

**Der Wirkmechanismus des Replikations-  
Repressorproteins E8<sup>A</sup>E2C bei Human-  
papillomviren**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Ingo Ammermann



Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2008

Dekan: Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter: PD Dr. Frank Stubenrauch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanovic



# Inhalt

Inhalt.....	5
1 Zusammenfassung.....	9
2 Einleitung.....	11
2.1 Das HPVE2 Protein reguliert die virale Transkription ...	14
2.2 Regulation der viralen DNA-Replikation .....	16
2.3 Regulation von Transkription und Replikation durch Chromatinmodifikationen .....	21
2.3.1 Der Histoncode .....	22
2.3.2 Große Komplexe bestimmen das Bild .....	29
2.3.3 SAP, NuRD und ALL1-Komplex.....	29
3 Material und Methoden .....	35
3.1 Häufig verwendete Abkürzungen .....	35
3.2 Material .....	37
3.2.1 Geräte.....	37
3.2.2 Kleingeräte/ Material .....	39
3.2.3 Chemikalien.....	40
3.2.4 Fertige Reagenzsysteme .....	41
3.2.5 Radioaktive Nukleotide .....	41
3.2.6 Enzyme .....	42
3.2.7 Antikörper.....	42
3.2.8 Marker .....	45
3.2.9 Oligonukleotide .....	45
3.2.10 Plasmide und Vektoren.....	45

3.2.11	Bakterienstämme .....	51
3.2.12	Eukaryote Zelllinien .....	51
3.2.13	Medien für Bakterienkultur .....	52
3.2.14	Medien für Zellkultur .....	52
3.2.15	Häufig benutzte Medien und Puffer.....	53
3.3	Methoden .....	54
3.3.1	Mikrobiologische Methoden.....	54
3.3.2	DNA-Methoden .....	55
3.3.3	Zellkultur-Methoden.....	61
3.3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	69
3.3.5	Hefe-Methoden .....	78
4	Ergebnisse.....	80
4.1	HDAC-Inhibitoren können die Transkriptionsrepression durch E8 <sup>Δ</sup> E2C teilweise aufheben .....	80
4.1.1	HC-Toxin und MS-275 führen nicht zu einer verminderten Zellvitalität .....	82
4.1.2	Der HDAC-Inhibitor HC-Toxin induziert Histonacetylierung im eingesetzten Zellsystem .....	85
4.1.3	HDAC-Inhibitoren HC-Toxin und MS-275 heben die transkriptionelle Repression durch E8 <sup>Δ</sup> E2C(1-37)- GAL4 und E8 <sup>Δ</sup> E2C teilweise auf .....	86
4.1.4	HC-Toxin neutralisiert transkriptionelle E8- Repressorfunktion in scc-13 Zellen vollständig .....	91
4.2	Die E8-Domäne interagiert spezifisch mit den Klasse I Histon-Deacetylasen HDAC 1, 2 und 3 .....	92

4.2.1	Affinitätsgereinigte GST-E8 <sup>E2C</sup> -Fusionsproteine weisen einen hohen Reinheitsgrad auf.....	92
4.2.2	Klasse I-Histon-Deacetylasen interagieren in Pull-down-Experimenten mit E8 <sup>E2C</sup> .....	94
4.2.3	HDAC3-GAL4 kann mit GST-E8 <sup>E2C</sup> aus Zellextrakten präzipitiert werden.....	95
4.2.4	Koimmunpräzipitation von HDAC3-STREP und E8 <sup>E2C</sup> (1-37)-GAL4 .....	97
4.2.5	Koimmunpräzipitation von überexprimiertem HDAC3-GAL4 mit E8 <sup>E2C</sup> -Protein A.....	99
4.3	HDAC-Inhibitoren haben keine Wirkung auf die Replikationsrepressionsaktivität von E8 <sup>E2C</sup> .....	100
4.4	Die HDAC-unabhängigen Transkriptionsfaktoren HP1 $\alpha$ , TRIM28 und die KRAB-Domäne hemmen die Replikation des HPV31 Ursprungs .....	103
4.5	TRIM28, aber keines der HP1-Proteine interagiert mit E8-Domäne .....	105
4.5.1	In vitro translatiertes <sup>35</sup> S-TRIM28 bindet im GST-Pulldown an E8 <sup>E2C</sup> .....	106
4.5.2	Endogenes TRIM28 kann mit GST-E8 <sup>E2C</sup> spezifisch aus Gesamtzellextrakten präzipitiert werden.....	108
4.5.3	Koimmunpräzipitation von TRIM28 mit E8 <sup>E2C</sup> -Protein A Fusionsprotein .....	108
4.5.4	Die HP1-Proteine binden nicht an E8 <sup>E2C</sup> .....	110

4.6	Die E8-Domäne interagiert mit Histon-Methyltransferasen	111
4.6.1	<sup>35</sup> S-markiertes, in vitro- translatiertes SUV39H1 bindet in Pulldown-Experimenten an GST-E8 <sup>E2C</sup> .....	112
4.6.2	Überexprimiertes SUV39H1-myc kann mit GST-Proteinen aus Zellextrakten präzipitiert werden .....	113
4.6.3	<sup>35</sup> S-markiertes, in vitro-translatiertes SETDB1 bindet an GST-E8 <sup>E2C</sup> .....	114
4.6.4	Endogenes SetDB1 kann mit GST-Fusionsproteinen aus Zellextrakten präzipitiert werden .....	115
4.7	<i>De novo</i> DNA-Methyltransferase DNMT3a bindet an die E8-Domäne .....	117
4.8	Im Y2H Screen binden Bestandteile großer Proteinkomplexe an E8 <sup>E2C</sup> .....	119
5	Diskussion .....	123
6	Literaturverzeichnis.....	141
7	Akademische Lehrer.....	173
8	Akademischer Lebenslauf .....	174



# 1 Zusammenfassung

Infektionen mit humanen Papillomviren (HPV) induzieren benigne Tumoren der Haut oder Schleimhaut, die besonders bei den so genannten "high risk"-Typen (u.a. 16, 18, 31 und 45) ein großes Risiko der malignen Konversion bedingen. Der Replikationszyklus des Virus ist eng mit dem Grad der Differenzierung der infizierten Epithelzellen verbunden. In den noch undifferenzierten Keratinozyten basaler Hautschichten kommt es zu einer persistenten Infektion, bei der nur eine begrenzte DNA-Replikation und Expression der frühen Virusgene stattfindet.

Die zunehmende Differenzierung der infizierten Zellen verursacht die starke Amplifikation der Virusgenome, Expression der späten viralen Proteine und die Produktion infektiöser Virionen.

Zwei virale, sequenzspezifisch an das HPV-Genom bindende Proteine regulieren dessen Replikation: E2 aktiviert die Replikation und kontrolliert die Genexpression; das durch alternatives Spleißen aus dem E2-Transkript gebildete E8<sup>E2C</sup> des HPV31 ist der regulative Gegenspieler von E2, reprimiert die Replikation und ist ein Repressor des frühen Promotors P97. Die in HPV hoch konservierte, sehr kleine E8-Domäne ist eine übertragbare funktionelle Repressoreinheit, die auch über längere Distanzen wirkt.

Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass E8<sup>E2C</sup> mit zellulären Proteinen wechselwirkt, die an der Umwandlung von aktivem Euchromatin in inaktives Heterochromatin beteiligt sind.

Eine solche Interaktion konnte gezeigt werden für drei Klasse I Histon-Deacetylasen (HDAC1, 2, und 3), den Transkriptionsfaktor und Korepressor TRIM28 sowie die Histon-Methyltransferasen SUV39H1 und SETDB1 und die DNA-Methyltransferase DNMT3a. Die Gabe von HDAC-Inhibitoren konnte die Transkriptionsrepression durch E8<sup>E2C</sup> wieder aufheben, nicht jedoch die Repression der Replikation des HPV31 Ursprungs. Diese Ergebnisse legen nahe, dass E8<sup>E2C</sup> über die Wechselwirkung mit zellulären, Chromatin modifizierenden Proteinen sowohl die Transkription als auch die Replikation des HPV Genoms reprimieren kann.

Die zelluläre Maschinerie zur Heterochromatisierung besteht aus einem eng verflochtenen Netz miteinander interagierender Proteine, die in unterschiedlich stark reversiblen und aufeinander aufbauenden Schritten aktive Gene (Euchromatin) transkriptionell inaktivieren und schließlich dauerhaft stilllegen (Heterochromatin). Die in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner von E8<sup>E2C</sup>, HDAC1, 2 und 3, TRIM28, SUV39H1, SETDB1 sowie DNMT3A, erlauben, einen solchen spezifisch und über größere Entfernungen durch E8<sup>E2C</sup> herbei geführten Pfad – ausgehend von der leicht reversiblen Deacetylierung der Histone über die Methylierung der Histonschwänze und die abschließende Methylierung der DNA im Bereich der E2-Bindestellen – auch für HPV-Genome nachzuvollziehen.

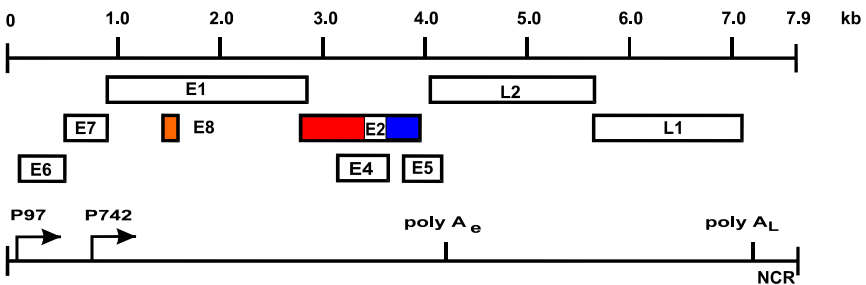
## 2 Einleitung

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

Bisher konnten über 100 verschiedene HPV-Typen identifiziert werden, die einen strikten Gewebetropismus für die verhornende Haut oder Schleimhaut besitzen (Laimins, 1996). Infektionen mit Papillomviren führen zu gutartigen Tumoren der Haut und Schleimhaut, wie Warzen, Kondylomen, Larynx- oder Konjunktivpapillomen. Eine persistierende Papillomvirus-Infektion kann zu einer Progression des Primärtumors über intraepitheliale Neoplasien bis hin zum invasiven Karzinom führen (Walboomers et al., 1994). Die kausale Rolle von humanen Papillomviren bei der Krebsentstehung zeigt die Anwesenheit von HPV-DNA in über 99,7% der Zervixkarzinome (Walboomers et al., 1999). Der häufigste HPV-Typ in diesen Tumoren ist HPV16 (ca. 50% der Fälle), gefolgt von HPV18, 45 und 31 (Walboomers et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind die HPV-Typen 6 und 11 hauptsächlich mit gutartigen Läsionen des Genitalbereichs und niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien assoziiert (Walboomers et al., 1994). Dieses unterschiedliche karzinogene Potential führte zur Klassifizierung in eine Gruppe mit niedrigem ("low risk")

und einer Gruppe mit hohem Risiko ("high risk") für die Entstehung von Tumoren (Stubenrauch und Iftner, 1999).

Das Genom humaner Papillomviren ist sehr ähnlich aufgebaut und besteht aus einer kodierenden und einer nicht-kodierenden Region (Abb. 1). Die kodierende Region enthält die offenen Leserahmen für die frühen ("early", E) Proteine, die bedeutende Funktionen bei der Zelltransformation (E6, E7), der Replikation der viralen DNA (E1, E2) und der Regulation der viralen Promotoren (E2) besitzen sowie der späten ("late", L) Proteine, der Strukturproteine für die Kapsidbildung (L1, L2). Die nichtkodierende Region ("non coding region", NCR oder "upstream regulatory region", URR) spielt eine zentrale



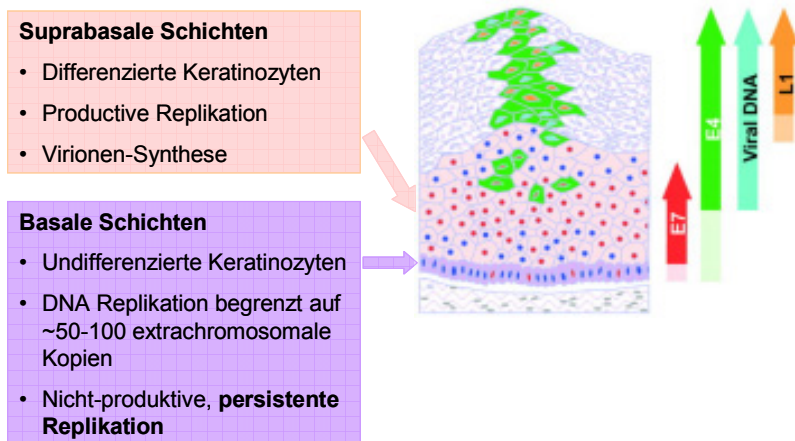
**Abb. 1: Die Genomorganisation von HPV31.**

Die Grafik zeigt im oberen Teil das HPV31 Genom in linearer Form mit den offenen Leserahmen für die frühen ("early", E) und späten ("late", L) viralen Proteine. Charakteristisch ist die überlappende Lage der offenen Leseraster in den drei verschiedenen Leserastern. Der N-terminale Teil von E2 ist in rot und der C-terminale Teil in blau dargestellt. Der Leseraster von E8 ist in orange abgebildet. Der untere Teil der Abbildung stellt die Lage der Promotoren P97 und P742, der frühen und späten Polyadenylierungssignale (poly A<sub>e</sub> bzw. poly A<sub>L</sub>) sowie der regulatorischen, nicht-kodierenden Region (NCR) dar. Der Maßstab zeigt die Größenverhältnisse in Kilobasen (Abb. aus Dissertation Zobel, 2003).

Rolle für die cis-Regulation der viralen Transkription und Replikation. Sie enthält eine Enhancer-Region mit zahlreichen Bindungsstellen für zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren sowie den viralen Replikationsursprung (Kanaya et al., 1997; Laimins, 1996; Sen et al., 2002; Ustav et al., 1991). In der NCR befinden sich im Falle von HPV31 unter anderem Bindungsstellen für das TATA-Box bindende Protein (TBP), SP1, AP1, Oct1, YY1 und TEF1 (Hubert et al., 1999; Kanaya et al., 1997; Sen et al., 2002).

Die Expression der polycistronischen Transkripte des HPV31 wird durch den frühen Promotor P97 und den späten Promotor P742 reguliert (Hummel et al., 1992) (Abb. 1).

Die Expression der Strukturproteine und die Produktion infektiöser



**Abb. 2: Zelldifferenzierungsabhängige Replikation von HPV.**

Mit der Differenzierung der Hautschichten schlägt die Replikation des HPV um von persistenter Replikation in produktive Replikation. (Abbildung modifiziert nach Middleton et al., 2003)

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

Die frühen Proteine E6 und E7 spielen eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese durch Papillomviren. Im späten viralen Lebenszyklus der hoch karzinogenen „high risk“ Papillomaviren ermöglicht die Expression von E6 und E7 in differenzierten Keratinozyten eine Reaktivierung des Zellzyklus und der DNA-Synthese, die die Amplifikation der viralen DNA gestattet (Laimins, 1996). In HPV-positiven Zervixkarzinomen kann eine kontinuierliche Expression der E6/E7-Gene nachgewiesen werden (Jeon und Lambert, 1995; Schwarz et al., 1985).

## **2.1 Das HPVE2 Protein reguliert die virale Transkription**

Das E2 Protein humaner Papillomviren wirkt als positiver und negativer Regulator der viralen Transkription. E2 besteht aus einer aminoterminalen Domäne, die für die Transaktivierung der viralen Promotoren sowie für die virale DNA-Replikation benötigt wird, einer

zentralen "Hinge"-Region, die ein Kernlokalisierungssignal enthält, sowie der carboxyterminalen Domäne, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlich ist (McBride et al., 1991). Die E2 Proteine genitaler HPV-Typen binden als Dimere an vier in der NCR gelegene E2-Bindungsstellen (E2BS) mit der Konsensussequenz ACCN<sub>6</sub>GGT (McBride et al., 1991). Die E2-Bindungsstellen ermöglichen eine Bindung von E2 mit hoher Affinität.

