

**Charakterisierung und Nachweis des
E8[^]E2C Repressorproteins des
humanen "high-risk" Papillomvirus
Typ 31 (HPV31)**

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Thomas Zobel

aus Heidelberg

2005

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2005

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: PD Dr. F. Stubenrauch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Blin

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
3 MATERIAL UND METHODEN.....	10
3.1 Häufig verwendete Abkürzungen	10
3.2 Material.....	12
3.2.1 Geräte.....	12
3.2.2 Kleingeräte/Materialien	13
3.2.3 Chemikalien	14
3.2.4 Fertige Reagenziensysteme.....	14
3.2.5 Radioaktive Nukleotide	15
3.2.6 Enzyme.....	15
3.2.6.1 Restriktionsendonukleasen.....	15
3.2.6.2 Sonstige Enzyme.....	15
3.2.7 Antikörper	16
3.2.8 Marker	16
3.2.8.1 DNA-Längenstandards	16
3.2.8.2 Protein-Größenstandards.....	16
3.2.9 Oligonukleotide	17
3.2.10 Plasmide und Vektoren	19
3.2.11 Sonstige Nukleinsäuren	24
3.2.12 Bakterienstämme	24
3.2.13 Eukaryonte Zellen	24
3.2.14 Medien für Bakterienkultur	24
3.2.15 Medien für Zellkultur.....	25
3.2.16 Häufig benutzte Medien und Puffer	25
3.3 Methoden	26
3.3.1 Mikrobiologische Methoden.....	26
3.3.1.1 Kulturen für Plasmidisolierungen	26
3.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	26

Inhaltsverzeichnis

3.3.2 DNA-Methoden	27
3.3.2.1 Standardmethoden	27
3.3.2.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	27
3.3.2.3 Fragmentelution aus Agarosegelen	27
3.3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.3.2.5 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide.....	28
3.3.2.6 Ortsspezifische PCR-Mutagenese.....	28
3.3.2.7 Sequenzierung von DNA	29
3.3.2.8 Radioaktive 5'-Endmarkierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden	30
3.3.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	30
3.3.2.10 Isolation von niedermolekulargewichtiger DNA nach Hirt.....	31
3.3.2.11 DNA-Transfer nach Southern (Southern-Blot-Analyse).....	31
3.3.2.12 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Sonden..	31
3.3.3 Zellkultur-Methoden	32
3.3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen	32
3.3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
3.3.3.3 Mitomycin C-Behandlung von NIH3T3-J2 Zellen	33
3.3.3.4 Transfektion von Humanzellen mit Liposomen	34
3.3.3.5 Luziferase-Reporteranalyse.....	34
3.3.3.6 Transiente Replikation von HPV31-Replikationsursprung-Reporterkonstrukten.	35
3.3.3.7 Transiente Replikation von HPV31-Genomen	35
3.3.4 RNA-Methoden	35
3.3.4.1 RNase-Protektionsanalyse	35
3.3.5 Protein-Methoden	36
3.3.5.1 Bakterielle Proteinexpression	36
3.3.5.2 Herstellung nukleärer Extrakte aus Keratinozyten	38
3.3.5.3 Gelretardationsanalyse.....	39
3.3.5.4 SDS-PAGE.....	39
3.3.5.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot)	39
3.3.5.6 Immunologischer Nachweis transferierter Proteine.....	40
4 ERGEBNISSE.....	41
4.1 Die effiziente Repression der HPV31 P97-Aktivität durch E8^AE2C erfordert nur eine einzelne, promotor-distale E2BS und den E8-Anteil.....	41
4.2 Die E8-Domäne von E8^AE2C ist essentiell für die transkriptionelle Repression des HPV6a P2 Promotors über grosse Distanz.....	44

Inhaltsverzeichnis

4.3 Die Aminosäuresequenz der potentiellen E8-Domänen verschiedener HPV-Typen ist stark konserviert	46
4.4 Analyse der DNA-Bindungskapazität der E8 ^{E2C} -Mutanten	48
4.5 Nachweis der stabilen Proteinexpression der E8 ^{E2C} -Mutanten.....	49
4.6 Die konservierten Aminosäuren Tryptophan 6 und Lysin 7 der E8-Domäne sind essentiell für die Repression über grosse Distanz	52
4.7 E8 ^{E2C} reprimiert spezifisch den frühen Promotor des Simian Virus 40 (SV40)....	53
4.8 E8 ^{E2C} wirkt in der Anwesenheit von E2BS als Repressor von synthetischen minimalen Promotoren	55
4.9 Die Fernrepression durch E8 ^{E2C} wird nicht für die Repression der E2-vermittelten Transaktivierung benötigt.....	58
4.10 Mutation der Aminosäuren W6 und K7 von E8 ^{E2C} im HPV31 Genom resultieren in einer drastisch erhöhten viralen DNA-Replikation	60
4.11 Die Überreplikation von HPV31 E8 ^{E2C} -Mutanten resultiert nicht aus einem Anstieg der viralen Transkription.....	62
4.12 Klonierung, Expression und Nachweis von E8 ^{E2C} -GAL4-DBD Fusionsproteinen	64
4.13 Eine minimale Domäne von E8 ^{E2C} genügt zur effizienten Repression eines minimalen, synthetischen Promotorkonstruktes	66
4.14 Die minimale transkriptionelle Repressordomäne von E8 ^{E2C} wirkt als Repressor des HPV31 Replikationsursprungs	67
4.15 E8 ^{E2C} (1-21)-GAL4 inhibiert die Replikation von oriP des Epstein-Barr-Virus (EBV)	70
4.16 Die Repression des minimalen, synthetischen Luziferase-Reporterkonstrukts pC18-luc durch E8 ^{E2C} ist unabhängig von Histon-Deacetylierung	73
5 DISKUSSION.....	75
6 LITERATURVERZEICHNIS	82

1 ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV) induzieren benigne Tumoren der Haut oder Schleimhaut, die besonders bei den sogenannten "high risk"-Typen wie 16, 18, 31 und 45 ein hohes Risiko der malignen Konversion besitzen. Der Replikationszyklus von Papillomviren ist eng an den Differenzierungsgrad des infizierten Epithels gekoppelt. In undifferenzierten Keratinozyten liegt eine persistente Infektion vor, bei der nur eine limitierte DNA-Replikation und Expression der frühen Gene stattfindet, aber keine Virusproduktion. Zunehmende Differenzierung resultiert in einer Amplifikation der Virusgenome sowie in der Expression der späten viralen Proteine. Die virale DNA-Replikation wird positiv und negativ durch zwei virale, sequenzspezifisch DNA-bindende Proteine reguliert, welche vom E2 Gen kodiert werden und durch alternatives Spleißen entstehen. Das E2 Protein aktiviert die virale DNA-Replikation und reguliert die virale Genexpression. Das E8^{E2C} Protein von HPV31 reprimiert die DNA-Replikation und wirkt als Repressor des frühen Promotors P97, der für die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 verantwortlich ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollten für die Repression durch HPV31 E8^{E2C} erforderliche *cis*- und *trans*-Elemente identifiziert und charakterisiert werden. Mutationsanalysen der vier E2 Bindungsstellen (E2BS) im P97 Promotor zeigten, daß das E8^{E2C} Protein, im Gegensatz zu E2, eine E2BS-abhängige, transkriptionelle Fernrepressionsaktivität besitzt, für welche die unter HPV hochkonservierte E8-Domäne verantwortlich ist. E8^{E2C} inhibierte auch den HPV6a P2 Promotor, den minimalen frühen SV40 Promotor und den minimalen späten Adenovirus Hauptpromotor in der Anwesenheit von E2BS. Eine "Alanin-Scanning"-Mutagenese der E8-Domäne identifizierte die Aminosäuren W6 und K7 als spezifisch für die Ferndistanzrepressionsaktivität. Die Mutation der Aminosäuren W6 und K7 von E8^{E2C} im Kontext des HPV31 Genoms resultierte in einer starken Überreplikation der Genome, ähnlich der von HPV31 E8^{E2C} „Knock-out“-Mutanten. Überraschenderweise war die Überreplikation nicht eine Folge einer erhöhten viralen Genexpression, was auf eine direkte Beteiligung von E8^{E2C} bei der Inhibition der DNA-Replikation hinwies. Fusionsproteine der ersten 12, 21 und 37 Aminosäuren von E8^{E2C} mit der heterologen GAL4-DNA-Bindungsdomäne legten die ersten 21 Aminosäuren als minimale Repressionsdomäne für die Transkription und virale DNA-Replikation fest. Diese Experimente zeigten, daß die postulierte Bindungsstellenkompetition und Ausbildung von inaktiven Heterodimeren zwischen E2 und E8^{E2C} Proteinen nicht wesentlich zur Replikationskontrolle bei HPV31 beitragen. Die minimale Repressionsdomäne genügte zur Repression des heterologen EBV-Replikationsursprungs oriP, der den Kontrollmechanismen unterliegt, welche dafür verantwortlich sind, daß das

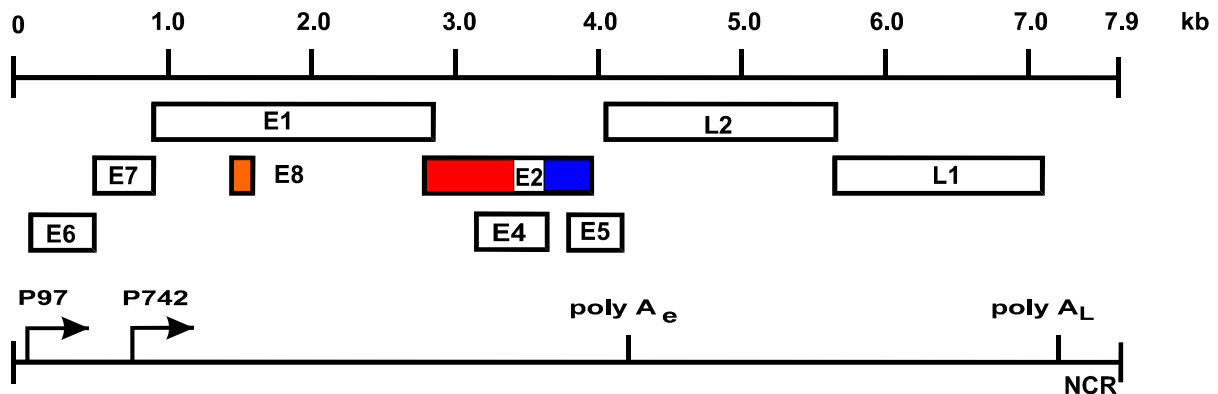
zelluläre Genom exakt einmal pro Zellzyklus repliziert wird. Zusammenfassend legen diese Daten nahe, daß E8^{E2C} einen generellen Inhibitor von extrachromosomal-replizierenden, karzinogenen Viren des Menschen darstellt, was wichtige Implikationen für die Entwicklung neuartiger antiviraler Therapien besitzt.

2 EINLEITUNG

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine, doppelsträngige DNA-Viren, die zusammen mit den animalen Papillomviren und den Polyomaviren die Familie der Papovaviridae bilden. Die nicht umhüllten, ikosaedrischen Viruspartikel haben einen Durchmesser von ca. 55 nm und umschließen einen zirkulären DNA-Strang von ca. 8 kb Länge (Howley, 1996).

Bisher konnten über 90 verschiedene HPV-Typen identifiziert werden, die einen strikten Gewebetropismus für die verhornende Haut oder Schleimhaut besitzen (Laimins, 1996). Infektionen mit Papillomviren führen zu gutartigen Tumoren der Haut und Schleimhaut, wie Warzen, Kondylomen, Larynx- oder Konjunktivpapillomen. Eine persistierende Papillomvirus-Infektion kann zu einer Progression des Primärtumors über intraepitheliale Neoplasien bis hin zum invasiven Karzinom führen (Walboomers et al., 1994). Die kausale Rolle von humanen Papillomviren bei der Krebsentstehung zeigt die Anwesenheit von HPV-DNA in über 99,7% der Zervixkarzinome (Walboomers et al., 1999). Der häufigste HPV-Typ in diesen Tumoren ist HPV16 (ca. 50% der Fälle), gefolgt von HPV18, 45 und 31 (Walboomers et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind die HPV-Typen 6 und 11 hauptsächlich mit gutartigen Läsionen des Genitalbereichs und niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien assoziiert (Walboomers et al., 1994). Dieses unterschiedliche karzinogene Potential führte zur Klassifizierung in eine Gruppe mit niedrigem ("low risk") und einer Gruppe mit hohem Risiko ("high risk") für die Entstehung von Tumoren (Stubenrauch und Iftner, 1999).

Das Genom humaner Papillomviren ist sehr ähnlich aufgebaut und besteht aus einer kodierenden und einer nicht-kodierenden Region (**Abb. 1**). Die kodierende Region enthält die offenen Leseraster für die frühen ("early", E) Proteine, die bedeutende Funktionen bei der Zelltransformation (E6, E7), der Replikation der viralen DNA (E1, E2) und der Regulation der viralen Promotoren (E2) besitzen sowie der späten ("late", L) Proteine, der Strukturproteine für die Kapsidbildung (L1, L2). Die nichtkodierende Region ("non coding region", NCR oder "upstream regulatory region", URR) spielt eine zentrale Rolle für die *cis*-Regulation der viralen Transkription und Replikation. Sie enthält eine Enhancer-Region mit zahlreichen Bindungsstellen für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren sowie den viralen Replikationsursprung (Kanaya et al., 1997; Laimins, 1996; Sen et al., 2002; Ustav et al., 1991). In der NCR befinden sich im Falle von HPV31 unter anderem Bindungsstellen für das TATA-Box bindende Protein (TBP), SP1, AP1, Oct1, YY1 und TEF1 (Hubert et al., 1999; Kanaya et al., 1997; Sen et al., 2002).

**Abb. 1****Die Genomorganisation von HPV31.**

Die Grafik zeigt im oberen Teil das HPV31 Genom in linearer Form mit den offenen Leserahmen für die frühen ("early", E) und späten ("late", L) viralen Proteine. Charakteristisch ist die überlappende Lage der offenen Leserahmen in den drei verschiedenen Leserastern. Der N-terminale Teil von E2 ist in rot und der C-terminale Teil in blau dargestellt. Der Leserahmen von E8 ist in orange abgebildet. Der untere Teil der Abbildung stellt die Lage der Promotoren P97 und P742, der frühen und späten Polyadenylierungssignale (poly A_e bzw. poly A_L) sowie der regulatorischen, nicht-kodierenden Region (NCR) dar. Der Maßstab zeigt die Größenverhältnisse in Kilobasen.

Die Expression der polycistronischen Transkripte hoch-karzinogener Papillomviren wird durch zwei Promotoren reguliert, den frühen Promotor P97 und den späten Promotor P742 bei HPV31 (Hummel et al., 1992) (**Abb. 1**).

Die Expression der Strukturproteine und die Produktion infektiöser Viruspartikel ist an den Differenzierungsgrad des Epithels gekoppelt (Laimins, 1996). In den basalen Epithelzellschichten werden nur die frühen viralen Gene exprimiert, die zu einer Etablierung der viralen DNA mit 10 bis 100 episomalen Genom-Kopien pro Zelle beitragen (Stenlund, 1996; Stubenrauch und Laimins, 1999). Mit zunehmender Differenzierung des Epithels kommt es schließlich zur Amplifikation der viralen DNA und zu einer starken Expression der späten Gene, was in der Bildung infektiöser Viruspartikel resultiert (Laimins, 1996; Stubenrauch und Laimins, 1999).

Die frühen Proteine E6 und E7 spielen eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese durch Papillomviren, aber auch in der späten Phase des viralen Lebenszyklus. Im späten viralen Lebenszyklus der hoch karzinogenen Papillomviren ermöglicht die Expression von E6 und E7 in differenzierten Keratinozyten eine Reaktivierung des Zellzyklus und der DNA-Synthese, welche die Amplifikation der viralen DNA erlaubt (Laimins, 1996).

In HPV-positiven Zervixkarzinomen kann eine kontinuierliche Expression der E6/E7 Gene nachgewiesen werden (Jeon und Lambert, 1995; Schwarz et al., 1985). Die Expression von

E6 und E7 der hoch karzinogenen HPV-Typen ermöglichen zudem die Immortalisierung von primären Vorhaut-Keratinocyten (Hawley-Nelson et al., 1989). Diese Eigenschaft der viralen Onkoproteine beruht unter anderem auf ihrer Fähigkeit, mit essentiellen Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus zu interferieren (Mantovani und Banks, 2001; Münger et al., 2001; Thomas et al., 1998). E7 bewirkt durch die Inaktivierung der zyklinabhängigen Proteinkinaseinhibitoren p21 und p27 sowie durch die Degradation des zellulären Tumorsuppressorproteins pRb eine Deregulation des Zellzyklus (Münger et al., 2001; Thomas et al., 1998). Die Inaktivierung von p21 und p27 durch E7 führt zu einer Aufhebung des durch diese Inhibitoren vermittelten G1/S-Phase-Arrests (Funk et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996). Weiterhin resultiert die Degradation von pRb durch E7 in einer Freisetzung des zellulären Transkriptionsfaktors E2F, der wiederum die Transkription S-Phase spezifischer Gene induziert (Münger et al., 2001; Thomas et al., 1998). Freies E2F würde zu einer Induktion der p53-abhängigen Apoptose führen. Das virale E6 Protein verhindert die Apoptose durch die Ubiquitin-abhängige Degradierung von p53 (Scheffner et al., 1990) und gewährleistet im Zusammenspiel mit E7 eine kontinuierliche Proliferation der infizierten Zellen.

Das E2 Protein humaner Papillomviren wirkt als positiver und negativer Regulator der viralen Transkription. E2 besteht aus einer aminoterminalen Domäne, die für die Transaktivierung der viralen Promotoren sowie für die virale DNA-Replikation benötigt wird, einer zentralen "Hinge"-Region, die ein Kernlokalisierungssignal enthält, sowie der carboxyterminalen Domäne, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlich ist (McBride et al., 1991). Die E2 Proteine genitaler HPV-Typen binden als Dimere an vier in der NCR gelegene E2-Bindungsstellen (E2BS) mit der Konsensussequenz ACCN₆GGT (McBride et al., 1991). Die E2-Bindungsstellen ermöglichen eine Bindung von E2 mit hoher Affinität, zeigen aber gleichzeitig eine unterschiedliche Bedeutung im Verlauf des viralen Lebenszyklus. Auf Transkriptionsebene bewirkt die Bindung von E2 an die promotor-proximalen E2-Bindungsstellen 3 und 4 eine Repression des frühen viralen Promotors (Dong et al., 1994; Romanczuk et al., 1990; Thierry und Howley, 1991). Diese Repression erfolgt durch die Verdrängung zellulärer Transkriptionsfaktoren (SP1, TBP) von ihren in unmittelbarer Nähe der E2BS gelegenen Bindungsstellen (Demeret et al., 1997; Dong et al., 1994; Stubenrauch et al., 1996; Tan et al., 1994) oder durch eine direkte Interaktion von E2 mit dem basalen Transkriptions-Initiationskomplex (Hou et al., 2000). Diese Interaktion bewirkt eine Verdrängung der basalen Transkriptionsmaschinerie (Hou et al., 2000). Die Bindung von E2 an die promotor-distalen E2BS1 und 2 führt zu einer Transaktivierung des frühen viralen Promotors (Romanczuk et al., 1990). Die E2BS1, 3 und 4 von HPV31 spielen eine

essentielle Rolle bei der Etablierung und stabilen Erhaltung der episomalen Replikation (Stubenrauch et al., 1998a).

Zervixkarzinomzellen enthalten oft chromosomal integrierte HPV-DNA oder eine Mischung aus integrierter und episomaler Virus-DNA (Park et al., 1997). Die Integration der Virus-DNA unterbricht oftmals den E2 Leserahmen und kann dadurch zu einer unkontrollierten Expression der E6/E7 Onkoproteine beitragen (Park et al., 1997; Schneider-Maunoury et al., 1987).

Die Initiation der DNA-Replikation humaner Papillomviren erfordert das virale E1 Protein (Stenlund, 1996). E1 besitzt eine ATP-abhängige Helikase-Aktivität und rekrutiert die zelluläre Replikationsmaschinerie durch Interaktion mit Replikationsproteinen wie DNA-Polymerase α /Primase (Park et al., 1994; Stenlund, 1996). E1 erkennt den viralen Replikationsursprung spezifisch, aber mit relativ geringer Affinität. Die Interaktion von E2 mit E1 ermöglicht eine effizientere Bindung von E1 und damit eine wesentlich höhere Replikation der viralen DNA (Frattini und Laimins, 1994; Mohr et al., 1990; Stenlund, 1996; Yang et al., 1991).

Humane Papillomviren replizieren im Gegensatz zur zellulären chromosomalen DNA oder dem Genom anderer humanpathogener Viren (z. B. des Epstein-Barr-Virus) nicht nur einmal pro Zellzyklus. Die Aufrechterhaltung der konstanten viralen Genom-Kopienzahl während der nicht-produktiven Phase der Infektion erfordert eine Kopienzahl-Kontrolle, deren exakter Mechanismus weitestgehend unklar ist (Gilbert und Cohen, 1987; Piirsoo et al., 1996). Erste Hinweise ergaben sich aus dem Befund, daß neben dem E2 Protein bei verschiedenen Papillomvirus-Typen weitere Transkripte für kurze oder alternativ gespleisste E2 Proteine nachgewiesen werden konnten. Das Rinderpapillomvirus Typ1 (BPV1) besitzt neben E2 mindestens zwei weitere E2 Proteine: ein verkürztes E2 Protein (E2C oder E2TR), das nur aus Teilen der "Hinge"- und der C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne besteht, sowie ein alternativ gespleisstes Protein, bei dem ein kurzer offener Leserahmen (E8) im Bereich des E1 Gens an den C-Terminus von E2 gespleisst wird (E8-E2) (Choe et al., 1989; Hubbert et al., 1988; Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1989). Kotransfektionsstudien von E2TR oder E8-E2 mit E2 zeigten eine Repression der Transaktivierung durch E2 (Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1990). Der Verlust von E2C im BPV-Genom führte zu einer 10- bis 20-fach höheren DNA-Kopienzahl in transformierten Zellen (Lambert et al., 1990; Riese et al., 1990). Diese Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung des E2C Proteins als Repressor der viralen Replikation und Transkription von BPV hin. Der Verlust von E8-E2 im BPV-Genom zeigte dagegen keine phänotypische Auswirkung (Lambert et al., 1990). Im Gegensatz dazu führte die Kombination beider Mutationen zu einer geringeren stabilen

Genom-Kopienzahl und zu einer reduzierten Transformationshäufigkeit (Lambert et al., 1990). Die Rolle der BPV E2-Repressorproteine im viralen Lebenszyklus ist damit sehr komplex und bleibt weiter unklar.

Bisher konnten bei den hoch-karzinogenen HPV-Typen 16, 31 und 33 (Doorbar et al., 1990; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000) sowie dem niedrig-karzinogenen HPV11 (Chiang et al., 1991; Rotenberg et al., 1989) Transkripte nachgewiesen werden, die dem alternativ gespleissten E8-E2 von BPV ähneln. Ein dem E2C von BPV entsprechendes Transkript wurde bei humanen Papillomviren allerdings bisher nicht nachgewiesen.

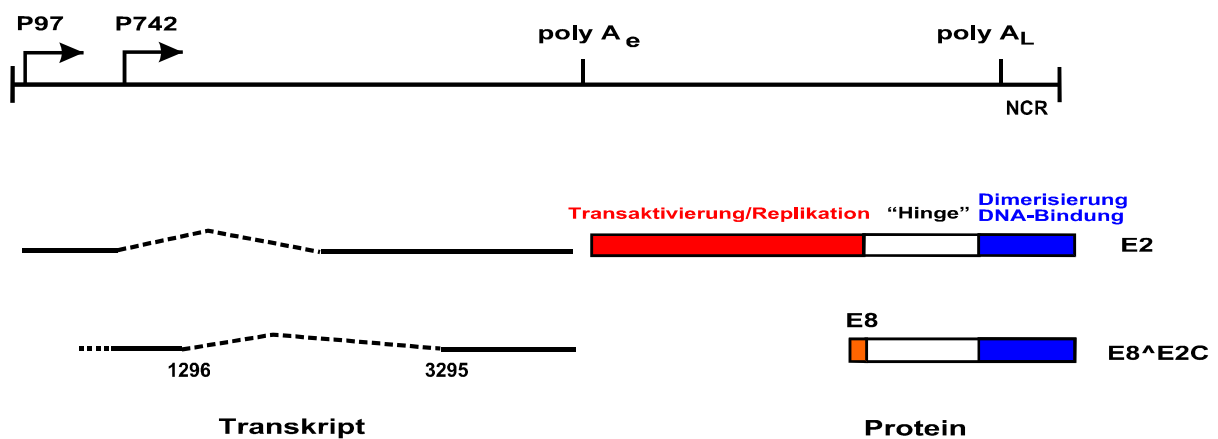


Abb. 2
Die E2 Proteine von HPV31.

Die Abbildung zeigt einen Vergleich von E2 mit dem alternativ gespleissten E8^{E2C} Protein. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Transkripte, welche für die E2 Proteine nachgewiesen werden konnten. Die Initiation des Transkripts für E2 erfolgt wahrscheinlich an P97, wohingegen der 5'-Bereich des Transkripts für E8^{E2C} noch nicht kartiert werden konnte. Dargestellt sind der Spleissdonor des Transkripts für E8^{E2C} bei Nukleotid 1296 und der Spleissakzeptor bei Nukleotid 3295. Der rechte Teil der Abbildung vergleicht die Domänen der E2 Proteine. Die N-terminale Transaktivierungs- und Replikationsdomäne von E2 ist bei E8^{E2C} durch die E8-Domäne ersetzt.

Das Transkript für E8^{E2C} von HPV31 konnte zuerst aus einer Zelllinie isoliert werden, in der HPV31 mit etwa 100 Kopien stabil episomal repliziert (CIN612-9E) (Stubenrauch et al., 2000). Es enthält einen offenen Leserahmen mit einem einzelnen ATG-Startkodon bei Nukleotid-Position (nt) 1259 des HPV31 Genoms, benutzt eine Spleissdonor-Stelle bei nt 1296 und wird an eine Spleissakzeptor-Stelle bei nt 3295 gespleisst (Stubenrauch et al., 2000)(**Abb. 2**). Gespleisste Transkripte für E8^{E2C} sind nach einer Infektion von immortalisierten Keratinozyten mit HPV31-Virionen sehr früh nachweisbar (Ozgun, 2002).

Das resultierende E8^{E2C} Protein besteht aus einer N-terminalen E8-Domäne von 12 Aminosäuren, die mit der "Hinge"- und DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne von E2 verknüpft ist (**Abb. 2**).

Der HPV31 P97 Promotor wird bei der Kotransfektion von geringen Mengen eines Expressionsvektors für das HPV31 E2 Protein in SCC13-Keratinocyten schwach transaktiviert (Rheinwald und Beckett, 1981), wohingegen die Kotransfektion grosser Mengen des gleichen Expressionsvektors zu einer mässigen Repression des P97 Promotors führt (Stubenrauch et al., 2000). Im Gegensatz dazu resultiert schon die Kotransfektion geringer Mengen des Expressionsvektors für HPV31 E8^{E2C} in einer starken Repression der P97-Aktivität (Stubenrauch et al., 2000). Dies wies darauf hin, daß die unterschiedlichen N-terminalen Domänen der E2 Proteine zur Regulation von P97 beitragen.

Transiente Replikationsstudien mit genomischen HPV31-E8ATG und Spleissdonor-Mutanten sowie Mutanten mit einem Stopkodon im N-Terminus von E8^{E2C} zeigten eine um das 30- bis 40-fach erhöhte Replikation verglichen mit dem HPV31 WT-Genom (Stubenrauch et al., 2000). HPV31 E8^{E2C} reprimiert auch die E1/E2-vermittelte transiente Replikation eines Reporterplasmids, das nur die NCR mit dem Replikationsursprung von HPV31 enthält (Stubenrauch et al., 2000). Transiente Luziferase-Reporteranalysen zeigten, daß E8^{E2C} die Transaktivierung des frühen SV40 Promotors durch E2 inhibiert (Stubenrauch et al., 2000). Diese Ergebnisse entsprechen dem gängigen Modell, nach dem die Aktivität von E2 durch Bindungsstellenkompetition oder Heterodimerisierung mit E2-Repressorproteinen moduliert wird (Barsoum et al., 1992; Bouvard et al., 1994; McBride et al., 1989; Lim et al., 1998). Allerdings reprimiert E8^{E2C} den frühen Promotor P97 im Kontext der gesamten NCR von HPV31 auch in Abwesenheit von E2 (Stubenrauch et al., 2000). E8^{E2C} könnte damit die Replikation auch indirekt über die Repression der E1 und E2 Expression regulieren. Die Repression der Transkription von P97 erfolgt nach dem gängigen Modell vermutlich durch die Verdrängung zellulärer Transkriptionsfaktoren von den Promotorproximalen E2BS.

Interessanterweise zeigte sich auch, daß E8^{E2C} für die langfristige, extrachromosomale Replikation von HPV31-Genomen benötigt wird. HPV31 E8^{E2C}-„Knock-out“-Mutanten, die einen Verlust des Proteins zur Folge hatten, integrierten trotz einer hohen transienten Replikation der Genome in Langzeitexperimenten mit stabilen Zelllinien in die chromosomale DNA der Wirtszelle (Stubenrauch et al., 2000).

