylcellulose noch einmal kurz gerührt. Alle Arbeiten nach Autoklavierung wurden steril durchgeführt.

Für die Differenzierung der Zellen wurden unbeschichtete 6 Well-Platten mit ca. 8 mL Methylcellulose befüllt. Anschließend wurden die zu differenzierenden Zellen mit Trypsin abgelöst, nachdem zuvor etwaige Feeder-Zellen mit Hilfe einer Stabpipette abgespült wurden. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert, pelletiert und in EGF-freiem E-Medium erneut resuspendiert. Die Zellen wurden

tropfenweise auf die Methylcellulose gegeben und vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze eingerührt. Die Zellen wurden anschließend für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Zur Aufreinigung der Zellen wurde die Methylcellulose schließlich mit kaltem PBS verdünnt und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 250 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand bis auf wenige Milliliter abgenommen und vor einer weiteren Zentrifugation erneut mit kaltem PBS aufgefüllt. Dies wurde wiederholt, bis die Methylcellulose entfernt war und die Zellen am Boden des Reaktionsgefäßes sedimentiert waren. Das gewonnene Zellpellet konnte für weitere Analysen genutzt werden.

#### **4.2.2.9 Organotypische Zellkulturen (3D)**

Für die Erstellung von organotypischen Zellkulturen wurden zunächst NIH3T3-J2-Zellen in Kollagenpfropfen (Rattenschwanzkollagen Typ I) auf Zellkultureinsätzen, welche sich in 6-Well-Platten befanden, eingebettet. Diese dienten als Matrix für ein dermales Äquivalent. Anschließend wurden Keratinozyten auf diesen Pfropfen ausgesät. Nachdem diese konfluent waren, wurde das E-Medium vollständig aus dem Inneren der Einsätze entfernt, sodass die Keratinozyten der Luft ausgesetzt waren. Zusätzlich wurde das Medium in den 6-Well-Platten durch EGF-freies E-Medium ersetzt. Dies induzierte die Differenzierung der Keratinozyten. Nach insgesamt 16 Tagen nach Differenzierungsbeginn wurden Zellen von den Kollagenpfropfen entfernt und analysiert.

### **4.2.3 DNA-Methoden**

#### **4.2.3.1 Standardmethoden**

- Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegel)
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

#### **4.2.3.2 Amplifikation von Gensequenzen durch PCR**

Für die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenzen mittels PCR, wurden spezifische Oligonukleotide, sowie die Pyrobest® DNA-Polymerase (Takara) aus *Pyrococcus* sp. verwendet.

#### **Ansatz für PCR:**

<b>Reagenz</b>	<b>Menge</b>
DNA-Template	10 ng

Pyrobest® DNA-Polymerase	0,25 µL
10x Pyrobest® Buffer II	5 µL
dNTPs	4 µL
Primer (Forward, Reverse)	Jeweils 25 µM (2,5 µL)
H <sub>2</sub> O	Auf 50 µL auffüllen

#### Standardprotokoll für Amplifikation:

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	10 s
Primerbindung	55 °C (variabel anzupassen)	30 s (variabel anzupassen)
Elongation	72 °C	60 s
Finale Elongation	72 °C	10 min
Ende	4 °C	∞

30-34 Zyklen

#### 4.2.3.3 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienzellen

Die Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterienzellen wurde mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit, dem QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit oder dem QIAgen® Plasmid Plus Maxi Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA wurde in 50-400 µl Elutionspuffer eluiert und die DNA-Konzentration, sowie deren Reinheit mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt.

#### 4.2.3.4 DNA-Fragment-Elution aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung unter ultraviolettem Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und anschließend in 30-50 µL Elutionspuffer eluiert.

#### 4.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die somit erzeugten zirkulären Plasmide wurden anschließend in kompetente E.coli DH5α transformiert.

#### **4.2.3.6 Sequenzierung**

Die DNA wurde von der Firma Eurofins Scientific sequenziert. Die Sequenzierung wurde anschließend mit der Software SnapGene (Version 5.0.7) analysiert.

#### **4.2.3.7 ExonukleaseV-Resistenz qPCR-Assay**

Der Assay wurde nach Myers et al., 2019 durchgeführt. Dazu wurden jeweils 100 ng der gesamtzellulären DNA mit oder ohne 5 U ExonukleaseV (NEB M0345S) in 1x NEBuffer 4 und 1 mM ATP für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die ExonukleaseV bei 95 °C für 10 min inaktiviert. Die DNA wurde in der qPCR mit spezifischen Primern gemessen.

#### **4.2.3.8 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen**

Eukaryontische Zellen wurden mit Trypsin abgelöst oder abgeschabt und bei 4 °C und 17.900 g für 20 s sedimentiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

### **4.2.4 RNA-Methoden**

#### **4.2.4.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen**

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit® (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurden Zellen mit 350 µL RLT-Lysepuffer (10 µL β-Mercaptoethanol auf 1 mL RLT-Puffer), pro Well einer 6-Well-Platte, lysiert. Das Lysat wurde anschließend durch das QIAshredder® Kit (Qiagen) homogenisiert und mit dem RNeasy® Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die RNA wurde anschließend in 50 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Reinheit und Konzentration wurden mit dem Spektralphotometer ND-1000 (NanoDrop) ermittelt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert, oder direkt für die cDNA-Synthese weiterverwendet.

#### **4.2.4.2 Synthese von copy-DNA (cDNA)**

1 µg der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach den Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden anschließend mit RNase-freiem Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Die Endkonzentration der cDNA betrug somit jeweils 10 ng/µL.

#### 4.2.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die viralen Transkripte wurden mit dem LightCycler® 480 (Roche), in entsprechenden LightCycler® 480 Multiwell Platten 96 (Roche) und dem SyberGreen-MasterMix (Roche), analysiert. Hierbei wurde der Mastermix mit den entsprechenden Primerpaaren in die gewünschten *Wells* der Multiwellplatte vorgelegt und anschließend die Probe hinzupipettiert.

##### Mastermix:

für Standardwerte:	Für cDNA-Proben:
4 µL DEPC-Wasser	1 µL DEPC-Wasser
2 µL <i>forward</i> Primer	2 µL <i>forward</i> Primer
2 µL <i>reverse</i> Primer	2 µL <i>reverse</i> Primer
10 µL SYBR Green Master I	10 µL SYBR Green Master I
+ 2 µL Standard	+ 5 µL cDNA

Nach Versiegelung der Platte mit einer Folie und Zentrifugation bei 250 g für 3 min, wurde mit dem SYBR Green Standard Programm, nach folgenden Einstellungen amplifiziert:

Initiale Denaturierung	95 °C, 10 min	
Denaturierung	95 °C, 10 s	} 45 Zyklen
Primerbindung	55 °C, 15 s	
Amplifikation	72 °C, 15 s	
Schmelzkurve	95 °C, 10 s	
	65 °C, 30 s	
	95 °C	
Ende	∞, 4 °C	

Mit der LightCycler® 480-Software wurde der Cp-Wert (Crossing-Point) für jeden Reaktionsansatz bestimmt. Dieser Wert entspricht dem Zyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Für die viralen Transkripte wurden Standardverdünnungsreihen als Doppelwerte gemessen, um somit die Konzentration des jeweiligen Transkripts zu bestimmen. Außerdem wurde zur Normierung jeder Probe, ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen (PGK1) gemessen. Bei Transkripten ohne vorhandenes Standardplasmid wurde die Pfaffl-Formel angewandt [123].

$$relative\ mRNA - Expression = \frac{Primereffizienz^{\Delta CP_{Zielgen}(Kontrolle-Probe)}}{Primereffizienz^{\Delta CP_{Referenzgen}(Kontrolle-Probe)}}$$

#### 4.2.4.4 RNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten RNA wurde von der Core Facility für Angewandte Transkriptomik und Genomik der Universität Tübingen durchgeführt. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte durch das Zentrum für Quantitative Biologie der Universität Tübingen.

Im Folgenden die Erläuterung zur Methodik der RNA-Sequenzierung durch das Zentrum für Quantitative Biologie der Universität Tübingen:

“Die RNA-Seq libraries wurden mit dem TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina Inc.) nach Herstellerangaben angefertigt. Die Qualität und Konzentration der RNA in jeder Library wurde mittels Qubit und einem Bioanalyzer (Agilent) gemessen. Dabei hatten alle Proben einen RIN-Wert von >7. Die Proben wurden mit Hilfe eines HiSeq2500 Systems (Illumina Inc.) mit einem Ausgangsformat von 125 bp paired-end Reads sequenziert. Die Qualität der Rohwerte wurde mit Hilfe von FastQC (Version V0.11.4) bewertet und mit der Cutadapt Software (Version 1.8.3) die Illumina Adaptersequenzen und Basen niedriger Qualität getrimmt [124]. Die bearbeiteten Reads wurden anschließend mit der Tophat2 Software (Version 2.1.1) und den Standardoptionen mit dem humanen Referenzgenom (Version hg19) abgeglichen [125]. Mit Hilfe von HTSeq (Version 0.6.0) wurden die Reads, welche eine Sequenzübereinstimmung mit Genen oder Exons aufwiesen, gezählt [126], indem der „union“ Modus für die „Gene-ID“ Funktionen ausgewählt wurde. Um unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren wurde das R Paket DESeq2 (Version 1.10.1) verwendet [127]. R Standardpakete (Version 3.2.1) und ggplot2 wurden verwendet, um Abbildungen zu generieren.“

#### 4.2.5 Proteinmethoden

##### 4.2.5.1 Zellyse zur Proteinextraktion

Die in Kultur gehaltenen eukaryotischen Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber, in 1,5 mL PBS von der Platte entfernt. Die Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 15 s bei 17.900 g herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50-100 µL RIPA-Puffer für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) im Verhältnis 1:4 hinzugegeben und die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt. Zur Fragmentierung

der DNA wurden die Proben mit Hilfe eines SonoPuls Sonifier UW 2200 (Bandelin, 12 s, 20 %) sonifiziert.

#### **4.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Für die weitere Analyse wurden die Proteine aus den Zellextrakten eindimensional, diskontinuierlich aufgetrennt. Dazu wurden die Proben auf ein SDS-Trenngel aufgetragen und für 45-90 min bei 160-200 V in 1 % SDS-Laufpuffer aufgetrennt. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific) als Marker aufgetragen.

#### **4.2.5.3 Western Blot**

Zur immunologischen Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine, wurden diese zunächst via Nass-Blotting (90 min, 90 V) auf eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,22 µm, Amersham) übertragen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran anschließend für 60 min in PBS mit 3 % BSA inkubiert. Danach wurde der Blockierpuffer entfernt und die Membran über Nacht mit den gewünschten primären Antikörpern (Verdünnung nach Herstellerangaben in PBS) bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal mit PBS-T gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit den sekundären Antikörpern (800 nm; 680 nm; 1:15.000 in PBS-T; LI-COR Biosciences) für 60 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde abermals dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend im LI-COR® Odyssey Fc analysiert.

#### **4.2.5.4 Ko-Immunpräzipitation (CoIP)**

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden C33A in 100 mm-Schalen ausgesät und mit den Plasmiden zur Expression der zu untersuchenden Proteine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, abzentrifugiert und in 250 µL CoIP-Lysepuffer und 1 µL Benzonase (250 U, Novagen) für 30 min, bei 4 °C schüttelnd lysiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 17.900 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurden jeweils 10 % der Proben als Input-Kontrolle abgenommen, mit Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die restlichen Proben wurden mit magnetischen Beads versetzt und den Herstellerangaben entsprechend weiterbehandelt.

Bei der Verwendung von magnetischen FLAG-Beads (Pierce) wurden die Beads zunächst im magnetischen Stand vom Puffer getrennt, dieser entfernt und die Beads für mindestens 30 min in PBS

mit 5 % BSA geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern. Anschließend wurde der Blockierpuffer entfernt und das Zelllysat zu den Beads gegeben. Diese wurden für 20 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden im magnetischen Stand separiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgten 3 Waschgänge mit dem Lysepuffer. Zu guter Letzt wurden die Beads in 50 µL Elutionspuffer aufgenommen und für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die daran gebundenen Proteine zu entfernen. Die Beads wurden im magnetischen Stand separiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Bei der Verwendung von magnetischen HA-, oder FLAG-Beads der Firma Miltenyi Biotec wurden 30 µL Beads dem Zelllysat hinzugefügt und dieses für 2 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Für die Aufreinigung der Proben wurden µMacs<sup>®</sup>-Säulen (Miltenyi Biotec) verwendet. Diese wurden in eine magnetische Vorrichtung platziert und mit 250 µL Lysepuffer equilibriert. Die Proben wurden in die Säule gegeben, so dass das Lysat hindurchtropfen konnte, die Beads aber zurückgehalten wurden. Anschließend wurden dreimal 500 µL Lysepuffer auf die Säulen gegeben, um ungebundene Proteine von den Beads zu entfernen. Die Säulen wurden aus der magnetischen Vorrichtung entfernt auf 1,5 mL Reaktionsgefäße gesetzt und 50 µL Elutionspuffer, welcher zuvor auf 95 °C erhitzt wurde, hinzugegeben. Die im Reaktionsgefäß aufgefangene Probe wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine von den Beads zu lösen.

Die Proben konnten anschließend über ein SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunblot-Analyse untersucht werden.

#### **4.2.5.5 Durchflusszytometrie-basierte FRET-Analyse (FACS/FRET)**

Eine Möglichkeit zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* ist FACS basiertes FRET (Förster-Resonanzenergietransfer). Dazu wurden  $1,5 \times 10^5$  C33A-Zellen pro Well in einer 12-Wellplatte ausgesät und am darauffolgenden Tag den entsprechenden BFP- und sYFP-Expressionsplasmiden transfiziert und 48 h später für die Analyse mit Trypsin von der Platte gelöst. Anschließend wurden 300 µL PBS mit 1 % FKS hinzugegeben, die Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 17.900 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurden verworfen und die Zellen in 400 µL PBS mit 1 % FKS resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse erfolgte mit dem MACSQuant<sup>®</sup> VYB (Miltenyi Biotec) und Lasern im Wellenlängenbereich von 405 nm, 488 nm und 561 nm. Die Daten wurden anschließend mit der Software von FlowLogic<sup>™</sup> analysiert. Das Gating wurde wie bei Yigitliler et al. (2021) gezeigt, entsprechend durchgeführt [86].

#### 4.2.5.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen entweder auf MatTek-Schälchen (HPV-positive Keratinozyten) oder auf Glasplättchen in 6-Wellplatten (C33A) ausgesät, nach 24 h direkt analysiert, oder transfiziert und 48 h später analysiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 4-prozentigem Paraformaldehyd für 15 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit einem Blockierpuffer inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden primären Antikörper in Antikörperverdünnungspuffer verdünnt und auf die Zellen gegeben. Für transient exprimierte Proteine entsprach die Inkubationszeit 1 h bei RT, für endogene Proteine wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden abermals dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit den Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgenommen und DAPI, zur Anfärbung der DNA, für 30 s auf die Zellen gegeben. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit PBS. Die Glasplättchen wurden mit Mowiol 4-88 auf Objektträgern fixiert. Bei Zellen, die in MatTek-Schalen kultiviert wurden, wurde das PBS durch dH<sub>2</sub>O ersetzt. Die Analyse erfolgte mit dem Axio Observer Z1 Mikroskop von Zeiss. Für die 630-fache Vergrößerung wurde zusätzlich ein ApoTome verwendet.

#### 4.2.5.7 Markierung proximaler Proteine via BioID

C33A-Zellen ( $4 \times 10^6$ ) wurden in 150-mm-Zellkulturschalen ausgesät und mit 10 µg des BioID2-E2-Expressionsvektors oder einem BioID2-Expressionsvektor als Kontrolle transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zelle lysiert.

Die weitere Aufreinigung wurde vom *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen* wie folgt durchgeführt:

„Die biotinylierten Proteine wurden anschließend mit Streptavidin-Sepharose (IBA Lifesciences) angereichert. 50 µl der gepackten Beads pro Probe wurden mit TBS und Lysepuffer (TBS mit 0,5% IGEPAL CA-630, kompletten Proteaseinhibitoren (Roche) und Phosphataseinhibitor-Cocktails 2 und 3 (Sigma)) gewaschen. Dann wurden gleiche Mengen Lysat zu den Beads gegeben und die Mischung wurde 1 Stunde lang bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads dreimal mit TBS gewaschen, bevor sie einem *on-bead*-Verdau unterzogen wurden.“

#### 4.2.5.8 LC-MS/MS-Analyse

Die MS-Analyse wurde vom *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen* wie folgt durchgeführt:

„Affinitätsgereinigte Proteine wurden durch On-Bead-Verdau eluiert, wie zuvor beschrieben [128]. Die LC-MS/MS-Analyse wurde auf Ultimate3000 nanoRSLC-Systemen (Thermo Scientific) durchgeführt, die über eine Nanospray-Ionenquelle mit einem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer (Thermo Scientific) gekoppelt waren. Tryptische Peptidmischungen wurden automatisch injiziert und mit einer Flussrate von 30  $\mu\text{L}/\text{min}$  in 0,1 % Trifluoressigsäure in HPLC-Wasser auf eine Nano-Trap-Säule (300  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  5 mm Pre-Säule, gepackt mit Acclaim PepMap100 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ; Thermo Scientific) geladen. Nach 3 Minuten wurden die Peptide eluiert und auf der analytischen Säule (75  $\mu\text{m}$  i.d.  $\times$  25 cm, Acclaim PepMap RSLC C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ; Thermo Scientific) durch einen linearen Gradienten von 2 % bis 30 % Puffer B (80 % Acetonitril und 0,08 % Ameisensäure in HPLC-Wasser) in Puffer A (2 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure in HPLC-Wasser) bei einer Flussrate von 300 nL/min über 117 Minuten getrennt. Die verbleibenden Peptide wurden durch einen kurzen Gradienten von 30 % auf 95 % Puffer B in 5 min eluiert. Die Analyse der eluierten Peptide wurde mit einem LTQ Fusion-Massenspektrometer durchgeführt. Aus dem hochauflösenden MS-Pre-Scan mit einem Massenbereich von 335 bis 1500 wurden die intensivsten Peptidionen, die mindestens doppelt geladen waren, für die Fragmentanalyse im Orbitrap-Verfahren mit hoher Geschwindigkeit ausgewählt. Die normalisierte Kollisionsenergie für HCD wurde auf einen Wert von 27 eingestellt, und die resultierenden Fragmente wurden mit einer Auflösung von 120.000 nachgewiesen. Die Lock-Mass-Option wurde aktiviert; das Hintergrundsignal mit einer Masse von 445.12003 wurde als Lock-Masse verwendet [129]. Jedes für die Fragmentierung ausgewählte Ion wurde 20 Sekunden lang durch dynamischen Ausschluss ausgeschlossen. Die MS/MS-Daten wurden mit der MaxQuant-Software (Version 1.6.1.0) analysiert [130, 131]. Als Verdauungsenzym wurde Trypsin/P mit maximal 2 Fehlsplattungen ausgewählt. Die Cystein-Carbamidomethylierung wurde als feste Modifikation festgelegt, während die Oxidation von Methionin und die N-terminale Acetylierung als variable Modifikation angegeben wurden. Die Daten wurden durch markierungsfreie Quantifizierung mit einer minimalen Ratio-Zahl von 3 analysiert. Die Toleranz für das erste Suchpeptid wurde auf 20, die Toleranz für das Hauptsuchpeptid auf 4,5 ppm gesetzt, und die Option "Re-Quantifizierung" wurde ausgewählt. Für die Peptid- und Proteinidentifizierung wurde die menschliche Teilmenge der SwissProt-Datenbank (Release 2019\_11) verwendet, die HPV-Proteinsequenzen enthielt, und Verunreinigungen wurden mithilfe der MaxQuant-Verunreinigungssuche erkannt. Eine Mindestpeptidzahl von 2 und eine Mindestlänge von 7 Aminosäuren wurden toleriert. Für die Quantifizierung wurden Unique- und Razor-Peptide verwendet. Die Option für den Abgleich zwischen den Läufen wurde mit einem Zeitfenster von 0,7 min für den Abgleich und einem Zeitfenster von 20 min für das Alignment aktiviert. Die statistische Analyse, einschließlich der Berechnung von Verhältnissen und Signifikanz A, wurde mit der Perseus-Software (Version 1.6.2.3 [132]) durchgeführt.“

#### **4.2.5.9 Luciferase-Assay**

Es wurden  $7,5 \times 10^4$  C33A-Zellen in eine 24-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen entweder mit siRNA oder direkt (ansonsten 24 h später) mit Plasmid-DNA transfiziert. 48 h nach der DNA-Transfektion wurden die Zellen mit PBS zweimal gewaschen und anschließend mit 150  $\mu$ L Luciferase-Lysepuffer auf Eis für 10 min lysiert. Jeweils  $2 \times 50$   $\mu$ L der lysierten Zellen wurde in eine weiße 96-Well-Platte überführt. Das Luminometer (TriStar2S, Berthold Technologies) wurde mit Gaussia-Juice (2  $\mu$ L Coelenterazine (CTZ) auf 100  $\mu$ L Gaussia-juice, pjk) und dem Firefly-Luciferase-Puffer (1  $\mu$ L Luciferin auf 100  $\mu$ L Assay-Puffer) vorgefüllt. Für die Messung wurden jeweils 50  $\mu$ L des jeweiligen Puffers mit den 50  $\mu$ L Lysat in der Platte gemischt und anschließend die relative Lichteinheit (RLU) und somit die Luciferase-Aktivität gemessen. Anschließend wurde der Wert der Firefly-Luciferase-Aktivität auf die der Renilla-Luciferase normalisiert.

#### **4.2.5.10 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Für die ChIP-Analyse wurden C33A-Zellen ( $4 \times 10^6$ ) in 150-mm-Schalen ausgesät und mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) (#9003) gemäß der Gebrauchsanweisung vorbereitet. Die präzipitierte und aufgereinigte DNA wurde mittels qRT-PCR analysiert.

#### **4.2.5.11 Anfertigung von Kryoschnitten**

Zellen aus organotypischen Gewebekulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Kryoeinbettformen in Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura® Finetek) eingebettet und auf Trockeneis tiefgefroren. Das Gewebe wurde mit einem Cryostat Microtome (Reichert-Jung) in 7  $\mu$ m dünne Scheiben geschnitten und auf SuperFrost® Objektträger (Carl Roth) aufgenommen. Die Flüssigkeit wurde durch Inkubation in einer EtOH-Verdünnungsreihe (50 %, 70 %, 100 %) entzogen. Anschließend konnten die Schnitte für die Immunfluoreszenz gefärbt werden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 E2 Proteine von Hochrisiko $\alpha$ -HPV-Typen interagieren mit der PDID-Region von BRD4

Die Interaktion von HPV E2 mit BRD4 ist gut beschrieben und hat Einfluss auf den viralen Lebenszyklus [58, 78, 80, 107, 133-135]. Dabei bindet E2 an die C-terminale Domäne (CTM) von BRD4. Bei der verkürzten Form von BRD4, BRD4S, die durch alternatives Spleißen entsteht, fehlt die CTM und somit die Interaktionsstelle mit E2 (**Abbildung 5**). Dennoch ist BRD4S in der Lage mit E2-Proteinen mancher HPV-Typen zu interagieren [86, 136].