Im Verlauf des Lebenszyklus vermitteln die E2-Bindungsstellen unterschiedliche Funktionen:

- Auf **Transkriptionsebene** bewirkt die Bindung von E2 an die promotor-proximalen E2-Bindungsstellen 3 und 4 eine Repression des frühen viralen Promotors (Dong et al., 1994; Romanczuk et al., 1990; Thierry und Howley, 1991; Stubenrauch, 2001). Diese Repression erfolgt durch die Verdrängung zellulärer Transkriptionsfaktoren (SP1, TBP) von ihren in unmittelbarer Nähe der E2BS gelegenen Bindungsstellen (Demeret et al., 1997; Dong et al., 1994; Stubenrauch et al., 1996; Tan et al., 1994) oder durch eine direkte Wechselwirkung von E2 mit dem basalen Transkriptions-Initiationskomplex, die zur Verdrängung der basalen Transkriptionsmaschinerie führt (Hou et al., 2000).
- Die E2BS1, 3 und 4 von HPV31 nehmen eine zentrale Rolle ein bei der Etablierung und stabilen Erhaltung der episomalen **Replikation** (Stubenrauch et al., 1998a).

Zervixkarzinomzellen enthalten oft chromosomal integrierte HPV-DNA oder eine Mischung aus integrierter und episomaler Virus-

DNA (Park et al., 1997). Die Integration der Virus-DNA unterbricht oftmals den E2-Leserahmen und kann dadurch zu einer unkontrollierten Expression der E6/E7-Onkoproteine beitragen (Park et al., 1997; Schneider-Maunoury et al., 1987).

## **2.2 Regulation der viralen DNA-Replikation**

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

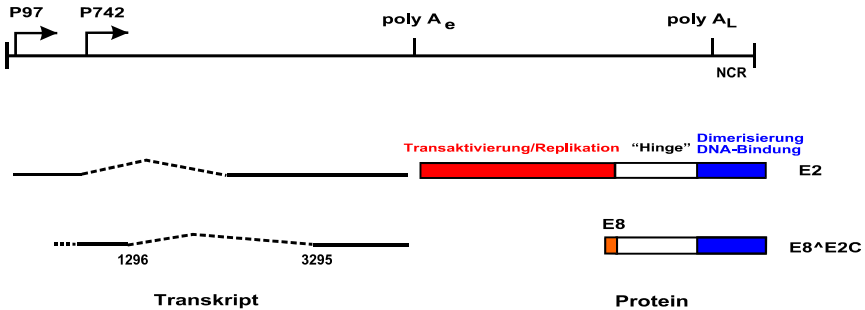
Humane Papillomviren replizieren im Gegensatz zur zellulären chromosomalen DNA oder dem Genom anderer humanpathogener Viren (z..B. des Epstein-Barr-Virus) nicht nur einmal pro Zellzyklus. Die Aufrechterhaltung der konstanten viralen Genom-Kopienzahl während der nicht-produktiven Phase der Infektion erfordert eine Kontrolle der Kopienzahl, deren exakter Mechanismus noch unklar ist (Gilbert und Cohen, 1987; Piirsoo et al., 1996). Erste Hinweise lieferte der Befund, dass neben dem E2 Protein bei verschiedenen Papillomvirus-Typen weitere Transkripte für kurze oder alternativ



gespleisste E2 Proteine nachgewiesen werden konnten. Das Rinderpapillomvirus Typ1 (BPV1) besitzt neben E2 mindestens zwei weitere E2 Proteine: ein verkürztes E2 Protein (E2C oder E2TR), das nur aus Teilen der "Hinge"- und der C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne besteht sowie ein alternativ gespleisstes Protein, bei dem ein kurzer offener Leserahmen (E8) im Bereich des E1-Gens an den C-Terminus von E2 gespleisst wird (E8-E2) (Choe et al., 1989; Hubbert et al., 1988; Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1989). Kotransfektionsstudien von E2TR oder E8-E2 mit E2 zeigten eine Repression der Transaktivierung durch E2 (Lambert et al., 1987; Lambert et al., 1990). Der Verlust von E2C im BPV-Genom führte zu einer 10- bis 20-fach höheren DNA-Kopienzahl in transformierten Zellen (Lambert et al., 1990; Riese et al., 1990). Diese Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung des E2C Proteins als Repressor der viralen Replikation und Transkription von BPV hin. Der Verlust von E8-E2 im BPV-Genom zeigte dagegen keine phänotypische Auswirkung (Lambert et al., 1990). Im Gegensatz dazu führte die Kombination beider Mutationen zu einer geringeren stabilen Genom-Kopienzahl und zu einer reduzierten Transformationshäufigkeit (Lambert et al., 1990). Die Rolle der BPV E2-Repressorproteine im viralen Lebenszyklus ist damit sehr komplex und bleibt weiter unklar.

Bisher konnten bei den hoch-karzinogenen HPV-Typen 16, 31 und 33 (Doorbar et al., 1990; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000) sowie dem niedrig-karzinogenen HPV11 (Chiang et al., 1991; Rotenberg et al., 1989) Transkripte nachgewiesen werden, die dem

alternativ gespleissten E8-E2 von BPV ähneln. Ein dem E2C von BPV entsprechendes Transkript wurde bei humanen Papillomviren



### **Abb. 3: Die E2 Proteine von HPV31.**

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

bisher nicht nachgewiesen.

Das Transkript für E8<sup>E2C</sup> von HPV31 konnte zuerst aus der Zelllinie CIN612-9E isoliert werden, in der HPV31 mit etwa 100 Kopien stabil episomal repliziert wird (Stubenrauch et al., 2000). Es enthält einen offenen Leserahmen mit einem einzelnen ATG-Startkodon bei Nukleotid-Position (nt) 1259 des HPV31 Genoms, benutzt eine Spleissdonor-Stelle bei nt 1296 und wird an eine Spleissakzeptor-Stelle bei nt 3295 gespleisst (Stubenrauch et al., 2000)(Abb. 3).

Gespleisste Transkripte für E8<sup>E2C</sup> sind nach einer Infektion von immortalisierten Keratinozyten mit HPV31-Virionen schon sehr früh nachweisbar (Ozbun, 2002).

Das E8<sup>E2C</sup> Protein besteht aus einer N-terminalen E8-Domäne von 12 Aminosäuren, die mit der "Hinge"- und DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne von E2 verknüpft ist (Abb. 2). Transiente Replikationsstudien mit genomischen HPV31-E8ATG und Spleissdonor-Mutanten sowie Mutanten mit einem Stoppkodon im N-Terminus von E8<sup>E2C</sup> zeigten eine um das 30-40fach erhöhte Replikation verglichen mit dem HPV31 WT-Genom (Stubenrauch et al., 2000). HPV31 E8<sup>E2C</sup> reprimiert auch die E1/E2-vermittelte transiente Replikation eines Reporterplasmids, das nur die NCR mit dem Replikationsursprung von HPV31 enthält (Stubenrauch et al., 2000). Transiente Luziferase-Reporteranalysen zeigten, dass E8<sup>E2C</sup> die Transaktivierung des frühen SV40 Promotors durch E2 reprimiert (Stubenrauch et al., 2000). Diese Ergebnisse entsprachen dem gängigen Modell, nach dem die Aktivität von E2 durch Bindungsstellenkompetition oder Heterodimerisierung mit E2-Repressorproteinen moduliert wird (Barsoum et al., 1992; Bouvard et al., 1994; McBride et al., 1989; Lim et al., 1998). Allerdings reprimiert E8<sup>E2C</sup> den frühen Promotor P97 im Kontext der gesamten NCR von HPV31 auch in Abwesenheit von E2 (Stubenrauch et al., 2000).

Stubenrauch et al (2001) zeigten in Mutationsanalysen der vier E2 Bindungsstellen (E2BS) im P97 Promotor, dass das E8<sup>E2C</sup> Protein, im Gegensatz zu E2, eine E2BS-abhängige, transkriptionelle Fernre-

pressionsaktivität besitzt, für welche die unter HPV hochkonservierte E8<sup>E2C</sup>-Domäne verantwortlich ist. E8<sup>E2C</sup> konnte auch den HPV6a P2 Promotor, den minimalen frühen SV40 Promotor und den minimalen späten Adenovirus Hauptpromotor in Anwesenheit von E2BS wirkungsvoll reprimieren. Eine "Alanin-Scanning"-Mutagenese der E8-Domäne identifizierte die Aminosäuren W6 und K7 als spezifisch für die Ferndistanzrepressionsaktivität. Die Mutation der Aminosäuren W6 und K7 von E8<sup>E2C</sup> im HPV31 Genom ergab eine den HPV31 E8<sup>E2C</sup> „Knock-out“-Mutanten ähnlich starke Überreplikation der Genome. Die Überreplikation war nicht eine Folge einer erhöhten viralen Genexpression, was auf eine direkte Beteiligung von E8<sup>E2C</sup> bei der Inhibition der DNA-Replikation schließen ließ (Zobel et al 2003). Fusionsproteine der ersten 12, 21 und 37 Aminosäuren von E8<sup>E2C</sup> mit der heterologen GAL4-DNA-Bindungsdomäne identifizierten die ersten 21 Aminosäuren als minimale Repressionsdomäne für virale DNA-Replikation. Interessanterweise genügten davon abweichend bereits die ersten 12 Aminosäuren für die annähernd vollständige Repression der Transkription (Zobel et al 2003). Diese Experimente zeigten, dass die zunächst angenommenen passiven Mechanismen wie Bindungsstellenkompetition und Ausbildung von inaktiven Heterodimeren zwischen E2 und E8<sup>E2C</sup> Proteinen nicht zur Replikationskontrolle bei HPV31 beitragen.

Zobel et al. (2003) untersuchten schließlich auch die Wirkung der übertragbaren minimalen GAL4-gekoppelten E8-Repressordomäne auf die Replikation des mit GAL4-Bindestellen versehenen EBV

oriP, der aufgrund der vollständigen Abhängigkeit von der zellulären Replikationsmaschinerie und deren Kontrollmechanismen nur einmal pro Zellzyklus repliziert wird. Aus der auch für den oriP durch E8 vermittelten Replikationsrepression schließen Zobel et al. auf einen über HPV31 hinaus gültigen, durch E8 gesteuerten Repressionsmechanismus für extrachromosomal replizierende karzinogene Viren des Menschen.

### **2.3 Regulation von Transkription und Replikation durch Chromatinmodifikationen**

Viele in den letzten Jahren veröffentlichten Untersuchungen weisen auf ein Netzwerk sich selbst verstärkender Interaktionen hin, die zur Modifikation von die DNA umgebenden Histonen führen. Diese Chromatinmodifikationen und die damit verbundene Umorganisation des Chromatins (Chromatin Remodeling) von transkriptionell aktivem Euchromatin zu inaktivem Heterochromatin rückte immer stärker in den Fokus als zentrales Instrument zur Regulation der Genexpression und später auch der Replikation.

Vieles von dem heute bekannten Wissen über Heterochromatin wurde mit Untersuchungen der Polytän-Chromosomen von *Drosophila* erworben. Die meisten Eigenschaften und Grundregeln des Heterochromatins scheinen auch in den meisten anderen Eukaryoten gültig zu sein. Viele Faktoren sind zwischen *Drosophila*, fission yeast und budding yeast konserviert. In Vertebraten kommen die CpG-

Methylierung und die damit assoziierten Proteine zum zellulären Werkzeugkasten dazu.

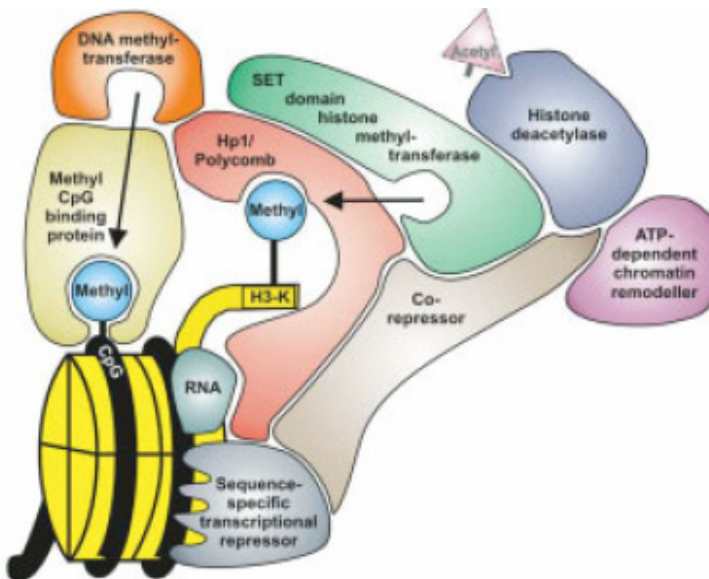
Konstitutives Heterochromatin bleibt während der gesamten Lebenszeit eines Organismus kondensiert. Dagegen verbringt fakultatives Heterochromatin einen Teil seiner Zeit als Euchromatin und wird kondensiert, wenn Gene permanent unterdrückt werden sollen.

Beide Arten von Heterochromatin bestehen aus einer Reihe von Faktoren, die gemeinsam eine kooperative und selbst-verstärkende Organisation innerhalb des Heterochromatins bilden. Zwischen den einzelnen Proteingruppen besteht eine Vielzahl von Wechselwirkungen und Bindungen. Sie werden hier kurz eingeführt in der allgemein angenommenen Position, die sie in der „Befehlskette“ einnehmen, die am Ende zur Heterochromatisierung und somit zum Silencing eines Gens führt.

### **2.3.1 Der Histoncode**

Durch eine Vielzahl – meist reversibler – Modifizierungen an den Histonen und auch an der DNA selbst entsteht ein Muster, das in seiner Summe durch Enzyme interpretiert werden kann und selbst durch biochemische Eigenschaften (z.B. durch die negativen Ladungen eingeführter Acetylreste an den N-terminalen Histonschwänzen) zur Änderung der Histonstruktur und so zur Steuerung der Expression beiträgt. Die wichtigsten Spieler sind:

- DNA-spezifische Transkriptionsfaktoren (Repressoren oder Aktivatoren) leiten Veränderungen des Chromatins ein. Nach ihrer Bindung an einen Promotor initiieren sie die Akkumulation wei-



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines möglichen zur Heterochromatisierung führenden Proteinkomplexes**

(aus: Craig 2005).

terer Faktoren. Auch wenn einige Transkriptionsfaktoren direkt an andere Komponenten des Heterochromatins binden, spielt meist ein Korepressor eine zentrale Rolle im weiteren Geschehen, indem er an den Transkriptionsfaktor bindet und weitere Komponenten rekrutiert. Ein zentraler Korepressor mit einer großen Zahl weiterer Interaktionspartner ist das Protein TRIM28 (Jepsen und Rosenfeld 2002, Burke und Banihmad 2000).

