

**Untersuchung einer potentiellen zweiten
Interaktionsstelle zwischen Brd4 und HPV31 E2 und
ihre Bedeutung im Papillomviruslebenszyklus**

**Dissertation
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt von
Aylin Yigitliler
aus Albstadt-Ebingen**

**Tübingen
2020**

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

30.10.2020

Stellvertretender Dekan:

Prof. Dr. József Fortágh

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thomas Iftner

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Nadine Ziemert

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Klassifizierung und Charakterisierung von Papillomviren	3
2.2	Genomorganisation	5
2.3	Lebenszyklus von Papillomviren.....	6
2.4	Die viralen Onkoproteine E6 und E7	7
2.5	Das virale E1 Protein – die virale Helikase	8
2.6	Das virale E2 Protein – ein Regulator der viralen Transkription und Replikation.....	10
2.7	Das multifunktionelle, zelluläre Protein Brd4.....	11
2.8	Brd4 und seine Rolle im Lebenszyklus von Papillomviren	13
2.9	Ziel der Arbeit.....	16
3	Material	18
3.1	Chemikalien	18
3.2	Medien und Puffer	18
3.2.1	Puffer und Lösungen	18
3.2.2	Medien für die Bakterienkultur	20
3.2.3	Medien für die Zellkultur	20
3.3	Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien	21
3.4	Größenstandards für die Gelelektrophorese	22
3.5	Enzyme	22
3.6	Primäre Antikörper	23
3.7	Sekundäre Antikörper.....	24
3.8	Bakterienstämme	25
3.9	Eukaryotische Zellen	25
3.10	siRNA.....	25
3.11	Oligonukleotide	26
3.12	Plasmide und Vektoren	28
3.13	Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien.....	39

3.14	Geräte.....	40
4	Methoden.....	42
4.1	Mikrobiologische Methoden.....	42
4.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	42
4.1.2	Transformation von DNA in kompetente Bakterien.....	42
4.1.3	Anzucht von Bakterienkulturen für die Plasmidisolierung.....	42
4.2	Zellkultur-Methoden.....	43
4.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	43
4.2.2	Mitomycin-Behandlung von NIH3T3-J2-Fibroblasten.....	43
4.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	44
4.2.4	DNA Transfektion von eukaryotischen Zellen mit FuGENE HD.....	44
4.2.5	siRNA Transfektion von eukaryotischen Zellen mit RNAimax.....	46
4.2.6	Knockdown von Zielgenen in eukaryotischen Zellen mittels lentiviraler Infektion	46
4.2.7	Differenzierung von CIN612-9E-Zellen in Methylcellulose.....	47
4.3	DNA-Methoden.....	48
4.3.1	Standardmethoden.....	48
4.3.2	Amplifikation von Gensequenzen mittels PCR.....	48
4.3.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	49
4.3.4	DNA-Isolation aus Bakterienzellen.....	49
4.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten.....	49
4.3.6	Sequenzierung.....	49
4.3.7	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	50
4.3.8	DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen.....	50
4.3.9	Multiplex qRT-PCR.....	50

4.4	RNA-Methoden	52
4.4.1	RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen	52
4.4.2	copy-DNA (cDNA) Synthese	53
4.4.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	53
4.5	Protein-Methoden.....	54
4.5.1	Luziferase-Reporter-Assay.....	54
4.5.2	Gesamtzelllyse zur Proteinextraktion	54
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
4.5.4	Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)	55
4.5.5	Immunoblotanalyse	55
4.5.6	Herstellung nukleärer Extrakte	56
4.5.7	Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	56
4.5.8	Ko-Immunopräzipitation (Co-IP)	57
4.5.9	Durchflusszytometrie-basierte FRET-Analyse (FACS-FRET)	58
4.5.10	Direkte und indirekte Fluoreszenz-Analyse von Proteinen.....	58
5	Ergebnisse	60
5.1	Untersuchung einer zweiten potentiellen Interaktionsstelle zwischen HPV31 E2 und Brd4	60
5.1.1	Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten FRET Analyse zur Untersuchung der Interaktion von HPV31 und Brd4	60
5.1.2	Brd4-Deletionsmutanten geben keinen Hinweis auf eine zweite Interaktionsstelle mit HPV31 E2	63
5.1.3	Isolierte Brd4-PDID interagiert mit HPV31 E2.....	65
5.1.4	HPV16 E2 interagiert mit PDID, aber nicht CRPV E2.....	67

5.1.5	Funktionelle Charakterisierung von HPV31 E2 mit den Mutationen von Serin zu Asparagin an der Position 313 und von Lysin zu Asparaginsäure an der Position 314 ..68	
5.1.6	ND-Mutationen im C-Terminus von E2 haben keinen Effekt auf die PDID-Bindung	72
5.1.7	Konservierungsanalyse der C-terminalen Domäne von HR- und LR-Papillomvirus E2 Proteinen	73
5.1.8	Die Interaktion von PDID zu HPV31 E2 erfolgt über den N-Terminus von HPV31 E2	74
5.1.9	HPV31 E2 R37A und I73L Mutanten zusammen mit PDID weisen reduziertes FRET-Signal auf.....	76
5.1.10	Interaktion zu HPV31 E2 wird über BD2, NPS und Region 505-530 in PDID vermittelt	78
5.1.11	Dimerisierung der PDID ist von der BD2 und der Region 505-530 abhängig...80	
5.1.12	Dominant-negativer Effekt von PDID auf HPV31 E2-abhängige Transkriptionsaktivität.....	81
5.2	Die Rolle von Brd4S im Lebenszyklus von HPV31	84
5.2.1	Brd4S in HPV-relevanten Zelllinien	84
5.2.2	Brd4S interagiert mit HPV31 E2	85
5.2.3	Hinweis auf Brd4S Homo- und Heterodimere.....	86
5.2.4	Brd4S hat einen reprimierenden Effekt auf die HPV31 E4 ^{L1} -Expression	87
5.2.5	Brd4S reguliert nicht die Expression der viralen Transkripte in differenzierten CIN612-9E-Zellen.....	90
5.2.6	CrisprCas-vermittelter Knockdown von Brd4S.....	91
5.2.7	CrisprCas-vermittelter Knockdown von Brd4S führt zur erhöhten Expression von HPV31 E4 ^{L1} -Transkripten	93

5.2.8	Brd4S Knockdown führt zu einer erhöhten Aktivität der E2-abhängigen Transaktivierung.....	94
5.2.9	Verringerte Aktivität von E2 und E1/E2-abhängigen Reportern mit der Koexpression von Brd4S.....	96
5.2.10	Brd4S wird in HPV31 E1/E2-positive nukleäre Foci rekrutiert.....	98
6	Diskussion.....	102
6.1	Zweite Interaktionsstelle in Brd4 und HPV E2 Proteinen	102
6.2	Beteiligung von Brd4S im PV-Lebenszyklus.....	108
7	Literaturverzeichnis	111
8	Abkürzungsverzeichnis.....	119
9	Abbildungsverzeichnis.....	123
10	Erklärung über Beiträge zu dieser Arbeit	124
11	Akademischer Lebenslauf	125
12	Publikationen.....	126
13	Danksagungen	127

1 Zusammenfassung

Humane Papillomviren sind ursächlich für die Entstehung von gutartigen bis hin zu bösartigen Erkrankungen des Epithels von Haut und Schleimhaut. Der virale Lebenszyklus ist abhängig von dem Differenzierungsstatus des Epithels. Nach der Infektion durch Mikroläsionen findet mit der Expression der frühen viralen Gene E1 und E2 zunächst eine mäßige Amplifikation des viralen Genoms statt, welche mit der Differenzierung des Epithels jedoch stark ansteigt, so dass es in dieser produktiven Lebensphase zur Bildung von infektiösen Partikeln kommt. E2 ist ein zentraler Regulator des viralen Lebenszyklus, da er sowohl an der viralen Replikation, der Transkription viraler und zellulärer Gene und der Segregation des viralen Genoms bei der Zellteilung beteiligt ist. Insbesondere die Transkriptions- und Segregationsfunktion wird von E2 mit dem zellulären Chromatinregulator Brd4 bewerkstelligt. Brd4 ist ein konservierter Interaktor von E2, wobei diese konservierte Interaktion über den C-Terminus von Brd4 (CTM) und den N-terminus von E2 vermittelt wird. Neben dieser bekannten Interaktionsstelle wurden weitere potentielle Bindungsstellen in Brd4 und E2 Proteinen identifiziert. Hauptsächlich Interaktionsanalysen mit aufgereinigten Proteinen/Peptiden sagten eine Interaktion für die PDID und BID in Brd4 und für den C-Terminus in E2 voraus. Die Untersuchung dieser potentiellen zweiten Interaktionsstelle erfolgte mithilfe der FACS (*fluorescent activated cell sorting*) – FRET (*Försters resonance energy transfer*) Analyse. Diese Methode erlaubt es Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu messen. In Einklang mit den Daten von Wu et al. (2016) konnte die PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*) als zweite Interaktionsstelle in Brd4 bestätigt werden, für die BID (*basic residue-enriched interaction domain*) hingegen konnte keine Interaktion mit HPV31 E2 nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die vorhergesagte Bindestelle im C-Terminus von HPV31 E2 untersucht, welche den Aminosäurenresten S313/K314 in HPV31 E2 entsprach. Da davon ausgegangen wurde, dass *low-risk* E2 Proteine die PDID aufgrund der Aminosäurenreste N und D an der entsprechenden Stelle im C-Terminus nicht binden können, wurde eine HPV31 E2 S313N/K314D Proteinmutante hergestellt. Diese wurde zunächst funktionell charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass die Mutationen von S313/K314 jeweils zu N und D überraschenderweise zu einem Verlust der DNA-Bindung führten. Zudem zeigte die HPV31 E2 ND-Proteinmutante keinen Verlust in der PDID-Bindung, was zusammengenommen darauf schließen lässt, dass die zweite Bindestelle in HPV31 E2 nicht die angenommenen Aminosäurenreste S313/K314 im C-terminus umfasst, sondern, dass diese vielmehr essentiell für die DNA-Bindung in *high-risk* Papillomvirustypen sind. Eingehendere Untersuchungen identifizierten die TAD (Transaktivierungsdomäne) mit der Hinge von HPV31 E2 als Interaktionspartner der PDID.

Die detailliertere Betrachtung der PDID-Interaktionsstelle eröffnete außerdem die Möglichkeit der indirekten Interaktion zwischen HPV31 E2 und der PDID-Domäne über endogenes Brd4. Neben der langen Brd4-Isoform ist auch eine kurze, genannt Brd4S, im menschlichen Genom codiert. Brd4S enthält nicht die konservierte Interaktionsstelle CTM von Brd4, aber die PDID, weshalb eine Interaktion mit E2 Proteinen möglich wäre. Diese Annahme konnte für HPV31 E2 mittels einer Ko-Immunopräzipitationsanalyse bestätigt werden. Darüber hinaus wurde die Funktion von Brd4S im Lebenszyklus von Papillomviren untersucht. Im Kontext von replizierenden Genomen zeigte der Knockdown von Brd4S in undifferenzierten Zellen eine Erhöhung in der HPV31 E4^{L1}-Transkriptmenge. Bezüglich E2-abhängiger Aktivitäten zeigte sich für Brd4S eine ebenso repressive Eigenschaft in der Transaktivierungs- und Replikationsfunktion. Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen eine bisher unbekannte Beteiligung von Brd4S im Lebenszyklus von Papillomviren im Hinblick auf die Transkription und Replikation. Zudem weisen die erhöhten E4^{L1} Transkriptmengen in Folge eines Brd4S-Knockdowns in undifferenzierten Zellen auf eine potentielle Funktion von Brd4S im Rahmen der RNA-Prozessierung hin, welche möglicherweise die Expression der späten immunogenen Kapsidproteine unterdrückt, um somit eine HPV-Latenz zu begünstigen.

2 Einleitung

2.1 Klassifizierung und Charakterisierung von Papillomviren

Die diverse Familie der *Papillomaviridae* beinhaltet aktuell 440 Papillomvirustypen, von denen 225 den humanen und 215 den tierischen zugeordnet werden (<http://pave.niaid.nih.gov>, Stand Februar 2020). Papillomviren (PV) sind kleine unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von ungefähr 55 nm. Das doppelsträngige, 8000 bp (Basenpaar) große und zirkuläre Genom wird von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben [1, 2]. Die Klassifikation der Papillomviren basiert hauptsächlich auf Sequenzanalysen des hochkonservierten Kapsidproteins L1, aber auch auf medizinisch-biologisch relevanten Eigenschaften [3, 4]. Die Gesamtheit der Papillomviren lässt sich in mehr als 50 Genera unterteilen, welche die Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-Genera mit den 225 humanen Papillomviren inkludiert (<http://pave.niaid.nih.gov>, Stand Februar 2020). Papillomviren infizieren ausschließlich Keratinozyten der Haut und Schleimhaut. Besonders sticht hierbei das Alpha-Genus hervor, welches Papillomvirustypen enthält, die sowohl die Haut als auch die Schleimhaut infizieren können, wohingegen die verbleibenden Genera ausschließlich kutane Keratinozyten befallen. Infektionen mit Papillomviren verlaufen größtenteils asymptomatisch und werden in 90% der Fälle innerhalb von zwei Jahren nach der Infektion durch das Immunsystem beseitigt [5]. Jedoch sind einige Typen des Alpha-Genus in der Lage schwerwiegende Zellveränderungen sowohl im anogenitalen, als auch im oropharyngealen Bereich zu verursachen. In diesem Kontext werden mukosale Papillomvirustypen in Hochrisiko (*High-risk*, HR)- und Niedrigrisiko (*lowrisk*, LR)- Typen unterteilt [4]. Dabei können LR-Typen, wie beispielsweise HPV6 und 11, gutartige Läsionen beziehungsweise Kondylome verursachen [1]. Eine persistierende Infektion mit HR-Typen hingegen ist insbesondere für die Entstehung von Zervixkarzinomen, aber auch von Anal-, Vaginal-, Vulva-, Penis- und Oropharynxkarzinomen verantwortlich [1, 6, 7]. Mehr als 99,7% aller Zervixkarzinome sind mit humanen Papillomviren assoziiert, unter welchen HPV16 mit 59%, HPV18 mit 12%, HPV45 mit 4,8% und HPV31 mit 3,7% vertreten sind [8, 9]. 2005 wurden die dreizehn HR-Typen (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) von der WHO als Klasse I und HPV68 als IIA Karzinogene für den Menschen eingestuft [10]. Der Hauptübertragungsweg der humanen Papillomviren ergibt sich über den direkten Kontakt von Mensch zu Mensch und es wird angenommen, dass eine HPV-Infektion zu den am häufigsten sexuell übertragbaren Infektionen gehört [11]. Im Falle einer persistierenden Infektion, was ca. 10% der Infizierten betrifft, kann es über mehrere Stufen von zervikalen intraepithelialen Neoplasien innerhalb von 7-10 Jahren (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN) zu Gebärmutterhalskrebs kommen [12].

Mit über 500.000 Neuerkrankten im Jahr 2018 ist Gebärmutterhalskrebs die vierthäufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Jährlich sterben ca. 300.000 Frauen an den Folgen der Krebserkrankung (GLOBACON, Stand 2020). Seit 2006 gibt es prophylaktische HPV-Impfstoffe. Diese basieren auf „*virus like particles*“ (VLP), die aus rekombinant hergestellten L1 Proteinen, welche Bestandteile des Viruskapsids sind, zusammengesetzt werden. Gardasil®, ein quadrivalenter Impfstoff, wurde 2006 zugelassen und richtet sich gegen die beiden HR-Typen 16 und 18 und die LR-Typen 6 und 11. Seit 2007 ist auch der bivalente Impfstoff Cervarix® (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG) verfügbar, welcher ausschließlich gegen die HR-Typen 16 und 18 gerichtet ist. Beide Impfstoffe wurden größtenteils durch die im Jahr 2016 zugelassene nonavalente Vakzine Gardasil-9® (Sanofi Pasteur MSD) abgelöst, da diese die HPV-Typen abdeckt (HPV16, 18, 31, 33, 45, 52, 58), welche für 92% aller Zervixkarzinom-Fälle verantwortlich sind. Weiterhin sind auch die LR-Typen HPV6 und 11 abgedeckt, was die Bildung von Kondylomen und gutartigen Läsionen verhindert [13]. Die Ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt die Impfung gegen eine HPV-Infektion für Mädchen, aber insbesondere seit Juni 2018 auch für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. Da die prophylaktischen Impfstoffe weder gegen eine schon bestehende Infektion, noch gegen bereits vorhandene Krebsvorstufen wirksam sind, kann derzeit nichts die Früherkennungsuntersuchung des Gebärmutterhalses ersetzen [14, 15]. Der Gemeinsame Bundesausschuss (G-BA) hat für 2020 beschlossen, dass für Frauen der Altersgruppe von 20-34 Jahren eine jährliche zytologische Untersuchung, der sogenannte Pap-Test, durchgeführt wird und für Frauen ab 35 Jahren alle drei Jahre eine Kotestung zusätzlich mit einem HPV-Test stattfinden soll [16].

Abgesehen von der direkten Kausalität zwischen anogenitalen Karzinomen und den genannten HR-Papillomvirustypen, stehen auch einige kutane Papillomvirustypen des Beta-Genus im Verdacht verantwortlich für die Entstehung von kutanen Tumoren zu sein. Im Allgemeinen können verschiedene HPV-Typen in Hautproben von Plattenepithelkarzinomen (*squamous cell carcinoma*, SCC) und Basalzellkarzinomen (*basal cell carcinoma*, BCC) gefunden werden. Die Zahl beschränkt sich jedoch auf wenige Kopien pro Zelle. Da in Vorstufen des Plattenepithelkarzinoms, der aktinischen Keratose (*actinic keratose*, AK), hingegen Genomkopienzahlen von 50 pro Zelle gefunden werden können, nimmt man an, dass Beta-Papillomviren für die Entstehung, aber nicht für die Aufrechterhaltung der malignen Zellveränderungen der Haut relevant sind. Darüber hinaus jedoch sind insbesondere immunsupprimierte Patienten, aber auch Patienten der autosomal rezessiv vererbten Erkrankung *Epidermodysplasia Verruciformis* (EV) gefährdet [17-20]. 30-60% der EV-Patienten entwickeln 10-30 Jahre nach dem Auftreten von gutartigen Hautläsionen Plattenepithelkarzinome. Dabei sind immer UV-exponierte Körperstellen betroffen [21]. Im Gegensatz zu den ausgesprochen niedrigen Kopienzahlen (1-8 Kopien/10⁴-10⁶ Zellen) in

nicht-melanozytärem Hautkrebs (*non-melanoma skin cancer*, NMSC), können in EV-Patienten bis zu 50 Kopien pro Zelle von HPV-Genomen nachgewiesen werden. Darunter finden sich vorzugsweise die HPV-Typen 5 und 8, welche 2009 von der WHO/IARC als potentiell karzinogen eingestuft wurden [21, 22].

2.2 Genomorganisation

Die unbehüllten, ungefähr 55 nm großen und mit einem ikosaedrischen Kapsid umgebenen DNA-Viren besitzen ein doppelsträngiges, zirkuläres Genom, das circa 8000 Basenpaar (bp) groß ist. Das virale Genom lässt sich in drei Bereiche gliedern. Diese umfassen die frühe Region (*early*, E) mit bis zu sieben offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), die späte Region (*late*, L) und eine ca. 1000 bp große regulatorische, nicht-kodierende Region (*non-coding region*, NCR), ebenso bekannt als *long control region* (LCR) oder *upstream regulatory region* (URR) [23]. Die nicht-kodierende Region, die die späte und die frühe Region verbindet, enthält Bindestellen für virale und zelluläre Transkriptionsfaktoren, den viralen Replikationsursprung und Promotorelemente [13, 24-28]. Die darauf folgende frühe Region kodiert für die viralen Proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7 und E8 [13]. Dabei sind die hochkonservierten Proteine E1 und E2 wichtige regulatorische Elemente für den Lebenszyklus aller Papillomviren. E1, als virale Helikase und E2, als Transkriptions- und Replikationsfaktor nehmen damit einen unerlässlichen Teil in der viralen Replikation und Transkription ein [13, 29]. Im Gegensatz zum E2 Protein, das als transkriptioneller Aktivator fungieren kann, wirkt das Fusionsprotein E8^{E2}, was eine verkürzte Form von E2 mit einem zusätzlichen E8 Leserahmen darstellt, reprimierend auf die virale Transkription und Replikation [13, 29-33]. Die übrigen Leserahmen der frühen Region spielen eine wichtige Rolle bei der Dysregulation des Zellzyklus, der Umgehung des Immunsystems und der Freisetzung von Viruspartikeln. Die späte Region enthält die Leserahmen für die Kapsidproteine L1 und L2. Diese wird am Anfang durch ein frühes Polyadeneylierungssignal (PAE) und am Ende durch ein spätes Polyadeneylierungssignal (PAL) von der frühen Region abgegrenzt [29]. Der verantwortliche Promotor PE für die Transkription der polycistronischen Genprodukte befindet sich für die frühen Gene E1, E2, E6 und E7 in der URR (P97 für HPV16 und HPV31). PL, der späte Promotor (P670 für HPV16; P742 für HPV31), welcher verantwortlich ist für die Expression von L1 und L2, aber auch für E1^{E4} und E5 befindet sich im ORF von E7 ([13], <http://pave.niaid.nih.gov>). Für das Fusionsprotein E8^{E2} von HPV16 wurde ein zusätzlicher Promotor im E1 Leserahmen identifiziert [34]. Die Regulation der Promotoren ist differenzierungsabhängig. Der frühe Promotor PE ist in den initialen Lebensphasen des Virus aktiv, wohingegen der späte Promotor PL nach Differenzierung der Keratinozyten aktiv wird [13].

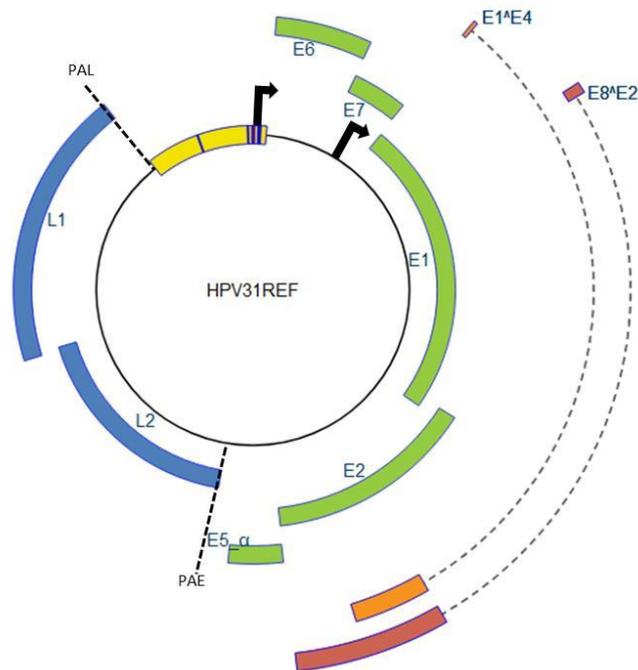


Abbildung 1: Genomstruktur des HPV31.

Dargestellt wird die URR (gelb) mit dem angedeuteten frühen Promotor (P97), der späte Promotor (P670) im E7-ORF, die frühe Genregion E1-E7 (grün), die Splicevarianten E1^ΔE4 (orange) und E8^ΔE2 (rot) und die späte Genregion mit L1 und L2 (blau). Die frühe und späte Genregion wird durch die dargestellten frühen bzw. späten Polyadenylierungssignale PAE und PAL abgegrenzt (modifiziert nach <http://pave.niaid.nih.gov>).

2.3 Lebenszyklus von Papillomviren

Der Lebenszyklus von Papillomviren ist eng mit dem Differenzierungsstatus des Plattenepithels der Haut und Schleimhaut des Wirts verknüpft. Papillomviren verschaffen sich durch kleinste Läsionen zunächst Zugang zur undifferenzierten Basalzellschicht (Abbildung 2). In diesen findet die erste Amplifikation des Papillomvirus-Genoms statt, welche durch zelluläre Faktoren und der damit verbundenen Expression von E1 und E2 initiiert wird [35, 36]. Die Anzahl des episomal vorliegenden Genoms beträgt zu diesem Zeitpunkt 50-100 Kopien pro Zelle. In dieser Phase werden auch die beiden Onkoproteine E6 und E7 exprimiert, die zur Dysregulation des Zellzyklus führen [37-39]. Damit wird die Erhaltung des viralen Genoms begünstigt, da mit der vermehrten Replikation der Wirtszellen auch das virale Genom vermehrt wird. Mit der Differenzierung der Keratinozyten schließlich beginnt die produktive Lebensphase des Virus, in welcher tausende Kopien pro Zelle des viralen Genoms detektierbar sind. Dies führt zur Expression von dem E4 Protein, den beiden Kapsidproteine L1 und L2 und letztendlich zur Freisetzung von neuen Virionen [36, 39, 40].

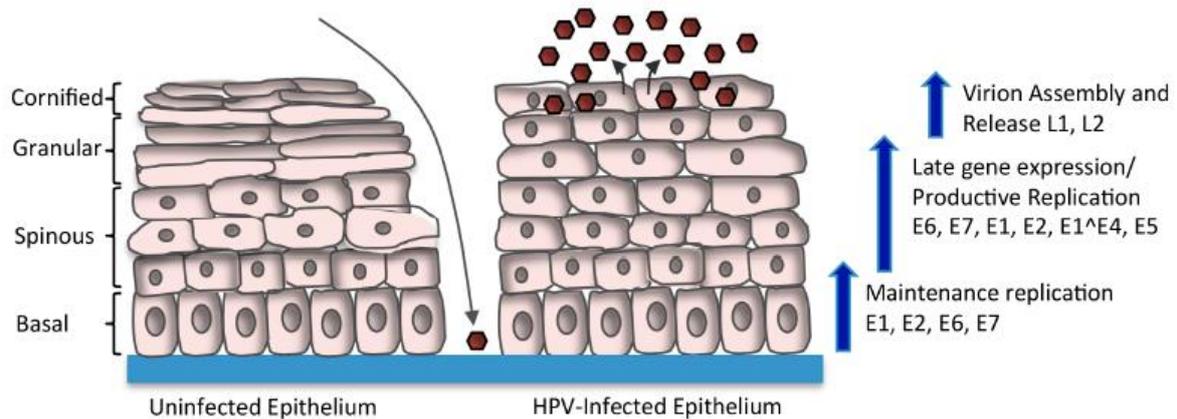


Abbildung 2: Der Lebenszyklus von Papillomviren.

Dargestellt ist ein mehrschichtiges Epithel. Durch eine Mikrowunde werden das Eindringen von Papillomviren (braunes Hexagon) und das Infizieren der undifferenzierten basalen Keratinozyten ermöglicht. Nach dem Eindringen wird die Replikation des viralen Genoms initiiert. Die Anzahl der episomalen Genome bleibt dabei konstant, bis es zur Differenzierung und damit zur produktiven Lebensphase der Papillomviren kommt. Diese beinhaltet die Expression der Verpackungsproteine L1 und L2, aber auch weiterer Proteine, wie E4 (beeinflusst das Netzwerk an Keratinfilamenten) und E5 (Transmembranprotein, das mit EGF und PDGF Rezeptoren interagiert). In der obersten Schicht des Epithels werden die Viruspartikel entlassen (modifiziert nach Moody C. 2017 [36]).

2.4 Die viralen Onkoproteine E6 und E7

Die Differenzierung des Epithels bedingt einen Zellzyklusarrest der suprabasalen Zellen. Damit wäre eine Vermehrung des Virusgenoms in sich differenzierenden Keratinozyten nicht möglich, da Papillomviren auf die Replikationsmaschinerie der infizierten Zelle angewiesen sind. Mithilfe der beiden Onkoproteine E6 und E7 ist es Papillomviren jedoch möglich zelluläre Replikationsproteine zu aktivieren, um die virale DNA zu vermehren. Als Folge dieser E6/E7-bedingten unkontrollierten Zellteilung und Verhinderung des Zelltodes wird die Entstehung von Karzinomen begünstigt [37].

In der Aufrechterhaltung des aktiven Zellzyklus in sich differenzierenden Keratinozyten spielt E7 eine wesentliche Rolle. Die E7 Proteine vieler Papillomviren sind in der Lage den Tumorsuppressor pRb (Retinoblastom-Protein), p107 und p130 zu binden [13, 36, 41]. Die Proteine der Rb-Familie regulieren den G1 zu S-Phase-Übergang, indem sie die Aktivität von E2F-Transkriptionsfaktoren, die eine aktivierende und reprimierende Wirkung auf die Genexpression haben können, kontrollieren. Für den Übergang in die S-Phase werden die Rb-Proteine durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) phosphoryliert, wodurch E2F freigesetzt wird, was schließlich die Aktivierung zahlreicher S-Phase-Gene zur Folge hat [13, 36, 42]. Durch die Bindung von E7 mit dem konservierten LXCXE-Motiv am C-Terminus wird die Interaktion zwischen Rb und den E2F-Transkriptionsfaktoren verhindert und somit ein Wiedereintritt der differenzierenden Keratinozyten in die S-Phase gewährleistet. Dieser

Mechanismus ermöglicht den Papillomviren die Nutzung der zellulären Replikationsmaschinerie [13, 36, 43]. Im Gegensatz zu den HR-Papillomvirustypen, binden die Typen der LR-Gruppe mit einer geringeren Affinität an pRb, p107 und p130. Ein weiterer Faktor für die Aufrechterhaltung der S-Phase, ist die Bindung von E7 an p21, das im Differenzierungszustand CDK2 inhibiert, was einen G1/S-Phase-Übergang veranlasst [36, 44].

Weitere Modulationen der Wirtszelle finden mithilfe des E6 Onkoproteins statt. Die Schlüsselfunktion von E6 ist hierbei die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53. Dies geschieht über die Bindung des E6 Proteins an die E3-Ligase E6AP, wodurch p53 ubiquitiniert und somit dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Dadurch wird die Einleitung von p53-vermittelten DNA-Reparaturmechanismen verhindert und der damit verbundene Zellzyklusarrest und proapoptotische Signalweg [36, 45-47]. Sowohl E6 Proteine der LR- als auch der HR-Papillomvirustypen interagieren mit p53, wobei HR-E6 Proteine in der Lage sind die Kernregion des p53-Proteins zu binden und dieses somit zu degradieren [48, 49]. Darüber hinaus binden E6 Proteine von HR-Typen zelluläre Proteine, die ein PDZ (PSD95/DLG1/ZO-1)-Motiv enthalten [50]. PDZ-Proteine, die involviert sind in Prozesse des Zellwachstums, Proliferation, Migration, Polarität und Apoptose, werden mit Hilfe des PDZ-Bindemotifs (PBM) von E6 für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet [36, 50-52]. Im Gegensatz dazu wurde für CRPV und HPV38 E6 gezeigt, dass indirekt über die Bindung an die Histonacetyltransferase p300 die Funktion von p53 Apoptose zu induzieren inhibiert wird [53]. Des Weiteren sind HR-PV Typen im Unterschied zu den LR-Typen in der Lage hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) zu induzieren, was die Seneszenz durch verkürzte Telomere verhindert [38].

2.5 Das virale E1 Protein – die virale Helikase

Das E1 Protein, das am höchsten konservierte Protein der Papillomviren, ist eine hexamere DNA-Helikase. E1 ist ein wesentlicher und unerlässlicher Bestandteil im Lebenszyklus von Papillomviren, was auch durch die ausgeprägte Konservierung dieses Proteins veranschaulicht wird. Es ist involviert in alle Lebensphasen der Papillomviren, beginnend bei der Etablierung des episomal vorliegenden PV-Genoms nach der Infektion der basalen Keratinozyten, hin zur Aufrechterhaltung der Kopienzahlen in den sich differenzierenden Zellen, bis hin zur produktiven Amplifikation des viralen Genoms, um eine effiziente Vermehrung des PV zu gewährleisten [2].

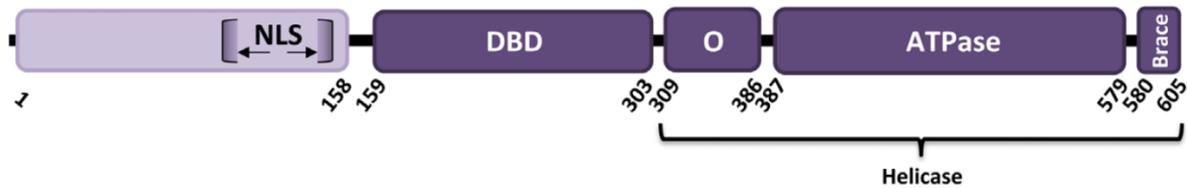


Abbildung 3: Schematische Darstellung von E1 des bovinen Papillomvirus Typ 1 (BPV1). Abgebildet sind die drei Domänen des E1 Proteins: Die regulatorischen N-terminalen Domäne, die ein Kernlokalisierungssignal (NLS) enthält, die DNA-Bindedomäne (DBD) und die C-terminale Region mit der Oligomerisierungsdomäne (O) und der ATPase (modifiziert nach Bergvall M., Melendy T. und Archambault J. 2013 [2]).

E1, das das größte kodierte Protein im PV-Genom ist, variiert zwischen 600 und 650 Aminosäuren je nach PV-Typ und kann in drei funktionelle Untereinheiten eingeteilt werden. Dazu gehört die regulatorische N-terminale Einheit, die DNA-Bindedomäne (DBD) und eine oligomerisierende C-terminale Domäne mit ATPase-Aktivität (Abbildung 3) [2, 54-56].

Der N-Terminus des E1 Proteins, der aus circa 200 Aminosäuren besteht, ist der am wenigsten konservierte Abschnitt. In diesem befinden sich unterschiedliche Motive, deren variable Konservierung unter den PV auf eine Anpassung an den Wirt und die zu infizierende Umgebung hindeutet. Ein wichtiger Sequenzabschnitt umfasst das zweiteilige Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS), das größtenteils aus negativ geladenen Aminosäuren besteht und dessen beide Regionen ungefähr 30 Aminosäuren voneinander entfernt sind. Weiterhin besitzt der N-Terminus ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) und ein Cyclin-Bindemotif (CBM). Damit können CDK2 und andere Kinasen die zelluläre Lokalisation des E1 Proteins über Phosphorylierung steuern [2, 57-59].

Für die Funktion als virales Replikationsprotein, ist die DNA-Bindedomäne (DBD) und Oligomerisierungsdomäne mit der ATPase unerlässlich. Die DBD kann nur mit geringer Affinität an folgende Konsensussequenz in der URR binden: 5'-AT(A/G/T)G(C/T)(C/T)-3' [60]. In dieser nicht kodierenden Region des viralen Genoms befinden sich sechs überlappende E1 Bindestellen (BS) [60, 61]. Zusätzlich befinden sich dort auch E2 Bindestellen. Mit der Bindung des E2 Proteins an diese, wird E1 in räumliche Nähe des Replikationsursprungs gebracht, womit sich ein E1-Dimer mit erhöhter DNA-Affinität an den E1-BS ausbildet [62]. Das E1 Protein kann die DNA am Replikationsursprung an beiden Strängen binden und bildet dort zunächst ein Dimer aus. Mit Hilfe der Oligomerisierungsdomäne werden aus den doppelten E1-Dimeren über E1-Trimere letztendlich doppelte Hexamere gebildet [60, 61]. Die beiden E1 Hexamere ermöglichen eine bidirektionale Entwindung der viralen DNA, die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängig ist. Mit Hilfe von weiteren zellulären Replikationsproteinen, wie der Polymerase- α , Topoisomerase I und dem Replikationsprotein A wird die bidirektionale Replikation des viralen Genoms vorangetrieben [2].

2.6 Das virale E2 Protein – ein Regulator der viralen Transkription und Replikation

Das E2 Protein ist ein vielseitiges Protein, das in zahlreiche Aspekte des Papillomviruslebenszyklus involviert ist. Zu diesen zählen die virale Replikation und Transkription [62-64]. Wesentlich für die Funktionalität von E2 sind die strukturellen Voraussetzungen. E2 ist ein hoch konserviertes Protein, dessen N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) aus ca. 200 Aminosäuren besteht. Diese ist über eine unter den verschiedenen PV-Typen in der Länge und Aminosäuresequenz variierende Hinge-Region mit der aus ca. 100 Aminosäuren bestehenden DNA-Bindedomäne (DBD), die auch für die Dimerisierung von E2 verantwortlich ist, verknüpft (Abbildung 4) [62]. In der URR des PV-Genoms bindet E2 an folgende, sich mehrfach wiederholende Konsensussequenz: 5'-ACCN₆GGT-3' [63].



Abbildung 4: Schematische Darstellung des E2 Proteins.

Abgebildet ist die N-terminale Transaktivierungsdomäne (*Transactivation domain*, TAD; hellgrün), die flexible Hinge-Region (graue Verbindung) und die DNA-Bindungs und Dimerisierungsdomäne (*DNA binding domain*, DBD; dunkelgrün) (modifiziert nach Graham S.V. 2016 [65]).

Für die Replikation von Papillomviren ist die Interaktion der viralen Helikase E1 mit dem viralen Transkriptions-/Replikationsfaktor E2 notwendig, wie in Abschnitt 2.5 bereits beschrieben wurde.

Durch die Fähigkeit von E2 nicht nur mit dem viralen Protein E1, sondern auch mit zellulären Faktoren wie dem Bromodomänen-enthaltenden Protein 4 (Brd4) zu interagieren, gehört neben der Replikation auch die Transkription zu dessen Funktionen [62]. Dabei ist E2 in der Lage virale Promotoren einerseits zu aktivieren, andererseits aber auch zu reprimieren [66-68]. Wird die Repression des frühen viralen Promotors durch die Integration des Papillomvirusgenoms aufgehoben und dadurch der Verlust des E2 kodierenden Genombereichs bedingt, resultieren daraus erhöhte Mengen der viralen Onkoproteine E6 und E7 [66, 69, 70]. Weiterhin ist im Papillomvirusgenom E8^{E2} kodiert, das ein alternatives Spliceprodukt aus E8 und dem C-Terminus des E2 Proteins darstellt und die virale Transkription und Replikation reprimiert [71].

Die Beobachtung, dass E2 und die virale DNA in nukleären Foci mit mitotischen Chromosomen der Wirtszelle kolokalisieren, impliziert des Weiteren, dass E2 für die Erhaltung und Verteilung des viralen Genoms während des Zellteilungsprozesses verantwortlich ist [35, 62].

2.7 Das multifunktionelle, zelluläre Protein Brd4

Das Bromodomänen-enthaltende Protein 4 (Brd4) ist ein Mitglied der BET- (Bromodomänen (BD)- und Extra-Terminale-Domäne (ET)) Familie, zu welcher auch Brd2, Brd3 und Brdt gehören [72, 73]. Brd4 besteht aus 1362 Aminosäuren, welche die namensgebenden BD1 und 2 und die ET-Domäne umfassen. Brd4 beinhaltet weitere Domänen, wie die NPS (*N-terminal cluster of phosphorylation sites*), BID (*basic residue-enriched interaction domain*), SEED (*Ser/Glu/Asp-rich region*), CTM (*C-terminal motif*) und die PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*), zu der die BD2 und NPS gezählt werden (Abbildung 5) [74-76]. Neben der langen Isoform A gibt es auch eine kurze Isoform C, genannt Brd4S (*Brd4 short*), die 722 Aminosäuren lang ist. Die Aminosäuren 1-719 sind bei beiden Isoformen identisch. Durch alternatives Splicing unterscheidet sich die kurze Isoform C jedoch durch die Aminosäuresequenz GPA am C-Terminus [75]. Brd4 ist ein essentielles Protein, das ubiquitär in proliferierenden Zellen exprimiert wird [77]. In unterschiedlichen Geweben werden variierende Mengen von der langen, als auch von der kurzen Isoform exprimiert [78]. Eine weitere Isoform B, die sich wie Brd4S zusammensetzt, aber zusätzliche 76 Aminosäuren am C-Terminus besitzt, wurde lediglich für U2OS-Zellen beschrieben [79].

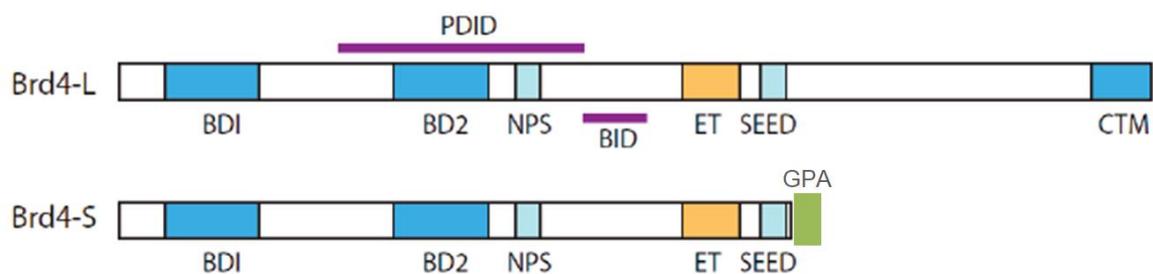


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Brd4 und seiner kurzen Isoform Brd4S. Abgebildet sind folgende Domänen: BD1 (Bromodomäne1; Aminosäuren (AS) 58-169); BD2 (Bromodomäne 2; AS 349-461); NPS (N-terminal cluster of phosphorylation sites; AS 483-504); PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*; AS 287-530); BID (*basic residue-enriched interaction domain*; AS 524-579); ET (Extra-Terminale-Domäne; AS 600-978); SEED (*Ser/Glu/Asp-rich region*; AS 695-720) CTM (*C-terminal motif*; AS 1325-1362); in Brd4S GPA-Aminosäuresequenz (AS 720-722)(modifiziert nach McBride A.A. und Jang M.K. 2013 [80]).