Diese Arbeiten wiesen darauf hin, daß E8^{E2C} die Expression der Onkogene E6 und E7 nicht nur direkt über die Repression des frühen Promotors P97, sondern auch indirekt über die stabile Aufrechterhaltung der episomalen viralen DNA-Replikation kontrolliert. Eine

Integration der Virus-Genome kann durch die Unterbrechung des Leserahmens für E2 zu einer Deregulation von P97 führen. Demnach könnte E8^{E2C} als zentraler negativer Regulator im Lebenszyklus humaner Papillomviren dienen, dem sowohl die Kontrolle der viralen Onkoproteine als auch der Kopienzahl und des Status der viralen DNA unterliegt. Die gentherapeutische Behandlung von Papillomvirus-induzierten Karzinomen mit E8^{E2C} würde damit einen vielversprechenden Ansatz für die klinische Therapie darstellen.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Funktion des E8^{E2C} Proteins im Lebenszyklus von HPV31. Dabei sollte vor allem der molekulare Mechanismus der Inhibition der viralen Transkription und DNA-Replikation aufgeklärt werden. Hierzu sollten durch umfassende Mutationsanalysen *cis*-Elemente identifiziert werden, welche für die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} hinreichend sind. Die Bedeutung des unter humanen Papillomviren hoch konservierten E8-Anteils für die Kontrolle der Transkription und Replikation sollte durch Mutationsanalysen und die Herstellung von rekombinanten HPV31 Genomen untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zu einem besseren Verständnis von negativen Regulationsmechanismen beitragen, welche die Onkogen-Transkription und DNA-Replikation von Krebs-assoziierten humanen Papillomviren kontrollieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Häufig verwendete Abkürzungen

A	Ampere
AMPS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Tissue Type Culture Collection"
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BPV	Rinderpapillomvirus
BS	Bindungsstelle
BSA	Rinderserum-Albumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CBD	Zellulose-Bindungsdomäne
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute ("counts per minute")
CRPV	"Cottontail rabbit"-Papillomvirus
CS	Kälberserum
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes, minimal essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GST	Glutathion S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPK	Humane primäre Keratinozyten

HPV	Humanes Papillomvirus
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
luc	Luziferase-Gen
μ	micro
M	Molar
MG	Molekulargewicht
N	Normal
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PS	Polystyren
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
V/V	Volumen-/Volumenverhältnis
W/V	Gewichts-/Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

3.2 Material

3.2.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Blotkammer, klein	Transblot	BioRad
Blotkammer, gross	Transblot	BioRad
CO ₂ -Inkubator		Labotect
CO ₂ -Inkubator	US Airflow	NuAire
Durchlichtmikroskop	DM IRB	Leica
Feinwaage	GJ und 770	Kern
Horizontal-EP-Kammer (DNA-Gele)	Sub Cell GT; Mini-Sub Cell GT ; Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
Hybridisierungssofen	Mini 10	Hybaid
Inkubator	Inkubator C 200	Labotect
Kamerasystem (DNA-Gele)	Gel Doc 2000	BioRad
Kamerasystem (Proteingele)	Fluor-S Multi Imager	BioRad
Luminometer	Lumat LB 9507	EG & G Berthold
PCR-Maschine	PTC 200	MJ Research
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Phosphoimager	Fujifilm BAS-1800	Fuji
Pipetten	Pipetman 10, 20, 200 und 1000	Gilson
Schüttelinkubator	Certomat IS	B. Braun Biotech International
Schüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
	ThermoStat Plus	Eppendorf
	Rocky 3D	
Sequenzier	ABI Prism 310 Genetic Analyser	Perkin-Elmer
Sonifizierer	SonoPuls	Bandelin

Spannungsversorgung	PowerPac 200, PowerPac 3000	BioRad
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heräus
Szintillationszähler	1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Vakuum-Geltrockner	Model 583 Gel Dryer	BioRad
Vertikal-EP-Kammer (Proteingele)	Mini Protean 3 Cell	BioRad
Wasserbad	WB 10	Memmert
Vakuum-Absaugvorrichtung	VacuSafe	IBS
Zentrifugen	5810R, 5417R und 5417C Sorvall	Eppendorf Du Pont-Instruments

3.2.2 Kleingeräte/Materialien

Gel-Blotting-Papier	Blotting Paper P-7921 15*15	Schleicher&Schüll Sigma
Faltenfilter	MN 403¼; 11 cm Durchm.	Macherey&Nagel
Kryoröhrchen	Cellstar Cryo.s	Greiner
Nitrocellulose-Membran	Protran 0,2 µm	Schleicher&Schüll
Nylon-Membran	GeneScreenPlus	NEN
PCR-Reaktionsgefäße	PCR-Softtubes 0,2 ml, FD	Biozym
Plastikküvetten	UVette	Eppendorf
Plastikpipetten	2, 5, 10, 25, 50 ml	Becton/Dickinson
PS-Röhrchen steril	55*12 mm; 3,5ml	
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Röntgenfilme	Hyperfilm MP, Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia
Sterilfilter	0,2 µm	Millipore
Zählkammer	Neubauer; 0,100mm Tiefe; 0,0025mm ²	Assistent
Zellkulturplatten	6x 35mm	Becton/Dickinson
Zellkulturschalen	35 mm 60 mm, 100 mm	Nunc Becton/Dickinson
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Becton/Dickinson

3.2.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- BioRad
- Biozym
- Calbiochem
- Fluka
- Medac
- Merck
- Peqlab
- Perkin-Elmer
- Roche
- Roth
- Sigma

3.2.4 Fertige Reagenziensysteme

- BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer)
- DNA-Ligation Kit Ver. II (Takara)
- ECL[™]-Chemilumineszenz-Kit (Amersham Pharmacia)
- SuperSignal West Pico (Pierce)
- NucTrap Probe Purification Columns (Stratagene)
- Oligotex mRNA Purification System (Qiagen)
- Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Plasmid Mini Kit (Qiagen)
- Plasmid Midi Kit (Qiagen)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- Riboprobe Combination System-SP6/T7 (Promega)
- RPA III[™]-Kit (Ambion)
- BugBuster GST-Bind Purification Kit (Novagen)

3.2.5 Radioaktive Nukleotide

Folgende radiaktive Nukleotide wurden von Amersham Pharmacia bezogen:

- γ -³²P-ATP, 10 mCi/ml
- α -³²P-dCTP, 10 mCi/ml
- α -³²P-UTP, 10 mCi/ml

3.2.6 Enzyme

3.2.6.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Invitrogen
- MBI Fermentas
- New England Biolabs

3.2.6.2 Sonstige Enzyme

- Alkalische Phosphatase (New England Biolabs)
- Benzonase (Novagen)
- Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase (Invitrogen)
- Proteinase K (Roche)
- Pyrobest DNA-Polymerase (Takara)
- RNase A (Roche)
- T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)
- T4-Polynukleotidkinase (Invitrogen)
- Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs)

3.2.7 Antikörper

- Antiserum 96:
polyklonales IgY-Antiserum, das durch Immunisierung von Hühnern mit Peptiden gewonnen wurde; erkennt die "Hinge"-Region der E2 Proteine von HPV31 (Aminosäuren 58-75 von HPV31 E8^{E2C})
Verdünnung für Western-Blot: 1:2000

Käuflich erworben wurde folgender Erstantikörper:

- anti-GAL4-DBD (sc-577, Santa Cruz Biotechnology):
polyklonaler Antikörper aus Kaninchen
Verdünnung für Western-Blot: 1:2000

Käuflich erworben wurden folgende Zweitantikörper:

- Esel anti-Huhn HRPO konjugiert (Jackson):
Verdünnung für Western-Blot: 1:2500 für nukleäre Extrakte, 1:3000 für bakteriell exprimierte Proteine
- Schwein anti-Kaninchen HRPO konjugiert (DAKO):
Verdünnung für Western-Blot: 1:2500

3.2.8 Marker

3.2.8.1 DNA-Längenstandards

- 50 bp-DNA-Leiter (New England Biolabs)
- 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen)
- λ -HindIII-Fragmente (Invitrogen)

3.2.8.2 Protein-Größenstandards

- Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad)
- SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)

3.2.9 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Invitrogen oder Eurogentec synthetisiert.

Oligonukleotid	Sequenz ^a	HPV31 Nt.
E8RI-WT	CCAGACGAATTCCATGGCAATAC	1246-1268
E8RI-I3A	CCAGACGAATTCCATGGCAG <u>C</u> ACTGAAGTGG	1246-1276
E8RI-L4A	CCAGACGAATTCCATGGCAATAG <u>C</u> GAAAGTGGAAAC	1246-1280
E8RI-K5A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGG <u>C</u> GTGGAAACGC	1246-1282
E8RI-W6A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAG <u>G</u> CGAAACGC	1246-1282
E8RI-K7A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAGTGG <u>G</u> CACGC AGCAG	1246-1287
E8RI-R8A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAGTGGAAAG <u>C</u> CA GCAGATG	1246-1290
E8RI-S9A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAGTGGAAACG <u>C</u> G <u>C</u> CAGATGGTAC	1246-1294
E8RI-R10A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAGTGGAAACGCA G <u>C</u> GATGGTACAG-	1246-1296
E8RI-W11A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAGTGGAAACGCA GCAGAG <u>C</u> GTACAGCAGTG	1246-1296 [^] 3295-3299
E8RI-Y12A	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGAAGTGGAAACGCA GCAGATGG <u>G</u> CAGCAGTGAC	1246-1296 [^] 3295-3301
E8RI-KWK	CCAGACGAATTCCATGGCAATACTGG <u>C</u> GGAG <u>G</u> CACGC AGCAG	1246-1287
E8RI-d3-12	GGTTAAGAATTCCATGGCTAGTGACGAAATATCCTTTG CTGGG	3296-3319
dsE8N 1-12 for	AATTCATGGCAATACTGAAGTGGAAACGCAGCAGATG GTACGGG	1259-1294
dsE8N 1-12 rev	AATCCCGTACCATCTGCTGCGTTTCCACTTCAGTATTG CCATGG	1294-1259
dsE8N 1-21 for	AATTCATGGCAATACTGAAGTGGAAACGCAGCAGATG GTACAGCAGTGACGAAATATCCTTTGCTGGG	1259-1296 [^] 3295-3319

dsE8N 1-21 rev	AATCCCAGCAAAGGATATTTTCGTCACTGCTGTACCAT CTGCTGCGTTTCCACTTCAGTATTGCCATGG	3319-3295 ^a 1296-1259
4xGAL4-HindIII1	AGCTCGGAAGACTCTCCTCCGACGGAAGACTCTCCTC CGACGGAAGACTCTCCTCCGACGGAAGACTCTCCTCC GA	
4xGAL4-HindIII2	AGCTTCGGAGGAGAGTCTTCCGTCGGAGGAGAGTCTT CCGTCGGAGGAGAGTCTTCCGTCGGAGGAGAGTCTTC CG	
pGL31BS2,3,4- P97del-1	GCATATAC <u>CGCG</u> TTACACCGTTTTTCG	7853-7877
pGL31BS2,3,4 P97del-2	CTATGTGCTTTT <u>CTCGAG</u> CAACCGTTTTTC	82-55
HPV31-E8W6A for	GGTATGGCAATACTGAAG <u>GCG</u> AAACGCAGCAGATGGT AC	1256-1294
HPV31-E8W6A rev	GTACCATCTGCTGCGTTT <u>CGC</u> CTTCAGTATTGCCATAC C	1294-1256
HPV31-E8K7A for	CAATACTGAAGTGG <u>GAC</u> GCAGCAG	1263-1287
HPV31-E8K7A rev	CTGCTGCGT <u>GCCC</u> ACTTCAGTATTG	1287-1263
HPV31-E8KWK for	GGTATGGCAATACT <u>AGCGGAAGC</u> ACGCAGCAGATG	1256-1290
HPV31-E8KWK rev	CCTGTACCATCTGCTGCGT <u>GCTTCCGCT</u> AGTATTGCCA TACC	1297-1256

^a Oligonukleotid-Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung dargestellt. Nukleotidaustausche, die in Aminosäureaustauschen resultieren, sind unterstrichen.

3.2.10 Plasmide und Vektoren

- **pSG5:**
eukaryontes Expressionsplasmid, bei dem die Expression des inserierten Gens unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors steht (Stratagene)
- **pSG-31E1:**
von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das die kodierende Sequenz für HPV31 E1 enthält (Frattini und Laimins, 1994)
- **pSX-E2:**
von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das die kodierende Sequenz für HPV31 E2 enthält (Stubenrauch et al., 1998b)
- **pSG-E8^{E2C}:**
von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8^{E2C}, das die kodierende Region von E8^{E2C} (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) ohne die nicht-kodierende "Leader"-Sequenz (HPV31 Nt. 1212-1258) von pSG-E8^{E2C}-L enthält (Stubenrauch et al., 2001). Die Klonierung erfolgte durch eine ortsspezifische PCR-Mutagenese mit dem Oligonukleotid E8RI-WT (siehe Abschnitt 3.2.9) und einem anschließenden Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Das *EcoRI*-Fragment aus pSG-E8^{E2C}-L wurde durch das mit *EcoRI* verdaute PCR-Fragment ersetzt.
- **pSG-E8^{E2C} I3A bis Y12A und KWK:**
von pSG-E8^{E2C} abgeleitete Expressionsplasmide, in denen durch ortsspezifische PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden E8RI-I3A bis E8RI-KWK (siehe Abschnitt 3.2.9) Mutationen der Aminosäuren 3 bis 12 von E8^{E2C} zu Alanin sowie des zentralen KWK-Motivs zu AEA eingeführt wurden. Die Klonierung der Expressionsplasmide erfolgte wie bei pSG-E8^{E2C} beschrieben.
- **pSG-E8^{E2C} d3-12:**
von pSG-E8^{E2C} abgeleitetes Expressionsplasmid, dessen kodierende Sequenz für die Aminosäuren 3-12 von E8^{E2C} durch ortsspezifische PCR-Mutagenese mit dem Oligonukleotid E8RI-d3-12 (siehe Abschnitt 3.2.9) deletiert wurde. Die Klonierung erfolgte wie bei pSG-E8^{E2C} beschrieben.
- **pSG5-Sma:**
von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, in dessen *EcoRI*- und *BamHI*-Restriktionsstellen ein doppelsträngiges Oligonukleotid (Sequenzen: 5'-AATCCCGGG-3' und 5'-GATCCCGGG-3') mit einer zusätzlichen *SmaI*-Restriktionsstelle kloniert wurde.

- **pSG-GAL4:**
von pSG5-*Sma* abgeleitetes Expressionsplasmid, in dessen *Bam*HI- und *Bgl*II-Restriktionsstellen die PCR-amplifizierte GAL4-DBD (Aminosäuren 1-147) aus pM (Clontech) eingefügt wurde
- **pSG-E8(1-12)-GAL4, pSG-E8^{E2C}(1-21)-GAL4, pSG-E8^{E2C}(1-37)-GAL4 und pSG-E8^{E2C}(1-37) KWK-GAL4:**
von pSG-GAL4 abgeleitete Expressionsplasmide, in deren *Eco*RI-Restriktionsstelle doppelsträngige Oligonukleotide mit der kodierenden Sequenz für die Aminosäuren 1-12 bzw. 1-21 (dsE8N 1-12 bzw. dsE8N 1-21; siehe Abschnitt 3.2.9) oder die *Eco*RI-Restriktionsfragmente (Aminosäuren 1-37) aus E8^{E2C} bzw. E8^{E2C} KWK inseriert wurden
- **pGL31URR:**
ein von pGL3-Basic (Promega) abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, in dessen *Mlu*I-*Xho*I Restriktionsstellen die komplette regulatorische Region von HPV31 mit dem frühen Promotor P97 (HPV31 Nt. 7068-106) eingeführt wurde (Stubenrauch et al., 1998b)
- **pGL31URR BS4MT, pGL31URR BS3,4MT und pGL31URR BS2,3,4MT:**
von pGL31URR abgeleitete Luziferase-Reporterplasmide, in denen die bei Stubenrauch et al. (1998b) beschriebenen Mutationen der E2BS2, 3 und 4 von HPV31 durch "overlap extension"-PCR (Higuchi et al., 1988) eingeführt wurden. Die mit *Bst*XI und *Hind*III verdauten PCR-Produkte wurden benutzt, um das *Bst*XI-*Hind*III-Fragment von pGL31URR zu ersetzen.
- **pGL31URR BS1,3,4MT und pGL31URR BS1,2,3,4MT:**
von pGL31URR BS3,4MT bzw. pGL31URR BS2,3,4MT abgeleitete Luziferase-Reporterplasmide mit einer zusätzlichen Mutation der E2BS1. Die Klonierung erfolgte durch die Insertion des *Rsr*II-*Spe*I-Fragments mit der mutierten E2BS1 aus pHPV31-BS1 (Stubenrauch et al., 1998a) in die entsprechend verdauten Ausgangsplasmide.
- **6aNCR-P1*P2-luc:**
ein Luziferase-Reporterplasmid, das die gesamte regulatorische Region von HPV6a (HPV6a Nt. 7139-446) mit einer Mutation der TATA-Box des P1 Promotors enthält (Rapp et al., 1997)

- **6aNCR-P1*P2-BS1MT-luc, 6aNCR-P1*P2-BS2MT-luc, 6aNCR-P1*P2-BS1,2MT-luc, 6aNCR-P1*P2-BS3,4MT-luc, 6aNCR-P1*P2-BS2,3,4MT-luc und 6aNCR-P1*P2-BS1,2,3,4MT-luc:**
von 6aNCR-P1*P2-luc abgeleitete Luziferase-Reporterplasmide mit verschiedenen Punktmutationen der E2BS1 bis 4, die den bei Rapp et al. (1997) beschriebenen Mutationen entsprechen. Die Klonierung der Plasmide wurde bei Stubenrauch et al. (2001) beschrieben.
- **p6XE2BS-luc:**
ein von pGL3-Promotor (Promega) abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, das drei Kopien der E2BS3 und 4 von HPV31 enthält (Stubenrauch et al., 1998b)
- **pC18-SP1-luc:**
ein von dem Luziferase-Reporterplasmid pAluc (Dong et al., 1994) abgeleitetes Plasmid, das vier synthetische E2BS (*HindIII-BamHI* inseriert) und zwei synthetische SP1-Bindungsstellen (*BamHI* inseriert) 5' von der TATA-Box und dem Initiator-Element des späten Adenovirus Hauptpromotors enthält (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Steger, Köln)
- **pC18-luc:**
ein von pC18-SP1-luc abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, dessen SP1-Bindungsstellen durch einen *BamHI*-Restriktionsverdau deletiert wurden
- **pML44-luc:**
ein von pC18-luc abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, dessen E2BS über einen *HindIII-BamHI*-Restriktionsverdau mit anschließender Klenow-Auffüllreaktion deletiert wurden
- **pBR322.HPV31:**
ein auf pBR322 basierender Vektor, in dessen *EcoRI*-Restriktionsstelle das gesamte HPV31-Genom inseriert wurde (Stubenrauch et al., 2000)
- **pHPV31-E8ATG:**
ein auf pBR322.HPV31 basierender Vektor, dessen Startkodon für E8^{E2C} (HPV31 Nt. 1259) durch eine Punktmutation inaktiviert wurde (Stubenrauch et al., 2000)
- **pHPV31-E8W6A, pHPV31-E8K7A und pHPV31-E8KWK:**
auf pBR322.HPV31 basierende Vektoren mit Punktmutationen der entsprechenden Aminosäuren von E8^{E2C} zu Alanin bzw. AEA. Die beschriebenen Mutationen wurden durch "overlap extension"-PCR mit den Oligonukleotiden HPV31-E8W6A, -K7A bzw. -KWK for/rev (siehe Abschnitt 3.2.9) in das HPV31 WT-Genom eingeführt.

Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *Ban*II und *Swa*I verdaut und in das entsprechend verdaute Plasmid pBR322.HPV31 inseriert.

- **pHPV31-E8W6A/ATG, pHPV31-E8K7A/ATG und pHPV31-E8KWK/ATG:**
auf pBR322.HPV31 basierende Vektoren mit den im vorigen Punkt beschriebenen Punktmutationen der entsprechenden Aminosäuren zu Alanin bzw. AEA sowie der bei Stubenrauch et al. (2000) beschriebenen Inaktivierung des Startkodons von E8^{E2C}. Die Klonierung erfolgte wie im vorigen Punkt dargestellt.
- **pHPV31-E1N-TTL:**
ein auf pBR322.HPV31 basierender Vektor, in dessen E1 Gen ein Stop-Kodon bei HPV31 Nt. 1039 eingeführt wurde (Stubenrauch et al., 1998a)
- **pHPV31-E1N-TTL-E8ATG, pHPV31-E1N-TTL-E8W6A und pHPV31-E1N-TTL-E8KWK:**
auf pHPV31-E1N-TTL basierende Vektoren mit den oben beschriebenen Punktmutationen der entsprechenden Aminosäuren von E8^{E2C} zu Alanin bzw. AEA. Die beschriebenen Mutationen wurden durch "overlap extension"-PCR (Oligonukleotide HPV31-E8W6A, -K7A bzw. -KWK for/rev) in das HPV31 E1N-TTL-Genom eingeführt. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *Ban*II und *Swa*I verdaut und in das entsprechend verdaute Plasmid pHPV31-E1N-TTL inseriert.
- **pM:**
eukaryonter Expressionsvektor, der die GAL4-DBD enthält (Clontech)
- **pGL31URR-4xGAL4:**
ein von pGL31URR abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, in dessen *Hind*III-Restriktionsstelle ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit vier GAL4-Bindungsstellen (4xGAL4-*Hind*III, siehe Abschnitt 3.2.9) inseriert wurde
- **pGL31BS2,3,4-4xGAL4:**
ein von pGL31URR-4xGAL4 abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, dessen E2BS1, "Enhancer"-Element und P97 Promotor deletiert wurden. Die Klonierung erfolgte durch eine PCR-Amplifikation der HPV31 Nt. 7877-78 mit den Oligonukleotiden pGL31BS2,3,4-P97del-1 und pGL31BS2,3,4-P97del-2 (siehe Abschnitt 3.2.9), einen anschließenden *Mlu*I-*Xho*I-Restriktionsverdau des PCR-Fragments sowie der Insertion des *Mlu*-*Xho*I-Fragments in den entsprechend verdauten Vektor pGL31URR-4xGAL4.

- **pMEP4:**
eukaryonter, induzierbarer Expressionsvektor mit dem gesamten Latenzreplikationsursprung oriP des Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie einem offenen Leserahmen für das EBV EBNA-1 Protein (Invitrogen)
- **p1553:**
ein von pCR-Blunt abgeleitetes Expressionsplasmid, das die gesamte kodierende Sequenz für das EBNA1 Protein von EBV enthält (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bill Sugden, Madison, USA)
- **pGL3-oriP-4xGAL4:**
ein von pGL31URR-4xGAL4 abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, dessen HPV31 Replikationsursprung durch den Epstein-Barr-Virus (EBV) oriP ersetzt wurde. Der gesamte EBV oriP wurde durch einen *AccI-XbaI*-Restriktionsverdau aus pMEP4 (Invitrogen) entfernt, die Enden durch das Klenow-Fragment von *E. coli* DNA-Polymerase I aufgefüllt und in das *MluI-XhoI* verdaute und aufgefüllte Plasmid pGL31URR-4xGAL4 inseriert. Die Orientierung des DS-Elements von oriP in pGL3-oriP-4xGAL4 lag 3', das FR-Element 5'.
- **pRP-P742:**
ein von pcDNAII (Stratagene) abgeleitetes Plasmid, dessen *BamHI* Restriktionsstelle die durch PCR amplifizierte Region von HPV31 Nt. 678-919 mit dem späten Promotor P742 enthält (Stubenrauch et al., 1998a)
- **pET-34b(+):**
ein IPTG-induzierbarer, bakterieller Expressionsvektor, der die Expression und Aufreinigung von CBD-Fusionsproteinen ermöglicht (Novagen)
- **pET-42b(+):**
ein IPTG-induzierbarer, bakterieller Expressionsvektor, der die Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen ermöglicht (Novagen)
- **pET42T:**
ein von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, dessen S-Tag und Faktor Xa Protease-Schnittstelle durch die Insertion eines doppelsträngigen Oligonukleotids (Sequenzen: 5'-GGGTCTGGTGCCACGCGGTTC-3' und 5'-CATGGAACCGCGTGGCACCAGAC CCGC-3') in die *SacII*- und *NcoI*-Restriktionsstellen deletiert wurden
- **pET34T-E8^ΔE2C:**
ein von pET-34b(+) abgeleitetes Plasmid, das die gesamte kodierende Sequenz für HPV31 E8^ΔE2C enthält. Die Klonierung erfolgte durch Insertion des *NcoI-BamHI*-

Restriktionsfragments aus pSG-E8^{E2C} in das entsprechend verdaute Plasmid pET34b(+).

- **pET42T-E8^{E2C}:**

ein von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, das die gesamte kodierende Sequenz für HPV31 E8^{E2C} enthält. Die Klonierung erfolgte durch Insertion des *NcoI-BamHI*-Restriktionsfragments aus pSG-E8^{E2C} in das entsprechend verdaute Plasmid pET42T.

3.2.11 Sonstige Nukleinsäuren

- Poly(dI-dC)Poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia)

3.2.12 Bakterienstämme

- E. coli DH5 α (Clontech)
- E. coli BL21(DE3) pLysS (Novagen)

3.2.13 Eukaryonte Zellen

- HeLa: HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey et al., 1952)
- Humane primäre Keratinozyten (HPK): Isolate aus Vorhäuten (Ruesch et al., 1998)
- NIH3T3-J2: murine Fibroblasten-Zelllinie (Rheinwald und Green, 1975)
- RTS3b: HPV-negative Hautkarzinom-Zelllinie (Purdie et al., 1993)
- SCC13: HPV-negative Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Rheinwald und Beckett, 1981)
- Phoenix: retrovirale Verpackungszelllinie, basierend auf 293

3.2.14 Medien für Bakterienkultur

- LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 20g LB Broth Base (Invitrogen) auf 1 Liter H₂O
- SOC-Medium: 2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose
- LB-Agar (Luria-Bertani-Agar): 32 g Lennox L Agar (Invitrogen) auf 1 Liter H₂O
- Einfriermedium: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO₄, 50 % (v/v) Glycerin

3.2.15 Medien für Zellkultur

- KGM: Keratinocyte Growth Medium (Clonetics) für HPK
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium + 50 mg/l Gentamycin (Invitrogen)
 - mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS; Seromed) für HeLa und Phoenix
 - mit 10 % Kalbsserum (CS; Invitrogen) für NIH3T3-J2
- E-Medium: Adenin ($1,8 \times 10^{-3}$ M), Hydrocortison (417 $\mu\text{g/ml}$), Insulin (50 $\mu\text{g/ml}$), Transferrin (50 $\mu\text{g/ml}$), T_3 (2×10^{-11} M), Cholera toxin (1×10^{-8} M), 50 % DMEM Pulver, 50 % DMEM/Ham's F12 1:1 Pulver, 3,07 mg/ml NaHCO_3 , 0,41 $\mu\text{l/ml}$ HCl konz., 10 $\mu\text{l/ml}$ Penicillin/Streptomycin
 - mit 5 % definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; HyClone) für SCC13
 - mit 5 % HC-FKS und 5 ng/ml EGF für transiente Replikationen mit HPK
 - mit 10 % FKS für RTS3b
- OptiMEM (Invitrogen): Serum- und Antibiotika-freies Medium für Transfektionen
- Trypsin-EDTA (Invitrogen): 0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung A

3.2.16 Häufig benutzte Medien und Puffer

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,2
- 50x TAE Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA
- 10x TBE Puffer: 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA
- 1x TBS Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl
- 1x TE Puffer pH 7,5: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
- 5x DNA-Ladepuffer: 50 % (v/v) Glycerol, 25 mM EDTA, 0,25 % (v/v) Bromphenolblau
- 5x SDS-Probenpuffer: 10 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 312,5 mM Tris/HCl pH 6,8
- 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat x 2 H_2O , pH 7,0 mit HCl
- 20x SSPE pH 7,4: 3 M NaCl, 0,2 M NaH_2PO_4 , 0,02 M EDTA

3.3 Methoden

3.3.1 Mikrobiologische Methoden

3.3.1.1 Kulturen für Plasmidisolierungen

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 α verwendet. Die in dieser Arbeit benutzten Plasmid-Konstrukte enthielten entweder ein Ampicillin- oder ein Kanamycin-Resistenzgen. Die Selektion plasmidhaltiger Stämme erfolgte daher auf LB-Agar-Platten bzw. in LB-Flüssigmedium mit einem Zusatz von 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. 3 ml Übernachtskulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum dienten zur Isolation kleiner DNA-Mengen (Mini-Präp) sowie als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen. Zur Extraktion größerer DNA-Mengen wurden 150 ml (Midi-Präp) oder 300 ml (Maxi-Präp) des entsprechenden LB-Mediums mit jeweils 50 μl einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C 16-18 h im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Langzeit-Lagerung wurden 500 μl Bakteriensuspension mit 500 μl Bakterien-Einfriermedium versetzt und bei -80°C eingefroren.

3.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Die Fähigkeit zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA (Kompetenz) von *E. coli* wurde durch eine Behandlung mit CaCl_2 , RbCl_2 und MnCl_2 erreicht (Ausubel et al., 1990). Die Transformation kompetenter Bakterien erfolgte durch eine Hitzeschock-Behandlung. Dazu wurden 90 μl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10 μl Ligationsansatz oder verdünnter Plasmid-DNA gemischt und 10 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (1 min. bei 42°C) wurde der Ansatz 1 min. auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900 μl SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension 30-60 min. bei 37°C geschüttelt. Je 50-200 μl des Transformationsansatzes wurden auf Antibiotika-haltige Agar-Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden in Übernachtskulturen vermehrt und auf rekombinante DNA untersucht.

3.3.2 DNA-Methoden

3.3.2.1 Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen, die bei Ausubel et al. (1990) beschrieben sind, durchgeführt:

- Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform
- Ethanolfällung von DNA und RNA
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten
- Erzeugung glatter Enden ("blunt ends") mittels des Klenow-Fragments der E. coli DNA-Polymerase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

3.3.2.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in verschiedenen Größenordnungen erfolgte mit "Plasmid Mini-", "Midi-" oder "Maxi-Kits" (QIAGEN) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 50-300 µl H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf BioPhotometer) bestimmt.

3.3.2.3 Fragmentelution aus Agarosegelen

Die Elution und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden unter UV-Licht mit Hilfe des "Qiaquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers.