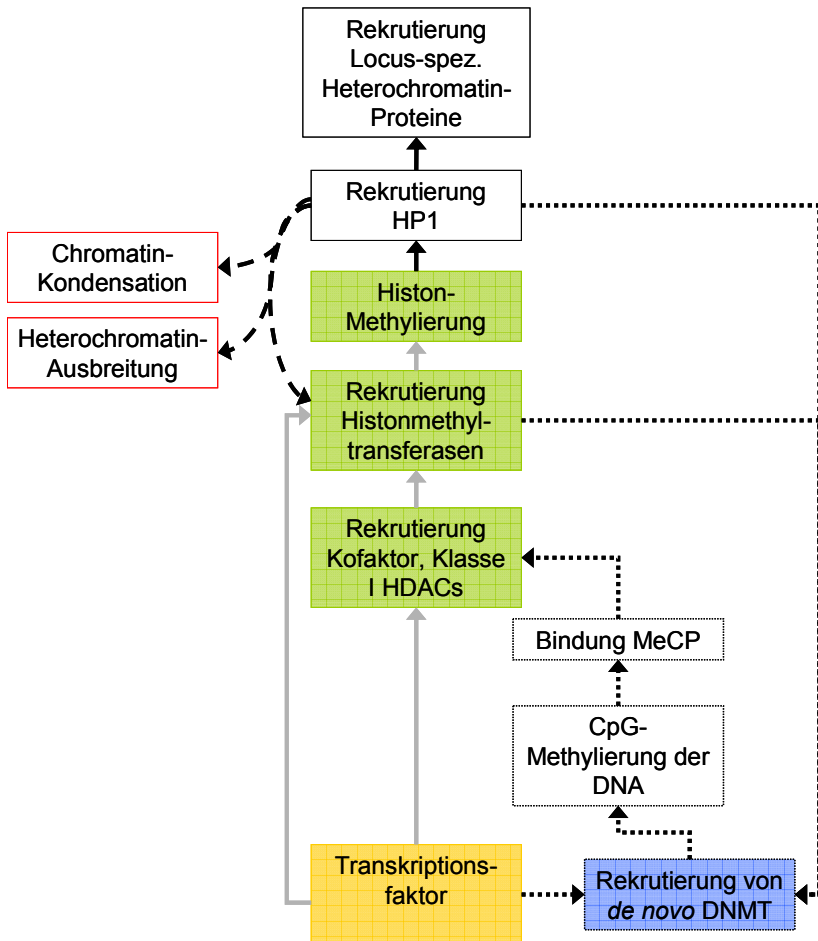
- Histon-Deacetylasen (HDACs) können von transkriptionellen Repressoren bzw. Korepressoren sowie von an methylierte DNA

bindenden Proteinen rekrutiert werden. Sie entfernen die i.d.R. an N-terminale Lysinreste gebundenen Acetylgruppen von Histonen und sind somit die regulativen Gegenspieler der Histon-Acetyltransferasen (HATs), die neue Acetylgruppen an Lysinresten einführen. Das Ausmaß der Histon-Acetylierung unterliegt während des Zellzyklus einem ständig schwankenden und sehr dynamischen Gleichgewicht (Ayer 1999). HDACs bilden sowohl Homo- als auch Heterodimere und makromolekulare Komplexe mit anderen Komponenten des Heterochromatins. Die beiden wichtigsten Komplexe sind SIN3 und NuRD, beide enthalten HDAC1 und 2 (Ahringer 2000, Narlikar 2002).

- Die Histonmethylierung an bestimmten Lysinresten wird durch Histonmethyltransferasen (HMTs) ausgeführt (Jenuwein et al 2001, Cao et al 2004, Sims et al 2003). Die meisten HMTs enthalten eine SET-Domäne. Verschiedene HMTs methylieren sowohl unterschiedliche als auch dieselben Lysinreste, die dadurch eine bis drei Methylgruppen erhalten können (Sims et al 2003). Es wird angenommen, dass die zahlreichen möglichen Variationen entscheidend sind für die Ausbildung eines feingliedrigen Histonkodes, mit dem verschiedene genetische Loci für eine spezifische Zusammensetzung von Faktoren gekennzeichnet werden (Jenuwein et al 2001).
- Heterochromatinprotein 1 (HP1) ist ein Adaptorprotein, das verschiedene Heterochromatin-Komponenten am Chromatin zu großen makromolekularen Komplexen verbindet. Die drei Isoformen



von HP1 (HP1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sind strukturelle Komponenten des Heterochromatins und binden methylierte Histone und die für die Methylierung verantwortlichen



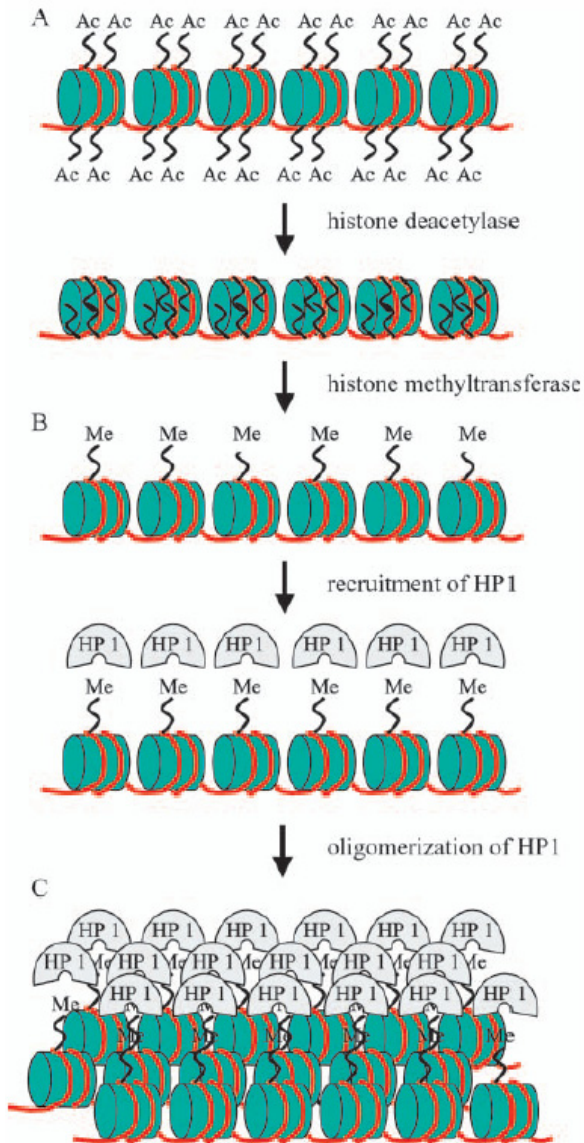
**Abb.5 (nach Craig 2004): Schematische Zusammenfassung der Wege zum Aufbau und Erhalt von Heterochromatin bei Säugern**

Beiträge hierzu leisten Histon-Deacetylierung und -Methylierung (graue Pfeile), DNA-Methylierung (gepunktete Pfeile). Durch die anschließende Rekrutierung von HP1-Proteinen wird das Heterochromatin kondensiert und so dauerhaft erhalten (schwarze Pfeile); über die Oligomerisierung von HP1 kann sich das Heterochromatin zudem entlang der Chromatinachse ausbreiten (unterbrochene Pfeile).

HMTs. HP1 und Polycomb haben eine homologe Domäne, die Chromodomäne. Die Interaktion zwischen HP1, HMTs und methylierten Lysinresten der Histone ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung und den Erhalt des Heterochromatins (Lachner et al 2001); das bestuntersuchte Beispiel hierfür ist die Bindung HP1-SUV39H1-H3-K9(methyl)<sub>3</sub>.

- Vertebraten-DNA kann am Cytosin des Dinukleotids CpG durch DNA Methyltransferasen (DNMTs) methyliert werden (Bird 2002, Meehan 2003, Wade 2001). Säugetiere haben zwei Arten von DNMTs. DNMT3a/b sind *de novo* DNMTs (Okano et al 1999, Ramsahoye et al 2000) und erreichen ihre höchste Expression in der frühen Embryogenese (Bird 2002, Wade 2001). DNMT1 dagegen ist eine Wartungs-DNMT, die unmittelbar bei der Replikation den neuen Strang methyliert (Chuang et al 1997). Methyl CpG-bindende Proteine (MeCPs) spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung transkriptioneller Repression, indem sie Proteine des Heterochromatins binden und zu den methylierten CpG Inseln rekrutieren. Die wichtigsten humanen MeCPs sind MeCP2 und MBD1/2. Diese haben auch eine transkriptionelle Repressordomäne, die Korepressoren, HDACs und ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Proteine rekrutieren kann (Wade 2001).

Es wird angenommen, dass die CpG-Methylierung der DNA in der Regel am Ende der Heterochromatisierung steht und die Inaktivierung des Chromatins dauerhaft stabilisiert (Bird 2002, Wade



**Abb. 6: Schematischer Ablauf der Heterochromatinisierung.**

Aus: Thiel et al. 2004

2001). Es gibt jedoch auch einige Beispiele, bei denen die DNA-Methylierung vorausgeht und unmittelbar das Silencing einer DNA-Sequenz einleitet (Ohlsson et al 2001, Takizawa et al 2001).

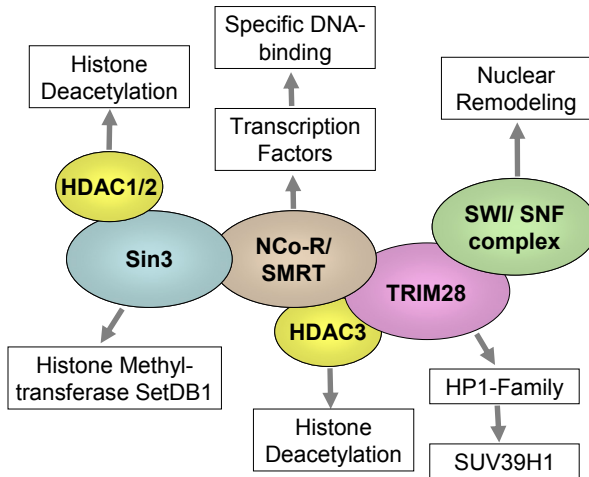
### **2.3.2 Große Komplexe bestimmen das Bild**

In dem dynamischen Forschungsfeld des Chromatin Remodeling wird immer deutlicher, dass nicht einzelne Proteine die Aktivierung oder Deaktivierung eines Promotors vermitteln. Vielmehr werden diese Funktionen von großen Proteinkomplexen übernommen, bei denen eine sehr variable Zahl unterschiedlicher Proteine mit vielfältigen unterschiedlichen Funktionen und Aktivitäten an ein Gerüst gebunden sind. Über unterschiedliche Adaptorproteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren wird ein solcher Komplex spezifisch an einen Promotor rekrutiert und in seiner Zusammensetzung beeinflusst. Die zwei am besten bekannten Proteinkomplexe sollen hier in vereinfachter Form dargestellt werden. In beiden Proteinkomplexen wurden HDAC1 und HDAC2 gefunden, die jeweils einen Kern der Komplexe bilden. Daneben kommen HDACs jedoch auch ungebunden vor.

### **2.3.3 SAP, NuRD und ALL1-Komplex**

Im SIN-assoziierten Protein-Komplex (SAP) ist Sin3 das Gerüst eines größeren Komplexes mit i.d.R. acht Proteinen und einem bis zwei MDa Proteinmasse. Im so genannten Kernkomplex, der von

Hefe bis zum Mensch konserviert ist, sind immer die HDACs 1 und 2 sowie RbAp46 und RbAp48 enthalten. SAP30, SAP18 und SDS3 stabilisieren den Komplex und binden direkt SIN3, HDAC1 und andere Proteine (Hassig et al 1997, Laherty et al 1997, Zhang et al



**Abb. 7: SAP (SIN-assoziierter Proteinkomplex) und seine Funktionen**

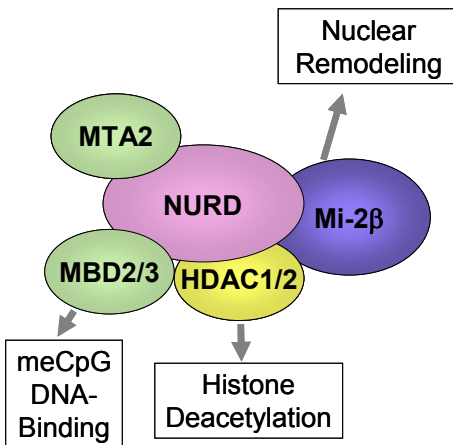
(nach Silverstein et al 2005)

1997, Zhang et al 1998, Dorland et al 2000, Lechner et al 2000). Über die Korepressoren N-CoR und/ oder SMRT wird der Kontakt zu Transkriptionsfaktoren und somit eine spezifische Bindung an Chromatin-DNA vermittelt. Über das Gerüstprotein Sin3 können eine Reihe weiterer Proteine rekrutiert und zusätzliche Funktionen vermittelt werden, unter anderem die Histonmethyltransferase SETDB1 (Yang et al. 2003), Nukleosome Remodeling über SWI/

SNF (Sif et al 2001), DNA-Methyltransferasen und A-acetylglucosamin-Transferase (Yang et al 2002).

Der SIN3-Komplex kann somit spezifisch die Initiation der Replikation am Replikationsursprung oder die Genexpression einzelner Gene reprimieren.

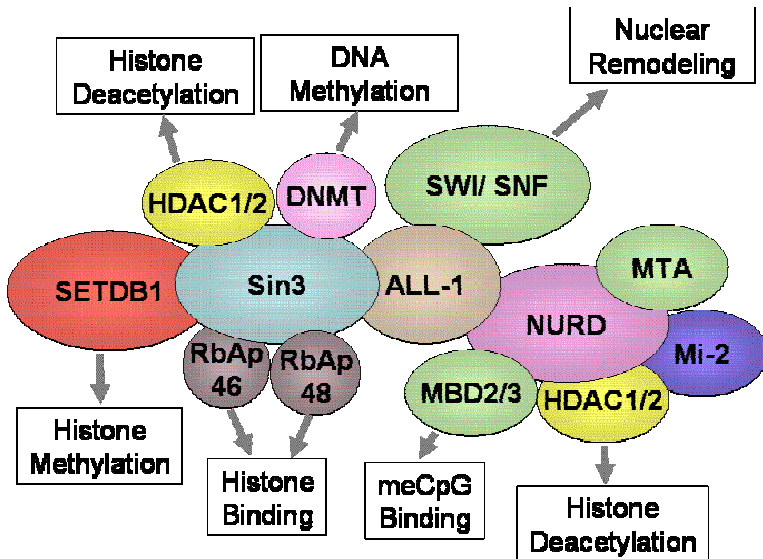
Der zweite große Proteinkomplex ist der NuRD-Komplex, der ebenfalls HDAC1/2 enthält und ein Gesamtgewicht von 1-2 MDa umfasst. Daneben sind die DNA Helikase/ ATPase MI-2 $\beta$  (synonym CHD4), MBD3 (mit einer an methylierte DNA bindenden Domäne homolog zu MeCP2) und MTA-2 enthalten Für diesen Komplex



wird eine von SAP unterschiedliche Funktion angenommen (Knoepfler und Eisenman 1999). NuRD wirkt wahrscheinlich sehr viel regionaler, d.h. großräumiger und reprimiert verhältnismäßig weite Chromatin-Bereiche über größere Entfernungen.

**Abb. 8: NuRD-Komplex und seine Funktionen**

(nach Silverstein et al 2005).



**Abb. 9: ALL1-Komplex und seine Funktionen**

(nach Silverstein et al 2005).

Nakamura et al. gelang es 2002, einen riesigen Proteinkomplex aufzureinigen, der die enzymatischen Fähigkeiten verschiedener Komplexe vereinte, 27 Proteine enthält und signifikant größer ist als 2 MDa (Silverstein RA, Ekwall K 2005): Im so genannten ALL-1 Komplex wurden neben der namensgebenden Methyltransferase ALL-1 der SIN3/ HDAC-Komplex (SIN3A, RBAP48/46, HDAC1/2, SAP30, SAP18), der nuclear Remodeling-Komplex SWI/SWF (BRM, BAF170, BAF155, INI1, hSNF2H), der TFIID-Präinitiations-Komplex (TAFII250, TAFII80, TAFII31, TAFII20, TBP, CPSF, U5snRNP, Simplekin) und der NuRD-Remodeling Komplex (MI-2,



MTA1-L1, KIAA0601, MBD3, RBAP48/46, HDAC1/2) gefunden. Der gesamte Komplex konnte hier jeweils vollständig mit Antikörpern gegen SIN3, BRM oder ALL1 und unabhängig von DNA-Bindung affinitätsgereinigt werden (Nakamura et al 2002).