Brd4 ist in der Lage mit Hilfe der beiden Bromodomänen an Chromatin zu binden und damit eine Vielzahl an Funktionen zu erfüllen [72]. Vorzugsweise werden durch die

Bromodomänen acetylierte Lysine an den Histonproteinen H3 und H4 gebunden [81]. Kennzeichnend für die BD2 ist, dass sie zusätzlich acetylierte Lysine anderer Proteine, wie NF- κ B oder CyclinT1 des P-TEFb-Komplexes (*positive transcription elongation factor b*), binden kann [72, 82-84]. Neben der Eigenschaft durch die intrinsische Histonacetyltransferase (HAT) –Aktivität Chromatin aktiv modellieren zu können, ist eine weitere wesentliche Aufgabe von Brd4 als Gerüst für andere Chromatin-modellierende Proteine zu fungieren. Dies erfolgt durch die Interaktion der übrigen beschriebenen Domänen von Brd4 mit zahlreichen zellulären, aber auch viralen Proteinen. Dadurch ist Brd4 in Prozesse der Chromatin-Regulation, der Transkription, des Splicing, des Zellzyklus und auch der Deregulation dieser involviert [72]. Wichtig für Splicing-Ereignisse scheint dabei die N-terminale Region von Brd4 zu sein, von welcher eine Interaktion mit verschiedenen Splicing-Faktoren nachgewiesen werden konnte [85]. Weiterhin können über die Bindung an die ET-Domäne von Brd4 Histonmethyltransferasen, wie NSD3 (*Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 3*), Histondemethylasen, wie JMJD6 (*Jumonji Domain Containing 6*) und reprimierende Nukleosom-Remodellierungs- und Deacetylierungskomplexe, wie CHD4 (*Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4*) rekrutiert werden, welche die Transkription von Genen regulieren [72, 86].

Für die SEED-Domäne wurde beschrieben, dass diese über die Casein-Kinase (CK) 2 phosphoryliert wird und damit eine Konformationsänderung von Brd4 stattfindet, die dessen Funktionalität verändert [72]. Eine weitere Region in Brd4, die phosphorylierungs-abhängig ist und von CK2 reguliert wird, ist die NPS-Region [76]. Mit der Phosphorylierung der NPS werden Konformationsänderungen der PDID und BID in Brd4 verursacht (Abbildung 6). Es wurde gezeigt, dass im phosphorylierten Zustand der NPS die BD2 in der PDID nicht maskiert wird und somit eine Bindung an das Chromatin stattfinden kann. Gleichzeitig ist es auch p53 möglich in diesem Zustand an die phosphorylierte NPS zu binden. Im Gegensatz dazu wird für den nicht-phosphorylierten Zustand angenommen, dass p53 an die BID bindet, da diese erst durch die fehlende Phosphorylierung nicht maskiert wird. Diese Konformation jedoch führt zu der Maskierung der BD2, was zur Folge hat, dass Brd4 nicht mehr an das Chromatin binden kann [76]. Brd4 ist über diese Phosphorylierungs-bedingte Konformationsänderung hinaus in der Lage die Transkription auf weiteren Ebenen zu regulieren. Diese Regulation kann sowohl aktiv durch die direkte Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA Pol II, als auch passiv durch das Binden von P-TEFb (bestehend aus CyclinT1 und CDK9) an die CTM von Brd4 sein, wobei P-TEFb seinerseits wiederum Transkriptionsfaktoren rekrutieren und die RNA Pol II aktivieren kann. Damit ist Brd4 für die Transkriptionsinitiation und –elongation essentiell [72, 74].

Im Gegensatz zu der langen Isoform von Brd4 besitzt Brd4S keine HAT-Domäne und keine CTM-Domäne. Im Einklang damit konnten für die kurze Isoform gegensätzliche

Eigenschaften beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass Brd4S den Condensin II Chromatin-Remodellierungskomplex rekrutieren kann und damit durch eine kompaktere Chromatinstruktur vor DNA-Schäden schützt [79]. Überdies hinaus wurden den jeweiligen Isoformen unterschiedliche Rollen hinsichtlich der transkriptionellen Regulation neuronaler Gene, dem Voranschreiten von metastasierendem Brustkrebs und deren Lokalisation in Zellkernen zugeordnet [87-89]. Auch wurden ihnen spezifische Profile der Histonbindung nachgewiesen [87]. Wichtig scheint auch das Verhältnis von Brd4 und Brd4S im Hinblick auf den anti-leukämischen Effekt der Serine/Arginine-Protein Kinase 1 (SRPK1) -Inhibition zu sein [90].

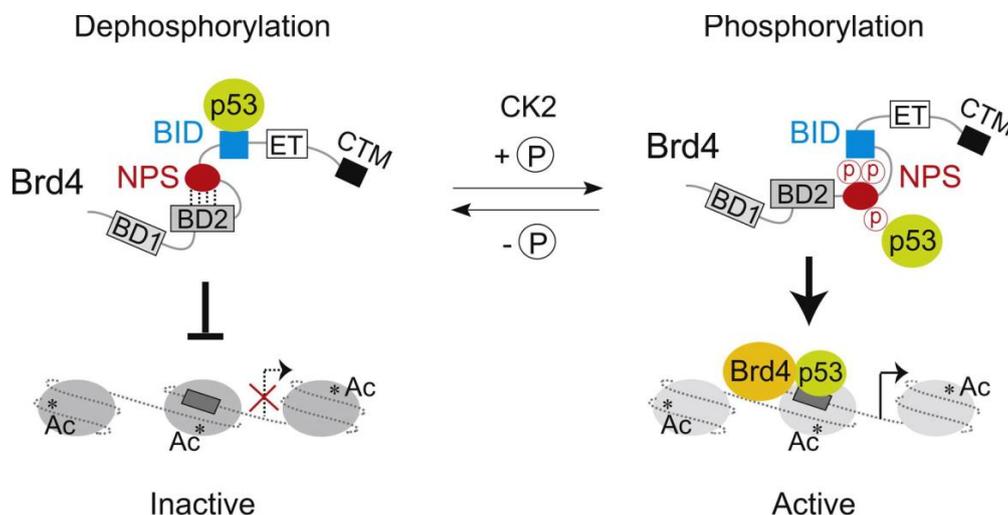


Abbildung 6: Phosphorylierungs-abhängige Konformationsänderung von Brd4 und p53-Interaktion (modifiziert nach Wu S.Y. 2013 [76]).

2.8 Brd4 und seine Rolle im Lebenszyklus von Papillomviren

Brd4 ist ein zelluläres Protein, das nahezu in alle Ebenen des PV-Lebenszyklus eingebunden ist. In diesem Zusammenhang konnte mit dem Knockdown von Brd4 im CRPV (*cottontail rabbit papillomavirus*)-vermittelten Kaninchentumormodell gezeigt werden, dass die Entstehung von Papillomen komplett verhindert werden kann [91]. Denselben Phänotyp zeigte eine im CRPV/Kaninchenmodell getestete Gesamtgenommutation, die im E2-Gen liegt und welche die Interaktion mit Brd4 verhindert. Dieser Befund verdeutlicht den direkten Zusammenhang, der auch für die Tumorigenese essentiell ist, zwischen Brd4 und dem PV-Lebenszyklus [92].

Der Wirkungsbereich von Brd4 im PV-Lebenszyklus wird über eine direkte Interaktion zu E2 bewerkstelligt. Dabei bindet die N-terminale TAD von E2 Proteinen aller Papillomviren an die CTM-Domäne von Brd4. Die Aminosäuren R37 und I73 in E2, die dabei den Kontakt zu der CTM von Brd4 herstellen, sind hochkonserviert [62, 80, 93, 94]. Die Position, an welcher

Stelle E2 relativ zum Promotor bindet, beeinflusst dessen Eigenschaft als Transkriptionsregulator [62, 66-68, 74]. Durch die Bindung an distale E2 Bindestellen (E2BS) und geringe Mengen von E2, kann der frühe virale Promotor aktiviert werden [69, 70]. Auch Mutationsanalysen der Positionen R37 und I73 in E2 oder umgekehrt die Titration des dominant-negativen Peptides des C-Terminus von Brd4 in ein E2-abhängiges System, bestätigen die aktivierende Wirkung des E2-Brd4-Komplexes [62, 80, 95-97]. Für E2 Proteine der HR-PV hingegen ist bekannt, dass diese Promotor-proximale E2BS binden können und in Folge dessen die virale Transkription inhibieren. Es wurde gezeigt, dass die Bindung in unmittelbarer Nähe zum viralen Promotor, die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors II D (TFIID) und des davon abhängigen Präinitiationskomplexes mit RNA Pol II verhindert [74, 98, 99]. Neben der Transkriptionsinitiation verhindert E2 auch die Elongation. Die Rekrutierung von P-TEFb durch Brd4 an den frühen viralen Promotor ist essentiell für dessen Transkriptionsaktivität, die jedoch durch das Konkurrieren von E2 mit P-TEFb um die Bindestelle am C-Terminus von Brd4 verhindert wird [74, 100].

Bezüglich der Replikation wird angenommen, dass Brd4 in der Anfangs- und Aufrechterhaltungsphase der Amplifikation des viralen Genoms eine Rolle spielt, jedoch nicht in der produktiven Lebensphase [35, 62, 74, 80]. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass Brd4 in E1/E2-abhängige Replikationsfoci rekrutiert wird. Nach dieser initialen Formation und Etablierung der Replikation jedoch wird Brd4 in die Peripherie des Komplexes verlagert [101, 102]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die langfristige Replikation des viralen Genoms in Zelllinien mit Brd4-bindungsdefizienten E2 Mutanten nicht beeinträchtigt wird und damit nicht essentiell für die produktive Virusvermehrung zu sein scheint [62, 74, 80, 97]. Auch ohne direkte Beteiligung von Brd4 an der vegetativen Replikation von Papillomviren besteht die Möglichkeit der Relevanz im Zusammenhang mit dem ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) DDR (*DNA damage and repair response*) Signalweg, der wesentlich zur Amplifikation des PV-Genoms in differenzierten Zellen beiträgt und durch PV-abhängige Replikationsfoci ausgelöst wird [74, 103]. Diese erschließt sich durch die Interaktion von Brd4 mit der Untereinheit ATAD5 des Replikationsfaktors C (RFC), die das Ringklemmenprotein PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) reguliert oder durch die Interaktion mit dem CDC6 (*cell division cycle 6*)-Protein, das für die Rekrutierung des DNA-Pre-Replikationskomplexes und der DNA-Replikationsmaschinerie verantwortlich ist [104, 105]. Weiterhin wird die kurze Isoform B von Brd4 (in Osteosarcoma-Zellen) mit einer dem DDR-Signalweg entgegenwirkenden Abschirmfunktion in Verbindung gebracht [79].

Eine weitere Funktion des E2-Brd4-Komplexes ist dafür zu sorgen, dass das virale Genom in den Wirtszellen persistieren kann [80]. Dies wird auf unterschiedliche Art und Weise für die verschiedenen PV-Genera erreicht. Für Alpha-PV E2 Proteine kann lediglich eine sehr geringe Bindung an Brd4 und damit an mitotische Wirtschromosomen festgestellt werden,

wohingegen E2 Proteine von Beta-PV eine starke Assoziation mit mitotischen Chromosomen aufweisen [62, 74, 80, 106]. Auch E2 Proteine anderer Genera sichern aufgrund ihrer starken Bindung an Brd4 die Anheftung an das zelluläre Chromatin [80, 107].

Viele Teilaspekte des PV-Lebenszyklus, wie die Stabilisierung des E2 Proteins, die Regulation der Transkription und Replikation und der Erhalt des viralen Genoms im Verlauf des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten beruhen auf der Bindefähigkeit von E2 an Brd4 [74].

Neben der bekannten Interaktionsstelle, die sich am C-Terminus von Brd4 und an der TAD des E2 Proteins befindet, wurde 2016 von Wu et al. eine potentielle zweite Interaktionsstelle in Brd4 und E2 postuliert (Abbildung 7) [74, 108]. Diese umfasst in Brd4 die PDID und BID (Abbildung 5). In E2 wurde der C-Terminus an den Positionen 306/307 mit den Aminosäuren KK für HPV16 und an den Positionen 307/308 mit den Aminosäuren RK für HPV18 als Interaktionsbereich insbesondere für die PDID beschrieben. Es wurde gezeigt, dass sich diese neue Interaktion zwischen HR- und LR- Alpha-Papillomviren unterscheidet. Hierzu wurde HPV11 als nicht-interagierendes Gegenstück mit den entsprechenden Aminosäurenresten N304/D305 im Vergleich zu HPV16 und 18 getestet [74, 108]. Ähnlich wie für die Bindung von p53 und PDID, wird auch für die Bindung von E2 eine phosphorylierungs-abhängige Konformationsänderung in der PDID beschrieben (siehe Abschnitt 2.7) [76, 108]. So kann für den nicht-phosphorylierten Zustand der PDID angenommen werden, dass die BID durch die NPS nicht maskiert wird. Dies ist ein Zustand, welcher die Bindung von HR- und LR- HPV zulässt [108]. Allerdings führt die fehlende Phosphorylierung der NPS zur Maskierung der BD2, was dazu führt, dass Brd4 seine Funktion als Chromatin-bindendes Protein nicht erfüllen kann. Im phosphorylierten Zustand hingegen ist die BD2 frei für die Bindung an das Chromatin und gleichzeitig wird die BID maskiert. In diesem Zustand ist es nur den HR-Typen möglich die phosphorylierte PDID zu binden [108]. Mit dieser phosphorylierungs-abhängigen Konformationsänderung von Brd4 wird neben der Rekrutierung von E2 oder p53 auch die Rekrutierung anderer Transkriptionsfaktoren, wie AP-1-Faktoren und NFκB moduliert [74, 76, 108].

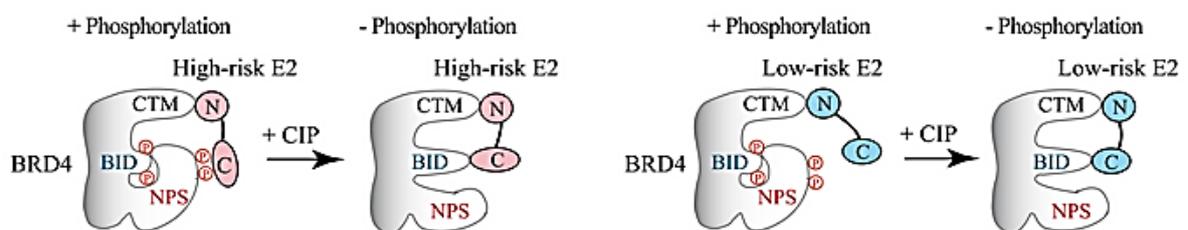


Abbildung 7: Zweite Phosphorylierungs-abhängige Interaktionsstelle zwischen HR- und LR-Papillomvirentypen und Brd4 (modifiziert nach Wu S.Y. 2016 [108]).

Darüber hinaus ist bekannt, dass auch andere Viren BET-Proteine für sich nutzen. Das im KSHV (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*)-Genom codierte LANA-1 (*latency-associated nuclear antigen-1*)-Protein, bindet Brd2 und Brd4, was der transkriptionellen Regulation dient. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass LANA-1 auch mit Brd4S interagiert und somit die Wirtszelle in die S-Phase treibt [109]. Im Kontext von HIV konkurrieren der virale Transaktivator TAT und P-TEFb um Brd4, was zur Latenz führt [80]. Brd4S wurde als weiterer Faktor identifiziert, welcher die HIV-Latenz unterstützt, indem es einen reprimierenden Chromatin-modellierenden Komplex an HIV-Chromatin rekrutiert [110]. Mit dem Einsatz von BET-Inhibitoren konnte HIV reaktiviert werden und Brd4S wurde von den entsprechenden Positionen des Chromatins deplatziert [80, 110].

2.9 Ziel der Arbeit

Brd4 ist ein hochkonservierter Interaktionspartner von E2 Proteinen der Papillomviren. Eine neuere Arbeit (Wu et al., 2016) beschreibt eine zweite potentielle Interaktionsstelle in Brd4 und E2 Proteinen. Diese umfasse die BID, eine universale E2-Bindestelle, und die PDID in Brd4, welche im phosphorylierten Zustand ausschließlich HR- E2 Proteine binden könne. Ziel war es zunächst diese zweite Interaktionsstelle in lebenden Zellen mithilfe der FACS (*fluorescent activated cell sorting*) – FRET (*Försters resonance energy transfer*) Methode für den HR-Typ HPV31 zu bestätigen. Da für die Bindung zur PDID in HPV16 und 18 E2 jeweils K306/K307 und R307/K308 identifiziert worden waren, wurde HPV31 E2 ebenso hinsichtlich dieser Bindung untersucht. Hierzu sollte die entsprechende HPV31 E2 S313N/K314D Proteinmutante hergestellt werden, von der angenommen wurde, dass sie einen Interaktionsverlust zur PDID zeigt. Im nächsten Schritt sollte die HPV31 E2 ND-Proteinmutante im Kontext E2-abhängiger Aktivitäten und der postulierten PDID und BID-Bindung untersucht werden. Mit der Bestätigung dieser Bindestelle im C-terminus von E2, sollten die Auswirkungen eines Verlustes der zweiten Interaktionsstelle im Gesamtgenomkontext mit Herstellung von stabilen Zelllinien, welche die HPV31 E2 S313N/K314D Proteinmutante exprimieren, erfolgen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob diese zweite Interaktionsstelle auch in CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*) E2 existiert, so dass eine funktionelle Untersuchung der zweiten potentiellen Interaktionsstelle *in vivo* mithilfe des CRPV/Kaninchenmodells erfolgen könnte.

Mit der Existenz einer zweiten Interaktionsstelle in Brd4, ist nicht nur die Interaktion zwischen der langen Isoform von Brd4 mit E2 Proteinen, sondern auch eine Interaktion mit Brd4S, einer kurzen Isoform von Brd4 ohne CTM, möglich. Diese mögliche Interaktion sollte

zunächst bestätigt werden. Da es des Weiteren keine Erkenntnisse über die Rolle von Brd4S im Lebenszyklus von Papillomviren gibt, sollte diese in Bezug auf E2-abhängige Aktivitäten und im Kontext replizierender Genome in HPV31-positiven Zellen (CIN612-9E) untersucht werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad p.a. („*pro analysis*“, zur Analyse), sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, BioRad, Biozym, Fluka, Medac, Merck, Perkin-Elmer, PeQlab, pjK, Roche, Roth und Sigma bezogen.

3.2 Medien und Puffer

3.2.1 Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulfatpuffer (Western Blot)

10 % Ammoniumperasulfat (w/v)

Annealingpuffer 2x

200 mM Kaliumacetat; 60 mM Hepes/KOH pH=7,4; 4 mM Magnesiumacetat

Antikörper-Verdünnungspuffer (Immunfluoreszenz)

PBS mit 3 % (w/v) BSA

Bindepuffer 5x (EMSA)

100 mM HEPES pH=7,9, 2,5 mM EDTA pH=8,0, 25 % Glycerin, 1 mM DTT

Blockierpuffer (Western Blot)

PBS + 5 % Magermilchpulver (w/v) oder PBS + 3 % BSA (w/v)

CAPS-Transferpuffer (Westernblot)

10 mM CAPS; 10 % (v/v) Methanol; pH=10,3 (mit 10 M NaOH eingestellt)

Fixierungspuffer (Immunofluoreszenz)

Methanol/Aceton-Gemisch (1:1)

Luziferase-Lysepuffer

100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH=7,8; 1 % (v/v) Triton-X 100; 1 mM DTT

Luziferase-Reaktionspuffer

100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH=7,8; 15 mM MgSO_4 ; 5 mM rATP

Lysepuffer (Immunpräzipitation)

50 mM TrisHCl (pH 8); 0,5 % Igepal 630 (NP40); 150 mM NaCl; 1 mM DTT, 1x complete EDTA free Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma); 1x PhosSTOP EASYpack Phosphataseinhibitor-Cocktail (Sigma)

PBS 10x

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄ pH=7,2

PBS-T

1x PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (Sigma)

Poly(dA-dT)

1 µg/µl gelöst in 10 mM HEPES pH=7,9 und 100 mM NaCl

Puffer A (nukleäre Extrakte)

10 mM HEPES/KOH, pH=7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 1x complete EDTA free Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma); 1x PhosSTOP EASYpack Phosphataseinhibitor-Cocktail (Sigma)

Puffer C (nukleäre Extrakte)

20 mM HEPES/KOH, pH=7,9; 1,5 mM MgCl₂; 420 mM NaCl; 25 % Glycerin (v/v); 2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 1x complete EDTA free Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma); 1x PhosSTOP EASYpack Phosphataseinhibitor-Cocktail (Sigma)

Sammelgelpuffer (Western Blot)

1,5 M TrisHCl; pH=6,8

SDS-Stammlösung (Western Blot)

10 % SDS (w/v)

SDS-Laufpuffer 5x

125 mM TrisHCl; 960 mM Glycin; 17,3 mM SDS

TAE-Puffer 50x

2 M Tris; 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA pH=8,0

TBE-Puffer 10x

890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH=8,0

Trenngelpuffer (Western Blot)

1,5 M TrisHCl; pH=8,8

Waschpuffer (Immunpräzipitation)

50 mM TrisHCl (pH 8); 0,5 % Igepal 630 (NP40); 0 - 400 mM NaCl

3.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Bakterien-Einfriermedium

65 % Glycerol (v/v); 0,1 M MgSO₄; 2,5 mM Tris, pH=8,0

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

25 g LB-Medium (Carl Roth) auf 1 l H₂O; gegebenenfalls Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

LB-Agar

25 g LB-Medium (Carl Roth) auf 1 l H₂O; 12 g Agar (Invitrogen) auf 1 l H₂O; gegebenenfalls Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

SOC-Medium

26,64 g SOB-Medium (Carl Roth) auf 1 l Medium; 20mM Glucose

3.2.3 Medien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Invitrogen) FKS

Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Invitrogen) CS

Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin und 10 % (v/v) Kälberserum (CS, Gibco Invitrogen)

E-Medium

50 % DMEM und 50 % DMEM/Ham's F12 1:1; 5 % definiertes fötales Kälberserum (HC-FKS: Perbio); Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (417 µg/ml); Insulin (50 µg/ml); Transferrin (50 µg/ml); Trijodthyronin T3 (20 pM); Cholera toxin (10 nM); 5 ng/µl epidermale Wachstumsfaktoren (EGF)

Gentamycin (Isok-Paas et al.)

Stammlösung 10 mg/ml in ddH₂O

Mitomycin (Medac)

Stammlösung 0,4 mg/ml in PBS

OptiMEM (Gibco)

Serumreduziertes Medium mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin)

PBS Dulbecco's (Gibco, Invitrogen)

Fertiglösung ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat

Polybrene

Stammlösung 5 mg/ml in ddH₂O

Puromycin (Calbiochem)

Stammlösung 1 mg/ml in ddH₂O

Trypsin-EDTA (Invitrogen)

0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter PUCK's Salzlösung A

Versen

PBS - Fertiglösung mit 0,5 mM EDTA

3.3 Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien**Tabelle 1:** Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien

Name	Hersteller	Verwendungszweck
EZ1 DNA Tissue Kit	Qiagen	DNA Extraktion

FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega	Transfektion von Plasmid-DNA
Gaussia-Juice Big Kit	pjk	Messung der Gaussia Luziferaseaktivität
LightCycler SYBR Green I Master	Roche	qRT-PCR
Lipofectamine® RNAiMax Reagent	Thermofisher Scientific	siRNA Transfektion
Protein A magnetic beads	Cell Signaling	Immunpräzipitation
QIAGEN® Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAGEN® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAGEN® Gel extraction Kit	Qiagen	DNA-Gelextraktion
QIAshredder® Kit	Qiagen	Homogenisierung des Zelllysats
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	Reverse Transkription, cDNA-Synthese
Rapid DNA Ligation Kit	Thermofisher Scientific	DNA-Ligation
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolation
Roti® Load 1 (4x)	Carl Roth	SDS-Probenpuffer
Roti®-Mount FluorCare DAPI	Roth	Zellkernfärbung
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Thermofisher Scientific	MultiplexqRT – PCR
µMACS HA Isolation Kit	Miltenyi Biotec	HA-Immunpräzipitation
µMACS Flag Isolation Kit	Miltenyi Biotec	Flag-Immunpräzipitation

3.4 Größenstandards für die Gelelektrophorese

DNA-Größenstandard: Generuler™ 1kb DNA-Ladder, 0,1 µg/µl (ThermoFisher Scientific)

Protein – Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific)

3.5 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Thermofisher Scientific
- New England Biolabs

Sonstige Enzyme:

- Alkalische Phosphatase (Thermofisher Scientific)
- Benzonase (Novagen)
- Proteinase K (Qiagen)
- Pyrobest® DNA-Polymerase (Takara)
- T4-DNA-Ligase (Thermofisher Scientific)

3.6 Primäre Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

Antigen	Spezies (Klonalität)	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung		
			WB	IF	IP
α -Tubulin	Mouse (mAb)	Calbiochem (CP06)	1:1000	-	-
Brd4 (N-Ter) 14H4L4	Rabbit (mAb)	Themofisher Scientific #702448	1:350	1:250	-
Brd4 E2A7X (C- Ter)	Rabbit (mAb)	Cell Signaling #13440S	1:1000	-	1:50
Brd4S GPA	Rabbit	CM Chiang	1:500	-	1:50
DYKDDDDK-Tag (Flag) (9A3)	Mouse (mAb)	Cell Signaling #8146S	1:1000	1:1000	-
DYKDDDDK-Tag (Flag)	Rabbit (pAb)	Cell Signaling #2368S	1:1000	1:400	-
HA-Tag (6E2)	Mouse (mAb)	Cell Signaling #2376S	1:1000	1:100	-
HA-Tag (C29F4)	Rabbit (mAb)	Cell Signaling #3724S	1:1000	1:800	-
HSP90	Mouse (mAb)	SantaCruz #sc-69703	1:2000	-	-
MCM-7/CDC47	Mouse (mAb)	Thermofisher	1:1500	-	-

(7DC141)		Scientific #MA1-91554			
Normal Rabbit IgG	Rabbit (pAb)	Cell Signaling (#2729)	-	-	1:50
tRFP	Rabbit (pAb)	Evrogen #233	1:1000	1:200	-
YFP (JL-8)	Mouse (mAb)	Takara #632381	1:1000	1:100	-

3.7 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antigen	Spezies (Klonalität)	Hersteller (Bestellnummer)	Verdünnung	
			WB	IF
Mouse Alexa Fluor® 488	Goat	ThermoFisher Scientific (A-11029)	-	1:2000
Mouse Alexa Fluor® 555	Donkey	ThermoFisher Scientific (A-31570)	-	1:2000
Mouse, IRDye® 680RD	Goat	LiCor (926-68070)	1:15000	-
Mouse, IRDye® 800CW	Goat	LiCor (926-32210)	1:15000	-
Rabbit Alexa Fluor® 488	Goat	ThermoFisher Scientific (A-11034)	-	1:2000
Rabbit Alexa® Fluor 555	Goat	ThermoFisher Scientific (A-21429)	-	1:2000
Rabbit, IRDye® 680RD	Goat	LiCor (926-68071)	1:15000	-
Rabbit, IRDye® 800CW	Goat	LiCor (926-32211)	1:15000	-

3.8 Baktrienstämme

Escherichia coli DH5 α (Clontech):

Genotyp: endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA (Naly) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15); Endonukleasen- und Rekombinase-defizienter Bakterienstamm zur DNA-Amplifikation

3.9 Eukaryotische Zellen

C33A (ATCC-Nr.: HTB-31):

Humane HPV-negative Zervixkarzinom-Zelllinie, Mutationen in p53 und pRB [111].

CIN – 612 9E:

HPV31 positive Zelllinie aus zervikaler intraepithelialer Neoplasie [112].

HEK293T (Human Embryonic Kidney):

Humane embryonale Nierenzelllinie, immortalisiert mit Adenovirus E1A und SV40 Large – T – Antigen [113].

Neomycin-resistente3T3-J2-NHP: Neomycin –, Hygromycin – und Puromycin – resistente NIH3T3 – J2 – Zellen [114].

NHK:

Normale humane Keratinozyten [115].

NIH3T3 – J2:

Murine Fibroblasten Zelllinie [116].

3.10 siRNA

Tabelle 4: verwendete siRNA-Sequenzen und ihre Bezeichnungen

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
AllStar.Neg.Control siRNA		Qiagen (SI03650318)
siBrd4S-1	GUUGAACUUGAAAGCUCAUUAG	Dharmacon
siBrd4S-2	GGAACUGGAAGUGGGCUAUCA	Dharmacon
siBrd4S-3	GGUCCUGCCUAAUCAUUGGAC	Dharmacon

siBrd4S	UCCCAGCAAGCUAUAGCUUAA	Dharmacon
---------	-----------------------	-----------

3.11 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Thermofisher Scientific oder IDT oder Biomers synthetisiert. Die Darstellung folgt der 5'-3' Orientierung. Für die Elektromobilitäts-Shift-Analysen wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY681 markiert.

Tabelle 5: Oligonukleotide mit der Bezeichnung, Sequenz und ihrem Verwendungszweck

Bezeichnung (Position)	Sequenz (5'-3')	Verwendung
E2BS pC18 F	CTAGACCGAAAACGGTCGGG	EMSA
E2BS pC18 R	CCCGACCGTTTTTCGGTCTAG	EMSA
E2 pC18 mut F	CTAGAGGGAAAACCCTCGGG	EMSA
E2 pC18 mut R	CCCGAGGGTTTTCCCTCTAG	EMSA
BRD4S-ex12-SA_A fw (31141)	CACCG TTTCTCTCTCCCTCTACGT [90]	gRNA
BRD4S-ex12-SA_A rev (31141)	AAAC ACGTAGAGGGAGAGAGAAA C [90]	gRNA
BRD4S-ex12-SA_B fw (31154)	CACCG TTAGGCAGGACCTACGTAG [90]	gRNA
BRD4S-ex12-SA_B rev (31154)	AAAC CTACGTAGGTCCTGCCTAA C [90]	gRNA
Brd4_XhoI_fw (7356)	TATATCTCGAGTCTGCGGAGAGCGGCC	Klonierung
Brd4_EcoRI_rev (25033)	GTCGGGGTTGGAATTCTTCAGGGAGG	Klonierung
Brd4Short_XhoI_fw (7353)	tcagatcTCGAGCTATGTCTGCGGAGAGC	Klonierung
Brd4Short_BamHI_rev (26285)	cttgagggatccgcGGCGGGGCTGTTTCGGAGTCTTC	Klonierung
BFP_31E2_Kpn2I_fw (1312)	aatTCCGGAGAGACACTGAG	Klonierung
BFP_31E2_BamHI_rev (2420)	tccggtgatcccTCAGATGGTCATGT	Klonierung
31E2_S313N/K314D_fw (2241)	GTACAGACTGAACGACTACAAGCAGC	Klonierung
31E2_S313N/K314D_rev	GCTGCTTGTAGTCGTTCACTGTGTAC	Klonierung

(2241)		
31E2_I73L_rev (1521)	TCTGCAGCTCCAGGGCCTGCAGG	Klonierung
31E2_I73L_fw (1521)	CCTGCAGGCCUUGGAGCTGCAGA	Klonierung
31E2_K111Q_fw (1633)	ACCGGCTGCCTGCAGAAACACGGCTAC	Klonierung
31E2_K111Q_rev (1633)	GTAGCCGTGTTTCTGCAGGCAGCCGGT	Klonierung
31E2_K111A_fw (1633)	ACCGGCTGCCTGGCCAAACACGGCTAC	Klonierung
31E2_K111A_rev (1633)	GTAGCCGTGTTTGGCCAGGCAGCCGGT	Klonierung
31E2_K112A_fw (1634)	CTGCCTGAAGGCCACGGCTACA	Klonierung
31E2_K112A_rev (1634)	TGTAGCCGTGGGCCTTCAGGCAG	Klonierung
31E2_E74A_fw (1523)	GCAGGCCATCGCCCTGCAGATGA	Klonierung
31E2_E74A_rev (1523)	TCATCTGCAGGGCGATGGCCTGC	Klonierung
31E2_R37A_fw (1413)	GAAGCACATCGCCCTGGAATGCG	Klonierung
31E2_R37A_fw (1413)	CGCATTCCAGGGCGATGTGCTTC	Klonierung
31E2_S65A_fw (1497)	CCTGAGCGTGGCCAAAGCCAAAG	Klonierung
31E2_S65A_rev (1497)	CTTTGGCTTTGGCCACGCTCAGG	Klonierung
31E2_T93A_fw (1581)	CGAGGACTGGGCCATGCAGCAGA	Klonierung
31E2_T93A_rev (1581)	TCTGCTGCATGGCCCAGTCCTCG	Klonierung
31E2_Y19A_fw (1359)	CCTGGAACACGCCGAGAACGACA	Klonierung
31E2_Y19A_rev (1359)	TGTCGTTCTCGGCGTGTTCCAGG	Klonierung
31E2_Y131A_fw (1695)	CACCATGCACGCCACCAACTGGA	Klonierung
31E2_Y131A_rev (1695)	TCCAGTTGGTGGCGTGCATGGTG	Klonierung
31E2_Y158A_fw (1776)	CAAGGGCATCGCCTACGTGCACG	Klonierung
31E2_Y158A_rev (1776)	CGTGCACGTAGGCGATGCCCTTG	Klonierung
31E2_Y159A_fw (1779)	GGGCATCTACGCCGTGCACGAGG	Klonierung
31E2_Y159A_rev (1779)	CCTCGTGCACGGCGTAGATGCC	Klonierung
31E2_Y87A_fw (1563)	CAACACCGAGGCCAAGAACGAGG	Klonierung
31E2_Y87A_rev (1563)	CCTCGTTCTTGGCCTCGGTGTTG	Klonierung
ACTB	Hs.PT.56a.40703009.9 (IDT)	Multiplex
HPV31 E2 fw (2875)	GTT GTC AGT ATC AAA GGC CAA AG (IDT)	Multiplex
HPV31 E2 rev (2996)	CAC CCT GTA GGT GCA GTT AAA TA (IDT)	Multiplex
HPV31 E2 Sonde (2963)	5Cy5/ACT TGT TTG CTG CAT TGT CCA GTC C/3IAbRQSp (IDT)	Multiplex
HPV31 E6 fw (431)	ACC GTT GTG TCC AGA AGA AA (IDT)	Multiplex
HPV31 E6 rev (527)	GGT TTC AGT ACG AGG TCT TCT C (IDT)	Multiplex
HPV31 E6 Sonde (501)	56-FAM/TGG ACA GGA /ZEN/CGT TGC ATA GCA TGT /3IABkFQ (IDT)	Multiplex

qPCRBrd4_fw (2184)	CGACTTTGAGACCCTGAAGC [90]	qRT-PCR
qPCRBrd4S_rev (2371)	GGCAGGACCTGTTTCGGA	qRT-PCR
qPCRBrd4FI_rev (2380)	TCGGAGCCATCTCTGTTTC [90]	qRT-PCR
HPV31 E1^E4F (804)	TGTTAATGGGCTCATTTGGAA	qRT-PCR
HPV31 E1^E4R (3373)	GGTTTTGGAATTCGATGTGG	qRT-PCR
HPV31 E8^E2F (1242)	ACTTCCAGACAGCGGGTATG	qRT-PCR
HPV31 E8^E2R (3461)	GGTGGGTGTTTCTGTGCTCT	qRT-PCR
HPV31 E4^L1 F (3528)	CATGCACAAACCAAACAAGG	qRT-PCR
HPV31 E4^L1R (5651)	GCACTGCCTGCGTGATAATA	qRT-PCR
HPV31 E6* F (192)	AATTGTGTCTACTGCAAAGGTGTA	qRT-PCR
HPV31R E6* (508)	CCAACATGCTATGCAACGTC	qRT-PCR
GAPDH for (448)	TGCACCACCAACTGCTTAGC	qRT-PCR
GAPDH rev (535)	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	qRT-PCR
Luc qPCR F (561)	CCAGGGATTTTCAGTCGATGT	qRT-PCR
Luc qPCR R (743)	AATCTCACGCAGGCAGTTCT	qRT-PCR

3.12 Plasmide und Vektoren

pC18 – Sp1 – Luc: Das Plasmid ist von pAluc abgeleitet. Es besitzt vier synthetische E2-Bindungsstellen und zwei SP1-Bindungsstellen 5' von dem Initiator-Element des späten Adenovirus-Hauptpromotors und der TATA-Box [30].

pcDNA3.1 (erhalten von Cheng Ming Chiang): Eukaryontes Expressionsplasmid, bei welchem das inserierte Gen unter der Kontrolle des CMV – Promotors steht (ThermoFisher Scientific).

pcDNA3 – flag hBrd4 [117]: Ein von pcDNA3.1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für das humane Brd4 und ein Flag – Epitop enthält, das an den N – Terminus von Brd4 fusioniert ist.

pcDNA3 – flag Brd4 (1-1223) [117]: Ein von pcDNA3-flag Brd4 abgeleitetes Expressionsplasmid. Der codierende Genabschnitt des humanen Brd4 enthält die Aminosäuresequenz von 1-1223 und ist eine CTM Deletionsmutante. Im Rahmen dieser Arbeit lautet die Bezeichnung: **f:Brd4dCTM**.

pcDNA3 – flag hBrd4 delta BD1/2 (dBD1/2) [117]: Ein von pcDNA3-flag hBrd4 abgeleitetes Expressionsplasmid. Die Bromodomänen 1 und 2 wurden deletiert.

pcDNA3 – flag hBrd4 delta BID (dBID) [76]: Ein von pcDNA3-flag hBrd4 abgeleitetes Expressionsplasmid. Die BID – Region wurde deletiert.

pcDNA3 – flag hBrd4 delta NPS (dNPS) [76]: Ein von pcDNA3-flag hBrd4 abgeleitetes Expressionsplasmid. Die NPS – Domäne wurde deletiert.

pCMV – GLuc: Ein Kontrollplasmid, welches unter der Kontrolle des CMV-Promotors das Luziferase-Gen von *Gaussia princeps* exprimiert (New England Biolabs).

pCMV neo 31E1 – 3xflag [118]: Ein von pCMV – 3Tag – 1a (Stratagene) abgeleitetes Expressionsplasmid, welches eine codon – optimierte Gensequenz für HPV31 E1 unter Kontrolle des CMV – Promotors enthält. N-terminal an E1 sind drei Flag – Epitope fusioniert.

pCMV 31E1 (hergestellt von Saskia van de Poel): Ein von pCMV neo 31E1-3xflag abgeleitetes Expressionsplasmid, bei welchem die drei Flag – Epitope durch eine ATG – Sequenz ersetzt wurden.

pEYFP-C1 (zur Verfügung gestellt von der AG Schindler): Eukaryontes Expressionsplasmid, welches unter Kontrolle des CMV – Promotors EYFP exprimiert und eine C – terminale MCS enthält.

pEYFP-HPV31 E2co-Nter (hergestellt von Giada Corradini Bartoli): Ein von pEYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codon – optmierte codierende Sequenz von HPV31 E2 und einen N-terminalen EYFP-Tag enthält.

pGL31URR – Luc [115]: Ein von pGL3 – Basic (Promega) abgeleitetes Luziferase – Reporterplasmid, welches den frühen Promotor p97 mit der regulatorischen Region von HPV31 (HPV31 Nt. 7068 - 106) enthält.

plentiCRISPR v2 [119] (zur Verfügung gestellt von der AG Schindler): Ein lentiviraler Vektor, welcher der Genom – Editierung von eukaryotischen Zellen dient. Unter Kontrolle des U6 Promoters wird eine beliebige gRNA exprimiert und unter der Kontrolle des EF1 α core Promotors die Gensequenz von Cas9.

pMD2.G (Addgene): Ein lentiviraler Vektor, welcher das VSV-G Hüllprotein exprimiert.

pmTagBFP – C1 (zur Verfügung gestellt von der AG Schindler): Eukaryontes Expressionsplasmid, welches unter Kontrolle des CMV – Promotors mTagBFP exprimiert und eine C – terminale MCS enthält.

pmTagBFP – HPV31 E2co N-Ter (hergestellt von Giada Corradini Bartoli): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codon – optimierte codierende Sequenz von HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält.

pmTagBFP – SYFP2 (hergestellt von Julian Gidda): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleiteter Expressionsvektor, welcher für das Fusionsprotein mTagBFP – SYFP2 codiert und als Positivkontrolle für die FACS – FRET – Methodik dient.

pSG5: Eukaryontes Expressionsplasmid. Der SV40 Promotor hat die Expression des inserierten Gen s unter Kontrolle (Stratagene).

pSG HPV31 E1co 3xflag (hergestellt von Saskia van de Poel): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E1, welches eine codon – optimierte E1 – Sequenz, sowie drei Flag – Epitope am N – Terminus enthält.

psPAX2 (Addgene): Ein lentiviraler Vektor, welcher für Verpackungselemente codiert.

pSYFP2 – C1 (zur Verfügung gestellt von der AG Schindler): Eukaryontes Expressionsplasmid, welches unter Kontrolle des CMV – Promotors mTagBFP exprimiert und eine C – terminale MCS enthält.

pSYFP2 – N1 (zur Verfügung gestellt von der AG Schindler): Eukaryontes Expressionsplasmid, welches unter Kontrolle des CMV – Promotors mTagBFP exprimiert und eine N – terminale MCS enthält.

pSX31 E2 – HA [120]: Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid. Es enthält die codierende Sequenz für HPV31 E2 mit einem HA – Epitop in der nicht konservierten Hinge – Region.