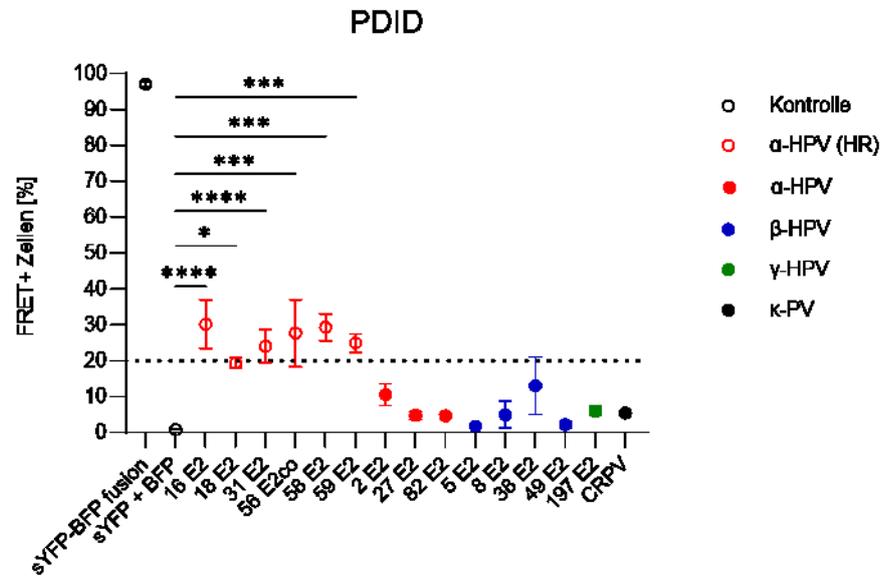


**Abbildung 5:** Schematische Darstellung von BRD4 und BRD4S. Die CTM ist in schwarz dargestellt. Die PDID (dunkelblau) besteht aus der Bromodomäne 2 (BD2) und der N-terminalen Phosphorylierungsseite (NPS). In Gelb ist die Extraterminale Domäne (ET) und in Hellblau die *Basic-residue enriched interaction domain* (BID) dargestellt. Die Spleißvariante BRD4S weist einen verkürzten C-Terminus mit einem GPA-Ende (rot) auf.

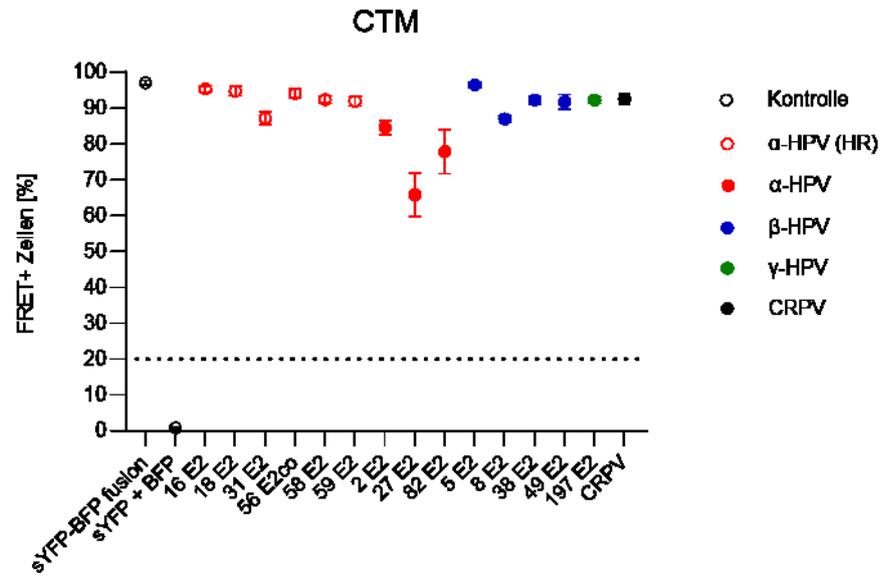
In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die E2 Proteine der beiden Hochrisikotypen HPV16 und 31 in der Lage sind mit der PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*) von BRD4, und somit auch mit BRD4S, zu interagieren und dass diese Interaktion starken Einfluss auf die Transkription der späten viralen Gene hat [86]. Um herauszufinden, ob die Bindung von E2 an die PDID und somit an BRD4S für verschiedene HPV-Typen konserviert ist, wurden Interaktionsstudien durchgeführt. Dazu wurde die FACS-FRET-Methode (*fluorescent activated cell sorting – Försters resonance energy transfer*) genutzt, wie bereits in der Publikation von Yigitliler et al. beschrieben [86]. Dazu wurden Expressionsplasmide für BFP-E2-Fusionsproteine von insgesamt 14 verschiedenen HPVs, sowie von CRPV hergestellt. Beim Försterresonanzenergietransfer wird ein Donor-Fluorophor, hier BFP (*blue fluorescent protein*), mit einem Laser einer festgelegten Wellenlänge (405 nm) angeregt. Befindet sich ein zweites Fluorophor (YFP, *yellow fluorescent protein*) in unmittelbarer Nähe ( $\leq 10$  nm) zum Donor, wird ein Teil dieser Energie strahlungsfrei übertragen. Dies führt dazu, dass das Akzeptor-Fluorophor ebenfalls angeregt wird und Licht emittiert. Interagieren zwei Proteine, die zuvor mit den jeweiligen Fluorophoren markiert wurden kann das FRET-Signal gemessen und mit entsprechenden Kontrollen verglichen werden. Um möglichst ein breites Spektrum

an verschiedenen HPV-Typen abzudecken, wurden E2 Proteine des  $\alpha$ -Genus, darunter die als karzinogen eingestuften 16, 18, 31, 56, 58, 59, sowie die als nicht karzinogen eingestuften 2,27, 82, sowie E2 Proteine des  $\beta$ -Genus (5, 8, 38, 49), des  $\gamma$ -Genus (197), sowie CRPV (*cottontail rabbit papillomavirus*) untersucht. Das *Gating* wurde wie bei Yigitliler et al. (2021) aufgeführt, festgelegt [86]. Als Positivkontrolle wurde ein pmTagBFP-sYFP2-Fusionsprotein verwendet, welches ein FRET-Signal von über 95 % aufwies. Für die Negativkontrolle wurden pmTagBFP und sYFP2 auf zwei unterschiedlichen Plasmiden ko-exprimiert und das *Gate* so festgelegt, dass das FRET-Signal unter 1 % lag. Der Wert von 20 % FRET-positiven Zellen wurde als Schwellenwert für eine positive Protein-Protein-Interaktion festgelegt. Die verschiedenen pmTagBFP-E2-Fusionsproteine wurden jeweils mit einem sYFP2-PDID-Fusionsprotein in C33A-Zellen ko-transfiziert und das FRET-Signal anschließend gemessen (**Abbildung 6 A**).

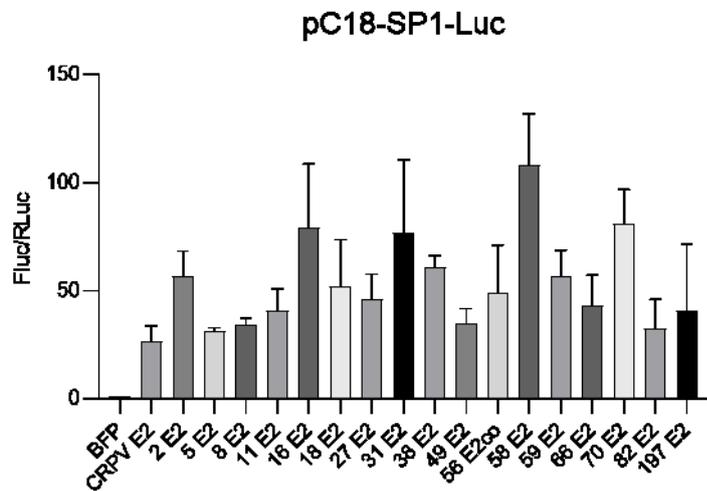
**A**



**B**



**C**



**Abbildung 6:** FACS-FRET-Analyse der Interaktion verschiedener HPV E2 mit der PDID oder CTM von BRD4. **A)** C33A Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene pmTagBFP-E2 mit sYFP-PDID ko-transfiziert und das FRET-Signal anschließend gemessen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den Standardfehler (SEM) an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett-Test für multiple Vergleiche ermittelt; \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . **B)** C33A Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene pmTagBFP-E2 mit sYFP-CTM ko-transfiziert und das FRET-Signal anschließend gemessen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. **C)** C33A-Zellen wurden mit 0,5 ng pCI-Neo RLuc, 50 ng pC18-Sp1-Luc, 10 ng pmTagBFP-E2 oder den entsprechenden Leervektoren ko-transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an.

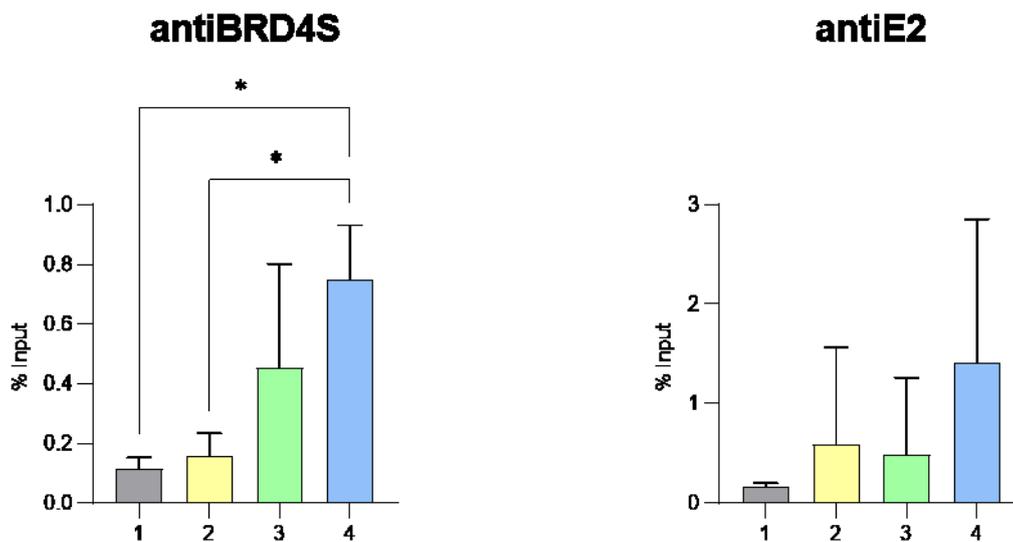
Die E2-Proteine der als karzinogen eingestuften HPV-Typen wiesen alle ein FRET-Signal von mindestens 20 % auf (**Abbildung 6 A**). Alle anderen getesteten E2-Proteine erzeugten ein deutlich geringeres FRET-Signal, was darauf hinweist, dass nur die E2-Proteine der karzinogenen  $\alpha$ -HPV in der Lage sind mit der PDID und somit mit BRD4S zu interagieren. Zusätzlich wurde das FRET-Signal von pmTag-BFP-E2 mit sYFP2-CTM untersucht. Die Bindung von E2 an die CTM von BRD4 ist zwischen verschiedenen HPV-Typen hochkonserviert. Alle getesteten E2-Fusionsproteine wiesen ein starkes FRET-Signal von deutlich über 60 % auf (**Abbildung 6 B**). Die korrekte Faltung und Funktionalität der E2-Proteine kann durch die Fusion mit pmTagBFP gestört sein. Um dies auszuschließen, wurden funktionelle Assays durchgeführt. Dabei wurden die E2-Fusionsproteine jeweils mit einem pC18-Sp1-Luc-Reporterplasmid, sowie einem Renilla-Luciferase-Expressionsplasmid, ko-transfiziert. Das artifizielle pC18-Sp1-Luc-Reporterkonstrukt weist 4 E2-, sowie 2 Sp1-Bindestellen auf und wird durch E2 transaktiviert. Es wurde die Luciferase-Aktivität der dadurch exprimierten Firefly-Luciferase gemessen und auf die ko-transfizierte Renilla-Luciferase normalisiert. Alle pmTagBFP-E2-Konstrukte konnten das pC18-Sp1-Luc-Reporterplasmid deutlich aktivieren (**Abbildung 6 C**).

## 5.2 BRD4S ist auf dem viralen Genom angereichert

In einer vorrausgegangenen Arbeit konnte durch Immunfluoreszenzstudien bereits gezeigt werden, dass BRD4S, ebenso wie BRD4, in viralen Replikationszentren angereichert ist [86]. Darüber hinaus hat BRD4S eine reprimierende Wirkung auf die Transkription der späten viralen Gene [86]. Zusammengenommen macht es dies sehr wahrscheinlich, dass BRD4S ebenfalls wie BRD4 direkt auf dem viralen Genom agiert. Um festzustellen, ob BRD4S ebenfalls mit HPV16-DNA interagiert, wurden Chromatinimmunpräzipitations-Experimente (ChIP) durchgeführt. Dazu wurde ein Plasmid, welches die *Upstream Regulatory Region* (URR) von HPV31 enthält, allein oder mit BRD4S-FLAG, HPV31 E2-HA oder beiden gemeinsam in C33A-Zellen ko-transfiziert (**Abbildung 7 A**).

**A**

	1	2	3	4
31 URR-Luc	+	+	+	+
31 E2-HA	-	+	-	+
BRD4S-Flag	-	-	+	+

**B**

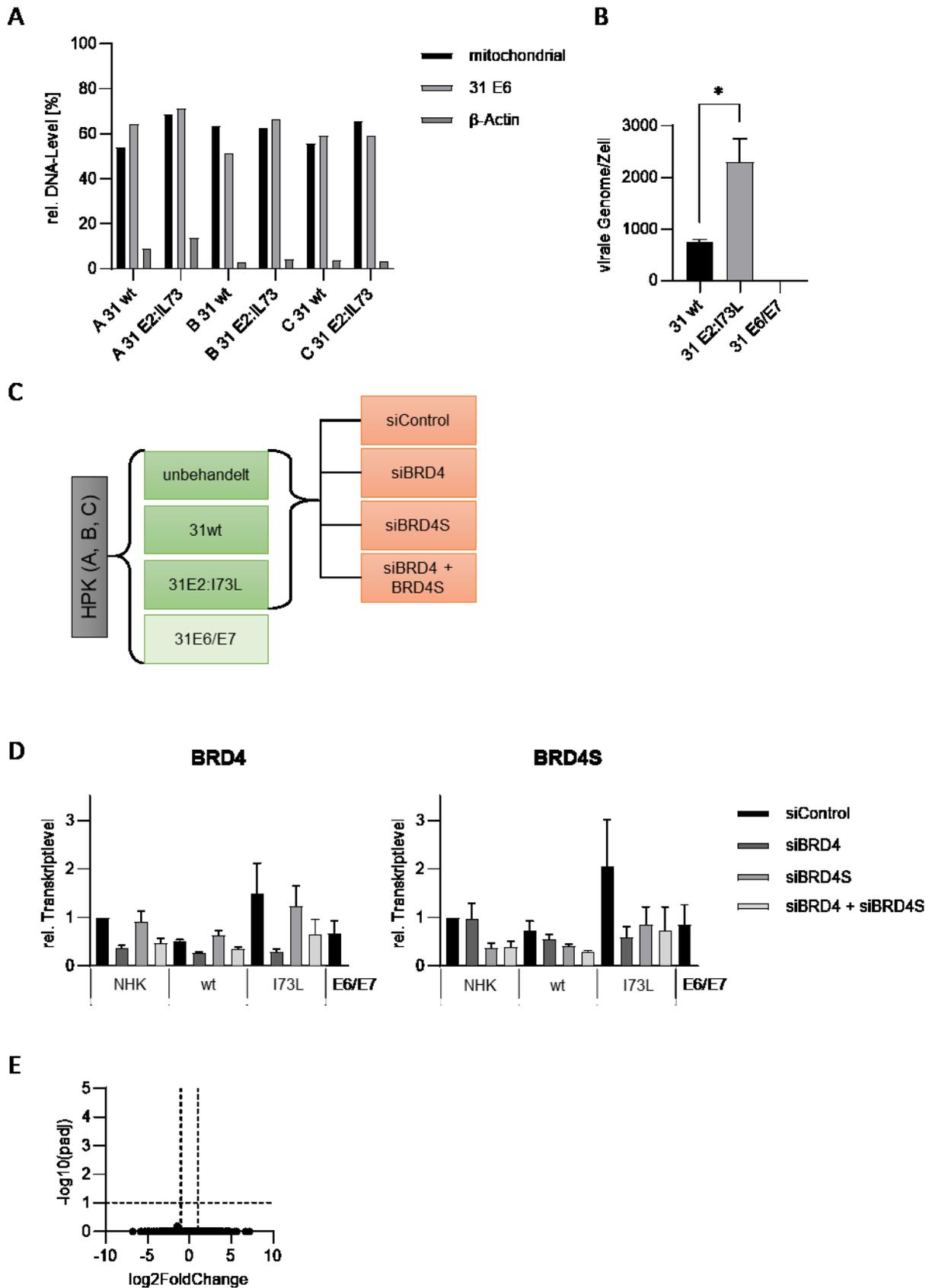
**Abbildung 7:** BRD4S wird an die virale DNA rekrutiert. **A)** Schematische Darstellung des Transfektionsschemas für die CHIP-Experimente. **B)** C33A-Zellen wurden mit 5 µg URR-Luc, 5 µg 31 E2-HA, 5 µg BRD4S-FLAG oder leerem Vektor wie in A dargestellt transfiziert. Das CHIP-Experiment wurde wie beschrieben mit Anti-HA- oder Anti-FLAG-markierten Magnetbeads durchgeführt. Die virale DNA wurde durch qPCR mit spezifischen Primern gemessen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; \*p<0,05

DNA-bindende Proteine wurden durch Paraformaldehyd mit Chromatin quervernetzt. Die Chromatinpräparate wurden zum Nachweis von E2 mit magnetischen α-HA-Beads, oder entsprechend mit magnetischen α-FLAG-Beads zum Nachweis von BRD4S, angereichert und anschließend die Menge der aufgereinigten DNA mit spezifischen Primern für die URR mittels qPCR gemessen. Es konnte sowohl für BRD4S, als auch E2 eine Anreicherung der viralen DNA gemessen werden und diese war jeweils am stärksten, wenn BRD4S und E2 zusammen exprimiert wurden. Dies zeigt, dass BRD4S an HPV-Chromatin bindet und dies durch E2 verstärkt wird (**Abbildung 7 B**).

### 5.3 Die Interaktion von HPV31 E2 mit BRD4 hat keinen Einfluss auf das Transkriptom von undifferenzierten Keratinozyten

Vosa et al. wiesen nach, dass das Wirtsgenom eine große Anzahl von E2BS enthält [137]. Im Einklang damit zeigten genomweite ChIP-on-Chip-Analysen, dass überexprimiertes E2 gemeinsam mit BRD4 an aktive zelluläre Promotoren bindet [90]. Eine globale Transkriptomanalyse von HPV16 E2-exprimierenden C-33A-Zellen, zeigte weitreichende Unterschiede in den Wirtsgen-Expressionsprofilen im Vergleich zur Kontrolle [138]. Dies lässt vermuten, dass die E2-BRD4-Interaktion die Expression zellulärer Gene kontrolliert. Allerdings wurde dies bisher nicht im Kontext von Zellen mit replizierenden HPV-Genomen untersucht, welche wt oder BRD4-bindungsdefizientes E2 kodieren und physiologische E2-Mengen exprimieren.

Zunächst wurden dafür unterschiedliche HPV31-positive Zelllinien kreiert. Normale humane Keratinozyten (NHK) wurden entweder mit einem HPV31 Wildtyp-Genom oder einem HPV31 E2:IL73-Mutanten-Genom transfiziert, oder mit pLSXN-31E6/E7 infiziert. Die Aminosäure Isoleucin an Position 73 des E2-Proteins ist essentiell für die Bindung von E2 an die CTM-Domäne von BRD4 [139]. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine E6/E7-positive Zelllinie erstellt, um auszuschließen, dass ein durch die Mutation in E2 möglicherweise beeinflusste Expression der beiden Onkogene E6 und E7 Auswirkungen auf das zelluläre Transkriptionslevel hat. Zur Herstellung der Zelllinien wurden Keratinozyten von jeweils drei verschiedenen Spendern genutzt und jeweils drei unterschiedliche Zelllinien hergestellt (**Abbildung 8 C**). Für die Charakterisierung der Zellen wurde deren virale Kopienzahl, sowie der physikalische Zustand der viralen Genome bestimmt (**Abbildung 8 A**). Dazu wurden die Zellen zunächst lysiert und die DNA mit Exonuclease V (Exo V) verdaut. Exo V ist ein Enzym das lineare, nicht aber zirkuläre, DNA abbaut. Da episomale Genome zirkulär und integrierte linear sind, verdaut Exo V selektiv integrierte HPV-DNA [140]. Mittels qPCR kann anschließend die Resistenz der viralen DNA gegenüber Exo V gemessen werden und somit der Anteil an episomaler viraler DNA bestimmt werden. Als Positivkontrolle diente mitochondriale DNA, die episomal zirkulär vorliegt [141]. Die viralen Genome wiesen eine vergleichbare Resistenz gegenüber Exo V-Behandlung auf, wie die mitochondriale DNA. Dies zeigt, dass die viralen Genome hauptsächlich episomal in den Zellen vorliegen und nicht in das Genom integriert sind (**Abbildung 8 A**).



**Abbildung 8:** Validierung der Zelllinien für die RNA-Sequenzierung. **A)** Die gesamtzelluläre DNA wurde mit Exonuclease V verdaut. Mittels qPCR wurde  $\beta$ -Actin, mitochondriale DNA und die virale DNA gemessen. Dargestellt ist der Anteil an Exo V-resistenter DNA im Vergleich zur unverdauten Kontrolle.

**B)** Die Kopienzahl der viralen Genome wurde mittels qPCR gemessen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplen Vergleichstest ermittelt; \* $p < 0,05$ . **C)** Schematische Darstellung der Behandlung der Zellen für die RNA-Sequenzierung. **D)** Relative Transkriptionslevel von BRD4 und BRD4S nach Behandlung mit siBRD4 oder/und BRD4S. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. **E)** Der Volcano Plot zeigt die Gene, deren Transkription in der E2:IL73-Mutante im Vergleich zu den Wildtyp-Zelllinien verändert sind. Für die RNA-Sequenzierung wurden jeweils Zelllinien aus Keratinozyten von drei unterschiedlichen Spendern verwendet.

Die Bestimmung der Kopienzahl der viralen Genome zeigte, dass die Zelllinien mit der HPV31 E2:IL73-Mutanten eine signifikant höhere Kopienzahl haben, als die Wildtyp-Zelllinien (**Abbildung 8 B**).