3.3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren erfolgte mit dem DNA-Ligation-Kit Ver. II (Takara) nach den Angaben des Herstellers.

Die Religation von HPV31-Genomen erfolgte mit *EcoRI*-linearisierten pBR322.HPV31 oder pHPV31 Plasmiden. Zur Förderung der intramolekularen Religation wurde der Ligationsansatz auf eine DNA-Konzentration von 10 µg/ml eingestellt. Die Religation erfolgte mit 4 µg linearisierter Plasmid-DNA, 1 U T4 DNA-Ligase und T4 DNA-Ligase-Puffer (1x; 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA) über Nacht bei 16°C. Anschließend wurde die religierte DNA durch eine Ethanol-fällung konzentriert und in 20 µl sterilem TE Puffer resuspendiert. Die Ligationseffizienz wurde mit einem 0,8 %-igen analytischen Agarosegel kontrolliert. Die religierten HPV31 Genome wurden direkt für transiente Replikationsanalysen eingesetzt.

3.3.2.5 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Doppelsträngige Oligonukleotide wurden aus den entsprechenden komplementären einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt. Jeweils 10 µg der einzelsträngigen Oligonukleotide wurden mit 50 mM NaCl in einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgenommen und in der PCR-Maschine denaturiert (3 min, 100°C). Zur Hybridisierung der komplementären Oligonukleotidstränge wurde der Ansatz in der PCR-Maschine langsam auf RT abgekühlt.

3.3.2.6 Ortsspezifische PCR-Mutagenese

Punktmutationen wurden auf zwei unterschiedliche Methoden mittels ortsspezifischer PCR-Mutagenese eingeführt.

Eine schnelle, Ein-Schritt-Methode wurde unter anderem für die "Alanin-Scanning"-Mutagenese von pSG-E8^AE2C eingesetzt. Mit dieser Methode wurden auch zusätzliche Restriktionsstellen zur Selektion der mutierten PCR-Produkte eingeführt. Der Reaktionsansatz enthielt neben der Matrizen-DNA ein Oligonukleotid mit der gewünschten Mutation und Restriktionsstellen zur Klonierung und zur Selektion positiver Bakterienklone sowie einen zweiten Primer zur Amplifikation des mutierten PCR-Fragments. Zur Vermeidung zusätzlicher, unerwünschter Mutationen wurde eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität eingesetzt (Vent oder Pyrobest DNA-Polymerase). Nach einer initialen Denaturierung (4 min., 96°C) bestand ein Zyklus aus einer Denaturierung (30 sec., 96°C), gefolgt von einer Hybridisierung (30 sec., 52°C) (abhängig vom Schmelzpunkt des Primers) und einer Elongationsphase (1 min., 72°C). Nach 25 Amplifikationszyklen wurden die PCR-Fragmente der erwarteten Größe über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt, mit

den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in die gewünschten Vektor-Plasmide kloniert.

Bei der zweiten Methode wurden Punktmutationen mit Hilfe dreier kombinierter PCR-Reaktionen eingeführt ("overlap extension"-PCR; Higuchi et al., 1988). Auf diese Weise wurden Punktmutationen in die regulatorische Region sowie das Gesamt-Genom von HPV31 eingeführt. In zwei parallelen Ansätzen mit gleicher DNA-Matrize, aber verschiedenen Mutagenese- und Amplifikations-Primern, wurden überlappende PCR-Fragmente hergestellt. Der Überlappungsbereich wurde durch die Verwendung von zueinander komplementären "inneren" Primern erzeugt, von denen je einer in den beiden PCR-Ansätzen eingesetzt wurde. Diese "inneren" Primer enthielten die gewünschten Nukleotidsubstitutionen. Die PCR wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei der Ein-Schritt-Methode durchgeführt. Die Fragmente der erwarteten Größe wurden über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und Aliquots etwa gleicher DNA-Menge gemischt. Der Überlappungsbereich in der Sequenz der beiden Fragmente erlaubte eine Hybridisierung in dieser Region, wobei das Duplex-Fragment anschließend durch die Polymerase zum Doppelstrang ergänzt wurde. Die Amplifikation des resultierenden Fragments wurde mit den flankierenden "äußeren" Primern unter den identischen PCR-Bedingungen durchgeführt. Das Amplifikat wurde über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und in den präparierten Vektor kloniert.

Alle Mutanten wurden anschließend durch DNA-Sequenzierung überprüft.

3.3.2.7 Sequenzierung von DNA

Sequenzanalysen rekombinanter Plasmid-DNA wurden nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode (Sanger et al., 1977) mit dem "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin-Elmer) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in einer PCR in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Durch die Kopplung der unterschiedlichen Basen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konnte die Sequenzierreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden. Ein µg Plasmid-DNA wurde mit 50 ng des entsprechenden Sequenzierprimers und 2 µl "BigDye Reaction Mix" in einem Gesamtvolumen von 10 µl vereint. Die Reaktion wurde in einer PCR-Maschine durchgeführt und bestand aus 30 Amplifikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (96°C, 10 sec.), Primer-Hybridisierung (50°C, 5 sec.) und Elongation (60°C, 4 min.). Nach der Amplifikation erfolgte die Präzipitation der PCR-Produkte mit 1/10 Vol.

3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Vol. 100 % Ethanol. Die resultierenden Pellets wurden in 20 μ l "Template Suppression Reagent" (TSR, Perkin-Elmer) resuspendiert und erhitzt (2 min., 90°C). Anschließend wurde die Nukleotidabfolge durch Anregung der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide in einem "ABI Prism 310 Genetic Analyser" (Perkin-Elmer) bestimmt.

3.3.2.8 Radioaktive 5'-Endmarkierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Für Gelretardationsanalysen mit DNA-bindenden Proteinen wurden doppelsträngige Oligonukleotide mittels γ -³²P-ATP 5'-endmarkiert. Die 5'-Endmarkierung erfolgte mit dem Enzym Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4, das den Transfer des N-terminalen γ -Phosphats von ATP auf das freie 5'-OH-Ende der DNA katalysiert. Zweihundert ng doppelsträngiges Oligonukleotid wurden mit 50 μ Ci γ -³²P-ATP, 10 U T4-Polynukleotidkinase und dem dazugehörigen "Forward"-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ l radioaktiv markiert (30 min., 37°C). Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotids von freiem γ -³²P-ATP erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (NucTrap Probe Purification Columns, Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Aktivität des aufgereinigten Oligonukleotids wurde mit einem Szintillationszähler gemessen.

3.3.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase I und α -³²P-dCTP. Für die Hybridisierung mit HPV31-Genomen diente das gesamte, mit *EcoRI* linearisierte HPV31-WT-Genom aus pBR322.HPV31 als Matrize. Die Hybridisierung von Plasmiden, die auf pGL31URR basierten, erfolgte mit dem *KpnI-SphI*-Restriktionsfragment aus pGL31URR. Das pGL3-oriP-4xGAL4 Plasmid wurde mit dem *SpeI-EcoRV*-Fragment aus pMEP4 hybridisiert.

Die linearisierte DNA (20 bis 40 ng des Fragments) wurde 10 min. bei 95°C denaturiert, 1 min. auf Eis abgekühlt und anschließend mit Hilfe des "DNA Labelling Kits" (Amersham Pharmacia) nach den Anweisungen des Herstellers radioaktiv markiert. Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotids von freiem α -³²P-dCTP erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (NucTrap Probe Purification Columns, Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Aktivität der aufgereinigten DNA-Sonde wurde mit einem Szintillationszähler gemessen.

3.3.2.10 Isolation von niedermolekulargewichtiger DNA nach Hirt

Die Isolation replizierter, niedermolekulargewichtiger DNA aus transfizierten Säugerzellen erfolgte nach der Methode von Hirt (1967). Die Fällung der Hirt-DNA erfolgte mit 0,7 Vol. Isopropanol bei 4°C (1h, 14000 rpm). Die Pellets wurden zweimal mit 1,5 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl 0,1x TE pH 7,5 mit 50 µg/ml RNase resuspendiert. Die Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 5 U *DpnI* und 15 U *NcoI* (HPV31 Replikationsursprung-Reporterkonstrukte), *HpaI* (HPV31-Genome) oder *EcoRV* (oriP-Replikation) für 5 h bei 37°C verdaut und im Southern-Blot analysiert.

3.3.2.11 DNA-Transfer nach Southern (Southern-Blot-Analyse)

Der Transfer von DNA-Fragmenten auf eine positiv geladene Nylonmembran erfolgte nach der Methode von Southern (Ausubel et al., 1990). Als Transferpuffer diente NaOH, die gleichzeitig zur Denaturierung und zur Fixierung der DNA auf der Membran beitrug.

Jeweils 15 µl der linearisierten DNA-Proben wurden auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetragen und bei 65 V über Nacht aufgetrennt. Als Längenstandards dienten λ -*HindIII*-DNA sowie 100 pg der entsprechenden linearisierten Plasmid-DNA. Am folgenden Tag wurde das Gel mit einem Lineal fotografiert, in 0,25 M HCl depurinert und anschliessend oberhalb der 23 kb Markerbande und 13 cm unterhalb mit einem Skalpell geschnitten, um überschüssige Gelreste außerhalb des Bereichs der replizierten DNA zu entfernen. Der Transfer der DNA auf eine GeneScreenPlus-Nylonmembran erfolgte mit 0,4 M NaOH für 5 h wie von Southern beschrieben. Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran einmal mit 2x SSC gewaschen und in einem Hybridisierungssofen zur Fixierung der DNA getrocknet (30 min., 50-60°C). Die Membran konnte anschliessend bei RT aufbewahrt oder direkt zur Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde eingesetzt werden.

3.3.2.12 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Sonden

Die Hybridisierungslösung (4x SSPE, 4x Denhardt's Lösung, 10 % Dextransulfat, 50 % Formamid, 1 % SDS) wurde auf 42°C vorgewärmt. Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit den zu untersuchenden DNA-Proben in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml Hybridisierungslösung sowie 200 µl hitzedenaturierter (15 min. 95°C, 10 min. auf Eis) Lachssperma-DNA versetzt und für 1 h im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die radioaktive Markierung der Sonde. 10^7 cpm der Sonde wurden mit

200 µl Lachssperma-DNA denaturiert (15 min., 95°C) und 10 min. auf Eis gekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und durch 10 ml Hybridisierungslösung mit der denaturierten Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt, die Membran mit 50 ml Lösung A (2x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen und in eine Wanne mit 500 ml Lösung A überführt. Das Dextran-sulfat wurde mechanisch mit den Fingern entfernt und die Membran 15 min. bei RT auf einem Taumler bewegt. Danach wurde die Membran auf dem Taumler zweimal 15 min. in jeweils 500 ml Lösung B (0,1x SSC, 0,1 % SDS) bei RT und zweimal 30 min. in einem Wasserbad bei 50°C mit jeweils 500 ml Lösung C (0,1x SSC, 1 % SDS) gewaschen. Abschließend wurde die Membran nochmals kurz in 2x SSC gewaschen, um überschüssiges SDS zu entfernen, und kurz auf Gel-Blotting-Papier getrocknet. Die Detektion der hybridisierten Sonde erfolgte mit dem Phosphoimager.

3.3.3 Zellkultur-Methoden

3.3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen

Humane primäre Keratinozyten (HPK), HeLa, NIH3T3-J2, Phoenix, RTS3b und SCC13 Zellen wurden als "Monolayer"-Kultur bei 37°C, 5 % CO₂ und humidifizierter Atmosphäre in Plastik-Gewebekulturschalen kultiviert. Die Kultivierung von HPK erfolgte in serumfreiem KGM-Medium. Zum Teilen konfluenten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-Lösung gewaschen. Durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 8 ml serumhaltigem Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % CS oder FKS und Gentamycin) inaktiviert und die Zellen nach der Aufnahme und Vereinzeln in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 20°C abzentrifugiert (5 min., 250x g). Anschliessend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml KGM resuspendiert. HPK wurden maximal im Verhältnis 1:5 geteilt und bis zu Passage 5 weiter kultiviert. HeLa und Phoenix Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS und Gentamicin kultiviert. Zum Teilen konfluenten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst. Anschliessend wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml DMEM/10 % FKS inaktiviert, die Zellen aufgenommen und vereinzelt. HeLa-Zellen wurden maximal im Verhältnis 1:10 geteilt und weiter kultiviert. Phoenix-Zellen wurden im

Verhältnis 1:30 geteilt und weiter kultiviert. NIH3T3-J2 wurden in DMEM mit 10 % CS und Gentamicin kultiviert. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in DMEM/10 % CS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:5 geteilt. NIH3T3-J2 wurden bis Passage 25 in Kultur gehalten. RTS3b Zellen wurden in E-Medium mit 10 % FKS kultiviert. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in E-Medium/10 % FKS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:8 geteilt. SCC13-Zellen wurden in E-Medium mit 5 % HC-FKS auf einer "Feeder"-Zellschicht von Mitomycin C behandelten NIH3T3-J2 Fibroblasten gehalten. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in E-Medium/5 % HC-FKS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:8 geteilt.

3.3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die primären Keratinozyten oder Zelllinien von einer 10 cm Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums bei RT zentrifugiert (5 min., 250x g). Das Zellpellet wurde in 3 ml kaltem Einfriermedium (HPK: KGM mit 10 % HC-FKS und 20 % Glycerin; SCC13 und RTS3b: E-Medium mit 15 % HC-FKS und 20 % Glycerin; Hela: DMEM mit 20 % FKS und 10 % DMSO; NIH3T3-J2: DMEM mit 20 % CS und 10 % DMSO) resuspendiert und auf 3 Einfrierampullen verteilt, die zunächst in einer Einfrierbox auf -80°C eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die Zellen auf -196°C gebracht.

Für das Auftauen der Zellen wurde der Inhalt der Einfrierampulle mit 1 ml Medium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml äquilibriertem Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.3.3.3 Mitomycin C-Behandlung von NIH3T3-J2 Zellen

NIH3T3-J2 Zellen wurden zur Aussaat als "Feeder"-Zellschicht mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt. Das Zellkulturmedium einer konfluenten 10 cm-Schale wurde durch 5 ml frisches DMEM/10 % CS ersetzt. Daraufhin wurden 100 μl Mitomycin C (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS; Medac) in das Medium gegeben, die Platte geschwenkt und 1 h im Brutschrank inkubiert. Die arretierten Zellen wurden 3x mit je 10 ml sterilem PBS gewaschen und als "Feeder"-Zellen benutzt.

3.3.3.4 Transfektion von Humanzellen mit Liposomen

Die Transfektion von Humanzellen erfolgte mit dem kationischen Liposomenbildner Lipofectamine (Invitrogen). Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion geteilt und in Plastik-Gewebekulturschalen ausgesät (Zelldichte bei Aussaat: $1,5 \times 10^5$ pro 35 mm-Schale, 5×10^5 pro 60 mm-Schale, $1,5 \times 10^6$ pro 100 mm-Schale). Eine Stunde vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Zellkulturmedium. Die zu transfizierenden DNA's wurden gegebenenfalls in sterilem TE pH 7,5 verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden zwei sterile PS-Röhrchen mit jeweils 100 μ l OptiMEM (35 mm-Schale; 250 μ l für 60 mm; 500 μ l für 100 mm) vorbereitet. In das erste Röhrchen wurde die DNA in der entsprechenden Menge (siehe Legenden der Abb.), in das zweite Röhrchen 5 μ l Lipofectamine (35 mm-Schale; 15 μ l für 60 mm; 40 μ l für 100 mm) pipettiert. Nach der Vorbereitung aller Ansätze wurde das Liposomengemisch zum DNA-Gemisch gegeben, nochmals durchmischt und 30 min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen 2x mit OptiMEM gewaschen. Nach der Inkubationszeit wurde das Gesamtvolumen der Transfektion durch Zugabe von OptiMEM auf 1 ml erhöht (35 mm-Schale; 3 ml für 60 mm, 6 ml für 100 mm) und das Liposomengemisch zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun mit den Liposomen für 5 h im Brutschrank inkubiert. Anschliessend wurde die gleiche Menge des normalen Zellkulturmediums mit der doppelten Serumkonzentration zu den Zellen gegeben (bei HPK: nur KGM). Etwa 18 bis 20 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden je nach Anwendung weiter inkubiert oder auf 100 mm-Schalen ausgesät.

3.3.3.5 Luziferase-Reporteranalyse

Die transkriptionelle Aktivität von Promotorkonstrukten wurde indirekt durch die Expression des Luziferase-Reportergens bestimmt. Je $1,5 \times 10^5$ Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf einer 6x35 mm-Zellkulturplatte ausgesät und am folgenden Tag mit den entsprechenden DNA-Mengen (siehe Legenden der Abbildungen) transfiziert. Luziferase-Reporteranalysen wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und mit 150 μ l kaltem Lysepuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$), 1 % Triton X-100, 1 mM DTT) pro 35 mm Schale lysiert. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäss überführt und 5 min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Anschliessend wurden 20-80 μ l Zellextrakt zu 100 μ l Assay-

Puffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8, 15 mM MgSO₄, 5 mM ATP) gegeben und die Luziferase-Aktivität sofort im Luminometer vermessen.

Jedes Experiment wurde zur Ermittlung der durchschnittlichen relativen Luziferase-Aktivität mindestens 3-fach wiederholt.

3.3.3.6 Transiente Replikation von HPV31-Replikationsursprung-Reporterkonstrukten

Die transiente Replikation des HPV31-Replikationsursprungs wurde in SCC13-Keratinocyten untersucht. Je 5×10^5 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf eine 60 mm-Schale ausgesät und am folgenden Tag mit den entsprechenden DNA-Mengen (siehe Legenden der Abbildungen) transfiziert. Transfizierte Zellen wurden 18-21 h nach der Transfektion mit 1 ml Trypsin von der 60 mm-Schale abgelöst und auf eine 100 mm-Schale mit Mitomycin C-behandelten "Feeder"-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden anschliessend für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Niedermolekulargewichtige DNA wurde nach der Methode von Hirt isoliert.

3.3.3.7 Transiente Replikation von HPV31-Genomen

Die transiente Replikation von HPV31-Genomen wurde nach der Transfektion in primäre Keratinocyten untersucht. Je 5×10^5 HPK wurden am Tag vor der Transfektion auf eine 60 mm-Schale ausgesät und am folgenden Tag mit je 4 µg religierter Virusgenome transfiziert. Die Zellen wurden 18-21 h nach der Transfektion mit 1 ml Trypsin von der 60 mm-Schale abgelöst, nach Zugabe von 4 ml E-Medium/5 % HC-FKS/EGF aufgenommen und auf eine 100 mm-Schale mit Mitomycin C-behandelten NIH3T3-J2 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden für weitere 72 h im Brutschrank inkubiert. Niedermolekulargewichtige DNA wurde nach der Methode von Hirt isoliert.

3.3.4 RNA-Methoden

3.3.4.1 RNase-Protektionsanalyse

Die Regulation der viralen Promotoren P97 und P742 wurde im gesamtgenomischen Kontext von HPV31 mittels RNase-Protektionsanalysen untersucht.

Je 6 µg religierte gesamtgenomische HPV31 DNA wurden auf 100 mm-Schalen in $1,5 \times 10^6$ HPK transfiziert. Nach 24 h wurde die Gesamt-RNA Isolation mit Trizol Reagenz (Invitrogen)

nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Aus der Gesamt-RNA erfolgte eine polyA+-RNA-Selektion mit dem Oligotex mRNA Aufreinigungs-Kit (Qiagen) laut Protokoll des Herstellers. Die Aufreinigung erfolgte hierbei nach dem Miniprep-Protokoll mit 15 µl Oligotex-Suspension. Die Elution der polyA+-RNA erfolgte in zwei Mal 20 µl OEB-Puffer. Die Konzentration der polyA+-RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Gegenstrang-RNA-Sonden wurden mit dem Riboprobe Combination System-SP6/T7 (Promega) nach den Anweisungen des Herstellers synthetisiert. Zur Detektion von P97 und P742-Transkripten wurde Plasmid pRP-P742 als "Template" eingesetzt. Die Gegenstrang-Sonde wurde mittels SP6-RNA-Polymerase aus 1 µg *SpeI*-linearisierter, aufgereinigter Plasmid-DNA hergestellt und mit 50 µCi α -³²P-UTP markiert. Anschliessend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 U RNase-freier DNase 15 min. bei 37°C verdaut. Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde einmal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Die Fällung der Sonde erfolgte mit 400 mM LiCl und 2,5 Vol. 100 % Ethanol (30 min. bei 20000x g, 4°C). Das Pellet wurde einmal mit 75 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurde das RNA-Pellet in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert und im Szintillationszähler gemessen. Die Integrität der Sonde wurde mit einem 5 %-igen Harnstoff-Minigel analysiert. Zwei µl der Sonde wurden in 8 µl Gel-Ladepuffer (RPA III™-Kit, Ambion) resuspendiert, 5 min. bei 80°C erhitzt und 30 min. bei 25 mA in 1x TBE auf dem Harnstoffgel aufgetrennt. Das Gel wurde im Phosphoimager analysiert.

Die RNase-Protektionsanalyse wurde mit dem RPA III™-Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Eingesetzt wurden 2 µg polyA+-RNA bzw. 5 µg Hefe-Gesamt-RNA als Negativkontrolle. Die RNA-Proben wurden mit 100000 cpm der Sonde gemischt und wie vorgeschrieben copräzipitiert und hybridisiert. Der RNase-Verdau erfolgte mit einem 1:300 verdünnten RNase A/RNase T1-Gemisch. Die verdauten RNA-Proben wurden auf ein 5 %-iges Harnstoffgel (2,8 g Harnstoff, 830 µl 40 % Acrylamid (19:1), 1340 µl 5x TBE, 3 µl TEMED, 33 µl 10 % AMPS, 2127 µl H₂O) aufgetragen und 1,5 h bei 25 mA in 1x TBE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und im Phosphoimager ausgewertet.

3.3.5 Protein-Methoden

3.3.5.1 Bakterielle Proteinexpression

Die Expression von GST- und CBD-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Bakterien erfolgte mit dem pET-Expressionssystem (Novagen). Das pET-System mit den in dieser

Arbeit benutzten Vektoren pET34b(+) (Fusion mit der Zellulose-Bindungsdomäne, CBD) und pET42b(+) (Fusion mit Glutathion-S-Transferase, GST) bietet den Vorteil einer induzierbaren Expression mit variablen Aufreinigungsmöglichkeiten der exprimierten Fusionsproteine.

Beide Vektoren enthalten mehrere verschiedene Erkennungssequenzen ("Tags"), über die eine spezifische Aufreinigung der Fusionsproteine in nativer oder denaturierter Form erfolgen kann. Außerdem enthalten die Fusionsproteine Protease-Schnittstellen, die eine Abspaltung des nach der Aufreinigung nicht mehr benötigten Fusionsanteils ermöglichen. Der modifizierte Vektor pET42T wurde durch Insertion eines doppelsträngigen Oligonukleotids in die *SacII*- und *NcoI*-Restriktionsstellen von pET42b(+) kloniert. Dadurch befindet sich die Thrombin-Protease-Schnittstelle im Fusionsprotein direkt vor dem Start-Methionin des Zielproteins. Die S-Tag Erkennungssequenz wurde durch die Klonierung von pET42T deletiert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in dem Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Dieser Stamm ermöglicht eine strikte Kontrolle der Proteinexpression über ein chromosomales Gen für T7 RNA-Polymerase und den *lac*-Repressor (*lacI*) sowie über ein extrachromosomales Plasmid mit einem Lysozym-Gen (pLysS). Die Expression der Fusionsproteine von pET-Plasmiden wird durch einen T7 Promotor mit einer *lac*-Operator-Sequenz (*T7/lac*) kontrolliert. Der *lacI*-Repressor reprimiert nicht nur diesen Promotor, sondern auch den *lacUV5*-Promotor der T7-RNA-Polymerase. Auf diese Weise wirken sich toxische Effekte der eingebrachten Fusionsproteine erst nach Induktion der Promotoren mit IPTG aus, das zu einer Ablösung des *lac*-Repressors von der Operatorsequenz führt. Lysozym wirkt als zusätzlicher Repressor der T7 RNA-Polymerase und erleichtert den Aufschluss der Bakterien bei der Aufreinigung der Fusionsproteine.

Am Tag vor der Expression der Fusionsproteine wurde eine Vorkultur des entsprechenden Bakterienstammes in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol (34 µg/ml) angeimpft, bei 37°C bis zu einer OD (600 nm) von 0,6-0,8 inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die gewünschte Menge LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol mit der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD (600 nm) von 0,8 inkubiert. Die Kultur wurde 2 h bei 22°C mit 1 mM IPTG auf einem Schüttler induziert. Die Ernte der induzierten Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 rpm (10 min., 4°C) und einem anschließenden Waschschrift mit 10 mM Tris-HCl pH 8. Die Pellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

Der Aufschluss der induzierten Bakterien erfolgte mit 20 ml BugBuster-Reagenz (Novagen) mit Protease-Inhibitoren (Complete Mini EDTA-free, Roche). Nach Zugabe von 15 µl Benzonase (Novagen) wurden die Bakterien mit dem BugBuster-Reagenz 20 min. in einem Wasserbad bei 22°C inkubiert und gelegentlich bewegt. Unlösliche Bestandteile wurden bei

11000 rpm (10 min., 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine benutzt.

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte nativ über eine Säulenchromatographie mit 5 ml Glutathion-Agarose-Matrix (50 %-ige Suspension) nach dem Protokoll des Herstellers (BugBuster GST-Bind Purification Kit, Novagen). Diese Methode macht sich die Interaktion der Glutathion-S-Transferase mit ihrem Substrat Glutathion zunutze. Die Elution des spezifisch gebundenen Proteins erfolgte mit 10 mM Glutathion. Das Eluat wurde bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung der CBD-Fusionsproteine erfolgte im "Batch"-Verfahren mit einer S-Protein Agarose nach den Angaben des Herstellers (S-Tag Thrombin Purification Kit, Novagen). Die starke Interaktion des S-Proteins mit dem S-Tag kann nur durch eine Abspaltung des Fusionsanteils mit Thrombin oder denaturierend aufgehoben werden. In dieser Arbeit erfolgte die Elution des S-Tag Fusionsproteins denaturierend mit 3 M Guanidinium-Thiocyanat. Das Eluat wurde anschließend gegen 200 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert und bei 4°C gelagert.

Die Analyse der aufgereinigten, bakteriell exprimierten Fusionsproteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot.

3.3.5.2 Herstellung nukleärer Extrakte aus Keratinozyten

Zur Herstellung nukleärer Extrakte wurden 5×10^5 HPK am Tag vor der Transfektion in 60 mm-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit jeweils 2 µg Expressionsplasmid und 15 µl Lipofectamine transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in 1 ml kaltem PBS abgeschabt und abzentrifugiert (30 sec. bei 20000x g, 4°C). Das Zellpellet wurde 5 min. auf Eis in Lysepuffer (10 mM HEPES pH 7,9, 300 mM Saccharose, 50 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Igepal CA 630, 1 mM EDTA, 0,25 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 0,5 mM Na-Orthovanadat, 10 µM N-acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN), 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)) inkubiert. Die Zellkerne wurden anschliessend 5 min. bei 3000x g und 4°C pelletiert. Das Kernpellet wurde mit 30 µl Elutionspuffer (10 mM HEPES pH 7,9, 20 % (v/v) Glycerin, 500 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 0,5 mM Na-Orthovanadat, 10 µM N-acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (ALLN), 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma)) 15 min. auf Eis extrahiert. Der Überstand, welcher den Kern-Rohextrakt darstellt, wurde durch eine erneute Zentrifugation (5 min. bei 20000x g, 4°C) gewonnen. Aliquots wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.5.3 Gelretardationsanalyse

Die Untersuchung der Eigenschaften viraler DNA-bindender Proteine erfolgte in Gelretardationsanalysen mit Hilfe von ^{32}P -endmarkierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden, welche der HPV31 E2BS4 oder einer Mutante, E2BS4MT, entsprachen. Die Bindungsreaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit jeweils 5 μl nukleären Extrakts, 50000 cpm des ^{32}P -endmarkierten Oligonukleotids und finalen Konzentrationen von 10 mM HEPES (pH 7,9), 125 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % Glycerin, 50 μg Lachssperma-DNA/ml und 75 μg Poly(dI-dC)/Poly(dI-dC)/ml angesetzt und für 10 min. auf Eis inkubiert. Komplexe wurden in einem nativen 7 % Polyacrylamid-Gel (Vernetzungsgrad 55:1; 12,2 ml 30 % Acrylamid, 3,3 ml 2 % Bis-Acrylamid, 2,5 ml 5x TBE, 40 μl TEMED, 200 μl AMPS, 31,76 ml H_2O) in 0,25x TBE für 1,5 h bei 200 V aufgetrennt. Die Gele wurden dann getrocknet und im Phosphoimager ausgewertet.

3.3.5.4 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (1970).

Die Proben wurden zur Denaturierung und Absättigung der Proteine mit SDS 5 min. bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz bei 14000 rpm abzentrifugiert und auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenstandard diente ein farbmarkierter Protein-Molekulargewichtsstandard (Bio-Rad oder Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) für 45 min bei 200 V.

3.3.5.5 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot)

Für die nachfolgende Immunreaktion wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, 0,2 μm Porendurchmesser; Schleicher & Schüll) übertragen.

Die Membran wurde kurz in H_2O befeuchtet und anschließend zusammen mit Gel-Blotting-Papier (Schleicher & Schüll) für 10 min. in CAPS-Puffer pH 10,3 (10 mM CAPS, 10 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Das Trenngel wurde nur kurz in CAPS-Puffer gewaschen. Auf die Kathode der Blotapparatur wurden zwei Lagen Gel-Blotting-Papier, darauf das Trenngel und die Nitrocellulose-Membran sowie zwei weitere Lagen Gel-Blotting-Papier gelegt. Der Transfer erfolgte 1 h bei konstant 70 V in einer Tank-Blotkammer mit Kühlschleife.