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Plasmide:

pBrd4 CTM – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die CTM-Domäne (1224-1365) von Brd4 exprimiert. C-terminal von der CTM-Domäne befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die BID-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 deltaBD1/2 – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die Brd4 BD1/2 Deletionsmutante exprimiert. C-terminal von der Brd4 BD1/2 Deletionsmutante befindet sich ein SYFP-Tag. Die Brd4 BD1/2 Deletionsmutante wurde anhand des pcDNA3-flag hBrd4 delta BD1/2-Konstruktes [117] amplifiziert und mittels Restriktionsverdau in den pSYFP-N1-Vektor eingefügt.

pBrd4 deltaBID – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die Brd4 BID Deletionsmutante exprimiert. C-terminal von der Brd4 BID Deletionsmutante befindet sich ein SYFP-Tag. Die Brd4 BID Deletionsmutante wurde anhand des pcDNA3-flag hBrd4 delta BID [76] amplifiziert und mittels Restriktionsverdau in den pSYFP-N1-Vektor eingefügt.

pBrd4 deltaCTM – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die Brd4 CTM Deletionsmutante exprimiert. C-terminal von der Brd4 CTM Deletionsmutante befindet sich ein SYFP-Tag. Die Brd4 CTM Deletionsmutante wurde anhand des pcDNA3-flag hBrd4 (1-1223) [117] amplifiziert und mittels Restriktionsverdau in den pSYFP-N1-Vektor eingefügt.

pBrd4 deltaNPS – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die Brd4 NPS Deletionsmutante exprimiert. C-terminal von der Brd4 NPS Deletionsmutante befindet sich ein SYFP-Tag. Die Brd4 NPS Deletionsmutante wurde anhand des pcDNA3-flag hBrd4 delta NPS [76] amplifiziert und mittels Restriktionsverdau in den pSYFP-N1-Vektor eingefügt.

pBrd4 PDID – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) von Brd4 exprimiert. C-terminal von PDID befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 PDIDdelta287-348 – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 287-348 von Brd4 exprimiert. C-terminal von PDIDd287-348 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID d287-348-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 PDIDdelta462-482 – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 462-482 von Brd4 exprimiert. C-terminal von PDIDd462-482 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID d462-482-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 PDIDdelta505-530 (d505-530) – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 505-530 von Brd4 exprimiert. C-terminal von PDIDd505-530 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID d505-530-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 PDIDdeltaBD2 – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 349-461, welche der BD2 von Brd4 entsprechen, exprimiert. C-terminal von PDIDdBD2 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID dBD2-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 PDIDdeltaNPS – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 483-504, welche der NPS von Brd4 entsprechen, exprimiert. C-terminal von PDIDdNPS befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID dNPS-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pBrd4 – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches das humane Brd4 exprimiert. C-terminal von Brd4 befindet sich ein SYFP-Tag.

pBrd4S – SYFP: Ein von pSYFP-N1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kurze Isoform C von Brd4 exprimiert. C-terminal von Brd4S befindet sich ein SYFP-Tag.

pcDNA3.1 – flag – Brd4 BID: Ein von pcDNA3.1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die BID-Sequenz exprimiert. N-terminal von der BID-Sequenz befindet sich ein SV40 NLS mit einem vorangehenden Flag-Epitop.

pcDNA3.1 – flag – Brd4 CTM: Ein von pcDNA3.1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die CTM-Sequenz exprimiert. N-terminal von der CTM-Sequenz befindet sich ein SV40 NLS mit einem vorangehenden Flag-Epitop.

pcDNA3.1 – flag – Brd4 PDID: Ein von pcDNA3.1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID-Sequenz exprimiert. N-terminal von der PDID-Sequenz befindet sich ein SV40 NLS mit einem vorangehenden Flag-Epitop.

pcDNA3.1 – flag – Brd4S: Ein von pcDNA3.1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die Kurze Isoform C von Brd4 exprimiert. N-terminal von der Brd4S-Sequenz befindet sich ein Flag-Epitop.

pEYFP-HPV31 E2 S313N/K314D: Ein von pEYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen EYFP-Tag enthält. Die Aminosäuren S an der Position 313 und K an der Position 314 wurden jeweils durch N und D ersetzt.

plentiCrispr BRD4S-ex12-SA_A: Ein von plentiCRIPR v2 abgeleitetes Plasmid für die Genom-Editierung der kurzen Isoform C von Brd4. Die BRD4S-ex12-SA_A, kurz CrisprBrd4S-A, -Sequenz [8] wurde mittels BsmBI Restriktionsstellen in den plentiCRIPSR v2-Vektor eingefügt.

plentiCrispr BRD4S-ex12-SA_B: Ein von plentiCRIPR v2 abgeleitetes Plasmid für die Genom-Editierung der kurzen Isoform C von Brd4. Die BRD4S-ex12-SA_B, kurz CrisprBrd4S-B, -Sequenz [8] wurde mittels BsmBI Restriktionsstellen in den plentiCRIPSR v2-Vektor eingefügt.

pmTagBFP – 31 E2-Hinge: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 Hinge-Region, ein N-terminales NLS und

ein BFP-Tag enthält. Die 31E2-Hinge-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pmTagBFP – 31 E2-Hinge-DBD: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 Hinge-DBD-Region, ein N-terminales NLS und ein BFP-Tag enthält. Die 31E2-Hinge-DBD-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert

pmTagBFP – 31 E2-Hinge-DBD-ND: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 Hinge-DBD-Region mit Mutationen an den Positionen S313/K314, ein N-terminales NLS und ein BFP-Tag enthält. Die 31E2-Hinge-DBD-ND-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert

pmTagBFP – 31 E2-TAD-Hinge: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 TAD-Hinge-Region, ein N-terminales NLS und ein BFP-Tag enthält. Die 31E2-TAD-Hinge-Sequenz wurde von Thermofisher Scientific (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert

pmTagBFP – 31 E2 E74A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure E an der Position 74 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 I73L: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure I an der Position 73 wurde durch L ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 K111A: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure K an der Position 111 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 K111Q: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure K an der Position 111 wurde durch Q ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 K112A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure K an der Position 112 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 R37A: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure R an der Position 37 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 R37A/I73L: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäuren R an der Position 37 und I an der Position 73 wurden jeweils durch A und L ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 S313N/K314D: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäuren S an der Position 313 und K an der Position 314 wurden jeweils durch N und D ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 S65A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure S an der Position 65 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 T93A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure T an der Position 93 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 Y131A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure Y an der Position 131 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 Y158A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2

und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure Y an der Position 158 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 Y159A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure Y an der Position 159 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 Y19A (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure Y an der Position 19 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – 31 E2 Y87A (hergestellt Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV31 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäure Y an der Position 87 wurde durch A ersetzt.

pmTagBFP – Brd4 PDID: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für die PDID-Region (287-530) und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS.

pmTagBFP – Brd4S: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die kurze Isoform C von Brd4 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält.

pmTagBFP – CRPV E2 (hergestellt von Dr. Markus Schneider): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die CRPV E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält.

pmTagBFP – HPV16 E2: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV16 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält.

pmTagBFP – HPV16 E2 K306N/K307D: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV16 E2 und einen N-

terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäuren KK an den Positionen 306/307 wurden jeweils durch N und D ersetzt.

pmTagBFP – HPV16 E2 R37A/I73A: Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für die HPV16 E2 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält. Die Aminosäuren R an der Position 37 und I an der Position 73 wurden entsprechend jeweils durch A ersetzt.

pSYFP – Brd4: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches das humane Brd4 exprimiert. N-terminal von Brd4 befindet sich ein SYFP-Tag.

pSYFP – Brd4 BID: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die BID-Region (523-580) von Brd4 exprimiert. N-terminal von BID befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die BID-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 CTM: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die CTM-Domäne (1224-1365) von Brd4 exprimiert. N-terminal von der CTM-Domäne befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die BID-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDID: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) von Brd4 exprimiert. N-terminal von PDID befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDID – BID: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID-BID-Sequenz (287-580) von Brd4 exprimiert. N-terminal von PDID-BID befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID-BID-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDIDAlaninmut: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID-Sequenz (287-530) von Brd4 mit folgenden Alanin-Mutationen exprimiert:

S484A; S488A; S492A; S494A; S498A; S499A; T500A; S503A. N-terminal von der PDIDalaninmut befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID-alaninmut-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDIDdelta287-348: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 287-348 von Brd4 exprimiert. N-terminal von PDIDd287-348 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID d287-348-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDIDdelta462-482: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 462-482 von Brd4 exprimiert. N-terminal von PDIDd462-482 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID d462-482 -Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDIDdelta505-530: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 505-530 von Brd4 exprimiert. N-terminal von PDIDd505-530 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID d505-530-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDIDdeltaBD2: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 349-461, welche der BD2 von Brd4 entsprechen, exprimiert. N-terminal von PDIDdBD2 befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID dBD2-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4 PDIDdeltaNPS: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die PDID (287-530) mit einer Deletion (d) der Aminosäuren 483-504, welche der NPS von Brd4 entsprechen, exprimiert. N-terminal von PDIDdNPS befindet sich ein SYFP-Tag. Um eine Lokalisation in den Zellkern zu gewährleisten befindet sich zusätzlich N-

terminal zur Sequenz ein SV40 NLS. Die PDID dNPS-Sequenz wurde von Thermofisher (Strings™ DNA Fragments) synthetisiert.

pSYFP – Brd4S: Ein von pSYFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kurze Isoform C von Brd4 exprimiert. N-terminal von Brd4S befindet sich ein SYFP-Tag.

3.13 Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

Material/ Gerät und Bezeichnung	Hersteller
Blue Cap-tubes, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one
Deckgläschen 24x36 mm	R.Langenbrinck GmbH
Einweg-Skalpelle	B.Braun Biotech
Gel-Blotting-Filterpapier	Whatman
Magnet-Säulen µMACS columns	Miltenyi Biotec
Multiwell 6 well (non-tissue culture treated)	Falcon (351146)
Nitrozellulose-Membran, protran (0,22 µm)	GE healthcare
PCR Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2 ml	Biozym®
Gestopfte Pipettenspitzen (10 , 20, 200, 1000 µl), ART® Aerosol Resistant Tips	Molecular Bio Products
Pipettenspitzen 0,5-10 µl (transparent)	Biozym®
Pipettenspitzen 10-200 µl (gelb); 200-1000 µl (blau)	Becton/Dickinson
Reaktionsgefäße: 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Röhrchen für Bakterienkulturen, PP-Tube 14 ml steril	Greiner bio-one
Real-Time Platten, LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
Röhrchen für Bakterienstock, Cryotube 3,5 ml SI	Thermofisher Scientific
Röhrchen für FACS basierten FRET-Assay 5 ml Polysyrene Round Bottom Tube	Falcon®
Röhrchen für Luziferse-Messung, 5 ml	Sarstedt
Sterilfilter: 0,2 µm und 0,44 µm	Millipore
Transfektionsröhrchen: 3,5 ml	Sarstedt

Zellkulturplatten: 24x10 mm; 12x22 mm; 6x35 mm	Nunc
Zellkulturschalen 60mm; 100 mm	Nunc
Zellschaber, cell lift costar®	Corning Incorporated

3.14 Geräte

Tabelle 8: Geräte

Gerät und Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern: mini-Sub Cell GT und Wide mini-Sub Cell GT	Bio Rad
BioRobot EZ1 Workstation	Qiagen
Blotkammer, groß, Trans-Blot Cell	Bio Rad
CO ₂ Inkubator, C200	Labotect
Durchlichtmikroskop, DM IRB	Leica
Einfrierbox, MR. FROSTY	Nalgene
Feinwaage, GJ und 770	Kern
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert M200	Zeiss
Inkubator, Kelvitron®T	Hereaus
Kamerasystem (Agarosegele), Gel Doc 2000	Bio Rad
Kamerasystem (Western Blots), LiCor Odyssey Fc mit Auswertungssoftware <i>Image Studio</i>	LiCor®
Luminometer, Lumat LB 9507	EG & G Bertold
PCR-Cycler, PCT 200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
pH-Meter, pH526	WTW
Photometer, ND-1000	NanoDrop®
Pipetten, Pipetman 10, 20, 200, 1000	Gilson
Pipettierhilfe, Easypet®	Eppendorf
Pipettierhilfe, pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time-PCR, Light Cycler®480	Roche
Reinstwasseranlage, Milli-Q UF Plus	Millipore
Schüttelinkubator, Certomat IS	B. Braun Biotech Int.
Schüttler, Rocky 3D	Perkin-Elmer
Schüttler, Thermomixer 5436 und ThermoStat Plus	Eppendorf

SDS-PAGE-Kammer, mini Trans-Blot Cell	Bio Rad
Sonifizierer, SonoPlus	Bandelin
Spannungsversorgung, Powerpack 200 und 300	Bio Rad
Sterile Werkbank, HeraSafe	Heraeus
Vakuum-Absaugungsvorrichtung, VacuSafe	IBS
Vortexter, REAXTop	Heidolph
Wasserbad, WB 10	Memmert
Zählkammer, Neubauer 0,100 mm Tiefe; 0,0025 mm ²	Assistent
Zentrifugen: 5810R, 5417R und 5417C	Eppendorf

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Exponentiell wachsende *Escherichia coli* wurden mit CaCl_2 , RbCl_2 und MnCl_2 behandelt. Diese Behandlung ermöglicht es den Bakterien zirkuläre Plasmid-DNA aufzunehmen (Kompetenz) [121].

4.1.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

100-200 μl kompetente *E. coli* DH5 α wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 μl des Ligationsansatzes hinzugegeben. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für eine Minute. Die Bakteriensuspension wurde 5 Min auf Eis inkubiert und darauffolgend mit 800 μl SOC-Medium versetzt, mit welchem die Bakterien für 45-60 Min bei 37 °C in einem schüttelnden Thermo-Cycler inkubiert wurden. Als Nächstes erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 6500 rpm für 3 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen, wobei ein restliches Volumen von 100-150 μl behalten wurde, um das Bakterienpellet in diesem zu resuspendieren. Dieser Transformationsansatz wurde auf Ampicillin-haltigen (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin) oder Kanamycin-haltigen (30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin) LB-Platten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht in einem Brutschrank. Einzelkolonien wurden zur weiteren Verwendung in Übernachtkulturen für die anschließende Plasmidisolierung vermehrt [121].

4.1.3 Anzucht von Bakterienkulturen für die Plasmidisolierung

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α wurde für die Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA verwendet. Da die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide eine Ampicillin- oder Kanamycinresistenz enthalten, erfolgte die Vermehrung der Bakterien von LB-Platten oder Kryostockröhrchen in 5 ml (DNA-Mini-Präparation) oder 30 ml (DNA-Midi-Präparation) LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. Hierzu wurden die mit Bakterien versetzten Flüssigkulturen schüttelnd über Nacht für 16-18 h bei 37 °C inkubiert. Für eine langfristige Aufbewahrung der Plasmid-DNA, wurde die mit der entsprechenden DNA

angeimpften Bakteriensuspension 1:1 mit Einfriermedium versetzt (500 µl Bakteriensuspension; 500 µl Bakterien-Einfriermedium) und bei -80 °C gelagert.

4.2 Zellkultur-Methoden

4.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle im Folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellkulturbedingungen für die, in dieser Arbeit verwendeten Zellen waren wie folgt: 37 °C, 5 % CO₂-Sättigung, humidifizierte Atmosphäre, Wachstum in Plastik-Gewebekulturschalen (Nunc) als Monolayer. Konfluente Zellen wurden zur weiteren Kultivierung zunächst mit 5-10 ml sterilem PBS gewaschen, um diese anschließend mit 2 ml Trypsin bei 37 °C zu inkubieren, bis diese sich ablösten. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte mit 8 ml serumhaltigem Medium, in welchem die abgelösten Zellen resuspendiert wurden, um dann mit dem entsprechenden Verhältnis auf neuen Gewebekulturschalen weitergeführt werden zu können.

C33A: Wurden in DMEM-FKS (10 % FKS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert. Das maximale Teilungsverhältnis betrug 1:10.

CIN-612-9E: Wurden in Kokultur mit Mitomycin-behandelten, teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten in E-Medium (5 % HC und 10 µl/ml Pen/Strep) gehalten. Die CIN612-9E-Zellen wurden in einem maximalen Verhältnis von 1:5 auf teilungsunfähige NIH3T3-J2-Fibroblasten gesplittet.

HEK293T: Wurden in DMEM-FKS (10% FKS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert. Das maximale Teilungsverhältnis betrug 1:10.

NIH3T3-J2-Fibroblasten: Wurden in DMEM-CS (10% CS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert. Das maximale Teilungsverhältnis betrug 1:5.

4.2.2 Mitomycin-Behandlung von NIH3T3-J2-Fibroblasten

Die Teilungsunfähigkeit von NIH3T3-J2-Fibroblasten wurde durch die Behandlung von Mitomycin C erreicht. Hierzu wurde eine konfluente Schale von Fibroblasten nach dem Absaugen des Mediums zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml DMEM-

CS und 100 µl Mitomycin C (400 mg/ml in PBS) bei 37 °C für 60 Min inkubiert. Um das Mitomycin zu entfernen, wurden die Fibroblasten nach der Inkubationszeit dreimal mit PBS gewaschen.

4.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Konfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden serumhaltigen Zellkulturmediums bei RT für 5 Min bei 250x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in entsprechendem Einfriermedium (entsprechendes Zellkulturmedium mit 10 % Serum und 10% DMSO für DMEM-CS, DMEM-FKS und 20% Glycerin für E-Medium, E-Medium-FKS) resuspendiert, auf zwei Einfrierröhrchen aufgeteilt und bei -80 °C langsam in einer Einfrierbox (MR FROSTY) eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff umgesetzt.

Für das Auftauen der Zellen, wurde das Einfrierröhrchen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und anschließend in eine 100 mm Schale überführt, wobei am nächsten Tag ein Mediumwechsel erfolgte.

4.2.4 DNA Transfektion von eukaryotischen Zellen mit FuGENE HD

Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurden 24 h zuvor die Zellen entsprechend der Analysemethode mit unterschiedlichen Zellzahlen in Zellkulturschalen unterschiedlicher Formate ausgesät (Tabelle 9). Am darauf folgenden Tag wurde die zu transfizierende DNA zu OptiMEM hinzugegeben, welches nach Herstellerangaben in entsprechenden Volumina in Polystyrol-Röhrchen vorgelegt wurde. Zu den Zellen wurde FuGENE HD im Verhältnis 1:5 (1 µg DNA; 5 µl FuGENE HD) oder im Verhältnis 2:5 (2 µg DNA; 5 µl FuGENE HD) hinzugegeben. Der Ansatz aus OptiMEM, DNA und FuGENE wurde nach dem Vortexen (10 s) 15 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen, bei denen zuvor ein Mediumwechsel erfolgte, gegeben. 24 h nach der Transfektion wurde bei den Zellen das Medium gewechselt und nach 48 h wurden diese geerntet und analysiert. Eine Ausnahme stellen die Zellen für die Immunofluoreszenz-Analyse dar, die nach 24 h ohne einen Mediumwechsel analysiert wurden.

Tabelle 9: ausgesäte Zellzahlen, Zellkulturschalen-Format, Transfektionsverhältnis (TV) und Transfizierte DNA-Mengen

Zelllinie	Methode	Format	Zellzahl	TV	DNA-Mengen
C33A	Reporter-Assay	24 well	7×10^5	1:5	0,5 ng pCMV-Gluc 50 ng pC18-SP1-Luc 50 ng pGL31URR-Luc 10 ng BFP-31E2 25, 50, 100 ng SYFP-PDID, BID oder SYFP-Brd4S/ pcDNA3.1 f:Brd4S
C33A	FACS-FRET	12 well	$1,5 \times 10^5$	1:5	800 ng Gesamt-DNA
C33A	Immunofluoreszenz	6 well	1×10^5	1:5	500 ng pGL31URR-Luc 500 ng pCMV neo 31E1- 3xFlag, pCMV E1 oder EYFP-31E1 700 ng pcDNA3-flag Brd4 500 ng pcDNA3-Flag-Brd4S 50 ng BFP-31E2 oder pSX31E2-HA 500 ng EYFP-31 E2 bzw. - 31 E2 S313N/K314D
C33A	Immunoblot-Analyse	6 well	3×10^5	2:5	500 ng - 1 μ g Gesamt-DNA
C33A	EMSA	60 mm	1×10^6	1:5	2 μ g Gesamt-DNA
C33A	Ko- Immunopräzipitation	100 mm	3×10^6	1:5	10 μ g Gesamt-DNA
HEK293T	Lentivirus- Produktion	60 mm	$2,5 \times 10^6$	2:5	1,5 μ g psPAX2 1,5 μ g pMD2.G 1,5 μ g lentivirale DNA

4.2.5 siRNA Transfektion von eukaryotischen Zellen mit RNAimax

Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA wurde der liposombasierte Komplexbildner „Lipofectamine® RNAiMax Reagent“ von Thermofisher nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden für unterschiedliche Zwecke die entsprechenden Zellen jeweils 24 h zuvor ausgesät. Die siRNA-, OptiMEM- und RNAiMax-Mengen wurden, wie in Tabelle 10 beschrieben, eingesetzt. Das Transfektions-Gemisch wurde nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT auf die Zellen gegeben. 24 h nach der siRNA-Transfektion wurde bei den Zellen das Medium gewechselt, um diese 48-72 h nach der siRNA-Transfektion zu analysieren. Zellen, die 24 h nach der siRNA-Transfektion in Methylcellulose differenziert oder mit DNA transfiziert wurden, wurden 72 h nach der siRNA-Transfektion analysiert.

Tabelle 10: ausgesäte Zellzahlen, Zellkulturschalen-Format, RNAiMax-Volumen und transfizierte siRNA-Menge

Zelllinie	Methode (nach siRNA-Transfektion)	Format	Zellzahl	RNAiMax	siRNA-Mengen
CIN612-9E	qPCR, Protein (48 h oder 72 h)	6 well	(72h) 1,25- (48h) 2,5x10 ⁵	9 µl in 150 µl OptiMEM	90 pmol in 150 µl OptiMEM
CIN612-9E	Methylcellulose (72h)	6 well	1,25x10 ⁵	9 µl in 150 µl OptiMEM	90 pmol in 150 µl OptiMEM
C33A	Reporter-Assay (72h)	24 well	6,0x10 ⁴	3 µl in 50 µl OptiMEM (→Ansatz für Duplikate)	30 pmol in 50 µl OptiMEM
C33A	Protein	6 well	2,0x10 ⁵	9 µl in 150 µl OptiMEM	90 pmol in 150 µl OptiMEM

4.2.6 Knockdown von Zielgenen in eukaryotischen Zellen mittels lentiviraler Infektion

Um einen spezifischen Knockdown eines spezifischen Zielgens zu erreichen wurde das CRISPR/Cas-System genutzt. Hierzu wurde ein lentiviraler Vektor plentiCRISPR v2

eingesetzt, welcher die gRNA gegen das gewünschte Gen enthält. Dieser wurde mit pSPAX2 und pMD2.G für die lentivirale Produktion von infizierenden Partikeln in HEK293T-Zellen transfiziert, welche 24 h zuvor auf einer 60 mm Schale ($2,5 \times 10^6$) ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurde das Medium der HEK293T-Zellen gewechselt und bei 32 °C für 16 h inkubiert. Am selben Tag wurden die eukaryotischen Zielzellen auf einer 60 mm Schale ausgesät. CIN612-9E-Zellen, welche in Kokultur mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten gehalten werden, wurden zunächst ohne diese ausgesät. Nach der 16-stündigen Inkubationszeit wurde das Medium der Zielzellen abgenommen und das infektiöse Medium der HEK293T-Zellen, nachdem dieses steril filtriert und Polybrene (Endkonzentration: 5 µg/ml) hinzugegeben wurde, auf diese gegeben. Zelltypbasierend konnte nach einigen Stunden nach der Zugabe der infektiösen Partikel mit entsprechendem Medium aufgefüllt werden. Am darauffolgenden Tag wurden die infizierten Zielzellen auf eine 100 mm Schale, je nach Zelltyp mit oder ohne teilungsunfähigen und Neomycin-resistenten 3T3-J2-NHP, gesplittet. Nach ca. 6 h wurde mit Puromycin (Endkonzentration: 1 µg/ml) selektioniert. Als Selektionskontrolle wurden nicht infizierte Zielzellen mitgeführt. Die Selektion mit Puromycin wurde drei bis sieben Tage aufrechterhalten. Immunoblot-Analysen, qPCR oder virale Kopienzahl-Bestimmungen wurden für die Charakterisierung der entstandenen Ziellinien durchgeführt.

4.2.7 Differenzierung von CIN612-9E-Zellen in Methylcellulose

Für die Herstellung der 1,5% Methylcellulose (Sigma M-0512) wurde die entsprechende Menge abgewogen und in einem geeigneten Gefäß mit einem Rührfisch autoklaviert. Die Hälfte des Endvolumens an zellspezifischem Medium (E-Medium ohne HC und EGF) wurde zu der Methylcellulose gegeben und in einem Wasserbad von 60 °C 20 Min ohne Rühren erwärmt. Danach wurde das Medium mithilfe des Rührfisches für 3 h oder bei 4 °C über Nacht gerührt, bis eine klare Lösung entstand. Zuletzt wurde entsprechendes Serum hinzugegeben (z.B. 5 % HC) und noch einmal kurz gerührt. Die angesetzte Lösung ist 4-8 Wochen haltbar.

Für die Differenzierung der Zellen wurden Wells einer unbeschichteten 6 well-Platte zunächst mit 6-8 ml der Methylcellulose-Lösung aufgefüllt. Die zu differenzierenden Zellen wurden anschließend mit Trypsin abgelöst, pelletiert und nach der Resuspension in 400 µl Medium (E-Medium ohne EGF!), tropfenweise auf die Methylcellulose-Lösung gegeben. Für die gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Methylcellulose wurde mit einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig in den entsprechenden Wells gerührt. Es wurde jeweils eine Kontrollschale der entsprechenden Konditionen ohne Methylcellulose mitgeführt. Die Zellen

wurden bei 37°C für 48 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in ein 15 ml Blue Cap überführt. Das Well wurde ein- bis zweimal mit kaltem PBS gespült. Die PBS-Lösung wurde in das entsprechende Blue Cap zugegeben und der Rest wurde mit kaltem PBS aufgefüllt. Daraufhin folgten einige Zyklen von einem Zentrifugationsschritt mit 250 g für 10 Min bei 4 °C und dem Verwerfen des Überstandes (ohne Methylcellulose), bis die gesamte Methylcellulose entfernt wurde. Das gewonnene Pellet wurde für RNA-Analysen verwendet [115].

4.3 DNA-Methoden

4.3.1 Standardmethoden

Die hier verwendeten Methoden wurden gemäß dem Protokoll von Ausubel *et al.* [122] durchgeführt:

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

4.3.2 Amplifikation von Gensequenzen mittels PCR

Ein Amplifikat der gewünschten DNA-Sequenz wurde mit spezifischen Oligonukleotiden mit dem Pyrobest® DNA-Polymerase Kit (Takara) in einer PCR generiert.

PCR-Ansatz:

DNA Template	10 ng
Pyrobest® DNA Polymerase	0,25 µl
10x Pyrobest® Buffer II	5 µl
dNTPs (2,5 mM jeweils)	4 µl
Forward Primer	2,5 µl (25µM)
Reverse Primer	2,5 µl (25µM)
H ₂ O	Bis 50 µl Endvolumen auffüllen

Standardprotokoll für Amplifikation:

Initiale Denaturierung	95 °C, 5 Min
Denaturierung*	95 °C, 10 s
Primerbindung*	55 °C, 30s
Elongation*	72 °C, 60s
Finale Elongation	72 °C, 10 Min
Ende	4 °C, ∞

* 30 Zyklen

4.3.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter ultraviolettem Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten. Das Fragment wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

4.3.4 DNA-Isolation aus Bakterienzellen

Die Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde nach Herstellerangaben mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) bzw. dem QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Reinheit und Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mit dem Spektralphotometer ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt.

4.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Aufgereinigte und mit Restriktionsenzymen linearisierte DNA-Fragmente wurden mit der T4-Ligase nach Herstellerangaben des Rapid DNA Ligation Kits (ThermoFisher) zu neuen zirkulären Plasmiden ligiert. Diese wurden anschließend in kompetente *E.coli* DH5α transformiert.

4.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen von DNA wurden von der Firma Eurofins Scientific durchgeführt.

4.3.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotidenpaare mit einer Endkonzentration von 1 µg/µl wurden mit einem Volumen von 12,5 µl zu 25 µl des 2x Annealingpuffers gegeben, um doppelsträngige DNA unter folgenden Bedingungen in einer PCR-Maschine zu generieren:

95 °C, 5 min
70 °C, 10 min
0.1 °/s to 60 °C
60 °C, 10 min
0.1 °/s to 50 °C
50 °C, 10 min
0.1 °/s to 40 °C
40 °C, 10 min
0.1 °/s to 25 °C
25 °C, 10 min
0.1 °/s to 4 °C
4 °C, ∞

4.3.8 DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Zellen, die mit Trypsin abgelöst, abgeschabt oder aus Zelllysaten zusammengeführt wurden, wurden bei 4 °C und 13.000 rpm für 20 s pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 190 µl Proteinase K-Puffer mit 10 ml Proteinase K resuspendiert und bei 56 °C über Nacht geschüttelt. Die DNA wurde mithilfe der „BioRobot EZ1 Workstation“ und dem „EZ1 DNA Tissue Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

4.3.9 Multiplex qRT-PCR

Die simultane Bestimmung der viralen Kopienzahlen von HPV31 E2 und HPV31 E6 bezüglich des Referenzgens Beta-Aktin erfolgte über eine Multiplex qRT-PCR. Hierzu wurde DNA verwendet, die aus eukaryotischen Zellen stammte. Ziel war es die viralen

Kopienzahlen zu bestimmen, wofür ndie DNA-Extraktion von NHK (normal human keratinocytes) erforderlich war. Um eine Standardkurve zu generieren, welche als Kalibrator für alle folgenden Experimente angewendet werden kann, wurden Verdünnungsreihen der NHK-DNA (50 ng/µl – 1,56 ng/ml in 1:2 Schritten) und des HPV31 Genoms (pMod BR HPV31) (10^{10} – 10^0 ; die Menge, die von dem Plasmid für 10^{10} Kopien eingesetzt werden musste, wurde in snapgene berechnet) angesetzt. Für die Standardkurve konnten nun definierte Mengen der NHK-DNA und des HPV31 Genoms eingesetzt werden. Die Verdünnungsreihen wurden mit drei Oligonukleotid-Sonden Paaren gemessen. In einer LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 (Roche) wurden die jeweiligen Ansätze in Duplikaten angesetzt. Dabei wurden die Verdünnungen der NHK dem Farbstoff VIC, welches Beta-Aktin misst, zugeordnet und des pModBR HPV31 Genoms mit E6 dem Farbstoff FAM und E2 dem Farbstoff Cy5 zugeordnet. Die Farbkompensation wurde von vorausgehenden Experimenten übernommen [123]. Die generierte Standardkurve wurde, wie in Tabelle 11 beschrieben erstellt.

Tabelle 11: Pipettierschema für Multiplex-Standardkurve

2 µl 10^6	2 µl 10^5	2 µl 10^4	2 µl 10^3	2 µl 10^2	2 µl 10^1
pModBR	pModBR	pModBR	pModBR	pModBR	pModBR
HPV31	+	+	+	+	+
+	2 µl 12,5	2 µl 6,25	2 µl 3,13	2 µl 1,56	2 µl 0,78
2 µl 25 ng/µl	ng/µl NHK				
NHK DNA =	DNA =	DNA =	DNA =	DNA =	DNA =1,56
50 ng/µl	25ng/µl	12,5ng/µl	6,25ng/µl	3,13ng/µl	ng/µl
7576 Zellen	3788 Zellen	1894 Zellen	947 Zellen	474 Zellen	236 Zellen
(berechnet mit **)					

Für die Standardkurve wurden folgende Mengen eingesetzt:

10 µl Fast Advanced Mastermix (10x)

1 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung beta-Aktin (4 µM)

1 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung beta-Aktin (4 µM)

1 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung beta-Aktin (4 µM)

3 µl H₂O
2 µl pModBR HPV31-Verdünnung
2 µl NHK-Verdünnung

Die zu messenden Proben, welche zuvor auf 10 ng/µl eingestellt wurden, wurden wie folgt angesetzt:

10 µl Fast Advanced Mastermix (10x)
1 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung beta-Aktin (4 µM)
1 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung beta-Aktin (4 µM)
1 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung beta-Aktin (4 µM)
5 µl H₂O
2 µl DNA (10 ng/µl)

Folgende Bedingungen wurden im LightCycler® 480 eingestellt:

Initialer Aktivierungsschritt: 95 °C, 15 min

2-Schritt Zyklus: 56 °C, 10 s **

72 °C, 5 s (Messung) **

** 45 Zyklen

Die Messung des Referenzgens Beta-Aktin ermöglichte es die absolute Zellzahl pro µl Probe zu berechnen, da man von einem Genomäquivalent 6,6 pg/Zelle (**) ausgeht. Daraus wurde die Viruslast mit der Anzahl der HPV31 E2 Kopien pro Zelle berechnet.

4.4 RNA-Methoden

4.4.1 RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen

Die Gesamt-RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit® (Qiagen), wie vom Hersteller angegeben. Hierzu wurden Zellen, welche in einer 6 well-Platte ausgesät (3×10^5 C33A) wurden, mit 350 µl RLT-Lysepuffer (10 µl β-Mercaptoethanol auf 1 ml RLT-Puffer) lysiert. Das Lysat wurde anschließend auf einen QIAshredder® (Qiagen) gegeben, wobei der Durchfluss für die weitere Aufreinigung verwendet wurde. Die RNA wurde mit 50 µl RNA-freiem Wasser eluiert und Reinheit und Konzentration wurden mit dem mit dem Spektralphotometer ND-1000 (NanoDrop) ermittelt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert bzw. für die cDNA-Synthese weiterverwendet.

4.4.2 copy-DNA (cDNA) Synthese

1 µg Gesamt-RNA wurde umgeschrieben. Hierzu wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben genutzt. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden auf 200 µl aufgefüllt. Die Endkonzentration der cDNA betrug somit 5 ng/µl.

4.4.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qPCR wurde mit dem „SYBR Green I Master Mix“ (Roche) und dem LightCycler® 480 (Roche) durchgeführt. Dabei wird die Fluoreszenz des Farbstoffes durch das unspezifische Interkalieren in doppelsträngige DNA verstärkt. Die Quantifizierung wird durch die Fluoreszenzmessung am Ende der Elongationsphase ermöglicht.

In einer LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 (Roche) wurde 15 µl Mastermix je Reaktionsansatz vorgelegt:

10 µl SYBR Green Master I
2 µl Primer forward
2 µl Primer reverse
1 µl H₂O

Zu diesem Mastermix wurden 5 µl (25 ng) der cDNA hinzugegeben. Dabei wurden jeweils Duplikate pipettiert. Nach dem Versiegeln der Platte mit einer Folie und der Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 Min bei 4 °C, wurde mit dem SYBR Green Standard Programm amplifiziert:

Initiale Denaturierung: 95°C, 10 min
Denaturierung: 95°C, 10 s *
Primerbindung: 55°C, 15 s *
Elongation: 72°C, 15 s *
Schmelzkurve: 95°C, 10 s
60°C, 30 s
90°C
Ende 4°C, ∞
* 45 Zyklen

Anschließend an die PCR wurde mithilfe der LightCycler® 480-Software der CP-Wert (Crossingpoint) für jeden Reaktionsansatz berechnet. Dieser markiert jenen Zyklus der

Fluoreszenzmessung, der sich erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Mit der Messung eines konstant exprimierten Referenzgens (PGK), war es möglich die Expression des Zielgens auf die des Referenzgens zu normieren, um so eine Vergleichbarkeit zwischen Proben und Experimenten erhalten zu können. Folgende Berechnung nach Pfaffl [124] wurde hierfür angewendet:

$$\text{relative mRNA – Expression} = \frac{\text{Primereffizienz}^{\text{(Zielgen(Kontrolle-Probe))}}}{\text{Primeffizienz}^{\text{(Referenzgen(Kontrolle-Probe))}}}$$

4.5 Protein-Methoden

4.5.1 Luziferase-Reporter-Assay

Der Luziferase-Reporter-Assay wurde 48 h oder 72 h nach DNA- oder RNA-Transfektion durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz wurde als Duplikat in einer 24 well-Platte mit 7×10^4 C33A angelegt. Um normalisierte Werte zu erhalten, wurde zunächst die Gaussia-Luziferase gemessen. Diese wird nach der Transfektion von pCMV-GLuc und ihrer Synthese von den Zellen in den Zellkulturüberstand sekretiert. 5 μl des Zellkulturüberstandes mit 100 μl Gaussia-Juice (2 μl Coelenterazine (CTZ) auf 100 μl Gaussia-juice), welches aus dem Gaussia-Juice BIG Kit (pjk) stammte, wurden im Luminometer gemessen. Für die Bestimmung der Firefly-Luziferase wurden die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit dem Luziferase-Lysepuffer für 10 Min bei 4 °C auf einem Schüttler lysiert. 100 μl des Zelllysats wurden mit 100 μl des Assaypuffers gemischt und mit der Umsetzung des Luziferin-Substrates wurde die Aktivität der Luziferase am Luminometer bestimmt. Aus den Duplikaten wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Die gemessenen RLU-Werte der Firefly-Luziferase wurden relativ zu den RLU-Werten der Gaussia-Luziferase gesetzt.

4.5.2 Gesamtzellyse zur Proteinextraktion

Um die Proteine aus eukaryotischen Zellen (6 well-Platte; ausgesät 3×10^5 C33A) zu isolieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend von der Platte mit einem Zellschaber und 1 ml PBS geschabt. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm bei 4 °C für 20 s herunterzentrifugiert. Nach dem Verwerfen

des Überstandes wurde das Pellet in Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) gelöst und 5 Min bei 95 °C aufgeköcht. Um die DNA zu fragmentieren wurden die Proben für 10 s mit dem Sonifizierer SonoPlus (Bandelin) sonifiziert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse von Proteinen wurden Proteinextrakte auf eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Hierfür wurden entsprechend der Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine 6-12% Trenngelle verwendet. Die Trenngellösung wurde zwischen zwei vertikale Glasplatten (1,5 mm Abstand) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und mit einem 5 % Sammelgel überschichtet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für 40-60 Min in 1x SDS-Puffer. Als Protein-Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific) verwendet.

4.5.4 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran (Western-Blot)

Die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden mithilfe der Wet-Blot-Technik auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde vor der Verwendung im CAPS-Transferpuffer äquilibriert (10 mM CAPS, 10 % (v/v) Methanol). Die Sandwich-Konstruktion wurde über zwei Gel-Blotting-Papieren (Whatman), über das Acrylamid- Gel, über die Nitrozellulose-Membran, hin zu zwei abschließenden Gel-Blotting-Papieren (alle Komponenten ca. 6x9 cm) aufgebaut. Luftblasen wurden mithilfe eines 50 ml Blue Caps ausgerollt. Der Transfer im CAPS-Transferpuffer erfolgte bei 90 V für 90 Min.

4.5.5 Immunoblotanalyse

Um auf eine Nitrozellulose-Membran transferierte Proteine zu analysieren, wurden spezifische Antikörper verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT mit PBS, welches 3% BSA enthielt geblockt. Anschließend wurden die entsprechenden Primärantikörper in 3% BSA/PBS mit 0,1% Tween verdünnt, nach dem Entfernen der Blockierlösung auf die Membran gegeben und schüttelnd über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Primärantikörperlösung verworfen, die Membran wurde dreimal für 5 Min bei RT mit PBS-T gewaschen und mit der

Zweitantikörperlösung für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-T konnte die Membran mithilfe des LiCor® Odyssey Fc detektiert werden. Mithilfe der dazugehörigen Auswertungssoftware *Image Studios* war es auch möglich mit der Detektion eines konstant exprimierten Proteins, auf welches normalisiert werden konnte, die Proteinbanden zu quantifizieren.

4.5.6 Herstellung nukleärer Extrakte

Zur Extraktion nukleärer Proteine wurden C33A-Zellen, welche zuvor mit einer Zellzahl von 1×10^6 auf einer 60 mm Schale ausgesät wurden, 48 h nach ihrer Transfektion mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mithilfe eines Zellschabers von der Platte geschabt. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 13.000 rpm bei 4 °C für 20 s heruntergefugt. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 400 µl kaltem Puffer A resuspendiert und für 10 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 s auf einem Vortexer geschüttelt und 10 s bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 30-100 µl Puffer C gelöst und für die Hochsalzextraktion 20 Min auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die Suspension bei 13.000 rpm und 4 °C für 2 Min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Für eine Immunoblot-Analyse wurden die Proben mit Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt.

4.5.7 Elektromobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Protein-DNA-Interaktionen wurden mithilfe eines Elektromobilitäts-Shift-Assays *in vitro* analysiert. Die Analyse erfolgt über die Bindung des Proteins (aus nukleärem Extrakt) mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid, welches in einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt wird. Bindet das Protein an das Oligonukleotid, so ergibt sich eine Bande, welche oberhalb des freien Oligonukleotids läuft (*Shift*).

Nach der Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide (Endkonzentration 40 fmol/µl nach Hybridisierung), mit der zu untersuchenden Bindestelle und dem DY681 Farbstoff am 5'-Ende, wurde folgende Bindungsreaktion angesetzt:

2 µl 5x Bindepuffer

0,5 µl Poly(dA-dT) (1 µg/µl)

2,5 µl H₂O

3 µl nukleärer Extrakt
1 µl Oligonukleotid

30 Min vor dem Auftragen des Ansatzes bekam das native Polyacrylamidgel bei 100 V und 4 °C einen Vorlauf. Die Proben wurden für 15 Min bei RT inkubiert und auf das vorbereitete Polyacrylamidgel aufgetragen. Das native Polyacrylamidgel wurde anschließend bei 100 V für 45 laufen gelassen. Die Analyse des Gels erfolgte mit dem LiCor® Odyssey Fc und der dazugehörigen Auswertungssoftware *Image Studios* (680 nm).

4.5.8 Ko-Immunopräzipitation (Co-IP)

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurden 3×10^6 C33A in einer 100 mm Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die entsprechenden Plasmide zur Expression der zu untersuchenden Proteine transfiziert und nach 48 h wurden die transfizierten Zellen geerntet. Für die Untersuchung von endogenen Brd4 und Brd4S Homo- oder Heterodimerkomplexen wurde pro Ansatz eine konfluente 100 mm Schale mit C33A geerntet. Hierfür wurde das Medium abgekippt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml PBS und einem Zellschaber in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die geernteten Zellen wurden bei 4 °C und 1000 rpm für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde je nach Größe in 150-300 µl Lysepuffer mit 1 µl Benzonasse (250 U, Novagen) für 30 Min auf 4 °C schüttelnd lysiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat bei 13.000 rpm für 15 Min bei 4 °C zentrifugiert. 10 % des Überstandes wurden für die Input-Kontrolle verwendet und hierfür mit Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt und bei 95 °C für 5 Min aufgekocht. Zu dem restlichen Überstand, welcher in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde, wurden 50 µl der magnetischen HA- oder Flag-beads (Miltenyi) gegeben und bei 4 °C für 2 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Aufreinigung der Proteinkomplexe fand über die µMacs®-Säulen (Miltenyi), welche in einer magnetischen Vorrichtung bei 4 °C platziert wurden, statt. Die Säulen wurden zunächst mit 500 µl Waschpuffer äquilibriert und anschließend wurde das Protein-Bead-Gemisch auf die Säulen gegeben. Nach dem Durchlaufen des Protein-Bead-Gemischs wurde drei- bis viermal mit 200 µl des Waschpuffers gewaschen. Für die Elution der an die Säule gebundenen Proteinkomplexe wurde der Elutionspuffer von miltenyi auf 95 °C erhitzt. 20 µl des Elutionspuffers wurden auf die Säulen gegeben und für 5 Min inkubiert. Für die finale Elution wurde die nun durchlaufende Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Für die Untersuchung von Brd4 und Brd4S Homo- oder Heterodimerkomplexen wurden die magnetischen Protein A Agarose beads (Cell Signaling) zunächst mit den Zelllysaten ohne

die Zugabe des spezifischen Antiköpers für 20 Minuten bei RT inkubiert (*preclearing*). Die Separation des Waschpuffers oder des Zelllysates von den Protein A Agarose beads erfolgte mit einem magnetischen Separationsrack. Damit sich ein Immunokomplex formen kann, wurde das präparierte Zelllysate anschließend mit dem Primärantikörper oder Isotypen-Kontrolle (1:50) rotierend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zu den mit dem Waschpuffer vorgewaschenen magnetischen Beads wurden die entsprechenden Zelllysate gegeben und rotierend 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach fünf Waschschritten der immunpräzipitierten Proben wurde das Pellet in 1xRoti Load aufgenommen und bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Der Überstand wurde über das magnetische Separationsrack von den magnetischen Beads getrennt und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Input und IP-Proben wurden mittels Immunoblot-Analyse untersucht.