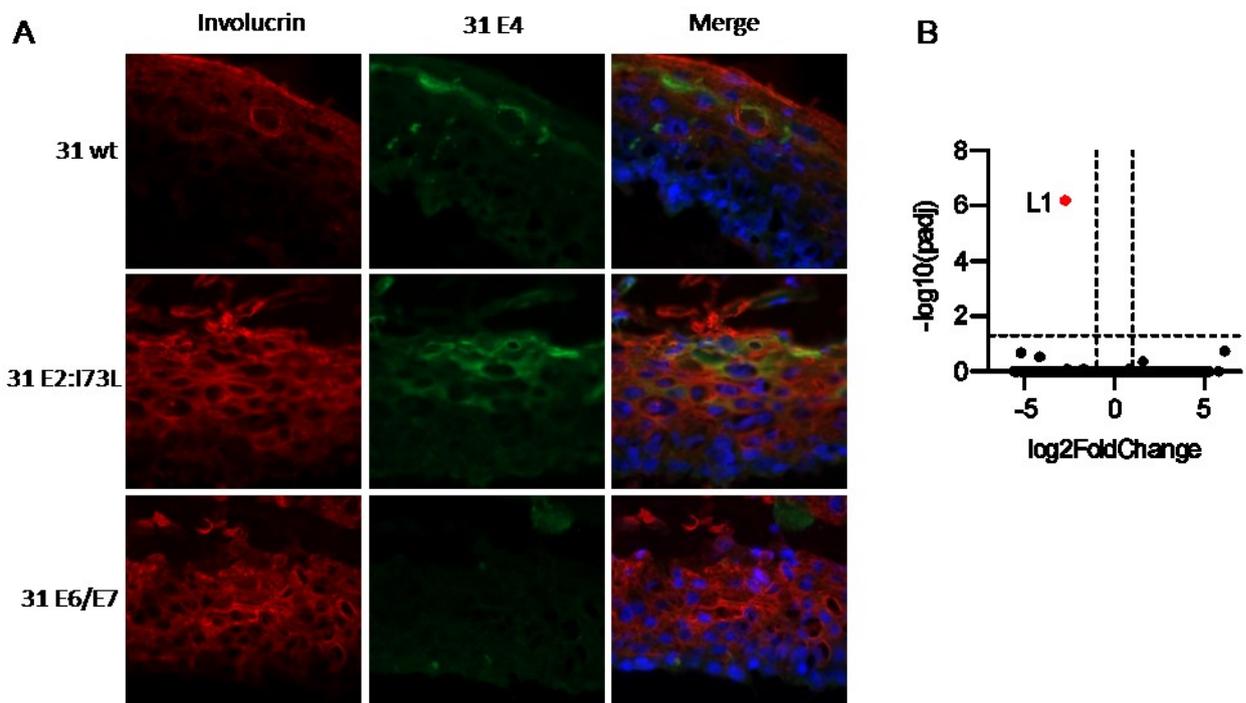
Für die RNA-Sequenzierung wurden die primären Keratinozyten, sowie die 31 wt und 31 E2:IL73 Zelllinien der drei verschiedenen Spender jeweils entweder mit einer siRNA gegen BRD4, BRD4S oder beiden zusammen transfiziert (**Abbildung 8 C**). Als weitere Kontrolle wurden die 31 E6/E7-Zelllinien nur mit siControl behandelt. Die Knockdown-Effizienzen der siRNAs wurden mittels qPCR mit spezifischen Primern gegen BRD4 oder BRD4S untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Knockdown von BRD4, als auch BRD4S erfolgreich war und auch keine Auswirkungen auf die Transkription des jeweils anderen Spleißproduktes hatte (**Abbildung 8 D**).

Überraschenderweise gab es keine Unterschiede bei der Expression zellulärer Gene zwischen Wildtyp und Mutante in der Anwesenheit der Kontroll-siRNA (**Abbildung 8 E**), was der Annahme widerspricht, dass E2 durch die Bindung an die CTM von BRD4 Einfluss auf die zelluläre Transkription nehmen kann. Da wider Erwarten kein Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp im zellulären Transkriptom gemessen wurde, war auch eine weitere Auswertung der Transkriptome nach siRNA-Knockdown von BRD4 und BRD4S hinfällig.

#### **5.4 Die Bindung von E2 an BRD4 ist wichtig für die Transkription der späten viralen Gene in differenzierten Zellen**

Der virale Lebenszyklus von HPV ist stark an den Differenzierungsstatus der Wirtszellen gebunden. So steigt die Amplifikation der viralen Genome, ebenso wie die Transkription der späten viralen Gene nach Differenzierung stark an [142]. Daher ist es möglich, dass die Interaktion von BRD4 und E2 erst nach Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. Das zuvor beschriebene RNA-Seq-Experiment wurde mit undifferenzierten Zellen durchgeführt. Um zu untersuchen inwiefern die Interaktion von BRD4 und E2 einen Einfluss auf das Transkriptom in differenzierten Keratinozyten hat, wurden organotypische Kulturen der HPV31 Wildtyp, E2:IL73, sowie der HPV31 E6/E7 Zelllinien hergestellt. Die organotypischen Kulturen wurden für 16 Tage differenziert und anschließend für die RNA-

Sequenzierung geerntet. Teile der organotypischen Kulturen wurden eingebettet, um Kryoschnitte anzufertigen. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Involucrin, einem Differenzierungsmarker, sowie HPV31 E4 angefärbt. Wie in **Abbildung 9 A** zu sehen ist die undifferenzierte Basalzellschicht Involucrin-negativ und nur Zellen der höheren differenzierten Schichten positiv. HPV31 E4 wird ebenfalls erst nach Differenzierung stark exprimiert und dient als Hinweis für die virale Amplifikation [143, 144]. Sowohl in den HPV31 Wildtyp-, als auch in den E2:IL73-Zelllinien ist eine deutliche E4-Expression in den oberen Zellschichten zusehen. Im Vergleich dazu sind die 31 E6/E7-Zelllinien, wie zu erwarten, negativ für E4 (**Abbildung 9 A**).



**Abbildung 9:** Die HPV31 E2:IL73-Mutante weist, im Vergleich zum Wildtyp, eine reduzierte Transkription an L1 in differenzierten Zellen auf. **A)** Kryoschnitte von organotypischen Kulturen, mit einer Schnittdicke von 7  $\mu$ M. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen Involucrin (rot) und 31 E4 (grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. **B)** Der Volcano Plot zeigt die Gene deren Transkription in der E2:IL73-Mutante im Vergleich zu den Wildtyp-Zelllinien verändert sind. Für die RNA-Sequenzierung wurden jeweils Zelllinien aus Keratinozyten von drei unterschiedlichen Spendern verwendet.

Die Auswertung der RNA-Sequenzierung zeigte, dass es auch nach Differenzierung keine Unterschiede in der Expression von zellulären Genen zwischen Wildtyp und Mutante gibt. Jedoch war die Transkriptmenge des späten viralen L1-Gens in den Mutanten-, im Vergleich zu den Wildtyp-Zelllinien signifikant reduziert (**Abbildung 9 B**). Die Interaktion von E2 mit der CTM von BRD4 hat zwar keinen

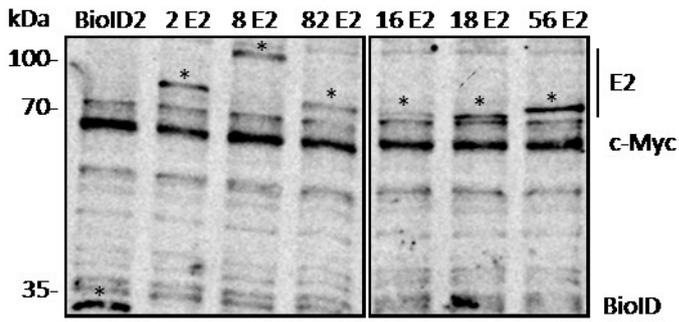
Einfluss auf die Transkription der zellulären Gene, ist aber wichtig für die Expression der späten viralen Gene.

## **5.5 Proximity-Labeling mittels BioID zeigt potentielle Interaktoren von E2**

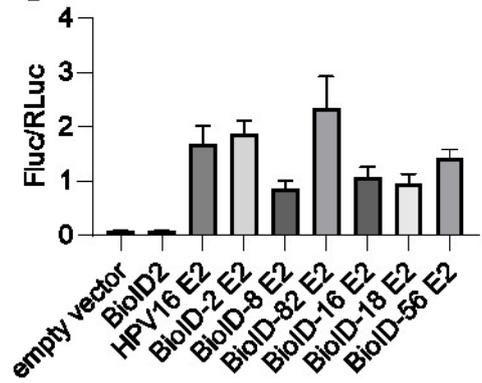
Zusätzlich zu den viralen E1- und zellulären BRD4-Proteinen, die hoch konservierte Interaktionspartner für alle E2-Proteine des Papillomavirus sind, wurde eine große Anzahl von potentiell E2 interagierenden Wirtszellproteinen, mit Hilfe von verschiedenen Immunpräzipitations-Massenspektrometrie-Ansätzen identifiziert [46]. In jüngster Zeit wurden Biotin-Proximity-Ligationstests entwickelt, bei denen das Protein von Interesse genetisch an eine Biotin-Proteinligase fusioniert wird, die nach Zugabe von Biotin *in vivo* proximale Proteine biotinyliert, die entweder direkte Interaktionspartner des Ziel-Proteins sind oder sich in einem Abstand von weniger als 10 nm befinden [145]. Biotinylierte Proteine werden dann durch Streptavidin-Anreicherung und anschließende Massenspektrometrie identifiziert. Das *Biotin-Proximity Labeling* bietet dadurch den Vorteil, dass potentielle Interaktionspartner zum einen *in vivo* markiert und zum anderen auch schwache oder nur sehr transiente Interaktionen identifiziert werden können [114, 145].

Um neue potentielle zelluläre Interaktoren von HPV E2 zu identifizieren, wurde ein BioID-Massenspektrometrie-Experiment durchgeführt. Es wurden jeweils 3 E2 gewählt, die nach den Ergebnissen der FACS-FRET-Analysen in der Lage sind BRD4S zu binden, und 3 E2 Proteine, die dies nicht können. Damit sollte untersucht werden, ob E2 von karzinogenen HPV-Typen in der Lage sind mit anderen zellulären Proteinen zu interagieren, als nicht-karzinogene HPV-Typen. Zu diesem Zweck wurden BioID2-markierte E2-Proteine von HPV 16, 18, 56, 2, 8, 82 in HPV-negativen C33A-Zellen exprimiert. Western-Blot-Experimente bestätigten die Expression der verschiedenen BioID2-E2-Fusionsproteine in leicht unterschiedlichen Mengen (**Abbildung 10 A**).

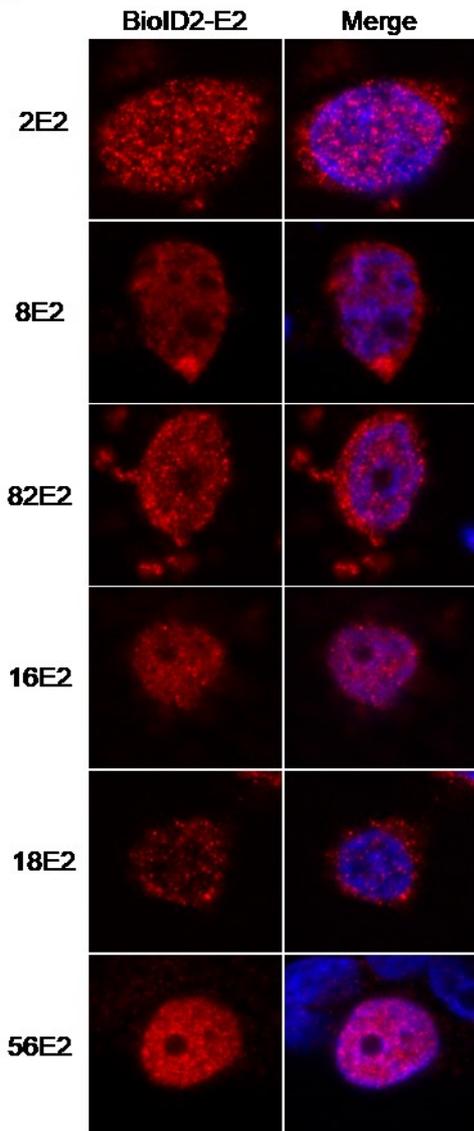
**A**



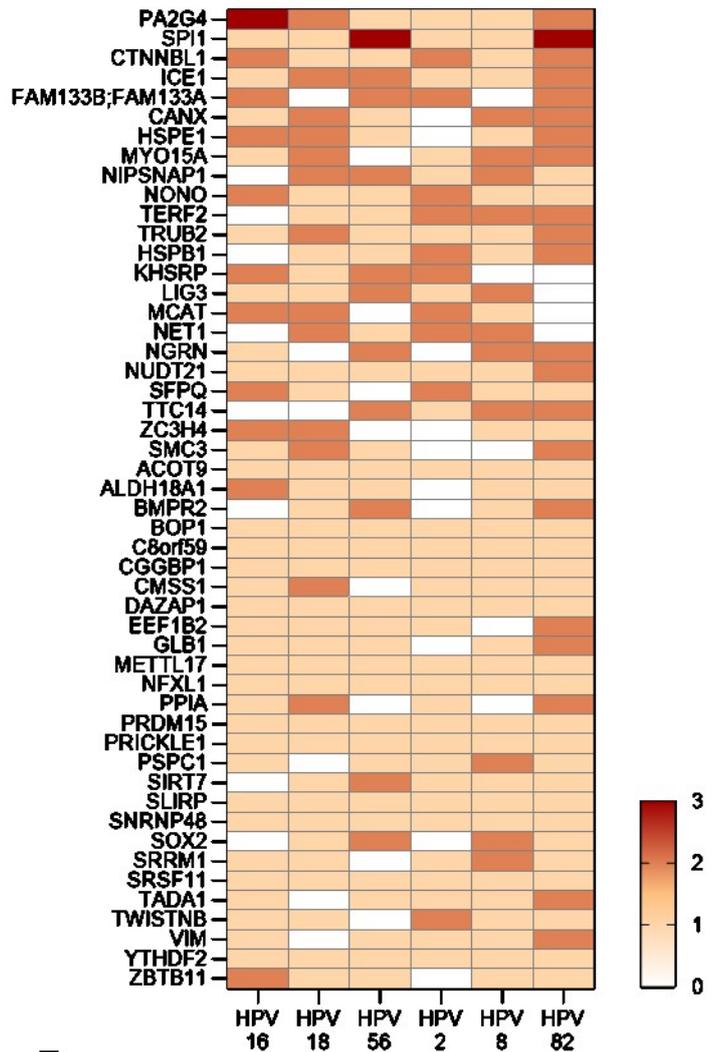
**C**



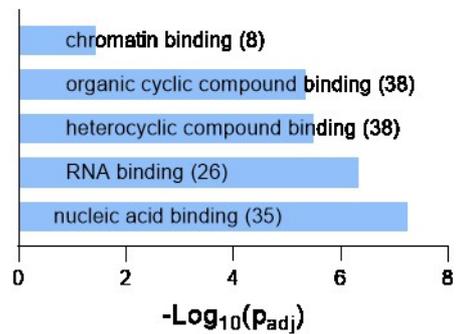
**B**



**D**



**E**



**Abbildung 10:** BioID2-Proximity-Labeling zeigt neue mutmaßliche Interaktionspartner von HPV-E2-Proteinen. **A)** C33A-Zellen wurden mit den verschiedenen BioID2-E2-Expressionsvektoren transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Proteinexpression mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen das Myc-Epitop analysiert, die endogene c-Myc- und Myc-markierte BioID2-E2-Proteine nachweisen. **B)** C33A-Zellen wurden mit 100 ng eines der BioID2-E2-Expressionsplasmide transfiziert und durch Immunfluoreszenz mit anti-myc-Antikörpern analysiert. Zur Färbung der DNA wurde DAPI verwendet. **C)** C33A-Zellen wurden mit 50 ng pC18-Sp1-Luc, 10 ng BioID2-E2 oder pSG5 16 E2 und 0,5 ng pCI-Neo RLuc (Transfektionskontrolle) transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet. **D)** Heatmap, die die Anreicherung der 50 wichtigsten Treffer aus BioID-E2-Proximity-Labeling-Experimenten zeigt (n=3). **E)** Eine g:profiler-Analyse (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) der 50 wichtigsten Treffer aus dem BioID-E2-Proximity-Labeling-Experiment. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Proteine in der jeweiligen Kategorie an.

Darüber hinaus ergab die Immunfluoreszenzanalyse eine vorwiegend nukleäre Lokalisierung aller BioID2-E2-Fusionsproteine, die mit der subzellulären Lokalisierung von Wildtyp-E2 übereinstimmt (**Abbildung 10 B**). Um die Funktionalität der E2-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden Luciferase-Assays mit dem E2-abhängigen Reporterplasmid pC18-Sp1-Luc und unfusioniertem HPV16 E2 als Positivkontrolle durchgeführt. Alle BioID2-markierten E2-Proteine waren in der Lage, das Reporterplasmid in leicht unterschiedlichen Mengen zu aktivieren, ähnlich wie Wildtyp 16 E2 (**Abbildung 10 C**). Insgesamt deuten diese Experimente darauf hin, dass die BioID2-E2-Fusionsproteine im Zellkern exprimiert werden und eine Transkriptionsaktivierungsaktivität aufweisen.

C33A-Zellen wurden nur mit BioID2 oder mit den verschiedenen BioID2-E2-Fusionen transfiziert. Biotin-markierte Proteine wurden durch Massenspektrometrie-Analyse identifiziert. Die Anreicherung der biotinylierten Proteine aus jedem der verschiedenen Lysate mit den BioID2-E2-Fusionsproteinen wurde mit der reinen BioID2-Probe verglichen. Insgesamt wurden 514 Proteine bei einem der E2-Proteine mindestens einmal signifikant angereichert. Die Heatmap zeigt die 50 wichtigsten Treffer aus jedem der drei unabhängigen Experimente und die Anzahl der Anreicherungen im Vergleich zur Kontrolle (**Abbildung 10 D**). Eine g:profiler-Analyse (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) ergab, dass die Mehrzahl dieser Proteine eine Nukleinsäure-, RNA- oder Chromatinbindungsaktivität aufweist, die mit Funktionen bei der Kontrolle der Genexpression übereinstimmt (**Abbildung 10 E**).

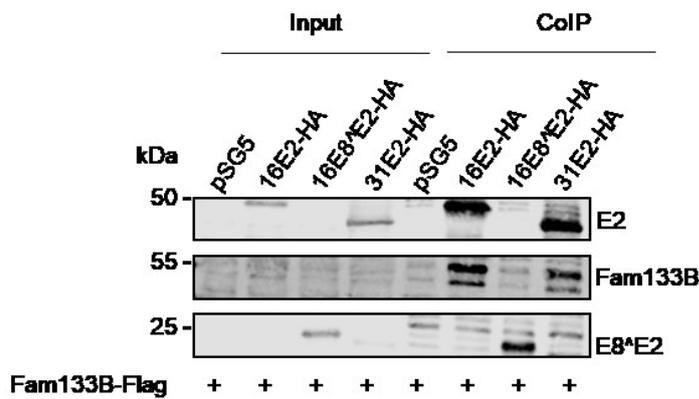
Es wurden verschiedene Proteine ausgewählt und deren Ko-Lokalisation mit E2 untersucht. Dabei zeigten sich Fam133A/B und ZC3H4 als mögliche Interaktoren. Fam133A/B wurde am häufigsten in mindestens 2 Experimenten angereichert (16 E2, 56 E2co, 2 E2, 82 E2). ZC3H4 war das einzige Protein, welches nur bei E2 von karzinogenen HPV-Typen (16 E2, 18 E2) in mindestens 2 Experimenten angereichert wurde (**Abbildung 10 D**). ZC3H4 wird außerdem mit der Kontrolle der Genexpression in Verbindung gebracht [95-100]. Zu der Funktion von Fam133A/B ist derzeit noch wenig bekannt. Aus

diesen Gründen wurden diese Proteine weiter auf ihre potentielle Interaktion mit E2 und deren Bedeutung für den viralen Lebenszyklus von HPV untersucht.

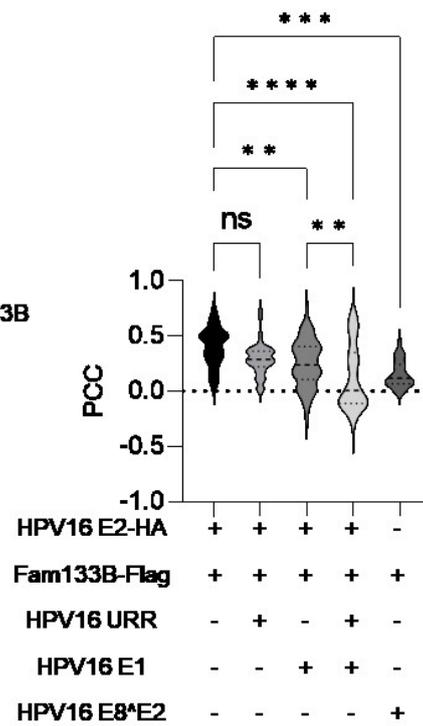
## **5.6 Fam133B interagiert mit HPV16 und 31 E2**

Fam133A ist ein Krebs-Hoden-Antigen, das normalerweise nur in Spermatozyten oder Tumoren exprimiert wird [92, 146]. Aus diesem Grund konzentrieren sich die weiteren Experimente auf das Paralog Fam133B, welches in den Zielzellen von HPV exprimiert wird. Zur Validierung der Ergebnisse aus dem BioID-Massenspektrometrie-Experiment wurde ein Ko-Immunpräzipitations-Experiment durchgeführt. Die Ko-Immunpräzipitation von überexprimiertem Fam133B-Flag mit HPV16 E2, E8<sup>E2</sup> oder HPV31 E2 in C33A-Zellen führte zu einer Anreicherung von Fam133B, wenn es zusammen mit HPV16 oder HPV31 E2, aber nicht, wenn es mit HPV16 E8<sup>E2</sup> exprimiert wurde (**Abbildung 11 A**).