3.3.5.6 Immunologischer Nachweis transferierter Proteine

Die gesuchten Polypeptide wurden nach dem Transfer auf der Nitrocellulosemembran mit einem für die jeweiligen Proteine spezifischen Erstantikörper sowie einem gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper nachgewiesen. Das an den Zweitantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase erzeugte in Anwesenheit seines Substrats eine Chemilumineszenz. Alle Inkubationen und Waschschriffe erfolgten unter Schütteln.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C in Blockmilch (5 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween-20 in TBS) inkubiert. Die Erstantikörper wurden wie unter Abschnitt 3.2.7 angegeben in Blockmilch verdünnt und für 1 h (nukleäre Extrakte: 2 h) bei RT mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran 2x 5 min. und 1x 15 min. mit TBS-T (0,1 % Tween-20 in TBS) gewaschen. Der Zweitantikörper wurde wie unter Abschnitt 3.2.7 angegeben in Blockmilch verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nach der Wiederholung der Waschschriffe erfolgte die Detektion wie in den Legenden der Abbildungen angegeben mit dem ECL™-Chemilumineszenz-Kit (Amersham Pharmacia) oder SuperSignal West Pico (Pierce).

4 ERGEBNISSE

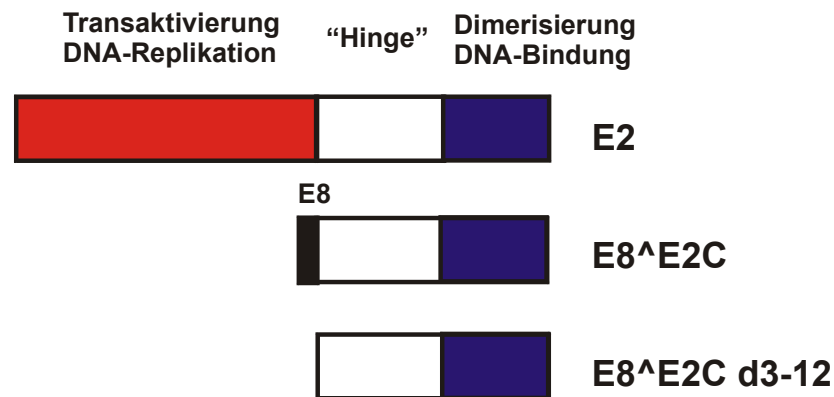
4.1 Die effiziente Repression der HPV31 P97-Aktivität durch E8^{E2C} erfordert nur eine einzelne, promotor-distale E2BS und den E8-Anteil

Die Regulation des frühen Promotors P97 von HPV31 spielt eine zentrale Rolle für die Kontrolle der viralen DNA-Replikation und Onkogen-Expression.

Die Repression des frühen Promotors P97 durch E2 wird nach dem gängigen Modell hauptsächlich durch die Bindung an die promotor-proximalen E2BS und die dadurch verursachte Verdrängung von Komponenten des basalen Transkriptionsinitiationskomplexes sowie von Transkriptionsfaktoren bewirkt (Dostatni et al., 1991; Dong et al., 1994; Hou et al., 2000; Stubenrauch et al., 1996; Tan et al., 1994). Um den Beitrag der einzelnen E2BS auf die Repression durch E8^{E2C} zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Luziferase-Reporterplasmide auf Basis von pGL31URR konstruiert, welche die gesamte regulatorische Region von HPV31 mit dem frühen Promotor P97 enthielten und in welchen verschiedene Kombinationen von E2BS durch gerichtete Mutagenese inaktiviert wurden. Die entsprechenden Mutationen führen zu einem Verlust der E2-Bindung und beeinflussen auch die transiente Replikation von HPV31-Genomen, wie bereits früher durch Stubenrauch et al. (1998a) gezeigt.

Die Bedeutung der unterschiedlichen N-terminalen Domänen der E2 Proteine sollte mit einer Deletionsmutante (E8^{E2C} d3-12) untersucht werden, welche nur aus der sowohl in E2 als auch in E8^{E2C} enthaltenen "Hinge"-Region und der C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von E2 besteht (**Abb. 3**).

Die Reporteranalysen wurden in primären humanen Keratinozyten (NHK) durchgeführt, den natürlichen Zielzellen humaner Papillomviren. Unterschiedliche Zelltypen zeigten in früheren Experimenten (Rapp et al., 1997) Differenzen in der durch E2 vermittelten Repression des frühen Promotors.

**Abb. 3****Schematische Darstellung der HPV31 E2 Proteine sowie der Deletionsmutante E8^{E2C} d3-12.**

Die E2 Proteine besitzen eine gemeinsame C-terminale Region, die aus der "Hinge" (weiß) und der DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne (blau) besteht. Die durch PCR-Amplifikation hergestellte Deletionsmutante E8^{E2C} d3-12 besteht nur aus der "Hinge" und der DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne von E2 und E8^{E2C}.

Je 200 ng der entsprechenden Reporterplasmide wurden mit 10 ng der Expressionsplasmide für E2, E8^{E2C}, E8^{E2C} d3-12 oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 kotransfiziert. Alle Werte wurden auf die Basalaktivität nach Kotransfektion von pSG5 bezogen. Die Kotransfektion aller Expressionsplasmide resultierte in einer Repression der Basalaktivität von P97 in Anwesenheit aller vier E2BS (pGL31URR) (**Abb. 4**). E8^{E2C} und E8^{E2C} d3-12 zeigten eine starke Repression auf 10 % der Basalaktivität, im Gegensatz zu E2 mit etwa 25 % der Basalaktivität. Überraschenderweise reprimierte E8^{E2C} nicht nur die P97 Promotor-Aktivität des Plasmids pGL31URR, sondern im gleichen Maße auch die der Plasmide pGL31URR BS4MT, pGL31URR BS3,4MT, pGL31URR BS2,3,4MT und pGL31URR BS1,3,4MT (7 bis 11 % der Basalaktivität). Die Repression durch E8^{E2C} war allerdings abhängig von E2BS, da keine Repression des Plasmids pGL31URR BS1,2,3,4MT erfolgte, welches über keine intakte E2BS verfügt. Die einzelnen promotor-distalen E2BS1 oder 2 genügten für eine vollständige Repression der P97 Promotor-Aktivität, die der Repression in der Anwesenheit aller vier E2BS entsprach. Im Gegensatz zu E8^{E2C} zeigte E2 bei Mutation der promotor-proximalen E2BS4 (pGL31URR BS4MT) eine leichte Transaktivierung von P97 (ca. 1,9-fach). Die Transaktivierung durch E2 zeigte keine Bindungsstellenabhängigkeit, da zusätzliche Mutationen der E2BS1, 2 oder 3 keine Abschwächung dieses Effekts aufwiesen.

Die Deletionsmutante E8^ΔE2C d3-12 reprimierte die P97-Aktivität nur in Anwesenheit von allen E2BS im selben Maße wie E8^ΔE2C. Mutation der promotor-proximalen E2BS3 und 4 resultierte in einem vollständigen Verlust der Repression durch E8^ΔE2C d3-12.

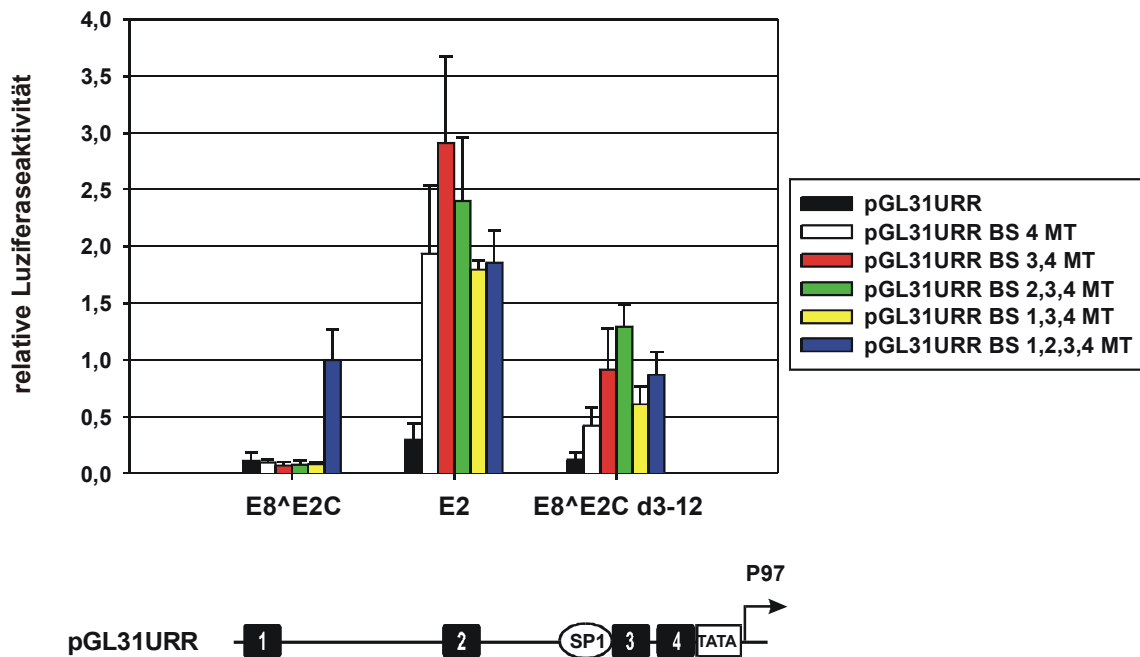


Abb. 4

Effekte verschiedener E2-Bindungsstellenmutationen auf die Regulation der basalen Promotoraktivität von HPV31 P97 durch E2, E8^ΔE2C und E8^ΔE2C d3-12.

Primäre humane Keratinozyten wurden mit je 200 ng der verschiedenen HPV31 P97 Luziferase-Reporterplasmide und 10 ng der Expressionsplasmide für E8^ΔE2C, E2 sowie E8^ΔE2C d3-12 oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität der Reporterplasmide bei Kotransfektion von pSG5 bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die schematische Struktur des pGL31URR Reporterplasmids mit den E2BS1 bis 4 sowie dem frühen Promotor P97.

Eine zusätzliche Mutation von E2BS2 im Plasmid pGL31URR BS2,3,4MT führte sogar zu einer leichten Aktivierung von P97 auf das 1,3-fache der Basalaktivität. Im Gegensatz dazu zeigte das Plasmid pGL31URR BS1,3,4MT eine stärkere Repression durch E8^ΔE2C d3-12 als pGL31URR BS2,3,4MT und pGL31URR BS1,2,3,4MT. Diese Ergebnisse verdeutlichten,

daß ein grundlegender Unterschied in der Repression des P97 zwischen E8^{E2C} und E2 besteht, welcher auf die E8-Domäne zurückzuführen ist.

4.2 Die E8-Domäne von E8^{E2C} ist essentiell für die transkriptionelle Repression des HPV6a P2 Promotors über grosse Distanz

Die Identifizierung dieser neuartigen Repressionsaktivität warf die Frage auf, ob die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} auf den P97 Promotor von HPV31 beschränkt ist. Daher sollte der Einfluss von E8^{E2C} auf den heterologen HPV6a P2 Promotor (Rapp et al., 1997; Smotkin et al., 1989) untersucht werden. Die vier E2BS von HPV6a liegen etwa 200 bis 660 Nt. stromaufwärts von P2 und können damit sämtlich als promotor-distal betrachtet werden. Der P1 Promotor von HPV6a entspricht von seiner Lage dem P97 Promotor von HPV31. Der P2 Promotor wird im Gegensatz zum P1 Promotor nicht durch HPV6a E2 reprimiert, sondern transaktiviert (Rapp et al., 1997).

Das Reporterkonstrukt 6aNCR-P1*P2-luc (Rapp et al., 1997) enthält ein Luziferasegen unter der Kontrolle der kompletten regulatorischen Region von HPV6a mit den vier konservierten E2BS, die den E2BS von HPV31 in Lage und Sequenz sehr ähnlich sind, und erstreckt sich bis zu Nt. 446 der frühen Region (**Abb. 5**). Da die TATA-Box des P1 Promotors durch eine Mutation inaktiviert wurde, erfolgt die Initiation der Luziferase-mRNA ausschließlich am P2 Promotor (Rapp et al., 1997). 200ng des HPV6a Reporterkonstrukts wurden zusammen mit 10 ng des leeren Expressionsvektors pSG5, E8^{E2C} oder E8^{E2C} d3-12 in RTS3b Keratinozyten kotransfiziert und die Luziferaseaktivität 48 h nach der Transfektion gemessen. Die Haut-Keratinozytenzelllinie RTS3b erwies sich als die einzige Zelllinie, in der die frühen Promotoren P1 und P2 von HPV6 durch E2 differentiell reguliert werden (Purdie et al., 1993; Rapp et al., 1997). E8^{E2C} zeigte, ähnlich wie beim HPV31 P97 Promotor, eine sehr starke Repression des HPV6a P2 Promotors im Plasmid 6aNCR-P1*P2-luc auf etwa 15 % der Basalaktivität (**Abb. 5**). Die Repressionsaktivität von E8^{E2C} war wiederum abhängig von der E8-Domäne, da die Deletionsmutante E8^{E2C} d3-12 die Promotoraktivität von P2 nur auf etwa 75 % der Basalaktivität reprimierte. Die Repression durch die E8-Domäne über grosse Distanz scheint damit nicht auf den P97 Promotor von HPV31 beschränkt zu sein.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob eine Bindungsstellenabhängigkeit für die Repression durch E8^{E2C} über grosse Distanz besteht. Die Fernrepression durch E8^{E2C} erfolgte sowohl bei P97 als auch bei P2 in Anwesenheit der E2BS1 und 2, was eine Kopplung an

diese E2BS für möglich erscheinen ließ. Zur Beantwortung dieser Frage wurden in dieser Arbeit verschiedene Kombinationen der von Rapp et al. (1997) beschriebenen E2BS-Mutanten des Plasmids 6aNCR-P1*P2-luc hergestellt, deren E2BS durch ortsspezifische Mutagenese inaktiviert waren. E8^ΔE2C reprimierte die Reporterplasmide mit Mutationen in E2BS1 und 2 (6aNCR-P1*P2-BS1,2MT-luc) oder E2BS3 und 4 (6aNCR-P1*P2-BS3,4MT-luc) genauso stark wie das Ausgangsplasmid 6aNCR-P1*P2-luc (**Abb. 5**). Das Plasmid 6aNCR-P1*P2-luc-BS2,3,4MT-luc zeigte einen leichten Verlust der Repression durch E8^ΔE2C.

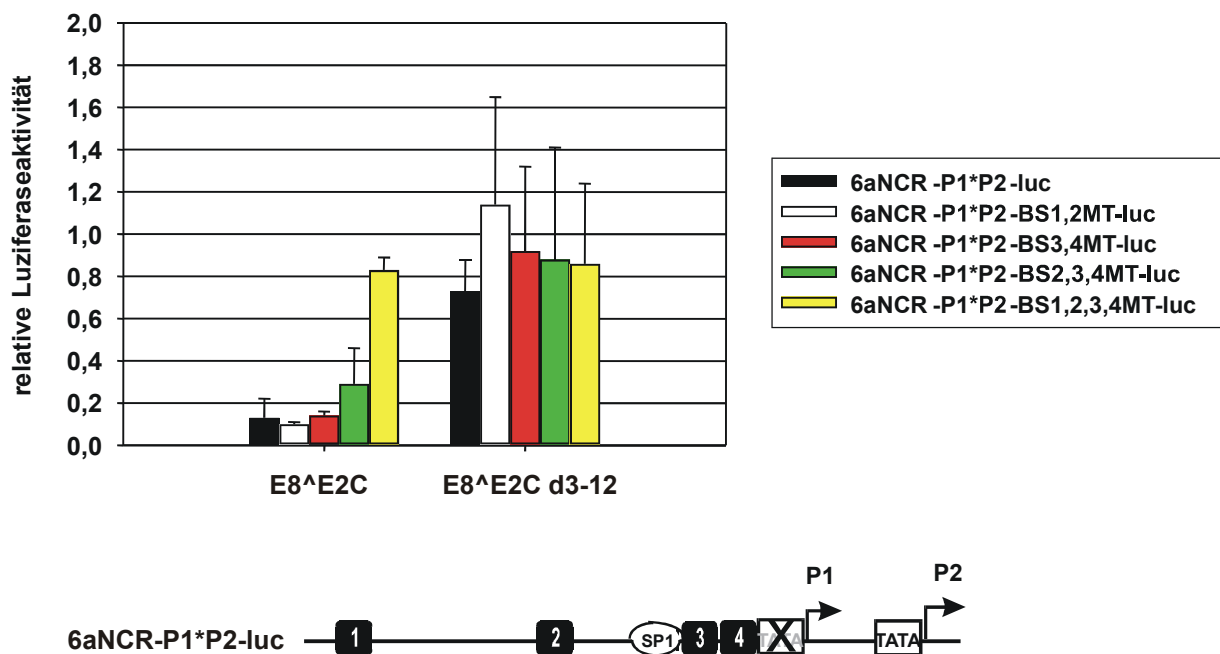


Abb. 5

Regulation der HPV6a P2 Promotoraktivität durch E8^ΔE2C und E8^ΔE2C d3-12.

RTS3b-Zellen wurden mit je 200 ng der verschiedenen 6aNCR-P1*P2-luc Luciferase-Reporterplasmide und 10 ng der Expressionsvektoren für E8^ΔE2C, E8^ΔE2C d3-12 oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 kotransfiziert. Die relative Luciferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität der Reporterplasmide bei Kotransfektion von pSG5 bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die schematische Struktur des 6aNCR-P1*P2-luc Reporterplasmids mit den E2BS1 bis 4 sowie den Initiationsstellen der frühen Promotoren P1 und P2. Die Initiation der Transkription an P1 wurde durch eine Mutation der TATA-Box verhindert (Rapp et al., 1997).

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die Fernrepression durch E8^{E2C} nicht spezifisch durch E2BS1 oder 2 vermittelt wird. Die Repression durch E8^{E2C} erforderte wie beim HPV31 P97 Promotor die Anwesenheit von mindestens einer E2BS, da die Aktivität des Plasmids 6aNCR-P1*P2-BS1,2,3,4MT-luc nicht mehr inhibiert werden konnte (vgl. **Abb. 4**). Damit konnte gezeigt werden, daß E8^{E2C} eine von E2 oder der E2C-Domäne völlig unterschiedliche Ferndistanzrepressionsaktivität besitzt, die nicht für den HPV31 P97 Promotor spezifisch ist. Die Repression benötigt mindestens eine promotor-distale E2BS und die Anwesenheit der Aminosäuren 3-12 im E8^{E2C} Protein.

4.3 Die Aminosäuresequenz der potentiellen E8-Domänen verschiedener HPV-Typen ist stark konserviert

Ein Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener "high risk" (HPV16, 31 und 33) sowie "low risk" (HPV11) HPV-Typen zeigt eine sehr starke Konservierung der E8-Domäne (**Abb. 6 a**). Besonders auffällig sind der große Anteil basischer Aminosäuren (Lysin und Arginin) und die Konservierung des zentralen KWK-Motivs. Im Gegensatz zu den humanen Papillomviren zeigen die animalen Papillomviren BPV und CRPV keine vergleichbare Konservierung der Aminosäuresequenz, obwohl die resultierenden Proteine funktionell als Repressoren identisch sind (Choe et al., 1989; Jeckel et al., 2003). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse (**Abb. 4 und 5**) war es offensichtlich, daß die Aminosäuren 3-12 von HPV31 E8^{E2C} die Repression über grosse Distanz bewirken. Nun stellte sich die Frage, welcher Aminosäurereste für diese Repression verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde mittels ortsspezifischer PCR-Mutagenese eine Alanin-"Scanning"-Mutagenese der Aminosäurereste 3-12 sowie eine Mutation des zentralen KWK-Motivs von E8^{E2C} durchgeführt (**Abb. 6 b**).

A

31	MAILKW-KRSRWY
16	MAILKW-KLSRCY
33	MAILKW-KLSRWYN
11	MAILKW-KLQR
BPV1	MKLTVFLRPSR
CRPV	MKLLLLVL--SRY

B

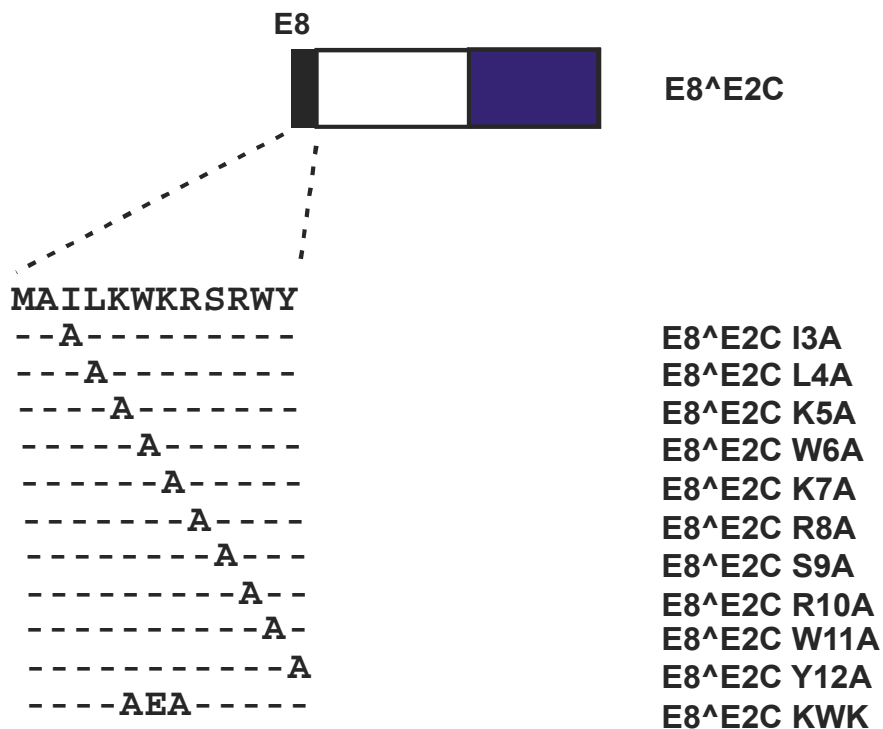


Abb. 6

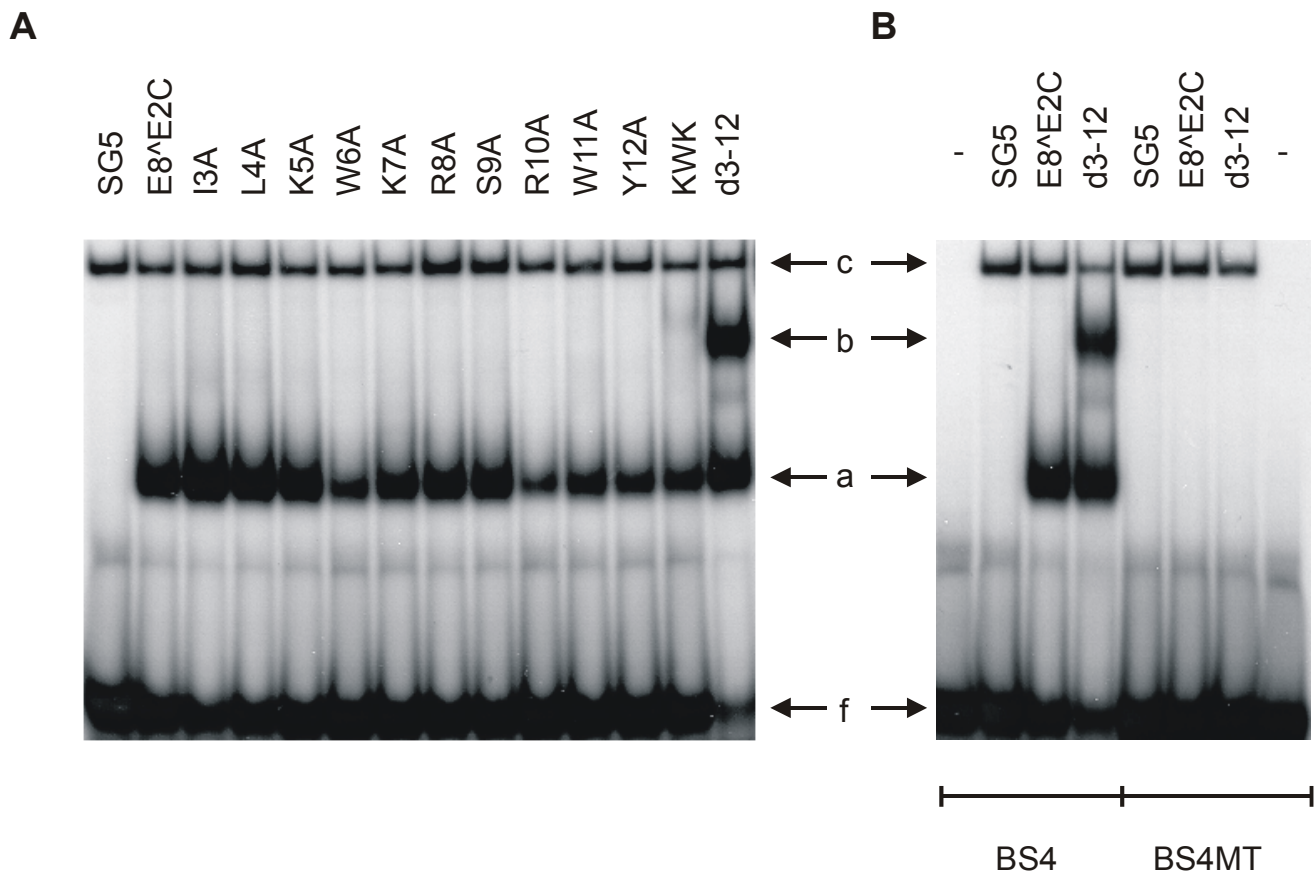
Alanin-"Scanning"-Mutagenese der konservierten E8-Domäne.

(A) Vergleich der E8-Domänen von HPV11, 16, 31 und 33 sowie BPV1 und der E9-Domäne von CRPV. Ähnliche oder identische Aminosäurereste sind markiert. (B) Struktur und Sequenz der HPV31 E8^AE2C-Mutanten. Neben der Aminosäuresequenz der Aminosäuren 1 bis 12 von E8^AE2C sind im unteren Teil der Abbildung die Namen der Mutanten mit den entsprechenden Aminosäureaustauschen dargestellt.

4.4 Analyse der DNA-Bindungskapazität der E8^{E2C}-Mutanten

Zunächst wurden die DNA-Bindungskapazität und die Stabilität der resultierenden Proteine mit Hilfe von Gelretardations- und Western-Blot-Analysen untersucht. Zur Kontrolle der DNA-Bindungskapazität wurden primäre humane Keratinozyten mit den Expressionsvektoren für E8^{E2C} oder den entsprechenden Mutanten transfiziert. Nach 48 h wurden nukleäre Extrakte isoliert und mit ³²P-endmarkierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden inkubiert, deren Sequenz der E2BS4 von HPV31 oder der bei Stubenrauch et al. (1998a) beschriebenen mutierten E2BS4MT Sequenz entsprach. Die resultierenden Komplexe wurden anschließend in nativen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und mit dem Phosphorimager ausgewertet.

Die Extrakte der mit E8^{E2C} oder den E8^{E2C}-Mutanten transfizierten Zellen zeigten in der Gelretardationsanalyse zwei Protein-DNA-Komplexe (Komplex a und b, **Abb. 7 a**), deren Mobilität sich von dem freien E2BS4-Oligonukleotid unterschied. Im Gegensatz zu Komplex c war Komplex a nicht in Extrakten aus Zellen vorhanden, die mit dem leeren Expressionsvektor pSG5 transfiziert wurden (**Abb. 7 a**). Komplex c wurde aufgrund seiner Anwesenheit nach Transfektion von pSG5 sowie der simultanen Bindung an E2BS4 und E2BS4MT offensichtlich durch einen unspezifisch DNA-bindenden Komplex gebildet (**Abb. 7 a und b**). Komplex a wurde nicht gebildet, wenn das Oligonukleotid E2BS4MT eingesetzt wurde (**Abb. 7 b**) und stellt damit höchstwahrscheinlich das gebundene E8^{E2C} Protein oder die entsprechenden Mutanten dar. Komplex b besaß eine unterschiedliche Mobilität und erschien nur in Extrakten aus Zellen, die mit der Deletionsmutante E8^{E2C} d3-12 transfiziert wurden (**Abb. 7 a**). Auch dieser Komplex zeigte eine Bindungsspezifität für E2BS4 (**Abb. 7 b**), was darauf hinweist, daß es sich um eine posttranslationale Modifikation oder eine unterschiedliche Konformation des E8^{E2C} d3-12 Proteins handelt. Alle E8^{E2C}-Mutanten zeigten damit wie das Wildtyp-Protein eine DNA-Bindungsspezifität für E2BS.

**Abb. 7****Gelretardationsanalyse der DNA-Bindung von E8^{E2C} und E8^{E2C}-Mutanten an E2-Bindungsstellen.**

Gelretardationsanalysen der E8^{E2C}-Mutanten wurden mit nukleären Extrakten aus transfizierten humanen primären Keratinozyten und einem ³²P-endmarkierten Oligonukleotid durchgeführt, das der E2BS4 von HPV31 (A) oder einer mutierten, E2-bindungsdefizienten E2BS4 (E2BS4 MT; Stubenrauch et al., 1998a) entspricht (B). Die Bezeichnungen der transfizierten Expressionsvektoren sind über den jeweiligen Spuren dargestellt. Als Negativkontrolle dienten die Oligonukleotide ohne Zugabe von nukleärem Extrakt (-). Die Pfeile markieren die Position des ungebundenen Oligonukleotids (f) sowie der Komplexe mit veränderten Laufeigenschaften (a-c).