Ziel dieser Arbeit war vor dem Hintergrund des von Zobel et al 2003 postulierten, über HPV hinaus gültigen Mechanismus zur Repression viraler Replikation die genauere Untersuchung des Wirkmechanismus des Repressorproteins HPV31 E8<sup>E2C</sup>.

Da für einen auch auf andere Viren und insbesondere für einen auf EBV übertragbaren Mechanismus eine Interaktion mit zellulären Faktoren anzunehmen war, stand vor allem die Suche nach zellulären Interaktionspartnern von E8<sup>E2C</sup> im Vordergrund. Aufgrund der sehr geringen natürlichen Expression des E8<sup>E2C</sup>-Proteins und der damit verbundenen Schwierigkeiten beim Nachweis potenzieller Interaktionspartner *in vivo* wurde bevorzugt eine Reihe biochemischer Ansätze verfolgt, insbesondere GST-Pulldowns mit radioaktiv markierten Proteinen sowie Koimmunpräzipitationen aus Zellkultur-extrakten. Mittels eines genetischen Screens sollten weitere mögliche Interaktionspartner identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten zu einem besseren Verständnis der negativen Regulation der Replikation von karzinogenen high risk HPV beitragen, die Voraussetzung ist zum Einen für die lange Persistenzphase und die langfristige Stabilität der episomalen Genome und zum Anderen für die stark begrenzte Transkription der viralen Onkogene in dieser Zeit.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Häufig verwendete Abkürzungen

A	Ampere
AMPS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Tissue Type Culture Collection"
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BPV	Rinderpapillomvirus
BS	Bindungsstelle
BSA	Rinderserum-Albumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CBD	Zellulose-Bindungsdomäne
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute ("counts per minute")
CRPV	"Cottontail rabbit"-Papillomvirus
CS	Kälberserum
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes, minimal essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang, doppelsträngig

DTT	Dithiothreitol
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GST	Glutathion S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPK	Humane primäre Keratinozyten
HPV	Humanes Papillomvirus
HRPO	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
luc	Luziferase-Gen
$\mu$	micro
M	Molar
MG	Molekulargewicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Normal
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS	Polystyren
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
V/V	Volumen-/Volumenverhältnis
W/V	Gewichts-/Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

## 3.2 Material

### 3.2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotkammer, klein	Transblot	BioRad
Blotkammer, gross	Transblot	BioRad
CO <sub>2</sub> -Inkubator	US Airflow	NuAire

Durchlichtmikroskop	DM IRB	Leica
Feinwaage	GJ und 770	Kern
Horizontal-EP-Kammer (DNA-Gele)	Sub Cell GT; Mini- Sub Cell GT ; Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
Hybridisierungsofen	Mini 10	Hybaid
Inkubator	Inkubator C 200	Labotect
Kamerasystem (DNA- Gele)	Gel Doc 2000	BioRad
Kamerasystem (Protein- gele)	Fluor-S Multi Imager	BioRad
Luminometer	Lumat LB 9507	EG & G Berthold
PCR-Maschine	PTC 200	MJ Research
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf
Phosphoimager	Fujifilm BAS-1800	Fuji
Pipetten	Pipetman 10, 20, 200 und 1000	Gilson
Schüttelinkubator	Certomat IS	B. Braun Biotech International
Schüttler	Thermomixer 5436 ThermoStat Plus Rocky 3D	Eppendorf Eppendorf
Sequenzer	ABI Prism 310 Ge- netic Analyser	Perkin-Elmer

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

### **3.2.2 Kleingeräte/ Material**

Gel-Blotting-Papier	Blotting Paper P-7921 15*15	Schleicher&Schüll Sigma
Faltenfilter	MN 403¼; 11cm Durchm.	Macherey&Nagel
Kryoröhrchen	Cellstar Cryo.s	Greiner
Nitrocellulose- Membran	Protran 0,2 µm	Schleicher&Schüll

Nylon-Membran	GeneScreenPlus	NEN
PCR-Reaktionsgefäße	PCR-Softtubes 0,2ml, FD	Biozym
Plastikküvetten	UVette	Eppendorf
Plastikpipetten	2, 5, 10, 25, 50 ml	Becton/Dickinson
PS-Röhrchen steril	55*12mm;3,5ml	
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Sterilfilter	0,2 µm	Millipore
Zählkammer	Neubauer; 0,100mm Tiefe; 0,0025mm <sup>2</sup>	Assistent
Zellkulturplatten	6x 35mm	Becton/Dickinson
Zellkulturschalen	35 mm	Nunc
	60 mm, 100 mm	Becton/Dickinson
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Becton/Dickinson

### **3.2.3 Chemikalien**

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- BioRad
- Biozym
- Calbiochem
- Fluka
- Medac
- Merck
- Peqlab
- Perkin-Elmer



- Roche
- Roth
- Sigma

### **3.2.4 Fertige Reagenzsysteme**

- BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer)
- DNA-Ligation Kit Ver. II (Takara)
- ECL™-Chemilumineszenz-Kit (Amersham Pharmacia)
- SuperSignal West Pico (Pierce)
- NucTrap Probe Purification Columns (Stratagene)
- Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- Plasmid Mini Kit (Qiagen)
- Plasmid Midi Kit (Qiagen)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- WST-1 Cell Proliferation Reagent (Roche)
- TNT Quick Coupled Transcription/ Translation Systems für T7 bzw. SP6 Promotor (Promega)

### **3.2.5 Radioaktive Nukleotide**

Folgende radioaktive Reagenzien wurden von Amersham Pharmacia bezogen:

- $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, 10 mCi/ml
- <sup>35</sup>S-Cystein, 1 mCi
- <sup>35</sup>S-Methionin, 1 mCi

### **3.2.6 Enzyme**

#### **3.2.6.1 Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Invitrogen
- MBI Fermentas
- New England Biolabs

#### **3.2.6.2 Sonstige Enzyme**

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

### **3.2.7 Antikörper**

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper, die Bezugsquellen und die jeweils eingesetzten Verdünnungen im Western Blot angegeben.

#### **3.2.7.1 Primärantikörper**

Antigen	Quelle	Firma	Verdünnung im Western
---------	--------	-------	--------------------------

Antiserum 99 (AS 58-75 von HPV31E8^E2)	Chicken polyclonal	Davids Biotech- nology	1:1.500
Acetyl-Histon H3	Rabbit polyclonal	Upstate #06-599	1:1.500
Acetyl-Histon H4	Rabbit an- tiserum	Upstate #06-866	1:1.500
c-myc	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT #sc-40	1:1.500
DNMT3a	Rabbit poly- clonal	Novus Biologicals #NB 100-265	1:1.000
FLAG M2	Mouse monoclonal	Sigma #F3165	1:20.000- 1:40.000
GAL4 (DBD)	Rabbit poly- clonal	Santa Cruz BT #sc-577	1:1.500
GAL4 (DBD)	Mouse monoclonal, Ag-conj.	Santa CruzBT #sc-510	Für IPs 20 µl beads
GAL4 (DBD)	Mouse monoclonal HRP-conj.	Santa Cruz BT	1:1.500
GST	Rabbit poly- clonal, HRP- conj.	Santa Cruz BT #sc-459	1:1.500
HA-probe	Rabbit poly-	Santa Cruz BT	1:1.500

	clonal	#sc-805	
HDAC3	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT #sc-17795	1:1.000
Trimethyl-Histone H3	Rabbit polyclonal	Upstate #07-442	1:1.500
HP1 $\alpha$	Mouse monoclonal	Upstate #05-689	1:1.500
TRIM28 (=KRIP-1)	Mouse monoclonal	Transduction Laboratories #K57620	1:1.500
mSETDB1 (=ESET)	Rabbit polyclonal	Upstate #07-378	1:1.500
SUV39H1	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT #sc-23961	1:500

### 3.2.7.2 Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper

Antigen	Quelle	Firma	Verdünnung im Western
Rabbit	Swine	DAKOCytomation #0399	1:3.000
Mouse	Rabbit	DAKOCytomation #0260	1:3.000
Chicken IgY	Goat	Jackson Immuno Research Lab.	1:3.000

		#703-035-155	
--	--	--------------	--

### **3.2.8 Marker**

#### **3.2.8.1 DNA-Längenstandards**

- 50 bp-DNA-Leiter (New England Biolabs)
- 1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen)
- $\lambda$ -HindIII-Fragmente (Invitrogen)

#### **3.2.8.2 Protein-Größenstandards**

- SeeBlue Plus2 (Invitrogen)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

### **3.2.9 Oligonukleotide**

#### **3.2.10 Plasmide und Vektoren**

- pC18-SP1-4xGAL4 (Zobel et al., 2003): vom Luziferase-Reporterplasmid pAluc (Dong et al., 1994) abgeleitetes Plasmid, das vier synthetische GAL4-Bindungsstellen, vier synthetische E2-Bindungsstellen und zwei synthetische SP1-Bindungsstellen 5' von der TATA-Box und dem Initiator-Element des späten Adenovirus-Hauptpromotors enthält.
- pET42b(+) (Novagen): IPTG-induzierbarer bakterieller Expressionsvektor, der die Überexpression von GST- und Polyhistidin-Fusionsproteinen ermöglicht.

- pET42b-E8<sup>E2C</sup> (Zobel, 2003): von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, das die gesamte codierende Sequenz für HPV31 E8<sup>E2C</sup> enthält.
- pET42b-E8<sup>E2C</sup> Δ3-12 (Zobel, 2003): von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, das die codierende Sequenz für HPV31 E8<sup>E2C</sup> ohne die Sequenz für die Aminosäuren 3-12 enthält.
- pET42b-HP1 $\alpha$  (Bruckner, 2006): von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, in dessen EcoRI- und HindIII-Restriktionsstellen die vollständige, über PCR amplifizierte Sequenz (Aminosäuren 1-191) für humanes HP1 $\alpha$  eingefügt wurde.
- pGL31URR (Stubenrauch et al., 1998): von pGL3-Basic (Promega) abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, in dessen MluI/XhoI-Restriktionsstellen die komplette regulatorische Region von HPV31 mit dem frühen Promotor P97 (HPV31 Nt. 7068-106) eingeführt wurde.
- pGL31URR-4xGAL4 (Zobel et al, 2003): ein von pGL31URR abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, in dessen HindIII-Restriktionsstelle ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit vier GAL4-Bindungsstellen (4xGAL4-HindIII, siehe Abschnitt 3.2.9) inseriert wurde
- pSG5 (Stratagene): eukaryontes Expressionsplasmid, bei dem die Expression des inserierten Gens unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors steht.
- pSG-E8<sup>E2C</sup> (Stubenrauch et al, 2001): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die kodierende Re-

gion von E8<sup>Δ</sup>E2C (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) ohne die nicht-kodierende „leader“-Sequenz (HPV31 Nt. 1212-1258) von pSG-E8<sup>Δ</sup>E2C-L enthält (Stubenrauch et al. 2001).

- pSG-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12 (Stubenrauch et al, 2001): von pSG-E8<sup>Δ</sup>E2C abgeleitetes Expressionsplasmid, dessen codierende Sequenz für die Aminosäuren 3-12 von E8<sup>Δ</sup>E2C deletiert wurde.
- pSG-GAL4 (Zobel, 2003): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, in dessen BamHI- und BglII-Restriktionsstellen die PCR-amplifizierte GAL4-DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 1-147) aus pM (Clontech) eingefügt wurde.
- pSG-E8<sup>Δ</sup>E2C (1-37)-GAL4 (Zobel, 2003): von pSG5-GAL4 abgeleitetes Expressionsplasmid, in dessen EcoRI-Restriktionsstelle das EcoRI-Restriktionsfragment (Aminosäuren 1-37) aus E8<sup>Δ</sup>E2C eingefügt wurde.
- pCMVGAL4-Suv39H1 (Vandel et al., 2001): Expressionsplasmid für SUV39H1, fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pCMV (myc)3-SUV39H1 (Lachner et al, 2001): an myc-Tag fusioniertes Konstrukt für Expression in Zellkultur und *in vitro* Translation (SP6 Promotor).
- pM GAL4-SUV39H1: von pM (Clontech) abgeleitetes Expressionsplasmid für humanes SUV39H1, fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pSG SUV39H1-GAL4: von pSG 5 (Stratagene) abgeleiteter Expressionsvektor mit SUV39H1-GAL4 Insert.

- pM GAL4-SETDB1 (Bruckner, 2006): von pM (Clontech) abgeleitetes Expressionsplasmid für humanes SETDB1, fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pCMV SETDB1: Konstrukt zur *in vitro* Translation, SETDB1 Insert.
- pOTB7 TRIM28: Konstrukt zur *in vitro* Translation (SP6 Promotor) von TRIM28 (=TIF1b)
- pG4MpolyII-mTIF1 $\beta$  WT (Nielsen et al., 1999): Expressionsplasmid für murines TIF1 $\beta$  (TRIM28), fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pG4MpolyII-mTIF1 $\beta$  $\Delta$ HP1box (Nielsen et al., 1999): Expressionsplasmid einer Deletionsmutante von murinem TIF1 $\beta$  (TRIM28), fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Die HP1-bindende „PXVXL“ Aminosäurekonsensussequenz von TIF1 $\beta$  wurde deletiert.
- pCMV Sport6 HP1 $\alpha$ : auf pCMV Sport6 basierendes Konstrukt zur *in vitro* Translation von HP1 $\alpha$ ; SP6-Promotor.
- pM hsHP1 $\alpha$  (Bruckner, 2006): Expressionsplasmid für humanes HP1 $\alpha$ , fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pG4MpolyII-mHP1 $\beta$  (Nielsen et al., 1999): Expressionsplasmid für murines HP1 $\beta$ , fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pOTB7 HP1 $\beta$ : Vektor zur *in vitro* Translation von HP1 $\beta$ ; SP6-Promotor.



- pG4MpolyII-mHP1 $\gamma$  (Nielsen et al., 1999): Expressionsplasmid für murines HP1 $\gamma$ , fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pCMV Sport6 HP1 $\gamma$ : auf pCMV basierendes Konstrukt zur *in vitro* Translation von HP1 $\gamma$ ; SP6-Promotor.
- pCMV Sport6 RACK1: Konstrukt zur *in vitro* Translation von RACK1 (=GNBL2L).
- pM GAL4-hsDNMT1 (Robertson, unpubliziert): Von pGBKT7 (Clontech) abgeleitetes Expressionsplasmid für humane DNMT1, fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pCMV Sport6 DNMT3A: in pCMV Sport 6 kloniertes DNMT3A zur *in vitro* Translation, SP6-Promotor.
- pGalHDAC1 (Xie & Folk, 2002): Von pSG424 (Sadowski & Ptashne, 1989) abgeleitetes Expressionsplasmid für die humane HDAC1, fusioniert mit einer GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pSG424 GAL4-HDAC2 (Xie & Folk, 2002): Von pSG424 (Sadowski & Ptashne, 1989) abgeleitetes Expressionsplasmid für die murine HDAC2, fusioniert mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne.
- pCDNA3.1 HDAC2-FL-myc-hisA: über BamHI und EcoRI in pCDNA3.1 eingeführte humane HDAC2 zur Expression und *in vitro* Translation (T7 Promotor), mit myc und hisA Tags.
- pCDNA3.1 hsHDAC3-FLAG: in pCDNA3.1 eingeführtes full length humane HDAC3 mit FLAG-Tag zur *in vitro* Translation (T7-Promotor).