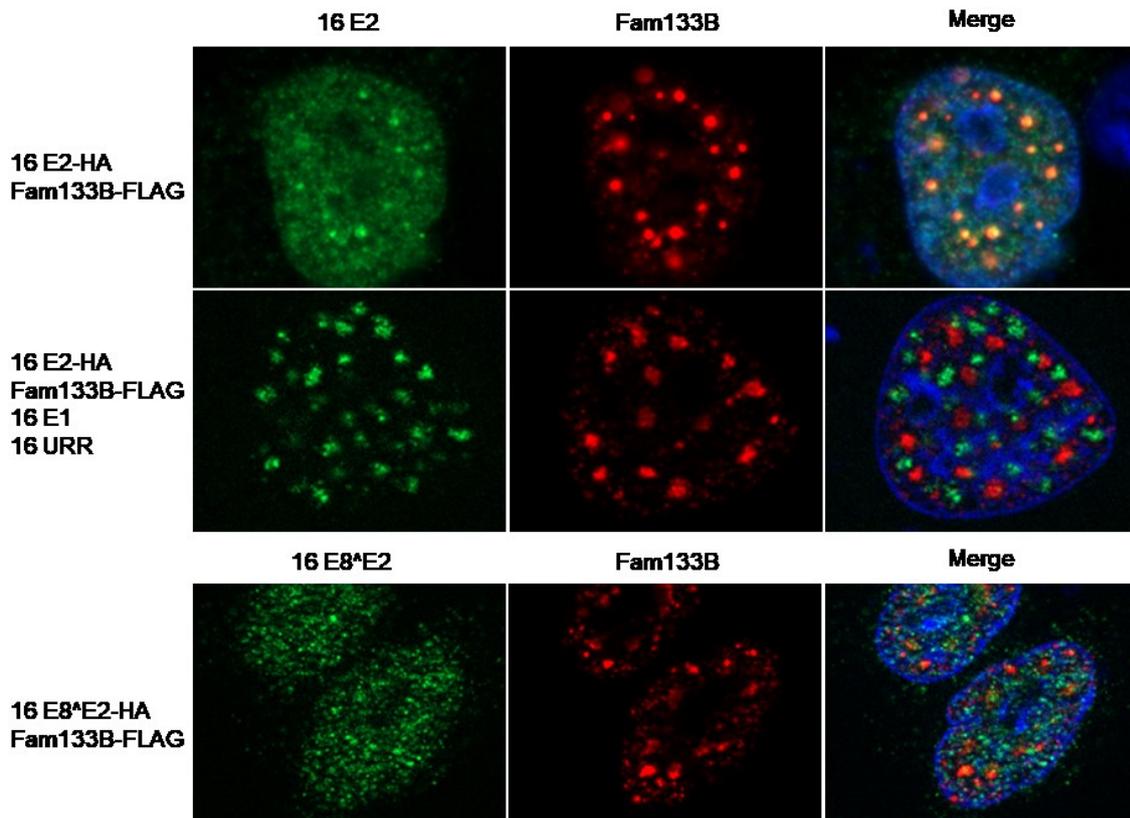
**A**



**C**



**B**



**Abbildung 11:** Fam133B interagiert mit HPV16 E2. **A)** C33A-Zellen wurden mit 1 µg Fam133B-Flag zusammen mit 1 µg 16 E2-HA, 31 E2-HA oder 16 E8<sup>E2</sup>-HA Expressionsplasmiden transfiziert. Es wurde eine Ko-Immünpräzipitation unter Verwendung von anti-HA-Magnetbeads durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden dann mittels Western Blot analysiert. **B)** C33A-Zellen wurden mit

Kombinationen von Expressionsvektoren für Fam133B (500 ng; pcMVneo-3xFlag-Fam133B), HPV16 E1 (500 ng; pSG5 16 E1co), HPV16 E2 (50 ng; pSG5 16 E2-HA) oder HPV16 URR (500 ng, pGL3 16 URR) transfiziert und mittels Immunfluoreszenz mit Anti-HA- und Anti-Flag-Antikörpern analysiert. Zur Färbung der DNA wurde DAPI verwendet. **C)** Ko-Lokalisierung zwischen Fam133B und HPV16 E2. Der Pearson-Korrelationskoeffizient von  $n \geq 29$  E2-positiven Nuclei wurde bestimmt und die Mittelwerte wurden berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; ns  $p > 0,5$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Dies deutet darauf hin, dass die N-terminale TAD von E2 für die Interaktion mit Fam133B erforderlich ist. In Übereinstimmung damit ergab die Analyse von transfizierten Fam133B-Flag- und HPV16 E2-HA-Proteinen in C33A-Zellen, mittels Immunfluoreszenz, eine signifikant höhere Ko-Lokalisierung beider Proteine im Zellkern (Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC) = 0,4) als Fam133B-Flag, das mit HPV16 E8<sup>E2</sup>-HA ko-transfiziert wurde (PCC = 0,12) (**Abbildung 11 B, C**). Die Ko-Transfektion mit der HPV16 URR oder HPV16 E1 reduzierte die Ko-Lokalisierung zwischen Fam133B und E2 signifikant (**Abbildung 11 B, C**). Die Bindung von E2 an E1 scheint die Ko-Lokalisierung von Fam133B und E2 deutlich zu reduzieren.

## 5.7 HPV16 E2 aktiviert den späten viralen Promotor in Abhängigkeit von Fam133B

Da bisher wenig über die Funktion von Fam133B erforscht ist, wurden die bekannten Funktionen von E2 und die möglichen Auswirkungen von Fam133B auf diese, untersucht. Es ist bekannt, dass E2 die Genexpression reguliert. Daher wurde der Einfluss von Fam133B auf die E2-abhängige HPV16-Promotoraktivität mit Hilfe von Reporterassays untersucht. Dazu wurde pC18-Sp1-Luc, welches durch E2 stark aktiviert wird, das HPV16 E6 ATG-Luc, in dem die URR mit dem frühen Hauptpromotor P<sub>97</sub> die Luciferase-Expression vom E6 ATG aus steuert, HPV16 E7 ATG-Luc, in dem Luciferase vom E7 ATG aus durch P<sub>97</sub> exprimiert wird, und HPV16 E1 ATG-Luc, in dem Luciferase vom E1 ATG aus exprimiert wird verwendet (**Abbildung 12 A**). HPV16 E1 ATG-Luc enthält zusätzlich zu P<sub>97</sub> auch P<sub>670</sub>, den späten Promotor (**Abbildung 12 A**). Darüber hinaus enthalten E7 ATG-Luc und E1 ATG-Luc das fakultative Intron im E6-Gen, was zu P<sub>97</sub>-initiierten, gespleißten Transkripten führen kann (**Abbildung 12 A**). Die verschiedenen Reporterstrukturen wurden mit HPV16 E2 und zunehmenden Mengen von Fam133B-Expressionsplasmiden (**Abbildung 12 B**) in C33A-Zellen ko-transfiziert.

HPV16 E2 wurde bisher hauptsächlich mit der Repression des frühen viralen Promotors in Verbindung gebracht, nicht aber mit einer Aktivierung des späten Promotors [46, 47, 102, 147, 148]. Die Ko-Expression des E1 ATG-Luc-Reporters mit HPV16 E2 zeigte jedoch eine Aktivierung des Reporterkonstrukts (**Abbildung 12 B**). Fam133B zeigt einen leichten positiven Effekt auf die Aktivierung

der verschiedenen viralen Reporterkonstrukte. Wenn es jedoch zusammen mit HPV16 E2 exprimiert wird, zeigt es einen signifikant starken positiven Effekt auf die Aktivierung des E1 ATG-Luc-Reporterkonstrukts, das zusätzlich zu P<sub>97</sub> den späten Promotor P<sub>670</sub> enthält (**Abbildung 12 B**).

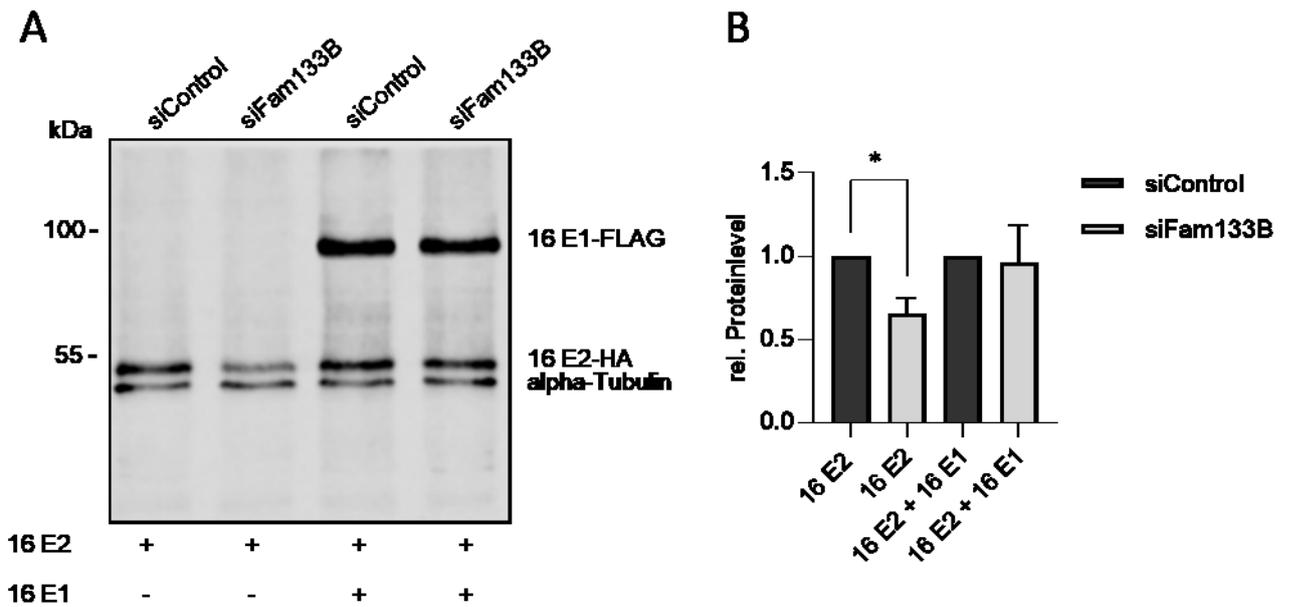


**Abbildung 12:** Fam133B erhöht die E2-induzierte Aktivierung des späten Promotors. **A)** Schematische Darstellung der verschiedenen HPV16-Reporterkonstrukte. Dargestellt sind die Startstellen des frühen Hauptpromotors P<sub>97</sub> und des späten Promotors P<sub>670</sub>. Die E2-Bindestellen in der URR sind braun markiert. **B)** C33A-Zellen wurden mit 0,5 ng pCI-Neo RLuc, 50 ng eines der vier Reporterplasmide (pC18-Sp1-Luc, HPV16 E6 ATG-Luc, HPV16 E7 ATG-Luc, HPV16 E1 ATG-Luc), 10 ng 16 E2 und zunehmenden Mengen von Fam133B (50 ng, 100 ng, 250 ng) oder entsprechenden Leervektoren transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet und auf die Kontrolle normalisiert. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; ns p>0,05; \*p<0,05, \*\*p<0,01. **C)** C33A-Zellen wurden mit 15 pmol siControl oder siFam133B transfiziert und 24 h später mit 0,5 ng pCI-Neo RLuc, 50 ng eines der vier Reporterplasmide (pC18-Sp1-Luc, E6 ATG-Luc, E7 ATG-Luc, E1 ATG-Luc), 10 ng pSG5 16 E2 oder entsprechenden Leervektoren transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; ns p>0,05; \*p<0,05. **D)** C33A-Zellen wurden mit Fam133B-Flag oder entsprechendem Leervektor transfiziert und 48 h später für einen Western Blot geerntet.

Dieser Effekt steigt mit zunehmender Menge an Fam133B, was stark darauf hindeutet, dass Fam133B einen positiven Effekt auf die E2-abhängige Aktivierung des späten HPV16-Promotors hat. Der Knockdown von Fam133B durch siRNA führte nur zu einer geringen, nicht signifikanten Abnahme der Reporteraktivität (**Abbildung 12 C**). Dies könnte auf die sehr niedrigen Mengen von endogenem Fam133B zurückzuführen sein.

## **5.8 Der Knockdown von Fam133B führt zu einer reduzierten E2-Proteinmenge**

Um zu überprüfen, ob die zuvor genannten Ergebnisse auf veränderten E2-Proteinmengen beruhen, wurden C33A-Zellen mit siRNA gegen Fam133B behandelt und einen Tag später mit HPV16 E2-HA und mit oder ohne HPV16 E1-Flag transfiziert. Die Proteinmengen wurde anschließend mit einem Western Blot mittels LI-COR-Gerät quantifiziert (**Abbildung 13 A**). Der Knockdown von Fam133B mittels siRNA führte zu einer signifikanten Verringerung des HPV16 E2-Proteinlevels. Interessanterweise hob die Ko-Transfektion mit HPV16 E1 diesen Effekt auf (**Abbildung 13 B**). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von E2 mit E1 die Bindung an Fam133B verringert.

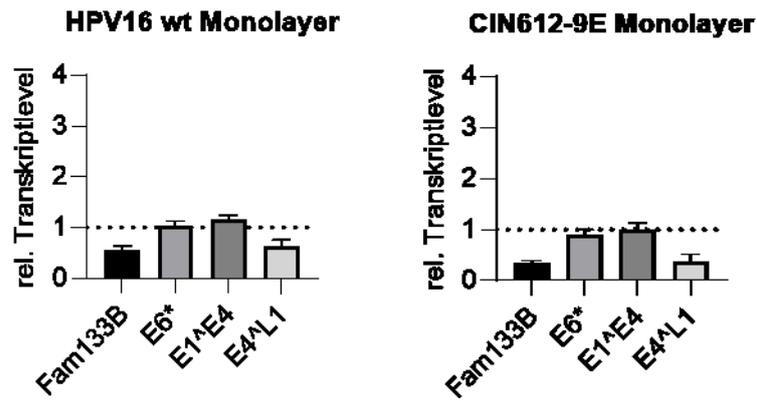


**Abbildung 13:** Der Knockdown von Fam133B reduziert das Proteinlevel von HPV16 E2. **A)** C33A wurden mit 75 pmol siControl oder siFam133B und 24 h später entweder nur mit 16E2-HA oder gemeinsam mit 16E1-FLAG transfiziert. **B)** Die Proteinlevel wurden auf das zelluläre alpha-Tubulin normalisiert. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; \* $p < 0,05$ .

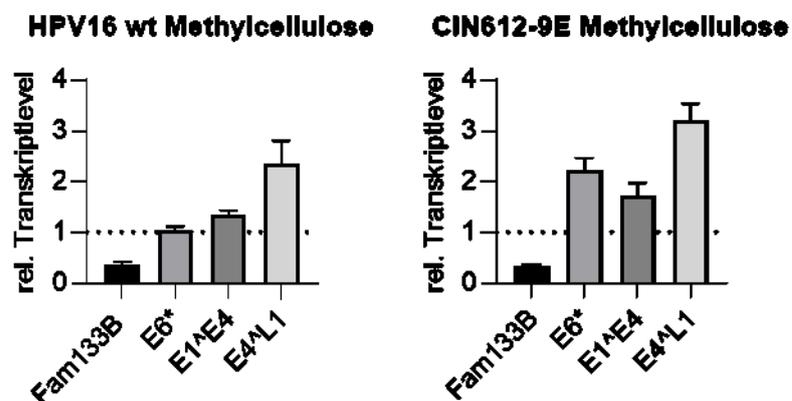
## 5.9 Der Knockdown von Fam133B beeinflusst die Transkription der späten viralen Gene

Um die Funktion von Fam133B im viralen Lebenszyklus weiter zu untersuchen, wurden HPV16-positive Keratinozyten und HPV31-positive Zellen aus einer intraepithelialen Neoplasie des Gebärmutterhalses (CIN612-9E), die in undifferenziertem Zustand gehalten wurden, mit siFam133B transfiziert und die virale Genexpression 48 Stunden später mittels qPCR bestimmt. Die gespleißte E6\*<sub>I</sub> RNA wird von P<sub>97</sub>, E1<sup>E4</sup> von P<sub>97</sub> als auch von P<sub>670</sub>, und E4<sup>L1</sup> hauptsächlich von P<sub>670</sub> exprimiert [149]. Der Knockdown von Fam133B reduzierte spezifisch die Menge der E4<sup>L1</sup>-Transkripte in beiden Zelllinien (**Abbildung 14 A**).

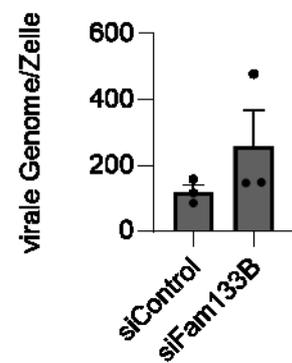
**A**



**B**



**C**



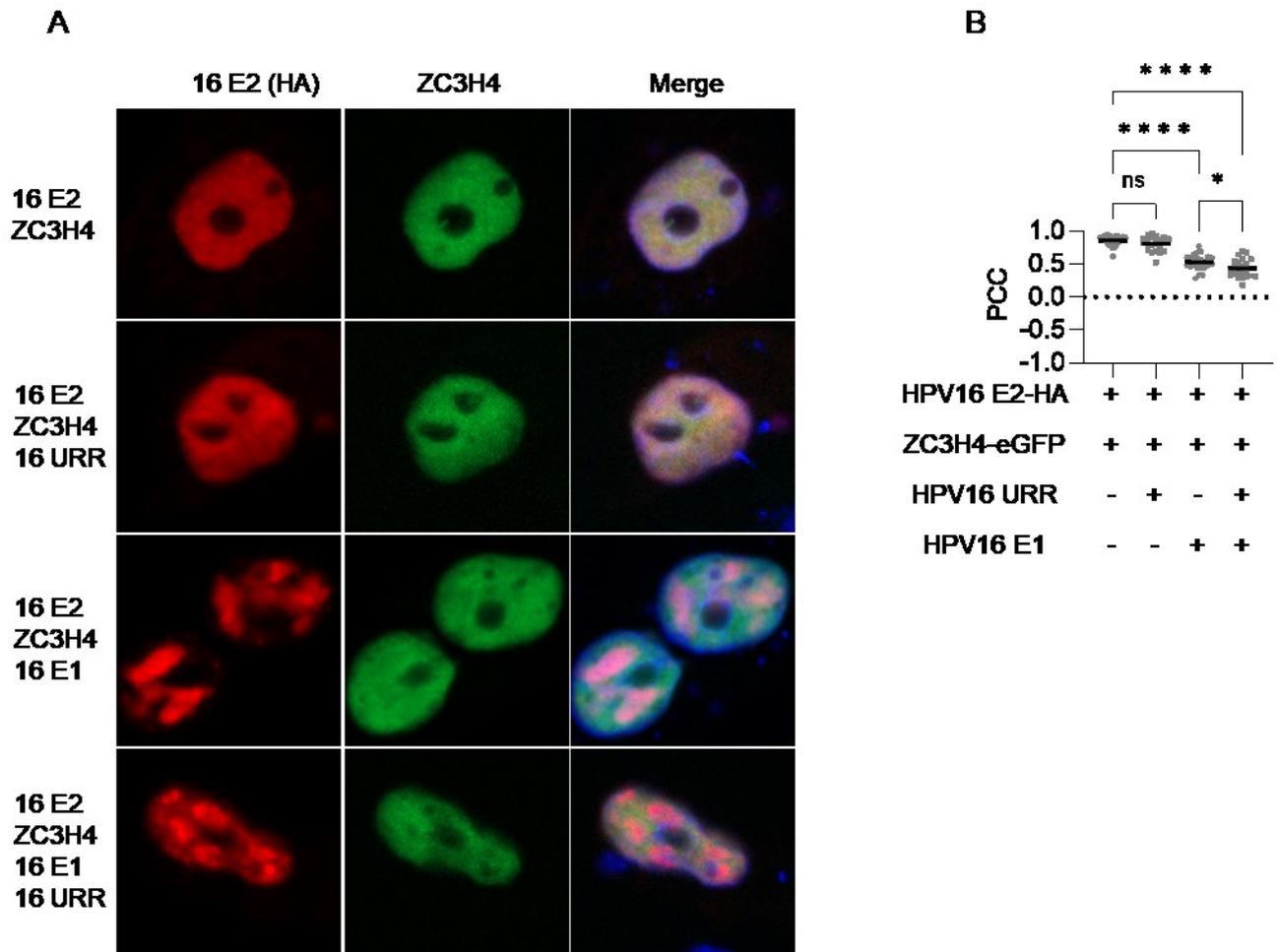
**Abbildung 14:** Der Knockdown von Fam133B beeinflusst die Transkription der späten viralen Gene. **A)** HPV16 positive Keratinozyten und Cin612-E9-Zellen wurden jeweils mit siControl oder siFam133B transfiziert und die mRNA-Level 72 h später mittels qPCR gemessen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. **B)** Die Zelllinien wurden nach Transfektion mit siRNA für 48 h in Methylcellulose differenziert und anschließend mRNA-Level via qPCR gemessen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. **C)** Die Kopienzahl der viralen Genome wurden mittels qPCR nach Behandlung mit siFam133B oder siControl und Differenzierung in Methylcellulose, wie oben beschrieben, berechnet.

Andere virale Transkripte blieben unverändert. Im Falle von E1<sup>E4</sup> könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass E1<sup>E4</sup> in undifferenzierten Zellen vor allem über den frühen Promotor und nur schwach vom späten Promotor exprimiert wird. Um die Wirkung von Fam133B auf späte virale Gene weiter zu untersuchen, wurden die Zellen nach der Behandlung mit siRNA 48 Stunden lang in Methylcellulose differenziert. Überraschenderweise führt der Knockdown von Fam133B in differenzierten Zellen, entgegen dem Trend in undifferenzierten Zellen, zu einem Anstieg der E4<sup>L1</sup>- sowie zu einem leichten Anstieg der E1<sup>E4</sup>-Transkripte (**Abbildung 14 B**).

Des Weiteren wurden eine Auswirkung des siRNA-Knockdowns von Fam133B auf die Kopienzahl der viralen Genome untersucht. Dieser hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Menge der viralen Genome (**Abbildung 14 C**).

## 5.10 ZC3H4 ko-lokalisiert mit HPV16 E2

Zusätzlich zu Fam133B wurde ZC3H4 auf eine mögliche Rolle im viralen Lebenszyklus untersucht. Versuche, überexprimiertes GFP-ZC3H4 mit HPV16 E2-HA aus transfizierten C33A-Zellen zu ko-immunpräzipitieren, konnten keine direkte Interaktion nachweisen, was darauf hindeutet, dass entweder die Interaktion schwach ist oder, dass sich beide Proteine nur in unmittelbarer Nähe zueinander aufhalten und nicht direkt miteinander interagieren. Die Analyse der transfizierten GFP-ZC3H4- und HPV16 E2-HA-Proteine in C33A-Zellen mittels Immunfluoreszenz ergab jedoch eine hohe Ko-Lokalisierung beider Proteine im Zellkern (Pearson-Korrelationskoeffizient (PCC) = 0,86; **Abbildung 15 A**).