4.5 Nachweis der stabilen Proteinexpression der E8^{E2C}-Mutanten

Zum Nachweis der E8^{E2C}-Proteine wurde ein polyklonales Hühner-IgY-Antiserum eingesetzt, das gegen ein Peptid im Bereich der Aminosäuren 58 bis 75 von E8^{E2C} gerichtet wurde. Aufgrund seiner Lage in der "Hinge"-Region von E2 ermöglicht es den Nachweis aller E2 Proteine. Die Spezifität des Antiserums (AS 96) für E8^{E2C} wurde mit Hilfe von bakteriell exprimierten GST-E8^{E2C} und CBD-E8^{E2C} Fusionsproteinen nach-

gewiesen. Dabei handelt es sich um N-terminale Fusionen der Glutathion-S-Transferase (GST; Expressionsvektor: pET42T) oder der Zellulose-Bindungs-Domäne (CBD, Expressionsvektor: pET34T) an E8^AE2C. Nach der Induktion der Expression in E. coli BL21-pLysS Bakterien mit IPTG wurden die löslichen Fusionsproteine durch Lyse mittels Detergentien gewonnen und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Der Nachweis der Proteine erfolgte nach der Auftrennung in einem 12 %-igen Polyacrylamidgel mittels Western-Blot-Analysen. AS 96 erkannte im Gegensatz zu Lysaten des induzierten leeren Expressionsvektor pET42T und des nicht-induzierten Expressionsvektors für GST-E8^AE2C spezifisch GST-E8^AE2C und CBD-E8^AE2C in den Eluaten aus induzierten Fraktionen (**Abb. 8**). Die spezifischen Banden bei etwa 52 kDa (GST-E8^AE2C) bzw. 48 kDa (CBD-E8^AE2C) entsprechen den errechneten Molekulargewichten der Fusionsproteine. AS 96 erkannte eine zusätzliche Bande mit geringerem Molekulargewicht im Eluat der Aufreinigung von GST-E8^AE2C, die vermutlich einem Degradationsprodukt entspricht (**Abb. 8**).

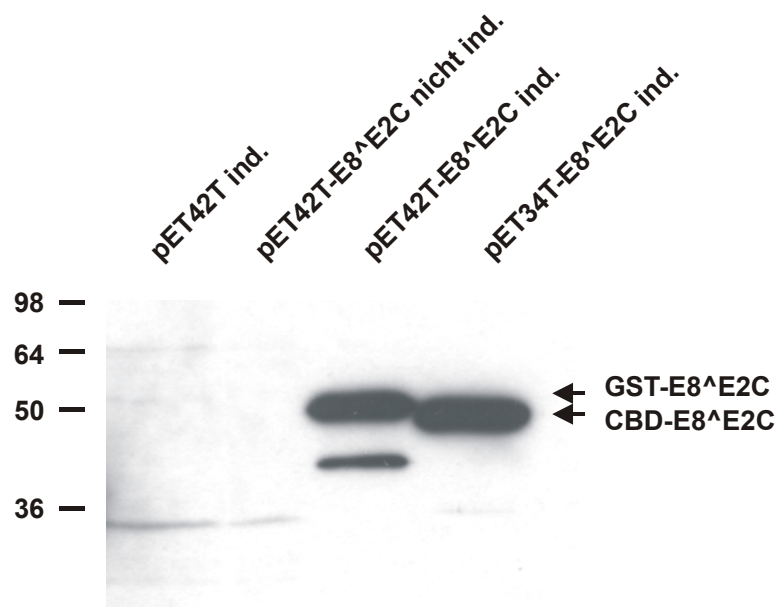


Abb. 8

Immunologischer Nachweis von bakteriell exprimierten E8^AE2C-Fusionsproteinen.

Western-Blot-Analysen wurden mit Extrakten aus nicht induzierten oder IPTG-induzierten E. coli BL21-pLysS Bakterien durchgeführt. Die Bakterien enthielten Expressionsvektoren für GST (pET42T), GST-E8^AE2C (pET42T-E8^AE2C) oder CBD-E8^AE2C (pET34T-E8^AE2C). Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit dem polyklonalen Hühner-IgY-Antiserum 96 (AS 96). Als Zweitantikörper diente ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-IgY-Antikörper aus Esel. Die Detektion erfolgte mit ECL-Reagenz. Spezifisch nachgewiesene Proteine sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Molekulargewichte auf der linken Seite der Abbildung sind in Kilodalton angegeben.

Die Kontrolle der Expressionsstärken und der Stabilität der E8[^]E2C Proteine in transfizierten primären humanen Keratinozyten erfolgte mit Western-Blot-Analysen von Gesamtproteinextrakten. Die Gesamtproteinextrakte wurden 48 h nach der Transfektion durch Lyse der Zellen in SDS-Probenpuffer gewonnen. Nach der Auftrennung in einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. In Proteinextrakten aus Keratinozyten, die mit den Expressionsvektoren für E8[^]E2C oder den entsprechenden Mutanten transfiziert wurden, zeigte sich im Gegensatz zum leeren Expressionsvektor pSG5 eine spezifische Bande bei etwa 22 kDa (**Abb. 9**).

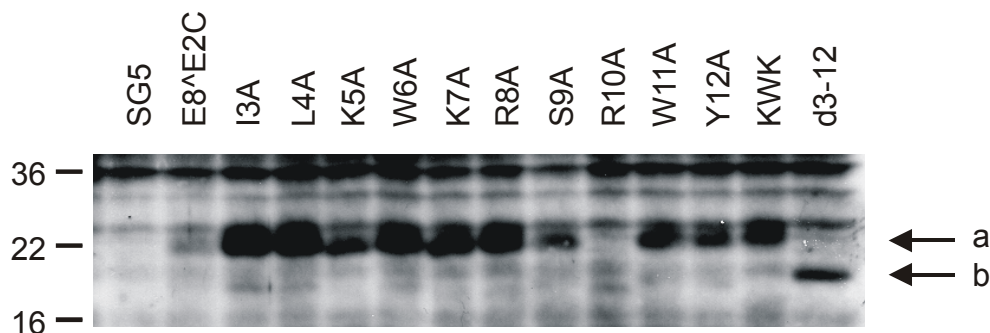


Abb. 9

Immunologischer Nachweis von E8[^]E2C und den E8[^]E2C-Mutanten aus transfizierten humanen primären Keratinozyten.

Western-Blot-Analysen wurden mit nukleären Extrakten aus transfizierten humanen primären Keratinozyten durchgeführt. Der Nachweis von E8[^]E2C und den Mutanten erfolgte mit dem spezifischen polyklonalen AS 96. Als Zweitantikörper diente ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-IgY-Antikörper aus Esel. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit SuperSignal West Pico durchgeführt. Die Position der spezifischen Banden der E8[^]E2C Proteine (a) sowie der Deletionsmutante E8[^]E2C d3-12 (b) sind markiert. Die Molekulargewichte auf der linken Seite der Abbildung sind in Kilodalton angegeben.

Dieses geschätzte Molekulargewicht entspricht nahezu dem berechneten Molekulargewicht von 20,5 kDa für E8[^]E2C. Extrakte aus Zellen, die mit der Deletionsmutante E8[^]E2C d3-12 transfiziert wurden, zeigten eine Bande mit verringertem Molekulargewicht, entsprechend dem Verlust von 10 Aminosäuren aus E8[^]E2C (**Abb. 9**). Die E8[^]E2C-Mutanten zeigten mit Ausnahme von E8[^]E2C R10A eine im Vergleich zum Wildtyp-Protein wesentlich erhöhte Expressionsrate. In weiteren Experimenten zeigte die Mutante R10A eine Expression, die dem Wildtyp-Protein entsprach. Dabei zeigte sich auch, daß nur die Mutanten E8[^]E2C I3A,

L4A, W6A, KWK und d3-12 eine konstant höhere Expression als E8^{E2C} zeigten, wohingegen die Expression aller anderen Mutanten dem Wildtyp-Protein ähnelte. Diese Analysen bewiesen die Expression aller E8^{E2C}-Mutanten, gaben aber auch Hinweise auf eine Bedeutung der E8-Domäne für die Stabilität des Proteins.

4.6 Die konservierten Aminosäuren Tryptophan 6 und Lysin 7 der E8-Domäne sind essentiell für die Repression über grosse Distanz

Die Fähigkeit der E8^{E2C}-Mutanten zur Repression der Transkription wurde mit Hilfe der Reporterplasmide pGL31URR und pGL31URR BS3,4MT in Kotransfektionsexperimenten mit den entsprechenden Expressionsplasmiden untersucht.

Die Basalaktivität des Plasmids pGL31URR wurde in Anwesenheit aller vier E2BS durch alle Mutanten stark reprimiert (**Abb. 10**). Die E8^{E2C}-Mutanten K7A und KWK zeigten einen leichten Verlust der Repression auf 23 % bzw. 14 % der Basalaktivität, gemessen an der Kotransfektion des leeren Expressionsvektors pSG5. Alle anderen Mutanten verhielten sich wesentlich wie das E8^{E2C} Wildtyp-Protein, das die Basalaktivität von pGL31URR auf etwa 5 % reprimierte. Das Reporterplasmid pGL31URR BS3,4MT, dessen promotor-proximale E2BS durch ortsspezifische Mutagenese inaktiviert wurden, zeigte im Vergleich zu pGL31URR einen signifikanten Verlust der Repressionsaktivität der E8^{E2C}-Mutanten W6A und K7A von 9 auf 32 % bzw. von 23 auf 48 % (**Abb. 10**). Die E8^{E2C} KWK Mutante mit einer Mutation der Aminosäuren 5, 6 und 7 von E8^{E2C} zeigte einen nahezu vollständigen Verlust der Repression von pGL31URR BS3,4MT. Im Gegensatz dazu reprimierten das E8^{E2C} Wildtyp-Protein und alle weiteren Einzelmutanten beide Reporterplasmide gleich stark. Diese Daten legen nahe, daß die Aminosäuren W6 und K7 von E8^{E2C} spezifisch für die neuartige Ferndistanzrepression verantwortlich sind, da weder die transkriptionelle Repression über kurze Distanz, die Proteinstabilität oder die DNA-Bindungskapazität verringert sind.

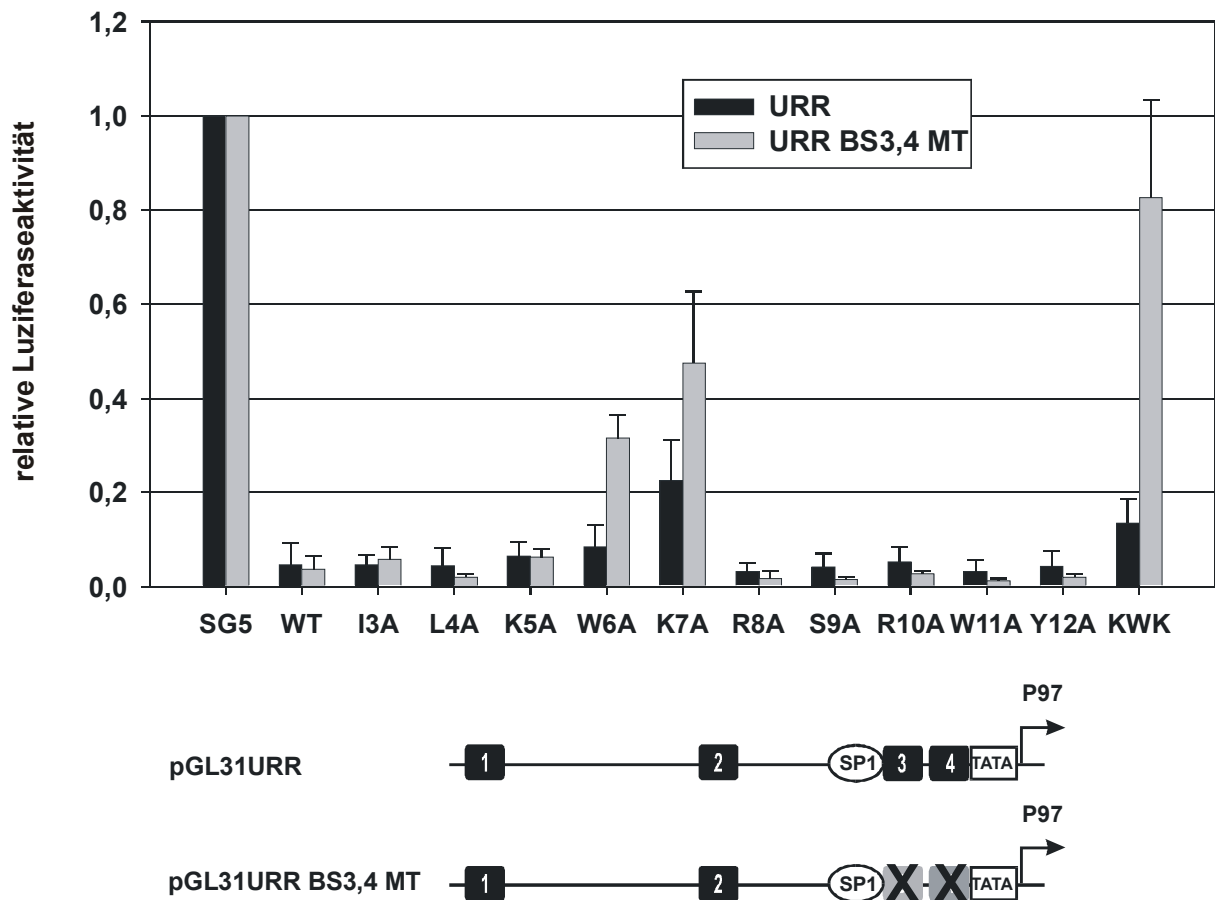


Abb. 10

Effekte der E8^{E2C}-Mutanten auf die Promotoraktivität von P97 in Anwesenheit aller E2BS und bei Mutation der promotor-proximalen E2BS.

Primäre humane Keratinozyten wurden mit je 10 ng der Expressionsvektoren für E8^{E2C}, den entsprechenden Mutanten oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 sowie 200 ng der Luziferase-Reporterplasmide pGL31URR (URR) oder pGL31URR BS3,4 MT (URR BS3,4 MT) kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität der Reporterplasmide bei Kotransfektion von pSG5 bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Reporterplasmide (siehe auch Abb. 4). Die Mutation der E2BS3 und 4 ist durch ein X dargestellt.

4.7 E8^{E2C} reprimiert spezifisch den frühen Promotor des Simian Virus 40 (SV40)

Nachdem die für die Repression verantwortlichen Aminosäuren der E8-Domäne identifiziert wurden, stellte sich die Frage, ob weitere Elemente neben den E2BS in der regulatorischen Region humaner Papillomviren für die Repression durch E8^{E2C} benötigt werden. Zur Klärung dieser Frage wurde ein bereits früher beschriebenes synthetisches Luziferase-

Reporterplasmid (6XE2BS-luc; Stubenrauch et al., 1998b) mit einem minimalen frühen SV40 Promotor und 3 Kopien eines Oligonukleotids, bestehend aus den E2BS3 und 4 von HPV31, eingesetzt (**Abb. 11**).

Kotransfektionsexperimente mit den Expressionsplasmiden für pSG5, E2, E8^AE2C und E8^AE2C KWK wurden in primären humanen Keratinozyten durchgeführt und 48 h nach Transfektion analysiert. E2 bewirkte eine starke Transaktivierung der Luziferase-Expression von 6XE2BS-luc, wohingegen E8^AE2C den Promotor auf 20 % der Basalaktivität reprimierte (**Abb. 11**).

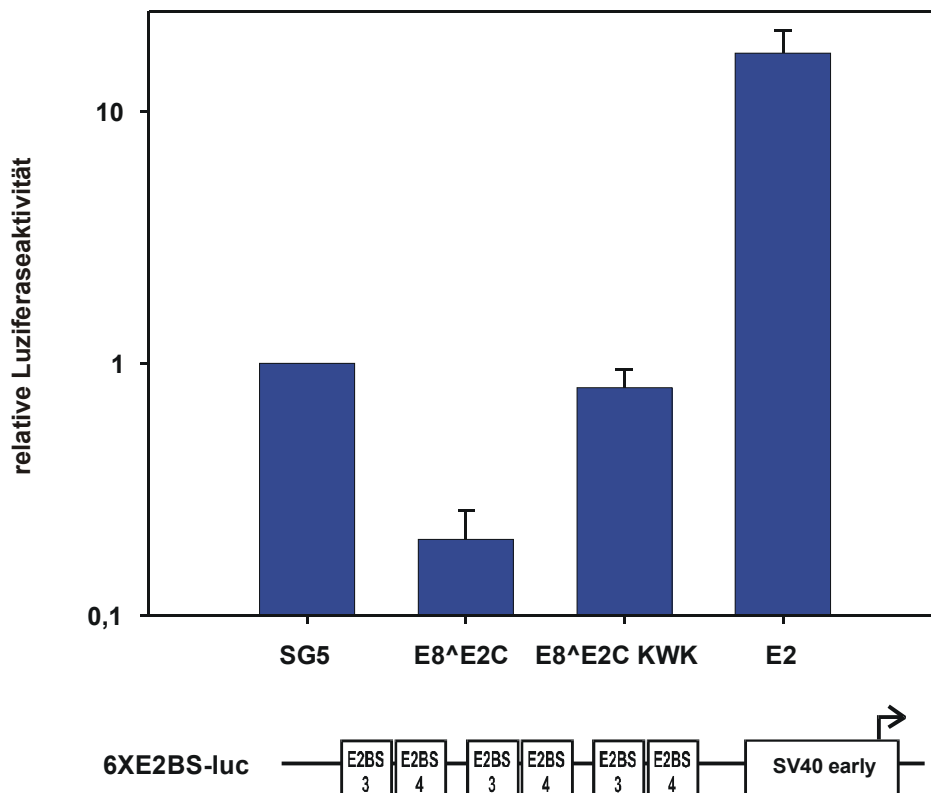


Abb. 11

Modulation des heterologen frühen Simian Virus 40 (SV40) Promotors durch E2 Proteine.

Primäre humane Keratinozyten wurden mit je 10 ng der Expressionsplasmide für E2, E8^AE2C oder E8^AE2C KWK bzw. dem leeren Vektor pSG5 sowie 200 ng des 6XE2BS-luc Luziferase-Reporterplasmids kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität des Reporterplasmids bei Kotransfektion von pSG5 bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Struktur des 6XE2BS-luc Reporterplasmids mit drei Wiederholungen der E2BS3 und 4 von HPV31, dem minimalen frühen SV40 Promotor sowie der Transkriptionsinitiationsstelle.

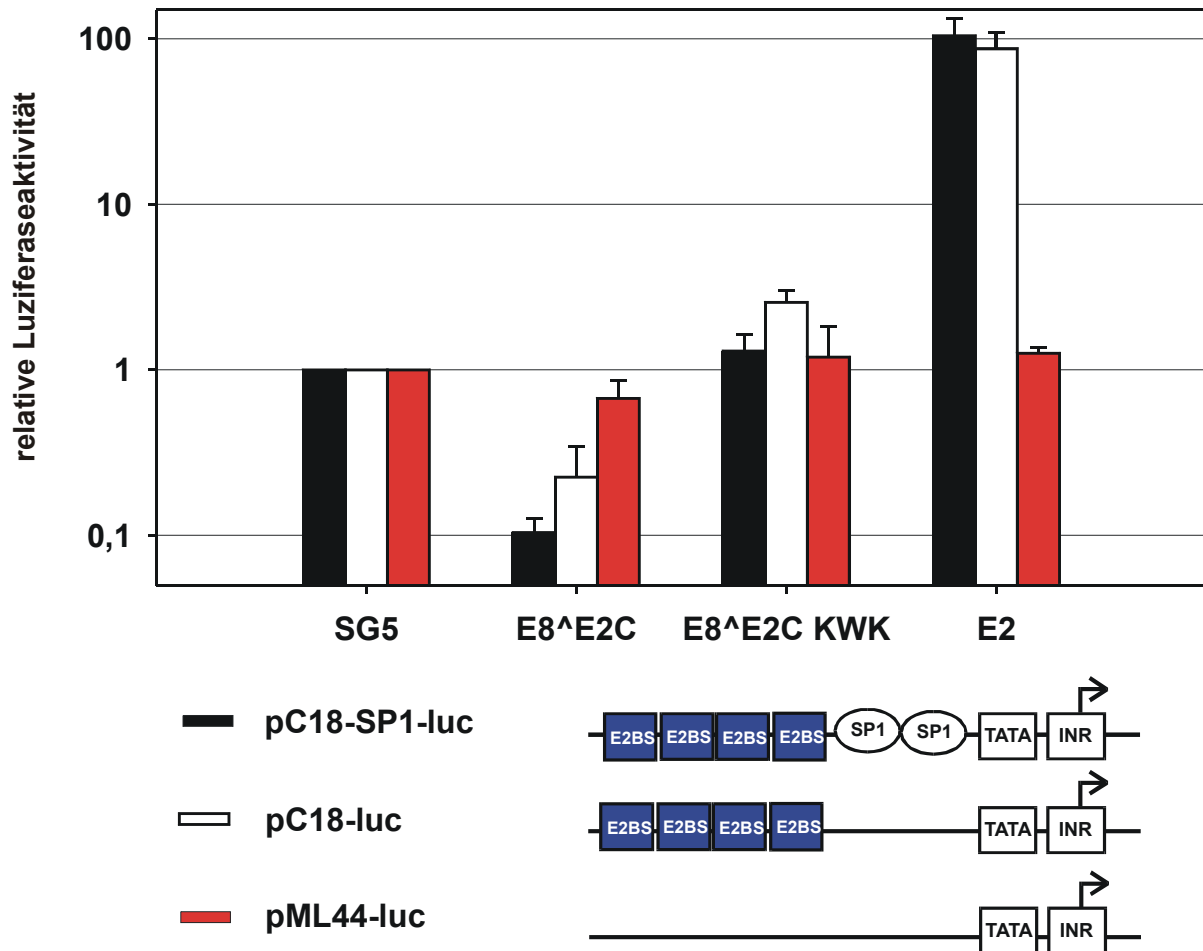
Interessanterweise führte die Kotransfektion von E8^{E2C} KWK mit 6XE2BS-luc zu keiner Repression des frühen SV40 Promotors. Damit scheinen E2 und die Fernrepressions-negative E8^{E2C} KWK Mutante nur in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box von P97 reprimierend zu wirken, was auf eine direkte Interaktion mit Komponenten des basalen Transkriptionsinitiationskomplexes hinweist. Die einzige Voraussetzung für die Repression durch E8^{E2C} scheinen damit E2BS zu sein. Die Repression der P97-Aktivität durch E8^{E2C} beruht daher nicht auf der Verdrängung zellulärer Transkriptionsfaktoren von den E2BS3 und 4, sondern auf einem neuartigen Mechanismus.

4.8 E8^{E2C} wirkt in der Anwesenheit von E2BS als Repressor von synthetischen minimalen Promotoren

Zur weiteren Eingrenzung der erforderlichen *cis*-Elemente für die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} wurde das freundlicherweise von G. Steger (Köln) zur Verfügung gestellte Plasmid pC18-SP1-luc eingesetzt, welches ausschließlich definierte Transkriptionselemente, wie vier synthetische E2BS mit der Konsensussequenz, zwei SP1-Bindungsstellen und die TATA-Box sowie das Initiator-Element des späten Adenovirus Hauptpromotors enthält (**Abb. 12**). Zudem stellte sich die Frage, ob die Repression durch E8^{E2C} durch den Transkriptionsfaktor SP1 vermittelt wird, da sämtliche bisher in dieser Arbeit verwendeten Reporterplasmide SP1-Bindungsstellen enthielten. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit das Plasmid pC18-luc aus pC18-SP1-luc durch Deletion der SP1-Bindungsstellen hergestellt. Die Deletion der SP1-Bindungsstellen resultierte in einer etwa 30-fachen Reduktion der basalen Promotoraktivität verglichen mit pC18-SP1-luc, was die Bedeutung von SP1 für die basale Transkription verdeutlicht. Trotzdem lag die basale Promotoraktivität von pC18-luc etwa 10-fach höher als der Hintergrund, so daß auch für dieses Plasmid die Repression durch E8^{E2C} bestimmt werden konnte. Als Kontrolle diente das Plasmid pML44-luc, das durch Deletion der E2BS aus pC18-luc hergestellt wurde, und somit nur noch die TATA-Box und das Initiator-Element des späten Adenovirus Hauptpromotors enthält. 200 ng der Reporterplasmide wurden mit 10 ng des leeren Vektors pSG5 oder der Expressionsplasmide für E2, E8^{E2C} oder E8^{E2C} KWK in primäre humane Keratinozyten kotransfiziert und die Luziferaseaktivität 48 h nach der Transfektion gemessen. Kotransfektion von E2 bewirkte eine starke Transaktivierung der Luziferase-Expression von

pC18-SP1-luc und pC18-luc (**Abb. 12**). Im Gegensatz dazu zeigte E8^{E2C} eine starke Repression der Basalaktivität von pC18-SP1-luc und pC18-luc auf 10 bzw. 30 % (**Abb. 12**). E8^{E2C} KWK inhibierte die Basalaktivität der getesteten Plasmide nicht, sondern bewirkte sogar eine leichte Transaktivierung von pC18-luc. Die Aktivität aller E2 Proteine war abhängig von der Anwesenheit der E2BS, da keines der Proteine eine Veränderung der Basalaktivität von pML44-luc bewirkte (**Abb. 12**). Diese Ergebnisse zeigten, daß weder die Transaktivierung durch E2 noch die Repression durch E8^{E2C} von der Anwesenheit von SP1-Bindungsstellen abhängt. Die einzigen *cis*-Erfordernisse für die Repression durch E8^{E2C} sind E2BS.

Die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} ist damit nicht auf die frühen Promotoren humaner Papillomviren beschränkt, sondern wirkt auch auf minimale, synthetische Promotoren. Essentiell für die Repression ist das zentrale KWK-Motiv der E8-Domäne von E8^{E2C}.

**Abb. 12**

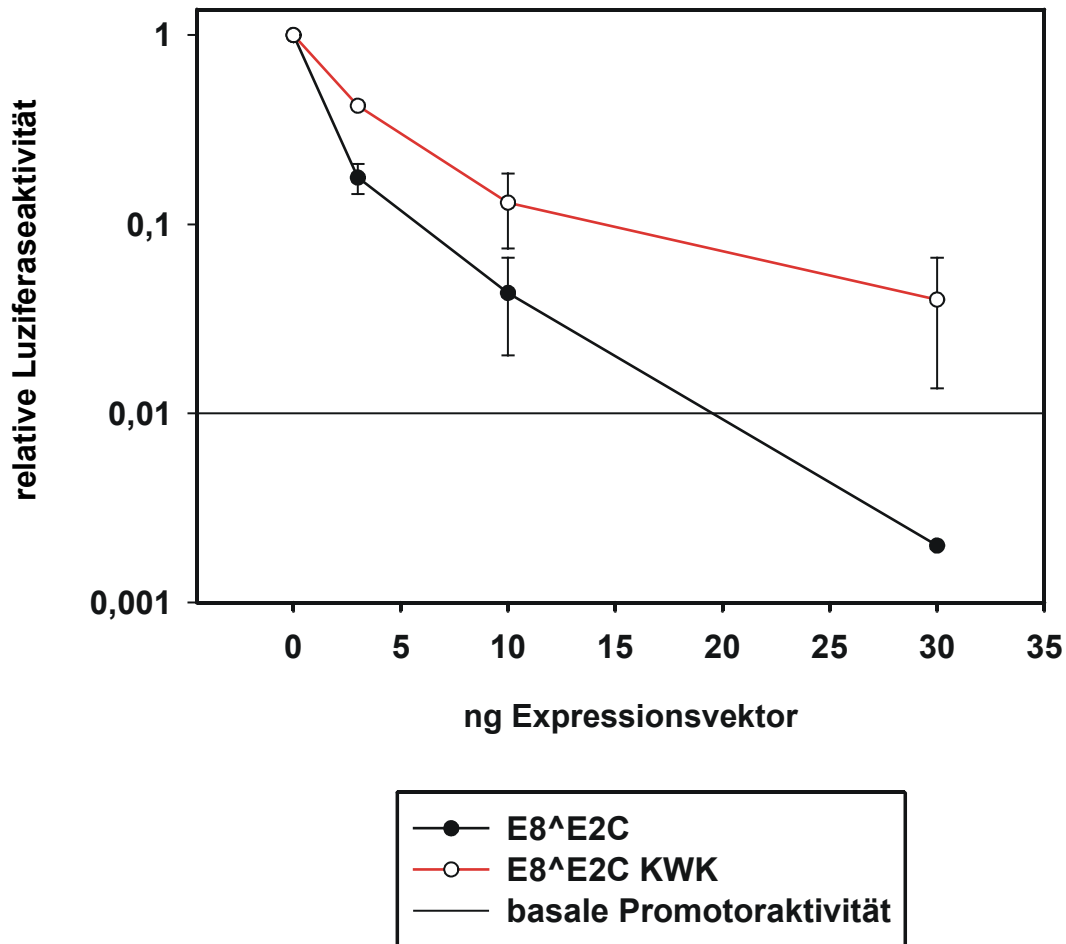
Regulation der Basalaktivität verschiedener minimaler, synthetischer Promotorkonstrukte durch E2, E8^{E2C} und E8^{E2C} KWK.

Primäre humane Keratinozyten wurden mit je 10 ng der Expressionsvektoren für E2, E8^{E2C} oder E8^{E2C} KWK bzw. dem leeren Expressionsvektor pSG5 sowie 200 ng der Luziferase-Reporterplasmide pC18-SP1-luc, pC18-luc oder pML44-luc kotransfiziert. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität des Reporterplasmids bei Kotransfektion von pSG5 bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien über den Balken dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Struktur der Reporterplasmide mit den transkriptionellen Kontrollelementen, den E2BS, SP1-Bindungsstellen (SP1), der TATA-Box (TATA) und dem Initiator-Element (INR) des späten Adenovirus Hauptpromotors.

4.9 Die Fernrepression durch E8^{E2C} wird nicht für die Repression der E2-vermittelten Transaktivierung benötigt

Als nächstes stellte sich die Frage, welche Bedeutung die Fernrepression durch E8^{E2C} für die Repression der Transaktivierung durch E2 besitzt. Zur Klärung dieser Frage wurde das Reporterplasmid pC18-SP1-luc mit einer konstanten Menge des Expressionsvektors für E2 (10 ng) und steigenden Mengen (0, 3, 10, 30 ng) der Expressionsvektoren für E8^{E2C} oder E8^{E2C} KWK in primären humanen Keratinozyten kotransfiziert.