- pM hsHDAC3-GAL4: auf dem pM-Plasmid beruhendes Konstrukt mit C-terminaler GAL4-Bindedomäne zur Expression in Zellkultur.
- pM GAL4-hsHDAC3: auf dem pM-Plasmid beruhendes Konstrukt mit N-terminaler GAL4-Bindedomäne zur Expression in Zellkultur.
- pSG5-Strep-HDAC3: von pSG5 abgeleitetes Plasmid, das humanes HDAC3 sowie einen Strep-Tag zur Präzipitation aus Zellextrakt enthält.
- pSG-KRAB-GAL4 (Slany, unpubliziert): von pSG424 (Sadowski & Ptashne, 1989) abgeleitetes Expressionsplasmid, das die KRAB-Domäne (Aminosäuren 1-74) aus dem KOX1-Protein, fusioniert mit der GAL4-DNABindedomäne, enthält.
- pG4MpolyII-mTIF1 $\beta$  WT (Nielsen et al., 1999): Expressionsplasmid für murines TIF1 $\beta$ , fusioniert mit der GAL4-DNABindedomäne.
- pSG-31E1: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das die kodierende Sequenz für HPV31 E1 enthält (Frattini und Laimins, 1994)
- pSX-E2: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das die kodierende Sequenz für HPV31 E2 enthält (Stubenrauch et al., 1998b)
- pC18-SP1-luc: ein von dem Luziferase-Reporterplasmid pAluc (Dong et al., 1994) abgeleitetes Plasmid, das vier synthetische E2BS (HindIII-BamHI inseriert) und zwei synthetische SP1-

Bindungsstellen (BamHI inseriert) 5' von der TATA-Box und dem Initiator-Element des späten Adenovirus Hauptpromotors enthält (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Steger, Köln).

- pM: eukaryonter Expressionsvektor, der die GAL4-DBD enthält (Clontech)
- pori31 (Bruckner, 2006): Ein von pGL31URR abgeleitetes Reporterplasmid, in der das Luziferasegen deletiert wurde.

### **3.2.11 Bakterienstämme**

- E. coli DH5 $\alpha$  (Clontech)
- E. coli BL21(DE3) pLysS (Novagen)

### **3.2.12 Eukaryote Zelllinien**

- HeLa: HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey et al., 1952)
- HK-16E6/E7: Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV16E6/E7 (Ganzenmüller, 2006).
- NIH3T3-J2: murine Fibroblasten-Zelllinie (Rheinwald und Green, 1975)
- scc-13: HPV-negative Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Rheinwald und Beckett, 1981)
- $\Phi$ NX: retrovirale Verpackungszelllinie, basierend auf 293

### **3.2.13 Medien für Bakterienkultur**

- LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 20g LB Broth Base (Invitrogen) auf 1 Liter H<sub>2</sub>O
- SOC-Medium: 2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose
- LB-Agar (Luria-Bertani-Agar): 32 g Lennox L Agar (Invitrogen) auf 1 Liter H<sub>2</sub>O
- Einfriermedium: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 % (v/v) Glycerin

### **3.2.14 Medien für Zellkultur**

- KGM: Keratinocyte Growth Medium (Clonetics) für HPK
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium + 50 mg/l Gentamycin (Invitrogen)  
mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS; Seromed) für HeLa und  $\Phi$ NX  
mit 10 % Kalbsserum (CS; Invitrogen) für NIH3T3-J2
- E-Medium: Adenin ( $1,8 \times 10^{-3}$  M), Hydrocortison (417  $\mu$ g/ml), Insulin (50  $\mu$ g/ml), Transferrin (50  $\mu$ g/ml), T<sub>3</sub> ( $2 \times 10^{-11}$  M), Cholera-toxin ( $1 \times 10^{-8}$  M), 50 % DMEM Pulver, 50 % DMEM/Ham's F12 1:1 Pulver, 3,07 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>, 0,41  $\mu$ l/ml HCl konz., 10  $\mu$ l/ml Penicillin/Streptomycin  
mit 5 % definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; HyClone) für scc-13

- OptiMEM (Invitrogen): Serum- und Antibiotika-freies Medium für Transfektionen
- Trypsin-EDTA (Invitrogen): 0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter Puck's Salzlösung A

### **3.2.15 Häufig benutzte Medien und Puffer**

- PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2
- 50x TAE Puffer: 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA
- 10x TBE Puffer: 0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA
- 1x TBS Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl
- 1x TBST Puffer: TBS Puffer + 0,1% (v/v) Igepal 630 (NP40).
- NP40 Puffer: 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8; frisch zugeben (nach Bedarf): 1mM DTT, Proteinase-Inhibitoren; es wurden unterschiedliche Mengen des Detergenz Igepal 630 (=NP 40) zugegeben; i.d.R. wurde in dieser Arbeit eine Konzentration von 0,1% Igepal 630 für Waschgänge usw. verwendet (u.a. GST-Pulldowns, Koimmunpräzipitationen).
- 1x TE Puffer pH 7,5: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
- 5x DNA-Ladepuffer: 50 % (v/v) Glycerol, 25 mM EDTA, 0,25 % (v/v) Bromphenolblau
- 5x SDS-Probenpuffer: 10 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 50 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 312,5 mM Tris/HCl pH 6,8
- 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat x 2  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0 mit HCl
- Hybridisierungslösung (Southern Blot):

Lösung A: 2x SSC, 0,1% SDS

Lösung B: 0,1x SSC, 0,1% SDS

Lösung C: 0,1x SSC, 1% SDS

### **3.3 Methoden**

#### ***3.3.1 Mikrobiologische Methoden***

##### **3.3.1.1 Kulturen für Plasmidisolierung**

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Die in dieser Arbeit benutzten Plasmid-Konstrukte enthielten entweder ein Ampicillin- oder ein Kanamycin-Resistenzgen. Die Selektion plasmidhaltiger Stämme erfolgte daher auf LB-Agar-Platten bzw. in LB-Flüssigmedium mit einem Zusatz von 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin oder 30  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin. 3 ml Übernachtskulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum dienten zur Isolation kleiner DNA-Mengen (Mini-Präp) sowie als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen. Zur Extraktion größerer DNA-Mengen wurden 100-200 ml (Midi-Präp) oder 300 ml (Maxi-Präp) des entsprechenden LB-Mediums mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C 16-18 h im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Langzeit-Lagerung wurden 500  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension mit 500  $\mu\text{l}$  Bakterien-Einfriermedium versetzt und bei -80°C eingefroren.

### **3.3.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien**

Die Fähigkeit zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA (Kompetenz) von *E. coli* wurde durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{RbCl}_2$  und  $\text{MnCl}_2$  erreicht (Ausubel et al., 1990). Die Transformation kompetenter Bakterien erfolgte durch eine Hitzeschock-Behandlung. Dazu wurden 90  $\mu\text{l}$  kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz oder verdünnter Plasmid-DNA gemischt und für 10 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min. bei  $42^\circ\text{C}$  wurde der Ansatz 1 min. auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900  $\mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension 30-60 min. bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Je 50-200  $\mu\text{l}$  des Transformationsansatzes wurden auf Antibiotika-haltigen Agar-Nährböden ausplattiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden in Übernachtkulturen vermehrt und auf rekombinante DNA untersucht.

### **3.3.2 DNA-Methoden**

#### **3.3.2.1 Standardmethoden**

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

- Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform
- Ethanol-fällung von DNA und RNA
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten
- Erzeugung glatter Enden ("blunt ends") mittels Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

### **3.3.2.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in verschiedenen Größenordnungen erfolgte mit "Plasmid Mini-", "Midi-" oder "Maxi-Kits" (QIAGEN) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 50-300 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf BioPhotometer) bestimmt.

### **3.3.2.3 Fragmentelution aus Agarosegelen**

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

### **3.3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

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



### **3.3.2.5 Sequenzierung von DNA**

Sequenzanalysen rekombinanter Plasmid-DNA wurden nach der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode (Sanger et al., 1977) mit dem "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Perkin-Elmer) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in einer PCR in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Durch die Kopplung der unterschiedlichen Basen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konnte die Sequenzierreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 50 ng des entsprechenden Sequenzierprimers und 2 µl "BigDye Reaction Mix" in einem Gesamtvolumen von 10 µl vereint. Die Reaktion wurde in einer PCR-Maschine durchgeführt und bestand aus 30 Amplifikationszyklen mit den Schritten Denaturierung (96°C, 10 sec.), Primer-Hybridisierung (50°C, 5 sec.) und Elongation (60°C, 4 min.). Nach der Amplifikation erfolgte die Präzipitation der PCR-Produkte mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Vol. 100 % Ethanol. Die resultierenden Pellets wurden in 20 µl "Template Suppression Reagent" (TSR, Perkin-Elmer) resuspendiert und 2 min. bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde die Nukleotidabfolge durch Anregung der fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide in einem "ABI Prism 310 Genetic Analyser" (Perkin-Elmer) bestimmt.

### **3.3.2.6 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden**

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der E. coli DNA-Polymerase I und  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP. Die Hybridisierung von Plasmiden, die auf pGL31URR basierten, erfolgte mit dem KpnI-SphI-Restriktionsfragment aus pGL31URR.

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

### **3.3.2.7 Isolation von niedermolekulargewichtiger DNA nach Hirt**

Die Isolation replizierter, niedermolekulargewichtiger DNA aus transfizierten Säugerzellen erfolgte nach der Methode von Hirt (1967). Die transfizierten Zellen wurden zur Ernte einmal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt und für 45 sec. bei 14000 rpm in 1,5 ml kaltem PBS abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 mM NaCl) resuspendiert und nach Zugabe von 0,2 % SDS sowie 40  $\mu$ g Proteinase K für 5 h bei 55°C verdaut. Anschließend wurde die Salzkonzentration auf 1 M NaCl erhöht. Die Fällung hochmolekulargewichtiger, chromo-somaler DNA erfolgte

über Nacht bei 4°C. Die chromosomale DNA wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 14000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde einmal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform extrahiert. Danach erfolgte die Fällung der Hirt-DNA mit 0,7 Vol. Isopropanol für 1h bei 14000 rpm und 4°C. Die Pellets wurden zweimal mit 1,5 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl 0,1x TE pH 7,5 mit 50 µg/ml RNase resuspendiert. Die Proben wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 5 U DpnI und 15 U NcoI für 5 h bei 37°C verdaut und im Southern-Blot analysiert.

### **3.3.2.8 DNA-Transfer nach Southern (Southern-Blot-Analyse)**

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

Jeweils 15 µl der linearisierten DNA-Proben wurden auf einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetragen und bei 65 V über Nacht aufgetrennt. Als Längenstandards dienten λ-HindIII-DNA sowie 100 pg der entsprechenden linearisierten Plasmid-DNA. Am folgenden Tag wurde das Gel mit einem Lineal fotografiert. Zur Depurinierung wurde das Gel 30 min. langsam mit 2 Litern 0,25 M HCl geschüttelt und anschliessend einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Überschüssige Gelreste außerhalb des Bereichs der replizierten DNA wurden oberhalb der 23 kb Markerbande und 13 cm unterhalb mit einem Skalpell entfernt. Eine GeneScreenPlus-Nylonmembran wurde auf die Grösse

13x15 cm zurechtgeschnitten, in H<sub>2</sub>O befeuchtet und für 10-15 min. in 0,4 M NaOH äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte auf einer Wanne, die mit 0,4 M NaOH als Transferpuffer gefüllt und mit einer Platte als Unterlage für den Blot bedeckt wurde. 2 Gel-Blotting-Papiere wurden als Transferpapier zurechtgeschnitten, mit NaOH befeuchtet und mit den Enden in den Transferpuffer getaucht. Darauf wurden zwei 13x15 cm große Gel-Blotting-Papiere gelegt und mit NaOH befeuchtet. Der Aufbau wurde nun luftblasenfrei ausgerollt. Das Gel wurde für einen effizienten Transfer der DNA umgedreht und auf die Papiere gelegt. Es folgten die äquilibrierte Membran und zwei weitere 13x15 cm große Gel-Blotting-Papiere, die mit NaOH befeuchtet wurden. Der Blot wurde nun nochmals luftblasenfrei ausgerollt. Auf diesen Aufbau wurden 10 saugfähige Blotting-Papiere, gefolgt von einer Lage Zellstoff, gelegt. Der Blot wurde mit einer halb gefüllten 500 ml-Flasche beschwert und die DNA wurde für 5 h transferiert. Nach dem Abbauen des Blots wurde die Membran einmal mit 2x SSC gewaschen und in einem Hybridisierungssofen zur Fixierung der DNA bei 50-60°C für 30 min. getrocknet. Die Membran konnte anschließend bei RT aufbewahrt oder direkt zur Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde eingesetzt werden.

### **3.3.2.9 Hybridisierung membrangebundener DNA mit radioaktiv markierten Sonden**

Die Hybridisierungslösung wurde auf 42°C vorgewärmt. Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit den zu untersuchenden DNA-Proben in einer Hybridisierungsröhre mit 20 ml Hybridisie-

rungslösung sowie 200 µl hitzedenaturierter (15 min. 95°C, 10 min. auf Eis) Lachssperma-DNA versetzt und für 1 h im Hybridisierungssofen bei 42°C inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die radioaktive Markierung der Sonde. 10<sup>7</sup> cpm der Sonde wurden mit 200 µl Lachssperma-DNA für 15 min. bei 95°C denaturiert und 10 min. auf Eis gekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde entfernt und durch 10 ml Hybridisierungslösung mit der denaturierten Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt, die Membran in der Hybridisierungsröhre mit 50 ml Lösung A gewaschen und in eine Wanne mit 500 ml Lösung A überführt. Das Dextransulfat wurde mechanisch mit den Fingern entfernt und dann 15 min. bei RT auf einem Taumler bewegt. Danach wurde die Membran auf dem Taumler zweimal 15 min. in jeweils 500 ml Lösung B bei RT und zweimal 30 min. in einem Wasserbad bei 50°C mit jeweils 500 ml Lösung C gewaschen. Abschließend wurde die Membran nochmals kurz in 2x SSC gewaschen um überschüssiges SDS zu entfernen, kurz auf Gel-Blotting-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie gewickelt. Die Detektion der hybridisierten Sonde erfolgte mit dem Phosphoimager.

### **3.3.3 Zellkultur-Methoden**

#### **3.3.3.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen**

Humane Keratinozyten (HK-16E6/E7), HeLa, NIH3T3-J2, ΦNX und scc-13 Zellen wurden als "Monolayer"-Kultur bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>

und humidifizierter Atmosphäre in Plastik-Gewebekulturschalen kultiviert. Die Kultivierung von HK-16E6/E7 erfolgte in serumfreiem KGM-Medium. Zum Teilen konfluenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-Lösung gewaschen. Durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 8 ml serumhaltigem Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % CS oder FKS und Gentamycin) inaktiviert und die Zellen nach der Aufnahme und Vereinzelung in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 20°C für 5 min. bei 250x g abzentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml KGM resuspendiert. HeLa- und  $\Phi$ NX - Zellen wurden in DMEM mit 10 % FKS und Gentamicin kultiviert. Zum Teilen konfluenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst. Anschliessend wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml DMEM/10 % FKS inaktiviert, die Zellen aufgenommen und vereinzelt. HeLa-Zellen wurden maximal im Verhältnis 1:10 geteilt und weiter kultiviert.  $\Phi$ NX -Zellen wurden im Verhältnis 1:30 geteilt und weiter kultiviert. NIH3T3-J2 wurden in DMEM mit 10 % CS und Gentamicin kultiviert. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in DMEM/10 % CS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:5 geteilt. NIH3T3-J2 wurden bis Passage 25 in Kultur gehalten. scc-13-Zellen wurden in E-Medium mit 5 % HC-

FKS auf einer "Feeder"-Zellschicht von Mitomycin C behandelten NIH3T3-J2 Fibroblasten gehalten. Die Zellen wurden mit Trypsin geteilt, in E-Medium/5 % HC-FKS aufgenommen und maximal im Verhältnis 1:8 geteilt.