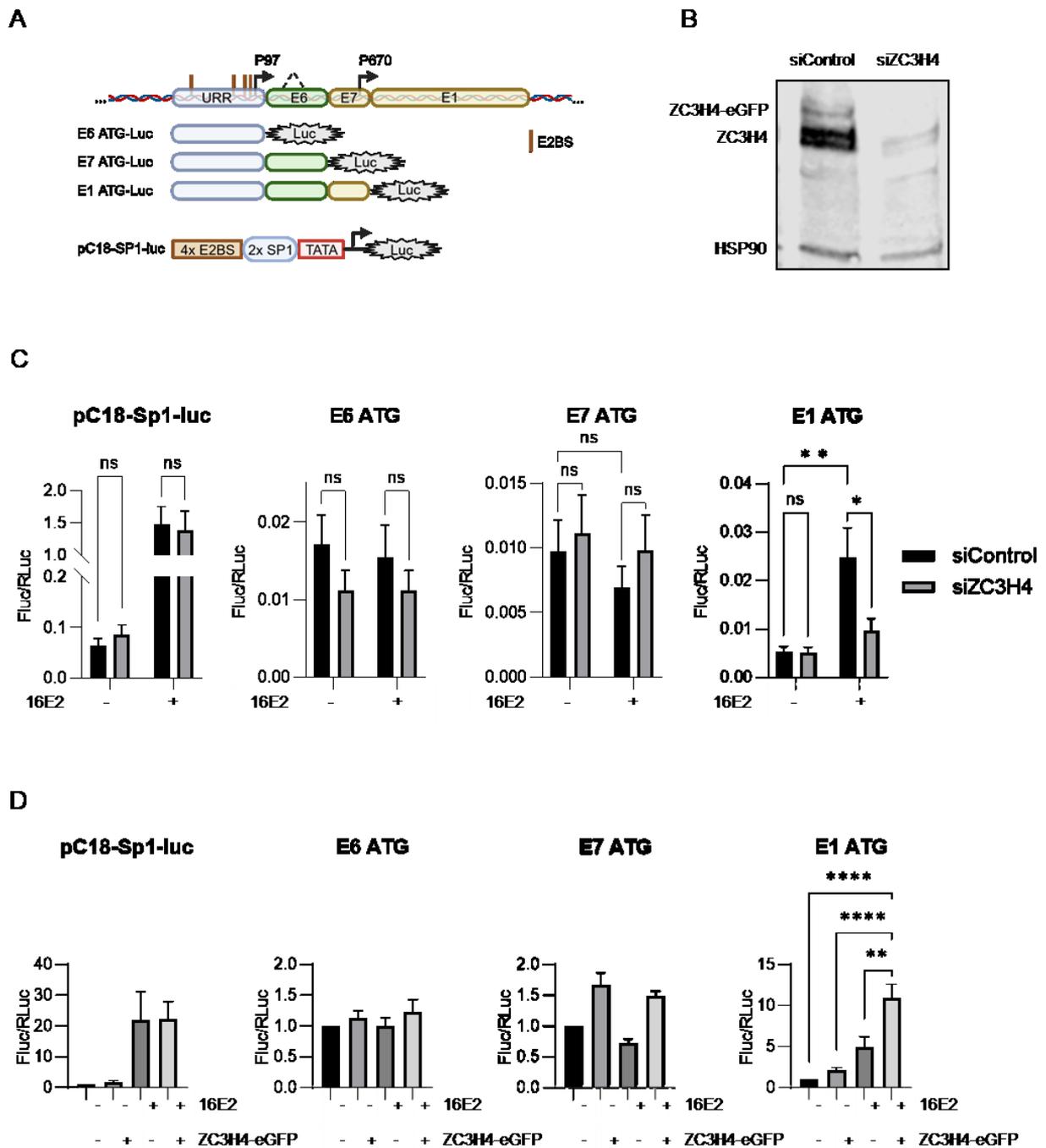


**Abbildung 15:** ZC3H4 ko-lokalisiert mit HPV16 E2. **A)** C33A-Zellen wurden mit Kombinationen von Expressionsvektoren für HPV16 E1 (500 ng; pSG5 16 E1co), HPV16 E2 (50 ng; pSG5 16 E2-HA), ZC3H4 (500 ng; pcDNA3 ZC3H4-eGFP) oder HPV16 URR (500 ng, HPV16 E6 ATG-Luc) transfiziert und durch Immunfluoreszenz mit Anti-HA- oder Anti-ZC3H4-Antikörpern analysiert. DAPI wurde zur Färbung der DNA verwendet. **B)** Ko-lokalisierung zwischen ZC3H4 und HPV16 E2. Der Pearson-Korrelationskoeffizient von  $n \geq 23$  E2-positiven Kernen wurde bestimmt und die Mittelwerte wurden berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; ns  $p > 0,5$ , \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$

Diese war nach Ko-Transfektion eines HPV16 URR-Plasmids (HPV16 E6 ATG-Luc), welches hochaffine E2-Bindestellen, den Replikationsursprung und Transkriptionskontrollsequenzen enthält, quasi unverändert (**Abbildung 15 B**). Die Ko-Transfektion von E1 verringerte jedoch die Ko-Lokalisierung von E2 und ZC3H4 signifikant (PCC= 0,53), und dieser Wert sank weiter auf 0,44, wenn das HPV16-URR-Plasmid ko-transfiziert wurde (**Abbildung 15 B**). Nichtsdestotrotz konnte eine Ko-Lokalisierung von ZC3H4 mit E2 unter verschiedenen Bedingungen gemessen werden. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von ZC3H4 im viralen Lebenszyklus hin.

## 5.11 HPV16 E2 aktiviert den späten viralen Promotor in einer von ZC3H4 abhängigen Weise

Da sowohl ZC3H4 als auch E2 die Genexpression regulieren, wurde ihr Einfluss auf die Aktivität des HPV16-Promotors mittels Reporterassays untersucht. Es wurden die in Abschnitt (5.7) bereits beschriebenen Reporterkonstrukte pC18-Sp1-Luc, E6 ATG-Luc, E7 ATG-Luc und E1 ATG-Luc verwendet. Die verschiedenen Reporterkonstrukte wurden mit einem HPV16 E2-Expressionsvektor in C33A-Zellen ko-transfiziert, nachdem die ZC3H4-Expression mit einer spezifischen siRNA verringert worden war (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16:** ZC3H4 erhöht die Aktivierung des späten Promotors durch E2. **A)** Schematische Darstellung der verschiedenen HPV16-Reporterkonstrukte. Dargestellt sind die Startstellen des frühen Hauptpromotors P<sub>97</sub> und des späten Promotors P<sub>670</sub>. **B)** Immunoblot von C33A-Zellen, die mit siRNA gegen ZC3H4 oder einer Kontroll-siRNA und mit 1000 ng ZC3H4-eGFP transfiziert wurden, unter Verwendung von für ZC3H4 spezifischen Antikörpern zum Nachweis von endogenem und transfiziertem ZC3H4. HSP90 wurde als Ladekontrolle verwendet. **C)** C33A-Zellen wurden mit 15 pmol siControl oder siZC3H4 behandelt und 24 h später mit 0,5 ng pCI-Neo RLuc, 50 ng eines der vier Reporterplasmide (pC18-Sp1-Luc, E6 ATG-Luc, E7 ATG-Luc, E1 ATG-Luc), 10 ng pSG5 16 E2 oder leeren Vektoren transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest (im Vergleich zur Aktivität des Luciferase-Reporters) ermittelt; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001. **D)** C33A-Zellen wurden mit 0,5 ng pCI-Neo RLuc, 50 ng eines der vier Reporterplasmide (pC18-Sp1-Luc, E6 ATG-Luc, E7 ATG-Luc, E1 ATG-Luc), 10 ng 16 E2 und 50 ng ZC3H4-eGFP oder leeren Vektoren transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet und relativ zur Kontrolle ausgedrückt. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett-Test für multiple Vergleiche ermittelt; ns p>0,05; \*p<0,05, \*\*p<0,01.

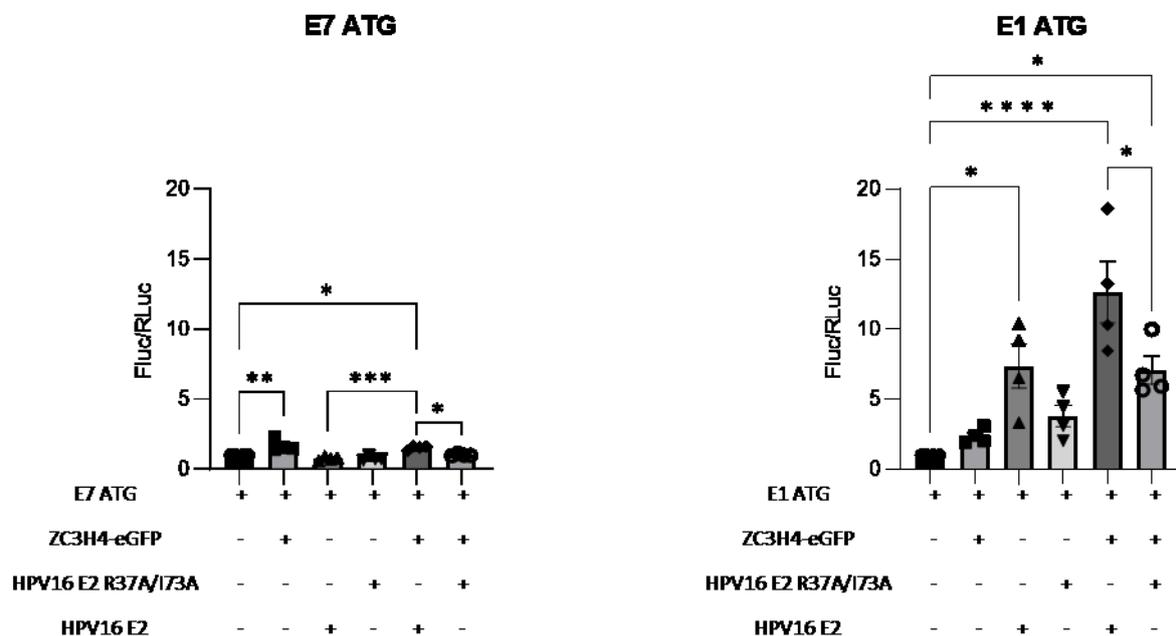
Der pC18-Sp1-Luc-Reporter wurde durch E2 stark aktiviert. Der Knockdown von ZC3H4 hatte keinen Einfluss auf die Basalaktivität oder die E2-Transaktivierung. E2 hatte keine signifikante Wirkung auf E6 ATG-Luc. Der Knockdown von ZC3H4 hemmte dessen Aktivität in Abwesenheit oder Anwesenheit von E2 zwar schwach, aber nicht signifikant (**Abbildung 16 C**). E2 hemmte außerdem E7 ATG-Luc leicht, aber wiederum nicht signifikant und der Knockdown von ZC3H4 aktivierte den Reporter sowohl in Ab-, als auch Anwesenheit von E2 nur sehr schwach (**Abbildung 16 C**). E2 aktivierte E1 ATG-Luc signifikant um das 4,8-fache. Der Knockdown von ZC3H4 hatte keinen Einfluss auf die Basalaktivität, verringerte aber die Aktivierung von E1 ATG-Luc in Gegenwart von E2 um das 2,5-fache.

Um dies weiter zu analysieren, wurden ZC3H4-Überexpressionsstudien durchgeführt. Ein GFP-ZC3H4-Expressionsplasmid wurde mit den verschiedenen Reportern in An- und Abwesenheit von HPV16 E2 ko-transfiziert (**Abbildung 16 D**). ZC3H4 hatte keinen Einfluss auf die Basalaktivität von E6 ATG-Luc und einen nur leicht positiven Effekt auf die Basalaktivität von pC18-Sp1-Luc und E7 ATG-Luc. Bei der Ko-Transfektion mit E2 hatte ZC3H4 keine Auswirkungen auf die Aktivität von pC18-Sp1-Luc oder von E6 ATG-Luc (**Abbildung 16 D**). Die Aktivierung von E7 ATG-Luc wurde durch ZC3H4 leicht erhöht und durch E2 leicht verringert. Die Ko-Transfektion von ZC3H4 wirkte diesem Effekt durch E2 entgegen. Dies führte zu einer leichten Aktivierung, ähnlich der, wenn nur ZC3H4 transfiziert wurde (**Abbildung 16 D**). Die Basalaktivität von E1 ATG-Luc war nach Ko-Transfektion von ZC3H4, ähnlich wie bei pC18-Sp1-Luc und E7 ATG-Luc, um das 2,1-fache erhöht. Darüber hinaus verstärkte ZC3H4 die Transaktivierung durch E2 erheblich (**Abbildung 16 D**). Da E1 ATG-Luc neben P<sub>97</sub> auch den späten Promotor P<sub>670</sub> enthält, scheint es, dass ZC3H4 die E2 bedingte Aktivierung von P<sub>670</sub> verstärkt. Dieser Befund unterscheidet sich

deutlich von dem zu pC18-Sp1-Luc, das einen minimalen späten Adenovirus-Hauptpromotor als Antrieb für die Luciferase-Expression verwendet. Dies deutet darauf hin, dass die kombinatorischen aktivierenden Effekte von E2 und ZC3H4 spezifisch für P<sub>670</sub> sind.

## 5.12 Die Interaktion von BRD4 mit HPV16 E2 trägt zur Aktivierung des späten Promotors bei

Die Transkriptionsaktivierung durch E2-Proteine korreliert mit der Interaktion mit dem zellulären BRD4-Protein [55, 150]. Um festzustellen, ob die Transaktivierung des späten Promotors durch E2 und ZC3H4 durch die E2-BRD4-Interaktion beeinflusst wird, wurden Reporterassays mit der BRD4-bindungsdefizienten HPV16 E2 R37A/I73A-Mutante durchgeführt [55]. Im Vergleich zum Wildtyp E2 zeigte die Mutante eine deutlich reduzierte Aktivierung des E1 ATG-Luc-Konstrukts sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von überexprimiertem ZC3H4 (**Abbildung 17**). Im Gegensatz dazu wurde E7 ATG-Luc in ähnlichem Maße durch Wildtyp-E2, als auch die E2-Mutante leicht reprimiert. Die schwache Aktivierung durch ZC3H4 wurde jedoch durch E2 R37A/I73A reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von BRD4 an E2 zur Aktivierung von P<sub>670</sub> durch E2 und ZC3H4 beiträgt.



**Abbildung 17:** Die BRD4-bindungsdefiziente Mutante von E2 R37A, I73A, hat eine verringerte Transaktivierungseffizienz des viralen späten Promotors. C33A-Zellen wurden mit 0,5 ng pCI-Neo RLuc, 50 ng E7 ATG-luc oder E1 ATG-luc, 10 ng von 16 E2 oder 16 E2 R37A/I73L und 50 ng ZC3H4-eGFP oder leeren Vektoren in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die Werte wurden als Verhältnis von Firefly- zu Renilla-Luciferase berechnet und relativ zur Kontrolle ausgedrückt. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die

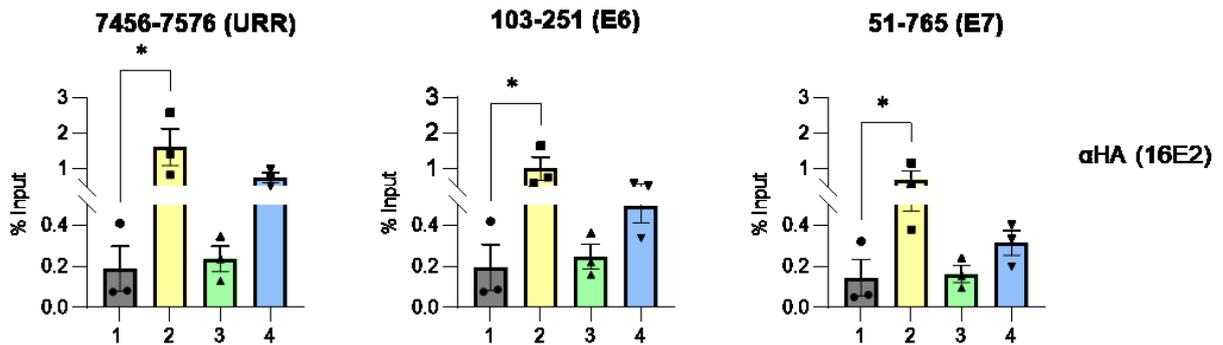
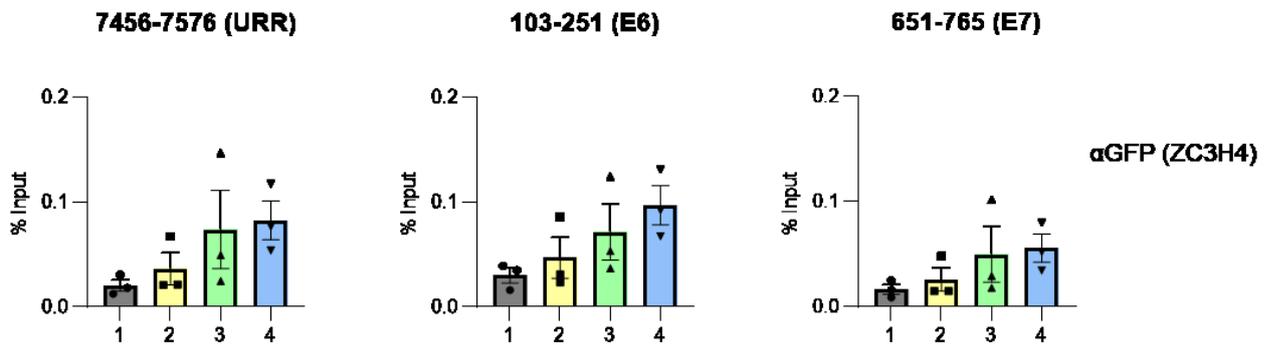
statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 5.13 ZC3H4 wird an HPV16-DNA rekrutiert

In ChIP-Seq-Experimenten wurde gezeigt, dass ZC3H4 an zelluläres Chromatin rekrutiert wird [95, 97, 99]. Um festzustellen, ob ZC3H4 mit HPV16-DNA interagiert, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. E1 ATG-Luc wurde allein oder mit ZC3H4-eGFP, HPV16 E2-HA oder beiden gemeinsam transfiziert (**Abbildung 18 A**). Die quervernetzten Chromatinpräparate wurden zum Nachweis von E2 mit magnetischen  $\alpha$ -HA-Beads, oder entsprechend mit magnetischen  $\alpha$ -GFP-Beads zum Nachweis von ZC3H4, angereichert. Die Menge der dadurch angereicherten DNA wurde anschließend mittels qPCR gemessen. Es wurden verschiedene Primerpaare in der URR, E6 oder E7 verwendet, um festzustellen, ob ZC3H4 in bestimmten Regionen angereichert ist. Wie erwartet wurde eine starke Anreicherung von E2 in der URR festgestellt, aber auch ein schwächeres Signal in E6 und E7 (**Abbildung 18 B**).

**A**

	1	2	3	4
E1 ATG-Luc	+	+	+	+
16 E2-HA	-	+	-	+
ZC3H4-eGFP	-	-	+	+

**B****C**

**Abbildung 18:** ZC3H4 wird an die virale DNA rekrutiert. **A)** Schematische Darstellung des Transfektionsschemas für die ChIP-Experimente. **B, C)** C33A-Zellen wurden mit 4  $\mu$ g E1 ATG-Luc, 4  $\mu$ g HPV16 E2-HA, 4  $\mu$ g ZC3H4-eGFP oder leerem Vektor wie in A dargestellt transfiziert. Das ChIP-Experiment wurde wie beschrieben mit Anti-HA- oder Anti-GFP-markierten Magnetbeads durchgeführt. E1 ATG-Luc wurde durch qPCR mit drei verschiedenen Primerpaaren gemessen, die HPV16 nt. 7456-7575, 103-251, oder 51-765. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt; \* $p < 0,05$

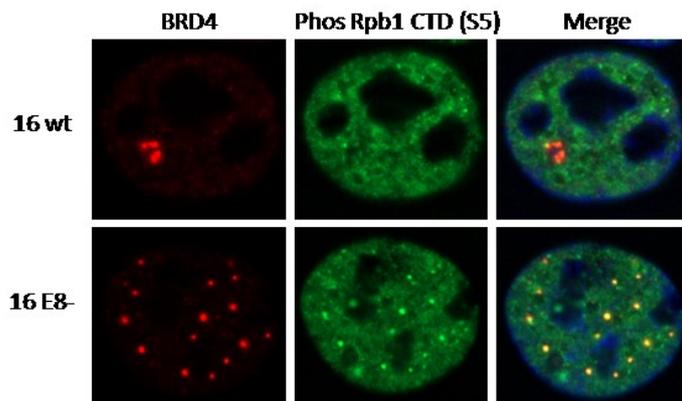
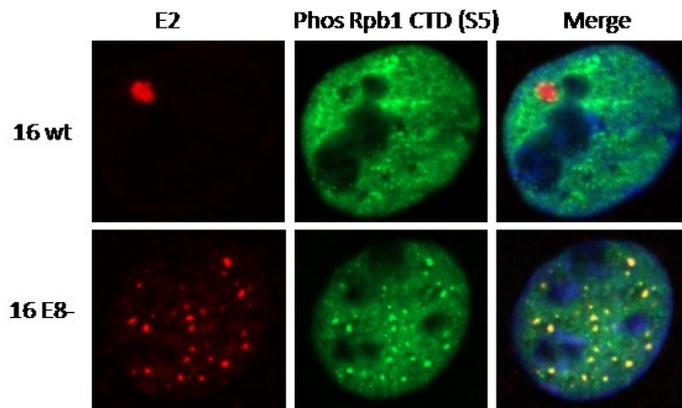
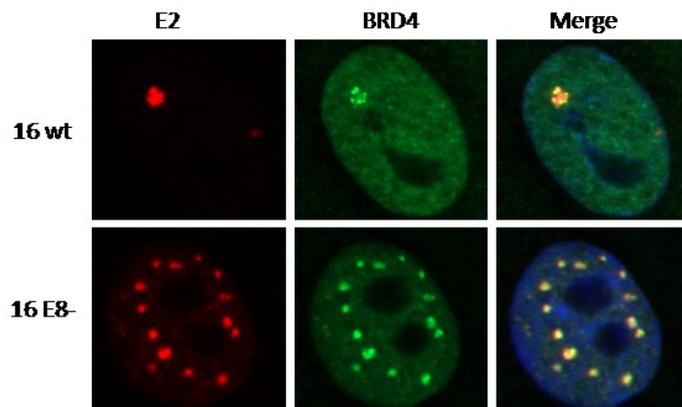
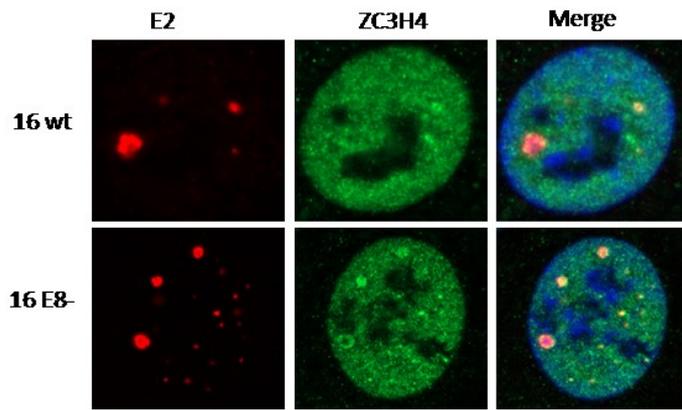
Dies ist höchstwahrscheinlich nicht auf eine direkte Bindung von E2 in den E6- oder E7-Genen zurückzuführen, die keine hochaffinen E2BS aufweisen, sondern auf die begrenzte Fragmentierung des Chromatins und damit auf das Vorhandensein von Oligonukleosomen zusätzlich zu Mononukleosomen. ZC3H4 ist in der URR-, E6- und E7-Region in ähnlichem Maße angereichert, wenn

es allein exprimiert wird, und in Gegenwart von E2 in höherem Maße (**Abbildung 18 C**). Dies deutet darauf hin, dass ZC3H4 an HPV-Chromatin bindet und dass dies durch E2 verstärkt wird (**Abbildung 18 B**). Die stärkste Bindung findet jedoch nicht in E7 statt, wo sich P<sub>670</sub> befindet, was darauf schließen lässt, dass ZC3H4 nicht spezifisch an die Transkriptionsstartstellen von P<sub>670</sub> rekrutiert wird.