4.5.9 Durchflusszytometrie-basierte FRET-Analyse (FACS-FRET)

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* wurden $1,5 \times 10^5$ C33A in einer 12 well-Platte ausgesät, am nächsten Tag mit den entsprechenden SYFP- und BFP-Expressionsvektoren transfiziert und 48 h nach der Transfektion für die Analyse mit 200 µl Trypsin geerntet. Um das Trypsin abzustoppen wurde 300 µl PBS mit 1 % FKS auf die Zellen gegeben. Die abgelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, welches bei 13.000 rpm für 20 s bei 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 400 µl PBS mit 1 % FKS gelöst. Die Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit dem MACSQuant® VYB (Miltenyi Biotec) analysiert. Hierfür wurden folgende Laser verwendet: 405 nm, 488 nm, 561 nm. Analysiert wurden die gemessenen Daten mithilfe der MACSQuant® Software [125]. Die Gating-Strategie wird in Abbildung 8 gezeigt. Alle Ergebnisse setzen eine Mindestzellzahl von 1000 im FRET (405/525) – YFP (488/525) – Feld voraus.

4.5.10 Direkte und indirekte Fluoreszenz-Analyse von Proteinen

Um die zelluläre Lokalisation von Proteinen zu bestimmen wurden 1×10^5 C33A in einer 6 well-Platte, für die direkte Fluoreszenz-Analyse ohne Glasplättchen und für die indirekte Fluoreszenz-Analyse mit Glasplättchen, ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren (direkt: SYFP- oder EYFP-Vektor; indirekt: diverse Expressionsvektoren mit Tags) transfiziert und nach 24-48 h analysiert. Die Zellen für die direkte Fluoreszenz-Analyse wurden nach der Abnahme des Mediums unter der Haltung von PBS direkt am Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop analysiert. Für die indirekte Fluoreszenz-Analyse wurde das Medium der Zellen abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen für 2 Min bei RT mit einem Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) permeabilisiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit der entsprechenden Erstantikörperlösung, welche 3 % BSA/PBS und den Erstantikörper in entsprechender Verdünnung enthielt, für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Glasplättchen mit den Zellen zurück in die 6 well-Platte platziert und dreimal für 5 Min bei RT mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in der Zweitantikörperlösung, die sich entsprechend wie die Erstantikörperlösung zusammensetzte, für 1 h im Dunkeln bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut in der 6 well-Platte dreimal mit PBS gewaschen und die Glasplättchen wurden mit dem Roti®-Mount FluorCare DAPI (Roth) auf Objektträgern fixiert. Damit wurden die C33A-Zellen auch gleichzeitig mit DAPI gefärbt. Die Analyse erfolgte am Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop mit dem Apotom und einer 630-fachen Vergrößerung.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung einer zweiten potentiellen Interaktionsstelle zwischen HPV31 E2 und Brd4

5.1.1 Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten FRET Analyse zur Untersuchung der Interaktion von HPV31 und Brd4

Das Brd4 Protein ist ein hochkonservierter Interaktionspartner von Papillomvirus E2 Proteinen. Die bisher bekannte Interaktionsstelle befindet sich in der CTM-Domäne (*C-terminal motif*) von Brd4 und wird über die konservierten Aminosäuren Arginin an Position 37 (R37) und Isoleucin an Position 73 (I73), die sich in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) verschiedener E2 Proteine befinden, vermittelt. Eine Arbeit aus dem Jahr 2016 (Wu et al, 2016) legt darüber hinaus nahe, dass es eine zweite Interaktionsstelle gibt, welche die PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*) und BID (*basic residue-enriched interaction domain*) in Brd4 (Abbildung 8A) und den C-Terminus in E2 Proteinen umfasst [108]. Um diese zweite Interaktionsstelle genauer zu analysieren, wurde die FACS (*fluorescent activated cell sorting*) – FRET (*Försters resonance energy transfer*) Methode für das HPV31 E2 Protein und Brd4 etabliert [126]. Mit dieser Methode ist es möglich Protein-Protein-Interaktionen, basierend auf der Emission von FRET-Signalen, in lebenden Zellen nachzuweisen. Für die Erzeugung eines FRET-Signals geht die Anregung des Donors, hier *blue fluorescent protein* (BFP), bei einer spezifischen Wellenlänge (405 nm) voraus. Die dadurch emittierte Wellenlänge kann dann ein weiteres Protein mit einem Akzeptor, hier *super yellow fluorescent protein* (SYFP), anregen, wenn dieses sich in unmittelbarer Nähe befindet (Förster-Radius <10 nm). Schließlich wird die emittierte Wellenlänge des Akzeptors gemessen. Für die Bestimmung dieser FRET-Signale wurde die zuvor beschriebene *Gating*-Strategie [108, 125], durch die Transfektion von C33A-Zellen, mit den Expressionvektoren pSYFP2-N1, pmTagBFP-C1, pSYFP2-N1 und pmTagBFP zusammen (Negativkontrolle) und mit dem Expressionvektor pmTagBFP-SYFP2 für das Fusionsprotein (Positivkontrolle), optimiert (Abbildung 8B). Von der lebenden Zellpopulation, die mithilfe der SSC (*Side Scatter*) und FSC (*Forward Scatter*) bestimmt wurde (hier nicht gezeigt), wurden anschließend die doppelt-positiven Zellen bestimmt, welche SYFP und BFP exprimieren und mit den Wellenlängen von 488 nm (Bandpassfilter 525 nm) und 405 nm (Bandpassfilter 450 nm) angeregt wurden (Abbildung 8B, Zeile 1). Für die nächste Auswahl wurden die Zellen mit 405 nm (Bandpassfilter 525 nm), was verwendet wird um FRET-Signale zu bestimmen, und 488 nm (Bandpassfilter 525 nm) angeregt. Mit diesem zusätzlichen *Gate* ist es möglich die Zellen, die YFP exprimieren, mit der Anregung durch 405 nm jedoch in das FRET-*Gate* hineinstrahlen, aus der Eingrenzung herauszunehmen

(Abbildung 8B, Zeile 2). Schließlich wurden die Zellen, die ein FRET-Signal und ein YFP-Signal erzeugt haben erneut mit 405 nm (Bandpassfilter 525 nm) und 405 nm (Bandpassfilter 450 nm) angeregt. Die Bestimmung der FRET positiven Zellen erfolgt anhand der Negativkontrolle. Da SYFP und BFP nicht miteinander interagieren und somit auch keine räumliche Nähe der exprimierten Proteine gegeben ist, wird kein positives FRET-Signal generiert. Das gesetzte *Gate* muss hier unter 1% an FRET positiven Zellen liegen. Für die C33A-Zellen, die mit dem Expressionsvektor für die BFP-SYFP-Positivkontrolle transfiziert wurden, ist ein deutlicher *Shift* der Zellen zu erkennen (Abbildung 8B, Zeile 3). Da durch den rekombinanten Fusionsvektor pmTagBFP – SYFP2 die Fluorophore in unmittelbarer räumlicher Nähe sind, ergibt sich ein FRET-Signal von 95% - 99%. Das Ergebnis dieser Auswertung wird in *% of FRET positive cells* angegeben und bezieht sich auf eine Mindestanzahl von 1000 ausgewerteten Zellen im FRET (405/525) – YFP (488/525) – Feld (Abbildung 8B, Zeile 2). Für alle folgenden Graphen wird die Negativ- und Positivkontrolle nicht mehr angezeigt. Mindestens 20% an FRET-positiven Zellen wurden für eine Interaktion zwischen zwei Proteinen oder Domänen als Schwellenwert festgelegt.

Um die Interaktion zwischen dem Brd4 und dem HPV31 E2 Protein zu analysieren wurde das BFP-HPV31 E2 Fusionsprotein in Kombination mit Brd4 beziehungsweise Brd4dCTM Proteinen, die am C-Terminus mit SYFP fusioniert sind, untersucht. Für alle folgenden Versuche wurden durchgängig E2 Proteine verwendet, die am N-Terminus mit BFP markiert wurden, da ausschließlich durch die N-terminale Markierung die Funktion des E2 Proteins beibehalten werden kann. Unter der Verwendung eines α -Brd4 (C-Ter) Antikörpers konnte die Expression sowohl für endogenes Brd4 (untere Pfeilmarkierung) als auch für die SYFP-markierten Brd4 Proteine (obere Pfeilmarkierung; Abbildung 8C links) nachgewiesen werden. Ebenso war es möglich Brd4-SYFP und zusätzlich Brd4dCTM-SYFP mit einem α -YFP Antikörper (Abbildung 8C; rechts) nachzuweisen. Die Expression des BFP-markierten HPV31 E2 Proteins wurde mithilfe eines α -RFP Antikörpers (Abbildung 8C unten) nachgewiesen. Nachdem C33A-Zellen in den angegebenen Kombinationen mit den Fusionsproteinen transfiziert und nach 48 Stunden mithilfe der FACS-FRET Methode analysiert wurden, ergab sich für die Kombination von Brd4 (C-terminaler SYFP-Tag) mit dem HPV31 E2 Protein ein FRET-Signal von 71% (Abbildung 8D). Wurde jedoch ein Brd4-Fusionsprotein verwendet, welches am N-Terminus mit SYFP markiert war, konnte kein FRET-Signal gemessen werden (hier nicht gezeigt). Um die zweite Interaktionsstelle unabhängig von der konservierten Bindung, welche den C-Terminus von Brd4 und den N-Terminus von E2 umfasst, analysieren zu können, wurde das Brd4dCTM Protein mit dem HPV31 E2 Protein untersucht. Diese Kombination zeigte jedoch kein Interaktionssignal (Abbildung 8D).

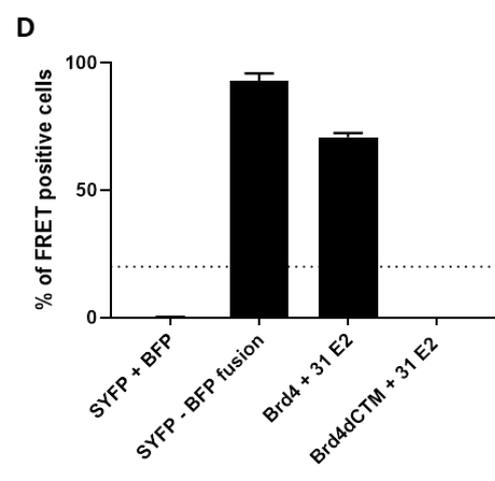
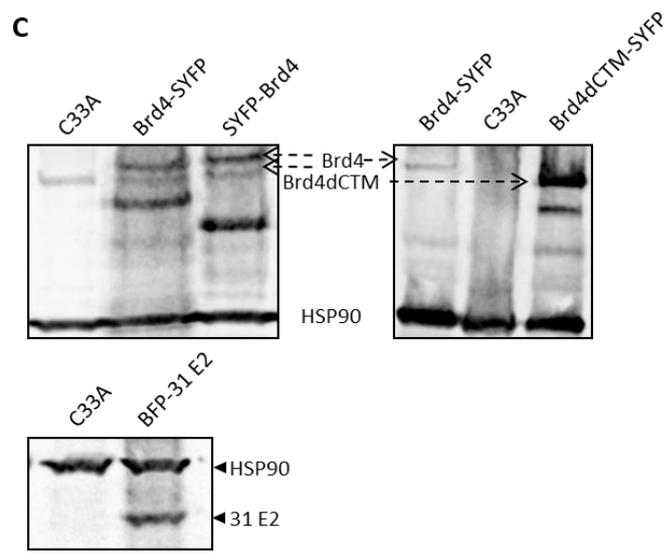
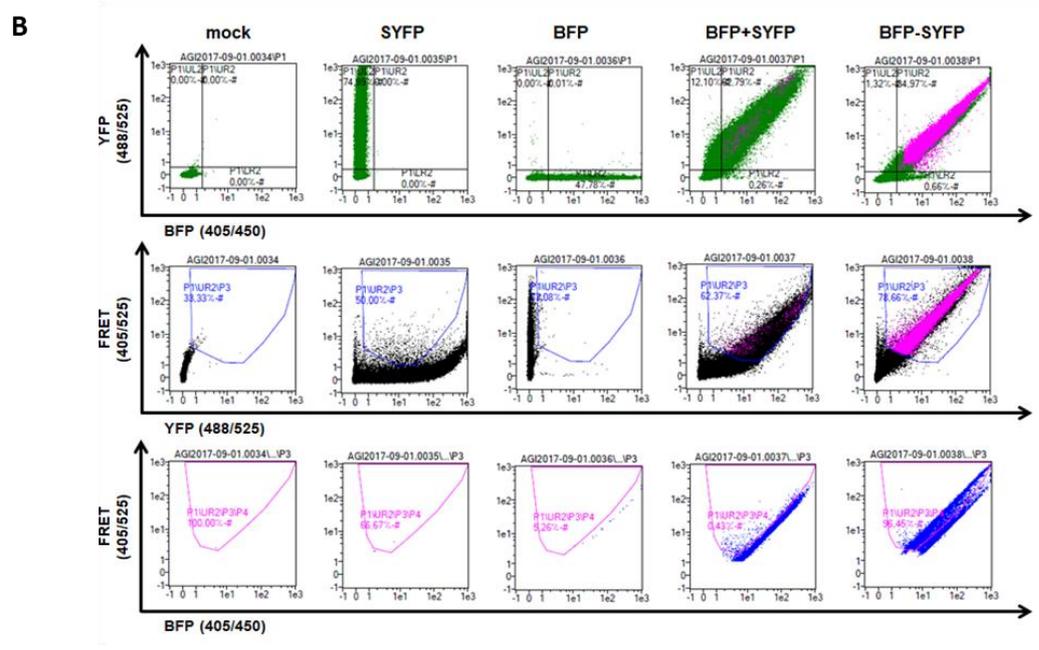
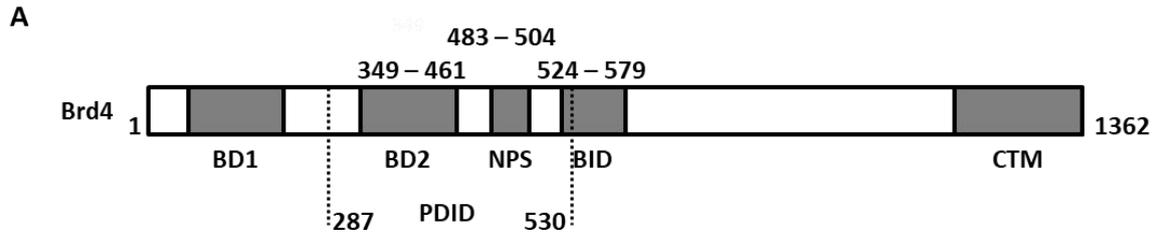


Abbildung 8: Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten FRET Analyse zur Bestimmung der Interaktion von Brd4 und HPV31 E2.

A) Schematische Darstellung von Brd4 (Aminosäuresequenz (AS-Sequenz) 1-1632). Gezeigt werden folgende Domänen (grau): BD1 (Bromodomäne 1), BD2 (Bromodomäne 2; AS-Sequenz 349-461), NPS (N-terminal cluster of phosphorylation sites; AS-Sequenz 483-504), BID (basic residue-enriched interaction domain; AS-Sequenz 524-579), PDID (phosphorylation dependent interaction domain; AS-Sequenz 287-530) und CTM (C-terminal motif). B) Strategie zur Festlegung der Gates für eine FACS-basierte Bestimmung der Interaktion von Brd4 und HPV31 E2. C33A-Zellen wurden jeweils mit 400 ng der SYFP-, BFP-Plasmide und dem BFP-SYFP-Fusionsplasmid transfiziert. Die Kotransfektion von SYFP und BFP wurde mit einer Gesamt-DNA von 800 ng durchgeführt. Als Mock-Kontrolle wurden untransfizierte C33A verwendet. Im Feld YFP(488/525) – BFP(405/450) wird das Gate für Zellen festgelegt, die doppelt-positiv für SYFP und BFP sind. Die nächste Auswahl beinhaltet Zellen, die ein FRET-Signal (405/525) und ein YFP-Signal (488/525) generieren. In diesem Feld werden mit dem gesetzten Gate die falsch-positiven Zellen, die nur SYFP enthalten, aber durch die Anregung mit dem 405 nm Laser in den FRET-Kanal einstrahlen, ausgegattet. Weiter werden die ausgewählten Zellen auf ein FRET-Signal (405/525) mit einem BFP-Signal (405/450) untersucht. In diesem Feld werden anhand der SYFP- und BFP-Kotransfektion Zellen, bei denen keine Interaktion messbar ist, ausgegattet. Die Zellen, die sich schließlich innerhalb des Gates befinden werden als FRET positive Zellen bezeichnet und prozentual gesehen auf die Zellzahl im Feld FRET (405/525) – YFP (488/525) angegeben. Um eine gesicherte Aussage über eine Interaktion machen zu können wird für alle Ergebnisse eine Mindestzellzahl von tausend im FRET (405/525) – YFP (488/525) – Feld vorausgesetzt. C) Immunoblotanalyse der BFP- und SYFP-Fusionsproteine. 48 h nach der Transfektion (500 ng – 1 µg DNA) wurden die C33A-Zellen geerntet. Die Gesamtzelllysate wurden auf ihre Anwesenheit von Brd4-SYFP, Brd4dCTM-SYFP und BFP-31 E2 mit α -Brd4 (C-Ter) (links), α -YFP (rechts) und α -RFP (unten) Antikörpern untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle. D) C33A-Zellen wurden mit Brd4-SYFP und BFP-31 E2- und BFP-31 E2 I73L-Expressionsplasmiden transfiziert. Eine Gesamtmenge von 800 ng DNA wurde verwendet. Dargestellt wird der Mittelwert der Anzahl an FRET-positiven Zellen in Prozent [%] von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; standard error of the mean).

Zusammenfassend konnte mit der Durchflusszytometrie-basierten FRET Methode die bereits bekannte Interaktion zwischen dem Brd4 und dem HPV31 E2 Protein nachgewiesen werden. Mit dem SYFP-Brd4-Konstrukt und der Brd4dCTM Deletionsmutante hingegen konnte für die Untersuchung der zweiten Interaktionsstelle kein FRET-Signal gemessen werden.

5.1.2 Brd4-Deletionsmutanten geben keinen Hinweis auf eine zweite Interaktionsstelle mit HPV31 E2

Die potentielle zweite Interaktionsstelle umfasst in dem Brd4 Protein die Domänen BD2, NPS und BID. Um die Rolle dieser Domänen im Zusammenhang mit der neu beschriebenen Interaktionsstelle mithilfe der FACS-FRET Methode zu untersuchen, wurden am C-Terminus mit SYFP markierte Mutanten mit Deletionen dieser Domänen in Brd4 untersucht. Diese wurden unter Verwendung der FACS-FRET Methode mit BFP markiertem HPV31 E2 oder mit der HPV31 E2 I73L Proteinmutante getestet. Letzteres ist Brd4-CTM-bindungsdefizient

und ermöglicht somit eine Interaktion, unabhängig von der konservierten Bindungsstelle, zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden im Vergleich zu den bereits getesteten Kombinationen von Brd4 und Brd4dCTM mit dem HPV31 E2 Protein dargestellt (Abbildung 9A). Für die Kombination mit dem HPV31 E2 Protein zeigen circa 51% der gemessenen Zellen für Brd4dBD1/2-Mutante, 69% für Brd4dNPS und 68% für Brd4dBID ein positives FRET-Signal. Im Vergleich dazu konnte, trotz ausreichender Expression für keine der Kombinationen mit der HPV31 E2 I73L Proteinmutante ein Interaktionssignal gemessen werden (Abbildung 9A und B).

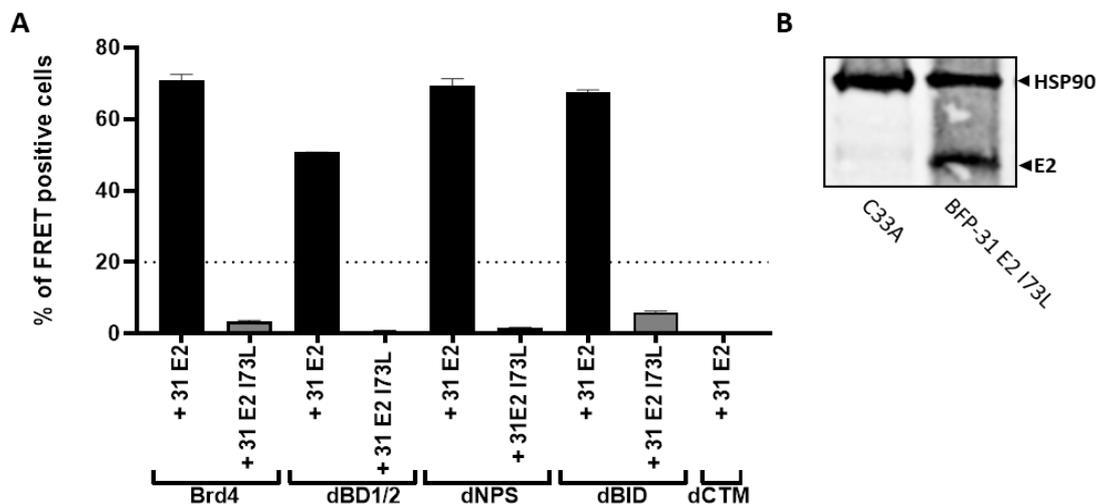


Abbildung 9: Kein Hinweis auf eine zweite Interaktionsstelle von HPV31 E2 in Kombination mit Brd4 oder Brd4 Deletionsmutanten im FACS-FRET Assay.

A) Für die FACS-basierte FRET Analyse der Brd4-Deletionsmutanten mit 31 E2 bzw. 31 E2 I73L wurden C33A mit 800 ng der Brd4-SYFP und BFP-31 E2 und BFP-31 E2 I73L Fusionsplasmide transfiziert. Dargestellt wird der Mittelwert der Anzahl an FRET-positiven Zellen in Prozent [%] von drei unabhängigen Experimenten. Für Brd4dBD1/2 wurden zwei unabhängige Experimente ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*). B) Immunoblotanalyse von BFP-31 E2 I73L. 48 h nach der Transfektion (500 ng DNA) wurden die C33A-Zellen geerntet. Als Kontrolle dienen untransfizierte C33A. Die Gesamtzelllysate wurden auf ihre Anwesenheit von BFP-31 E2 I73L mit dem α -RFP Antikörper untersucht. HSP90 diene als Ladekontrolle.

Die robusten positiven FRET-Signale mit dem HPV31 E2 Protein sind auf die Interaktion der CTM-Domäne von Brd4 mit dem N-Terminus von HPV31 E2 zurückzuführen, da sich die Fluorophore räumlich gesehen in der Nähe dieser beschriebenen konservierten Bindungsstellen befinden. Die Abwesenheit eines FRET-Signals bei der HPV31 E2 I73L Proteinmutante und auch bei der Brd4-CTM-Deletionsmutante könnten darauf hindeuten, dass durch die Entfernung zwischen der zweiten Interaktionsstelle und den Fluorophoren vermutlich kein Förster-Radius zustande kommt, welcher nötig ist um ein FRET-Signal zu generieren.

5.1.3 Isolierte Brd4-PDID interagiert mit HPV31 E2

Da es mit den Deletionsmutanten von Brd4 und der HPV31 E2 I73L Proteinmutante nicht möglich war ein Interaktionssignal für die zweite Interaktionsstelle, welche die PDID und BID in Brd4 und den C-Terminus in E2 umfasst, mittels FACS-FRET Analyse zu messen, wurden als Nächstes die isolierten PDID (enthält die BD2 und NPS), BID und CTM Domänen von Brd4 untersucht. Die Interaktion dieser Domänen mit E2 Proteinen verschiedener HPV-Typen wurde bereits in *in vitro*-Assays getestet [108]. Für die FACS-FRET Analyse wurden rekombinante SYFP –PDID, –BID, und –CTM Plasmide erstellt. C33A-Zellen wurden mit den erstellten Expressionvektoren transfiziert und nach 48 Stunden auf die Anwesenheit von PDID, BID und CTM mittels Immunoblotanalyse untersucht. Die Expression der Proteine konnte somit bestätigt werden (Abbildung 10A). Für die Interaktionsanalyse wurden C33A-Zellen jeweils mit den drei rekombinanten SYFP-Plasmiden zusammen mit BFP-HPV31 E2 transfiziert, um nach 48 Stunden die angegebenen Kombinationen mithilfe der FACS-FRET Analyse in lebenden Zellen zu untersuchen. Sowohl die CTM als auch die PDID wiesen ein positives FRET-Signal über 40% auf. Im Vergleich dazu gab es kein Interaktionssignal für die BID mit HPV31 E2 (Abbildung 10). Des Weiteren sollten diese durch das FACS-FRET indizierten Interaktionen mit einer Ko-Immunopräzipitation bestätigt werden. Hierfür wurden zunächst C33A, die mit einem HA-markierten HPV31 E2 Expressionsplasmid transfiziert wurden oder untransfizierte C33A-Zellen verwendet. Die nach 48 Stunden geernteten Zellen wurden lysiert und 10% des Zelllysats wurden als Input-Kontrolle für die Immunoblotanalyse aufgetragen. Das restliche Lysat wurde anschließend mit magnetischen Flag-beads (miltenyi) inkubiert. Mit Hilfe einer Immunoblotanalyse konnte bestätigt werden, dass es keine unspezifische Bindung des HA-getaggen HPV31 E2 Proteins an die magnetischen Flag-beads gab (Abbildung 10C). Für die Untersuchung der PDID, BID und CTM Domänen mit HPV31 E2 Protein wurden diese zunächst mit einem N-terminalen Flag-Tag in den pcDNA3.1-Vektor kloniert. Die erstellten rekombinanten Plasmide wurden jeweils mit einem HA-markierten HPV31 E2 Expressionsplasmid in C33A-Zellen kotransfiziert. Auch hier wurden 10% des Zelllysats der nach 48 Stunden geernteten C33A-Zellen als Input-Kontrolle verwendet. Die Flag-markierten Brd4-Domänen der restlichen Extraktion wurden mit den magnetischen Flag-beads präzipitiert.

Das Ergebnis der Immunoblotanalyse der immunpräzipitierten Zelllysate deutet, wie die FACS-FRET Analyse auf eine Interaktion der CTM- und PDID-Domänen mit dem HPV31 E2 Protein hin. Zusätzlich bestätigte das Ergebnis der Ko-Immunpräzipitation, dass die BID-Domäne nicht mit dem HPV31 E2 Protein interagiert (Abbildung 10D). Im Kontext von isolierten Domänen konnte somit eine zweite Interaktionsstelle in Brd4 bezüglich der PDID bestätigt werden. Dies gilt jedoch nicht für die BID von Brd4.

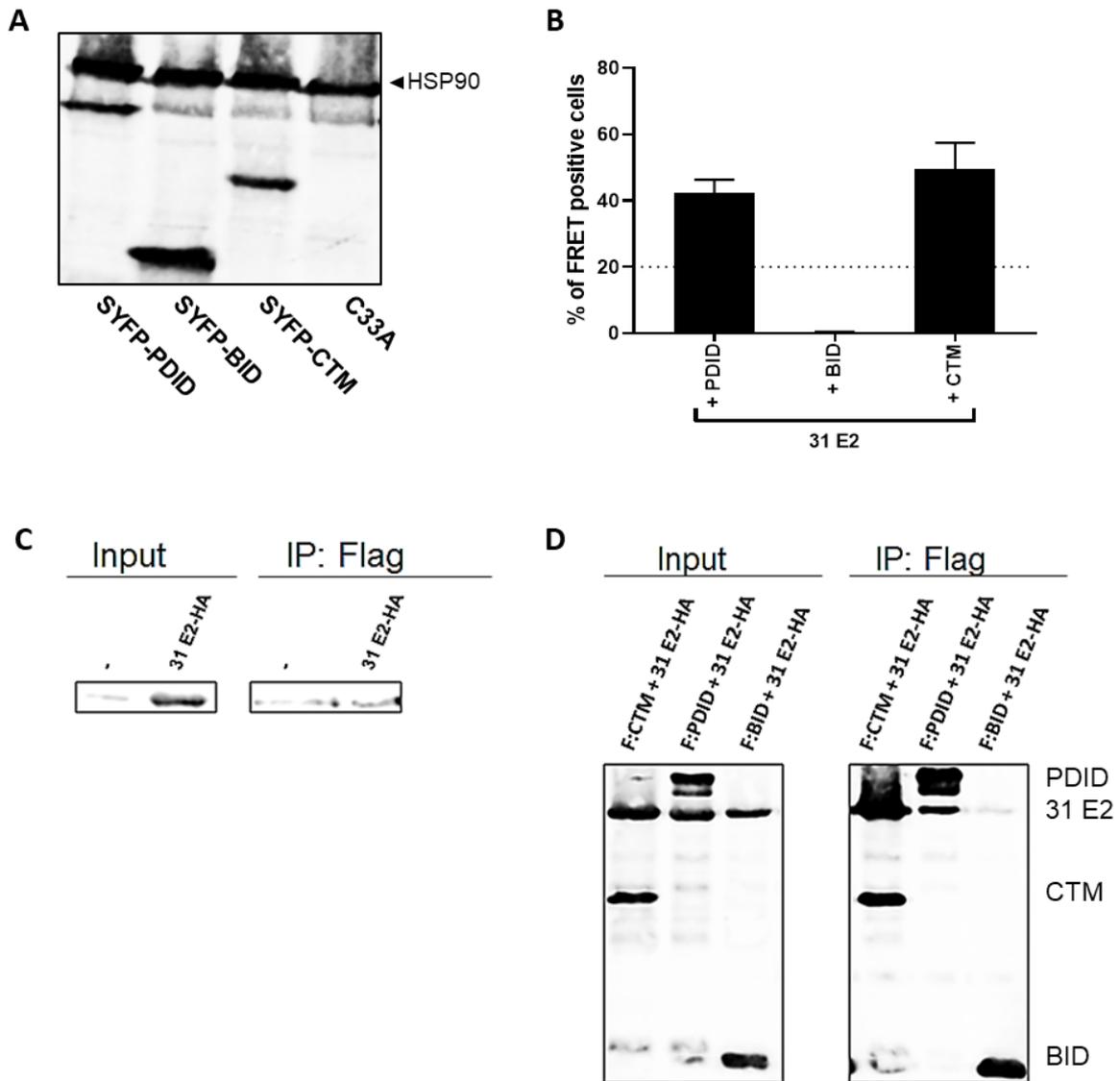


Abbildung 10: 31 E2 interagiert mit PDID, aber nicht mit BID.

A) Immunoblotanalyse von SYFP-PDID, -BID und -CTM. 1 μ g der jeweiligen Expressionsplasmide wurde in C33A transfiziert und nach 48 h geerntet. Die hergestellten Gesamtzellextrakte wurden auf die Anwesenheit der SYFP-Fusionsproteine (α -YFP) und auf HSP90, das als Ladekontrolle diente, untersucht. B) FACS-FRET Analyse von SYFP-PDID, -BID und -CTM mit BFP-31 E2 in C33A-Zellen. Es wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf Interaktionssignale untersucht. Der Graph zeigt die Mittelwerte von FRET-positiven Zellen in Prozent [%] von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*). Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde ein gepaarter zweiseitiger t-Test verwendet (** $p < 0,001$). C) Etablierung einer Ko-Immunopräzipitation mit HPV31 E2-HA-transfizierten oder untransfizierten (-) C33A. Die C33A-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. 10% des Zelllysats wurde als Input-Kontrolle aufgetragen. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden magnetische Flag-Beads (miltenyi) verwendet. Diese wurden nach der Immunpräzipitation mit dem entsprechenden Waschpuffer (0 mM NaCl) gewaschen und mittels Immunoblotanalyse mit einem α -HA Antikörper untersucht. D) C33A-Zellen wurden mit den Flag-getaggten Expressionsplasmiden für PDID, BID und CTM zusammen mit HA-markiertem 31 E2 kotransfiziert. Die jeweiligen Ansätze wurden wie in C) beschrieben

behandelt und mittels Immunoblotanalyse mit α -HA Antikörpern und α -Flag Antikörpern untersucht.

5.1.4 HPV16 E2 interagiert mit PDID, aber nicht CRPV E2

Im Hinblick auf die Postulierung, dass ausschließlich *high-risk* (HR) Papillomviren (PV)-Typen an die NPS der Brd4-PDID binden können [108], wurden weitere PV-Typen auf ihre Fähigkeit mit der PDID interagieren zu können untersucht. Zu diesem Zweck wurden die E2-Sequenzen von HPV16, als weiterer Vertreter der HR-Typen und CRPV (*Cottontail rabbit papillomavirus*), als nicht-HR-Typ in den BFP-C1-Expressionsvektor gebracht. Die BFP-Expressionsplasmide für die E2 Proteine von HPV16 und CRPV wurden in C33A-Zellen jeweils in Kombination mit den SYFP-PDID, -BID und -CTM Expressionvektoren transfiziert. Die jeweiligen Ansätze wurden 48 Stunden nach ihrer Transfektion auf Interaktionssignale mithilfe der FACS-FRET Analyse untersucht. Für das HPV16 E2 Protein ergab sich vergleichbar zu dem HPV31 E2 Protein, dass mehr als 40% der untersuchten Zellen ein FRET positives Signal in Kombination mit der CTM- und PDID-Domäne zeigten. Im Vergleich zu den HPV31 und HPV16 E2 Proteinen konnte für das CRPV E2 Protein hingegen kein positives FRET-Signal mit der PDID-Domäne nachgewiesen werden (Abbildung 11B). Die BID-Domäne zeigte erneut keine Interaktion, weder mit dem E2 Protein von HPV16 noch mit dem E2 Protein von CRPV (Abbildung 11A und B). Da die bisher in der Literatur beschriebene konservierte Interaktion der CTM mit E2 Proteinen als Positivkontrolle fungiert, kann eine fehlerhafte Expression des CRPV E2 Proteins ausgeschlossen werden. Die Expression der CTM und des CRPV E2 Proteins generierte ein positives FRET-Signal von circa 70%.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass ein weiterer HR-Typ an die PDID binden kann, CRPV E2 als Vertreter des kappa-Genus jedoch nicht.

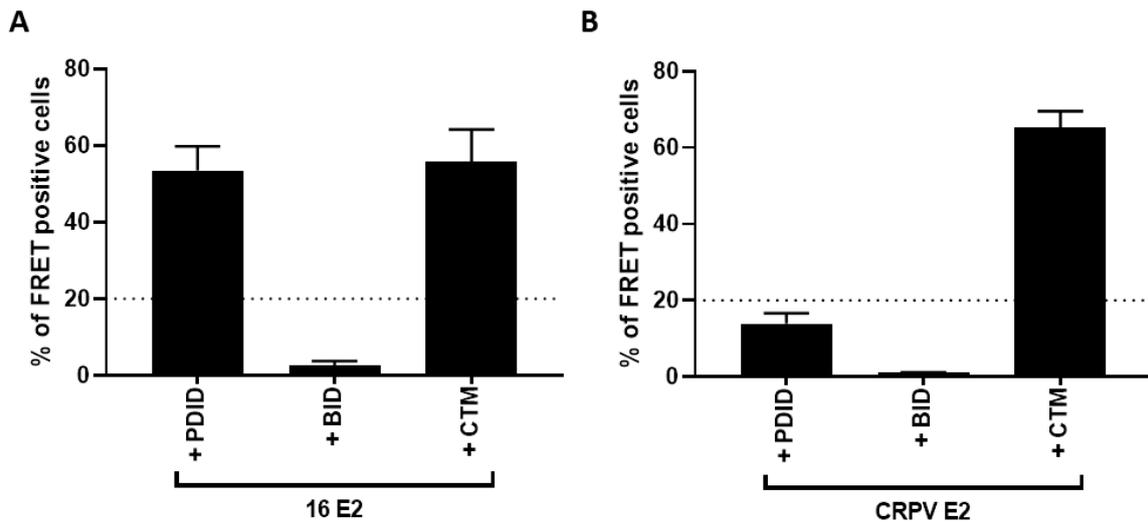


Abbildung 11: FACS-FRET-basierte Interaktionsanalyse von HPV16 E2 und CRPV E2 mit PDID

A) FACS-FRET Analyse von SYFP-PDID, -BID und -CTM mit BFP-16 E2 in C33A. Es wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf Interaktionssignale untersucht. Der Graph zeigt die Mittelwerte von FRET-positiven Zellen in Prozent [%] von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*).

B) Wie in A) wurde die Interaktion SYFP-PDID, -BID und -CTM mit BFP-CRPV E2 in C33A mittels Durchflusszytometrie-basierter FRET-Analyse untersucht. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf Interaktionssignale untersucht. Der Graph zeigt die Mittelwerte von FRET-positiven Zellen in Prozent [%] von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*).

5.1.5 Funktionelle Charakterisierung von HPV31 E2 mit den Mutationen von Serin zu Asparagin an der Position 313 und von Lysin zu Asparaginsäure an der Position 314

In vitro Pull-down Experimente deuteten an, dass der C-Terminus von E2 Proteinen verantwortlich für die Bindung an die PDID ist [108]. Insbesondere wurden hier die Positionen 306 und 307 mit zwei Lysinen (K) in HPV16 E2 genannt. Es wurde gezeigt, dass die Mutation dieser Aminosäurenreste zu Asparagin (N) und Asparaginsäure (D) einen Verlust der PDID-Bindung hervorruft [108]. Die Aminosäuren N und D sind an der entsprechenden Stelle in dem *low-risk* (LR)-Papillomvirustyp 11 zu finden. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass im Vergleich zu HR-Typen die LR-Typen nicht in der Lage sind an die PDID-Domäne zu binden. Für die BID-Domäne hingegen wurde nahe gelegt, dass alle PV-Typen diese Domäne binden können [108]. Um die Bedeutung dieser

Positionen im Hinblick auf die Funktionalität von HR-E2 Proteinen zu überprüfen, wurden die entsprechenden Aminosäurenreste an der Position 313 mit einem Serin (S) und 314 mit einem Lysin (K) in BFP-HPV31 E2 und die erwähnten Positionen 306 und 307 in BFP-HPV16 E2 zu N und D mittels *Overlap-Extension-PCR* mutiert. Zunächst wurde der Einfluss der HPV31 S313N/K314D und HPV16 K306N/K307D Proteinmutanten auf die virale Transkription bestimmt. Dazu wurden C33A-Zellen mit den Expressionsplasmiden für die Wildtyp-E2 Proteine oder für die ND-Mutanten transfiziert. Die E2-abhängige Aktivität wurde durch die Verwendung des artifiziellen Reporterkonstrukts pC18-Sp1-Luc, welches vier E2-Bindestellen und zwei Sp1-Bindestellen enthält, ermittelt. Die C33A-Zellen wurden zusätzlich mit einem Gaussia-Luziferase-Expressionsplasmid transfiziert. Die exprimierte Gaussia-Luziferase wird dabei in den Überstand sekretiert und dient als Kontrolle für die Transfektionseffizienz. Die gemessene Aktivität der Firefly-Luziferase-Expression wurde auf die Aktivität der Gaussia-Luziferase normalisiert. Die Kotransfektion der Expressionsplasmide für die HPV31 oder HPV16 E2 Wildtyp-Proteine mit dem pC18-Sp1-Luc Reporter führte jeweils zu einer 25-fachen und 31-fachen Erhöhung der Aktivität im Vergleich zur Aktivität des Reporterplasmids allein (Abbildung 12A und B). Mit der Kotransfektion des Reporterplasmids mit den HPV31 und HPV16 E2 ND-Proteinmutanten ergab sich jedoch nur eine 4,8- bzw. 1,6-fache Induktion der E2-abhängigen Aktivität im Vergleich zu Kontrolle (Abbildung 12A und B). Für die Überprüfung der Auswirkungen der ND-Mutation in HPV31 E2 bezüglich der Replikationsaktivität wurden C33A-Zellen mit dem pGL31URR –Luc Reporterplasmid, welches die HPV31 URR enthält, transfiziert. Für die Induktion der Replikation wurden die Expressionsplasmide für HPV31 E1 und E2 Proteine kotransfiziert, was zu einer 82-fachen Erhöhung der Aktivität verglichen mit der Aktivität des Reporterplasmids allein führte (Abbildung 12C). Die Kotransfektion mit der BFP- HPV31 E2 S313N/K314D Mutante hingegen führte zu einem Verlust dieser Replikationsaktivität (4,3-fache Reduktion) (Abbildung 12C).