### **3.3.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die primären Keratinozyten oder Zelllinien von einer 10 cm Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums bei RT 5 min. bei  $250\times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml kaltem Einfrieremedium (HPK: 70% E-Medium, 10 % HC-FKS und 20 % Glycerin; scc-13: E-Medium mit 15 % HC-FKS und 20 % Glycerin; HeLa: 70% DMEM, 20% FKS, 10% DMSO; NIH3T3-J2: DMEM mit 20 % CS und 10 % DMSO) resuspendiert und auf 3 Einfrierampullen verteilt, die zunächst in einer Einfrierbox auf  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die Zellen auf  $-196^{\circ}\text{C}$  gebracht.

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

### **3.3.3.3 Mitomycin C-Behandlung von NIH3T3-J2 Zellen**

NIH3T3-J2 Zellen wurden zur Aussaat als "Feeder"-Zellschicht mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt. Das Zellkulturmedium

einer konfluenten 10 cm-Schale wurde durch 5 ml frisches DMEM/ 10 % CS ersetzt. Daraufhin wurden 100 µl Mitomycin C (400 µg/ml in PBS; Medac) in das Medium gegeben, die Platte geschwenkt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die arretierten Zellen wurden 3x mit je 10 ml sterilem PBS gewaschen und als "Feeder"-Zellen benutzt.

#### **3.3.3.4 Transfektion von Humanzellen mit Liposomen**

Die Transfektion von Humanzellen erfolgte mit dem kationischen Liposomenbildner Lipofectamine (Invitrogen). Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion geteilt und in Plastik-Gewebekulturschalen ausgesät (Zelldichte bei Aussaat:  $1,5 \times 10^5$  pro 35 mm-Schale,  $5 \times 10^5$  pro 60 mm-Schale,  $1,5 \times 10^6$  pro 100 mm-Schale). Eine Stunde vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Zellkulturmedium. Die zu transfizierenden DNA's wurden gegebenenfalls in sterilem TE pH 7,5 verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden zwei sterile PS-Röhrchen mit jeweils 100 µl OptiMEM (35 mm-Schale; 250 µl für 60 mm; 500 µl für 100 mm) vorbereitet. In das erste Röhrchen wurde die DNA in der entsprechenden Menge (siehe Legenden der Abb.), in das zweite Röhrchen 5 µl Lipofectamine (35 mm-Schale; 15 µl für 60 mm; 40 µl für 100 mm) pipettiert. Nach der Vorbereitung aller Ansätze wurde das Liposomengemisch zum DNA-Gemisch gegeben, nochmals durchmischt und 30 min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen 2x mit OptiMEM gewaschen. Nach der Inkubationszeit wurde das Gesamtvolumen der Transfektion durch Zugabe von OptiMEM auf 1



ml erhöht (35 mm-Schale; 3 ml für 60 mm, 6 ml für 100 mm) und das Liposomengemisch zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun mit den Liposomen für 5h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge des normalen Zellkulturmediums mit der doppelten Serumkonzentration zu den Zellen gegeben (bei HPK: nur KGM). Etwa 18 bis 20 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden je nach Anwendung weiter inkubiert oder auf 100 mm-Schalen ausgesät.

### **3.3.3.5 Luziferase-Reporteranalyse**

Die transkriptionelle Aktivität von Promotorkonstrukten wurde indirekt durch die Expression des Luziferase-Reportergens bestimmt. Je  $1,5 \times 10^5$  Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf einer 6x35 mm-Zellkulturplatte ausgesät und am folgenden Tag mit den entsprechenden DNA-Mengen (siehe Legenden der Abbildungen) transfiziert. Luziferase-Reporteranalysen wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und mit 150  $\mu$ l kaltem Lysepuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), 1 % Triton X-100, 1 mM DTT) pro 35 mm Schale lysiert. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Anschliessend wurden 20-80  $\mu$ l Zellextrakt zu 100  $\mu$ l Assay-Puffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,8, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM ATP) gegeben und die Luziferase-Aktivität sofort im Luminometer vermessen.

Um den methodisch bedingten Schwankungen zu begegnen, wurde jeder Messwert dreimal erhoben, d.h. es wurden für jeden Wert drei Nöpfe mit Zellen angesetzt, transfiziert und gemessen.

Auswertung: die Auswertung der Messwerte erfolgte relativ zu einem Bezugswert.

- Bezugswert: Der gemessene Durchschnittswert der drei Wiederholungen für die Kombination Luciferase-Reporterplasmid/ leerer Expressionsvektor (d.h. z.B. das pSG Plasmid ohne E8<sup>E2C</sup> oder ein anderes Insert) wurde als 100% gesetzt, d.h. die nicht inhibierte Transkription des Luciferase-Gens unter den gegebenen Bedingungen.
- Die nach Transfektion verschiedener anderer Expressionsvektoren im gleichen Experiment gemessenen Werte wurden hierzu in Relation gesetzt und in prozentuale Angaben umgerechnet, d.h.  $(\text{Wert} / \text{Bezugswert}) * 100$ . Bei einem aktivierend wirkenden Expressionsplasmid entstehen somit Vielfache von 100%, bei einer Reprimierung der Luciferase-Transkription Werte unter 100%.
- Für die Zugabe von HDAC-Inhibitoren wurde ebenso verfahren. Zunächst wurde der Bezugswert für die Kombination Luciferase-Reporterplasmid/ leerer Expressionsvektor unter HDACi bestimmt (dieser Wert kann als absoluter Messwert deutlich vom Wert ohne HDACi abweichen, da die Deacetylierung von Histonen meist zu einer deutlichen allgemeinen Aktivierung der transkriptionellen Aktivität führt) und als 100% gesetzt. Sodann wurden die unter HDACi gemessenen Werte der anderen Expres-

sionsvektoren auf diesen HDACi-Bezugswert bezogen. Auf diese Weise konnte die spezifische Wirkung der HDACi auf die Transkriptionsrepression durch verschiedene transfizierte Expressionsplasmide unabhängig von der allgemein durch HDACi erhöhten Transkription untersucht werden.

### **3.3.3.6 Zugabe von HDAC-Inhibitoren**

Die HDAC-Inhibitoren HC-Toxin oder MS-275 wurden als Pulver gekauft und in DMSO gelöst (jeweils 3 mM). Die eingesetzte Endkonzentration im Zellkulturmedium betrug 3  $\mu$ M (HC-Toxin) bzw. 10  $\mu$ M (MS-275), d.h. das Lösungsmittel DMSO lag in einer Endkonzentration von 1:300 (MS-275) bzw. 1:1.000 (HC-Toxin) im Zellkulturmedium vor. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich DMSO erst an einer Konzentration von über 1:100 auf die Zellproliferation auswirkt.

Bei Zugabe nach Lipofectamin-Transfektion (für Luciferase-Assay) wurde nach der fünfstündigen Inkubation mit Lipofectamin in Opti-MEM das Medium abgezogen und das entsprechende Normalmedium mit den HDAC-Inhibitoren über Nacht (genau 14 h) zugesetzt. Für Replikations-Assays wurden die HDAC-Inhibitoren am Morgen nach der Transfektion dem vorgesehenen normalen Medium zugegeben. Die Ernte erfolgte jedoch schon nach genau 14 Stunden (statt normalerweise nach 48 Stunden). Da somit entsprechend weniger Zeit für Zellteilung/ Replikation zur Verfügung stand, wurde in der Regel nach der Aufreinigung der DNA nach Hirt dann mit der gesamten Menge weiter gearbeitet (statt die DNA wie im Protokoll

vorgesehen in zwei gleiche Ansätze zu teilen und einen zunächst wegzufrieren).

### **3.3.3.7 Transiente Replikation von HPV31-Replikationsursprung-Reporterkonstrukten**

Die transiente Replikation des HPV31-Replikationsursprungs wurde in scc-13-Keratinocyten untersucht. Je  $5 \times 10^5$  Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf eine 60 mm-Schale ausgesät und am folgenden Tag mit den entsprechenden DNA-Mengen (siehe Legenden der Abbildungen) transfiziert. Transfizierte Zellen wurden 18-21 h nach der Transfektion mit 1 ml Trypsin von der 60 mm-Schale abgelöst und auf eine 100 mm-Schale mit Mitomycin C-behandelten "Feeder"-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden anschliessend für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Niedermolekulargewichtige DNA wurde nach der Methode von Hirt isoliert.

### **3.3.3.8 Zellproliferations-Assays nach Zugabe von HDACi**

Bei der Messung der Zellproliferation wurde nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll vorgegangen. Je 5.000 Zellen (HK-16E6/E7 oder scc-13) wurden in sterilen 96-Napf Platten (Flachboden) ausgesät und am nächsten Tag für 8-14 Stunden in 100  $\mu$ l Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen der HDAC-Inhibitoren in Medium m Zellkultur-Inkubator inkubiert. Anschliessend wurde das WST-1 Reagenz (Roche) zugegeben (10  $\mu$ l pro Napf), kurz vorsichtig geschüttelt und für eine Stunde im Inkubator inkubiert.

In einem ELISA-Reader wurde anschließend die OD<sub>500</sub> gemessen.

### **3.3.4 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.4.1 Bakterielle Expression von Fusionsproteinen**

Die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Bakterien erfolgte mit dem pET-Expressionssystem (Novagen). Das pET-System mit dem in dieser Arbeit benutzten Vektor pET42b(+) (Fusion mit Glutathion-S-Transferase, GST) bietet den Vorteil einer induzierbaren Expression mit variablen Aufreinigungsmöglichkeiten der exprimierten Fusionsproteine.

Der Vektor enthält mehrere verschiedene Erkennungssequenzen ("Tags"), über die eine spezifische Aufreinigung der Fusionsproteine in nativer oder denaturierter Form erfolgen kann. Außerdem enthalten die Fusionsproteine Protease-Schnittstellen, die eine Abspaltung des nach der Aufreinigung nicht mehr benötigten Fusionsanteils ermöglichen. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in dem Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Dieser Stamm ermöglicht eine strikte Kontrolle der Proteinexpression über ein chromosomales Gen für T7 RNA-Polymerase und den *lac*-Repressor (*lacI*) sowie über ein extrachromosomales Plasmid mit einem Lysozym-Gen (pLysS). Die Expression der Fusionsproteine von pET-Plasmiden wird durch einen T7 Promotor mit einer *lac*-Operator-Sequenz (T7*lac*) kontrolliert. Der *lacI*-Repressor reprimiert nicht nur diesen Promotor, sondern auch den *lacUV5*-Promotor der T7-RNA-Polymerase. Auf diese Weise wirken sich toxische Effekte der ein-

gebrachten Fusionsproteine erst nach Induktion der Promotoren mit IPTG aus, das zu einer Ablösung des *lac*-Repressors von der Operatoresequenz führt. Lysozym wirkt als zusätzlicher Repressor der T7 RNA-Polymerase und erleichtert den Aufschluss der Bakterien bei der Aufreinigung der Fusionsproteine.

Am Abend vor der Expression der Fusionsproteine wurde eine Vorkultur des entsprechenden Bakterienstammes in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol (34 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gewünschte Menge LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol im Verhältnis 1:10 mit der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD (600 nm) von 0,6 bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Kulturen bei 25°C weiter unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht war.

Die Kultur wurde für mindestens 2 h bei 25°C mit 4 mM IPTG auf einem Schüttler induziert. Die Ernte der induzierten Bakterien erfolgte für 10 min. bei 4°C und 4000 rpm.

Die Pellets (jeweils von 1 L Kultur) wurden vorsichtig mit 8 ml eiskaltem, mit Proteinaseinhibitoren (Complete Mini EDTA-free, Roche) versetztem PBS resuspendiert (**ab hier erfolgten alle Schritte gekühlt/ auf Eis und in Anwesenheit der Proteinaseinhibitoren**). Der Aufschluss der induzierten Bakterien erfolgte durch Sonifizieren (30 sec., 40% Power, ein durchgehender Stoß) und anschließende Zugabe von 1/10 Vol. 10% Triton X-100 (Endkonz. 1%).

Die Zelltrümmer und denaturierte Aggregate der aufgeschlossenen Zellen wurden durch zweimaliges Zentrifugieren von  $10^7$  bei 12.000 g pelletiert (4°C) und der Überstand jeweils in ein neues Falcon überführt.

Die Aufreinigung erfolgte mittels Gluthathione-Matrix (Fast-Flow-Gluthathione-Agarose von Pharmacia), pro 1L Startkultur wurden 250-500 µl Matrix eingesetzt (Erfahrungswert: bei der Aufreinigung von GST-E8<sup>E2C</sup> wurde im Vergleich zu anderen Konstrukten die doppelte Menge Startkultur pro Matrixvolumen eingesetzt, d.h. entweder doppelte Menge Kulturmedium oder halbe Menge Gluthathione-Matrix) und über Nacht bei 4°C inkubiert (Überkopf-Taumler, im Kühlraum).

Am nächsten Morgen wurde die Matrix in eine kleine Chromatographie-Säule überführt und nach Absetzen der Gluthathione-Agarose der Überstand darüber gegeben. Nach Durchlauf des Überstands wurde 5x mit 10 ml PBS (+Protease-Inhibitor) und 5x mit 10 ml NP40-Puffer (0,1 % Igepal 630, ebenfalls mit Proteinase-Inhibitor) gewaschen.

Nach Zugabe von Natriumazid wurde das Eluat bei 4°C gelagert bzw. per SDS-Page die Ausbeute und Reinheit bestimmt.

#### **3.3.4.2 *In vitro* Translation <sup>35</sup>S-markierter Proteine**

Es wurde streng der Verfahrensvorschrift des Herstellers gefolgt. Pro 50 µl Reaktion wurden folgende Ansätze (stets auf Eis) pipettiert:

40 µl TNT Quick Master Mix

2 µl Plasmid DNA [0,5 µg/µl], d.h. 1 µg Plasmid DNA/ Reaktion

ad 48 µl mit dd H<sub>2</sub>O, anschließend wurde im Isotopenlabor die <sup>35</sup>S-markierte Aminosäure zugegeben.

2 µl <sup>35</sup>S Methionin oder <sup>35</sup>S Cystein

Bei Mehrfach-Ansätzen wurden alle Mengen entsprechend vervielfacht. Der Mix wurde bei 30° C für 60 Min. inkubiert und anschließend 1 min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert. In der Regel wurde sofort anschließend weiter gearbeitet (GST-Pulldown Experimente), nur sehr selten wurde der Reaktionsmix bei 4° C über Nacht aufgehoben.

#### **3.3.4.3 Herstellung von Zellextrakten aus eukaryoten Zellen**

Die Zellen wurden in 1 ml eiskaltem PBS abgeschabt und abzentrifugiert (30 sec. bei 20.000x g und 4°C). Das Zellpellet wurde für 10 min. auf Eis in 300 µl NP40-Puffer (0,1% Igepal 630 +1x complete EDTA free Protease-Inhibitor, Roche) lysiert. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (10 min. @ 20.000x g @ 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Wenn irgend möglich wurde sofort weitergearbeitet und die Zellextrakte nicht eingefroren.

Je nach Zelllinie waren für die Lyse unterschiedliche Konzentrationen insbesondere des Igepal 630 notwendig. Für ΦNX-Zellen wurde in der Regel mit 0,1 % Igepal 630 in NP40 Puffer gute Ergebnisse erzielt.



### 3.3.4.4 GST-Pulldown Experimente

In der Regel wurden diese mit *in vitro* translatierten, d.h. <sup>35</sup>S-markierten Proteinen durchgeführt, d.h. ein an GST-Agarose gebundenes Protein wurde hinsichtlich seiner Interaktion mit dem *in vitro* hergestellten Interaktionskandidaten überprüft. Seltener wurde eine Interaktion mit Proteinen aus Zellextrakten mit Hilfe von Western Blot-Analyse überprüft.

Mittels SDS-PAGE wurden jeweils zunächst die an die Glutathion-Agarose gebundenen Proteinmengen abgeglichen (i.d.R. GST-E8<sup>E2</sup>C vs. GST-E8<sup>E2</sup>Cd3-12 sowie zur Kontrolle GST allein). Pro Reaktionsansatz wurden nun 20 µl (entspricht ca. 0,1 µg Protein) der entsprechenden Agarose zu 1 ml NP40 Puffer mit 0,1 % Igepal 630 gegeben (dazu wurde eine an der Spitze abgeschnittene 200 µl-Pipettenspitze in die abgesetzten Beads versenkt und die Beads vorsichtig aufgenommen).