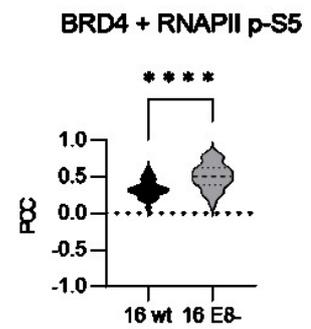
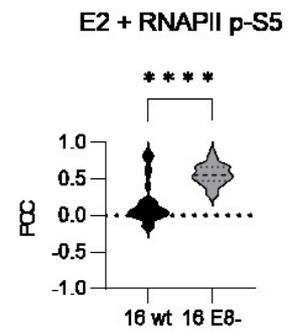
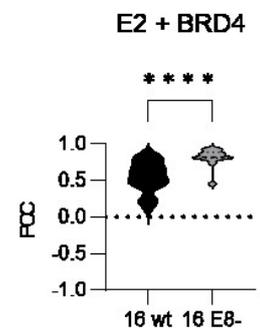
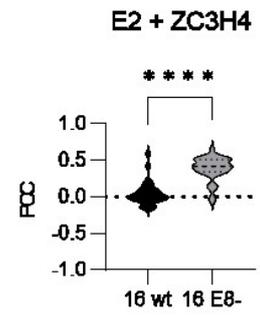
#### 5.14 ZC3H4 ko-lokalisiert mit E2-Foci in HPV16 positiven Keratinozyten

Um den Beitrag von E2 und ZC3H4 zur späten viralen Transkription zu untersuchen, wurden stabile Keratinozyten-Zelllinien verwendet, die extrachromosomal replizierende HPV16 wt- oder E8<sup>-</sup>-Genome enthalten. E8<sup>-</sup>-Genome exprimieren das virale E8<sup>-</sup>E2-Repressorprotein nicht und weisen daher eine erhöhte virale Kopienzahl, sowie eine erhöhte Expression der frühen und späten viralen Gene auf [69]. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass in solchen Zelllinien HPV16 E2-Antikörper definierte E2-Akkumulationen im Zellkern nachweisen können, die virale Replikationszentren darstellen, welche auf den produktiven Replikationszyklus hinweisen [61]. Diese Ergebnisse konnten mit einem gegen HPV16 E2 gerichteten monoklonalen Antikörper ebenfalls validiert werden, der zuvor bereits beschrieben wurde [118, 151]. Die Analysen zeigen, dass in solchen Zelllinien entweder ein bis zwei große oder mehrere kleinere E2-Foci vorhanden sein können. Die Immunfluoreszenzanalyse von E2 und endogenem ZC3H4 in Wildtyp-Zellen ergab sehr geringe Mengen an ko-lokalisiertem ZC3H4 und E2 in E2-Foci-positiven Kernen (PCC=0,04; **Abbildung 19 A, B**). Allerdings exprimieren Wildtyp-Zellen nicht nur E2, sondern auch den E8<sup>-</sup>E2-Repressor. Beide Proteine können mit dem verwendeten monoklonalen E2-Antikörper nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Ko-Lokalisierung zwischen E2 und ZC3H4 in der E8<sup>-</sup>-Zelllinie, welche nur E2 exprimiert, in den E2-Foci positiven Kernen stark erhöht (PCC=0,45, **Abbildung 19 B**). Zusätzlich wurde die Ko-Lokalisierung von E2 mit BRD4 in diesen Foci untersucht. Diese wiesen eine ähnliche Zunahme der Ko-Lokalisierung der E8<sup>-</sup>-Zellen, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen auf, was auf eine Korrelation zwischen erhöhten E2-, BRD4- und ZC3H4-Spiegeln hindeutet (**Abbildung 19 B**). ZC3H4 kann über das zelluläre WDR82-Protein an die RNA-Polymerase II (RNAPII) rekrutiert werden, wenn diese an Serin 5 (p-S5) in ihrer C-terminalen, aus Heptad-Wiederholungen bestehenden Domäne phosphoryliert ist. Diese Modifikation ist ein Indikator für die Transkriptionsinitiierung [99, 152]. Sowohl E2 als auch BRD4 zeigen eine signifikant höhere Ko-Lokalisierung mit RNAPII p-S5 in E8<sup>-</sup> im Vergleich zu Wildtyp-Zelllinien (**Abbildung 19 A, B**). Um die Ko-Lokalisierung von BRD4 und RNAPII p-S5 zu bestimmen, wurden Zellen mit entsprechenden BRD4-Foci ausgewählt, wie sie in der E2-BRD4-Ko-Lokalisierungsanalyse beobachtet wurden (**Abbildung 19 A**). Diese Daten unterstützen die Idee, dass ZC3H4 mit viralen Genomen interagiert und dass dies mit der Menge an vorhandenem E2 und der Transkriptionsaktivität der viralen Genome korreliert.

**A**



**B**

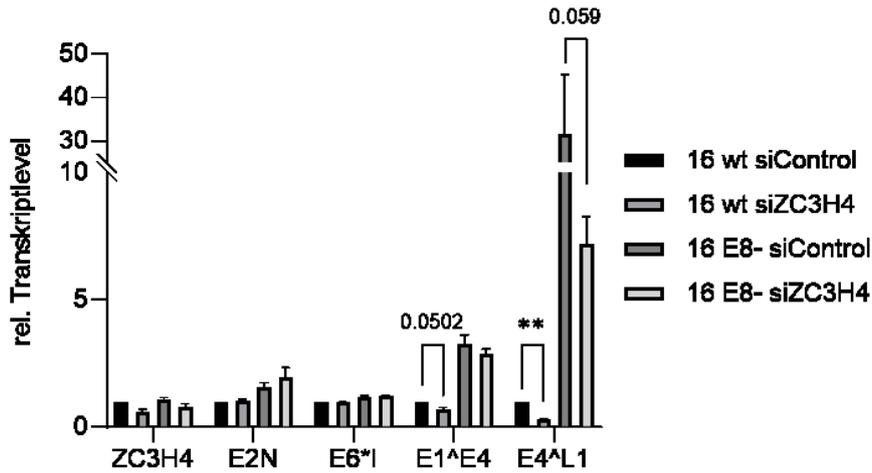


**Abbildung 19:** ZC3H4 ist in viralen Replikationszentren in HPV16-positiven Keratinozyten angereichert. **A)** HPV16-Wildtyp oder HPV 16 E8<sup>-</sup>-positive Keratinozyten wurden ausgesät und mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung von Antikörpern gegen HPV16 E2 und ZC3H4 analysiert. Zur Färbung der DNA wurde DAPI verwendet. **B)** Ko-lokalisierung zwischen ZC3H4 und HPV16 E2. Der Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen E2 und ZC3H4 wurde für  $n \geq 28$  Zellkerne bestimmt und die Mittelwerte wurden berechnet

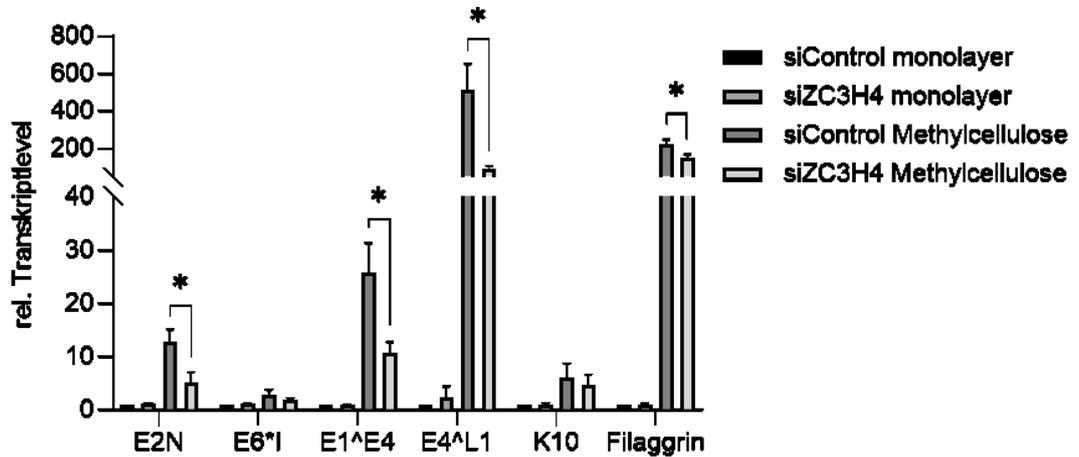
### **5.15 Der Knockdown von ZC3H4 reduziert die Expression später viraler Gene, sowie die Anzahl der Genomkopien in differenzierten Keratinozyten**

Um die Funktion von ZC3H4 im viralen Lebenszyklus zu untersuchen, wurden HPV16 Wildtyp- oder E8<sup>-</sup>-Zelllinien, welche im undifferenzierten Zustand gehalten wurden, mit siZC3H4 transfiziert und die virale Genexpression nach 48 Stunden mittels qPCR bestimmt. E6\*<sup>I</sup> wird von P<sub>97</sub> exprimiert, E2<sup>N</sup> und E1<sup>E4</sup> können sowohl von P<sub>97</sub> als auch von P<sub>670</sub> exprimiert werden. E4<sup>L1</sup> wird hauptsächlich von P<sub>670</sub> abgeleitet [149]. In Übereinstimmung mit früheren Studien wiesen E8<sup>-</sup>-Zellen höhere Konzentrationen verschiedener viraler Transkripte auf als Wildtyp-Zellen, wobei dies für das gespleißte, späte E4<sup>L1</sup>-Transkript am stärksten ausgeprägt war (**Abbildung 20 A**). Der Knockdown von ZC3H4 reduzierte die E4<sup>L1</sup>-Menge in Wildtyp- und E8<sup>-</sup>-Zellen erheblich. Dahingegen blieben andere virale Transkripte unverändert, was auf eine vorherrschende Rolle bei der späten viralen Transkription hindeutet. Die wesentlich geringeren Auswirkungen auf die E1<sup>E4</sup>-Menge, im Vergleich zu der von E4<sup>L1</sup>, sind wahrscheinlich auf die geringere Aktivität von P<sub>670</sub> im Vergleich zu P<sub>97</sub> in undifferenzierten Zellen zurückzuführen. Die Transkription der späten Virusgene wird durch die Differenzierung der Keratinozyten stark induziert. Daher wurden Wildtyp-Zellen 48 Stunden lang in einem Methylcellulosehaltigen Medium in Gegenwart von siControl oder siZC3H4 differenziert. Die Immunoblot-Analyse ergab sehr niedrige Konzentrationen des ZC3H4-Proteins in undifferenzierten Zellen, welche aber nach Differenzierung stark zunahmten und durch die spezifische siRNA effizient reduziert wurden (**Abbildung 20 C**). Die Kultivierung in Methylzellulosemedium führte zu einer starken Induktion der Keratinozyten-Differenzierungsmarker Keratin 10 (K10) und Filaggrin, sowie der viralen E2<sup>N</sup>-, E1<sup>E4</sup>- und E4<sup>L1</sup>-, aber nicht E6\*<sup>I</sup>-Transkripte, was mit einer Aktivierung von P<sub>670</sub> durch Differenzierung übereinstimmt (**Abbildung 20 B**) [8].

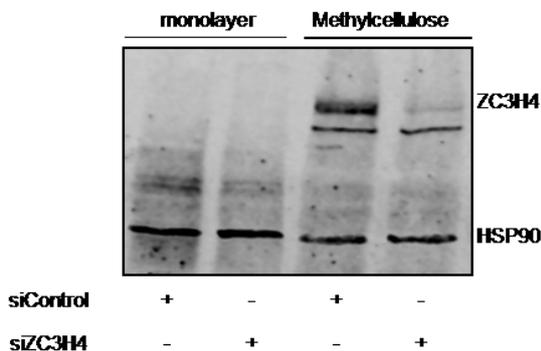
A



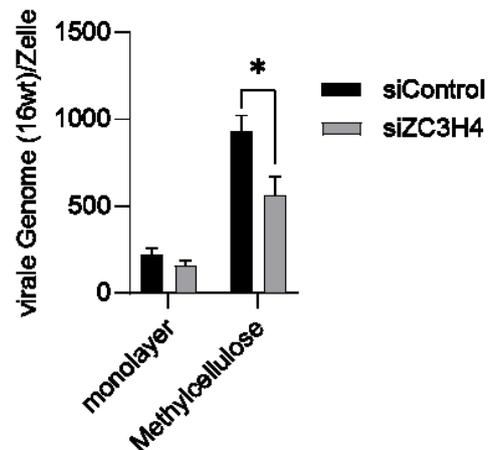
B



C



D



**Abbildung 20:** SiRNA-vermittelter Knockdown von ZC3H4 verringert die Expression der späten viralen Gene von HPV16. **A)** HPV16-Wildtyp oder E8<sup>-</sup>-positive Keratinozyten wurden mit 45 pmol siZC3H4 oder siControl transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und die RNA-Level mittels qPCR gemessen. Die Ergebnisse sind relativ zu siControl dargestellt und zeigen den Mittelwert von drei

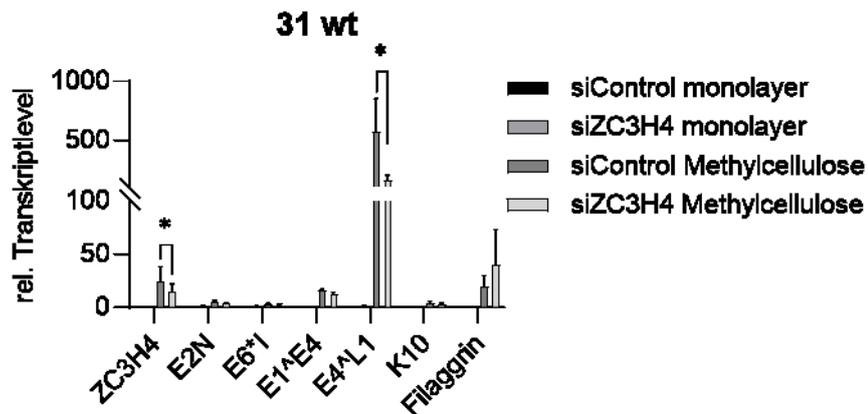
unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben den SEM-Wert an. Die statistische Signifikanz wurde durch einen gepaarten t-Test ermittelt;  $**p < 0,01$ . **B)** HPV16-Wildtyp-positive Keratinozyten wurden mit 75 pmol siZC3H4 oder siControl transfiziert und 48 h lang in Methylcellulose differenziert. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde mittels qPCR gemessen. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt;  $*p < 0,05$ . **C)** HPV16-Wildtyp-positive Keratinozyten wurden mit 75 pmol siZC3H4 oder siControl transfiziert und 48 Stunden lang in Methylcellulose differenziert. Die Expression von endogenem ZC3H4 wurde mittels Western Blot unter Verwendung von Antikörpern gegen ZC3H4 und HSP90 analysiert. **D)** Die Kopienzahlen des viralen Genoms wurden mittels qPCR nach Behandlung mit siZC3H4 oder siControl und Differenzierung in Methylcellulose, wie oben beschrieben, berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels einseitiger ANOVA und Dunnett's multiplem Vergleichstest ermittelt;  $n=3$ ,  $*p < 0,05$ .

Der Knockdown von ZC3H4 reduzierte nur die E1<sup>E4</sup>-, E2N- und E4<sup>L1</sup>-Transkriptmenge signifikant, nicht aber die von E6\*1 (**Abbildung 20 B**). Darüber hinaus wurden keine Veränderungen von K10 und eine sehr geringe Reduzierung der Filaggrin-Transkripte beobachtet (**Abbildung 20 B**). Diese Daten deuten darauf hin, dass ZC3H4 speziell für hohe Transkriptionslevel von P<sub>670</sub> und nicht für die Differenzierung erforderlich ist. Die Differenzierung führte erwartungsgemäß zu einem Anstieg der viralen Genomkopien, welche durch den Knockdown von ZC3H4 ebenfalls deutlich reduziert wurden (**Abbildung 20 D**). Dies könnte eine Folge der verringerten E2N-Transkriptmengen sein, welche für E2 kodieren können und somit die für die Genomreplikation erforderlichen Mengen an E2-Protein begrenzen würden.

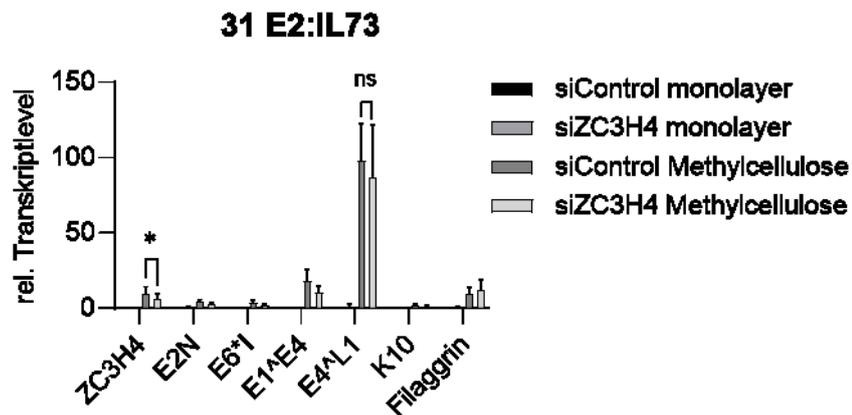
### **5.16 Der Knockdown von ZC3H4 reduziert die Transkriptmenge der späten viralen Gene in HPV31 wt, aber nicht in HPV31 E2:IL73 positiven Keratinozyten**

Die vorangegangenen Versuche legen nahe, dass sowohl BRD4, als auch ZC3H4 für die HPV16-E2-bedingte Aktivierung des späten Promotors essentiell sind. Um dies in anderen HPV-haltigen Zellen zu validieren, wurden ZC3H4 Knockdown-Studien nach Differenzierung der zuvor beschriebenen HPV31-Zelllinien (5.3) mit BRD4-bindungsdefizientem E2 durchgeführt. HPV31-Zelllinien sind im Gegensatz zu HPV16-Zelllinien nach einer Mutation in E2 an I73 immer noch in der Lage episomal replizierende Genome aufrechterhalten zu können [88, 89]. Die HPV31-Wildtyp-Zelllinien zeigten nach ZC3H4-Knockdown und anschließender Differenzierung die selbe Reduktion der E4<sup>L1</sup>-Transkriptmenge, wie zuvor schon die HPV16-Zelllinien (**Abbildung 21 A**). Dem entgegen hatte den siRNA-bedingte Knockdown von ZC3H4 keinen Einfluss auf die Transkription der späten viralen Gene in der BRD4-bindungsdefizienten Mutanten-Zelllinie (**Abbildung 21 B**).

A



B



**Abbildung 21:** Der Knockdown von ZC3H4 hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge in HPV31 E2:IL73-Zelllinien. **A)** HPV31-Wildtyp-positive Keratinozyten wurden mit 75 pmol siZC3H4 oder siControl transfiziert und 48 h lang in Methylcellulose differenziert. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde mittels qPCR gemessen. Die statistische Signifikanz wurde durch einen gepaarten t-Test ermittelt; \* $p < 0,05$ . **B)** HPV31 E2:IL73-positive Keratinozyten wurden mit 75 pmol siZC3H4 oder siControl transfiziert und 48 h lang in Methylcellulose differenziert. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde mittels qPCR gemessen. Die statistische Signifikanz wurde durch einen gepaarten t-Test ermittelt; \* $p < 0,05$ .

## 6 Diskussion

Ein wichtiger Schritt im Replikationszyklus von HPV ist die Aktivierung des späten Promotors in differenzierten Keratinozyten, der für die Expression der späten L1- und L2-Kapsidproteine und somit für die Produktion infektiöser Virionen erforderlich ist. Frühere Arbeiten wiesen bereits darauf hin, dass differenzierungsregulierte zelluläre Transkriptionsfaktoren wie C/EBP-beta, die an HPV-Genome binden, zur Aktivierung des späten HPV-Promotors beitragen [10, 23, 24]. Allerdings sind auch extrachromosomal replizierende Virusgenome für die späte Promotorinduktion erforderlich, was darauf hindeutet, dass virale Replikations- und Transkriptionsfaktoren wie E1 oder E2 ebenfalls eine Rolle spielen könnten [17]. Ein Hauptkandidat ist E2, welches nicht nur die virale Replikation durch seine Interaktion mit E1 aktiviert, sondern auch ein Transkriptionsaktivator durch seine Interaktion mit der C-terminalen Domäne (CTM) von BRD4 ist [55, 150]. Verschiedene Hochrisiko-HPV sind zusätzlich in der Lage an die PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*) von BRD4 zu binden (**Abbildung 6**). Eine verkürzte Spleißvariante von BRD4, BRD4S, welche keine CTM und somit die hochkonservierte Bindestelle an das E2-Protein mehr aufweist, inhibiert die Aktivierung der späten viralen Gene [86]. Die Transkription dieser Gene wird durch den späten Promotor induziert.

Der späte HPV16 P<sub>670</sub> Promotor wird durch transkriptionelle Elongation reguliert, woran CDK9, eine Komponente des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb, BRD4 und CDK8, eine Komponente des Mediator-Komplexes, beteiligt sind [20]. BRD4 interagiert über seine CTM mit P-TEFb, um die transkriptionelle Elongation zu ermöglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass E2 P-TEFb über BRD4 rekrutiert, um so die Transkription von E2-abhängigen Promotoren zu aktivieren [133]. Da BRD4S keine CTM mehr aufweist und somit auch nicht mehr in der Lage ist P-TEFb zu rekrutieren, könnte dies zu dem inhibitorischen Effekt auf die Transkription der späten viralen Gene führen. BRD4S könnte die Bindung von E2 mit BRD4 stören und somit die Rekrutierung von P-TEFb. Des Weiteren ist BRD4 in der Lage phosphorylierungsabhängig Dimere zu bilden [153-155]. Es ist möglich, dass die Heterodimerisierung von BRD4 und BRD4S ebenfalls Auswirkungen auf die Rekrutierung von P-TEFb hat. So binden sowohl E2, als auch P-TEFb an die CTM von BRD4 und konkurrieren um diese Bindung [81]. Wenn BRD4 als Homodimer vorliegt ist es möglich, dass sowohl E2, als auch P-TEFb binden und p-TEFb somit an das virale Genom rekrutiert wird [133]. Die BRD4S-Proteinlevel sind in differenzierten HPV31-positiven CIN612-9E-Zellen deutlich reduziert, wohingegen die Transkripte der späten viralen Gene nach Differenzierung deutlich erhöht sind [86]. Die RNA-Sequenzierung von undifferenzierten HPV31 positiven Keratinozyten zeigte, dass die Mutation von I73 in E2, welche essentiell für die E2-Bindung an die CTM von BRD4 ist, weder Auswirkungen auf das zelluläre, noch das virale Transkriptom hatte (**Abbildung 8**). Erst die Differenzierung der Zellen in organotypischen Kulturen führte zu einer reduzierten L1 Transkriptmenge in Mutanten-, im Vergleich zu Wildtyp-Zelllinien (**Abbildung 9**).

Übereinstimmend dazu konnte bereits gezeigt werden, dass eine HPV31-Zelllinie mit BRD4-bindungsdefizientem E2 (E2:I73L), ein reduziertes Transkriptlevel der späten viralen Gene nach Differenzierung aufweist [89].