Steigende Mengen des Expressionsvektors für E8^{E2C} führten zu einer konzentrationsabhängigen, wie bereits früher für BPV1, HPV16 und HPV31 beschriebenen (Bouvard et al., 1994; Choe et al., 1989; Stubenrauch et al., 2000), Reduktion der Transaktivierung durch E2 (**Abb. 13**). Kotransfektion von 30 ng des Expressionsvektors für E8^{E2C} resultierten in einer Reduktion der Transaktivierung auf 0,2 %, die der Repression der Basalaktivität in Abwesenheit von E2 entsprach. Die Kotransfektion steigender Mengen des Expressionsvektors für E8^{E2C} KWK resultierte gleichfalls in einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Transaktivierung durch E2 (**Abb. 13**), die sich allerdings als weniger effizient erwies und nicht zu einer Repression unter die Basalaktivität führte (4 % der Transaktivierung durch E2). Diese Ergebnisse zeigten, daß die Fernrepressionsaktivität der E8-Domäne von E8^{E2C} die Repression der Transaktivierung durch E2 verstärkt und selbst in Anwesenheit von E2 zu einer Reduktion der Basalaktivität eines minimalen Promotors führen kann.

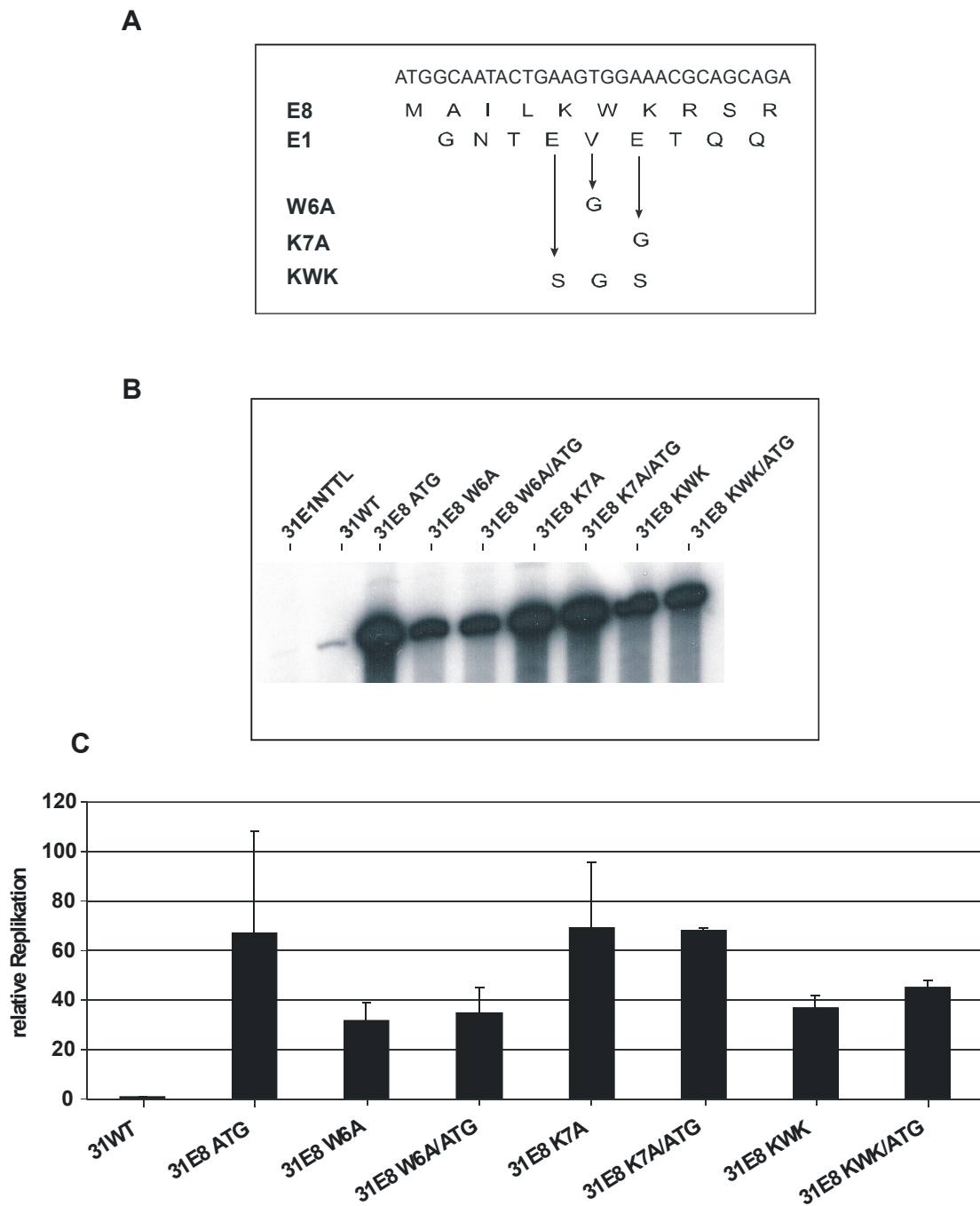
**Abb. 13****Vergleich der Effekte von E8^E2C und E8^E2C KWK auf die transkriptionelle Transaktivierung durch E2.**

Primäre humane Keratinozyten wurden mit 200 ng des Luziferase-Reporterplasmids pC18-SP1-luc, 10 ng des Expressionsvektors für E2 sowie steigenden Mengen der Expressionsvektoren für E8^E2C oder E8^E2C KWK (0, 3, 10, 30 ng) kotransfiziert. Die Gesamtmenge an Expressionsvektor wurde durch die Zugabe des leeren Vektors pSG5 konstant gehalten. Die relative Luziferaseaktivität in der Anwesenheit von 10 ng E2 wurde gleich 1 gesetzt. Die basale Promotoraktivität in Anwesenheit von pSG5 war 0,01 und ist als Referenz dargestellt. Die vertikalen Linien stellen die Standardabweichungen dar.

4.10 Mutation der Aminosäuren W6 und K7 von E8^{E2C} im HPV31 Genom resultieren in einer drastisch erhöhten viralen DNA-Replikation

Die hohe Sequenz-Konservierung der E8-Domäne unter verschiedenen HPV-Typen legte nahe, daß die Ferndistanzrepressionsaktivität von E8 eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation besitzt. Um die Bedeutung der Ferndistanzrepressionsaktivität für die Kontrolle der viralen Genom-Kopienzahl zu untersuchen, wurden über ortsspezifische Mutagenese HPV31 Genom-Mutanten (HPV31-E8W6A, HPV31-E8K7A und HPV31-E8KWK) hergestellt, in welchen die vorcharakterisierten Mutationen in E8 eingeführt wurden (**Abb. 14 a**). Die transiente Replikation der HPV31 Mutanten wurde durch Transfektion von primären humanen Keratinozyten untersucht. Nach 96 h wurde niedrig-molekulare DNA aus den transfizierten Zellen isoliert, mit dem Restriktionsenzym *DpnI* behandelt, um nicht-replizierte Ausgangs-DNA zu entfernen und mittels "Southern Blot"-Analysen quantifiziert.

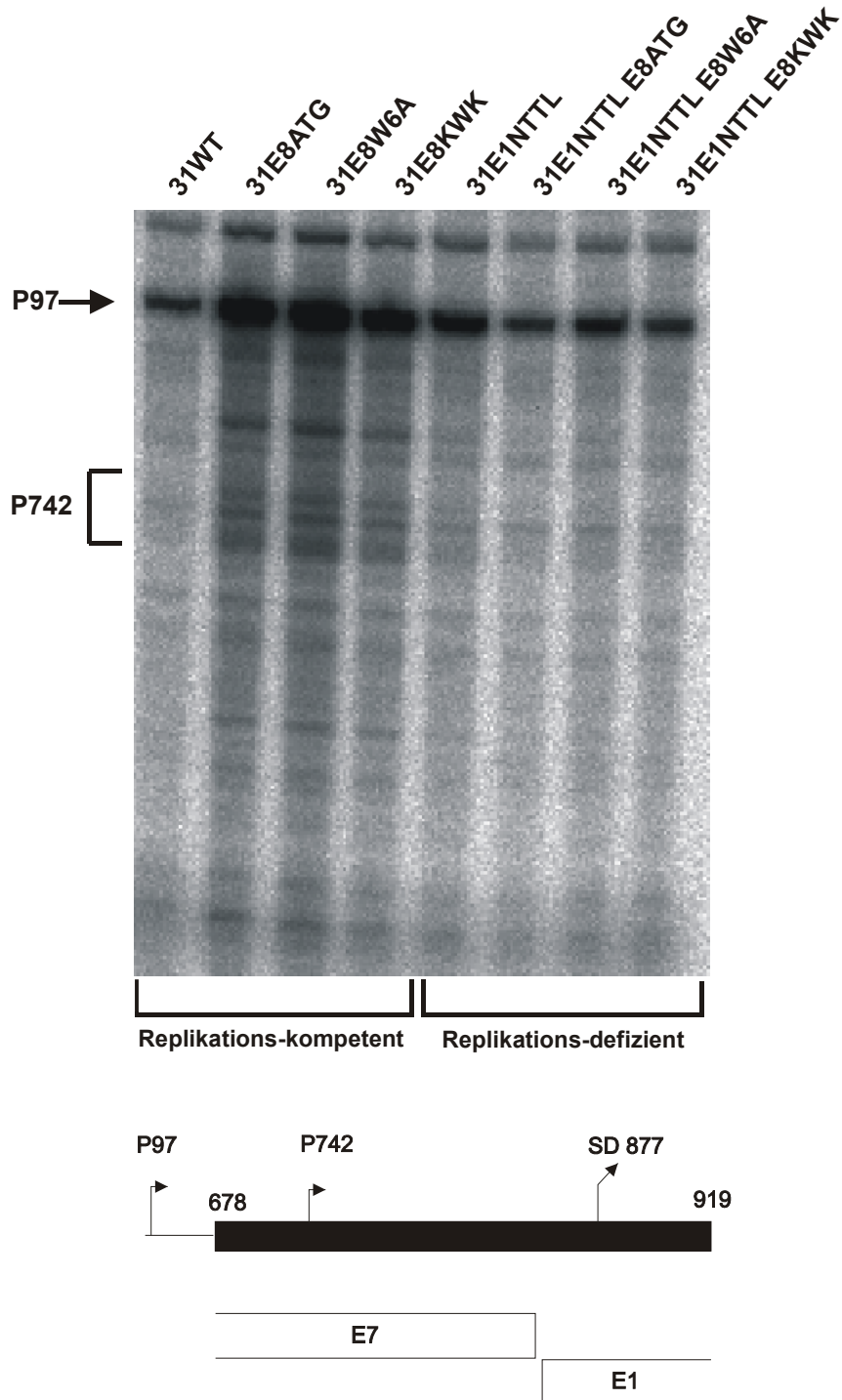
Die HPV31-E8ATG Mutante, welche kein E8^{E2C} exprimieren kann, zeigte im Vergleich zum HPV31 WT-Genom einen drastischen Anstieg der Genom-Kopienzahl um das 67-fache (**Abb. 14 b und c**). Ähnlich verhielten sich die HPV31 Genome mit Mutationen der Aminosäuren W6, K7 und des KWK-Motivs von E8^{E2C}, die 32-, 69- bzw. 37-fach besser replizierten als das HPV31 WT-Genom. Da der E8 und E1 Leserahmen überlappen, könnte die im Vergleich zu HPV31-E8K7A verringerte Replikation der HPV31-E8W6A und -KWK Genome auf die zusätzlichen Mutationen in E1 zurückzuführen sein (**Abb. 14 a**). Zur Kontrolle wurden die entsprechenden Mutationen in E8^{E2C} mit der in E1 stummen E8 ATG-Mutation kombiniert. Der Vergleich der Replikationsaktivitäten der Genome 31-E8W6A und 31-E8KWK mit den entsprechenden E8 ATG-Mutanten zeigte, daß die im Vergleich zu 31-E8ATG und 31-E8K7A/E8ATG leicht reduzierte Genom-Kopienzahl aus den Veränderungen im überlappenden E1 Gen resultiert (**Abb. 14 c**). Aufgrund dieser Daten scheint die Fernrepression durch E8^{E2C} für die limitierte DNA-Replikation von HPV31 WT-Genomen in undifferenzierten Keratinozyten verantwortlich zu sein. Die Bindungsstellenkompetition mit E2 scheint für die Kontrolle der Replikation nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die getesteten E8^{E2C}-Mutanten W6A, K7A und KWK DNA-Bindungsaktivität besitzen und insbesondere die E8^{E2C} KWK-Mutante in der Lage ist, die Transaktivierung durch E2 zu verhindern (siehe **Abb. 13**).

**Abb. 14****Transiente Replikation von HPV31 E8^{E2C} Genom-Mutanten.**

(A) Partieller Ausschnitt der DNA-Sequenz von HPV31 (oben; Nt. 1259 bis 1288) und der entsprechenden Aminosäuresequenz der E8 und E1 Gene (unten). Die aus der Mutation von E8 resultierenden Aminosäureaustausche in E1 sind darunter dargestellt. (B) Repräsentativer "Southern Blot" einer transienten Replikation des HPV31 WT-Genoms und verschiedener Genom-Mutanten in primären humanen Keratinozyten. Das replikations-defiziente HPV31-E1N-TTL Genom diente als Negativkontrolle. (C) Grafische Darstellung der relativen Replikation der HPV31 Genome. Die Signalintensitäten der *DpnI*-resistenten DNA wurden mit dem Phosphoimager quantifiziert. Die Replikation der HPV31 Genom-Mutanten wurde auf die Replikation des HPV31 WT-Genoms bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus drei verschiedenen Experimenten gebildet.

4.11 Die Überreplikation von HPV31 E8^{E2C}-Mutanten resultiert nicht aus einem Anstieg der viralen Transkription

Der starke Effekt der E8-Mutanten auf die HPV31 DNA-Replikation könnte auf einer Veränderung der viralen Genexpression beruhen. Um dies zu untersuchen wurden primäre humane Keratinozyten mit dem HPV31 WT-Genom oder den Mutanten 31-E8ATG, 31-E8W6A und 31-E8KWK transfiziert und nach 48 h polyA⁺-RNA isoliert. Jeweils 2 µg polyA⁺-RNA wurden in RNase-Protektionsexperimenten mit einer Antisense-Sonde (pRP742, **Abb. 15**) untersucht, welche die simultane Detektion von Transkripten des frühen viralen Haupt-Promotors P97 und des späten viralen Haupt-Promotors P742 ermöglicht (Klump et al., 1997). Da sich innerhalb des verwendeten Fragments ein Spleissdonor an Position 877 des HPV31-Genoms (SD 877) befindet, konnten sowohl ungespleisste als auch gespleisste Transkripte detektiert werden. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einem denaturierenden Harnstoff-Gel, das mit dem Phosphoimager quantitativ ausgewertet wurde. Die HPV31-E8ATG, -W6A und -KWK Genom-Mutanten zeigten im Vergleich zum HPV31 WT-Genom einen starken Anstieg der Transkriptmengen des frühen Promotors P97 und eine Induktion des späten Promotors P742 (**Abb. 15**). Da dieser Anstieg der Transkriptmengen auch eine Konsequenz der stark erhöhten Genom-Kopienzahl dieser Mutanten (vgl. **Abb. 14 c**) darstellen könnte, wurden replikations-defiziente Genome mit einem Translations-Terminations-Linker in E1 als Kontrolle hergestellt (31-E1N-TTL, 31-E1N-TTL-E8ATG, 31-E1N-TTL-E8W6A und 31-E1N-TTL-E8KWK) und in Transfektionsexperimenten untersucht. Die replikations-defizienten E8-Genom-Mutanten zeigten keinen Unterschied in den Transkriptmengen von P97 und P742 verglichen mit dem 31-E1N-TTL Genom. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die starke Überreplikation der HPV31 E8-Mutanten nicht durch eine erhöhte virale Transkription bedingt war, sondern möglicherweise auf einen direkten Einfluß auf die DNA-Replikation durch die E8-Domäne von E8^{E2C} zurückzuführen war.

**Abb. 15****RNase-Protektionsanalyse von P97- und P742-spezifischen Transkripten von replikations-kompetenten und –defizienten HPV31 Genomen.**

Der obere Teil der Abbildung zeigt eine repräsentative RNase-Protektionsanalyse von 2 µg polyA+RNA aus primären humanen Keratinozyten, die transient mit verschiedenen replikations-kompetenten und –defizienten HPV31 Genomen transfiziert wurden. Die Bezeichnungen der benutzten Genome sind über den jeweiligen Spuren angegeben. Die Positionen der gespleissten Transkripte, welche am frühen Haupt-Promotor P97 und am späten Haupt-Promotor P742 initiiert werden, sind durch einen Pfeil bzw. eine Klammer markiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt schematisch die Lage der verwendeten "antisense"-RNA-Sonde pRP742 im HPV31 Genom (Balken; HPV31 Nt. 678 bis 919) mit dem Spleiß-Donor bei Nt. 877 sowie die Positionen der offenen Leserahmen für E7 und E1.

4.12 Klonierung, Expression und Nachweis von E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteinen

Um den Einfluss der E8-Domäne auf die DNA-Replikation zu analysieren, mussten zunächst Bedingungen geschaffen werden, die eine von Bindungsstellenkompetition und Heterodimerisierung zwischen E2 und E8^{E2C} unabhängige Untersuchung ermöglichten. Gleichzeitig sollte die minimale Repressionsdomäne von E8^{E2C}, die für eine vollständige Repressionsaktivität benötigt wird, genauer eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurde die DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne von E8^{E2C} (E2C) durch die heterologe DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne (DBD) des *S. cerevisiae* GAL4 Proteins ersetzt, welches vergleichbar mit E2 spezifisch als Dimer an DNA bindet. Die aminoterminalen 12, 21 oder 37 Aminosäuren von E8^{E2C} oder E8^{E2C} KWK wurden an die GAL4-DBD fusioniert (**Abb. 16**). Die N-terminalen 12 Aminosäuren von E8^{E2C} stellen die E8-Domäne dar, wohingegen die Aminosäuren 1-21 und 1-37 weitere Anteile der "Hinge"-Region von E8^{E2C} enthalten. Die Klonierung der E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionskonstrukte erfolgte durch Insertion der entsprechenden doppelsträngigen Oligonukleotide in die *EcoRI*-Bindungsstelle von pSG-GAL4.

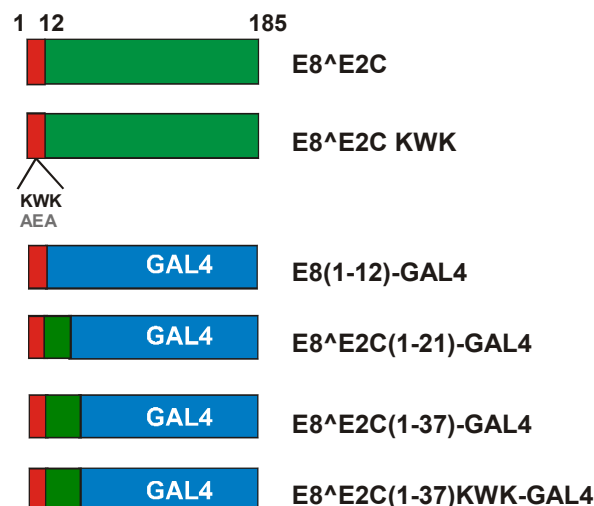


Abb. 16
Schematische Darstellung der Struktur von E8^{E2C} sowie der E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine.

Der obere Teil der Abbildung zeigt die Struktur des HPV31 E8^{E2C} Proteins sowie der Fernrepressions-defizienten E8^{E2C} KWK Mutante. Die E8-Domäne ist in rot und der C-terminale Teil aus der "Hinge"-Region und der DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne in grün abgebildet. Der Aminosäureaustausch in der E8-Domäne von E8^{E2C} KWK ist hervorgehoben. Im unteren Teil der Abbildung sind die Fusionen der ersten 12, 21 und 37 Aminosäuren von E8^{E2C} bzw. E8^{E2C} KWK an die heterologe DNA-Bindungsdomäne des *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktors GAL4 dargestellt.

Zum Nachweis der Expression und Stabilität der E8^{E2C}-GAL4-DBD-Fusionsproteine wurden die Expressionsplasmide für GAL4 oder die Fusionsproteine E8(1-12)-GAL4, E8^{E2C}(1-21)-GAL4, E8^{E2C}(1-37)-GAL4 und E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4 transient in Phoenix-Zellen, eine modifizierte humane 293-Zelllinie, transfiziert. Gesamtproteinextrakte wurden 48 h nach der Transfektion durch Lyse der Zellen in SDS-Probenpuffer gewonnen und in Western-Blot-Analysen untersucht. Der spezifische Nachweis der GAL4-Fusionsproteine erfolgte mit einem polyklonalen anti-GAL4-DBD-Antikörper aus Kaninchen sowie einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper aus Schwein, der über Chemilumineszenz mit dem Fluor-S-MAX-Imager detektiert werden konnte. Die Western-Blot-Analyse zeigte spezifische Banden, deren Größe den errechneten Molekulargewichten der GAL4-DBD (17 kDa) und der E8^{E2C}-GAL4-DBD-Fusionsproteine (19, 20 bzw. 22 kDa) entsprachen (**Abb. 17**). E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4 besaß eine zweite, kleinere Bande, deren Größe dem Molekulargewicht der GAL4-DBD entsprach. Alle GAL4-Fusionsproteine wurden stabil exprimiert, zeigten allerdings eine reproduzierbare Reduktion der Bandenintensität und damit der Proteinmenge in den Extrakten von E8(1-12)-GAL4 über E8^{E2C}(1-21)-GAL4 zu E8^{E2C}(1-37)-GAL4. E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4 zeigte eine wesentlich höhere Proteinmenge als E8^{E2C}(1-37)-GAL4.

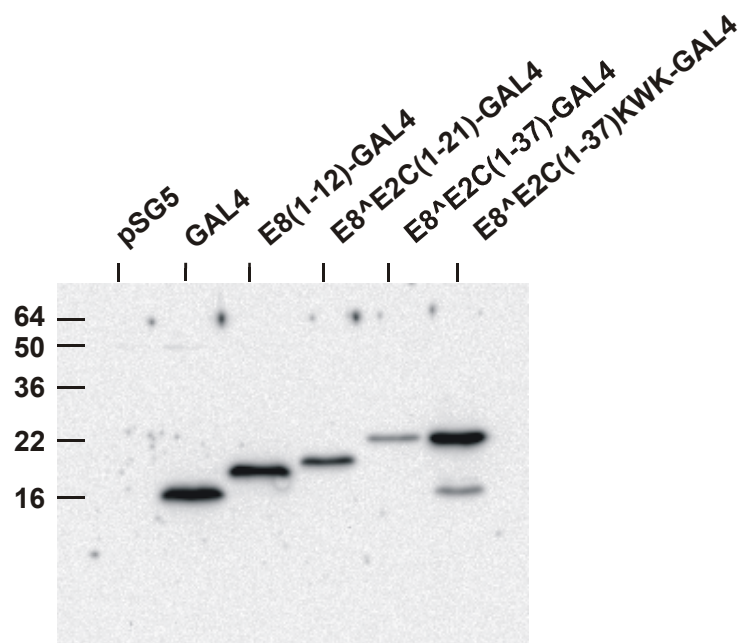


Abb. 17

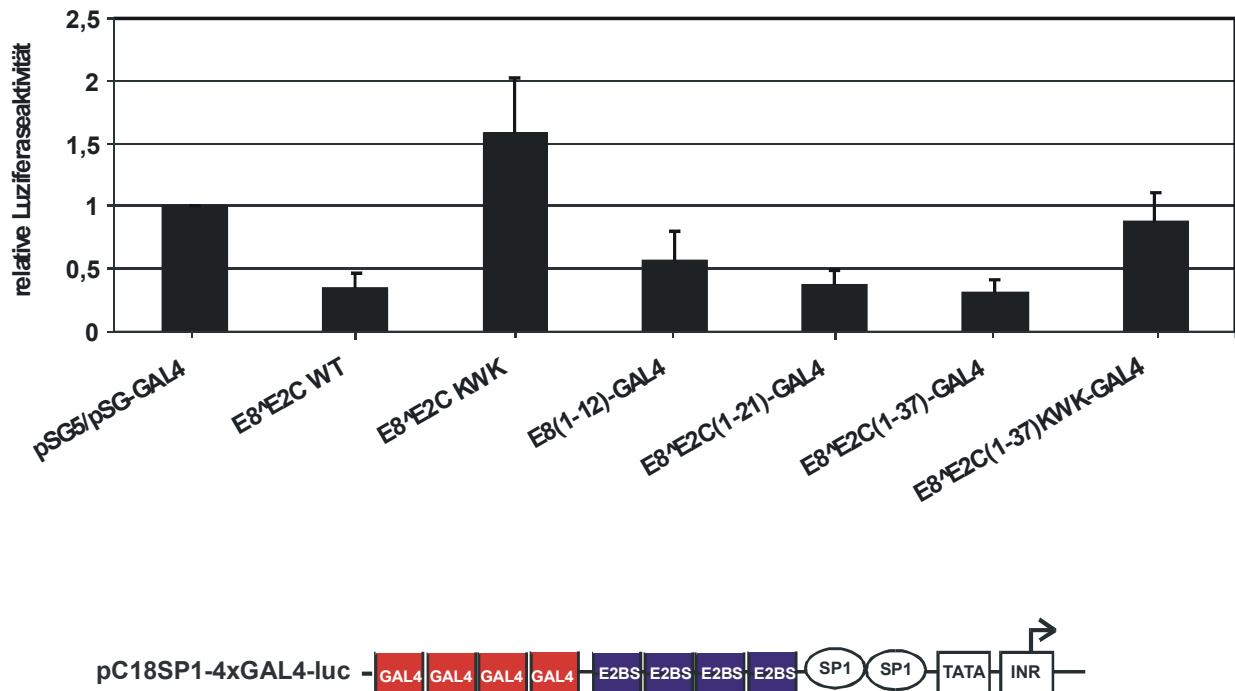
Immunologischer Nachweis der E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine.

Humane 293 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine, die GAL4-DBD oder mit dem leeren Expressionsvektor pSG5 transfiziert. Western-Blot-Analysen von Gesamtproteinextrakten wurden mit einem spezifischen, gegen die GAL4-DNA-Bindungsdomäne gerichteten Antikörper, durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit SuperSignal West Pico.

4.13 Eine minimale Domäne von E8^{E2C} genügt zur effizienten Repression eines minimalen, synthetischen Promotorkonstruktes

Die transkriptionelle Repressionsaktivität der GAL4-Fusionsproteine wurde in SCC13-Keratinocyten durch transiente Transfektion der Expressionsvektoren für die Fusionsproteine (pSG-E8(1-12)-GAL4, pSG-E8^{E2C}(1-21)-GAL4, pSG-E8^{E2C}(1-37)-GAL4 und pSG-E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4) bzw. des Expressionsvektors für die GAL4-DBD (pSG-GAL4) mit dem Luziferase-Reporterplasmid pC18-SP1-4xGAL4-luc untersucht. Das Reporterplasmid pC18-SP1-4xGAL4-luc basiert auf dem bereits beschriebenen Plasmid pC18-SP1-luc (**Abb. 12**), enthält aber neben den vier Konsensus-E2BS und dem minimalen Promotor vier zusätzliche GAL4-Bindungsstellen (**Abb. 18**). 30 ng der Expressionsplasmide für E8^{E2C} oder die GAL4-Fusionsproteine wurden mit 30 ng des leeren Vektors pSG5 oder pSG-GAL4 ausgeglichen und mit 200 ng des Reporterplasmids pC18-SP1-4xGAL4-luc kotransfiziert. Luziferase-Reporteranalysen wurden 48 h nach der Transfektion durchgeführt.

E8^{E2C}(1-21)-GAL4 und E8^{E2C}(1-37)-GAL4 reprimierten die Promotoraktivität von pC18-SP1-4xGAL4-luc ebenso effizient wie das E8^{E2C} WT-Protein auf etwa 35 % der Basalaktivität (**Abb. 18**). Im Gegensatz dazu zeigte E8(1-12)-GAL4 einen leichten Verlust der Repression auf 57 % der Basalaktivität. Die Repression durch die E8-Domäne war wiederum abhängig von der Anwesenheit des zentralen KWK-Motivs. E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4 zeigte einen fast vollständigen Verlust der Repression auf 87 % der Basalaktivität und entsprach damit der E8^{E2C} KWK-Mutante, die sogar aktivierend auf pC18-SP1-4xGAL4-luc wirkte. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Aminosäurereste 1 bis 21 von E8^{E2C} eine minimale, transferierbare Repressionsdomäne darstellen, die von einem intakten KWK-Motiv abhängt.

**Abb. 18****Modulation der Basalaktivität eines minimalen, synthetischen Promotors durch E8^E2C-GAL4-DBD Fusionsproteine.**

SCC13-Keratinocyten wurden mit 30 ng der Expressionsvektoren für E8^E2C, E8^E2C KWK oder die verschiedenen E8^E2C-GAL4-DBD Fusionsproteine sowie dem Luziferase-Reporterplasmid pC18-SP1-4xGAL4-luc kotransfiziert. Zum Ausgleich wurden zusätzlich je 30 ng des leeren Expressionsvektors pSG5 zu Transfektionen mit Expressionsvektoren für E8^E2C-GAL4-DBD Fusionsproteine bzw. je 30 ng des Expressionsvektors für die GAL4-DBD (pSG-GAL4) zu Transfektionen mit Expressionsvektoren für E8^E2C Proteine gegeben. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität des Reporterplasmids bei Kotransfektion von je 30 ng pSG5 und pSG-GAL4 bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Die Struktur des Luziferase-Reporterplasmids pC18-SP1-4xGAL4-luc ist unten dargestellt. Es entspricht pC18-SP1-luc (siehe **Abb. 12**), enthält aber zusätzlich vier GAL4-Bindungsstellen (GAL4).