Beim Mengenabgleich der eingesetzten, an die Glutathione-Matrix gebundenen GST-Proteine, wurde großer Wert darauf gelegt, gleiche Mengen der jeweiligen GST-Proteine in einem Experiment einzusetzen. D.h. es war wichtiger, von jedem Protein ungefähr gleich viel einzusetzen als die absolute µg-Menge der eingesetzten Proteine (da in jedem Fall ein Überschuss der Köderproteine vorliegt). Mittels der nach der Aufreinigung auf ein SDS-PAGE aufgetragenen und Coomassie-gefärbten Proben konnten diese relativen Mengen anhand der Bandenstärke gut abgeschätzt werden. Wenn sich aufgrund der jeweils unterschiedlichen Proteinmengen an der Matrix deutliche Ab-

weichungen beim Volumen der Matrix ergaben, wurde ggf. mit äquilibriumierter Matrix aufgefüllt.

Die Beads wurden nun 1 min. bei 500g in einer auf 4° C vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.

Zu den Beads wurde nun zunächst 0,5 ml NP40 Puffer mit 0,1% Igepal 630 gegeben und anschließend das hergestellte radioaktive Protein zu jeweils gleichen Teilen. Das Gemisch wurde 2 h bei 4° C im Überkopftaumler inkubiert.

Nach der Inkubation wurde erneut 1 min. in der vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (500g) und der Überstand sehr vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Anschließend wurde 8mal mit je 1 ml NP40-Puffer mit 0,1% Igepal 630 gewaschen (jeweils Zentrifugation bei 500g). Nach dem letzten Waschgang wurde der Überstand sehr genau abgenommen, so dass so wenig Überstand wie möglich zurück blieb (dies wurde durch erneutes Abziehen des Restüberstands mit einer 10 µl Pipettenspitze erreicht). Nach Zugabe von 20 µl 4X SDS-Probenpuffer wurde die Probe 5-10 min. bei 95% aufgeköcht und anschließend 1 min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen.

### **3.3.4.5 Co-Immunpräzipitation**

Eine alternative Methode zur Analyse möglicher Bindungspartner war die CoIP, die in der Regel aus Zellextrakten durchgeführt wurde, in die zuvor entweder

- nur das Köderprotein bzw. Kontrollen (d.h. Nachweis des endogen vorliegenden Interaktionspartners/ Beuteproteins) oder
- das Köderproteinoptional bzw. Kontrollen und das Beute-Protein (d.h. beide Proteine überexprimiert) transfiziert wurden.

Wie oben beschrieben wurden die Zellen geerntet und Extrakte angefertigt. In die oben beschriebenen 300 µl Zellextrakt wurden 40 µg eines an Agarose oder Sepharose gebundener Antikörper (z.B. Agarose-αGAL4, die Mengenangabe bezieht sich hier nur auf den Antikörper) zugegeben.

Nach einer Inkubation von 1-2 h bei 4° C im Überkopftaumler wurde 7x mit eiskaltem 1 ml NP40 Puffer mit 0,1 % Igepal 630 gewaschen (die Agarose/ Sepharose Beads wurden jeweils bei 500g abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgezogen und 1 ml frischer Puffer zugegeben).

Am Ende der Waschprozedur wurde der Überstand sehr gründlich abgezogen, mit 20 µl 4X SDS-Probenpuffer aufgeköcht und der resultierende Überstand durch Western Blot auf die Anwesenheit der potenziellen Bindungspartner analysiert.

### **3.3.4.6 SDS-PAGE**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die 8-15 %-ige Trenngel-Lösung wurde direkt nach der Zugabe des Polymerisationsstarters APS zwischen zwei vertikale Glasplatten (Spacerabstand 0,5 mm/ 0,75 mm/ 1 mm/ 1,5 mm)gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das 2-

Propanol entfernt, mit Wasser nachgewaschen und anschließend das 4% Sammelgel gegossen.

Die Proben wurden zur Denaturierung und Absättigung der Proteine mit SDS für 5 min. bei 95°C in SDS-Probenpuffer erhitzt, auf Eis abgekühlt, kurz bei 14000 rpm abzentrifugiert und auf das SDS-Polyacrylamidgel geladen. Als Größenstandard diente ein farbmarkierter Protein-Molekulargewichtsstandard (Invitrogen oder Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte in SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 200 V für 35-50 min.

#### **3.3.4.7 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot)**

Für die nachfolgende Immunreaktion wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zwei Gel-Blotting-Papiere (Schleicher & Schüll) und eine Nitrocellulose-Membran wurden auf die Größe des Trenngels (5,5 x 8,5 cm) zurechtgeschnitten. Das Sammelgel wurde nach dem Gellauf entfernt. Die Membran wurde kurz in H<sub>2</sub>O befeuchtet und anschließend zusammen mit dem Papier für 10 min. in CAPS-Puffer pH 10,3 (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol, einstellen des pH mit 10M NaOH) äquilibriert. Das Trenngel wurde nur kurz in CAPS-Puffer gewaschen. Auf die Kathode der Blotapparatur wurden zwei Lagen Gel-Blotting-Papier, darauf das Trenngel und die Nitrocellulose-Membran sowie zwei weitere Lagen Gel-Blotting-Papier gelegt. Der ganze Aufbau wurde luftblasenfrei ausgerollt. Der

Transfer erfolgte für 75-90 min. bei konstant 75-90 V in einer Tank-Blotkammer mit Kühlschleife unter ständigem Rühren.

#### **3.3.4.8 Immunologischer Nachweis transferierter Proteine**

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

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1 h bei RT bei 4°C in Blockmilch (5 % Magermilchpulver in TBST Puffer) inkubiert. Die Erstantikörper wurden wie unter Abschnitt 3.2.7 angegeben in Blockmilch verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 10 min. mit TBST gewaschen. Der Zweitantikörper wurde wie unter Abschnitt 3.2.7 angegeben in Blockmilch verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nach der Wiederholung der Waschschritte erfolgte die Detektion mit dem Chemilumineszenz-Kit SuperSignal West Dura oder Femto (Pierce).

### **3.3.5 Hefe-Methoden**

#### **3.3.5.1 Yeast-two-Hybrid (Clontech Matchmaker)**

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde ein Y2H Screen mittels Yeast Mating durchgeführt. Hierfür wurde ein E8<sup>E2C</sup>-GAL4 Fusionsprotein in das pGBKT7 Plasmid eingeführt und die Expression kontrolliert.

Mit dem vom Hersteller gelieferten Y187 Hefestamm (die eine HeLa cDNA Genbank enthielt) wurden die Hefen gepaart und anschließend auf Trp-/Leu-/His-/ bzw. Trp-/Leu-/His-/Ade- Selektionsmedium angezogen.

Die angewachsenen Klone wurden in Leu- Medium angezogen, die Expressionsplasmide mit der cDNA-Sequenz aufgereinigt, in ultrakompetente *E.coli* transformiert, ein Minipröp durchgeführt und die DNA sequenziert.

Die gewonnenen Sequenzen wurden anschließend über eine Datenbank-Suche mit bekannten Sequenzen abgeglichen.

#### **3.3.5.2 Yeast-two-Hybrid (Kooperation Michael Winkler)**

Michael Winkler (Universität Kiel) führte in Kollaboration zu dieser Arbeit einen weiteren Yeast-2-Hybrid Screen durch. Hierzu wurde ein Fusionsprotein von E8<sup>E2C</sup> und dem c-terminal fusionierten GAL4 Hefe-Transkriptionsfaktor verwendet (das System wurde im Details unter Durfee, 1993 beschrieben). Das Plasmid sowie das TRP1 Gen enthaltende Köder-Expressionsplasmid wurde in den Hefestamm Y153 transformiert. Die in Trp- wachsenden Hefen wur-

den mit einem weiteren Expressionsplasmid transformiert, der neben einer humanen Lymphozyten cDNA Genbank auch das LEU2 Gen enthielt.

Die beide Proteine exprimierenden Hefeklonen (die auf Trp-/Leu-Medien anwuchsen) wurden mit 25mM 3-Aminotriazol selektiert. Von Michael Winkler wurden 70 gepickte Hefeklonen übergeben, die bereits mit XhoI bzw. BglII zur Kontrolle gespalten worden waren. Aus diesen Hefeklonen wurde das die cDNA-Sequenz enthaltende Expressionsplasmid gewonnen und in ultrakompetente *E. coli* transformiert. Mittels Qiagen Minipräps wurde das Plasmid gewonnen, mit Restriktionsenzymen verdaut und die cDNA-Sequenz anschließend sequenziert. Die gewonnenen Sequenzen wurden anschließend über eine Datenbank-Suche mit bekannten Sequenzen abgeglichen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 HDAC-Inhibitoren können die Transkriptionsrepression durch E8<sup>E2</sup>C teilweise aufheben

Histon-Deacetylasen nehmen eine zentrale Stellung ein bei Veränderungen des Chromatins. Der Grad der Histon-Acetylierung ist einem dynamischen, von Histon-Acetylasen (HATs) und –Deacetylasen (HDACs) kontrolliertem Gleichgewicht unterworfen. HDACs können Hetero- und Homodimere bilden und mit zahlreichen anderen Proteinen des Heterochromatins wechselwirken (Craig, JM 2004). Sie können daneben Teil großer makromolekularer Komplexe sein, insbesondere des NuRD und des SIN3-Komplexes (siehe Einleitung).

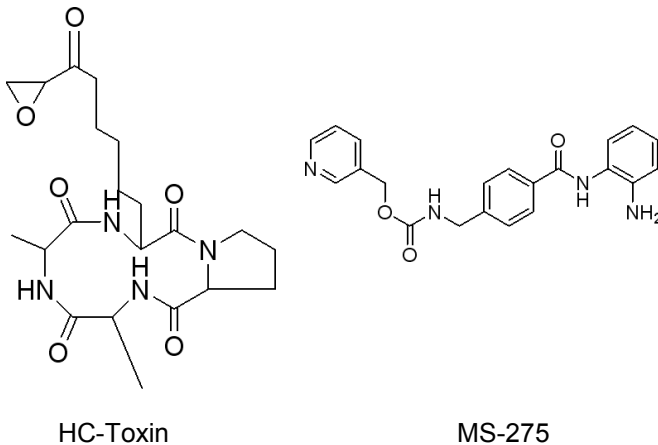
Von allen an der Heterochromatisierung beteiligten Proteinen gehören die HDACs zu den am besten untersuchten. Die Histon-Deacetylasen werden auf der Basis zu ihrer Ähnlichkeit zu den ursprünglichen Hefe-Deacetylasen in drei Klassen unterteilt: Die HDACs 1, 2, 3 und 8 werden zur Klasse I gezählt, die HDACs 4, 5, 6, 7, 9 werden der Klasse II zugerechnet. Eine dritte Klasse enthält die NAD-abhängigen Sirtuin-Proteine (SIRT1 bis SIRT7).

Bei der Heterochromatisierung spielen vor allem die Klasse I HDACs eine zentrale Rolle. Dabei sind die HDACs 1 und 2 fester Bestandteil der großen, in der Einleitung erwähnten Proteinkomplexe. Diese Arbeit konzentrierte sich daher zunächst auf die Untersu-



chung der HDACs 1, 2 und 3 mit dem Ziel, eine funktionelle Rolle der HDACs bei der Vermittlung der Repression von Transkription oder Replikation durch E8<sup>Δ</sup>E2C abzufragen.

Daher wurden zunächst die HDAC-Inhibitoren HC-Toxin (aus dem Pilz *Helminthosporium carbonum*) und das Benzinamid MS-275 ausgewählt, die gegen Klasse I Histondeacetylasen wirken (Simonini 2006, Park JH et al 2004, Walton JD 2006, Joung KE et al 2004).



**Abbildung 10: Strukturformeln der HDAC-Inhibitoren**

Es wurden Inhibitorkonzentrationen von 3  $\mu$ M HC-Toxin im Lösungsmittel DMSO (Endkonz. von 1:300 des Lösungsmittels DMSO in Zellkulturmedium) und von 10  $\mu$ M MS-275 verwendet (Endkonz. 1:1.000 des Lösungsmittels DMSO in Zellkulturmedium).

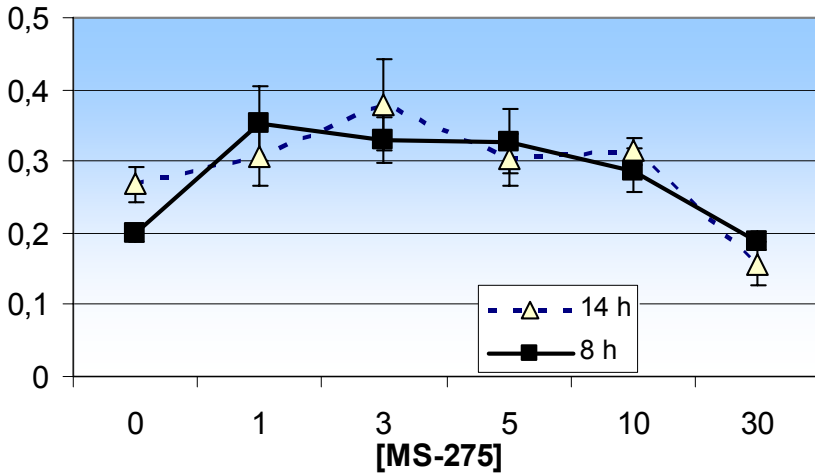
#### **4.1.1 HC-Toxin und MS-275 führen nicht zu einer verminderten Zellvitalität**

Die verwendeten Inhibitoren wurden in den eingesetzten Konzentrationen im WST-1 Zellproliferationsassay (Firma Roche) hinsichtlich der Beeinträchtigung der Zellfunktionen getestet. Hier wird die Stoffwechselrate von Zellen anhand der Bildung von Formazon gemessen (als OD<sub>500</sub>). Die Tests wurden sowohl bei immortalisierten Keratinozyten HPK E6/E7-Zellen als auch bei scc-13 Zellen durchgeführt. Für den Versuch wurden Inhibitorkonzentrationen von 0 µM bis 30 µM im Zellkulturmedium eingesetzt. Um die hohen Werte zu erreichen, war der Einsatz des Lösungsmittels DMSO in Konzentrationen von >1:1.000 notwendig, der nach Vorexperimenten für sich schon ausreichte, um die Zellproliferation deutlich zu beeinträchtigen.

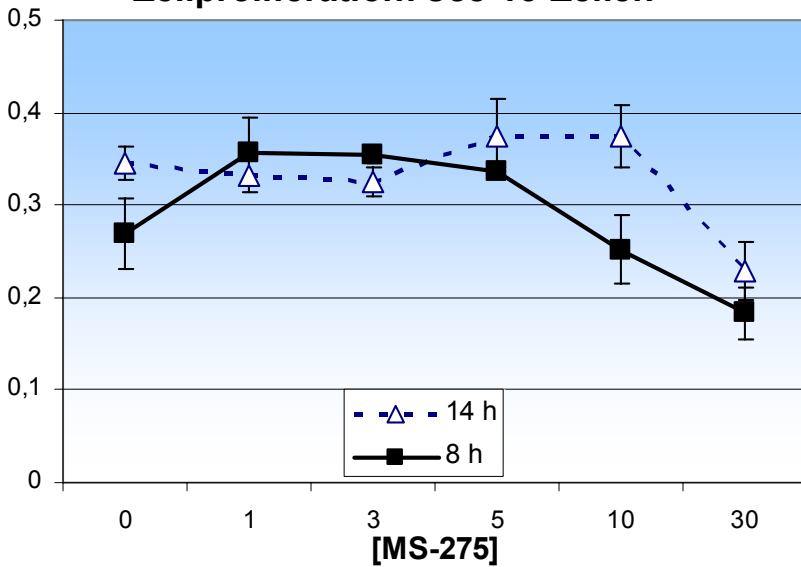
Bei einer Inkubationszeit von 14 Stunden bei 37°C konnte keine durch HC-Toxin oder MS-275 hervorgerufene Beeinträchtigung der Zellproliferation festgestellt werden (siehe Abb. 11 und 12).