Dies zeigt, dass die Interaktion von E2 mit der CTM von BRD4 eine essentielle Rolle bei der Transkription der späten viralen Gene spielt.

## **6.1 Proximity-Labeling zur Identifizierung neuer potenzieller Interaktionspartner von E2**

BRD4S scheint im Zusammenhang mit E2 antagonistisch zu BRD4 zu wirken [86, 136]. FACS/FRET-Analysen zeigten, dass die Bindung an die PDID von BRD4 und somit eine Interaktion mit BRD4S nur für bestimmte Hochrisiko-HPV des alpha-Genus möglich ist (**Abbildung 6**) und zur Reprimierung der Expression der immunogenen späten viralen Gene in undifferenzierten Zellen beiträgt [86]. Um zu untersuchen, ob die E2 von Hochrisikotypen zusätzlich andere Bindungspartner aufweisen, als Niedrigrisiko-HPV, wurde massenspektrometrisch nach neuen potentiellen Interaktionspartnern gesucht. Das *Biotin-Proximity-Labeling* bietet den Vorteil, dass potentielle Interaktionspartner *in vivo* markiert werden und auch schwache und transiente Interaktionen gemessen werden können [114, 145].

Mit dem *Biotin-Proximity-Labeling-Screening* verschiedener HPV-E2-Proteine konnte eine große Anzahl von Wirtszellproteinen als mutmaßliche, neuartige Interaktoren identifiziert werden (**Abbildung 10**). Dabei wurden auch bereits beschriebene Interaktoren von E2 gefunden (CPSF3/4, SF1, EP400, VIM, C1QBP), was die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse unterstützt [105, 149, 156, 157]. Verschiedene vielversprechende Kandidaten wurden zur weiteren Untersuchung ausgewählt und mittels Immunfluoreszenz auf ihre Ko-lokalisierung mit E2 validiert.

### **6.1.1 Fam133B interagiert mit verschiedenen HPV E2**

Fam133B zeigte sich als interessanter Kandidat, da es für vier der sechs untersuchten E2-Typen mehrfach stark angereichert war. Die Ko-Immunpräzipitation zeigte, dass Fam133B sowohl an HPV16, als auch an HPV31 E2 bindet. Darüber hinaus zeigt die fehlende Bindung an E8<sup>E2</sup>, dass höchstwahrscheinlich die Transaktivierungsdomäne (TAD) von E2 an der Bindung beteiligt ist. Diese ist für die Protein-Protein-Interaktionen von E2 essentiell. Zusätzlich zeigt die Immunfluoreszenz, dass sich Fam133B ebenfalls im Zellkern befindet und mit E2 ko-lokalisiert. Dies nimmt jedoch ab, wenn E1 und die URR ko-transfiziert werden, was vermuten lässt, dass die Bindung von E1 an E2 eine Bindung von Fam133B an E2 verhindert. Da E2 ebenfalls über die TAD mit E1 interagiert, ist es möglich, dass es

zu einer sterischen Hinderung der Bindung von Fam133B an E2 kommt [158]. Dies spricht gegen eine Rolle von Fam133B bei der Kontrolle der viralen Replikation.

Die weitere Analyse zur Funktionalität dieser Interaktion zeigt, dass Fam133B Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von E2 hat. Überraschenderweise zeigten Reporterassays in der C33A-Zelllinie, einer HPV-negativen Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie, dass E2 den späten HPV16-Promotor P<sub>670</sub> aktivieren kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Fam133B die Transaktivierung des späten viralen Promotors durch E2 verbessert (**Abbildung 12**). Transkriptanalysen in undifferenzierten HPV positiven Zelllinien, nach Knockdown von Fam133B, unterstützen diese Annahme (**Abbildung 14**). Unter differenzierenden Bedingungen wirkt der Knockdown von Fam133B jedoch positiv auf die Transkriptmenge der späten viralen Gene (**Abbildung 14**). Es ist möglich, dass die Interaktion von Fam133B mit E2 in undifferenzierten Zellen eine größere Bedeutung für das Virus hat, als in differenzierten Zellen, wenn die virale DNA amplifiziert und die Transkription der späten Gene stark aktiv ist. Leider war es weder in undifferenzierten, noch differenzierten HPV-positiven Zelllinien möglich mit kommerziell-erhältlichen Antikörpern endogenes Fam133B auf Proteinebene nachzuweisen. Dies könnte zum einen auf eine niedrige Proteinmenge hindeuten. Dementgegen sprechen allerdings die hohen Cp-Werte von Fam133B in der qPCR. Ferner könnte es von einer niedrigen Spezifität des polyklonalen Antikörpers gegen Fam133B herrühren. Die Transkriptmengen deuten jedoch darauf hin, dass Fam133B nach der Differenzierung nicht in signifikant erhöhten Mengen in den Zellen vorhanden ist.

Zusätzlich beeinflusst Fam133B die Stabilität von E2-Proteinen, sofern E1 nicht ko-transfiziert wird (**Abbildung 13**). Dies könnte in undifferenzierten Zellen, wo die Konzentration von E2 niedrig ist, deutliche Auswirkungen auf den Einfluss von E2 auf den viralen Lebenszyklus, wie die virale Transkription und Replikation haben [159]. In differenzierten Zellen, wenn die Expression von E2 deutlich erhöht ist, könnte der Einfluss von Fam133B auf die Stabilität von E2 in den Hintergrund geraten.

Da Fam133B bisher kaum charakterisiert ist und daher auch nichts über die Funktionsweise bekannt ist, ist es ebenso möglich, dass die Interaktion von Fam133B und E2, neben der Stabilität von E2, eventuell zusätzlich Einfluss auf die Expression, Modifikation oder Rekrutierung anderer zellulärer Faktoren hat.

### **6.1.2 ZC3H4 trägt zur E2-bedingten Aktivierung des späten viralen Promotors bei**

Ein anderes Protein, welches ein Treffer beim *Biotin-Proximity-Ligations-Screening* war, ist das *zinc finger CCCH-type containing 4*, kurz ZC3H4 welches nur bei den Hochrisiko-HPV 16- und 18-E2-Proteinen in zwei von drei Experimenten angereichert gefunden wurde (**Abbildung 10**). Es wird mit der Kontrolle der zellulären, aber bisher nicht mit der viralen Genexpression in Verbindung gebracht [95-

100]. In Ko-Immunopräzipitationstests konnte jedoch keine direkte Interaktion zwischen HPV16 E2 und ZC3H4 beobachtet werden, aber Ko-Lokalisierungsanalysen zeigten, dass sich E2 und ZC3H4 in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (**Abbildung 15, Abbildung 19**). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion schwach oder nur temporär ist oder, dass beide Proteine in unmittelbarer Nähe sind, weil sie an dieselben Stellen auf der DNA rekrutiert werden.

Reporterassays mit HPV-negativen C33A-Zellen zeigen, dass ZC3H4 die E2 bedingte Aktivierung des späten viralen Promotors P<sub>670</sub> von HPV16 verstärken kann (**Abbildung 16**). Ergänzend dazu führte ein siRNA-Knockdown von ZC3H4 zu einer Reduktion der E2-bedingten Aktivierung des späten Promotors (**Abbildung 16**). Im Gegensatz dazu wurde die schwache Reprimierung von P<sub>97</sub> durch E2 nicht durch ZC3H4 moduliert. Außerdem hatte weder der Knockdown, noch die Ko-Transfektion von ZC3H4 Auswirkungen auf die Aktivierung des Reporterkonstrukts pC18-SP1-Luc, welches einen minimalen Promotor und 4 E2-Bindestellen besitzt (**Abbildung 16**). Dies spricht dafür, dass der Einfluss von ZC3H4 auf die Transaktivierungseigenschaften von E2 spezifisch für den späten Promotor ist.

Die Aminosäurereste R37 und I73 bei HPV16-E2 sind für die BRD4-Bindung erforderlich [150, 160]. Die Aktivierung des späten Promotors war durch die E2 R37A/I73A-Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich reduziert (**Abbildung 17**). Die Ko-Transfektion von ZC3H4 führte zwar zu einer verstärkten Aktivierung, diese war aber dennoch deutlich schwächer als die Kombination von Wildtyp-E2 mit ZC3H4 (**Abbildung 17**). Sowohl die Transkriptionsaktivierungs- als auch die Repressionsfunktionen von E2 hängen stark von der Interaktion konservierter Reste mit dem zellulären BRD4-Protein ab [55, 77, 81, 150]. Interessanterweise zeigen HPV31-Mutantengenome, die ein BRD4-bindungsdefizientes E2 kodieren, keinen Phänotyp in basalähnlichen Keratinozyten, aber eine reduzierte späte Gentranskription und virale Genomamplifikation in differenzierten Zellen [89]. Dies wurde mit der Kontrolle zellulärer Gene in Verbindung gebracht, die für das Spleißen von L1-mRNAs durch den E2-BRD4-Komplex wichtig sind [161]. In einer Studie wurde berichtet, dass E2 nicht zur P<sub>670</sub>-Aktivität beiträgt [162]. Dem verwendeten Reporterkonstrukt fehlte aber die URR und damit die konservierten, hochaffinen E2BS, die für die E2-vermittelten Transkriptionsaktivitäten wichtig sind [46].

ZC3H4 schränkt die Transkription nicht-kodierender RNA ein, darunter lncRNA, eRNA und PROMPT-RNA [95-100]. Zusammen mit WDR82 bildet ZC3H4 einen Komplex, der eine vorzeitige Transkriptionstermination bewirkt [95, 96, 98, 99]. Die Reporterkonstrukte, die zur Bestimmung der Auswirkungen von ZC3H4 verwendet werden, haben das Potential, monocistronische, ungespleißte Transkripte (pC18-Sp1-Luc; E6 ATG-Luc), ein bicistronisches, gespleißtes oder ungespleißtes Transkript (E7 ATG-Luc) und ein tri-cistronisches, gespleißtes oder ungespleißtes Transkript von P<sub>97</sub> und ein ungespleißtes, monocistronisches Transkript von P<sub>670</sub> (E1 ATG-Luc) zu exprimieren. Darüber hinaus werden von P<sub>670</sub> im Zusammenhang mit dem HPV16-Genom verschiedene polycistronische, gespleißte

Transkripte initiiert [152]. Somit sind sowohl das Reporterplasmid als auch die von HPV16 abgeleiteten Transkripte ausschließlich proteinkodierende Transkripte. ZC3H4 reguliert jedoch nicht nur nicht-kodierende, sondern auch proteinkodierende RNAs [97-99], aber der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht geklärt. Es wurde vermutet, dass in Abwesenheit von ZC3H4 ein Teil des RNA-Polymerase II-Komplexes in Antisense-Richtung migriert und Antisense- statt proteinkodierender Sense-Transkripte produziert [99]. Es ist daher möglich, dass ZC3H4 die Antisense-Transkription des späten Promotors verhindert. Eine Studie zu Startstellen von Antisense-Transkripten, in einer HPV16-positiven CIN1-Läsion, berichtete von einer Antisense-Startstelle zwischen den Nukleotiden 592-652, welche direkt vor P<sub>670</sub> liegen [163]. In dieser Studie konnten keine vergleichbaren Antisense-Transkripte in HPV16-positiven W12- oder Gebärmutterhalskrebs-Zelllinien, unter undifferenzierten Bedingungen, nachgewiesen werden, was mit sehr niedrigen bis nicht nachweisbaren P<sub>670</sub>-initiierten Transkripten korrelierte. Dies lässt vermuten, dass diese Antisense-Startstellen eine Folge der P<sub>670</sub>-Aktivität nach Differenzierung sind. Es sind weiterführende Studien erforderlich, um herauszufinden, ob ZC3H4 den späten Promotor durch Modulation der HPV16-Antisense-Transkription aktiviert.

ChIP-Experimente erbrachten den Nachweis, dass ZC3H4 auf der HPV16-DNA vorhanden ist, und seine Abundanz am höchsten war, wenn zusätzlich E2 mit exprimiert wurde (**Abbildung 18**). Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen, dass ZC3H4 an Transkriptionsstartstellen aktiver zellulärer Gene vorhanden ist und mit RNA-Polymerase II ko-lokalisiert [95, 97, 99]. Darüber hinaus zeigten Ko-Lokalisierungsstudien, dass ZC3H4 in HPV16-positiven Zellen in E2-Foci lokalisiert ist (**Abbildung 19**). Insgesamt deutet dies darauf hin, dass es wahrscheinlicher ist, dass ZC3H4 direkt auf das virale Genom einwirkt und nicht indirekt durch Regulierung der Transkription in der Wirtszelle.

Der Knockdown von ZC3H4 in HPV16 positiven Keratinozyten führte zu einer deutlichen Reduktion der Transkription der späten viralen Gene (**Abbildung 20**). Durch die Differenzierung von Keratinozyten in Methylcellulose wird die Transkription der späten viralen Gene stark induziert. Der Knockdown von ZC3H4 reduzierte diese Induktion sowohl in den HPV16, als auch in HPV31 positiven Keratinozyten, signifikant (**Abbildung 20, Abbildung 21**). Dieser Effekt konnte jedoch nicht in einer HPV31-Zelllinie mit BRD4-bindungsdefizientem E2 (E2:IL73) nachgewiesen werden (**Abbildung 21**), was unterstreicht, dass die Interaktion von BRD4 mit E2 wichtig für die Aktivierung des späten Promotors ist und dass ZC3H4 ebenfalls die Transkription der späten viralen Gene beeinflusst.

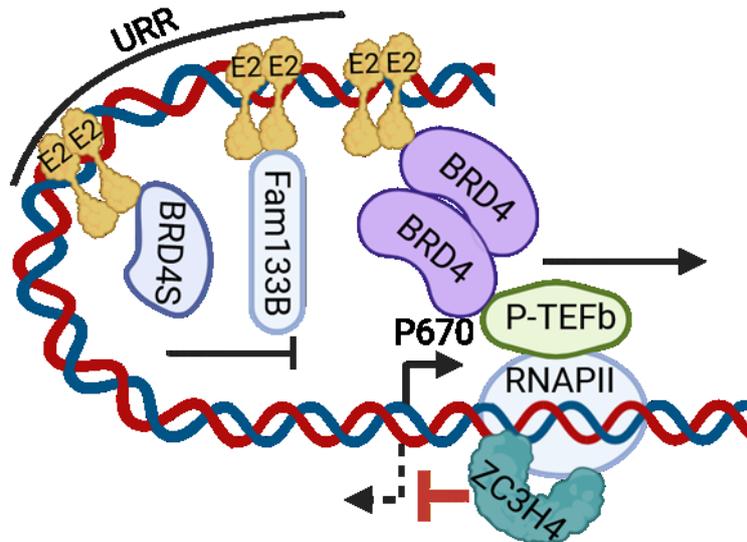
P<sub>670</sub> wird durch transkriptionelle Elongation reguliert. Daran sind CDK9, eine Komponente des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb, BRD4 und CDK8, eine Komponente des Mediator-Komplexes, beteiligt [20]. BRD4 interagiert mit P-TEFb, um die Transkriptionselongation zu ermöglichen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass E2 über BRD4 P-TEFb rekrutiert, um die Transkription von E2-abhängigen Promotoren zu aktivieren [133]. Da die Bindung von BRD4 an E2 zur Aktivierung des späten Promotors beiträgt (**Abbildung 9, Abbildung 17, Abbildung 21**), ist es sehr wahrscheinlich, dass die Hauptaktivität

von E2 darin besteht, P-TEFb an den späten Promotor zu rekrutieren und die transkriptionelle Elongation zu ermöglichen. Übereinstimmend damit ist die kurze Form von BRD4, BRD4S, die ebenfalls mit E2 interagiert, aber P-TEFb nicht rekrutieren kann, da ihr das C-terminale Motiv fehlt, ein Inhibitor der späten HPV31-Transkription [81, 85, 133, 164].

Die oben gezeigten Daten legen nahe, dass die Kombination von ZC3H4 und E2 nur P<sub>670</sub> aktiviert, nicht aber andere Transkriptionseinheiten (**Abbildung 16, Abbildung 17**). Die Effekte sind additiv, was darauf hindeutet, dass E2 und ZC3H4 unabhängige Wege nehmen. Dennoch verstärkt die Bindung von E2 an HPV16-DNA die Bindung von ZC3H4 (**Abbildung 18**). ZC3H4 könnte über die Interaktion mit WDR82 zu S5-phosphorylierter RNA-Polymerase II rekrutiert werden, die initiierte, pausierte RNA-Polymerase II markiert [99]. E2 könnte über BRD4 und P-TEFb die Elongation der RNA-Polymerase II durch S2-Phosphorylierung einleiten, was die Mengen an RNA-Polymerase II und dadurch an ZC3H4 erhöhen könnte, welches an die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II bindet.

Die Menge des HPV16-E2-Proteins steigt in suprabasalen Zellen an, was mit der Genomamplifikation zusammenfällt und somit vermutlich den Beginn der produktiven Phase markiert [60]. Übereinstimmend damit können in einer kleinen Fraktion kultivierter HPV16-positiver Zellen auch nukleäre E2-Foci beobachtet werden, die virale Replikationszentren darstellen und auf eine produktive Replikation hindeuten. ZC3H4 ko-lokalisiert mit solchen Kernfoci, insbesondere wenn nur E2 und nicht der Repressor E8<sup>E2</sup> in solchen Foci vorhanden ist, was zu einer höheren transkriptionellen Aktivität führt (**Abbildung 19**; [61]).

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass HPV16 E2 den späten Promotor aktivieren kann und somit ein wichtiger Faktor für die Expression der späten viralen Gene ist. Es wurde gezeigt, dass ein vergleichbares HPV31 E1 ATG-Luc-Reporterkonstrukt durch HPV31 E2 aktiviert wird [165], was die Idee unterstützt, dass Hochrisiko-HPV E2 den viralen späten Promotor aktivieren kann. Des Weiteren sind in Keratinozyten durch differenzierungsregulierte Proteine wie C/EBP-beta und ZC3H4 in Kombination mit dem viralen E2/BRD4/P-TEFb für die vollständige Aktivierung des späten Promotors erforderlich.



**Abbildung 22:** Modell der potentiellen Aktivierung des späten HPV16 Promotors. In differenzierten Zellen wird P<sub>670</sub> durch die Interaktion von E2 und BRD4 aktiviert, was durch ZC3H4 verstärkt wird. BRD4S und Fam133B wirken hingegen als Inhibitoren. Erstellt mit BioRender.com

Es ist wahrscheinlich, dass E2 über seine Bindung an die konservierten E2-Bindestellen BRD4 und somit auch P-TEFb an das virale Genom rekrutiert und somit die Transkription der späten viralen Gene über den späten Promotor reguliert (**Abbildung 22**). Zusätzlich sind andere zelluläre Faktoren für eine aktive Transkription wichtig. ZC3H4 wird entweder über E2 direkt, die E2-bedingte verstärkte Polymerase II-Konzentration an den viralen Genomen oder einen anderen Faktor der viralen Transkriptionsmaschinerie rekrutiert und trägt maßgeblich zur aktiven Transkription der späten viralen Gene bei. Gegensätzlich dazu wirken BRD4S, in undifferenzierten Zellen, und Fam133B, nach Differenzierung, reprimierend auf die Transkription der späten viralen Gene. Dabei könnte Fam133B wichtig für die Stabilität von E2 in der frühen Phase des viralen Lebenszyklus sein und in der späteren Phase, in differenzierenden Zellen die eine höhere E2-Konzentration enthalten, in den Hintergrund geraten. Zusammengefasst konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden wie der späte Promotor von Hochrisiko-HPV durch E2 im Zusammenspiel mit verschiedenen Wirtszellproteinen auf komplexe Art und Weise reguliert wird. Dies trägt weiter zum Verständnis bei, wie HPV mit Differenzierung der Wirtszelle in die produktive Phase seines Lebenszyklus eintritt, um schließlich neue virale Partikel zu bilden.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Struktur des Genoms von HPV16. ....	5
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des Lebenszyklus von HPV. ....	6
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung des E2-Proteins von HPV.....	9
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Phosphorylierung von SPT5 durch den ZWC-Komplex... 13	
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung von BRD4 und BRD4S. ....	43
<b>Abbildung 6:</b> FACS-FRET-Analyse der Interaktion verschiedener HPV E2 mit der PDID oder CTM von BRD4. ....	46
<b>Abbildung 7:</b> BRD4S wird an die virale DNA rekrutiert.....	47
<b>Abbildung 8:</b> Validierung der Zelllinien für die RNA-Sequenzierung. ....	49
<b>Abbildung 9:</b> Die HPV31 E2:IL73-Mutante weist, im Vergleich zum Wildtyp, eine reduzierte Transkription an L1 in differenzierten Zellen auf. ....	51
<b>Abbildung 10:</b> BioID2-Proximity-Labeling zeigt neue mutmaßliche Interaktionspartner von HPV-E2-Proteinen.....	54
<b>Abbildung 11:</b> Fam133B interagiert mit HPV16 E2.....	56
<b>Abbildung 12:</b> Fam133B erhöht die E2-induzierte Aktivierung des späten Promotors.....	60
<b>Abbildung 13:</b> Der Knockdown von Fam133B reduziert das Proteinlevel von HPV16 E2. ....	61
<b>Abbildung 14:</b> Der Knockdown von Fam133B beeinflusst die Transkription der späten viralen Gene.62	
<b>Abbildung 15:</b> ZC3H4 ko-lokalisiert mit HPV16 E2.....	64
<b>Abbildung 16:</b> ZC3H4 erhöht die Aktivierung des späten Promotors durch E2.....	66
<b>Abbildung 17:</b> Die BRD4-bindungsdefiziente Mutante von E2 R37A, I73A, hat eine verringerte Transaktivierungseffizienz des viralen späten Promotors. ....	67
<b>Abbildung 18:</b> ZC3H4 wird an die virale DNA rekrutiert. ....	69
<b>Abbildung 19:</b> ZC3H4 ist in viralen Replikationszentren in HPV16-positiven Keratinozyten angereichert. ....	72
<b>Abbildung 20:</b> SiRNA-vermittelter Knockdown von ZC3H4 verringert die Expression der späten viralen Gene von HPV16.....	73
<b>Abbildung 21:</b> Der Knockdown von ZC3H4 hat keinen Einfluss auf die Transkriptmenge in HPV31 E2:IL73-Zelllinien. ....	75
<b>Abbildung 22:</b> Modell der potentiellen Aktivierung des späten HPV16 Promotors.....	82

## 8 Literaturverzeichnis

1. Kirnbauer, R., et al., *Papillomavirus L1 Major Capsid Protein Self-Assembles into Virus-Like Particles that are Highly Immunogenic*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(24): p. 12180-12184.
2. de Martel, C., et al., *Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type*. Int J Cancer, 2017. **141**(4): p. 664-670.
3. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
4. Rieck, T., M. Feig, and A. Siedler, *Impfquoten von Kinderschutzimpfungen in Deutschland—aktuelle Ergebnisse aus der RKI-Impfsurveillance*. 2022.
5. O'Connor, M., S.-Y. Chan, and H.-U. Bernard, *Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs*. Human papillomaviruses, 1995: p. 21-40.
6. Li, N., et al., *Structure of the origin recognition complex bound to DNA replication origin*. Nature, 2018. **559**(7713): p. 217-222.
7. Yu, L., V. Majerciak, and Z.M. Zheng, *HPV16 and HPV18 Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
8. Grassmann, K., et al., *Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2339-49.
9. Hummel, M., J.B. Hudson, and L.A. Laimins, *Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes*. J Virol, 1992. **66**(10): p. 6070-80.
10. Kukimoto, I., T. Takeuchi, and T. Kanda, *CCAAT/enhancer binding protein beta binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16*. Virology, 2006. **346**(1): p. 98-107.
11. Straub, E., et al., *Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter*. Journal of virology, 2015. **89**(14): p. 7304-7313.
12. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Rev Med Virol, 2015. **25 Suppl 1**: p. 2-23.
13. McBride, A.A., *Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions*. Nat Rev Microbiol, 2022. **20**(2): p. 95-108.
14. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
15. Doorbar, J., *The E4 protein; structure, function and patterns of expression*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 80-98.
16. Milligan, S.G., et al., *Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNAs in differentiated W12 cervical epithelial cells*. Virology, 2007. **360**(1): p. 172-81.
17. Frattini, M.G., H.B. Lim, and L.A. Laimins, *In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(7): p. 3062-7.
18. Bodily, J.M. and C. Meyers, *Genetic analysis of the human papillomavirus type 31 differentiation-dependent late promoter*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3309-21.
19. Spink, K.M. and L.A. Laimins, *Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 4918-26.
20. Songock, W.K., M.L. Scott, and J.M. Bodily, *Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by transcriptional elongation*. Virology, 2017. **507**: p. 179-191.
21. Carson, A. and S.A. Khan, *Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4356-62.
22. Wooldridge, T.R. and L.A. Laimins, *Regulation of human papillomavirus type 31 gene expression during the differentiation-dependent life cycle through histone modifications and transcription factor binding*. Virology, 2008. **374**(2): p. 371-80.