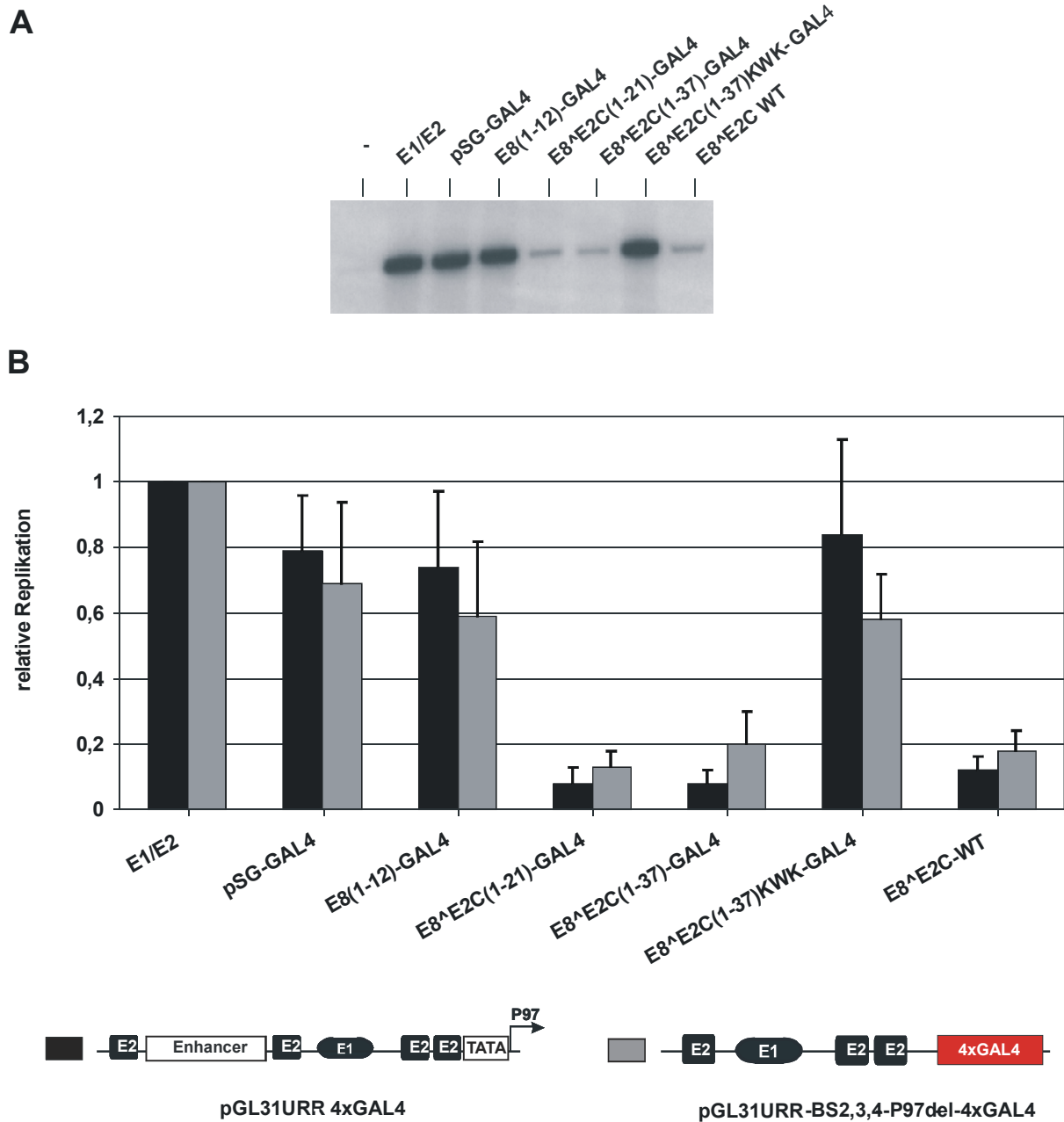
4.14 Die minimale transkriptionelle Repressordomäne von E8^E2C wirkt als Repressor des HPV31 Replikationsursprungs

Die Wirkung der E8^E2C-GAL4-DBD Fusionsproteine auf die transiente Replikation des HPV31 Ursprungs wurde mit einem Reporterplasmid untersucht, das im Rahmen dieser Arbeit durch Insertion von vier GAL4-Bindungsstellen in das Plasmid pGL31URR konstruiert wurde. Das resultierende Plasmid pGL31URR-4xGAL4 enthält die komplette regulatorische Region (URR) von HPV31 mit den vier E2BS (**Abb. 19**). Transiente Replikationsanalysen

wurden nach Kotransfektion von pGL31URR-4xGAL4 mit den Expressionsplasmiden für E1 und E2 sowie der verschiedenen GAL4-Fusionsproteine oder E8^{E2C} in SCC13-Keratinocyten durchgeführt. Zur Kontrolle des Einflusses der GAL4-DNA-Bindungsdomäne auf die transiente Replikation wurde die Positivkontrolle von E1 und E2 in zwei verschiedenen Ansätzen mit pSG5 oder pSG-GAL4 kotransfiziert. Alle weiteren Ansätze wurden für vergleichbare Bedingungen mit pSG5 oder pSG-GAL4 aufgefüllt. Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion geerntet und die neu-replizierte DNA wurde durch Southern-Blot-Analysen quantifiziert.

Die Kotransfektion der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pSG-GAL4) resultierte in einer Reduktion der transienten Replikation auf etwa 80 % des Ausgangswertes mit pSG5 (**Abb. 19**). Die Kotransfektion von E8^{E2C}(1-21)-GAL4 und E8^{E2C}(1-37)-GAL4 führte zu einer starken Repression der E1/E2-abhängigen Ursprungsreplikation, die der Reduktion durch das E8^{E2C} WT-Protein entsprach. Beide GAL4-Fusionsproteine reduzierten die transiente Replikation auf 8 % der Ausgangswerte mit pSG5. E8(1-12)-GAL4 und E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4 zeigten keine Repression der Ursprungsreplikation, verglichen mit pSG-GAL4. Diese Ergebnisse zeigten, daß die ersten 21 Aminosäuren von E8^{E2C} als minimale Repressor-domäne für die Repression der viralen DNA-Replikation wirken, unabhängig von Bindungsstellenkompetition oder Heterodimerisierung mit E2.

Nun stellte sich die Frage, ob die Repression der Replikation mit der transkriptionellen Repression von P97 oder dem "Enhancer"-Element in der regulatorischen Region von HPV31 in Verbindung steht. Dazu wurde das Reporterplasmid pGL31BS2,3,4-4xGAL4 kloniert, dem die E2BS1 sowie das "Enhancer"-Element und der frühe Promotor P97 von pGL31URR-4xGAL4 fehlen (**Abb. 19**). Transiente Replikationsstudien des minimalen Replikationsursprungs wurden wie bereits für pGL31URR-4xGAL4 beschrieben durchgeführt. E8^{E2C}(1-21)-GAL4 und E8^{E2C}(1-37)-GAL4 zeigten wiederum eine starke Repression der Replikation auf 13 bzw. 20 % der Ausgangswerte (**Abb. 19**). E8(1-12)-GAL4 und E8^{E2C}(1-37)KWK-GAL4 führten auch bei diesem Reporterplasmid zu keiner Repression der Replikation, verglichen mit pSG-GAL4. Die Repression der Replikation durch die minimale Repressionsdomäne erfolgt damit unabhängig von der Anwesenheit der "Enhancer"-Region und des P97 Promotors.

**Abb. 19****Transiente Replikation des HPV31 Ursprungs in Anwesenheit der E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine.**

Transiente Replikationsanalysen der Reporterplasmide pGL31URR-4xGAL4 oder pGL31BS2,3,4-4xGAL4 wurden in SCC13-Keratinozyten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Expressionsvektoren für E1 und E2 mit Expressionsvektoren für die GAL4-DBD, die E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine oder E8^{E2C} kotransfiziert. Die Signalintensitäten der *DpnI*-resistenten DNA wurden nach Southern Blot-Analysen mit dem Phosphorimager quantifiziert. (A) Repräsentativer Southern-Blot der transienten Replikation von pGL31URR-4xGAL4. (B) Grafische Darstellung der Ergebnisse. Die Replikation der verschiedenen Plasmid-Kombinationen wurde auf die Replikation der Reporterplasmide in Anwesenheit von E1 und E2 bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die schematische Struktur der Reporterplasmide. Die Bindungsstellen für E1, E2 sowie GAL4 sind ebenso wie das "Enhancer"-Element der regulatorischen Region von HPV31 und die TATA-Box des P97 Promotors dargestellt.

4.15 E8^AE2C(1-21)-GAL4 inhibiert die Replikation von oriP des Epstein-Barr-Virus (EBV)

Nun stellte sich die Frage, ob die Repression der Replikation auf den Replikationsursprung von HPV31 beschränkt ist, oder ob auch heterologe Replikationsursprünge durch die minimale Repressionsdomäne von E8^AE2C reprimiert werden können. Als Modellsystem wurde das Epstein-Barr-Virus (EBV) gewählt, ein karzinogenes Mitglied der humanen Herpesvirus-Familie, dessen Genom während der latenten Phase der Infektion wie die Papillomvirus-Genome episomal in infizierten Zellen repliziert (Leight und Sugden, 2000) (Tab. 1).

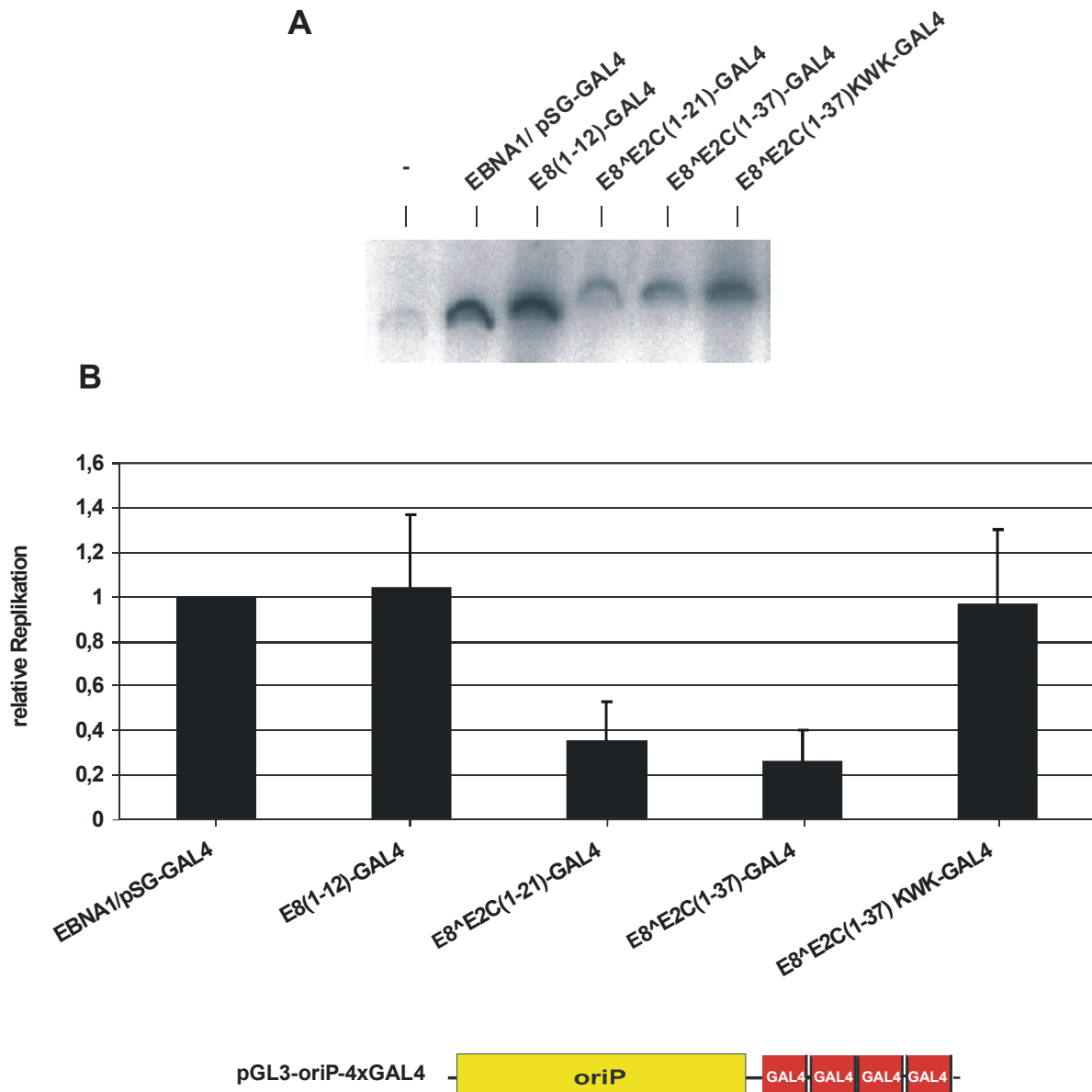
Tab. 1
Vergleich der Regulation der DNA-Replikation humaner Papillomviren und des Epstein-Barr-Virus (EBV) unter nicht-produktiven Bedingungen.

	<u>Papillomvirus</u>	<u>Epstein-Barr-Virus (oriP)</u>
Extrachromosomale Genomkopien pro Zelle	10-100	10-50
Erforderliche virale Proteine:	E1 <ul style="list-style-type: none"> • Ursprung bindendes Protein • Helikase • ATPase E2	EBNA1 <ul style="list-style-type: none"> • Ursprung bindendes Protein • keine bekannte enzymatische Aktivität • interagiert mit dem zellulären "origin recognition complex" (ORC)
Negativer Regulator:	E8 ^A E2C	?
Replikation in S-Phase	Ja	Ja
Beschränkt auf einmal pro Zellzyklus	Nein	Ja (benötigt ORC)
Kontrollmechanismus	Kopienzahlkontrolle	"replication licensing"

Die einzigen viralen Komponenten, die für die episomale Replikation von EBV benötigt werden, sind der latente Replikationsursprung oriP sowie das EBNA-1 Protein (Leight und Sugden, 2000). Der etwa 1,8 kb umfassende oriP enthält zwei in *cis* aktive Elemente, die für die Initiation der Replikation (DS-Element) und die Verteilung der viralen DNA an die Tochterzellen (FR-Element) benötigt werden. Beide Elemente enthalten mehrere Bindungsstellen für das nukleäre EBNA-1 Protein. Das EBNA-1 Protein besitzt keine bekannte enzymatische Aktivität, spielt aber in der latenten Phase der EBV-Infektion eine entscheidende Rolle bei der Replikation und der Regulation der viralen Genexpression. Das EBV-Genom repliziert im Gegensatz zum Papillomvirus-Genom nur einmal pro Zellzyklus, unterliegt also wie die chromosomale DNA der Wirtszelle dem sogenannten "replication licensing". Diese Kontrolle wird durch die Interaktion von EBNA-1 mit dem zellulären "origin recognition complex" (ORC) ermöglicht (Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001), eines Proteinkomplexes, der auch für die Initiation der zellulären DNA-Replikation benötigt wird (Bell und Dutta, 2002). Damit dient oriP nicht nur als Modell für einen heterologen viralen Replikationsursprung, sondern auch als Modell für die Initiation der zellulären DNA-Replikation.

Um den Effekt der GAL4-Fusionsproteine auf die transiente Replikation von oriP zu untersuchen, wurde ein Replikations-Reporterplasmid kloniert, das neben oriP vier GAL4-Bindungsstellen enthält (pGL3-oriP-4xGAL4, **Abb. 20**). Die transiente Replikation von pGL3-oriP-4xGAL4 in HeLa-Zellen wurde 144 h nach der Kotransfektion des Reporterplasmids mit den Expressionsplasmiden für EBNA-1 und pSG-GAL4 oder den GAL4-Fusionsproteinen analysiert. Neu replizierte DNA wurde durch Southern-Blot-Analysen nachgewiesen und mit dem Phosphoimager quantifiziert.

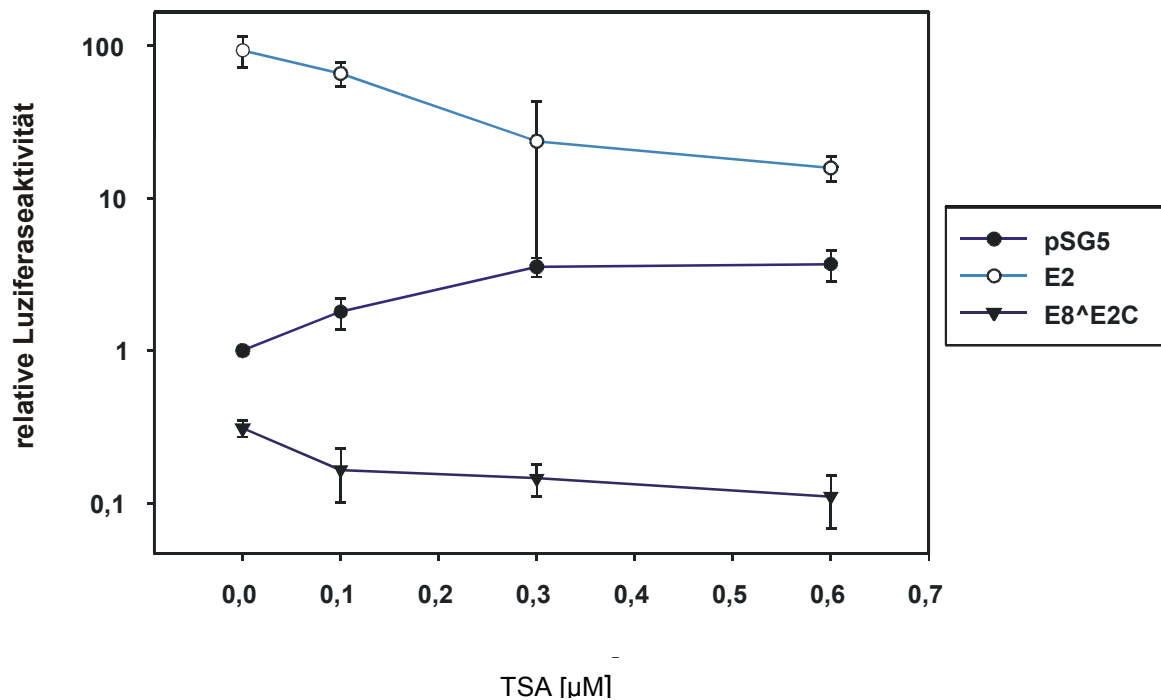
E8^AE2C(1-21)-GAL4 und E8^AE2C(1-37)-GAL4 reprimierten die EBNA-1 abhängige Replikation von pGL3-oriP-4xGAL4 auf 35 bzw. 26 % der Ausgangswerte mit pSG-GAL4 (**Abb. 20**). Im Gegensatz dazu zeigten E8(1-12)-GAL4 und E8^AE2C(1-37)KWK-GAL4 einen vollständigen Verlust der Repression der Replikation von pGL3-oriP-4xGAL4. Eine minimale Domäne der N-terminalen 21 Aminosäuren von E8^AE2C konnte damit nicht nur den Replikationsursprung von HPV31, sondern auch die Replikation des heterologen oriP von EBV reprimieren.

**Abb. 20****Effekt der E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine auf die Replikation des heterologen EBV oriP.**

HeLa-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pGL3-oriP-4xGAL4 und Expressionsplasmiden für EBNA1 sowie die GAL4-DBD (pSG-GAL4) oder die E8^{E2C}-GAL4-DBD Fusionsproteine kotransfiziert. Transient replizierte, *DpnI*-sensitive Reporterplasmide wurden in Southern Blot-Analysen detektiert und mit dem Phosphoimager quantifiziert. (A) Repräsentativer Southern-Blot der transienten Replikation von pGL3-oriP-4xGAL4. (B) Grafische Darstellung der Ergebnisse. Die relative Replikation des Reporterplasmids wurde auf die Replikation in Anwesenheit von EBNA1 und der GAL4-DBD bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die schematische Struktur des Reporterplasmids pGL3-oriP-4xGAL4 mit dem Replikationsursprung oriP, der multiple EBNA1-Bindungsstellen enthält, sowie vier GAL4-Bindungsstellen (GAL4).

4.16 Die Repression des minimalen, synthetischen Luziferase-Reporterkonstrukts pC18-luc durch E8^{E2C} ist unabhängig von Histon-Deacetylierung

Nachdem die Bedeutung der E8-Domäne für die Repression der Transkription und Replikation homologer und heterologer Modellsysteme gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage nach dem Mechanismus der Repression. Als möglicher Mechanismus zur Erklärung der Repression der Transkription und Replikation durch E8^{E2C} erschien die Chromatin-Modifikation. Ein bedeutender zellulärer Mechanismus zur Veränderung der Chromatinstruktur ist die Histon-Deacetylierung, die in einer Repression der Genexpression resultieren kann (Maldonado et al., 1999; Marks et al., 2001; Tyler et al., 1999; Workman und Kingston, 1998). Die meisten bekannten Histon-Deacetylasen (HDAC), mit Ausnahme der Sir-Familie, werden durch den spezifischen synthetischen Inhibitor Trichostatin A (TSA) mit großer Affinität inhibiert (Marks et al., 2001; Rusche et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Histon-Deacetylierung auf die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} untersucht. Das minimale, synthetische Luziferase-Reporterplasmid pC18-luc wurde mit 10 ng der Expressionsplasmide für HPV31 E2, E8^{E2C} oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 in primäre humane Keratinozyten kotransfiziert. Nach 24 h wurden steigende Mengen TSA zu den transfizierten Zellkulturen gegeben (0, 0,1, 0,3 und 0,6 μM). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität luminometrisch bestimmt. Steigende Konzentrationen von TSA führten zu einem Anstieg der basalen Promotoraktivität auf das 3,7-fache der Ausgangsaktivität (pSG5; 0,6 μM TSA)(**Abb. 21**). Im Gegensatz dazu, führten steigende Konzentrationen von TSA zu einer Steigerung der transkriptionellen Repression durch E8^{E2C} verglichen mit der Repression in Abwesenheit von TSA (0 μM TSA: 31 % der Basalaktivität, 0,6 μM TSA: 11 % der Basalaktivität). Die Transaktivierung der Promotoraktivität durch E2 nahm bei steigenden Konzentrationen von TSA überraschenderweise ab (0 μM TSA: 94-fach, 0,6 μM : 16-fach). Dieser Phänotyp lässt sich vermutlich durch den parallelen Anstieg der basalen Promotoraktivität von pC18-luc erklären, der keine stärkere Aktivierung ermöglicht. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint ein Einfluss von TSA-sensitiven HDAC auf die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} nicht wahrscheinlich zu sein.

**Abb. 21****Vergleich der Regulation eines minimalen, synthetischen Promotors durch E2 und E8^E2C bei Zugabe des Histon-Deacetylase-Inhibitors Trichostatin A.**

Primäre humane Keratinozyten wurden mit 10 ng der Expressionsvektoren für E2, E8^E2C oder dem leeren Expressionsvektor pSG5 sowie je 200 ng des Luziferase-Reporterplasmids pC18-luc (siehe **Abb. 12**) kotransfiziert. Nach 24 h wurden 0, 0,1, 0,3 oder 0,6 μM Trichostatin A (TSA) zu den transfizierten Zellen gegeben. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf die Basalaktivität des Reporterplasmids bei Kotransfektion von pSG5 ohne Zugabe von TSA bezogen, die gleich 1 gesetzt wurde. Die Standardabweichungen sind durch vertikale Linien über den Balken dargestellt.

5 DISKUSSION

Der Replikationszyklus humaner Papillomviren ist eng an den Differenzierungsgrad des infizierten Epithels gekoppelt (Laimins, 1996). In undifferenzierten Keratinozyten in Zellkultur und in den basalen Epithelzellschichten wird die virale DNA-Replikation auf etwa 10-100 Genomkopien pro Zelle limitiert (Stenlund, 1996; Stubenrauch und Laimins, 1999). Mit zunehmender Differenzierung des Epithels in den suprabasalen Zellschichten kommt es zu einer Amplifikation der viralen DNA zu mehreren 1000 Genomkopien pro Zelle sowie zur Expression der späten viralen Proteine mit der Bildung von infektiösen Viruspartikeln (Laimins, 1996; Stubenrauch und Laimins, 1999). Die Kopienzahl-Kontrolle spielt damit eine entscheidende Rolle im Lebenszyklus humaner Papillomviren (Gilbert und Cohen, 1987; Piirsoo et al., 1996). Der exakte Mechanismus der Kopienzahlkontrolle ist unbekannt. Eine Reihe von Beobachtungen lassen jedoch vermuten, daß virale Replikationsaktivator- und Replikationsrepressorproteine eine entscheidende Rolle spielen (Chiang et al., 1992; Lambert et al., 1990; Lim et al., 1998; Riese et al., 1990; Stenlund, 1996; Stubenrauch et al., 1998a; Stubenrauch et al., 2000).

Neben den für die Initiation der DNA-Replikation von Papillomviren essentiellen viralen Proteine E1 und E2, konnten bei verschiedenen Papillomvirus-Typen Transkripte für kurze oder alternativ gespleisste E2 Proteine nachgewiesen werden (Chiang et al., 1991; Doorbar et al., 1990; Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1990; Rotenberg et al., 1989; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000). Diese kurzen E2 Proteine wirken bei allen untersuchten Papillomvirus-Typen (BPV1, HPV11, HPV16 und HPV31) als Repressoren der viralen Replikation oder der Transkription und könnten somit eine wesentliche Rolle bei der viralen Kopienzahl-Kontrolle spielen. Untersuchungen an dem alternativ gespleissten HPV31 E8^{E2C} Protein zeigten, daß ein Verlust von E8^{E2C} im HPV31 Genom zu einer starken Überreplikation der viralen DNA führte und bei Langzeitexperimenten in einer Integration in das Wirtszell-Genom resultierte (Stubenrauch et al., 2000). Die Integration der viralen DNA in das Genom der Wirtszelle wird auch in vielen "high risk"-HPV assoziierten Karzinomen beobachtet (Park et al., 1997). Dabei erfolgt in den meisten Fällen eine Unterbrechung des E2 Gens, die durch den Verlust der transkriptionellen Regulation des frühen Promotors zu einer Deregulation der Expression der Onkogene E6 und E7 führt (Park et al., 1997; Schneider-Maunoury et al., 1987). In Luziferase-Reporteranalysen erwiesen sich sowohl E2 als auch E8^{E2C} als potente Repressoren der Transkription des frühen Promotors P97 von HPV31 (Stubenrauch et al., 2000). Die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} könnte

dabei nach dem gängigen Modell durch Heterodimerisierung oder Bindungsstellenkompetition mit E2 erfolgen (Barsoum et al., 1992; Bouvard et al., 1994; McBride et al., 1989; Lim et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung von E8^{E2C} für den viralen Lebenszyklus von HPV31 sowie der Mechanismus der Repression durch E8^{E2C} genauer charakterisiert werden. Die *cis*- und *trans*-Erfordernisse der transkriptionellen Repression von P97 durch E8^{E2C} wurden mit Hilfe der kompletten regulatorischen Region von HPV31, welche alle vier Bindungsstellen für das E2 Protein enthält, oder entsprechender Mutanten der URR mit inaktivierten E2BS analysiert. Die Repression des frühen Promotors durch E2 erfolgt durch eine Verdrängung von Komponenten des basalen Transkriptions-Initiationskomplexes (Hou et al., 2000) sowie von Transkriptionsfaktoren (Dong et al., 1994; Stubenrauch et al., 1996; Tan et al., 1994) an den promotor-proximalen E2BS3 und 4. Alle untersuchten E2 Proteine (HPV31 E2, E8^{E2C} sowie die Deletionsmutante E8^{E2C} d3-12) reprimierten P97 in Anwesenheit von E2BS3 und 4. Überraschenderweise genügte im Gegensatz zu E2 oder E8^{E2C} d3-12 eine einzelne, promotor-distale E2BS für die Repression durch E8^{E2C}. Damit konnte erstmals eine völlig neuartige transkriptionelle Repressionsaktivität des HPV31 E8^{E2C} Proteins über eine große Distanz nachgewiesen werden. Die Repression durch E8^{E2C} schien alleine von der E8-Domäne und E2BS abzuhängen. E2 bewirkte im Gegensatz zu E8^{E2C} schon nach dem Verlust der promotor-proximalen E2BS4 eine etwa zweifache Transaktivierung von P97, die selbst bei der Mutation aller vier E2BS erhalten blieb. Dieser Effekt der Transaktivierung ohne direkte, spezifische DNA-Bindung lässt sich vermutlich durch die zahlreichen Interaktionen der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von E2 mit zellulären Proteinen, wie z. B. CBP/p300 (Lee et al., 2000), erklären.