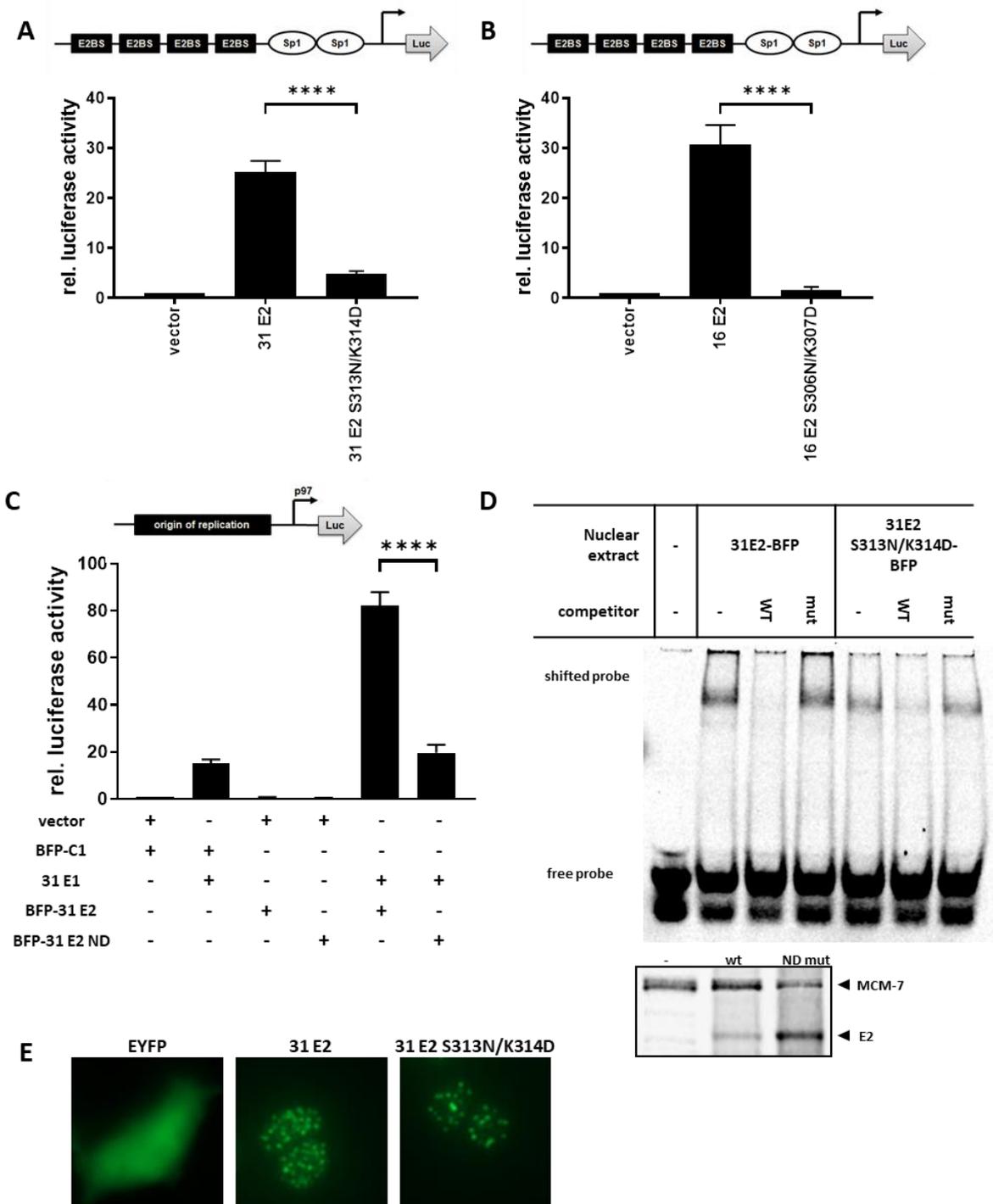


Abbildung 12: Die HPV31 E2 S313N/K314D Mutante zeigt einen Funktionsverlust.

A) Für die Bestimmung der Transaktivierungsaktivität der HPV31 S313N/K314D – oder B) HPV16 E2 K306N/K307D Mutanten in C33A-Zellen wurde das artifizielle Reporterkonstrukt pC18-Sp1-Luc (50 ng) transfiziert. C) Für die Bestimmung der Replikationsaktivität wurde das pGL31URR –Luc Reporterplasmid (50 ng) transfiziert. Es wurden jeweils 10 ng des BFP-Expressionsplasmide (leer oder mit E2) transfiziert. Für die Bestimmung der Replikationsaktivität wurden zusätzlich 100 ng des pSG HPV31 E1co 3xflag bzw. der pSG5-Leervektor für ein ausgeglichenes DNA-Mengenverhältnis transfiziert. Als interne Kontrolle diente die Expression des pCMV-Gluc-Vektors (0,5 ng). 48 h nach der Transfektion wurde die Aktivität der Firefly-Luziferase gemessen. Diese wurden ins Verhältnis zur Aktivität der Gaussia-Luziferase (Gluc) gesetzt. Angezeigt wird die relative Luiziferase-Aktivität bezüglich

des Reporters, welcher auf 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von vier unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt (**** $p < 0,0001$). D) Für die Ermittlung der DNA-Bindfähigkeit der HPV31 E2 S313N/K314D Mutante wurden C33A mit 2 μ g der BFP-Expressionsvektoren (E2-Wildtyp und ND-Mutante) transfiziert. Als Kontrolle wurden untransfizierte C33A verwendet. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Extraktion von nukleären Extrakten. Diese wurden mit einem DY681-markierten pC18-Oligo inkubiert und über ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Unter dem EMSA wird ein Immunoblot gezeigt, bei dem die Expression von BFP-31 E2 und BFP-31 E2 S313N/K314D mit einem α -RFP-Antikörper nachgewiesen wurde. Als Ladekontrolle diente das im Nukleus exprimierte MCM-7 (α -MCM-7/CDC47). E) Für die Fluoreszenzanalyse der HPV31 E2 S313N/K314D Mutante wurden 500 ng der EYFP-Expressionsvektoren in C33A transfiziert. Die Lokalisation des YFP-Fluoreszenzfarbstoffs wurde mithilfe des Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskops im FITC-Kanal analysiert (Vergrößerung 630-fach).

Wesentlich für die Funktionalität von E2 Proteinen ist, dass sie mithilfe des konservierten C-Terminus an die sich mehrfach wiederholende Konsensussequenz 5'-ACCN₆GGT-3' binden können [62, 63]. Um die Frage zu beantworten, ob der Verlust der Aktivität von E2-abhängigen Reportern in Zusammenhang mit der Beeinträchtigung der DNA-Bindfähigkeit der HPV31 E2 ND-Proteinmutante steht, wurden Elektromobilitäts-Shift-Analysen (EMSA) durchgeführt. Hierfür wurden nukleäre Extrakte von untransfizierten oder mit BFP-HPV31 E2 und BFP-HPV31 E2 S313N/K314D transfizierten C33A-Zellen verwendet. Diese wurden mit einem DY681-markierten pC18-Oligo inkubiert und anschließend nach der Auftrennung über ein natives Polyacrylamid-Gel analysiert. In der untransfizierten Probe war kein *Shift* des Oligos erkennbar. Für die mit dem Wildtyp HPV31 E2 behandelten Proben hingegen konnte ein spezifischer *Shift* beobachtet werden. Im Vergleich dazu war die Bandenstärke für die Proben mit der ND-Mutante schwächer (Abbildung 12D, EMSA). Vergleich man hierzu die Expression der Proteine, wurde der Eindruck einer verringerten Bindung der ND-Mutante durch die im Vergleich zum Wildtyp stärkere Expression bestärkt (Abbildung 12D, unter EMSA; Immunoblot).

Der Transport von E2 Proteinen in den Zellkern ist durch ein *nuclear localisation signal* (NLS), das sich im C-Terminus von E2 befinden kann [62], vorgegeben. Für den Transport ist ein intaktes und funktionelles NLS-Signal Voraussetzung, damit das E2 Protein in den Zellkern transportiert werden kann um dort an die DNA zu binden. Um zu überprüfen, ob das NLS-Signal durch die Mutation von S313/K314 zu N und D in dem HPV31 E2 Protein beschädigt wurde, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation dieser E2 Proteinmutante überprüft. Der EYFP-Expressionsvektor und die EYFP-markierten E2 Wildtyp- und ND-Mutanten-Proteine wurden mithilfe des Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskops im FITC-Kanal analysiert. Im Vergleich zu dem EYFP-Leervektor ist sowohl das HPV31 E2 Wildtyp-Protein als auch die HPV31 E2 S313N/K314D Proteinmutante im Zellkern der C33A-Zellen lokalisiert (Abbildung 12E).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die ND-Mutationen in E2 Proteinen einen Funktionsverlust der Transkription und Replikation zur Folge haben, welcher vor allem auf die reduzierte DNA-Bindung zurückzuführen ist. Die Lokalisation ist durch die ND-Mutationen jedoch nicht beeinträchtigt. Daraus kann man schließen, dass die Positionen 313/314 in HPV31 E2 und 306/307 in HPV16 E2 wichtig für die DNA-Bindung sind.

5.1.6 ND-Mutationen im C-Terminus von E2 haben keinen Effekt auf die PDID-Bindung

Da die Untersuchung der zweiten Interaktionsstelle zwischen Brd4 und den viralen E2 Proteinen zum Modell führte, welches den C-Terminus von HR-Papillomvirentypen als Interaktionsstelle für die PDID in Brd4 beschreibt [108], wurde daraufhin die Interaktion der BFP-HPV31 E2 S313N/K314D und BFP-HPV16 E2 K306N/K307D Proteinmutanten mit den PDID- und BID-Domänen, die alle PV-Typen binden sollen, untersucht. Dafür wurden die Expressionsplasmide sowohl für die HPV31 und HPV16 E2-Wildtyp Proteine als auch für die entsprechenden ND-Proteinmutanten jeweils mit den SYFP-PDID, -BID und -CTM Expressionsvektoren in C33A-Zellen kotransfiziert und nach 48 Stunden mit der FACS-FRET Methode analysiert. Für die Kombination der Brd4 BID-Domäne mit den HPV31 oder 16 E2 Proteinen oder den entsprechenden ND-Proteinmutanten konnten keine FRET positiven Zellen nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Wie erwartet binden die getesteten E2 Wildtyp-Proteine und ND-Proteinmutanten hingegen an die CTM-Domäne (Abbildung 13A und B). Vergleichend zu der Interaktion der Wildtyp-E2 Proteine mit der PDID-Domänen, wie bereits in Abbildung 10B und Abbildung 11A gezeigt wurde, wurde zusätzlich das FRET-Signal für die E2 ND-Proteinmutanten dargestellt, wobei kein Verlust des Interaktionssignal und kein signifikanter Unterschied (getestet mit zweiseitiger ANOVA) zu der Wildtyp-Kondition festgestellt werden konnte (Abbildung 13A und B).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die Mutationen der Positionen 306/307 in HPV16 E2 und der Positionen 313/314 in HPV31 E2 zu N und D keinen Effekt auf die PDID-Bindung haben. Dies könnte bedeuten, dass nicht die in Wu et al. (2016) genannten Positionen, sondern bislang unbekannte Aminosäurenreste in E2 Proteinen diese Interaktion vermitteln.

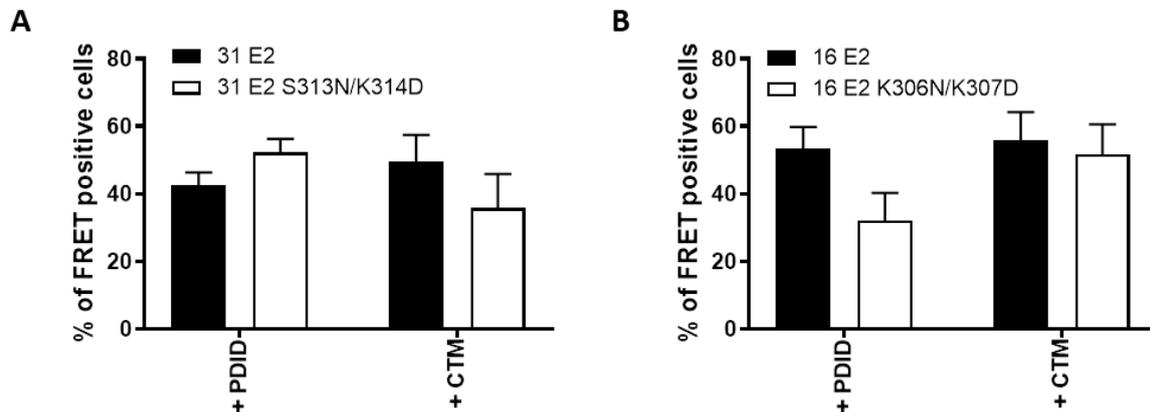


Abbildung 13: HPV31 E2 S313N/K314D und HPV16 E2 K306N/K307D interagieren mit PDID und CTM.

Mittels Durchflusszytometrie-basierter FRET-Analyse wurde die Interaktion von A) BFP-31 E2 S313N/K314D und B) BFP-16 E2 K306N/K307D mit SYFP-PDID und-CTM im Vergleich zu den E2-Wildtyp-Proteinen in C33A untersucht. Es wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf Interaktionssignale untersucht. Der Graph zeigt die Mittelwerte von FRET-positiven Zellen in Prozent [%] von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*).

5.1.7 Konservierungsanalyse der C-terminalen Domäne von HR- und LR-Papillomvirus E2 Proteinen

Die Aminosäurenreste R37 und I73 im N-Terminus von E2 Proteinen, welche die Interaktion zu dem Brd4-C-Terminus vermitteln, sind hochkonserviert [62]. In einer *in silico* Sequenzanalyse wurde mithilfe der Erstellung eines Weblogos die Konservierung der Positionen in HR-E2 Proteinen, die an die PDID binden sollen, untersucht. Ergänzend dazu wurden ebenso die entsprechenden Positionen in LR-E2 Proteinen analysiert. Für die E2 Proteine von HR-Papillomvirustypen hat sich ergeben, dass die Konservierung der Position, welche in HPV31 S313 entspricht nur mäßig konserviert ist. Die der HPV31 E2 K314-Position entsprechenden Lysine sind höher konserviert (Abbildung 14; Positionen 329 und 330 im Weblogo). Asparagin (N) und Asparaginsäure (D) an der entsprechenden Stelle für Niedrigrisiko-Typen sind jedoch nicht konserviert (Abbildung 14B; Positionen 345 und 346 im Weblogo).

Dieses und die vorangegangenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das zweite Lysin (Abbildung 14A; Weblogo K330) in HR-E2 Proteinen insbesondere für die DNA-Bindung wichtig ist. Für die LR-E2 Proteine hingegen scheint dies nicht der Fall zu sein, was sich in der nicht vorhandenen Konservierung widerspiegelt. Darüber hinaus scheinen die untersuchten Positionen in den E2 Proteinen von HR-Papillomvirentypen keine Rolle für die Interaktion mit der PDID zu spielen. Außerdem konnte nicht bestätigt werden, dass HR-E2 Proteine beziehungsweise E2 Proteine mit den „LR-Mutationen“ N und D an den entsprechenden Positionen, an die BID binden.

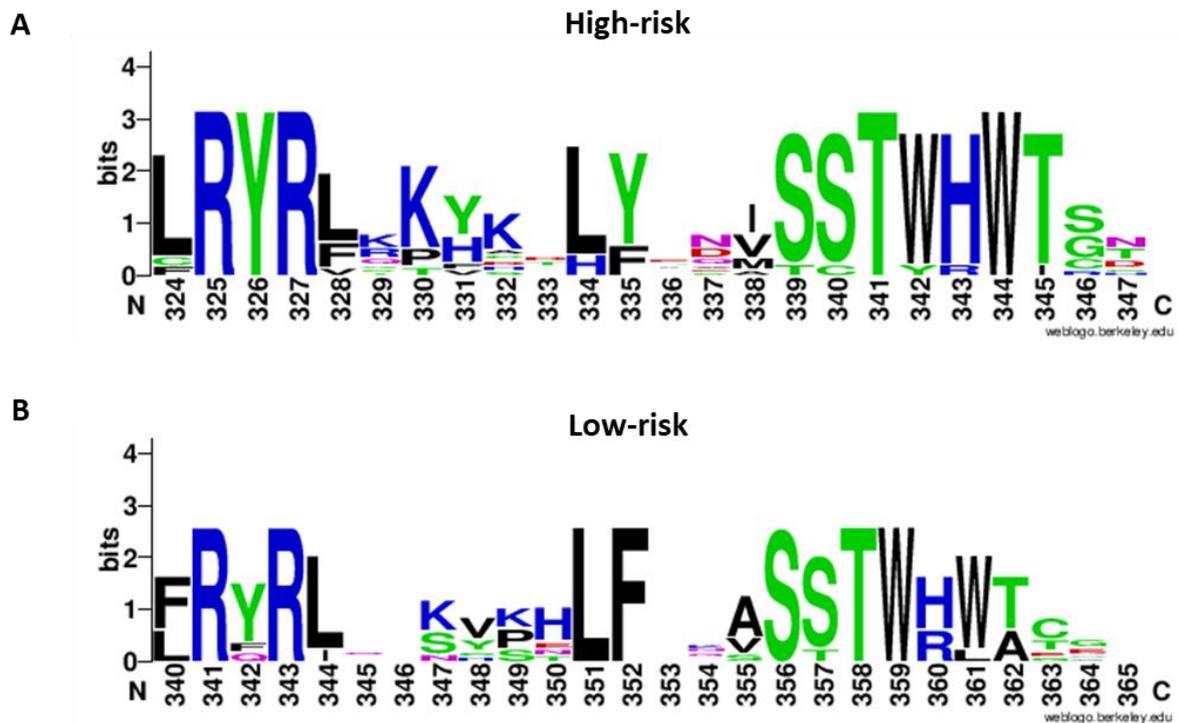


Abbildung 14: Weblogo des Aminosäuresequenzvergleichs von HR- und LR-E2 Proteinen. A) Für die HR-Typen wurden die E2-Sequenzen von HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 und 59 aus <https://pave.niaid.nih.gov> entnommen. Ein Weblogo des erstellten Alignements wurde mithilfe von <https://weblogo.berkeley.edu> erstellt. B) Für die LR-Typen wurden folgende E2-Sequenzen verwendet: 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81. Das Erstellen des Weblogos erfolgte wie für A) beschrieben.

5.1.8 Die Interaktion von PDID zu HPV31 E2 erfolgt über den N-Terminus von HPV31 E2

In den vorangegangenen Experimenten konnte die Annahme, dass die im C-Terminus lokalisierten Aminosäurenreste S313 und K314 die Interaktion zu der zweiten Bindestelle in Brd4 vermitteln, nicht bestätigt werden. Um zu untersuchen, ob die Interaktionsstelle in HPV31 E2 im C-Terminus lokalisiert ist oder in anderen Domänen des E2 Proteins wurden die isolierten Domänen TAD-Hinge, Hinge allein und Hinge-DBD von HPV31 E2 getestet. Zu

diesem Zweck wurden C33A-Zellen mit den BFP-Expressionsvektoren der genannten Domänen und mit den SYFP-PDID, -BID oder -CTM Expressionsvektoren kotransfiziert. In einer FACS-FRET Analyse wurde die Anzahl der FRET positiven Zellen (angegeben in %) bestimmt. Für die Kombinationen der PDID-Domäne mit der TAD-Hinge von HPV31 E2 zeigten etwa 24% der gemessenen Zellen ein positives FRET-Signal, die Hinge allein und die Hinge-DBD hingegen wiesen kein Interaktionssignal auf. Weiterhin zeigte die BID-Domäne von Brd4 kein Interaktionssignal mit den HPV31 E2-Domänen. Die konservierte Interaktion der Brd4-CTM Domäne mit dem N-Terminus von E2 (TAD-Hinge) ergab ein positives FRET-Signal von 51%. Wie erwartet ergab sich für die Hinge und Hinge-DBD kein weiteres FRET-Signal mit der CTM (Abbildung 15).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass in lebenden Zellen die Interaktion zwischen der Brd4 PDID-Domäne und dem HPV31 E2 Protein über die N-terminale Transaktivierungsdomäne in Verbindung mit der Hinge erfolgt.

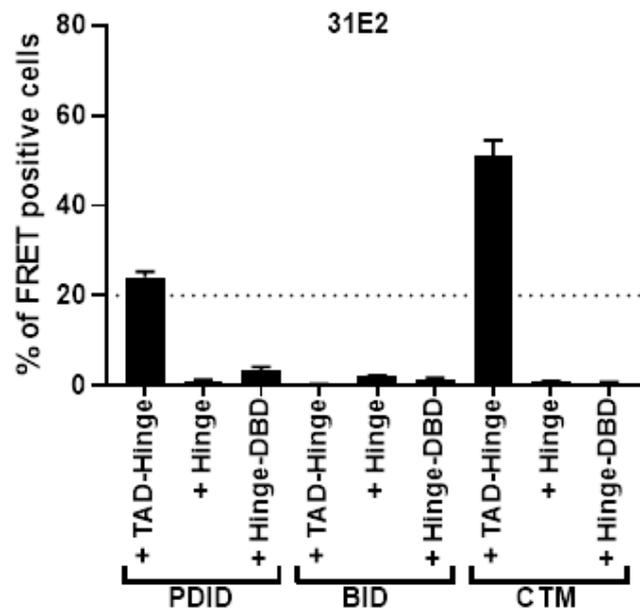


Abbildung 15: Die isolierte TAD-Hinge-Domäne von 31 E2 interagiert mit PDID.

Mittels Durchflusszytometrie-basierter FRET-Analysen wurde die Interaktion von BFP-31 E2 TAD-Hinge, -31 E2 Hinge und -31 E2 Hinge-DBD mit SYFP-PDID, -BID und -CTM in C33A untersucht. Es wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf FRET-positive Zellen untersucht, die in Prozent [%] dargestellt werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.9 HPV31 E2 R37A und I73L Mutanten zusammen mit PDID weisen reduziertes FRET-Signal auf

Der N-Terminus der E2 Proteine von Papillomviren beinhaltet hochkonservierte Aminosäurenreste [62]. Da gezeigt werden konnte, dass die TAD-Hinge (aber nicht die Hinge allein) von HPV31 E2 mit der PDID-Domäne ein positives FRET-Signal erzeugt, wurden zwölf der konservierten Aminosäurenreste aus dem N-Terminus von HPV31 E2 im Hinblick auf die Bindung zur PDID-Domäne untersucht. Die Mutationen an den entsprechenden Positionen wurden mittels *Overlap-Extension PCR* in das rekombinante BFP-HPV31 E2 Expressionsplasmid eingeführt. Die Expressionsplasmide der BFP-markierten Y19A, R37A, S65A, I73L, E74A, Y87A, T93A, K111Q, K111A, K112A, Y131A, Y158A und Y159A HPV31 E2 Proteinmutanten wurden für eine FACS-basierte FRET Analyse mit dem Expressionsplasmid für SYFP-PDID in C33A-Zellen transfiziert. BFP-HPV31 E2 R37A, I73L und E74A zeigten mit jeweils 20%, 32% und 29% FRET positiven Zellen die größte Reduktion im Vergleich zum Wildtyp mit 47% FRET positiven Zellen (Abbildung 16A). Da in E2 Proteinen die Positionen R37 und I73 die Interaktion zum C-Terminus von Brd4 vermitteln, ist vergleichend zu der Reduktion des FRET-Signals mit der PDID-Domäne und den entsprechenden HPV31 E2 Proteinmutanten auch ein Verlust des Signals mit der CTM-Domäne zu erwarten. Diese Erwartung konnte durch eine FACS-FRET Analyse bestätigt werden, was sich in einer signifikanten Abnahme des Interaktionssignals mit der CTM-Domäne äußerte. Dabei ergab sich für die HPV31 E2 I73L Proteinmutante ein FRET-Signal, welches sich unter dem Schwellenwert von 20% befand und damit nicht nur eine Reduktion, sondern einen Verlust des Interaktionssignals mit der CTM-Domäne aufzeigt (Abbildung 16B). Für die PDID und die BFP-HPV31 E2 R37A Proteinmutante zeigte sich ebenso eine signifikante Reduktion des FRET-Signals, für die I73L Proteinmutante hingegen konnte keine signifikante Reduktion gemessen werden (Abbildung 16B). Um zu überprüfen, ob diese Reduktion des Interaktionssignals auch für andere HR-Papillomvirustypen beobachtet werden kann, wurden die Doppelmutanten BFP-HPV31 R37A/I73L und BFP-HPV16 R37A/I73A generiert. Diese wurden in Kombination mit N-terminal oder C-terminal SYFP-markierter PDID- und CTM-Domäne mithilfe der FACS-FRET Methode analysiert (Abbildung 16C und D). Trotz des reduzierten Interaktionssignals der Doppelmutanten mit der CTM-Domäne, zeigte insbesondere das HPV16 E2 Protein kein ausreichendes FRET-Signal (circa 16%) in Kombination mit der PDID-Domäne. Damit konnte auch kein Unterschied zur R37A/I73A Mutante festgestellt werden. Für die HPV31 E2 R37A/I73L Proteinmutante hingegen konnte eine Reduktion um etwa 50% gegenüber dem Wildtyp Protein festgestellt werden (Abbildung 16C). Im Kontrast dazu konnte für die Kombinationen

mit dem C-terminalen SYFP-Tag für die PDID- und CTM-Domäne kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Wildtyp und den E2 37/73 Proteinmutanten von HPV16 und 31 festgestellt werden (Abbildung 16D).

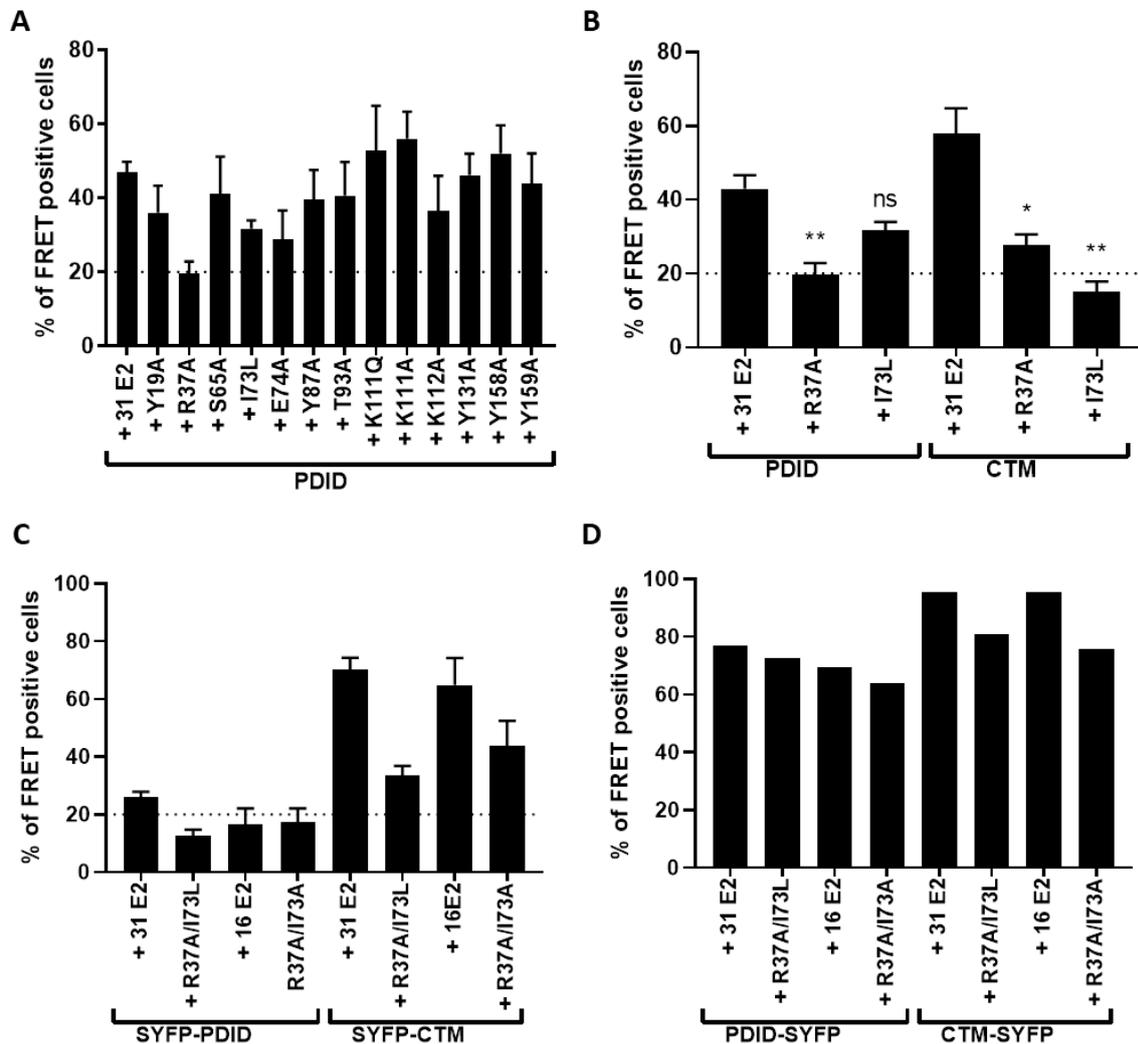


Abbildung 16: Interaktion von HPV31 E2- und HPV16 E2-Mutanten mit PDID.

A) Mit Hilfe der FACS-FRET-Analyse wurde die Interaktion von BFP-31 E2-Expressionsplasmiden, die Mutationen an den konservierten Positionen 19, 37, 65, 73, 74, 87, 93, 111, 112, 131, 158, 159 haben, mit SYFP-PDID in C33A untersucht (n≥3). B) Für die 31 E2 R37A und I73L Expressionsmutanten wurde zusätzlich die Interaktion mit der CTM gegenübergestellt (n≥3; CTM mit R37A n=2). Mithilfe einseitiger ANOVA mit Dunnett-Test wurde für A) und B) die statistische Signifikanz ermittelt (ns p>0,05; * p<0,05; ** p<0,01). C) Die Auswirkung der Doppelmutationen R37A/I73L für HPV31 und R37A/I73A für HPV16 wurde mit SYFP-PDID und –CTM (n≥3) oder D) PDID- und CTM-SYFP (n=1) im FACS-FRET getestet. Für A), B), C) und D) wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf FRET-positive Zellen untersucht, die in Prozent [%] dargestellt werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimenten schließen, dass die Aminosäurenreste R37 und I73 hauptsächlich für HPV31 E2 eine Rolle hinsichtlich der PDID-Interaktion spielen könnten.

5.1.10 Interaktion zu HPV31 E2 wird über BD2, NPS und Region 505-530 in PDID vermittelt

Die *Phosphorylation dependent interaction domain* (PDID) beinhaltet innerhalb der 243-langen Aminosäuresequenz fünf weitere Regionen [76]. BD2 (349-461), NPS (493-504) und die Regionen von 287-348, 462-482 und 505-530 (Abbildung 17A) [76]. Im Zusammenhang der PDID-Interaktion mit E2 Proteinen wurde über die NPS Domäne postuliert, dass diese im phosphorylierten Zustand ausschließlich HR-E2 Proteine binden kann, was vor allem mithilfe von *in vitro* Versuchen gezeigt wurde [108]. Um zu überprüfen, ob dies auch in lebenden Zellen zutrifft, wurde ein Expressionsvektor für eine PDID-NPS-Deletionsmutante, aber auch für Deletionsmutanten der anderen PDID-Regionen mit N- oder C-terminalem SYFP-Anhang hergestellt. C33A-Zellen wurden mit diesen und mit dem Expressionsvektor für BFP-HPV31 E2 kotransfiziert. Anhand der FACS-FRET Analyse wurde 48 Stunden nach der Transfektion der prozentuale Anteil an FRET positiven Zellen bestimmt (Abbildung 17C und D). Die Transfektionsansätze mit den Expressionsvektoren für die SYFP-PDID-Deletionsmutanten zeigen deutliche Abnahmen des FRET-Signals für die Deletion der BD2- und NPS-Domänen und der Region zwischen den Sequenzpositionen 505-530. Zusätzlich wurde eine PDIDalanin-Mutante (PDIDalamt) getestet, welche an acht Positionen in der NPS mutiert ist, so dass diese potentiell nicht mehr phosphoryliert werden können. Diese zeigte ein ähnliches Ergebnis, wie die NPS-Deletionsmutante, was darauf hinweist, dass die Phosphorylierung der NPS-Domäne innerhalb der PDID-Domäne wichtig für die Interaktion mit dem E2 Protein ist (Abbildung 17B). Um auszuschließen, dass das verringerte Interaktionssignal von SYFP-PDIDdBD2, -PDIDdNPS und -PDIDd505-530 mit BFP-HPV31 E2 auf eine reduzierte Expression zurückzuführen ist, wurde die Expression der PDID-Deletionsmutanten mittels Immunoblotanalyse überprüft (Abbildung 17B).

Wurden die PDID-Deletionsmutanten verwendet, die einen C-terminalen SYFP-Tag besitzen, betrug die Abnahme des FRET-Signals für die 31 E2-Interaktion mit PDIDdBD2 70% im Vergleich zur Abnahme mit dem N-terminalen SYFP-Tag, welche 31% betrug. PDIDdNPS-SYFP zeigte lediglich eine Reduktion von 32%, SYFP-PDIDdNPS hingegen eine Abnahme von 62%. Die Deletion der Region 505-530 schließlich führte zu einer 62%igen Abnahme des FRET-Signals mit dem C-terminalen SYFP-Tag und zu einer 97%igen Reduktion mit dem N-terminalen Tag. Die Deletionen der Regionen zwischen den Sequenzpositionen 287-

348 und 462-482 wiesen keine gravierenden Veränderungen bezüglich des FRET positiven Signals auf (Abbildung 17B und C).

Die Ergebnisse zeigen, dass die relative Abnahme des FRET positiven Signals für die N- oder C-terminal markierten PDID Deletionsmutanten unterschiedlich ist. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Lokalisation des Tags (N- vs. C-Terminus) und die daraus resultierende Konformation der PDID-Domäne sein, wodurch der Förster-Radius beeinträchtigt werden könnte. Weiterhin ergibt sich aus den Daten, dass die BD2- und NPS-Domäne und die Region zwischen den Sequenzpositionen 505-530 wichtig für die Interaktion mit dem HPV31 E2 Protein ist. Darüber hinaus könnte die große Differenz in der Abnahme des HPV31 E2-Interaktionssignals mit den PDIDdNPS-Mutanten auf die von CM. Chiang untersuchte Konformationsänderung in der PDID-Domäne hindeuten [76, 108].

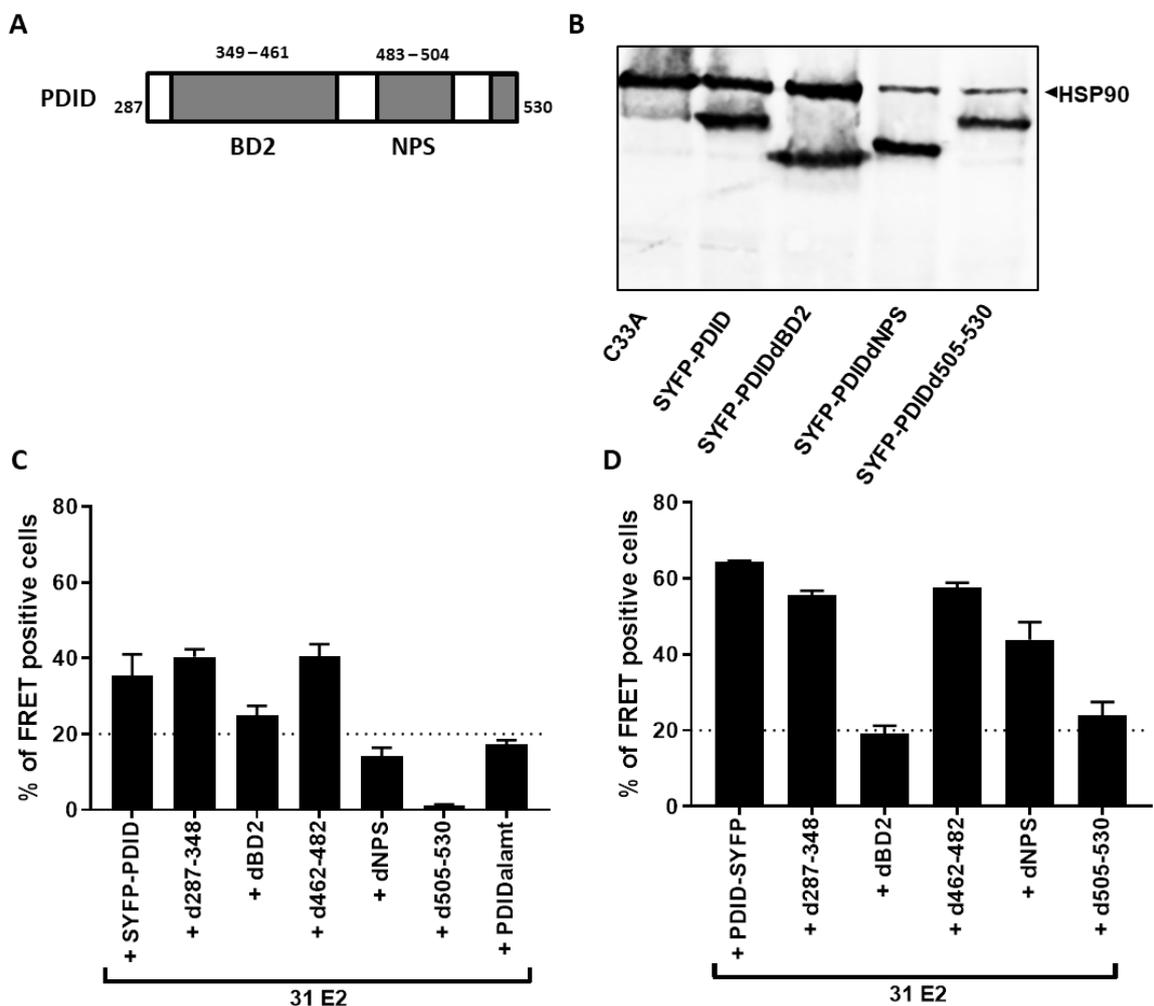


Abbildung 17: Deletion der BD2, NPS und der Region 505-530 in PDID reduzieren das Interaktionssignal mit HPV31 E2.

A) Schematische Darstellung der Brd4-PDID mit den Regionen 287-348, BD2, 462-482, NPS und 505-530. B) Immunoblotanalyse der PDID, PDIDdBD2, PDIDdNPS und PDIDd505-530 – Expressionsplasmide mit N-terminal getagtem SYFP. 1 µg der jeweiligen

Expressionsplasmide wurde in C33A transfiziert und nach 48 h geerntet. Untransfizierte C33A-Zellen dienten zur Kontrolle. Die hergestellten Gesamtzellextrakte wurden auf die Anwesenheit der SYFP-Fusionsproteine (α -YFP) und auf HSP90, das als Ladekontrolle diente, untersucht. C) FACS-FRET Analyse von SYFP-PDID, PDIDd287-348, PDIDdBD2, PDIDd462-482, PDIDdNPS und PDIDd505-530 oder D) von PDID-, PDIDd287-348-, PDIDdBD2-, PDIDd462-482-, PDIDdNPS- und PDIDd505-530-SYFP mit BFP-31E2. Es wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf FRET-positive Zellen untersucht, die in Prozent [%] dargestellt werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.1.11 Dimerisierung der PDID ist von der BD2 und der Region 505-530 abhängig

Vorangegangene Untersuchungen konnten bereits darlegen, dass die Domänen BD1 und BD2 für die Dimerisierung von Brd4 notwendig sind [127]. Darüber hinaus fand man in verschiedenen Brd-Proteinen ein konserviertes Motiv B (AS 502-547 in Brd4), welches eine *coiled-coil* Sequenz enthält (AS 511-531) und für die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren unter den Brd-Proteinen verantwortlich ist [128]. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit im Hinblick auf eine Erklärung für den Verlust des Interaktionssignales von dem HPV31 E2 Protein mit PDIDdBD2, PDIDdNPS und PDIDd505-530, wurden C33A-Zellen mit den Expressionsvektoren der BFP- oder SYFP-markierten CTM-, BID- und PDID-Domänen in verschiedenen Kombinationen transfiziert und mit der FACS-FRET Methode analysiert (Abbildung 18). Die Kombinationen von BFP-CTM und SYFP-CTM, BFP-BID und SYFP-BID, BFP-BID und SYFP-PDID, BFP-CTM und SYFP-PDID, BFP-CTM und SYFP-BID erzeugten kein positives FRET Signal (Abbildung 18). Für 31% der Zellen, welche für die Kombination von BFP-PDID mit SYFP-PDID untersucht wurden, konnte ein positives FRET-Signal ermittelt werden. Weiterführend wurde diese Fähigkeit zur Dimerisierung in Abhängigkeit von der BD2, NPS und der Sequenzregion 505-530, welche sich größtenteils mit dem Motiv B [128] deckt, im FACS-FRET Assay untersucht. Die Deletion der BD2 und der Sequenzregion 505-530 führte jeweils zu einem Verlust des FRET-Signals um 88% für das PDIDdBD2-Fragment und um 55% für das PDIDd505-530-Fragment in Kombination mit der gesamten PDID-Domäne. Im Gegensatz dazu führte die Deletion der NPS-Region zu keinem Verlust des FRET-Signals (Abbildung 18).

Mit diesen Ergebnissen, welche zeigen, dass die BD2 und die Sequenzregion 505-530 an der Dimerisierung von SYFP- und BFP-markierten PDID-Domänen beteiligt sind, können diese bereits zuvor untersuchten Domänen für die Beteiligung an der Dimerisierung von Brd-Proteinen bestätigt werden [127, 128]. Für die NPS hingegen, welche zwar bei der Interaktion zu HPV31 E2 eine Rolle zu spielen scheint, konnte keine Beteiligung bei der Dimerisierungsfunktion von PDID-Domänen beobachtet werden.

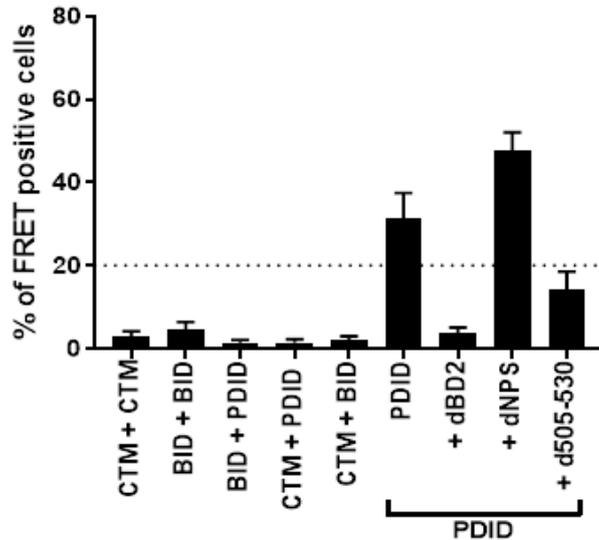


Abbildung 18: Die Bildung von PDID-Dimeren ist von BD2 und der Region 505-530 abhängig.