23. Gunasekharan, V., G. Haché, and L. Laimins, *Differentiation-dependent changes in levels of C/EBP $\beta$  repressors and activators regulate human papillomavirus type 31 late gene expression*. J Virol, 2012. **86**(9): p. 5393-8.
24. Gunasekharan, V.K., et al., *Post-Transcriptional Regulation of KLF4 by High-Risk Human Papillomaviruses Is Necessary for the Differentiation-Dependent Viral Life Cycle*. PLoS Pathog, 2016. **12**(7): p. e1005747.
25. Luyties, O. and D.J. Taatjes, *The Mediator kinase module: an interface between cell signaling and transcription*. Trends Biochem Sci, 2022. **47**(4): p. 314-327.
26. Fujinaga, K., F. Huang, and B.M. Peterlin, *P-TEFb: The master regulator of transcription elongation*. Mol Cell, 2023. **83**(3): p. 393-403.
27. Jang, M.K., et al., *The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 523-34.
28. Scarth, J.A., et al., *The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation*. J Gen Virol, 2021. **102**(3).
29. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
30. Münger, K., et al., *Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product*. Embo j, 1989. **8**(13): p. 4099-105.
31. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4620-4.
32. Bieging, K.T., S.S. Mello, and L.D. Attardi, *Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(5): p. 359-70.
33. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18*. Embo j, 1991. **10**(13): p. 4129-35.
34. Huibregtse, J.M., et al., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5249.
35. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. Cell, 1993. **75**(3): p. 495-505.
36. Wang, J.W. and R.B. Roden, *L2, the minor capsid protein of papillomavirus*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 175-86.
37. Buck, C.B., P.M. Day, and B.L. Trus, *The papillomavirus major capsid protein L1*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 169-74.
38. Pereira, R., Hitzeroth, II, and E.P. Rybicki, *Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses*. Arch Virol, 2009. **154**(2): p. 187-97.
39. Hughes, F.J. and M.A. Romanos, *E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(25): p. 5817-23.
40. Bergvall, M., T. Melendy, and J. Archambault, *The E1 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 35-56.
41. Porter, S.S., et al., *Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus*. Virus Res, 2017. **231**: p. 10-20.
42. Sanders, C.M. and A. Stenlund, *Recruitment and loading of the E1 initiator protein: an ATP-dependent process catalysed by a transcription factor*. Embo j, 1998. **17**(23): p. 7044-55.
43. Enemark, E.J. and L. Joshua-Tor, *Mechanism of DNA translocation in a replicative hexameric helicase*. Nature, 2006. **442**(7100): p. 270-5.
44. Chen, G. and A. Stenlund, *The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 292-302.
45. Hegde, R.S., *The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2002. **31**: p. 343-60.
46. McBride, A.A., *The papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 57-79.
47. Dong, G., T.R. Broker, and L.T. Chow, *Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements*. J Virol, 1994. **68**(2): p. 1115-27.

48. McBride, A.A., H. Romanczuk, and P.M. Howley, *The papillomavirus E2 regulatory proteins*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18411-4.
49. Remm, M., R. Brain, and J.R. Jenkins, *The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18*. Nucleic acids research, 1992. **20**(22): p. 6015-6021.
50. Steger, G. and S. Corbach, *Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein*. Journal of virology, 1997. **71**(1): p. 50-58.
51. Rogers, A., M. Waltke, and P.C. Angeletti, *Evolutionary variation of papillomavirus E2 protein and E2 binding sites*. Virology Journal, 2011. **8**(1): p. 379.
52. Rapp, B., et al., *Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6956-66.
53. Stubenrauch, F., I.M. Leigh, and H. Pfister, *E2 represses the late gene promoter of human papillomavirus type 8 at high concentrations by interfering with cellular factors*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 119-26.
54. Hou, S.Y., S.Y. Wu, and C.M. Chiang, *Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus E2 proteins correlates with E2 DNA binding*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45619-29.
55. McPhillips, M.G., et al., *Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9530-43.
56. Chang, S.W., et al., *Phosphorylation of HPV-16 E2 at serine 243 enables binding to Brd4 and mitotic chromosomes*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110882.
57. Howley, P.M. and H.J. Pfister, *Beta genus papillomaviruses and skin cancer*. Virology, 2015. **479-480**: p. 290-6.
58. Delcuratolo, M., et al., *Papillomavirus-Associated Tumor Formation Critically Depends on c-Fos Expression Induced by Viral Protein E2 and Bromodomain Protein Brd4*. PLOS Pathogens, 2016. **12**(1): p. e1005366.
59. Ushikai, M., et al., *trans activation by the full-length E2 proteins of human papillomavirus type 16 and bovine papillomavirus type 1 in vitro and in vivo: cooperation with activation domains of cellular transcription factors*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6655-66.
60. Xue, Y., et al., *HPV16 E2 is an immediate early marker of viral infection, preceding E7 expression in precursor structures of cervical carcinoma*. Cancer Res, 2010. **70**(13): p. 5316-25.
61. Khurana, S., et al., *Spatial and Functional Organization of Human Papillomavirus Replication Foci in the Productive Stage of Infection*. mBio, 2021. **12**(6): p. e0268421.
62. Stubenrauch, F., et al., *The E8<sup>E2C</sup> Protein, a Negative Regulator of Viral Transcription and Replication, Is Required for Extrachromosomal Maintenance of Human Papillomavirus Type 31 in Keratinocytes*. Journal of virology, 2000. **74**: p. 1178-86.
63. van de Poel, S., et al., *Identification and Functional Characterization of Phosphorylation Sites of the Human Papillomavirus 31 E8<sup>E2</sup> Protein*. Journal of virology, 2018. **92**(4): p. e01743-17.
64. Stubenrauch, F., et al., *The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1178-86.
65. Stubenrauch, F., et al., *The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins*. Int J Cancer, 2007. **121**(10): p. 2284-92.
66. Stubenrauch, F., T. Zobel, and T. Iftner, *The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31*. J Virol, 2001. **75**(9): p. 4139-49.
67. Dreer, M., et al., *Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8<sup>E2C</sup> Proteins Inhibits Viral Replication*. PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005556.

68. Dreer, M., et al., *Contribution of HDAC3 to transcriptional repression by the human papillomavirus 31 E8<sup>E2</sup> protein*. Journal of General Virology, 2020. **101**(7): p. 751-759.
69. Straub, E., et al., *The viral E8<sup>E2C</sup> repressor limits productive replication of human papillomavirus 16*. J Virol, 2014. **88**(2): p. 937-47.
70. Zobel, T., T. Iftner, and F. Stubenrauch, *The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8352-62.
71. Lace, M.J., et al., *The E8<sup>E2</sup> gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes*. Journal of virology, 2008. **82**(21): p. 10841-10853.
72. Isok-Paas, H., et al., *The transcription map of HPV11 in U2OS cells adequately reflects the initial and stable replication phases of the viral genome*. Virology journal, 2015. **12**(1): p. 1-15.
73. Wu, S.Y. and C.M. Chiang, *The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13141-5.
74. Rahman, S., et al., *The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(13): p. 2641-52.
75. Yang, Z., et al., *Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 535-45.
76. Huang, B., et al., *Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1375-87.
77. Wu, S.-Y., et al., *Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing*. Genes & Development, 2006. **20**(17): p. 2383-2396.
78. You, J., et al., *Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes*. Cell, 2004. **117**(3): p. 349-60.
79. Devaiah, B.N., et al., *BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(6): p. 540-8.
80. McBride, A.A. and M.K. Jang, *Current understanding of the role of the Brd4 protein in the papillomavirus lifecycle*. Viruses, 2013. **5**(6): p. 1374-94.
81. Yan, J., et al., *Abrogation of the Brd4-positive transcription elongation factor B complex by papillomavirus E2 protein contributes to viral oncogene repression*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 76-87.
82. Jeckel, S., et al., *A Transactivator Function of Cottontail Rabbit Papillomavirus E2 Is Essential for Tumor Induction in Rabbits*. Journal of Virology, 2002. **76**(22): p. 11209-11215.
83. Floyd, S.R., et al., *The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling*. Nature, 2013. **498**(7453): p. 246-50.
84. French, C.A., et al., *BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma*. Cancer Res, 2003. **63**(2): p. 304-7.
85. Wu, S.Y., et al., *BRD4 Phosphorylation Regulates HPV E2-Mediated Viral Transcription, Origin Replication, and Cellular MMP-9 Expression*. Cell Rep, 2016. **16**(6): p. 1733-48.
86. Yigitliler, A., et al., *BRD4S interacts with viral E2 protein to limit human papillomavirus late transcription*. J Virol, 2021. **95**(11).
87. Sakakibara, N., et al., *Brd4 is displaced from HPV replication factories as they expand and amplify viral DNA*. PLoS Pathog, 2013. **9**(11): p. e1003777.
88. Gauson, E.J., et al., *Evidence supporting a role for TopBP1 and Brd4 in the initiation but not continuation of human papillomavirus 16 E1/E2-mediated DNA replication*. J Virol, 2015. **89**(9): p. 4980-91.
89. Stubenrauch, F., A.M. Colbert, and L.A. Laimins, *Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 8115-23.

90. Jang, M.K., D. Kwon, and A.A. McBride, *Papillomavirus E2 proteins and the host BRD4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2592-600.
91. Gauson, E.J., et al., *Regulation of human genome expression and RNA splicing by human papillomavirus 16 E2 protein*. Virology, 2014. **468-470**: p. 10-18.
92. Huang, G.H., et al., *Methylation-mediated miR-155-FAM133A axis contributes to the attenuated invasion and migration of IDH mutant gliomas*. Cancer Lett, 2018. **432**: p. 93-102.
93. Whitehurst, A.W., *Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2014. **54**(1): p. 251-272.
94. Baltz, A.G., et al., *The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts*. Mol Cell, 2012. **46**(5): p. 674-90.
95. Austenaa, L.M.I., et al., *A first exon termination checkpoint preferentially suppresses extragenic transcription*. Nat Struct Mol Biol, 2021. **28**(4): p. 337-346.
96. Estell, C., et al., *A restrictor complex of ZC3H4, WDR82, and ARS2 integrates with PNUTS to control unproductive transcription*. Mol Cell, 2023. **83**(13): p. 2222-2239.e5.
97. Estell, C., et al., *ZC3H4 restricts non-coding transcription in human cells*. Elife, 2021. **10**.
98. Hughes, A.L., et al., *A CpG island-encoded mechanism protects genes from premature transcription termination*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 726.
99. Park, K., et al., *ZWC complex-mediated SPT5 phosphorylation suppresses divergent antisense RNA transcription at active gene promoters*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(7): p. 3835-3851.
100. Rouvière, J.O., et al., *ARS2 instructs early transcription termination-coupled RNA decay by recruiting ZC3H4 to nascent transcripts*. Mol Cell, 2023. **83**(13): p. 2240-2257.e6.
101. Decker, T.M., *Mechanisms of Transcription Elongation Factor DSIF (Spt4-Spt5)*. J Mol Biol, 2021. **433**(14): p. 166657.
102. Graham, S.V., *Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing*. J Virol, 2016. **90**(19): p. 8384-8.
103. Jeckel, S., et al., *A transactivator function of cottontail rabbit papillomavirus e2 is essential for tumor induction in rabbits*. J Virol, 2002. **76**(22): p. 11209-15.
104. Abbate, E.A., J.M. Berger, and M.R. Botchan, *The X-ray structure of the papillomavirus helicase in complex with its molecular matchmaker E2*. Genes Dev, 2004. **18**(16): p. 1981-96.
105. Olejnik-Schmidt, A.K., et al., *Search for cellular partners of human papillomavirus type 16 E2 protein*. Archives of virology, 2008. **153**(5): p. 983-990.
106. Schweiger, M.R., J. You, and P.M. Howley, *Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4276-85.
107. Lee, A.Y. and C.M. Chiang, *Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2778-86.
108. Abroi, A., R. Kurg, and M. Ustav, *Transcriptional and replicational activation functions in the bovine papillomavirus type 1 E2 protein are encoded by different structural determinants*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6169-79.
109. Behren, A., et al., *Papillomavirus E2 protein induces expression of the matrix metalloproteinase-9 via the extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 signaling pathway*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11613-21.
110. Schneider, M., et al., *Cottontail Rabbit Papillomavirus E1 and E2 Proteins Mutually Influence Their Subcellular Localizations*. J Virol, 2018. **92**(21).
111. Ruesch, M.N., F. Stubenrauch, and L.A. Laimins, *Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5016-24.

112. Reiser, J., et al., *High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression.* J Virol, 2011. **85**(21): p. 11372-80.
113. Klumpp, D.J., F. Stubenrauch, and L.A. Laimins, *Differential effects of the splice acceptor at nucleotide 3295 of human papillomavirus type 31 on stable and transient viral replication.* J Virol, 1997. **71**(11): p. 8186-94.
114. Kim, D.I., et al., *An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling.* Mol Biol Cell, 2016. **27**(8): p. 1188-96.
115. Fertey, J., et al., *Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8<sup>E2C</sup> proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein.* J Virol, 2011. **85**(6): p. 2918-26.
116. Straub, E., et al., *Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter.* J Virol, 2015. **89**(14): p. 7304-13.
117. Griffin, H., et al., *Stratification of HPV-induced cervical pathology using the virally encoded molecular marker E4 in combination with p16 or MCM.* Mod Pathol, 2015. **28**(7): p. 977-93.
118. Wieland, A., et al., *Defining HPV-specific B cell responses in patients with head and neck cancer.* Nature, 2021. **597**(7875): p. 274-278.
119. Scheffner, M., et al., *The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5523-7.
120. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.* Cell, 1975. **6**(3): p. 331-43.
121. Dickson, M.A., et al., *Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1436-47.
122. M. Ausubel, R.B., R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl., *Current protocols in molecular biology, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, \$165.00.* 1989. **1**(2): p. 146-146.
123. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
124. Martin, M., *Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads.* EMBnet.journal, 2011. **17**: p. 10-12.
125. Kim, D., et al., *TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions.* Genome Biol, 2013. **14**(4): p. R36.
126. Anders, S., P.T. Pyl, and W. Huber, *HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data.* Bioinformatics, 2015. **31**(2): p. 166-9.
127. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2.* Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
128. Bakhti, M., et al., *Synaptotagmin-13 orchestrates pancreatic endocrine cell egression and islet morphogenesis.* Nature Communications, 2022. **13**(1): p. 4540.
129. Olsen, J.V., et al., *Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap.* Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(12): p. 2010-21.
130. Cox, J. and M. Mann, *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.* Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
131. Cox, J., et al., *A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics.* Nat Protoc, 2009. **4**(5): p. 698-705.
132. Tyanova, S., et al., *The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data.* Nat Methods, 2016. **13**(9): p. 731-40.
133. Helfer, C.M., J. Yan, and J. You, *The cellular bromodomain protein Brd4 has multiple functions in E2-mediated papillomavirus transcription activation.* Viruses, 2014. **6**(8): p. 3228-49.

134. Iftner, T., et al., *Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle*. 2017. **231**: p. 76-82.
135. Ilves, I., et al., *Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3660-5.
136. Wu, S.Y., et al., *Opposing Functions of BRD4 Isoforms in Breast Cancer*. Mol Cell, 2020. **78**(6): p. 1114-1132.e10.
137. Vösa, L., et al., *Identification and Analysis of Papillomavirus E2 Protein Binding Sites in the Human Genome*. Journal of Virology, 2012. **86**(1): p. 348-357.
138. Ramírez-Salazar, E., et al., *HPV16 E2 could act as down-regulator in cellular genes implicated in apoptosis, proliferation and cell differentiation*. Virol J, 2011. **8**: p. 247.
139. Sénéchal, H., et al., *Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4*. Virology, 2007. **358**(1): p. 10-7.
140. Myers, J.E., et al., *Detecting episomal or integrated human papillomavirus 16 DNA using an exonuclease V-qPCR-based assay*. Virology, 2019. **537**: p. 149-156.
141. Habbane, M., et al., *Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases*. Biomedicines, 2021. **9**(10).
142. Stubenrauch, F. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus life cycle: active and latent phases*. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(6): p. 379-86.
143. Egawa, N., et al., *HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions*. PLoS Pathog, 2017. **13**(3): p. e1006282.
144. Yajid, A.I., et al., *Potential Role of E4 Protein in Human Papillomavirus Screening: a Review*. Asian Pac J Cancer Prev, 2017. **18**(2): p. 315-319.
145. Sears, R.M., D.G. May, and K.J. Roux, *BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells*. Methods Mol Biol, 2019. **2012**: p. 299-313.
146. Fratta, E., et al., *The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential*. Mol Oncol, 2011. **5**(2): p. 164-82.
147. Ferran, M.C. and A.A. McBride, *Transient Viral DNA Replication and Repression of Viral Transcription Are Supported by the C-Terminal Domain of the Bovine Papillomavirus Type 1 E1 Protein*. Journal of Virology, 1998. **72**(1): p. 796-801.
148. Fujii, T., et al., *High and low levels of cottontail rabbit papillomavirus E2 protein generate opposite effects on gene expression*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 867-74.
149. Johansson, C. and S. Schwartz, *Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(4): p. 239-51.
150. Schweiger, M.-R., J. You, and P.M. Howley, *Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function*. Journal of virology, 2006. **80**(9): p. 4276-4285.
151. Prabhakar, A.T., et al., *CK2 Phosphorylation of Human Papillomavirus 16 E2 on Serine 23 Promotes Interaction with TopBP1 and Is Critical for E2 Interaction with Mitotic Chromatin and the Viral Life Cycle*. mBio, 2021. **12**(5): p. e0116321.
152. Hsin, J.P. and J.L. Manley, *The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing*. Genes Dev, 2012. **26**(19): p. 2119-37.
153. Malvezzi, F., et al., *Phosphorylation-dependent BRD4 dimerization and implications for therapeutic inhibition of BET family proteins*. Communications Biology, 2021. **4**(1): p. 1273.
154. Weissman, J.D., et al., *The intrinsic kinase activity of BRD4 spans its BD2-B-BID domains*. J Biol Chem, 2021. **297**(5): p. 101326.
155. Wernersson, S., et al., *Bromodomain Interactions with Acetylated Histone 4 Peptides in the BRD4 Tandem Domain: Effects on Domain Dynamics and Internal Flexibility*. Biochemistry, 2022. **61**(21): p. 2303-2318.
156. Jang, M.K., et al., *A proteomic approach to discover and compare interacting partners of papillomavirus E2 proteins from diverse phylogenetic groups*. Proteomics, 2015. **15**(12): p. 2038-50.

157. Smith, J.A., et al., *Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(8): p. 3752-3757.
158. Mohr, I.J., et al., *Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator*. Science, 1990. **250**(4988): p. 1694-9.
159. Ozbun, M.A. and C. Meyers, *Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification*. Virology, 1998. **248**(2): p. 218-30.
160. Sakai, H., et al., *Targeted Mutagenesis of the Human Papillomavirus Type 16 E2 Transactivation Domain Reveals Separable Transcriptional Activation and DNA Replication Functions*. J Virol, 1996. **70**(3).
161. Klymenko, T., et al., *Human Papillomavirus E2 Regulates SRSF3 (SRp20) To Promote Capsid Protein Expression in Infected Differentiated Keratinocytes*. J Virol, 2016. **90**(10): p. 5047-58.
162. Bodily, J.M., et al., *Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle*. Virology, 2013. **443**(1): p. 11-9.
163. Taguchi, A., et al., *Characterization of novel transcripts of human papillomavirus type 16 using cap analysis gene expression technology*. J Virol, 2015. **89**(4): p. 2448-52.
164. Bisgrove, D.A., et al., *Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13690-5.
165. Hubert, W.G. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus type 31 replication modes during the early phases of the viral life cycle depend on transcriptional and posttranscriptional regulation of E1 and E2 expression*. J Virol, 2002. **76**(5): p. 2263-73.

## 9 Publikationen

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Renner J., Boldt K., Wieland A., Stubenrauch F, Iftner T., *Activation of the HPV16 late promoter by viral E2 and cellular ZC3H4 proteins*, (submitted)

Renner J., Stubenrauch F, Iftner T., *The cellular Fam133B protein interacts with the viral E2 protein*, (in preparation)

Während der Promotion wurde an folgenden Publikationen mitgewirkt:

Yigitliler A., Renner J., Simon C., Schneider M., Stubenrauch F., Iftner T., *BRD4S Interacts with Viral E2 Protein To Limit Human Papillomavirus Late Transcription*, *J. Virol* 2021 Jun; 95(11): e02032-20.

## 10 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei:

**Prof. Dr. Thomas Iftner** für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten im Forschungsbereich humane Papillomviren anfertigen zu können. Zusätzlich möchte ich mich für die fachlichen Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

**Prof. Dr. Frank Stubenrauch** für sein großes Engagement, die vielen intensiven Diskussionen und zahlreichen Ideen, die für die Umsetzung meines Projektes essentiell waren.

**Prof. Dr. Michael Schindler** für die Betreuung dieser Arbeit durch die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät und die Übernahme der Tätigkeit als Zweitgutachter.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen **Kolleginnen und Kollegen** für die tolle Atmosphäre und gegenseitigen Unterstützung in jeglichen Situationen bedanken.

Meiner Familie und Freunden danke ich für deren ständige und bedingungslose Unterstützung während dieser Zeit.