Die Spezifität der Fernrepression durch E8^{E2C} wurde zunächst mit dem P2 Promotor von HPV6a untersucht, dessen vier E2BS sämtlich promotor-distal in einer Entfernung von 200 bis 660 nt liegen. E8^{E2C} zeigte auch in diesem heterologen Modellsystem eine starke Fernrepression der basalen Promotoraktivität. Die Repression war abhängig von der E8-Domäne, da E8^{E2C} d3-12 die Basalaktivität nur minimal reprimierte. Diese leichte Repression durch die DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne könnte durch eine Konkurrenz mit zellulären Transkriptionsfaktoren in der regulatorischen Region von HPV6a verursacht werden. Das HPV6a P2 Modellsystem ermöglichte aufgrund der Promotor-Distanz sämtlicher E2BS eine Untersuchung zur Bindungsstellenspezifität der Fernrepression. Die Fernrepression durch E8^{E2C} wurde in gleichem Maße durch die Kombination der E2BS1 und 2 als auch durch E2BS3 und 4 ermöglicht. Nur in Anwesenheit der singulären E2BS1 zeigte E8^{E2C} einen leichten Verlust der Repression über große Distanz, der auf eine Kooperativität der

E2BS für die Repression im Falle des HPV6a Promotors hinweisen könnte. Dieser Effekt konnte aber für den HPV31 P97 Promotor nicht beobachtet werden.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener bekannter und potentieller E8-Domänen humaner Papillomviren zeigt eine starke Konservierung dieser Domäne sowie einen hohen Anteil basischer Aminosäurereste. Der E9-Anteil des analogen CRPV E9^{E2C} Proteins zeigt trotz ähnlicher Repressoreigenschaften keine starke Sequenzhomologie zu den HPV E8 Genen (Jeckel et al., 2003). Möglicherweise könnte es aber strukturelle Ähnlichkeiten der Repressionsdomänen geben. Zur genaueren Charakterisierung der für die Repression durch E8^{E2C} verantwortlichen Aminosäuren wurde eine "Alanin-Scanning"-Mutagenese der Aminosäurereste 3-12 durchgeführt. Alle E8^{E2C}-Mutanten zeigten eine stabile Expression und eine spezifische DNA-Bindungs Kapazität für E2BS. Die in Western-Blot-Analysen gemessenen Expressionsstärken der E8^{E2C} Proteine zeigten für die Mutanten I3A, L4A, W6A, KWK und d3-12 eine konstant höhere Expression als für das E8^{E2C} WT-Protein. Bei E8^{E2C}-Gal4-DBD Fusionsproteinen zeigte ebenfalls die KWK Mutation eine höhere Expression, was darauf hinweist, daß die E8-Domäne zur Protein-stabilität beiträgt. Die Stabilität vieler transkriptioneller Regulatoren wird durch Ubiquitin-abhängige Degradationswege kontrolliert (Salghetti et al., 1999; Salghetti et al., 2000). Das E2-Protein von HPV18 trägt ein Degradationssignal im Bereich der N-terminalen Transaktivierungsdomäne, das offensichtlich wesentlich zu seiner Regulation im viralen Lebenszyklus beiträgt (Bellanger et al., 2001). Die Regulation des gespleissten E8^{E2C}-Proteins, das nur die "Hinge"- und Transaktivierungsdomäne von E2 enthält, könnte daher durch die transkriptionell aktive E8-Domäne erfolgen.

Funktionelle Analysen zeigten, daß Einzelmutation der Aminosäuren W6 und K7 zu einem partiellen Verlust der transkriptionellen Repression über grosse Distanz führte. Eine Kombination dieser Mutationen (KWK) resultierte in einem vollständigen Verlust der Ferndistanzrepressionsaktivität.

Die für die Repression durch E8^{E2C} verantwortlichen *cis*-Elemente wurden mit Hilfe von heterologen Reporterkonstrukten charakterisiert. E8^{E2C} zeigte im Gegensatz zu E8^{E2C} KWK eine starke Repression der Basalaktivität des frühen SV40 Promotors und von minimalen, synthetischen Promotor-Konstrukten, welche synthetische E2BS, SP1-Bindungsstellen und das Initiator-Element/TATA-Box des späten Adenovirus Haupt-Promotors enthielten. Da auch Konstrukte ohne SP1-Bindungsstellen durch E8^{E2C} spezifisch reprimiert wurden, kann ausgeschlossen werden, daß eine Interferenz von E8^{E2C} mit SP1, wie für E2 beschrieben, zur transkriptionellen Repression beiträgt (Dong et al., 1994; Tan et al., 1994). Aufgrund der hohen Expression und DNA-Bindungs Kapazität der E8^{E2C} KWK-

Mutante kann auch ausgeschlossen werden, daß die Repression aus einer Verdrängung anderer zellulärer Proteine von E2BS resultiert.

Die Fernrepressionsaktivität durch E8^{E2C} deutete auf eine Schlüsselrolle des Proteins im Lebenszyklus humaner Papillomviren hin. E8^{E2C} wirkt als Gegenspieler von E2, das vermutlich hauptsächlich als Transaktivator der viralen Transkription und Initiator der viralen DNA-Replikation wirkt (Frattini und Laimins, 1994; McBride et al., 1991; Mohr et al., 1990; Romanczuk et al., 1990; Stenlund, 1996; Yang et al., 1991). E8^{E2C} inhibierte konzentrationsabhängig die Transaktivierung durch E2, was im Einklang steht mit Befunden für BPV1, HPV16 und HPV31 (Bouvard et al., 1994; Choe et al., 1989; Stubenrauch et al., 2000). Da auch E8^{E2C} KWK in der Lage war, mit der Transaktivierung von E2 zu interferieren, ist dies vermutlich auf Heterodimerisierung und Bindungsstellenkompetition durch die C-terminale Domäne zurückzuführen (Barsoum et al., 1992; Bouvard et al., 1994; McBride et al., 1989; Lim et al., 1998). Allerdings wurde die Repressionsaktivität durch die E8-Domäne wesentlich verstärkt und konnte auch nicht durch die höhere Expression bzw. Stabilität von E8^{E2C} KWK ausgeglichen werden.

Mutationen der für die Fernrepression essentiellen Aminosäuren W6 und K7 sowie des KWK-Motivs im Kontext des HPV31 Genoms führten zu einer starken Überreplikation der entsprechenden Genome, welche der Replikationsaktivität von E8^{E2C}-"Knockouts" entsprach. Die limitierte Kopienzahl von HPV31 Genomen in undifferenzierten Keratinozyten wird damit offensichtlich durch die Fernrepressionsaktivität von E8^{E2C} kontrolliert. Transkriptanalysen zeigten einen starken Anstieg der Transkriptmengen von P97 und eine Induktion des späten Promotors P742 in den HPV31-E8W6A und -KWK Mutanten. Replikations-defiziente E8^{E2C} Mutantengenome zeigten dagegen weder eine Induktion von P97- noch von P742-initiierten Transkripten. Dies führte zu der Hypothese, daß die Überreplikation der E8^{E2C}-Genom-Mutanten nicht auf eine transkriptionelle Derepression der viralen Haupt-Promotoren, sondern auf einen direkten Einfluss der E8-Domäne auf die virale DNA-Replikation zurückzuführen war. Die DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne von E8^{E2C} wurde durch die heterologe *S. cerevisiae* GAL4-DBD ersetzt, um den Einfluss auf die Replikation ohne Heterodimerisierung oder Bindungsstellenkompetition mit E2 untersuchen zu können. Die aminoterminalen 12 Aminosäuren der E8-Domäne zeigten im Vergleich zu E8^{E2C} eine deutlich schwächere transkriptionelle Repression, wohingegen die ersten 21 Aminosäuren für eine dem E8^{E2C} Protein entsprechende Repression genügten. Die Repression war auch hier von einem intakten KWK-Motiv abhängig. Die Reduktion der Stabilität der E8^{E2C}-GAL4 Fusionsproteine scheint mit der Fähigkeit zur Repression in

direkter Korrelation zu stehen. Ähnliche Effekte wurden für transkriptionelle Aktivatoren beobachtet, deren Stabilität mit zunehmender Aktivität abnimmt (Molinari et al., 1999). Möglicherweise spielt die posttranslationale Modifikation eine Rolle für die Unterschiede in der Repressionsaktivität der ersten 12 bzw. 21 und 37 Aminosäuren von E8^{E2C}. Sequenzanalysen mit PROSITE (Schweizerisches Institut für Bioinformatik, SIB) zeigten, daß sich im Bereich der Aminosäuren 13-16 von E8^{E2C} ein potentes Casein-Kinase 2 Phosphorylierungssignal befindet (SSDE). Dieses Phosphorylierungssignal könnte aufgrund der geringeren Repressionsaktivität der ersten 12 Aminosäuren eine wichtige Rolle für die Repression durch E8^{E2C} spielen.

In transienten Replikationsanalysen des HPV31 Ursprungs erwiesen sich die ersten 21 Aminosäuren von E8^{E2C} als minimale Repressionsdomäne der viralen DNA-Replikation. Die transkriptionelle Repressionsaktivität scheint nicht mit der Repression der Replikation zu überlappen, da die ersten 12 Aminosäuren von E8^{E2C} keine Repression der Replikation des HPV31 Ursprungs zeigten. Weitere Experimente zeigten, daß die E8^{E2C}-GAL4 Fusionsproteine die Replikation eines Reporterplasmids in gleichem Maße bei Anwesenheit oder Abwesenheit der "Enhancer"-Region und des P97 Promotors reprimierten. Bereits in früheren Experimenten zeigten Yang et al. (1991), daß die in vitro Replikation von BPV1 und HPV11 DNA keine RNA-Polymerase II-Aktivität benötigt. Die Repression der Replikation durch die minimale Repressionsdomäne scheint damit unabhängig von einer transkriptionellen Repression zu sein und erfolgt vermutlich nach einem neuartigen Mechanismus, der unabhängig von der Heterodimerisierung oder Bindungsstellenkompetition mit E2 wirkt. Überraschenderweise inhibierte E8^{E2C}(1-21)-GAL4 auch die EBNA1-abhängige Replikation des EBV Latenzreplikationsursprungs oriP. In der Latenzphase repliziert das EBV Genom im Gegensatz zum HPV Genom nur einmal pro Zellzyklus und unterliegt dem zellulären "replication licensing" durch den "origin recognition complex" (ORC) (Bell und Dutta, 2002). Diese Kopienzahlkontrolle wird durch die Interaktion von EBNA-1 mit ORC ermöglicht, der auch für die Initiation der zellulären DNA-Replikation benötigt wird (Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001). Dieser Befund macht es unwahrscheinlich, daß die Repression der Replikation durch E8^{E2C} auf eine direkte Interaktion mit den viralen Replikations-Initiationsproteinen E1, E2 und EBNA-1 zurückzuführen ist, da keine Sequenzhomologien zwischen den HPV31 und EBV Replikationsproteinen vorhanden sind. Das einzige weitere bisher bekannte Repressorprotein der ORC-abhängigen EBV oriP DNA-Replikation ist Geminin (Bell und Dutta, 2002). Weitere Transkriptionsfaktoren, die als Repressoren der Replikation wirken, scheinen in ihrer Wirkung auf die Replikation viraler Ursprünge begrenzt zu sein. Das TATA-Box bindende Protein (TBP) reprimiert in vitro die

Replikation des SV40 Ursprungs durch eine Interaktion mit dem für die Initiation und Elongation essentiellen viralen Protein Large T-Antigen (Herbig et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor YY1 inhibiert die HPV11 DNA-Replikation in vitro DNA-Bindungsstellen-unabhängig durch eine Interaktion mit dem HPV11 E2 Protein (Lee et al., 1998). Das p53 Protein reprimiert die Replikation des BPV1 Ursprungs in vivo sowie des Polyomavirus Ursprungs in vitro, aber nicht in vivo (Lepik und Ustav, 2000; Miller et al., 1995). Im Gegensatz zu E8^{E2C} inhibiert p53 allerdings nicht die Replikation von oriP, weshalb ein gemeinsamer Mechanismus der Repression unwahrscheinlich erscheint (Lepik und Ustav, 2000).

Da die Repression durch E8^{E2C} die Transkription und die Replikation offensichtlich unabhängig voneinander betraf, erschien die Chromatin-Modifikation als möglicher Mechanismus zur Erklärung beider Phänomene. In jüngerer Zeit wurden verschiedene zelluläre Mechanismen zur Veränderung der Chromatinstruktur beschrieben, die in einer Repression der Genexpression resultieren können, darunter die Histon-Deacetylierung und die Histon-Methylierung (Jenuwein und Allis, 2001; Maldonado et al., 1999; Marks et al., 2001; Rice und Allis, 2001; Tyler und Kadonaga, 1999; Workman und Kingston, 1998). Die Deacetylierung von Histonen erfolgt über die Abspaltung von Acetylgruppen durch spezifische Histon-Deacetylasen (HDAC) und resultiert in einer Verdichtung der Chromatinstruktur durch eine verstärkte Interaktion der Histone mit DNA (Workman und Kingston, 1998). Die Verpackung von BPV1 DNA in Nukleosomen verhindert in vitro die DNA-Replikation (Li und Botchan, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Histon-Deacetylierung auf die transkriptionelle Repression durch E8^{E2C} untersucht. Steigende Mengen des spezifischen HDAC-Inhibitors Trichostatin A (TSA) führten zu einem Anstieg der basalen Promotoraktivität des getesteten minimalen synthetischen Promotorkonstrukts. Damit ist eine Verpackung der transfizierten Plasmid-DNA mit Histonen sehr wahrscheinlich. Im Gegensatz dazu zeigte E8^{E2C} bei steigenden Konzentrationen von TSA sogar eine Verstärkung der transkriptionellen Repression. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Interaktion von E8^{E2C} mit TSA-sensitiven HDAC unwahrscheinlich. Ähnliche Ergebnisse erzielten del Mar Pena und Laimins (2001) nach TSA-Behandlung einer HPV31-haltigen Keratinozyten-Zelllinie (CIN 612-9E; Meyers et al., 1992) auch für die episomale Genom-Replikation. TSA-Behandlung von CIN 612-Zellen führte nicht zur Induktion der Expression der späten Gene und hatte keinen signifikanten Anstieg der episomalen Genomkopienzahl zur Folge. Eine Inaktivierung der Repression durch E8^{E2C} sollte dagegen aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit zu einem deutlichen Anstieg der viralen Genomkopienzahl führen. Nicht auszuschließen ist allerdings eine Interaktion mit der Nicht-

TSA-sensitiven HDAC-Familie der Sir-Proteine (Rusche et al., 2003). Interessanterweise wurde von Xie und Folk (2002) mit dem transkriptionellen Korepressor mSin3B ein weiteres Protein identifiziert, welches neben der transkriptionellen Repression auch als Repressor des Polyomavirus Replikationsursprungs wirkt. Die Repression durch mSin3B ist ebenfalls unabhängig von TSA-sensitiven HDAC, aber der Mechanismus der Repression ist wie bei E8^{E2C} bisher unklar.

Weiterführende Untersuchungen müssten auf die Identifikation von zellulären Interaktionspartnern für die minimale Repressionsdomäne von E8^{E2C} sowie einen möglichen Einfluss der Histon-Methylierung zielen. Überraschenderweise besitzt die Chromodomäne von HP1, eines Histon-Methyl-Gruppen bindenden Proteins (Nielsen et al., 2001), eine verblüffende Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der Methylgruppen-Bindungstasche zur E8-Domäne (LKWK; Jacobs et al., 2001). Erste Co-Immunpräzipitationen der GAL4-Fusionsproteine mit zwei Mitgliedern der HP1-Familie, HP1 α und HP1 β , ergaben im Rahmen dieser Arbeit aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen leider keine auswertbaren Ergebnisse. Allerdings lässt sich auch ein neuartiger, alleine durch die minimale Repressionsdomäne verursachter Mechanismus nicht ausschliessen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellten die Bedeutung des E8^{E2C} Proteins als zentralen Regulator des viralen Lebenszyklus heraus. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die Inhibition der DNA Replikation durch E8^{E2C} Proteine, im Gegensatz zu bisher postulierten Modellen, nicht auf passiven Mechanismen wie Bindungsstellenkompetition und Heterodimerisierung zwischen E2 Aktivator- und Repressorproteinen beruhen. Die Kopienzahl von HPV31 Genomen wird vielmehr durch eine neuartige Replikations-/Transkriptionsrepressionsaktivität von E8^{E2C} kontrolliert. Die aminoterminalen 21 Aminosäuren stellen eine transferierbare Replikations-/Transkriptionsrepressionsdomäne dar, für welche die Aminosäuren W6 und K7 benötigt werden. E8^{E2C} ist somit ein wesentlicher Regulator der viralen DNA Replikation und der E6/E7 Onkogenexpression. E8^{E2C} gewinnt zudem durch diese transferierbare Repressionsdomäne eine herausragende Bedeutung für die Entwicklung neuartiger antiviraler Therapien. Eine Fusion an entsprechende, spezifische DNA-Bindungsdomänen könnte eine Repression von viraler Replikation auch in Anwesenheit der entsprechenden Replikations-Aktivatorproteine ermöglichen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ausubel, F. A., E. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, und K. Struhl. 1990. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York

Barsoum, J., S. S. Prakash, P. Han, und E. J. Androphy. 1992. Mechanism of action of the papillomavirus E2 repressor: repression in the absence of DNA binding. *J. Virol.* **66**: 3941-3945

Bell, S. P., und A. Dutta. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 333-374

Bouvard, V., A. Storey, D. Pim, und L. Banks. 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* **13**: 5451-5459

Chiang, C. M., T. R. Broker, und L. T. Chow. 1991. An E1M-E2C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor. *J. Virol.* **65**: 3317-3329

Chiang, C. M., G. Dong, T. R. Broker, und L. T. Chow. 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J. Virol.* **66**: 5224-5231

Choe, J., P. Vaillancourt, A. Stenlund, und M. Botchan. 1989. Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs. *J. Virol.* **63**: 1743-1755

del Mar Pena, L. M., und L. A. Laimins. 2001. Differentiation-dependent chromatin rearrangement coincides with activation of human papillomavirus type 31 late gene expression. *J. Virol.* **75**: 10005-10013

-
- Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, und F. Thierry.** 1997. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* **71**: 9343-9349
- Dhar, S. K., K. Yoshida, Y. Machida, P. Khaira, B. Chaudhuri, J. A. Wohlschlegel, M. Leffak, J. Yates, und A. Dutta.** 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr Virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* **106**: 287-296
- Dong, G., T. R. Broker, und L. T. Chow.** 1994. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J. Virol.* **68**: 1115-1127
- Dong, X. P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler, und H. Pfister.** 1994. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* **58**: 803-808
- Doorbar, J., A. Parton, K. Hartley, L. Banks, T. Crook, M. Stanley, und L. Crawford.** 1990. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* **178**: 254-262
- Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, und M. Yaniv.** 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* **5**: 1657-1671
- Frattini, M. G., und L. A. Laimins.** 1994. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12398-12402
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, und D. A. Galloway.** 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* **11**: 2090-2100
- Gey, G. O., W. D. Coffman, und M. T. Kubicek.** 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265

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

Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy, und J. T. Schiller. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**: 3905-3910

Herbig, U., K. Weisshart, P. Taneja, und E. Fanning. 1999. Interaction of the transcription factor TFIID with simian virus 40 (SV40) large T antigen interferes with replication of SV40 DNA in vitro. *J. Virol.* **73**: 1099-1107

Higuchi, R., B. Krummel, und R. K. Saiki. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**: 7351-7367

Hirt, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**: 365-369

Hou, S. Y., S. Y. Wu, T. Zhou, M. C. Thomas, und C. M. Chiang. 2000. Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 113-125

Howley, P. M. 1996. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In B. N. Fields, D. M. Knipe, und P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed., vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA: 2045-2076

Hubbert, N. L., J. T. Schiller, D. R. Lowy, und E. J. Androphy. 1988. Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**: 5864-5868

Hubert, W. G., T. Kanaya, und L. A. Laimins. 1999. DNA replication of human papillomavirus type 31 is modulated by elements of the upstream regulatory region that lie 5' of the minimal origin. *J. Virol.* **73**: 1835-1845

-
- Hummel, M., J. B. Hudson, und L. A. Laimins.** 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* **66**: 6070-6080
- Jacobs, S. A., S. D. Taverna, Y. Zhang, S. D. Briggs, J. Li, J. C. Eissenberg, C. D. Allis, und S. Khorasanizadeh.** 2001. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* **20**: 5232-5241
- Jeckel, S., Loetzsch, E., Huber, E., Stubenrauch, F., und T. Iftner.** 2003. Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* **77**: 8736-8744
- Jenuwein, T., und C. D. Allis.** 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080
- Jeon, S., und P. F. Lambert.** 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 1654-1658
- Kanaya, T., S. Kyo, und L. A. Laimins.** 1997. The 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region acts as an enhancer which augments viral early expression through the action of YY1. *Virology* **237**: 159-69
- Klumpp, D. J., F. Stubenrauch, und L. A. Laimins.** 1997. Differential effects of the splice acceptor at nucleotide 3295 of human papillomavirus type 31 on stable and transient viral replication. *J. Virol.* **71**: 8186-8194
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laimins, L. A.** 1996. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. *Seminars in Virology* **7**: 305-313
- Lambert, P. F., B. A. Spalholz, und P. M. Howley.** 1987. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* **50**: 69-78

- Lambert, P. F., N. L. Hubbert, P. M. Howley, und J. T. Schiller.** 1989. Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J. Virol.* **63**: 3151-3154
- Lambert, P. F., B. C. Monk, und P. M. Howley.** 1990. Phenotypic analysis of bovine papillomavirus type 1 E2 repressor mutants. *J. Virol.* **64**: 950-956
- Lee, K. Y., T. R. Broker, und L. T. Chow.** 1998. Transcription factor YY1 represses cell-free replication from human papillomavirus origins. *J. Virol.* **72**: 4911-4917
- Lee, D., B. Lee, J. Kim, D. W. Kim, und J. Choe.** 2000. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **275**: 7045-7051
- Lepik, D., und M. Ustav.** 2000. Cell-specific modulation of papovavirus replication by tumor suppressor protein p53. *J. Virol.* **74**: 4688-4697
- Leight, E. R., und B. Sugden.** 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* **10**: 83-100
- Li, R., und M. R. Botchan.** 1994. Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **91**: 7051-7055.
- Lim, D. A., M. Gossen, C. W. Lehman, und M. R. Botchan.** 1998. Competition for DNA binding sites between the short and long forms of E2 dimers underlies repression in bovine papillomavirus type 1 DNA replication control. *J. Virol.* **72**: 1931-1940
- Maldonado, E., M. Hampsey, und D. Reinberg.** 1999. Repression: targeting the heart of the matter. *Cell* **99**: 455-458
- Mantovani, F., und L. Banks.** 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**: 7874-7887

Marks, P. A., R. A. Rifkind, V. M. Richon, R. Breslow, T. Miller, und W. M. Kelly. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews* **1**: 194-202

McBride, A. A., J. C. Byrne, und P. M. Howley. 1989. E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 510-514

McBride, A. A., H. Romanczuk, und P. M. Howley. 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 18411-18414

Meyers, C., M. G. Frattini, J. B. Hudson, und L. A. Laimins. 1992. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* **257**: 971-973

Miller, S. D., G. Farmer, und C. Prives. 1995. p53 inhibits DNA replication in vitro in a DNA-binding-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6554-6560

Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. MacPherson, und M. R. Botchan. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**: 1694-1699

Molinari, E., M. Gilman, und S. Natesan. 1999. Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *EMBO J.* **18**: 6439-6447

Münger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace, und V. L. Zacny. 2001. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**: 7888-7898

Nielsen, A. L., M. Oulad-Abdelghani, J. A. Ortiz, E. Remboutsika, P. Chambon, und R. Losson. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol. Cell* 2001 **7**: 729-739

Ozbun, M. A. 2002. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes and the onset of early transcription. *J. Virol.* **76**: 11291-11300.

Park, J. S., E. S. Hwang, S. N. Park, H. K. Ahn, S. J. Um, C. J. Kim, S. J. Kim, und S. E. Namkoong. 1997. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecol. Oncol.* **65**: 121-129

Piirsoo, M., E. Ustav, T. Mandel, A. Stenlund, und M. Ustav. 1996. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. *EMBO J.* **15**: 1-11

Purdie, K. J., C. J. Sexton, C. M. Proby, M. T. Glover, A. T. Williams, J. N. Stables, und I. M. Leigh. 1993. Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res.* **53**: 5328-5333

Rapp, B., A. Pawellek, F. Kraetzer, M. Schaefer, C. May, K. Purdie, K. Grassmann, und T. Iftner. 1997. Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J. Virol.* **71**: 6956-6966

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

Rheinwald, J. G., und M. A. Beckett. 1981. Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **41**: 1657-1663

Rice, J. C., und C. D. Allis. 2001. Code of silence. *Nature* **414**: 258-260

Riese, D. J. 2nd, J. Settleman, K. Neary, und D. DiMaio. 1990. Bovine papillomavirus E2 repressor mutant displays a high-copy-number phenotype and enhanced transforming activity. *J. Virol.* **64**: 944-949

Romanczuk, H., F. Thierry, und P. M. Howley. 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J. Virol.* **64**: 2849-2859

-
- Rotenberg, M. O., L. T. Chow, und T. R. Broker.** 1989. Characterization of rare human papillomavirus type 11 mRNAs coding for regulatory and structural proteins, using the polymerase chain reaction. *Virology* **172**: 489-497
- Ruesch, M. N., F. Stubenrauch, und L. A. Laimins.** 1998. 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.* **72**: 5016-5024
- Rusche, N. L., A. L. Kirchmaier, und J. Rine.** 2003. The establishment, heritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 481-516
- Salghetti, S. E., S. Y. Kim, und W. P. Tansey.** 1999. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* **18**: 717-726
- Salghetti, S. E., M. Muratani, H. Wijnen, B. Futcher, und W. P. Tansey.** 2000. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 3118-3123
- Sanger, F., S. Nicklen, und A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* **24**: 104-108
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, und P. M. Howley.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**: 1129-1136
- Schepers, A., M. Ritzi, K. Bousset, E. Kremmer, J. L. Yates, J. Harwood, J. F. X. Diffley, und W. Hammerschmidt.** 2001. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **20**: 4588-4602
- Schneider-Maunoury, S., O. Croissant, und G. Orth.** 1987. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.* **61**: 3295-3298

Schwarz, E., U. K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, und H. zur Hausen. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**: 111-114

Sen, E., J. L. Bromberg-White, und C. Meyers. 2002. Genetic analysis of cis regulatory elements within the 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle. *J. Virol.* **76**: 4798-4809

Smotkin, D., H. Prokoph, und F. O. Wettstein. 1989. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* **63**: 1441-1447

Snijders, P. J., A. J. van den Brule, H. F. Schrijnemakers, P. M. Raaphorst, C. J. Meijer, und J. M. Walboomers. 1992. Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6* transcript species which are terminated at different early region poly(A) sites. *J. Virol.* **66**: 3172-3178

Stenlund, A. 1996. Papillomavirus DNA replication. In M. DePamphilis (ed.) DNA replication in eukaryotes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NJ: 679-698

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

Stubenrauch, F., H. B. Lim, und L. A. Laimins. 1998a. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **72**: 1071-1077

Stubenrauch, F., A. M. Colbert, und L. A. Laimins. 1998b. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. *J. Virol.* **72**: 8115-8123

Stubenrauch, F., und T. Iftner. 1999. Krebs durch Papillomviren. *Target Forum* **1**: 5-15

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

Stubenrauch, F., M. Hummel, T. Iftner, und L. A. Laimins. 2000. The E8^{E2C} repressor protein, a negative regulator of replication and transcription, is required for the stable episomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. *J. Virol.* **74**: 1178-1186

Stubenrauch, F., T. Zobel, und T. Iftner. 2001. The E8 domain confers a novel long distance repression activity on the E8^{E2C} protein of high-risk human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **75**: 4139-4149

Tan, S. H., L. E. Leong, P. A. Walker, und H. U. Bernard. 1994. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol.* **68**: 6411-6420

Thierry, F., und P. M. Howley. 1991. Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol.* **3**: 90-100

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

Tyler, J. K., und J. T. Kadonaga. 1999. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* **99**: 443-446

Ustav, M., E. Ustav, P. Szymanski, und A. Stenlund. 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *EMBO J.* **10**: 4321-4329

Walboomers, J. M., A.-M. De Roda Husman, A. J. Van Den Brule, P. J. Snijders, und C. Meijer. 1994. Human Papillomaviruses and Cervical Cancer, Biology and Immunology (Stern, P. L. and Stanley, M. A.; Eds.) Oxford University Press, Oxford: 41-69

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. F. Snijders, J. Peto, C. J. L. M. Meijer, und N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**: 12-19

Workman, J. L., und R. E. Kingston. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 545-579

Xie, A. Y., und W. R. Folk. 2002. Inhibition of polyomavirus ori-dependent DNA replication by mSin3B. *J. Virol.* **76**: 11809-11818

Yang, L., R. Li, I. J. Mohr, R. Clark, und M. R. Botchan. 1991. Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* **353**: 628-632

Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, B. Mannhardt, R. Tindle, J. W. Botz, und P. Jansen-Dürr. 1996. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**: 2323-2330

Dank:

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. T. Iftner für die Förderung meiner Promotionsarbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Herrn Prof. Dr. N. Blin danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit vor der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität zu vertreten.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Frank Stubenrauch für die hervorragende akademische Betreuung, seine stete und kollegiale Ansprechbarkeit sowie die Geduld bei der Korrektur der Arbeit.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie, insbesondere den Papillomvirus-Arbeitsgruppen, für die sehr gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima danken.

Mein besonderer Dank gilt Bernd Karstensen, Sven Poppelreuther, Elke Straub, Sonja Jeckel, Evi Huber und Betti Schopp für die herausragende, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die den Stress im Labor zu einem Vergnügen werden ließ. Die Erinnerungen an die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse bleiben bestehen.

Lebenslauf

Name: Thomas Zobel

Geburtsdatum: 25.08.1970

Geburtsort: Heidelberg

Familienstand: verheiratet, ein Sohn

Schulbildung: Grundschule/Gymnasium in Wiesloch, 1977-1990, Abitur

Wehrdienst: 1990-1991

Hochschulstudium: Biologie, Universität Heidelberg, 1991-1998
Studienschwerpunkte: Genetik, Botanik, Biochemie

Diplomarbeit: "Ortsspezifische Mutagenese und Analyse genetischer Elemente im *rep*-und *cap*-Gen sowie dem Intron des Adeno-assoziierten Virus Typ 2 (AAV-2)" am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, Abteilung Angewandte Tumorstudiologie (Arbeitsgruppe PD Dr. Kleinschmidt)

Examen: Diplom Biologie 01/1998

Berufliche Tätigkeit: Wissenschaftlicher Angestellter am Biologischen Institut der Universität Tübingen, Lehrstuhl für Allgemeine Genetik (Arbeitsgruppe Dr. Zentgraf) von 07/1998 bis 09/1998

Promotion: Anfertigung der Dissertation am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Sektion Experimentelle Virologie, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Iftner von 10/1998 bis 05/2002

Abschluß der Promotion mit der Doktorprüfung 04/2005

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Name, Vorname: Zobel, Thomas

Anschrift: Prießallee 8, 33604 Bielefeld