Die Dimerisierungsfähigkeit der einzelnen Brd4-Domänen CTM, PDID, BID und den PDID-Deletionsmutanten wurde mittels FACS-FRET Analyse in C33A-Zellen ermittelt. BFP-PDID, -BID, -CTM wurden jeweils in verschiedenen Kombinationen mit SYFP-PDID, -BID, -CTM getestet. BFP-PDID wurde jeweils mit SYFP-PDID, PDIDdBD2, PDIDdNPS und PDIDd505 getestet. Es wurde eine Gesamtmenge von 800 ng DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die C33A-Zellen geerntet und auf FRET-positive Zellen untersucht, die in Prozent [%] dargestellt werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.1.12 Dominant-negativer Effekt von PDID auf HPV31 E2-abhängige Transkriptionsaktivität

Um die Frage zu beantworten, welche Funktion die neu beschriebene Interaktion zwischen HPV31 E2 und Brd4-PDID im Lebenszyklus von Papillomviren übernimmt, wurde der Effekt der PDID-Domäne auf die Funktion des E2 Proteins als Transkriptionsmodulator getestet. Die E2-abhängige Aktivität in Kombination mit steigenden Konzentrationen von PDID wurde in Luziferase-Reporteranalysen untersucht. Dafür wurden C33A-Zellen mit dem Reporterplasmid pC18-Sp1-Luc mit dem Expressionsplasmid für BFP-HPV31 E2 und in zunehmenden Konzentrationen (25 ng, 50 ng, 100 ng) mit den Expressionsplasmiden für SYFP-PDID, -BID und -CTM transfiziert. Mit der Kotransfektion von pCMV-Gluc wurden die nach 48 Stunden gemessenen Firefly-Werte auf die Werte der Gaussia-Aktivität normalisiert. Für die CTM-Domäne von Brd4 ist beschrieben, dass diese einen inhibierenden Effekt auf die E2-abhängige Aktivierungsfunktion hat [129]. Für die 32-fache E2-abhängige Induktion des Reporters kann dies mit der Überexpression des SYFP-CTM Vektors bestätigt werden. Es fand lediglich eine 9,4–13,5-fache Erhöhung der Transaktivierungsaktivität statt

(Abbildung 19A). Mit der Überexpression der BID-Domäne jedoch, von welcher in den vorangegangenen Experimenten keine Interaktion mit 31 E2 nachgewiesen werden konnte, ergab sich kein reprimierender Effekt auf die E2-abhängige Transkriptionsaktivität. Die Expression der PDID-Domäne im Kontext der E2-vermittelten Transkriptionsaktivität führte zu einer signifikanten Reduktion dieser, was sich durch die verringerte Induktion der transkriptionellen Aktivität um das 16,2 – 23,8-fache äußerte (Abbildung 19A). Parallel zu der Analyse der Proben im Reporterassay, wurden dieselben Proben in einer Immunoblotanalyse auf die Expression von BFP-HPV31 E2 und SYFP-PDID überprüft. Im Vergleich zur stärker exprimierten Bande von SYFP-PDID, was mit der steigenden Transfektionsmenge des Expressionplasmides korreliert, wird BFP-HPV31 E2 in allen drei Transfektionsansätzen in ähnlichen Mengen exprimiert (Abbildung 19B). Damit kann ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Aktivität der E2-abhängigen Transkription auf eine reduzierte Expression des E2 Proteins zurückzuführen ist.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die PDID-Domäne, ähnlich wie die CTM-Domäne, einen dominant-negativen Effekt auf die E2-abhängige Transkriptionsaktivität hat. Damit könnte die zweite Interaktionsstelle zwischen Brd4 und dem E2 Protein von Papillomviren, hier am Beispiel von HPV31 gezeigt, möglicherweise eine weitere, noch bisher unbekannte Funktion für den PV-Lebenszyklus einnehmen.

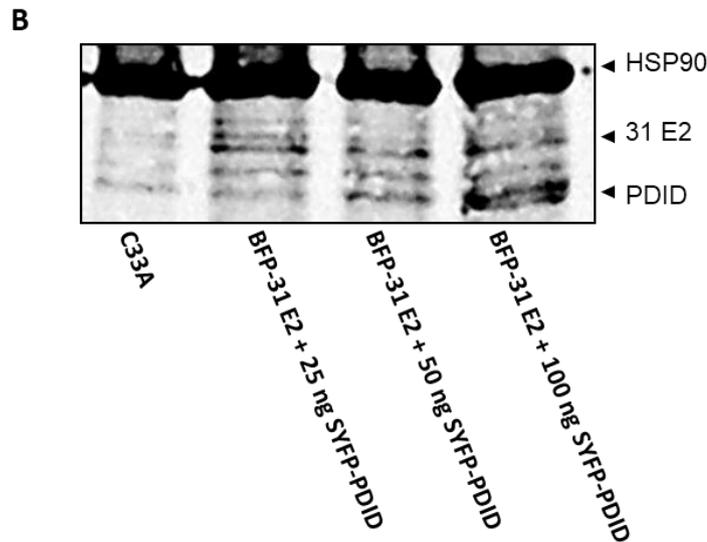
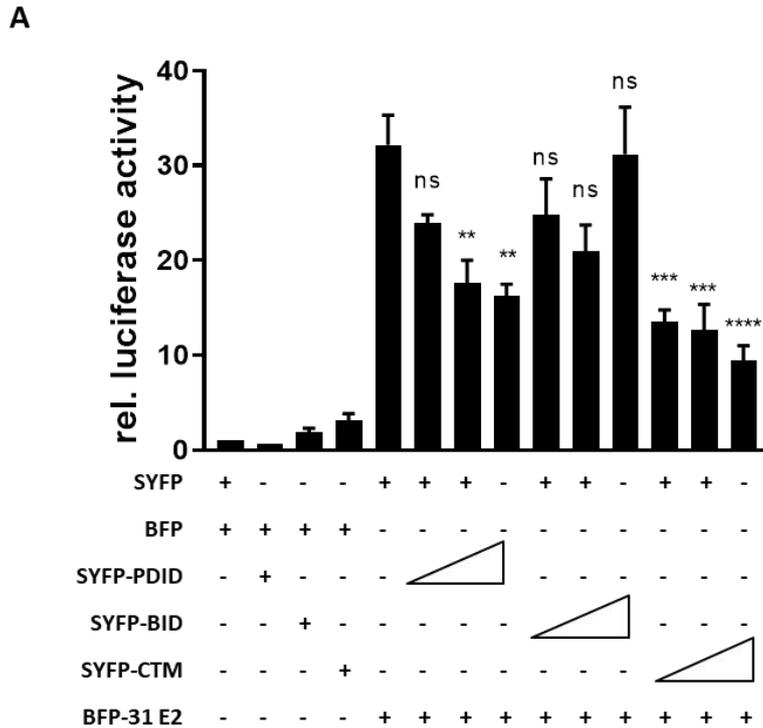


Abbildung 19: Überexpression von PDID hat einen dominant-negativen Effekt auf die E2-abhängige Transaktivierungsfähigkeit.

A) C33A-Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng des Reporterkonstrukts pC18-Sp1-Luc, 10 ng BFP-31 E2 und in steigenden Konzentrationen mit 25, 50, 100 ng SYFP-PDID, -BID und -CTM transfiziert. DNA-Mengenunterschiede wurden mit dem leeren SYFP- oder BFP-Vektor ausgeglichen. Die Luziferase-Aktivität wurde 48 h nach der Transfektion gemessen. Die Firefly-Werte wurden ins Verhältnis zu den Gaussia-Werten gesetzt. Angezeigt wird die relative Luziferase-Aktivität bezüglich des Reporters, welcher auf 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Aktivität des Reporters mit HPV31 E2. (ns $p > 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $< 0,0001$). B) Immunoblotanalyse von C33A-Zellen, die im

24 well-Format mit der doppelten DNA-Menge bezogen auf den Reporterassay (A) mit BFP-31 E2 und SYFP-PDID in aufsteigenden Mengen transfiziert wurden. Gesamtzellextrakte wurden 48 h nach der Transfektion mittels Westernblot mit Hilfe von α -RFP- und α -YFP-Antikörpern auf die Anwesenheit von 31 E2 und PDID untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle.

5.2 Die Rolle von Brd4S im Lebenszyklus von HPV31

5.2.1 Brd4S in HPV-relevanten Zelllinien

Neben der langen wird auch eine kurze Isoform von Brd4, genannt Brd4S, kodiert. Diese ist 722 Aminosäuren-lang und bis zur AS an Position 719 identisch zur Sequenz der langen Brd4-Isoform. Brd4S endet an den Positionen 720-722 mit den Aminosäuren GPA (Abbildung 20A). Das Vorhandensein einer potentiellen zweiten Interaktionsstelle zwischen Brd4 und dem viralen E2 Protein lässt vermuten, dass durch diese auch Brd4S an das E2 Protein gebunden werden kann. Mittels einer Immunoblotanalyse, für die Zellen von normalen humanen Keratinozyten (NHK), der HPV-negativen Zervixkarzinomzelllinie C33A und der HPV31-positiven Zelllinie CIN612-9E verwendet wurden, konnte spezifisch die Expression von endogenem Brd4 und Brd4S nachgewiesen werden (Abbildung 20B).

Somit sind weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Funktionsaufklärung der zweiten Interaktionsstelle beziehungsweise bezüglich des Brd4S Proteins, welches es erlaubt diese zweite Interaktionsstelle unabhängig von der CTM zu untersuchen, möglich.

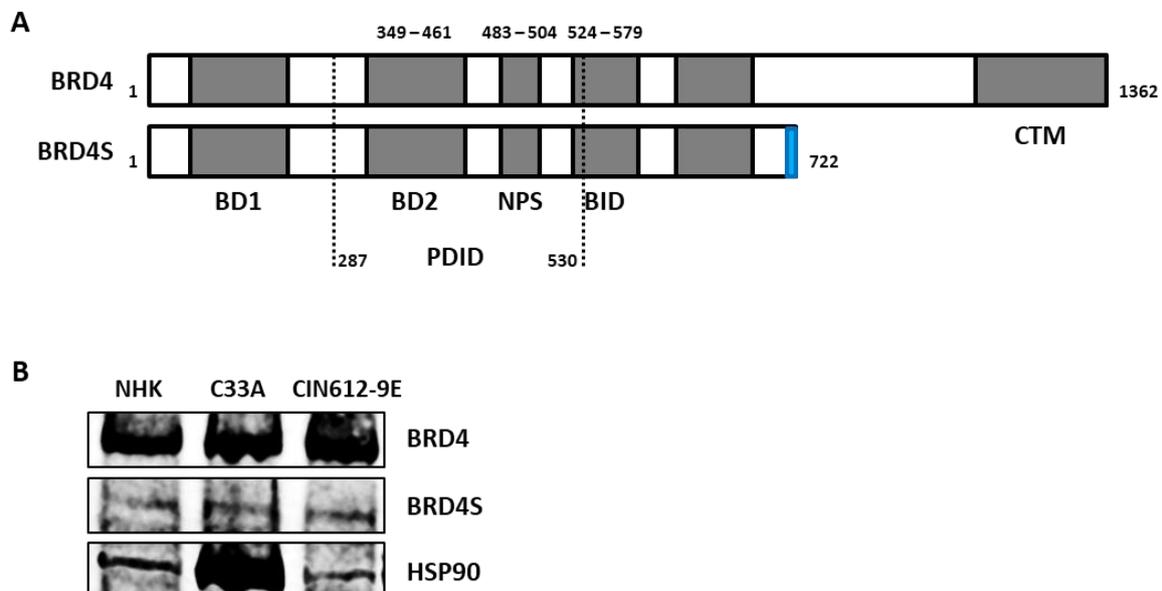


Abbildung 20: Brd4S-Expression in unterschiedlichen Zelllinien.

A) Schematische Struktur von Brd4 im Vergleich zu Brd4S, das bis zur Position 719 identisch zu Brd4 ist und sich in den Positionen 720-722 durch die Aminosäuren GPA (blau) auszeichnet. Dargestellte Domänen (grau): BD1 (Bromodomäne 1), BD2 (Bromodomäne 2; AS-Sequenz 349-461), NPS (*N-terminal cluster of phosphorylation sites*; AS-Sequenz 483-

504), BID (*basic residue-enriched interaction domain*; AS-Sequenz 524-579), PDID (*phosphorylation dependent interaction domain*; AS-Sequenz 287-530) und CTM. B) Untersuchung von normalen humanen Keratinozyten (NHK)-, C33A- und CIN612-9E-Zellen auf die Anwesenheit von Brd4S (α -Brd4 N-ter) und Brd4 (α -Brd4 C-ter). HSP90 diene als Ladekontrolle.

5.2.2 Brd4S interagiert mit HPV31 E2

Für die PDID-Domäne und das HPV31 E2 Protein konnte zuvor eine Interaktion *in vivo* mithilfe der Durchflusszytometrie-basierten FRET Analyse, als auch mit einer Ko-immunopräzipitation, nachgewiesen werden (Abbildung 10). Als Nächstes sollte untersucht werden, ob das PDID-enthaltende Brd4S-Protein auch mit dem HPV31 E2 Protein interagieren kann. Zu diesem Zweck wurden C33A-Zellen mit den Expressionsvektoren für HA-markiertes HPV31 E2 Protein und Flag-markiertem Brd4, Brd4S und Brd4dCTM transfiziert. Außerdem wurden untransfizierte und mit pSX31 E2-HA transfizierte C33A-Zellen verwendet. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Ein Teil des Zelllysats wurde als Input-Kontrolle verwendet. Die Flag-markierten Brd4-Proteine der restlichen Lysate wurden mit magnetischen α -Flag-Beads präzipitiert (IP). Die Input- und IP-Proben wurden mittels Immunoblotanalyse auf die Anwesenheit der Flag- und HA-markierten Proteine untersucht (Abbildung 21A). Mit der HPV31 E2-HA-Kontrolle wurde ausgeschlossen, dass das E2 Protein unspezifisch an die magnetischen Beads bindet. Für die präzipitierten Brd4, Brd4S und Brd4dCTM Proteine ist zu erkennen, dass HPV31 E2 ko-immunpräzipitiert wurde, wenn auch die Banden für Brd4S und Brd4dCTM schwächer sind. Des Weiteren wurde die Interaktion im FACS-basierten FRET Assay mit N- und C-terminal-markierten SYFP-Brd4S und BFP-HPV31 E2 Proteinen in lebenden C33A-Zellen getestet. Trotz ausreichender Expression von Brd4S (Abbildung 21B) zeigte keine der getesteten Kombinationen ein positives FRET-Signal (hier nicht gezeigt).

Trotz der negativen FACS-FRET Daten konnte mit den Ergebnissen der Ko-Immunopräzipitation eine Interaktion zwischen Brd4S und HPV31 E2 nachgewiesen werden. Das nicht vorhandene FRET-Signal ist kein Ausschlusskriterium für einen Interaktionsnachweis, da beispielsweise die Bildung eines Förster-Radius Konformationsbedingt verhindert sein kann.

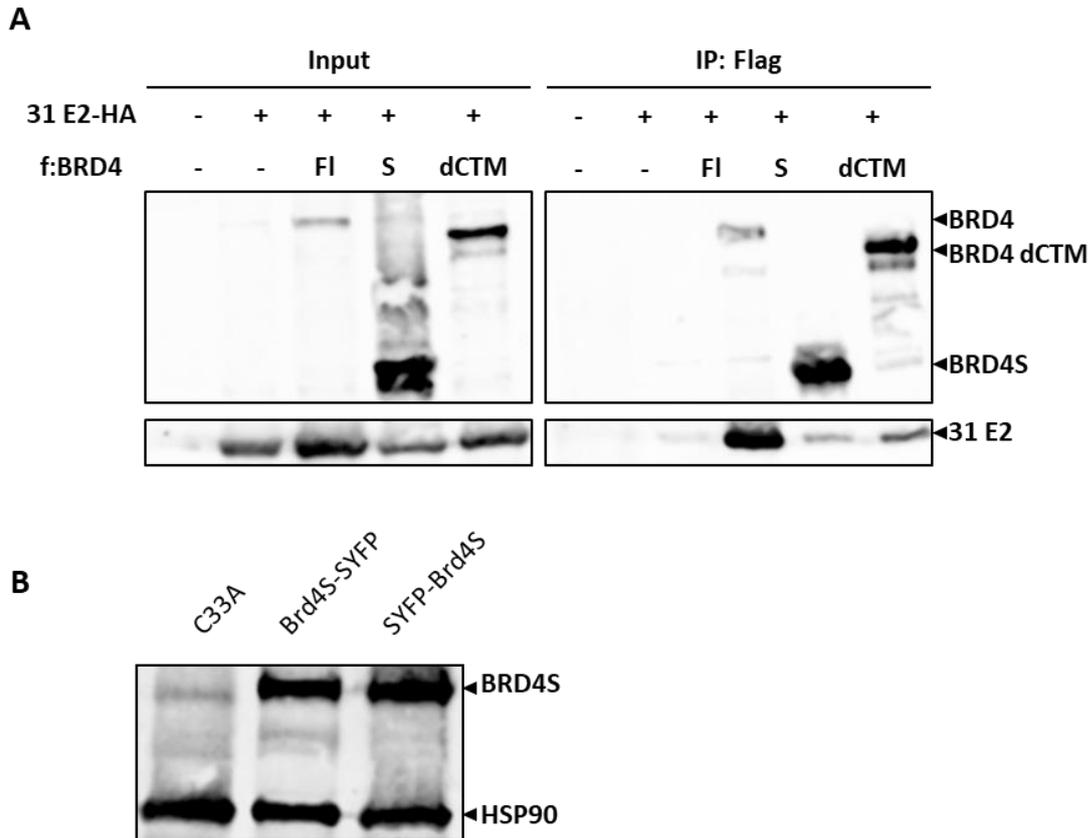


Abbildung 21: Nachweis der Interaktion von Brd4S mit HPV31 E2.

A) C33A-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für HA-markiertes 31 E2 Protein transfiziert, zusätzlich mit Expressionplasmiden für Flag-getaggetes Brd4, Brd4S und Brd4dCTM kotransfiziert oder untransfiziert analysiert. Als Input-Kontrolle wurden 10% des Zelllysats verwendet. Der restliche Zellextrakt wurde mit magnetischen α -Flag-Beads immunpräzipitiert. Mit Hilfe der Immunoblotanalyse wurden die Proben auf die Anwesenheit von Brd4, Brd4S, Brd4dCTM (α -Flag) und HPV31 E2 (α -HA) überprüft. B) Immunoblotanalyse von SYFP-Brd4S und Brd4S-SYFP. 48 h nach der Transfektion der Brd4S-Expressionsplasmide (1 μ g) wurden die C33A-Zellen geerntet. Die Gesamtzelllysate wurden auf ihre Anwesenheit von SYFP-markiertem Brd4S mit α -YFP Antikörpern untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle.

5.2.3 Hinweis auf Brd4S Homo- und Heterodimere

In Abschnitt 5.1.11 wurde gezeigt, dass die Bromodomäne 2 (BD2) und die Sequenzregion 505-530 die Dimerisierung der PDID-Domäne vermittelt. Um die Dimerisierungsfähigkeit von Brd-Proteinen weiter zu untersuchen, wurden C33A-Zellen, die mit Expressionsplasmiden für BFP-Brd4S und SYFP-Brd4S bzw. SYFP-Brd4 transfiziert wurden, auf Interaktionssignale hin untersucht. Die Analyse nach 48 Stunden im FACS-FRET zeigte für die Kombination Brd4S-Brd4S, dass 32% der untersuchten Zellen FRET positiv waren und 31% für die Brd4S-Brd4-Kombination (Abbildung 22A). Zudem sollte in einer Ko-Immunopräzipitation das Vorhandensein von endogenen Brd4S-Brd4-Komplexen überprüft werden. Die Input-Probe

Um die Funktion von Brd4S im Kontext des PV-Lebenszyklus zu untersuchen wurden vier verschiedene siRNAs gegen Brd4S (3'UTR) in HPV31-positiven Zellen (CIN612-9E) getestet. Die vier mithilfe von Online-Tools konstruierten siRNAs siBrd4S-1, siBrd4S-2, siBrd4S-3, siBrd4S und eine siRNA-Kontrolle wurden in C33A-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und die relative Transkriptmenge von Brd4S mittels qPCR bestimmt. Die beiden siRNAs siBrd4S-1 und -2 reduzierten die Brd4S-Transkriptmenge jeweils um 71% bzw. 66%. Die siRNA siBrd4S-3 zeigte keine Knockdown-Effizienz. Die beste Effizienz für einen Knockdown von Brd4S zeigte siBrd4S mit 87% (Abbildung 23A). Um zu analysieren, ob die Reduktion des Brd4S Proteins Auswirkungen auf die Expression der viralen Transkripte hat, wurden gleichzeitig die Mengen der viralen Splice-Produkte E4^{L1}, E1^{E4}, E8^{E2} und E6* von HPV31 gemessen. Keine der verwendeten siRNAs hatte nach 48 Stunden einen signifikanten Effekt auf die Expression der viralen Transkripte. Auch für die Transkriptmenge von Brd4 ergab sich keine signifikante Veränderung (Abbildung 23B; getestet mit zweiseitigem Anova-Test). Da nach 48 Stunden keine Veränderung der viralen Transkripte festzustellen war, sollten im nächsten Schritt 72 Stunden nach siRNA-Transfektion die Transkriptmengen gemessen werden. Hierfür wurden erneut CIN612-9E-Zellen mit der siRNA siBrd4S, welche die höchste Signifikanz in der Reduktion der Brd4S-Menge aufwies (berechnet mit einseitigem Anova-Test; **** $p < 0,0001$), transfiziert. Nach drei Tagen war die Transkriptmenge für Brd4S um 78% reduziert, was aber keinen signifikanten Einfluss auf die viralen Transkripte E1^{E4}, E8^{E2} und E6* hatte. Interessanterweise war das HPV31 E4^{L1} Transkript um das 33-fache erhöht. Dieser Effekt war unabhängig von einer Veränderung der Brd4-Menge (Abbildung 23C). Die Immunoblotanalyse in Abbildung 23D bestätigte die Knockdown-Effizienz der siRNA siBrd4S auch auf Proteinebene, wobei die Proteinmenge von Brd4 in CIN612-9E-Zellen unverändert blieb.

Diese Daten legen nahe, dass Brd4S vermutlich im Kontext replizierender HPV-Genome einen reprimierenden Effekt hat auf die späte E4^{L1}-Transkription haben könnte.

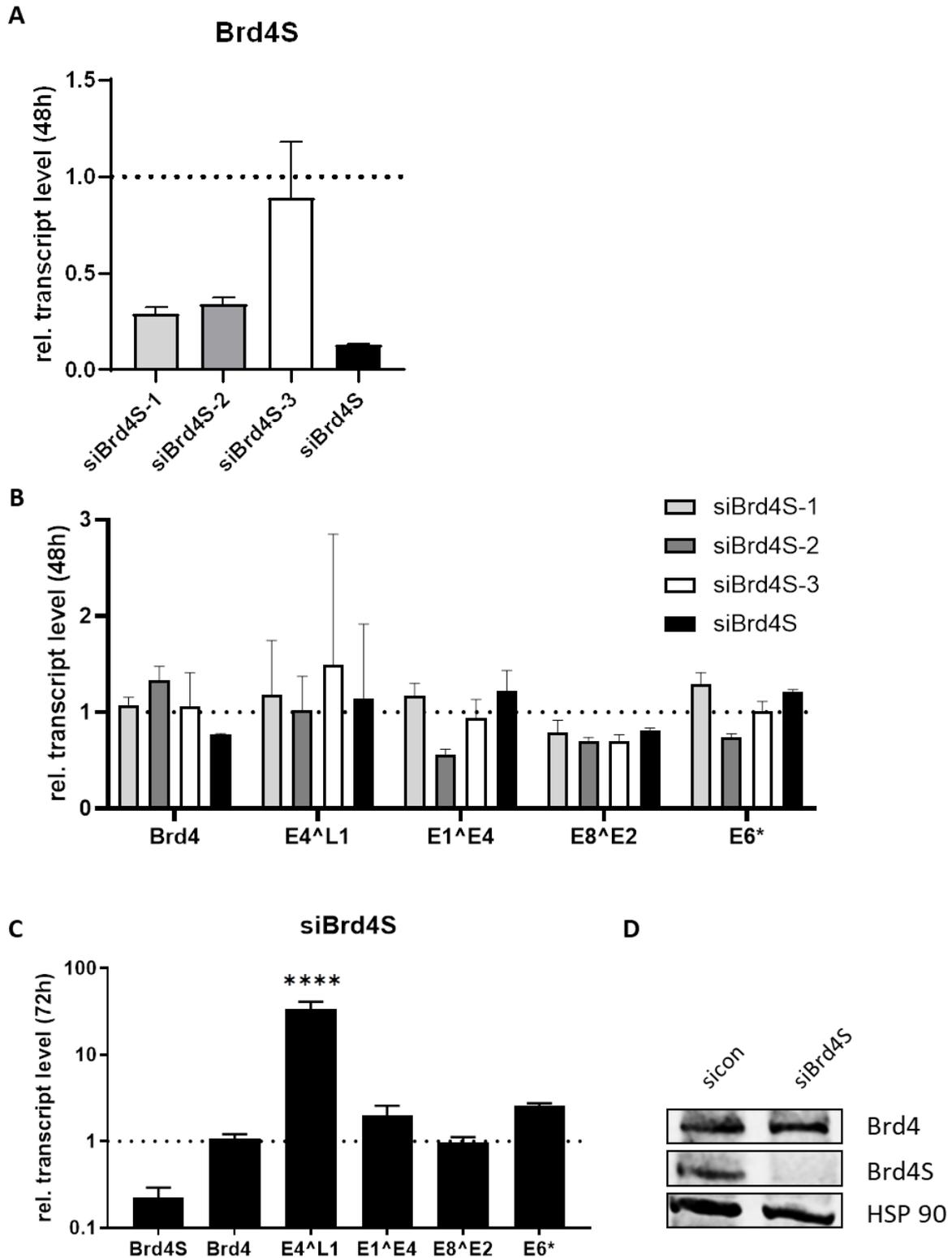


Abbildung 23: siRNA-basierter Knockdown von Brd4S führt zu einer erhöhten HPV31 E4^{L1} Expression.

A) CIN612-9E-Zellen wurden mit vier verschiedenen siRNAs (90 pmol) gegen Brd4S transfiziert. 48 h nach der siRNA-Transfektion wurde die RNA mittels qRT-PCR auf die relativen Transkriptmengen von Brd4S untersucht. B) Die RNA, der in A) beschriebenen Ansätze wurde auf die Expression der viralen Transkripte E4^{L1}, E1^{E4}, E8^{E2}, E6* von HPV31 und die Expression von Brd4 untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als

Referenz bezogen auf die siRNA-Kontrolle (=1). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten beziehungsweise für die Expression von Brd4 von zwei unabhängigen Experimenten. C) CIN612-9E-Zellen wurden mit siBrd4S (90 pmol) transfiziert. Die RNA wurde 72 h nach der Transfektion auf die Expression von Brd4S, Brd4 und der angegebenen viralen Transkripte analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als Referenz bezogen auf die siRNA-Kontrolle (=1). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen ANOVA mit Sidak Test ermittelt (**** $p < 0,0001$). D) Immunoblotanalyse von CIN612-9E-Zellen, die mit 90 pmol siBrd4S transfiziert wurden. Gesamtzellextrakte wurden 72 h nach der Transfektion mittels Westernblot mit Hilfe des α -Brd4 (N-ter) – und α -Brd4 (C-ter) – Antikörpers untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle.

5.2.5 Brd4S reguliert nicht die Expression der viralen Transkripte in differenzierten CIN612-9E-Zellen

Da der virale Lebenszyklus von der Differenzierung von Keratinozyten abhängig ist, sollte als Nächstes überprüft werden, welche Folgen der Knockdown von Brd4S in differenzierten CIN612-9E-Zellen hat. Für die Untersuchung des produktiven Lebenszyklus von humanen Papillomviren wurden die HPV31-positiven CIN612-9E-Zellen in Methylcellulose kultiviert, was zu einer Aktivierung des späten Promotors, der Transkription später viraler Gene und Genom-Amplifikation führt [115]. Die mit siBrd4S transfizierten Zellen wurden einen Tag später hierfür in eine 1,5%ige Methylcellulose-Suspension überführt. Gleichzeitig wurden undifferenzierte CIN612-9E-Zellen mitgeführt. Achtundvierzig Stunden nach der Differenzierung wurden die differenzierten und undifferenzierten Zellen geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qPCR wurden die Brd4S-Mengen und die Mengen der viralen Transkripte bestimmt. Beim Vergleich der differenzierten zu den undifferenzierten CIN612-9E-Zellen zeigte sich eine ungefähr 1800-fach erhöhte Expression von E4^{L1}, 12-fache Induktion von E1^{E4}, 1,6-fache Induktion von E8^{E2} sowie eine 2-fache Induktion von E6*. Die erhöhte Expression der viralen Transkripte weist somit auf eine erfolgreiche Induktion von differenzierungs-abhängigen Ereignissen im viralen Lebenszyklus hin. Des Weiteren wurde auch die Expression von Brd4S um das 3-fache in differenzierten Zellen induziert (Abbildung 24). Die Reduktion der Brd4S-Transkriptmenge um 80% jedoch, bewirkte keine Veränderung in der Expression der viralen Transkripte E4^{L1}, E1^{E4}, E8^{E2} und E6*.

Zusammengefasst deuten die Daten für undifferenzierte Zellen daraufhin, dass die Brd4S-Expression einen reprimierenden Effekt hat, in differenzierten CIN612-9E-Zellen jedoch keine Rolle spielt.

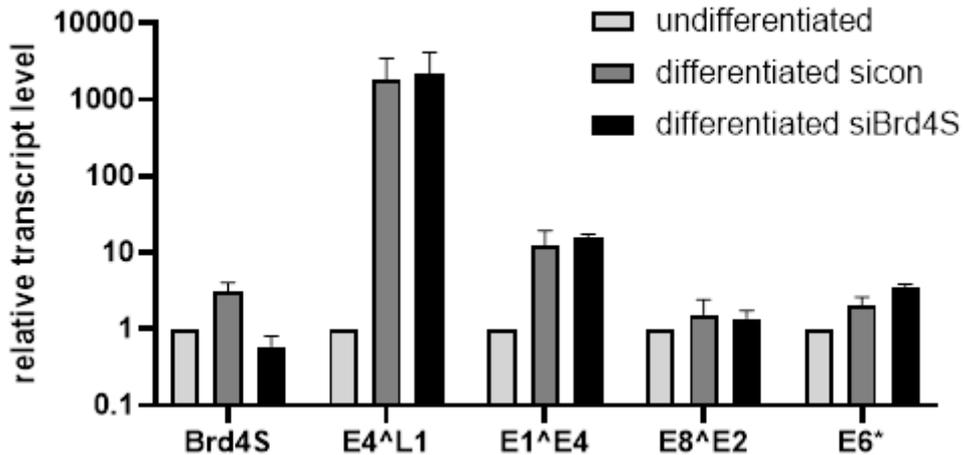


Abbildung 24: Knockdown von Brd4S beeinflusst die Expression der viralen Transkripte in differenzierten CIN612-9E-Zellen nicht.

90 pmol von siBrd4S wurden in CIN612-9E transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 h in 1,5% Methylcellulose – Lösung differenziert. Für jeden Ansatz wurde eine undifferenzierte Kontrolle mitgeführt. Die RNA, die nach insgesamt 72 h geernteten Zellen wurde auf die Expression von E4^{L1}, E1^{E4}, E8^{E2}, E6^{*} untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH bezogen auf die undifferenzierte siRNA-Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten.

5.2.6 CrisprCas-vermittelter Knockdown von Brd4S

Im Gegensatz zur Transfektion von siRNAs und dem damit verbundenen transienten Knockdown, sollten alternativ mithilfe des CrisprCas-Systems stabile CIN612-9E-Zelllinien generiert werden. Aufgrund eines Knockouts kann bei diesen Zellen das Brd4S Protein nicht mehr exprimiert werden. Dies macht es möglich die Funktion von Brd4S in Bezug auf den gesamten Lebenszyklus von HPV31 besser untersuchen zu können. Zu diesem Zweck wurden CIN612-9E-Zellen mit einem lentiviralen System transduziert, welches den CrisprCas-Expressionsvektor mit der darin enthaltenen gRNA-Sequenz A (BRD4S-ex12-SA_A) oder B (BRD4S-ex12-SA_B) enthält. Die gRNA-Sequenzen A und B sind gegen die *Splice-Site* gerichtet, welche dafür sorgt, dass die alternative Isoform Brd4S entsteht [90]. Als Kontrolle wurden CIN612-9E-Zellen mit dem plentiCRISPR v2 transduziert. Die nach der Antibiotika-Selektion generierten Zellen wurden geerntet und auf Protein- und Transkriptebene auf ihre Brd4S-Menge hin untersucht. Für die Zellen, die in der ersten Passage geerntet wurden, konnte man in der Immunoblotanalyse eine reduzierte Menge an Brd4S erkennen. Die Menge an Brd4 wurde dadurch nicht beeinträchtigt (Abbildung 25A; p1). Die Abnahme der Brd4S-Menge konnte auch mithilfe der qPCR-Analyse bestätigt werden, die eine Reduktion von 31% (A) und 50% (B) detektierte (Abbildung 25A; p1). Sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene wurde überraschenderweise für die weiter

passagierten Zellen deutlich, dass der CrisprCas-induzierte Knockdown von Brd4S nicht stabil war (Abbildung 25A und B; p2).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht in allen CIN612-9E-Zellen ein Knockdown von Brd4S erreicht werden konnte, so dass vermutlich in den weiteren Passagen jene Zellen mit funktionsfähigem Brd4S die Knockout-Zellen überwachsen konnten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Knockdown lediglich ein Allel betraf, so dass in der nächsten Passage die verringerte Brd4S-Menge durch das funktionelle Allel kompensiert werden konnte. Beide Möglichkeiten deuten darauf hin, dass Brd4S, ähnlich wie Brd4, ein wichtiger Transkriptions- und Chromatinmodulator ist.

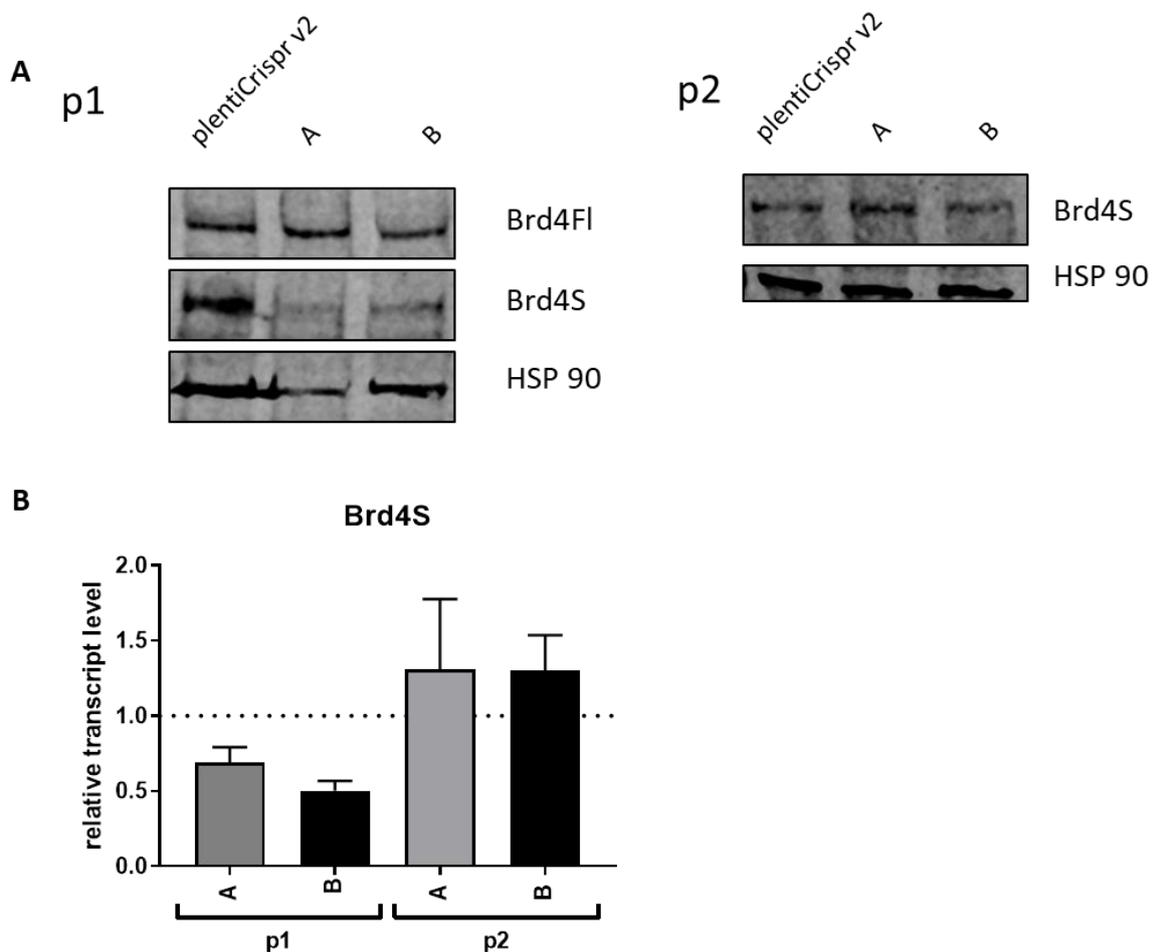


Abbildung 25: CrisprCas-vermittelter Knockdown von Brd4S in CIN612-9E-Zellen ist nicht stabil.

A) Immunoblotanalyse von CIN612-9E-Zellen, die mit plentiCrisprv2 (Leervektor), plentiCrispr BRD4S-ex12-SA_A (A) oder plentiCrispr BRD4S-ex12-SA_B (B) enthaltenden Lentiviren infiziert wurden. Links wird der Western Blot von Zellen gezeigt, die nach der Puromycin-Selektion untersucht wurden (Passage 1 – p1) und rechts nach einmaligen Passagieren der Zellen (p2). Mit Hilfe des α -Brd4 (N-ter) –Antikörpers wurde die Expression von Brd4 und Brd4S untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle. B) Relative Brd4S-mRNA-

Expression in CIN612-9E-Zellen mit CrisprCas-vermitteltem Knockdown von Brd4S. P1 fasst vier unabhängige Experimente von Zellen zusammen, die eine Woche nach der Antibiotika-Selektion (n=2) bzw. unmittelbar nach der Selektion (n=2) geerntet wurden. P2 beinhaltet die Daten der zwei unabhängigen Experimente, die nach einer Woche nach der Selektion untersucht wurden. Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als Referenz bezogen auf CIN612-9E-Zellen, die mit dem plentiCrisprv2 – Leervektor infiziert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den SEM an.

5.2.7 CrisprCas-vermittelter Knockdown von Brd4S führt zur erhöhten Expression von HPV31 E4^{L1}-Transkripten

Wenngleich keine Etablierung stabiler Zelllinien mit Brd4S Knockdown in CIN612-9E-Zellen möglich war, wurden die in Abschnitt 5.2.6 analysierten Zellen (p1) mittels qPCR auf die Expression der viralen Transkripte E4^{L1}, E1^{E4}, E8^{E2} und E6* von HPV31 untersucht. Beim Vergleich von CIN612-9E-Zellen, die mithilfe von plentiCrispr BRD4S-ex12-SA_A (A) oder plentiCrispr BRD4S-ex12-SA_B (B) enthaltenden Lentiviren transduziert wurden, ergab sich für Zelllinie A eine nicht-signifikante 2,3-fache Erhöhung der E4^{L1}-Transkripte im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Die Induktion für Zelllinie B betrug das 2,6-fache und war signifikant. Für die übrigen viralen Splice-Produkte E1^{E4}, E8^{E2} und E6* konnten keine signifikanten Veränderung in der Transkriptmenge festgestellt werden (Abbildung 26A). Ergänzend wurde untersucht, ob die CIN612-9E-Zellen mit 31% (für A) und 50% (für B) verringerter Brd4S-Transkriptmenge Unterschiede in der viralen Genomkopienzahl aufweisen. Im Anschluss zur Aufreinigung der zellulären DNA wurde die Anzahl an HPV31-Kopien pro Zelle mittels einer Multiplex qRT-PCR bestimmt. Die Genomkopienzahl schwankte zwischen den verschiedenen Ansätzen zwischen 629 und 672 Kopien pro Zelle. Es konnten keine signifikanten Unterschiede erfasst werden (Abbildung 26B).

Diese Daten zeigen, dass Brd4S vermutlich keine wesentliche Rolle in der Replikation von undifferenzierten CIN612-9E-Zellen spielt. Ebenso scheint Brd4S nicht in die virale transkriptionelle Aktivität differenzierter Zellen involviert zu sein. Doch für die Expression von viralen Transkripten in undifferenzierten CIN612-9E-Zellen kann zusammengefasst werden, dass unter der Verwendung von zwei unterschiedlichen methodischen Ansätzen mit dem Ziel einen Brd4S Knockdown zu erzeugen, erhöhte E4^{L1}-Mengen gemessen werden konnten.

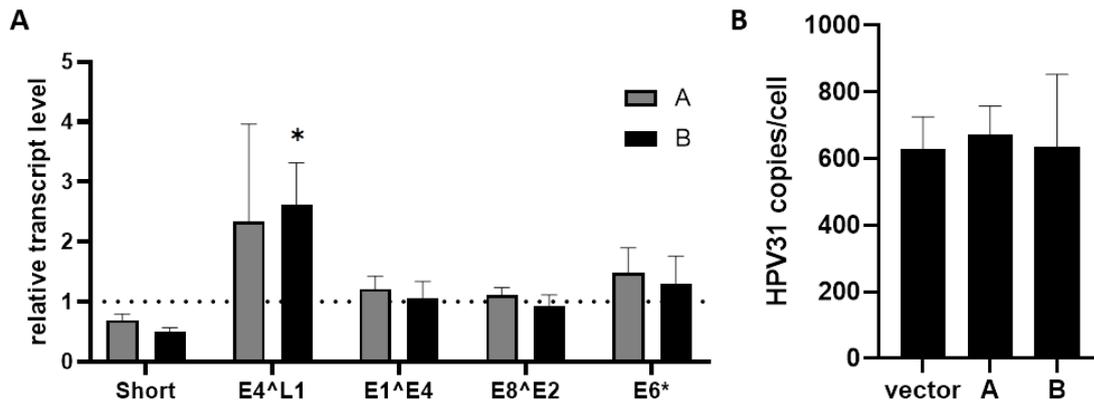


Abbildung 26: Crispr-vermittelter Brd4S-Knockdown zeigt erhöhte HPV31 E4^{L1}-Expression, aber keinen Unterschied in der Genomkopienzahl.

A) Für die RNA, die in Abbildung 25B) (p1) zusammengefassten vier unabhängigen Experimente, wurde die Expression der viralen Transkripte E4^{L1}, E1^{E4}, E8^{E2}, E6* von HPV31 untersucht. Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als Referenz bezogen auf CIN612-9E-Zellen, die mit dem plentiCrisprv2 – Leervektor infiziert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den SEM an. Die statistische Signifikanz wurde mit einem zweiseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt (* p<0,05). B) CIN612-9E-Zellen wurden mit plentiCrisprv2 (vector), plenti CRISPR BRD4S-ex12-SA_A (A) oder plenti CRISPR BRD4S-ex12-SA_B (B) enthaltenden Lentiviren infiziert. Gesamtzelluläre DNA wurde eine Woche nach der Puromycin-Selektion aus diesen isoliert. 20 ng der isolierten DNA wurden mit einer Multiplex qRT-PCR analysiert. Dargestellt werden die E2 Kopien von HPV31 pro zwei beta-Aktin Kopien. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von zwei unabhängigen Experimenten.

5.2.8 Brd4S Knockdown führt zu einer erhöhten Aktivität der E2-abhängigen Transaktivierung

In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass Brd4S und das HPV31 E2 Protein interagieren können. Um zu analysieren, ob Brd4S einen Einfluss auf E2-abhängige Aktivitäten hat, wurde siBrd4S in C33A-Zellen transfiziert. Die Konsequenz des Brd4 Knockdowns für E2—abhängige Aktivitäten sollte mithilfe eines Reporterassays aufgeklärt werden. Die siBrd4S-Transfektion führte nach 72 Stunden in C33A-Zellen zu einer Reduktion der Brd4S-mRNA um 84% (Abbildung 27A). Die Reduktion in der Brd4S-Menge konnte ergänzend in einer Immunoblotanalyse nachgewiesen werden (Abbildung 27B). Der Knockdown von Brd4S hatte keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Brd4-mRNA-Menge zur Folge (Abbildung 27A). Relativ zur HSP90-Menge gesehen war das auch für die Brd4-Proteinexpression festzustellen (Abbildung 27B). Für die Reporterassay-Analyse wurden 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion das Reporterplasmid pC18-SP1-Luc und das Expressionsplasmid für BFP-HPV31 E2 transfiziert. Die gemessenen Firefly-Werte des pC18-Reporters wurden auf die der Gaussia-Luziferase normalisiert. Im Vergleich zur siRNA-Kontrollbehandlung zeigte sich 48 Stunden nach der DNA-Transfektion für siBrd4S

eine 5,3-fach erhöhte Aktivierung des E2-abhängigen Reporters (Abbildung 27C). Diese Aktivierung konnte durch die Zugabe eines Expressionsplasmids von Brd4S, welches die Zielsequenz der siRNA nicht enthält, wieder aufgehoben werden.

Die Ergebnisse des siRNA-vermittelten Knockdowns führen zu dem Schluss, dass Brd4S eine reprimierende Wirkung auf die HPV31 E2-vermittelte transkriptionelle Aktivität hat.

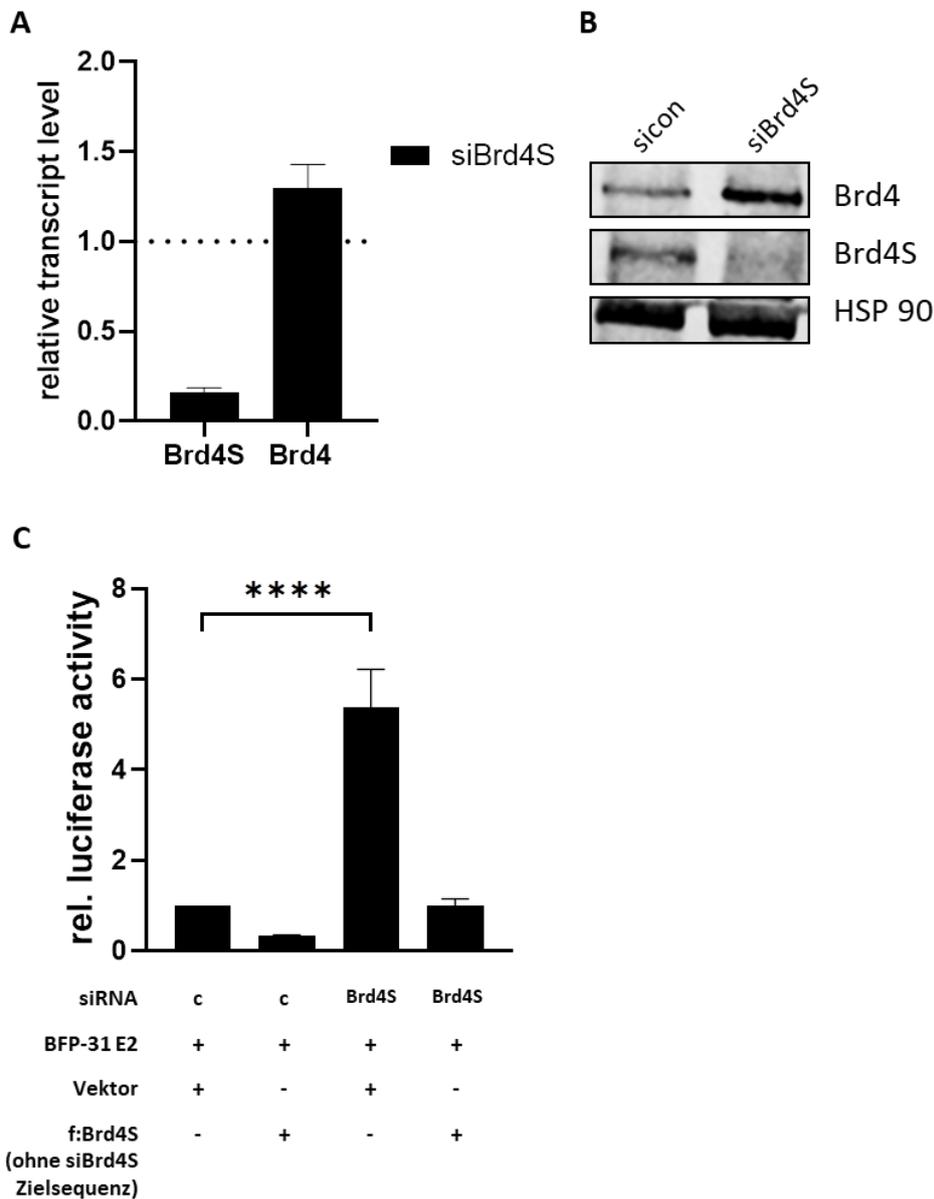


Abbildung 27: siRNA-vermittelter Knockdown von Brd4S führt zu einer erhöhten Aktivität des E2-abhängigen Reporters pC18-SP1-Luc.

A) C33A wurden mit siRNA gegen Brd4S (90 pmol) transfiziert und nach 72 h analysiert. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von Brd4 und Brd4S analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mit GAPDH als Referenz bezogen auf die siRNA-Kontrolle (=1). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten. B) Immunoblotanalyse von C33A-Zellen, die mit 90 pmol siBrd4S transfiziert wurden. Gesamtzellextrakte wurden 72 h nach der Transfektion mittels

Westernblot mit Hilfe des α -Brd4 (N-ter) – und α -Brd4 (C-ter) – Antikörpers untersucht. HSP90 diente als Ladekontrolle. C) C33A-Zellen wurden je mit 15 pmol der siRNA-Kontrolle (c) oder siBrd4S (Brd4S) transfiziert. Nach 24 h wurde 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng des Reporterkonstrukts pC18-Sp1-Luc, 10 ng BFP-31 E2, 100 ng des Expressionsvektors für Brd4S und gegebenenfalls für ein ausgeglichenes DNA-Mengenverhältnis 100 ng des pcDNA3.1-Vektors transfiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde 72 h nach der siRNA-Transfektion gemessen. Die Firefly-Werte wurden ins Verhältnis zu den Gaussia-Werten gesetzt. Angezeigt wird die relative Luziferase-Aktivität bezüglich der Aktivität des Reporters mit 31 E2 und der KontrollsiRNA (=1). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von mindestens drei unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt (**** $p < 0,0001$).

5.2.9 Verringerte Aktivität von E2 und E1/E2-abhängigen Reportern mit der Koexpression von Brd4S

Eine Reduktion der Brd4S-Menge führte zu einer Induktion der Aktivität des E2-abhängigen Reporters. Zusätzlich wurden die Folgen einer Koexpression von Brd4S in aufsteigenden Mengen in einem Transaktivierungs- und Replikations-Reporterassay mit HPV31 E2 untersucht. Für C33A-Zellen, die mit dem pC18-Sp1-Luc-Plasmid transfiziert wurden, wurde eine 52-fach erhöhte Aktivität des Reporters mit HPV31 E2 gemessen. Die Kotransfektion mit dem Expressionsvektor für Brd4S in steigenden Mengen führte bei 25 ng und 50 ng zu einer signifikanten Repression der E2-vermittelten Aktivität jeweils um das 4- und 8,7-fache. Die BID-Domäne, von welcher keine Interaktion mit dem HPV31 E2 Protein nachgewiesen werden konnte, zeigte keine signifikanten Effekte (Abbildung 28A). Ein ähnlicher Phänotyp wurde für C33A-Zellen gefunden, die mit dem pGL31URR –Luc-Reporterplasmid transfiziert wurden. Die Aktivität des Reporterplasmids wurde mit der Transfektion der Expressionsvektoren für HPV31 E1 und E2 um das ca. 160-fache im Vergleich zur Kontrollbehandlung induziert. Die Kotransfektion mit 25 ng, 50 ng und 100 ng des Expressionsvektors für Brd4S führte auch hier zu einer signifikanten Repression der E1/E2-abhängigen Reporteraktivität um das 2,7-, 2,9- und 3,4-fache, was für die BID-Domäne erneut nicht der Fall war (Abbildung 28B).

Mit diesen Daten wird veranschaulicht, dass Brd4S einen reprimierenden Effekt auf die E2-abhängige Transkription und Replikation hat. Darüber hinaus liegt es in Anbetracht dieser Daten und den Analysen im Gesamtgenom-Kontext in HPV31 positiven Zellen nahe, dass Brd4S ein negativer Regulator auf mehreren Ebenen des Lebenszyklus von HPV31 ist.

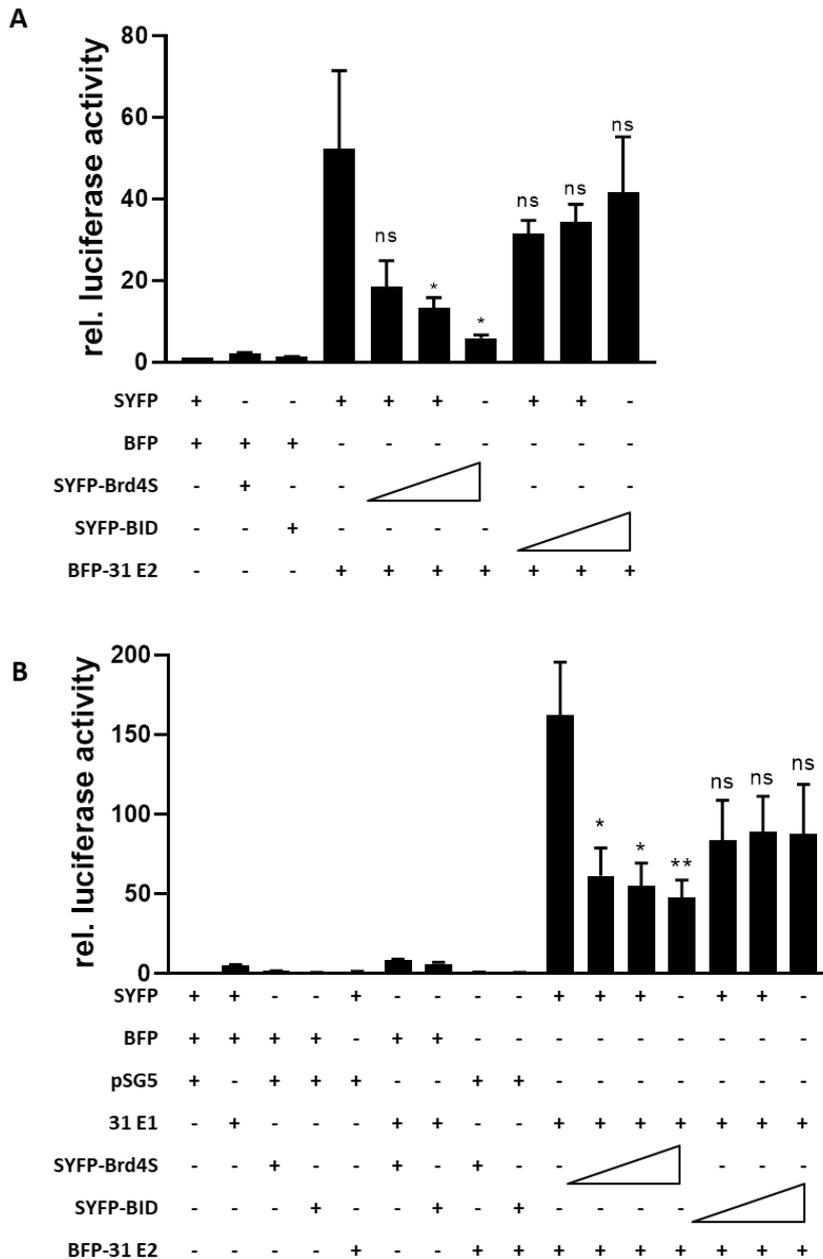


Abbildung 28: Überexpression von Brd4S hat einen dominant-negativen Effekt auf die E2-abhängige Transaktivierungsfähigkeit.

A) C33A-Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng des Reporterkonstrukts pC18-Sp1-Luc, 10 ng BFP-31 E2 und in steigenden Konzentrationen mit 25, 50, 100 ng SYFP-Brd4S und –BID transfiziert. DNA-Mengenunterschiede wurden mit dem leeren SYFP- und/oder BFP-Expressionsvektoren ausgeglichen. Im Unterschied zu A) wurde für B) 50 ng des pGL31URR –Luc-Reporterplasmids transfiziert. Zusätzlich erfolgte eine Kotransfektion mit dem Expressionsvektor für 31 E1 (100 ng) bzw. dem pSG5-Leervektor (100 ng). Die Luziferase-Aktivität wurde 48 h nach der Transfektion gemessen. Die Firefly-Werte wurden ins Verhältnis zu den Gaussia-Werten gesetzt. Angezeigt wird die relative Luziferase-Aktivität bezüglich des Reporters, welcher auf 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM; *standard error of the mean*) von mindestens vier unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt (ns $p > 0,05$;

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Die Signifikanzen beziehen sich auf die Aktivität des Reporters mit HPV31 E2.

5.2.10 Brd4S wird in HPV31 E1/E2-positive nukleäre Foci rekrutiert

Um den Einfluss von Brd4S bezüglich des HPV-Lebenszyklus eingehender zu untersuchen, wurden Kolokalisationsanalysen mittels Immunofluoreszenzfärbungen durchgeführt. C33A-Zellen wurden hierzu mit oder ohne die HPV31 URR einzeln oder in verschiedenen Kombinationen mit den Expressionsvektoren für das virale E1 Protein, für das virale E2 Protein, für Brd4 oder für Brd4S transfiziert. Die Immunofluoreszenzfärbung erfolgte nach 48 Stunden. Exemplarisch werden repräsentative Einzelausschnitte für die jeweiligen Konditionen gezeigt. Die Expression jeweils von E1 und E2 allein führen zu einem diffusen Immunofluoreszenzsignal, wohingegen sich Brd4 und Brd4S in nukleären Foci befinden [130, 131]. Die Koexpression von E1 und E2 führt bekanntermaßen zu Bildung von viralen Replikationsfoci, die sich in C33A-Zellen mit der Präsenz des viralen Replikationsursprungs vergrößern [131, 132] (Abbildung 29A und B).

Die Überexpression von Brd4 in den C33A-Zellen führte zu einer strukturierten Verteilung des HPV31 E2 Proteins, was teilweise zu einer Kolokalisation führte, die unabhängig von der HPV31 URR war (Abbildung 30A; Zeile 1, 2). Im Vergleich dazu zeigte sich für die Überexpression von Brd4S mit und ohne den Replikationsursprung ein diffuseres Signal für E2 und deutlich weniger Signalüberlagerungen von E2 und Brd4S (Abbildung 30B; Zeile 5, 6). Eine deutlichere Kolokalisation von Brd4 und ebenso von Brd4S mit E2 wird durch die zusätzliche Überexpression des Replikationsproteins E1 erreicht. Dies ist auch für die jeweiligen Kombinationen mit dem zusätzlichen Replikationsursprung zu beobachten (Abbildung 30A und B; Zeile 3, 4, 7, 8).

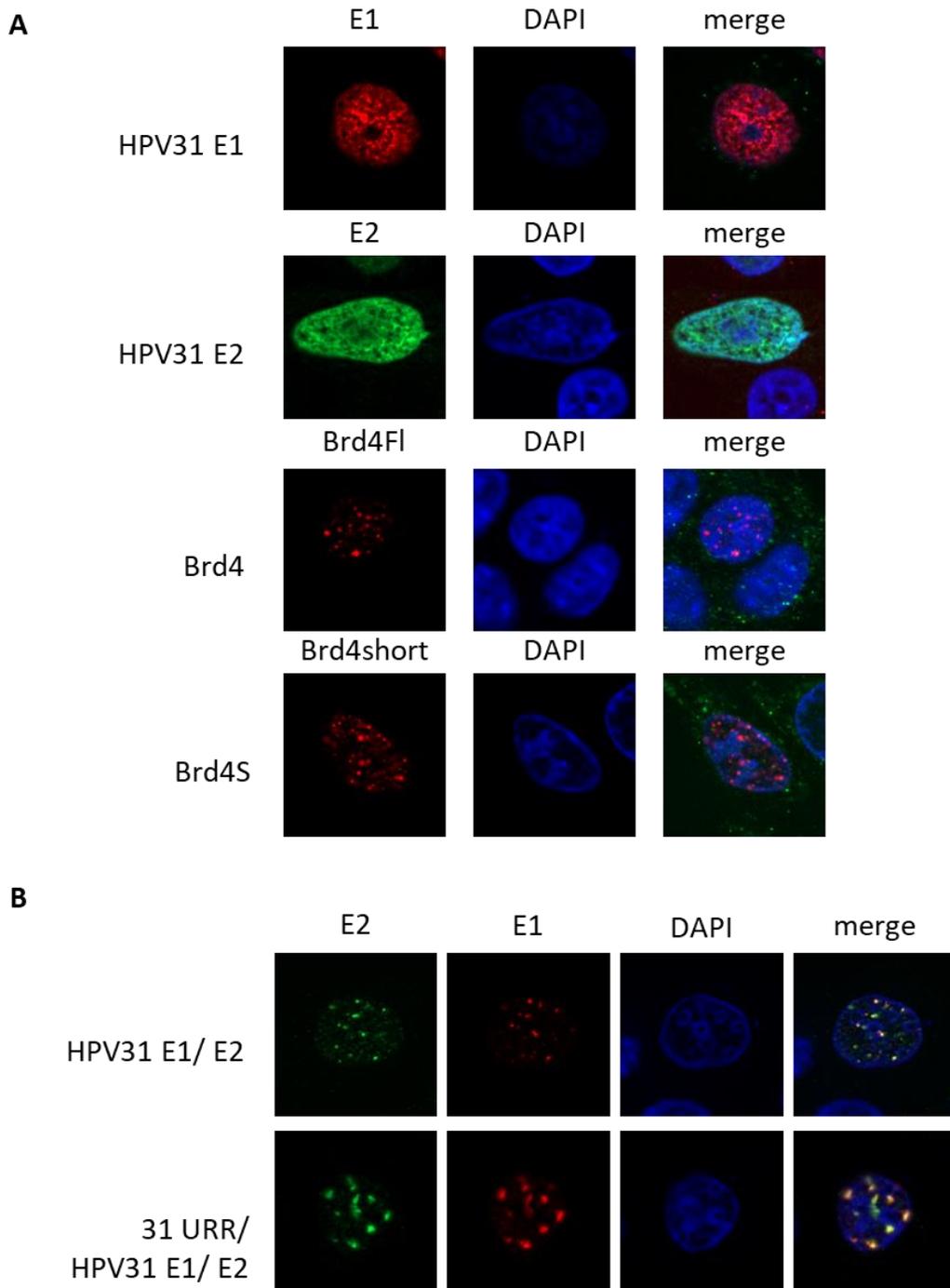


Abbildung 29: Intrazelluläre Lokalisation von HPV31 E1 und/oder E2, Brd4 und Brd4S. A) C33A-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für HPV31 E1 (500 ng pCMV neo 31E1 – 3xflag), für HPV31 E2 (50 ng pSX31E2 – HA), für Brd4 (700 ng pcDNA3-flag Brd4) und für Brd4S (500 ng pcDNA3-flag Brd4S) transfiziert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie und dem α -Flag und α -HA Antikörper wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion untersucht. Der Zellkern wurde durch den DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. B) C33A-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren (siehe A) für HPV31 E1 und E2 jeweils mit/ohne die virale URR (500 ng pGL31URR-Luc) kotransfiziert. Untersucht wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Hierfür wurden α -Flag und α -HA Antikörper verwendet. Der Zellkern wurde durch den DNA-Farbstoff DAPI angefärbt.

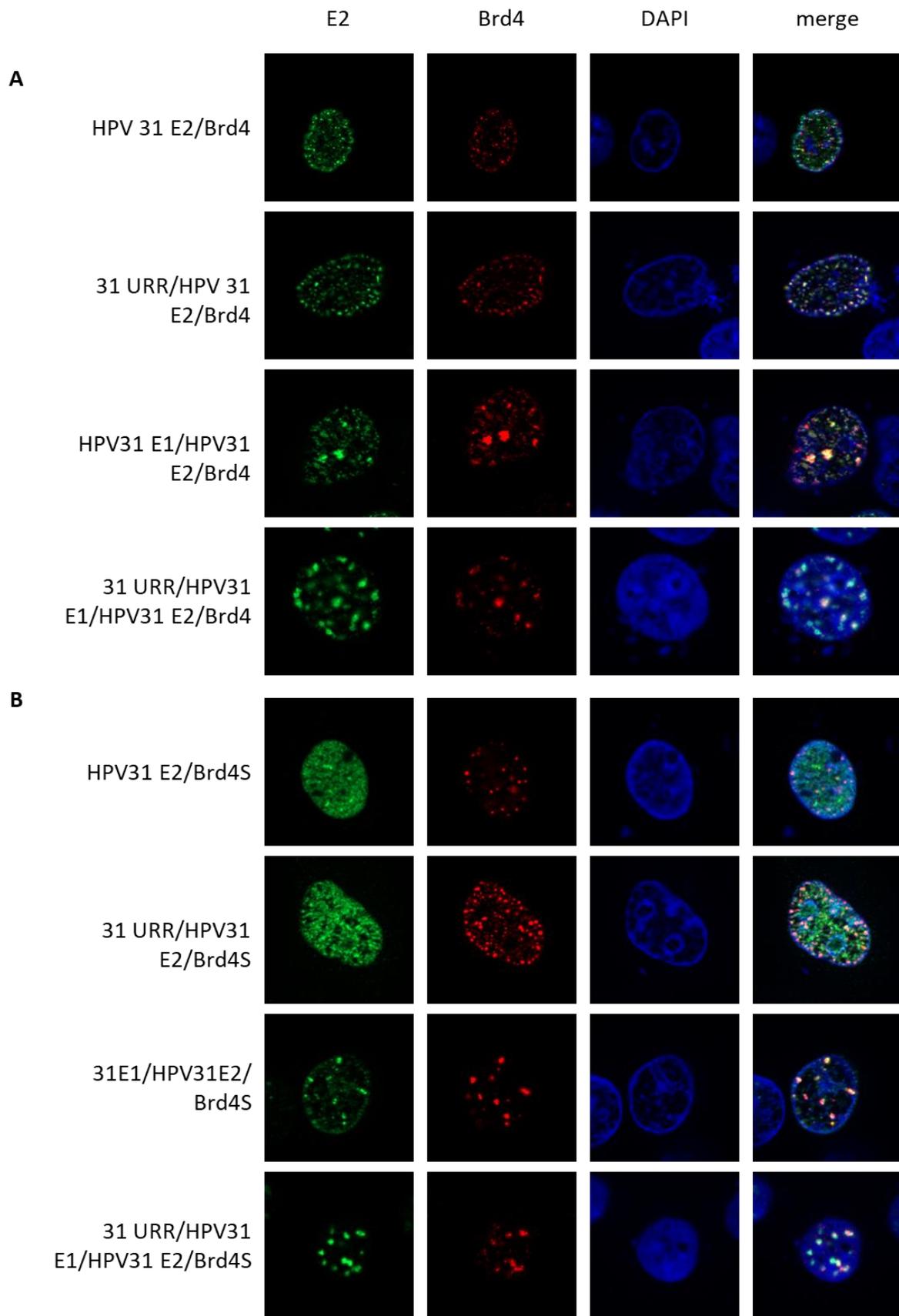


Abbildung 30: Brd4 und Brd4S werden in HPV31-positive Replikationsfoci rekrutiert
 A) C33A Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für HPV31 E2 (50 ng pSX31E2 – HA) und für Brd4 (700 ng pcDNA3-flag Brd4) transfiziert. Zusätzlich wurden diese mit/ohne 31

URR (500 ng pGL31URR-Luc) und mit/ohne HPV31 E1 (500 ng pCMV 31 E1) kombiniert. B) Im Unterschied zu A) wurde der Expressionsvektor für Brd4S transfiziert (500 ng pcDNA3-flag Brd4S). Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie und dem α -Flag und α -HA Antikörper wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion untersucht. Der Zellkern wurde durch den DNA-Farbstoff DAPI angefärbt.

Zusammengefasst wird für HPV31 deutlich, dass Brd4 und Brd4S in E1-/E2-positive Replikationsfoci rekrutiert werden. Dies könnte ein Hinweis auf die Beteiligung von Brd4S an der viralen Replikation sein.

6 Diskussion

Humane Papillomviren (HPV) sind unbehüllte DNA-Viren, die in die Genera der Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- und Nu-Papillomviren unterteilt werden. Der Infektionsweg verläuft direkt von Mensch zu Mensch und findet häufig durch sexuellen Kontakt statt. Die Infektion mit HPV verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch. Jedoch gibt es einige, wenige Papillomvirus (PV)-Typen, die zur Tumorentstehung beitragen können. Insbesondere kann die persistente Infektion mit Hochrisiko (*high risk*, *HR*)-Typen des Alpha-Genus zur Entstehung von anogenitalen Krebserkrankungen und Oropharynxkarzinomen führen [133]. Zudem stehen auch weitere PV-Typen, die dem Genus der Beta-Papillomviren angehören, unter Verdacht an der Entstehung von kutanen Tumoren beteiligt zu sein [1, 134].

Die Viren erlangen über Mikroverletzungen Zugang zu der Basalschicht der Haut- oder Schleimhautepithelzellen. In dieser initialen Phase wird das virale Genom mithilfe zellulärer Faktoren und den frühen viralen Proteinen E1 und E2 amplifiziert, bis zunächst etwa 100 Kopien pro Zelle vorliegen. Diese Anzahl an Genomkopien hält sich konstant, bis die Keratinozyten beginnen sich zu differenzieren. Die bis zu diesem Zeitpunkt exprimierten Onkoproteine E6 und E7 verhelfen dabei der Zellzykluskontrolle zu entkommen und somit die virale Amplifikation zu begünstigen. Es findet eine starke Vermehrung des Virusgenoms statt, wobei es auch zur Expression der späten Gene L1 und L2 kommt, so dass infektiöse Partikel produziert werden [1].

Trotz der symptomatischen Bandbreite, die eine persistierende Infektion mit HPV zur Folge haben kann, besteht bei allen PV die Gemeinsamkeit, dass sie abhängig von definierten zellulären Faktoren sind. Das E2 Protein, welches zusammen mit der viralen Helikase E1 für die initiale Amplifikation sorgt, reguliert zugleich mit dem konservierten zellulären Interaktor Brd4 auch die virale Transkription und sorgt für die Erhaltung des viralen Genoms bei der Zellteilung [62, 80].

6.1 Zweite Interaktionsstelle in Brd4 und HPV E2 Proteinen

Der Komplex zwischen dem zellulären Chromatinregulator Brd4 und dem viralen Transkriptionsfaktor E2 greift in mehrere Ebenen des PV-Lebenszyklus ein. Essentiell für die Ausbildung dieses regulatorischen Komplexes ist die hochkonservierte Interaktionsstelle im C-Terminus von Brd4 und im N-Terminus von E2. In dem E2 Protein wird diese Interaktion hauptsächlich über die Positionen R37 und I73 vermittelt. Mutationen dieser Aminosäurenreste führten in unterschiedlichen Ansätzen zum Verlust der transkriptionellen Aktivität des E2 Proteins [80, 135]. Interessanterweise zeigten die R37 und I73 Mutationen

im Kontext des Gesamtgenoms für HPV31, trotz der Unfähigkeit an die CTM von Brd4 zu binden, keinen Phänotyp in undifferenzierten Zellen und nur eine mäßige Reduktion der späten viralen Transkripte in differenzierten Zellen [97]. Neben dieser hochkonservierten Interaktionsstelle zwischen Brd4 und E2 gab es Evidenzen für weitere Interaktionsstellen, welche in Brd4 die Regionen zwischen der BD2 (Bromodomäne 2) und der BID (*basic residue-enriched interaction domain*) beinhalten [80]. Umfassendere Untersuchungen zeigten, dass die Bindung zu einer zweiten Interaktionsstelle für Papillomviren abhängig von deren karzinogenen Potential und der phosphorylierungsabhängigen Konformation in Brd4 ist. Es wurde postuliert, dass die BID-Domäne in Brd4 eine universale Bindestelle für E2 Proteine ist, welche *in vivo* üblicherweise nicht zugänglich ist [76, 108, 135]. Aufgrund der Casein-Kinase (CK2)-abhängigen Phosphorylierung der PDID-Domäne (*phosphorylation dependent interaction domain*) wird die BID-Domäne maskiert. In diesem physiologisch-relevanten Zustand wird die BD2-Domäne im Gegenzug demaskiert und Brd4 dazu befähigt an acetyliertes Chromatin zu binden [76]. Für diesen Zustand, in welchem die PDID-Domäne phosphoryliert und zugänglich ist, die BID-Domäne maskiert ist und die BD2-Domäne an das Chromatin binden kann, wurde gezeigt, dass nur *high-risk* (HPV16 und 18), aber keine *low-risk* (HPV11) Papillomvirustypen binden können [108]. Die Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten FRET (*Försters resonance energy transfer*)-Analyse für Brd4 und das HR-E2 Protein von HPV31 ermöglichte den Nachweis dieser zweiten Interaktionsstelle in lebenden Zellen. Mit dieser Methode und einer zusätzlichen Ko-Immunopräzipitations-Analyse konnte für die isolierte PDID-Domäne eine Interaktion mit dem HPV31 E2 Protein bestätigt werden. Für die BID-Domäne hingegen, welche als isolierte Domäne phosphorylierungsunabhängig und somit nicht maskiert ist, konnte keine Interaktion festgestellt werden (Abbildung 10). Im Einklang mit den von Wu et al. (2016) publizierten Daten konnte anhand der FACS-FRET-Methode auch die Interaktion der PDID-Domäne zu dem HPV16 E2 Protein gezeigt werden. Darüber hinaus wurde das CRPV E2 Protein, ein Vertreter der kappa-Papillomviren, welches in Hauskaninchen gutartige Läsionen hervorruft, die zu malignen Karzinomen progredieren können, analysiert [136]. Für das CRPV E2 Protein und die PDID-Domäne konnte anhand der Analyse mittels FACS-FRET kein Interaktionssignal gemessen werden (Abbildung 11). Ergänzend zu diesen Daten ist geplant, weitere E2 Proteine von HR-Papillomvirustypen, aber auch von nicht-karzinogenen Alpha-, Beta-, und Gamma-Typen hinsichtlich der Brd4-PDID-Bindung zu untersuchen. Mit diesen zusätzlichen Interaktionsanalysen, soll die im Rahmen dieser Arbeit und von Wu et al. (2016) angedeutete exklusive Bindefähigkeit der HR-Papillomviren mit der PDID von Brd4, mit dem Ziel Hinweise zur Pathogenese von Papillomviren mit karzinogenem Potential zu erlangen, weiter untersucht werden.

Strukturell besteht das E2 Protein aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD), welche über eine variable Hinge-Region mit der DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne (DBD) verbunden ist [62]. Im Gegensatz zur konservierten Interaktionsstelle, welche sich in der TAD von E2 befindet, wurde für die zweite Interaktionsstelle postuliert, dass der C-Terminus von E2 an dieser beteiligt ist [108]. Insbesondere wurden die Positionen K306/K307 in HPV16 und R307/K308 in HPV18 untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch die Mutation zu den Aminosäureresten Asparagin (N) und Asparaginsäure (D), welche in dem LR-Papillomvirustyp 11 an den entsprechenden Positionen zu finden sind, die Fähigkeit mit der PDID-Domäne zu interagieren, verloren geht [108]. Für eine Untersuchung der zweiten Interaktionsstelle im Hinblick auf ihre Funktion im Kontext des gesamten Virusgenoms, sollte in dieser Arbeit die entsprechende HPV31 E2 ND-Proteinmutante zunächst in transienten Reporteranalysen charakterisiert werden. Die HPV31 E2 S313N/K314D-Proteinmutante zeigte dabei einen Verlust in der Aktivität der Transaktivierung und Replikation. Auch die zuvor von Wu et al. (2016) beschriebene HPV16 K306N/K307D-Proteinmutante war nicht mehr in der Lage den E2-abhängigen Reporter zu aktivieren (Abbildung 12). Die Interaktionsanalysen der HPV31 und 16 E2 ND-Proteinmutanten deuteten darauf hin, dass dieser Verlust der Aktivität nicht mit einer reduzierten PDID-Bindung in Brd4 korrelierte (Abbildung 13). Vielmehr zeigten Gel-Shift-Analysen, dass die HPV31 E2 ND-Proteinmutante, trotz nukleärer Lokalisation, nicht an DNA binden kann (Abbildung 12). Diese Daten weisen darauf hin, dass die untersuchten Aminosäurereste, welche in HR-E2 Proteinen eine Konservierung aufweisen (Abbildung 14), wichtig für deren DNA-Bindung sind. Diese Annahme stimmt mit Erkenntnissen früherer Untersuchungen überein, die zeigten, dass in HPV18 E2 das Arginin (R) an Position 307 das DNA-Rückgrat direkt kontaktiert, wohingegen der LR-Papillomvirustyp 6 mit einem Asparagin (N) an entsprechender Position diesen Kontakt nicht herstellen kann [62, 137].

Zusammenfassend kann in dieser Arbeit eine zweite Interaktionsstelle in Brd4 bestätigt werden. Die Ergebnisse der *in vitro* Pull-down Experimente deuteten darauf hin, dass diese Interaktionsstelle in Brd4 die PDID- und BID-Domänen und in E2 den C-Terminus umfasst [108]. Im Unterschied dazu zeigte sich in Interaktionsanalysen mit lebenden Zellen, dass die PDID-, aber nicht BID-Domäne in Brd4 an der zweiten Interaktionsstelle beteiligt zu sein scheint. Da zudem gezeigt werden konnte, dass die postulierten Positionen im C-Terminus von HR-E2 Proteinen wichtig für die DNA-Bindeaktivität sind und nicht für die Bindung zur Brd4-PDID, wurde eingehender untersucht, über welche Domänen in E2 die Bindung zur PDID-Domäne in lebenden Zellen erfolgt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von HPV31 E2 mit der PDID-Domäne über die TAD erfolgt. Auch bei dieser kombinatorischen Untersuchung der einzelnen isolierten Domänen von Brd4 und E2 miteinander, konnte für die BID-Domäne keine Interaktion mit

dem HPV31 E2 Protein nachgewiesen werden (Abbildung 15). Der Hinweis, dass die TAD von HR-E2 Proteinen jedoch an der Interaktion beteiligt ist, führte zu der Untersuchung von dreizehn konservierten Aminosäuren, die sich in der TAD befinden und für die Interaktion der zweiten Bindestelle verantwortlich sein könnten. Interessanterweise zeigten Mutationen an den Positionen R37 und I73 die größten Verluste in der Stärke der PDID-Bindung, wobei lediglich die R37A Proteinmutante eine statistische Signifikanz aufwies (Abbildung 16). Weitere Experimente mit anderen bindenden HR-E2 Proteinen könnten aufklären, ob in Verbindung mit den entsprechenden Mutationen an den Positionen 37 und 73 ein ähnlicher Phänotyp zu beobachten ist. Darüber hinaus sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass weitere konservierte Aminosäuren in der TAD von E2 auch eine Rolle bei der Interaktion zur PDID-Domäne spielen könnten, da insbesondere die HPV31 E2 R37A Proteinmutante, trotz signifikanter Reduktion des Interaktionssignals, den Interaktions-Schwellenwert von 20% (FRET-positiven Zellen) nicht unterschritten hat und somit vermutlich noch mit der PDID-Domäne interagiert (Abbildung 16). Folgende konservierte Aminosäuren in der TAD von HPV31, von denen keine strukturbedingten Veränderungen bei einer Mutation bekannt sind und auch kein Verlust der E1-Bindung, könnten untersucht werden: E2, L4, R7, L8, Q13, G50, V59, P60, A69, A72, E90, W92, Q95, E100, V117, V119, D122, G123, N127, V152, V160, E162, G163, F171 [62, 138]. Mit der Identifizierung der für die PDID-Interaktion verantwortlichen Aminosäuren in E2, sollten ferner die E2-Proteinmutanten charakterisiert und beispielsweise die E2-abhängigen Aktivitäten mittels Reporteranalysen untersucht werden. Um die Funktion dieser zweiten Interaktionsstelle abschließend aufzuklären, könnten stabile Zelllinien mit den entsprechenden Gesamtgenommutanten von HPV31 und anderen bindenden HR-Papillomvirustypen hergestellt werden. Dieser Ansatz könnte dabei helfen, die Rolle einer zweiten Interaktionsstelle im Kontext des vollständigen Brd4 Proteins und des viralen E2 Proteins in Abhängigkeit des PV-Lebenszyklus zu untersuchen, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch zeitlich nicht mehr umsetzbar war.

Eine weiterführende Charakterisierung der neu beschriebenen Interaktionsstelle erfolgte über die Bindefähigkeit von PDID-Deletionsmutanten mit dem HPV31 E2 Protein. Die in der PDID-Domäne enthaltenen fünf Regionen (287-348, BD2, 462-482, NPS und 505-530) wurden hierfür jeweils deletiert. Die Interaktionsanalyse mit dem HPV31 E2 Protein ergab dabei, dass die Interaktion über die BD2, NPS und die Sequenzregion 505-530 vermittelt wird (Abbildung 17). Bei einer *in silico* Analyse stellte sich heraus, dass die Region 505-530 eine *coiled-coil* Sequenz enthält, die eine Heptad-Wiederholung von Aminosäuren aufweist, wobei die hydrophoben Aminosäuren an den Positionen 1 und 4 konserviert sind [139]. *Coiled-coil* Strukturen sind dafür bekannt bei unterschiedlichsten Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle zu spielen, wie beispielsweise bei der Anheftung von Vesikeln, der

Segregation von Chromosomen oder die Funktion als molekulares Gerüst zu übernehmen [139]. Damit besteht die Möglichkeit mit anderen Proteinen, wie E2, zu interagieren, aber auch eine Dimerformation einzugehen. Dies wurde für Brd2-Proteine gezeigt, deren Ausbildung eines Homodimers von dem Motiv B abhängt. Das Motiv B ist unter den Brd-Proteinen konserviert und entspricht in Brd4 den Aminosäuren 502-547, welche die vorhergesagte *coiled-coil*-Sequenz komplett miteinschließen [128]. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte auch für die PDID-Domäne von Brd4 eine Dimerisierung nachgewiesen werden, welche von der postulierten *coiled-coil* Region (505-530), aber auch von der BD2 abhängig ist (Abbildung 18). Dieses Ergebnis bestätigte ebenso zuvor publizierte Daten, die zeigten, dass Brd4 dimerisieren kann und diese Dimerisierung von den Bromodomänen 1 und 2 abhängig ist [127]. Mit diesen Befunden besteht auch für die PDID-Domäne die Möglichkeit mit endogenen Brd4-Proteinen zu dimerisieren. Über die Bindung an die CTM von endogenem Brd4 wäre es für E2 somit möglich ein indirektes Interaktionssignal für die PDID zu generieren. In Anbetracht des reduzierten Interaktionssignals der PDID in Kombination mit den HPV31 E2 R37- und I73-Proteinmutanten, welche Brd4-CTM bindungsdefizient sind, könnte ein Brd4-PDID-Heterodimer diesen Phänotyp erklären. Ebenso würde die Verhinderung der Brd4-PDID-Dimerisierung, durch das Deletieren der dafür notwendigen Regionen (BD2 und 505-530) in einem reduzierten Interaktionssignal mit dem HPV31 E2 Protein resultieren, was mit der FACS-FRET-basierten Nachweismethode gezeigt werden konnten (Abbildung 17). Ob die bestätigte zweite Interaktionsstelle in Brd4 und dem E2 Protein über eine direkte oder indirekte Bindung entsteht, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Zusammenfassend kann aber angenommen werden, dass die BD2 und die Region 505-530 in Brd4 die Interaktion zu dem HPV31 E2 Protein beeinflussen.

Über dies hinaus scheint auch die NPS eine Rolle bei dieser Interaktion zu spielen. Allerdings war nur in einer Konstellation die Abhängigkeit des FRET-Signals von der NPS gegeben (mit SYFP-PDID; Abbildung 17B). Für die Kombination von PDID-SYFP mit dem HPV31 E2 Protein war keine ausschlaggebende Reduktion des Interaktionssignals zu verzeichnen (Abbildung 17). Auch das Potential der PDID-Domäne zu Dimerisieren war nicht von der NPS abhängig (Abbildung 18). Das Zustandekommen eines FRET-Signals ist von vielen Faktoren abhängig, die es erlauben, dass die Fluorophore der zu untersuchenden Proteine in einem Radius von weniger als 10 nm zusammenkommen (Förster-Radius) [126]. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Rolle der NPS könnten ein Hinweis auf die konformationbedingte Anordnung der PDID sein, welche es dem SYFP-Anhang je nach N- oder C-terminaler Position erlaubt oder verhindert in die Nähe des BFP-Anhangs von E2 zu kommen. Zudem wurde postuliert, dass die Konformation der PDID phosphorylierungsabhängig ist [76, 108]. Charakteristisch dabei ist, dass nur HR-E2 Proteine in der Lage sind

die in der PDID enthaltene NPS zu binden, wenn diese phosphoryliert ist [108]. So zeigte eine PDID-Alanin-Mutante, die potentiell nicht mehr phosphoryliert werden kann, eine ähnliche Abnahme wie die PDID-NPS-Deletionsmutante (N-terminal mit SYFP getaggt) im FRET-Signal mit dem HPV31 E2 Protein (Abbildung 17).

Im Kontext der NPS lässt sich zusammenfassen, dass diese Region in der PDID vermutlich phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung auch eine Rolle bei der Interaktion mit dem HPV31 E2 Protein spielt.

Brd4 kann sowohl eine aktivierende als auch reprimierende Funktion bezüglich der E2-abhängigen viralen Transkription ausüben [80, 135]. Für onkogene Alpha-Papillomvirustypen wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von E2 an proximale Bindestellen des frühen viralen Promotors reprimierend wirkt [69, 80, 135]. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass E2 mit P-TEFb, einem zellulären Transkriptionsfaktor, welcher die RNA-Polymerase II reguliert und damit Transkription vorantreibt, konkurriert [100]. Dieses kompetitive Verhalten um dieselbe Bindestelle im C-Terminus von Brd4 mit der Konsequenz der Repression des frühen viralen Promotors, konnte mit einem dominant-negativen Peptid vom Brd4-C-Terminus aufgehoben werden [100]. Zudem konnte in E2-abhängigen transaktivierenden Kontexten gezeigt werden, dass das Brd4-C-terminus-enthaltende Peptid ebenso einen dominant-negativen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität hat [95, 96, 106]. Dies war auch für die isolierte CTM-Domäne von Brd4 unter der Verwendung eines artifiziellen Reporters mit vier E2-Bindestellen zu beobachten (Abbildung 19). Die PDID-Domäne, von welcher eine Interaktion mit dem HPV31 E2 Protein nachgewiesen werden konnte, zeigte ebenso einen reprimierenden Effekt auf die E2-abhängige Transaktivierung. Im Gegensatz dazu konnte ein derartiger Effekt für die BID-Domäne, für die auch keine Interaktion mit E2 bestätigt werden konnte, nicht beobachtet werden. Interessanterweise zeigte eine zuvor beschriebene, Brd4-N genannte Mutante, welche die Aminosäuresequenz 1-1223 (ohne CTM, aber mit der PDID) von Brd4 umfasst, einen dominant-negativen Effekt bezüglich der E2-abhängigen Transaktivierung [140]. Ebenso wurde für diese Daten die Idee von Brd-Dimeren diskutiert, welche den dominant-negativen Phänotyp der Brd4N-Mutante erklären würden [140]. Da eine direkte Interaktion von E2 und Brd4-PDID jedoch nicht ausgeschlossen ist, werden weitere Untersuchungen nötig sein, um dies abschließend zu klären.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ähnlich wie die CTM-, auch die PDID-Domäne in Brd4 eine Rolle in der E2-abhängigen Transaktivierungsfunktion spielt.

6.2 Beteiligung von Brd4S im PV-Lebenszyklus

Die vorangegangenen Daten lassen eine bisher unbekannte Rolle einer zweiten Interaktionsstelle in Brd4 und E2 annehmen. In diesem Zusammenhang sollte im nächsten Schritt die kurze Isoform von Brd4, genannt Brd4S untersucht werden. Brd4S ist 722 Aminosäuren-lang und bis zur Aminosäure 719 identisch zu der langen Isoform von Brd4, wobei es sich in den letzten drei Aminosäureresten (GPA) unterscheidet. Da Brd4S die PDID-Domäne enthält und nicht die CTM von Brd4, würde das virale E2 Protein Brd4S bei einer direkten Interaktion rekrutieren. Eine Interaktion zwischen Brd4S und dem HPV31 E2 Protein konnte mittels Ko-Immunopräzipitationsanalyse nachgewiesen werden (Abbildung 21). Dennoch ist nicht außer Acht zu lassen, dass die Möglichkeit einer indirekten Interaktion über die lange Isoform Brd4 besteht, da Brd4 und Brd4S in der Lage sind zu dimerisieren (Abbildung 22). Um diese Frage zu klären, könnten in Zukunft Ko-Immunopräzipitationsanalysen unter nativen Bedingungen durchgeführt werden, welche die unterschiedlichen Komplexformationen von Brd4, Brd4S und E2 aufzeigen würden.

Die Bedeutung von Brd4S in Bezug auf andere Viren, wie HIV-1 (Humane Immundefizienz-Virus-1) und KSHV (Kaposi-Sarkom-Herpesvirus) lässt auch für HPV, ob direkt durch E2 oder indirekt im Komplex mit Brd4, einen Zusammenhang im viralen Lebenszyklus vermuten [109, 110]. Brd4S wurde in HPV-relevanten Zellen, wie den HPV31-positiven CIN612-9E-Zellen und normalen humanen Keratinozyten, ebenso wie in den HPV-negativen C33A nachgewiesen (Abbildung 20). Als Nächstes sollte die Rolle von Brd4S im Kontext von replizierenden Genomen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden undifferenzierte CIN612-9E-Zellen mit einer siRNA gegen Brd4S transfiziert oder mithilfe des CrisprCas-Systems und der entsprechenden gRNA gegen Brd4S transduziert. Untersucht wurden die Mengen der viralen Transkripte, wobei sich keine oder nur geringe Erhöhungen in der Transkriptmenge von E6*, E1^{E4} und E8^{E2} zeigten. Überraschenderweise führte der Knockdown von Brd4S in beiden Ansätzen zu einer Erhöhung des E4^{L1}-Transkriptes (Abbildung 23 und Abbildung 26). In differenzierten Zellen hingegen wirkte sich der siRNA-vermittelte Brd4S-Knockdown nicht auf die Menge der viralen Transkripte aus (Abbildung 24). Frühere Untersuchungen zeigten in differenzierungsabhängigen Kontexten, dass E2 die Expression von Serin-/Arginin-reichen Splicing-Faktoren (SRSF) kontrolliert, die ihrerseits in differenzierten Zellen die Expression der späten viralen Gene induzieren, was auch im Einklang mit den erhöhten Transkriptmengen der in Methylcellulose differenzierten CIN612-9E-Zellen ist [141]. Im Gegensatz dazu wird für undifferenzierte Zellen davon ausgegangen, dass die Expression der späten Gene aufgrund ihrer hohen Immunogenität unterdrückt wird [142]. Verschiedene hnRNP (heterogenous ribonucleoprotein A1) Proteine wurden dabei als Faktoren identifiziert, die L1- und L2- Produktion inhibieren können [141]. Zwar wurde kein

direkter Zusammenhang zwischen Brd4S und negativen Splice-Faktoren gefunden, jedoch konnte eine Interaktion von Brd4 mit hnRNPM und hnRNPL nachgewiesen werden [143]. Somit könnte auch Brd4S in der Lage sein reprimierende Splicing-Faktoren zu rekrutieren, um die L1-Produktion zu verhindern. Insbesondere für HR-Papillomviren scheint die Expression der immunogenen Kapsidproteine auf die oberen Epithelschichten begrenzt zu sein, wohingegen bei anderen kutanen Papillomviren späte Ereignisse auch in darunterliegenden Schichten stattfinden [115, 144, 145]. Somit könnten sich die HR-Papillomviren mit diesem Mechanismus der Erkennung durch das Immunsystem in den unteren und mittleren Epithelschichten entziehen, was in Folge eine HPV-Latenz in undifferenzierten Zellen erlauben könnte. Auch für HIV-1 wurde gezeigt, dass Brd4S durch die Interaktion mit BRG1 (*Brahma-related gene-1*), einem reprimierenden Faktor der Genexpression, welcher eine repressive Nukleosomstruktur bedingt und somit die Transkription von HIV-1 inhibiert, zur HIV-Latenz beiträgt [110]. Damit besteht auch die Möglichkeit, dass alternative Splicing-Ereignisse bei Papillomviren nicht nur direkt durch positive oder negative Splicing-Faktoren beeinflusst werden können, sondern über Chromatin-Remodellierung, was in diesem Zusammenhang bereits für den Faktor BRG1 gezeigt wurde reguliert werden könnten [146].

Brd4S scheint nicht nur einen reprimierenden Effekt auf Splicing-Ereignisse von Papillomviren zu haben, sondern ein genereller negativer Regulator der viralen Transkription zu sein. Da in diesem Zusammenhang die nachgewiesene Interaktion zwischen Brd4S und dem HPV31 E2 Protein (Abbildung 21) nahelegt, dass Brd4S an E2-vermittelten Aktivitäten beteiligt sein könnte, wurden diese eingehender untersucht. In HPV-negativen C33A-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Brd4S-Knockdown zu einer Erhöhung der E2-abhängigen transkriptionellen Aktivität führte (Abbildung 27). Zusätzlich bewirkte die Ko-Expression von Brd4S die Reduktion der E2-abhängigen Aktivität (Abbildung 28). Diese Befunde lassen somit eine Rolle von Brd4S als negativen Regulator der viralen Transkription vermuten.

Interessanterweise konnte in Bezug auf die Expression zellulärer Gene in C33A-Zellen gezeigt werden, dass die c-Fos- und p21-Expression positiv von Brd4S, aber nicht von Brd4 reguliert wird [130]. Eine andere Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass das virale E2 Protein in C33A Zellen die c-Fos-Expression induzieren kann und dies abhängig von der Brd4-Bindung an eine E2-Bindestelle im c-Fos-Promotor ist [147]. Darüber hinaus stellte sich bei *in vivo*-Analysen heraus, dass c-Fos und Brd4 eine essentielle Rolle in der PV-induzierten Tumorigenese spielen [147]. Angesichts der Möglichkeit, dass die E2 abhängige c-Fos-Induktion von der Brd4- und möglicherweise von der Brd4S-Bindung reguliert sein kann, sind in Zukunft weitere Untersuchungen für die Aufklärung welcher der beiden Isoformen involviert ist nötig. Neuere Erkenntnisse deuten zudem darauf hin, dass Brd4S in anderen (nicht Virus-induzierten) Krebserkrankungen einen onkogenen Effekt hat,

beispielsweise durch erhöhte Mengen von Myc und Bcl2 in akuter myeloider Leukämie oder EN1 (*Engrailed-1*) in Brustkrebszellen [90, 148].

Ein weiterer viraler Faktor, von dem gezeigt wurde, dass er mit Brd4S interagiert ist das LANA-1 (*latency-associated nuclear antigen-1*) Protein des Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) [109]. Wie das E2 Protein von Papillomviren ist auch LANA ein viraler Regulator der Transkription und Replikation [80, 109]. Neben der Erkenntnis, dass Brd4S für die Inhibition von G1/S- und G2/M-Zellzyklusübergängen sorgt und LANA dieser Inhibition entgegenwirken kann, gab es auch Evidenzen, dass Brd4S an episomale Genome von KSHV rekrutiert werden könnte [109]. In Immunfluoreszenzanalysen konnte für HPV31 gezeigt werden, dass Brd4S, ebenso wie Brd4, in E1/E2-induzierte Replikationsfoci rekrutiert wird (Abbildung 30). Neuere Befunde deuteten außerdem an, dass sowohl Brd4 als auch Brd4S in virusunabhängigen Foci anwesend sind, was mit der Erkenntnis, dass Brd4 und Brd4S dimerisieren können einhergeht [130]. Mit diesen Befunden könnte weitergehend geklärt werden, ob auch in E1/E2-positiven Replikationsfoci beide Brd4 Isoformen anwesend sind.

Wenngleich kein genereller Effekt des CrisprCas-induzierten Brd4S-Knockdowns auf die virale Kopienzahl in undifferenzierten HPV31-positiven Zellen festgestellt werden konnte (Abbildung 26), so zeigte sich im Rahmen einer E1/E2-abhängigen Replikationsanalyse, ähnlich wie bei der E2-abhängigen Transaktivierung, dass die Ko-Expression von Brd4S einen reprimierenden Effekt auf die Aktivität des Reporters hat (Abbildung 28). Da der CrisprCas-vermittelte Knockdown von Brd4S nicht stabil war und nur eine Reduktion von 50% erreichte, könnte der Effekt von Brd4S auf die virale Genomkopienzahl in Zellen mit replizierendem Genom erneut mithilfe der siRNA gegen Brd4S, welche im Vergleich die Brd4S-Transkriptmenge um 78% in CIN612-9E-Zellen reduzierte, untersucht werden. Weiterführend könnte mit einer Chromatin-Immunopräzipitationsanalyse überprüft werden, ob Brd4S tatsächlich an die virale DNA rekrutiert wird.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Analysen, dass Brd4S ein bisher unbekannter Faktor im Papillomvirus-Lebenszyklus ist, welcher Einfluss sowohl auf die Replikation als auch Transkription hat. Ebenso besteht die Evidenz der Beteiligung an Splice-Prozessen der späten viralen Transkripte in undifferenzierten Zellen und damit die Verbindung zu einem möglichen Immunevasionsmechanismus, welcher eine HPV-Latenz begünstigen kann.

7 Literaturverzeichnis

1. Fields, B., et al., *Fields virology*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Pa, 2013.
2. Bergvall, M., T. Melendy, and J. Archambault, *The E1 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 35-56.
3. Bernard, H.U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
4. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
5. Burk, R.D., Z. Chen, and K. Van Doorslaer, *Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity*. Public Health Genomics, 2009. **12**(5-6): p. 281-90.
6. Bosch, F.X. and N. Munoz, *The viral etiology of cervical cancer*. Virus Res, 2002. **89**(2): p. 183-90.
7. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Reviews in medical virology, 2015. **25 Suppl 1**(Suppl Suppl 1): p. 2-23.
8. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. **189**(1): p. 12-9.
9. Bosch, F.X., et al., *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. J Clin Pathol, 2002. **55**(4): p. 244-65.
10. Cogliano, V., et al., *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. Lancet Oncol, 2005. **6**(4): p. 204.
11. Weaver, B.A., *Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection*. J Am Osteopath Assoc, 2006. **106**(3 Suppl 1): p. S2-8.
12. Stanley, M., *Immunobiology of HPV and HPV vaccines*. Gynecol Oncol, 2008. **109**(2 Suppl): p. S15-21.
13. Harden, M.E. and K. Munger, *Human papillomavirus molecular biology*. Mutat Res Rev Mutat Res, 2017. **772**: p. 3-12.
14. Christensen, N.D., et al., *Recent advances in preclinical model systems for papillomaviruses*. Virus Res, 2017. **231**: p. 108-118.
15. Hildesheim, A., et al., *Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial*. Jama, 2007. **298**(7): p. 743-53.
16. Bujan Rivera, J. and S.J. Klug, *[Cervical cancer screening in Germany]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2018. **61**(12): p. 1528-1535.
17. Ramoz, N., et al., *Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis*. Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 579-81.
18. de Villiers, E.M., *Heterogeneity of the human papillomavirus group*. Journal of virology, 1989. **63**(11): p. 4898-4903.
19. Dubina, M. and G. Goldenberg, *Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review*. The American Journal of dermatopathology, 2009. **31**(6): p. 561-573.
20. Bzhalava, D., et al., *A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 224-31.
21. Howley, P.M. and H.J. Pfister, *Beta genus papillomaviruses and skin cancer*. Virology, 2015. **479-480**: p. 290-6.

22. Cubie, H.A., *Diseases associated with human papillomavirus infection*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 21-34.
23. Knipe, D.M. and P.M. Howley, *Fields Virology*. 2013: Lippincott Williams & Wilkins.
24. Frattini, M.G. and L.A. Laimins, *The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b*. Virology, 1994. **204**(2): p. 799-804.
25. Frattini, M.G. and L.A. Laimins, *Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12398-402.
26. Kanaya, T., S. Kyo, and L.A. Laimins, *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, 1997. **237**(1): p. 159-69.
27. Sen, E., J.L. Bromberg-White, and C. Meyers, *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, 2002. **76**(10): p. 4798-809.
28. Ustav, M., et al., *Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1*. Embo j, 1991. **10**(13): p. 4321-9.
29. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Rev Med Virol, 2015. **25 Suppl 1**: p. 2-23.
30. Zobel, T., T. Iftner, and F. Stubenrauch, *The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(22): p. 8352-62.
31. Stubenrauch, F., et al., *The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1178-86.
32. Jeckel, S., et al., *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, 2003. **77**(16): p. 8736-44.
33. Dreer, M., et al., *Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8^{E2C} Proteins Inhibits Viral Replication*. PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005556.
34. Straub, E., et al., *Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter*. Journal of virology, 2015. **89**(14): p. 7304-7313.
35. McBride, A.A., *Mechanisms and strategies of papillomavirus replication*. Biol Chem, 2017. **398**(8): p. 919-927.
36. Moody, C., *Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes*. Viruses, 2017. **9**(9): p. 261.
37. Roman, A. and K. Munger, *The papillomavirus E7 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 138-68.
38. Vande Pol, S.B. and A.J. Klingelutz, *Papillomavirus E6 oncoproteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 115-37.
39. Stubenrauch, F. and L.A. Laimins, *Human papillomavirus life cycle: active and latent phases*. Semin Cancer Biol, 1999. **9**(6): p. 379-86.

40. Maglennon, G.A., P. McIntosh, and J. Doorbar, *Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression*. *Virology*, 2011. **414**(2): p. 153-63.
41. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. *Science*, 1989. **243**(4893): p. 934-7.
42. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. *Genes Dev*, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
43. Munger, K., et al., *Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product*. *Embo j*, 1989. **8**(13): p. 4099-105.
44. Funk, J.O., et al., *Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein*. *Genes Dev*, 1997. **11**(16): p. 2090-100.
45. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18*. *Embo j*, 1991. **10**(13): p. 4129-35.
46. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. *Cell*, 1993. **75**(3): p. 495-505.
47. Scheffner, M., et al., *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53*. *Cell*, 1990. **63**(6): p. 1129-1136.
48. Howie, H.L., R.A. Katzenellenbogen, and D.A. Galloway, *Papillomavirus E6 proteins*. *Virology*, 2009. **384**(2): p. 324-34.
49. Crook, T., K.H. Vousden, and J.A. Tidy, *Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation*. *Cell*, 1991. **67**(3): p. 547-556.
50. Ganti, K., et al., *The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to Malignancy*. *Viruses*, 2015. **7**(7): p. 3530-51.
51. Kiyono, T., et al., *Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(21): p. 11612-6.
52. Lee, S.S., R.S. Weiss, and R.T. Javier, *Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(13): p. 6670-5.
53. Muench, P., et al., *Cutaneous papillomavirus E6 proteins must interact with p300 and block p53-mediated apoptosis for cellular immortalization and tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(17): p. 6913-24.
54. Amin, A.A., et al., *Identification of Domains of the HPV11 E1 Protein Required for DNA Replication in Vitro*. *Virology*, 2000. **272**(1): p. 137-150.
55. Ferran, M.C. and A.A. McBride, *Transient Viral DNA Replication and Repression of Viral Transcription Are Supported by the C-Terminal Domain of the Bovine Papillomavirus Type 1 E1 Protein*. *Journal of Virology*, 1998. **72**(1): p. 796-801.
56. Sun, Y., H. Han, and D.J. McCance, *Active domains of human papillomavirus type 11 E1 protein for origin replication*. *Journal of General Virology*, 1998. **79**(7): p. 1651-1658.
57. Deng, W., et al., *Cyclin/CDK Regulates the Nucleocytoplasmic Localization of the Human Papillomavirus E1 DNA Helicase*. *Journal of Virology*, 2004. **78**(24): p. 13954-13965.

58. Fradet-Turcotte, A., et al., *Nuclear Export of Human Papillomavirus Type 31 E1 Is Regulated by Cdk2 Phosphorylation and Required for Viral Genome Maintenance*. Journal of Virology, 2010. **84**(22): p. 11747-11760.
59. Xiao, X.L. and V.G. Wilson, *Genetically defined nuclear localization signal sequence of bovine papillomavirus E1 protein is necessary and sufficient for the nuclear localization of E1- β -galactosidase fusion proteins*. Journal of General Virology, 1994. **75**(9): p. 2463-2467.
60. Titolo, S., et al., *Characterization of the DNA-binding properties of the origin-binding domain of simian virus 40 large T antigen by fluorescence anisotropy*. J Virol, 2003. **77**(9): p. 5512-8.
61. Chen, G. and A. Stenlund, *The E1 initiator recognizes multiple overlapping sites in the papillomavirus origin of DNA replication*. J Virol, 2001. **75**(1): p. 292-302.
62. McBride, A.A., *The papillomavirus E2 proteins*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 57-79.
63. Androphy, E.J., D.R. Lowy, and J.T. Schiller, *Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA*. Nature, 1987. **325**(6099): p. 70-3.
64. Sedman, J. and A. Stenlund, *Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro*. Embo j, 1995. **14**(24): p. 6218-28.
65. Graham, S.V., *Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing*. J Virol, 2016. **90**(19): p. 8384-8.
66. Cripe, T.P., et al., *Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 transactivator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis*. Embo j, 1987. **6**(12): p. 3745-53.
67. Spalholz, B.A., Y.C. Yang, and P.M. Howley, *Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product*. Cell, 1985. **42**(1): p. 183-91.
68. Steger, G. and S. Corbach, *Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 50-8.
69. Bernard, B.A., et al., *The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes*. J Virol, 1989. **63**(10): p. 4317-24.
70. Thierry, F. and P.M. Howley, *Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter*. New Biol, 1991. **3**(1): p. 90-100.
71. Dreer, M., S. van de Poel, and F. Stubenrauch, *Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein*. Virus Res, 2017. **231**: p. 96-102.
72. Devaiah, B.N., A. Gegonne, and D.S. Singer, *Bromodomain 4: a cellular Swiss army knife*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(4): p. 679-686.
73. Florence, B. and D.V. Faller, *You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D1008-18.
74. Iftner, T., et al., *Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle*. Virus Res, 2017. **231**: p. 76-82.
75. Wu, S.Y. and C.M. Chiang, *The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2007. **282**(18): p. 13141-5.

76. Wu, S.Y., et al., *Phospho switch triggers Brd4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting*. Mol Cell, 2013. **49**(5): p. 843-57.
77. Houzelstein, D., et al., *Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3794-802.
78. French, C.A., et al., ****BRD4-NUT*** Fusion Oncogene. A Novel Mechanism in Aggressive Carcinoma*, 2003. **63**(2): p. 304-307.
79. Floyd, S.R., et al., *The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling*. Nature, 2013. **498**(7453): p. 246-50.
80. McBride, A.A. and M.K. Jang, *Current understanding of the role of the Brd4 protein in the papillomavirus lifecycle*. Viruses, 2013. **5**(6): p. 1374-94.
81. Dey, A., et al., *The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(15): p. 8758-8763.
82. Huang, B., et al., *Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(5): p. 1375-87.
83. Jang, M.K., et al., *The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 523-34.
84. Schroder, S., et al., *Two-pronged binding with bromodomain-containing protein 4 liberates positive transcription elongation factor b from inactive ribonucleoprotein complexes*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1090-9.
85. Uppal, S., et al., *The Bromodomain Protein 4 Contributes to the Regulation of Alternative Splicing*. Cell Rep, 2019. **29**(8): p. 2450-2460.e5.
86. Rahman, S., et al., *The Brd4 Extraterminal Domain Confers Transcription Activation Independent of pTEFb by Recruiting Multiple Proteins, Including NSD3*. Molecular and Cellular Biology, 2011. **31**(13): p. 2641-2652.
87. Alsarraj, J., et al., *BRD4 Short Isoform Interacts with RRP1B, SIPA1 and Components of the LINC Complex at the Inner Face of the Nuclear Membrane*. PLOS ONE, 2013. **8**(11): p. e80746.
88. Hu, Y., et al., *Integrated cross-species transcriptional network analysis of metastatic susceptibility*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(8): p. 3184-3189.
89. Korb, E., et al., *BET protein Brd4 activates transcription in neurons and BET inhibitor Jq1 blocks memory in mice*. Nature Neuroscience, 2015. **18**(10): p. 1464-1473.
90. Tzelepis, K., et al., *SRPK1 maintains acute myeloid leukemia through effects on isoform usage of epigenetic regulators including BRD4*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5378.
91. Delcuratolo, M., et al., *Papillomavirus-Associated Tumor Formation Critically Depends on c-Fos Expression Induced by Viral Protein E2 and Bromodomain Protein Brd4*. PLoS Pathog, 2016. **12**(1): p. e1005366.
92. Jeckel, S., et al., *A transactivator function of cottontail rabbit papillomavirus e2 is essential for tumor induction in rabbits*. J Virol, 2002. **76**(22): p. 11209-15.
93. Abbate, E.A., C. Voitenleitner, and M.R. Botchan, *Structure of the papillomavirus DNA-tethering complex E2:Brd4 and a peptide that ablates HPV chromosomal association*. Mol Cell, 2006. **24**(6): p. 877-89.

94. You, J., et al., *Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes.* Cell, 2004. **117**(3): p. 349-60.
95. Schweiger, M.R., J. You, and P.M. Howley, *Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function.* J Virol, 2006. **80**(9): p. 4276-85.
96. Senechal, H., et al., *Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4.* Virology, 2007. **358**(1): p. 10-7.
97. Stubenrauch, F., A.M. Colbert, and L.A. Laimins, *Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions.* J Virol, 1998. **72**(10): p. 8115-23.
98. Hou, S.Y., et al., *Alleviation of Human Papillomavirus E2-Mediated Transcriptional Repression via Formation of a TATA Binding Protein (or TFIID)-TFIIB-RNA Polymerase II-TFIIF Preinitiation Complex.* Molecular and Cellular Biology, 2000. **20**(1): p. 113-125.
99. Wu, S.-Y., et al., *Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing.* Genes & Development, 2006. **20**(17): p. 2383-2396.
100. Yan, J., et al., *Abrogation of the Brd4-positive transcription elongation factor B complex by papillomavirus E2 protein contributes to viral oncogene repression.* J Virol, 2010. **84**(1): p. 76-87.
101. Sakakibara, N., R. Mitra, and A.A. McBride, *The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci.* J Virol, 2011. **85**(17): p. 8981-95.
102. Sakakibara, N., et al., *Brd4 is displaced from HPV replication factories as they expand and amplify viral DNA.* PLoS pathogens, 2013. **9**(11): p. e1003777-e1003777.
103. Moody, C.A. and L.A. Laimins, *Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation.* PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000605.
104. Wessel, S.R., et al., *Functional Analysis of the Replication Fork Proteome Identifies BET Proteins as PCNA Regulators.* Cell Rep, 2019. **28**(13): p. 3497-3509.e4.
105. Zhang, J., et al., *BRD4 facilitates replication stress-induced DNA damage response.* Oncogene, 2018. **37**(28): p. 3763-3777.
106. McPhillips, M.G., et al., *Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses.* J Virol, 2006. **80**(19): p. 9530-43.
107. Jang, M.K., D. Kwon, and A.A. McBride, *Papillomavirus E2 proteins and the host BRD4 protein associate with transcriptionally active cellular chromatin.* J Virol, 2009. **83**(6): p. 2592-600.
108. Wu, S.Y., et al., *BRD4 Phosphorylation Regulates HPV E2-Mediated Viral Transcription, Origin Replication, and Cellular MMP-9 Expression.* Cell Rep, 2016. **16**(6): p. 1733-48.
109. Ottinger, M., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest.* J Virol, 2006. **80**(21): p. 10772-86.
110. Conrad, R.J., et al., *The Short Isoform of BRD4 Promotes HIV-1 Latency by Engaging Repressive SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes.* Mol Cell, 2017. **67**(6): p. 1001-1012.e6.

111. Scheffner, M., et al., *The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5523-7.
112. Hummel, M., J.B. Hudson, and L.A. Laimins, *Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes*. J Virol, 1992. **66**(10): p. 6070-80.
113. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
114. Dickson, M.A., et al., *Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(4): p. 1436-47.
115. Ruesch, M.N., F. Stubenrauch, and L.A. Laimins, *Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5016-24.
116. Rheinwald, J.G. and H. Green, *Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 331-43.
117. Lee, A.Y. and C.M. Chiang, *Chromatin adaptor Brd4 modulates E2 transcription activity and protein stability*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2778-86.
118. Fradet-Turcotte, A., et al., *Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance*. J Virol, 2010. **84**(22): p. 11747-60.
119. Sanjana, N.E., O. Shalem, and F. Zhang, *Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening*. Nat Methods, 2014. **11**(8): p. 783-784.
120. Stubenrauch, F., et al., *The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins*. Int J Cancer, 2007. **121**(10): p. 2284-92.
121. M. Ausubel, R.B., R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl., *Current protocols in molecular biology*, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, \$165.00. 1989. **1**(2): p. 146-146.
122. Ausubel, F., et al., *Current protocols in molecular biology Wiley Interscience*. New York, NY, 1989: p. 2.2.
123. Manawapat-Klopfer, A., *Identifikation und Charakterisierung von potentiellen Biomarkern für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion*. Dissertation, 2013.
124. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
125. Schneider, M., et al., *Cottontail rabbit papillomavirus E1 and E2 proteins mutually influence their subcellular localizations*. 2018. **92**(21): p. e00704-18.
126. Banning, C., et al., *A flow cytometry-based FRET assay to identify and analyse protein-protein interactions in living cells*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9344.
127. Wang, R., et al., *Bromodomain protein Brd4 associated with acetylated chromatin is important for maintenance of higher-order chromatin structure*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(14): p. 10738-10752.

128. Garcia-Gutierrez, P., M. Mundi, and M. Garcia-Dominguez, *Association of bromodomain BET proteins with chromatin requires dimerization through the conserved motif B*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 15): p. 3671-80.
129. Ilves, I., et al., *Brd4 Is Involved in Multiple Processes of the Bovine Papillomavirus Type 1 Life Cycle*. Journal of Virology, 2006. **80**(7): p. 3660-3665.
130. Han, X., et al., *Roles of the BRD4 short isoform in phase separation and active gene transcription*. Nat Struct Mol Biol, 2020. **27**(4): p. 333-341.
131. Wang, X., et al., *Recruitment of Brd4 to the Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication Complex Is Essential for Replication of Viral DNA*. Journal of virology, 2013. **87**.
132. Sakakibara, N., et al., *Brd4 is Displaced from HPV Replication Factories as they Expand and Amplify Viral DNA*. PLoS pathogens, 2013. **9**: p. e1003777.
133. Haedicke, J. and T. Iftner, *Human papillomaviruses and cancer*. Radiother Oncol, 2013. **108**(3): p. 397-402.
134. Dubina, M. and G. Goldenberg, *Viral-associated nonmelanoma skin cancers: a review*. Am J Dermatopathol, 2009. **31**(6): p. 561-73.
135. Iftner, T., et al., *Involvement of Brd4 in different steps of the papillomavirus life cycle*. Vol. 231. 2016.
136. Shope, R.E. and E.W. Hurst, *Infectious Papillomatosis of Rabbits*. 1933.
137. Hooley, E., et al., *The recognition of local DNA conformation by the human papillomavirus type 6 E2 protein*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(14): p. 3897-908.
138. McBride, A. and G. Myers, *The E2 proteins: an update*. Human papillomaviruses, 1997.
139. Truebestein, L. and T.A. Leonard, *Coiled-coils: The long and short of it*. Bioessays, 2016. **38**(9): p. 903-16.
140. Gagnon, D., et al., *Proteasomal degradation of the papillomavirus E2 protein is inhibited by overexpression of bromodomain-containing protein 4*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4127-39.
141. Graham, S.V., *Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation*. Viruses, 2017. **9**(9): p. 245.
142. Buck, C.B., P.M. Day, and B.L. Trus, *The papillomavirus major capsid protein L1*. Virology, 2013. **445**(1-2): p. 169-74.
143. Uppal, S., et al., *The Bromodomain Protein 4 Contributes to the Regulation of Alternative Splicing*. Cell Reports, 2019. **29**(8): p. 2450-2460.e5.
144. Grassmann, K., et al., *Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA*. Journal of Virology, 1996. **70**(4): p. 2339-2349.
145. Peh, W.L., et al., *Life cycle heterogeneity in animal models of human papillomavirus-associated disease*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10401-16.
146. Zapater, A.G., et al., *The SWI/SNF subunits BRG1 affects alternative splicing by changing RNA binding factor interactions with RNA*. bioRxiv, 2019: p. 858852.
147. Delcuratolo, M., et al., *Papillomavirus-Associated Tumor Formation Critically Depends on c-Fos Expression Induced by Viral Protein E2 and Bromodomain Protein Brd4*. PLOS Pathogens, 2016. **12**(1): p. e1005366.
148. Wu, S.Y., et al., *Opposing Functions of BRD4 Isoforms in Breast Cancer*. Mol Cell, 2020.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
α	Anti oder alpha
AK	aktinische Keratose
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	<i>basal cell carcinoma</i>
BD1/2	Bromodomäne
BFP	<i>blue fluorescent protein</i>
BID	<i>basic residue-enriched interaction domain</i>
Bp	Basenpaar/e
Brd4	Bromodomänen-enthaltendes Protein 4
BSA	Bovines Serum Albumin
BS	Bindestelle
ca.	circa
CAPS	Cyclohexaminopropansulfonsäure
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CHD4	<i>chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4</i>
CIN	<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
CK2	Casein Kinase2
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CP	<i>crossing point</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRPV	<i>Cottontail rabbit papillomavirus</i>

CS	Kälberserum
C-Ter	C-Terminus
CTM	<i>C-terminal motif</i>
d	Delta
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DDR	<i>DNA damage and repairresponse</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles minimal essentielles Medium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	<i>early</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMSA	Elektromobilitäts-Shift-Assay
ET	Extra-Terminal
EV	<i>Epidermodysplasia Verruciformis</i>
fw	<i>Forward (Primer)</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FRET	<i>Försters resonance energy transfer</i>
gRNA	<i>guidingRNA</i>
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff
HPV	Humanes Papillomvirus
HR	<i>High-risk; hochrisiko</i>
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
JMJD6	<i>Jumonji Domain Containing 6</i>
kb	Kilobase/n
KSHV	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpes virus</i>
LANA	<i>lateny-associated nuclear antigen-1</i>
LB	<i>lysogeny broth</i> - Komplexes Medium zur

	Bakterienkultur
LCR	<i>long control region</i>
L	<i>late</i>
LR	<i>Low-risk</i> ; niedrigrisiko
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
mM	Millimolar
M	Molar (mol/l) oder Marker
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
Min	Minuten
mt oder mut	Mutante
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NCR	<i>Non-coding region</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHK	Normale humane Keratinozyten
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
NMSC	<i>non-melanoma skin cancer</i> , nicht-melanozytärer Hautkrebs
NPS	<i>N-terminal cluster of phosphorylation sites</i>
NSD3	<i>Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 3</i>
N-Ter	N-Terminus
ORF	<i>Open reading frame</i>
Ori	Replikationsursprung
o/n	<i>Over night</i> , über Nacht
pAb	<i>Polyclonal antibody</i>
PAE	Frühes Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Spätes Polyadenylierungssignal
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDID	<i>phosphorylation dependent interaction domain</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PV	Papillomvirus
P-TEFb	<i>positive transcription elongation factor b</i>
qRT-PCR	<i>Qualitative real time PCR</i>
Rb	Retinoblastom
rev	Reverse (Primer)
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	<i>Small interferingRNA</i>
SOC	SOB („Super Optimal Broth“) plus Glukose – komplexes Nährmedium zur Transformation kompetenter Bakterien
SYFP	<i>Super yellow fluorescent protein</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
URR	<i>Upstream regulatory region</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VLP	<i>Virus like particles</i>
v/v	Volumenprozent
WB	Western Blot
w/v	Gewichtprozent

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomstruktur des HPV31.	6
Abbildung 2: Der Lebenszyklus von Papillomviren.	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung von E1 des bovinen Papillomvirus Typ 1 (BPV1). ...	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des E2 Proteins.	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Brd4 und seiner kurzen Isoform Brd4S.....	11
Abbildung 6: Phosphorylierungs-abhängige Konformationsänderung von Brd4 und p53-Interaktion (modifiziert nach Wu S.Y. 2013 [76])......	13
Abbildung 7: Zweite Phosphorylierungs-abhängige Interaktionsstelle zwischen HR- und LR-Papillomvirentypen und Brd4 (modifiziert nach Wu S.Y. 2016 [108]).	16
Abbildung 8: Etablierung der Durchflusszytometrie-basierten FRET Analyse zur Bestimmung der Interaktion von Brd4 und HPV31 E2.....	63
Abbildung 9: Kein Hinweis auf eine zweite Interaktionsstelle von HPV31 E2 in Kombination mit Brd4 oder Brd4 Deletionsmutanten im FACS-FRET Assay.....	64
Abbildung 10: 31 E2 interagiert mit PDID, aber nicht mit BID.	66
Abbildung 11: FACS-FRET-basierte Interaktionsanalyse von HPV16 E2 und CRPV E2 mit PDID	68
Abbildung 12: Die HPV31 E2 S313N/K314D Mutante zeigt einen Funktionsverlust.....	70
Abbildung 13: HPV31 E2 S313N/K314D und HPV16 E2 K306N/K307D interagieren mit PDID und CTM.	73
Abbildung 14: Weblogo des Aminosäuresequenzvergleichs von HR- und LR-E2 Proteinen.	74
Abbildung 15: Die isolierte TAD-Hinge-Domäne von 31 E2 interagiert mit PDID.	75
Abbildung 16: Interaktion von HPV31 E2- und HPV16 E2-Mutanten mit PDID.	77
Abbildung 17: Deletion der BD2, NPS und der Region 505-530 in PDID reduzieren das Interaktionssignal mit HPV31 E2.	79
Abbildung 18: Die Bildung von PDID-Dimeren ist von BD2 und der Region 505-530 abhängig.	81
Abbildung 19: Überexpression von PDID hat einen dominant-negativen Effekt auf die E2-abhängige Transaktivierungsfähigkeit.	83
Abbildung 20: Brd4S-Expression in unterschiedlichen Zelllinien.....	84
Abbildung 21: Nachweis der Interaktion von Brd4S mit HPV31 E2.	86
Abbildung 22: FACS-FRET Analyse zeigt Interaktion von Brd4S-Brd4S und Brd4S-Brd4. ...	87
Abbildung 23: siRNA-basierter Knockdown von Brd4S führt zu einer erhöhten HPV31 E4 ^{L1} Expression.	89
Abbildung 24: Knockdown von Brd4S beeinflusst die Expression der viralen Transkripte in differenzierten CIN612-9E-Zellen nicht.....	91
Abbildung 25: CrisprCas-vermittelter Knockdown von Brd4S in CIN612-9E-Zellen ist nicht stabil.....	92
Abbildung 26: Crispr-vermittelter Brd4S-Knockdown zeigt erhöhte HPV31 E4 ^{L1} -Expression, aber keinen Unterschied in der Genomkopienzahl.	94
Abbildung 27: siRNA-vermittelter Knockdown von Brd4S führt zu einer erhöhten Aktivität des E2-abhängigen Reporters pC18-SP1-Luc.	95
Abbildung 28: Überexpression von Brd4S hat einen dominant-negativen Effekt auf die E2-abhängige Transaktivierungsfähigkeit.	97
Abbildung 29: Intrazelluläre Lokalisation von HPV31 E1 und/oder E2, Brd4 und Brd4S.	99
Abbildung 30: Brd4 und Brd4S werden in HPV31-positive Replikationsfoci rekrutiert.....	100

10 Erklärung über Beiträge zu dieser Arbeit

Folgende Kollegen haben einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet:

Für die Untersuchung der Interaktion von SYFP-PDID mit BFP-HPV31 E2 Proteinmutanten, ebenso wie mit BFP-CRPV E2 wurden folgende Expressionsplasmide von **Dr. Markus Schneider** hergestellt (Abbildung 11 und Abbildung 16):

pmTagBFP – 31 E2 E74A; pmTagBFP – 31 E2 K112A; pmTagBFP – 31 E2 S65A;
pmTagBFP – 31 E2 T93A; pmTagBFP – 31 E2 Y131A; pmTagBFP – 31 E2 Y158A;
pmTagBFP – 31 E2 Y159A; pmTagBFP – 31 E2 Y19A; pmTagBFP – 31 E2 Y87A;
pmTagBFP – CRPV E2.

Die E2-abhängige Reporteranalyse unter der Verwendung der siRNA gegen Brd4S in C33A-Zellen wurde von **Janis Renner** durchgeführt und ausgewertet (Abbildung 27).

11 Akademischer Lebenslauf

11.2016–bis heute	Promotion am Institut für medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten – AG Papillomviren, Universitätsklinikum Tübingen
10.2014–bis 09.2016	Biologie Master Eberhard Karls Universität Tübingen (Note 1,1)
10.2011–bis 09.2014	Biologie Bachelor Eberhard Karls Universität Tübingen Note 1,4)
2009-2010	Technische Biologie Universität Stuttgart
2001–bis 2009	Abitur (Note 1,9), <i>Gymnasium Albstadt-Ebingen</i>

12 Publikationen

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

In Revision (mBio02388-20): **BRD4S interacts with viral E2 protein to limit human papillomavirus late transcription supporting immune evasion and thereby promoting a latent state.**

Yigitliler A., Renner J., Simon C., Stubenrauch F., Iftner T.

Während der Promotion wurde bei folgenden Publikationen mitgewirkt:

An Orf Virus-based therapeutic vaccine for the treatment of papillomavirus-induced tumors.

Schneider M., Müller M., **Yigitliler A.**, Xi J., Simon C., Feger T., Rziha HJ., Stubenrauch F., Rammensee HG., Iftner T., Amann R. J Virol. 2020 May; e00398-20

Cottontail Rabbit Papillomavirus E1 and E2 Proteins Mutually Influence Their Subcellular Localizations.

Schneider M., **Yigitliler A.**, Stubenrauch F., Iftner T. J Virol. 2018 Oct.; e00704-18

13 Danksagungen

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Prof. Dr. Thomas Iftner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten im Forschungsbereich der Papillomviren anfertigen zu können. Ebenso möchte ich mich für die das entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld, sowie für die zahlreichen fachlichen Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Prof. Dr. Frank Stubenrauch für sein großes Engagement mit vielen Ideen zur Umsetzung meines Projektes.

Auch möchte ich Frau **Prof. Dr. Nadine Ziemert** danken für die Betreuung dieser Arbeit durch die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät und die Übernahme der Tätigkeit als Erstgutachterin.

Mein Dank geht auch an alle **Kolleginnen und Kollegen**, sowie den Ehemaligen für die freundschaftliche Atmosphäre und Unterstützung in allen Situationen. Zudem möchte ich mich für die vielen fachlichen Diskussionen und technischen Ratschläge bei allen und besonders bei **Elke Straub** bedanken.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem Kollegen, Freund und Partner **Dr. Markus Schneider**, der mir sowohl während meiner Zeit am Institut uneingeschränkt immer zur Seite stand, aber auch außerhalb jederzeit eine emotionale Stütze und liebevolle Unterstützung war.