Eine Verminderung der Zellproliferation wurde lediglich abhängig von der Endkonzentration des eingesetzten Lösungsmittels DMSO ab einer Konzentration von >1:300 im Zellkulturmedium beobachtet.

### Zellproliferation: HPKE6E7-Zellen

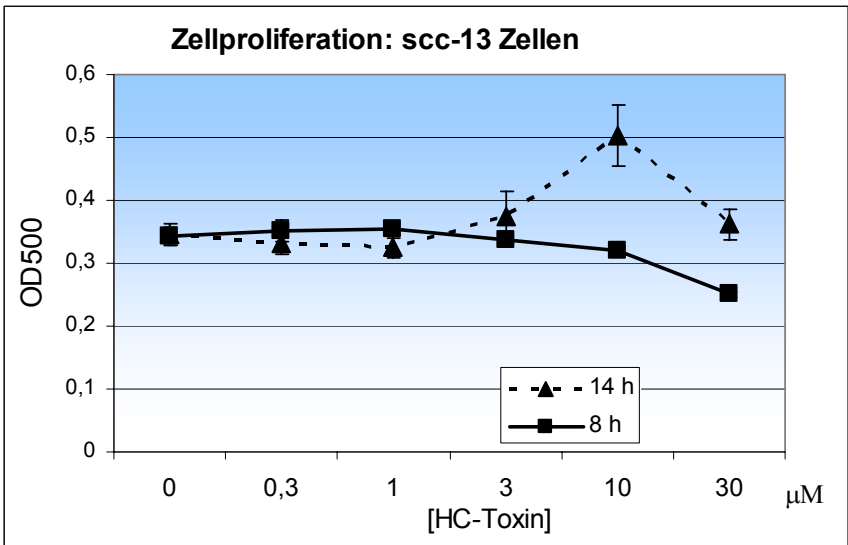
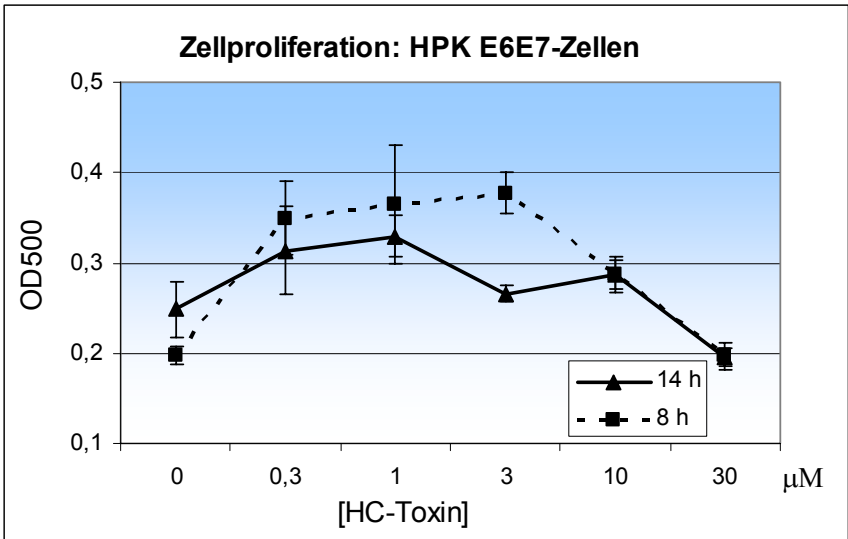


### Zellproliferation: scc-13-Zellen



**Abb. 11: WST-Zellproliferations-Assay**

für den HDAC-Inhibitor MS-275



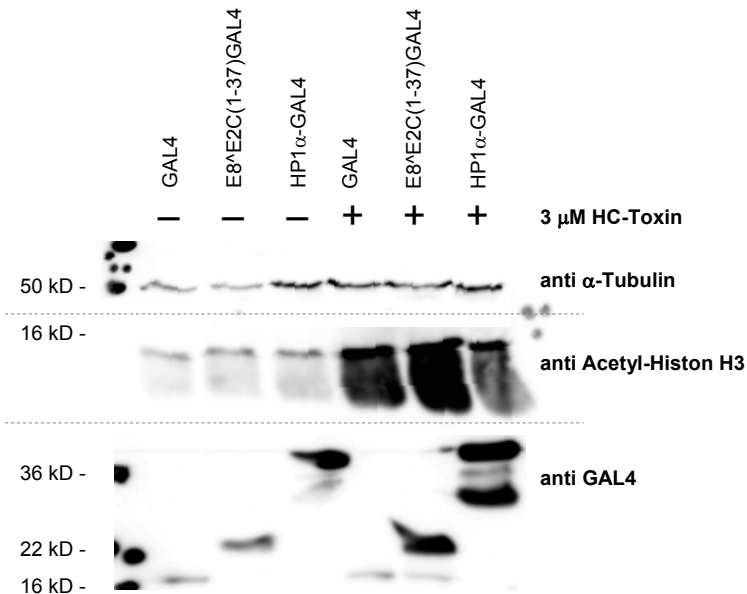
**Abb. 12: WST-Zellproliferations-Assay**

für den HDAC-Inhibitor HC-Toxin

#### 4.1.2 Der HDAC-Inhibitor HC-Toxin induziert Histonacetylierung im eingesetzten Zellsystem

Bei der für die Luciferase-Transkriptionsassays sowie dem Replikationsassay eingesetzten scc-13 (Plattenepithelkarzinom-Zelllinie) wurde untersucht, ob HC-Toxin eine spezifische Wirkung auf Klasse I Histondeacetylasen entfaltet.

Bei einer 14-stündigen Inkubation mit/ ohne HC-Toxin bei 37°C im



**Abb. 13: Proteinexpression mit und ohne HC-Toxin in SCC-13 Zellen**

Mit Expressionsvektoren von GAL4-Fusionsproteinen transfizierte scc-13 Zellen nach 14h Inkubation +/- HC-Toxin und anschließender Nachweis im Western Blot auf  $\alpha$ -Tubulin (Kontrolle des Proteinlevels, oben), Acetyl-Histon H3 (Mitte), GAL4 (Kontrolle der Expressionslevel der transfizierten Plasmide).

Zellkulturinkubator konnte nach Zellaufschluss mit SDS-Probenpuffer im anschließenden SDS-PAGE/ Western Blot gezeigt werden, dass die acetylierten Histone H3 abhängig von der Zugabe der HDAC-Inhibitoren deutlich zunehmen, d.h. die Deacetylierung wirksam inhibiert wurde. Der Vergleich mit der  $\alpha$ -Tubulin-Expression in denselben Proben ergab eine schwache Zunahme des exprimierten  $\alpha$ -Tubulins unter HC-Toxin-Einfluss. Die GAL4-Fusionsproteine E8<sup>E2C</sup>-GAL4 und GAL4-HP1 wurden unter Einfluss des HDAC-Inhibitors ebenfalls stärker exprimiert.

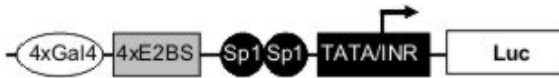
#### ***4.1.3 HDAC-Inhibitoren HC-Toxin und MS-275 heben die transkriptionelle Repression durch E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 und E8<sup>E2C</sup> teilweise auf***

Um die mögliche Beteiligung von Histon-Deacetylierung an der Wirkweise von E8<sup>E2C</sup> zu untersuchen, wurden die beiden HDAC-Inhibitoren in Luciferase-Assays getestet. Hierfür wurden je 50.000 HPVE6/ E7-immortalisierte humane primäre Keratinozyten in 24well Zellkulturschalen mit verschiedenen Expressionsplasmiden sowie einem Luciferase-Reporterplasmid transfiziert und dann mit den entsprechenden Inhibitoren oder mit Lösungsmittelkontrolle inkubiert.

Es wurden Inhibitorkonzentrationen von 3  $\mu$ M HC-Toxin im Lösungsmittel DMSO (Endkonz. von 1:300 DMSO in Zellkulturmedium) und von 10  $\mu$ M MS-275 verwendet (Endkonz. 1:1.000 DMSO in Zellkulturmedium).

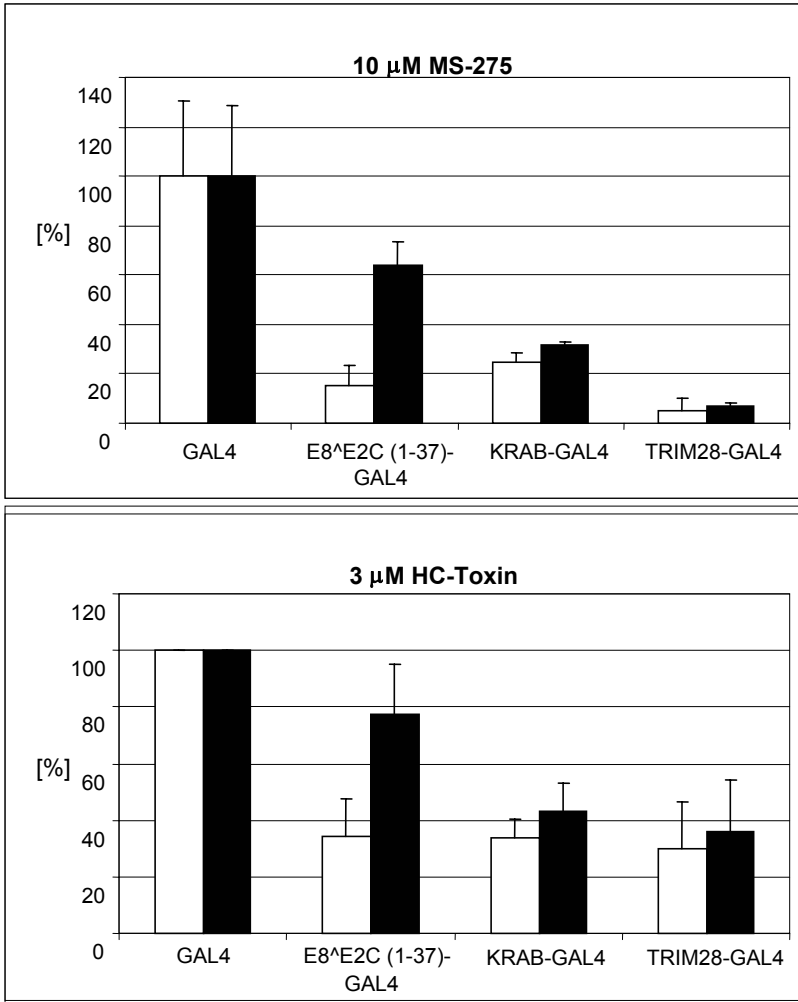
Die transkriptionelle Repressionsaktivität des E8<sup>E2C</sup>-Proteins wurde in Luciferase-Assays gemessen. Hierzu wurde ein Luciferase-Reporterkonstrukt mit minimalem Promotor und GAL4-Bindestellen (Abbildung 14) kotransfiziert mit verschiedenen Expressionsvektoren:

- E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4,
- die GAL4-DNA-Bindedomäne allein,
- GAL4-KRAB
- GAL4-TRIM28.



**Abb. 14: Minimaler Promotor pc18 SP1 4XGAL4**

Die beiden Konstrukte GAL4-TRIM28 und GAL4-KRAB dienen hierbei als Kontrolle für E8<sup>E2C</sup>. Beides sind bekannte Transkriptionsrepressoren (wie die KRAB-Domäne) bzw. Cofaktoren (TRIM28, synonym werden auch die Name TIF1 $\beta$  oder KAP1 verwendet), die die Transkription von Reporterkonstrukten sehr effektiv reprimieren können. Lorenz et al (2001) zeigten, dass diese Transkriptionsrepression unabhängig von Histondeacetylierung erfolgt.

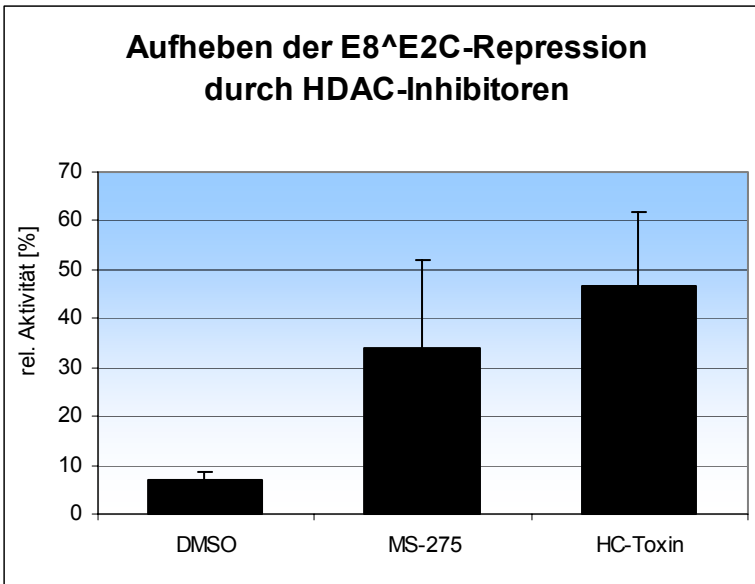


**Abb. 15: Luciferase-Reporterassays in HPK E6E7 in Anwesenheit von HDAC-Inhibitoren**

Ergebnisse der Luciferase-Reporterassays jeweils ohne (leere Balken) und mit (volle Balken) HDAC-Inhibitor der angegebenen Konzentration. Sie Zellen wurden mit dem Luciferasereporterplasmid pC18-SP1-4xGAL4-luc und den entsprechenden Expressionsplasmiden für GAL4-Fusionen kotransfiziert und nicht (leere Balken) oder mit (volle Balken) den entsprechenden Inhibitoren behandelt und die Enzymaktivität bestimmt.



Die Transkriptionsassays zeigten, dass das E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 Fusionsprotein die Transkriptionsaktivität des minimalen Promotors auf 20-30 % reprimieren kann verglichen mit der GAL4 transfizierte Kontrolle mit/ ohne Inhibitor. Auch die an eine GAL4-DNA-Bindedomäne fusionierte KRAB-Domäne und GAL-4-TRIM28 reprimierten die Luciferase-Transkription in vergleichbarem Umfang. Durch Zugabe von HDAC-Inhibitoren zu den HPK E6E7-Zellen



**Abb. 16: HDACi Luciferase Reporterassays in HPKE6/E7.**

Zellen wurden mit dem Luziferasereporterplasmid pC18-SP1-4xGAL4-luc und dem E8<sup>E2C</sup> Expressionsplasmid kotransfiziert und mit den entsprechenden Inhibitoren (3 $\mu$ M HC-Toxin bzw. 10  $\mu$ M MS-275) behandelt und die Enzymaktivität bestimmt.

konnte die von E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 vermittelte Transkriptionsrepression teilweise aufgehoben werden: nach Zugabe von MS-275 reduzierte sich die Transkriptionsrepression durch E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 von 15% auf 64%, dagegen bei Anwesenheit von KRAB-GAL4 nur von 25 auf 34%. Nach Zugabe von HC-Toxin nahm die Transkription in Anwesenheit von E8<sup>E2C</sup>(1-37)GAL4 von 34 auf 77% zu, bei Anwesenheit von KRAB-GAL4 von 34% auf 43%. Die Transkriptionsrepression durch GAL4-TRIM28 wurde durch Zugabe von MS-275 oder HC-Toxin nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass bei der Vermittlung der Transkriptionsrepression durch E8<sup>E2C</sup>(1-37) Histondeacetylierung eine Rolle spielt.

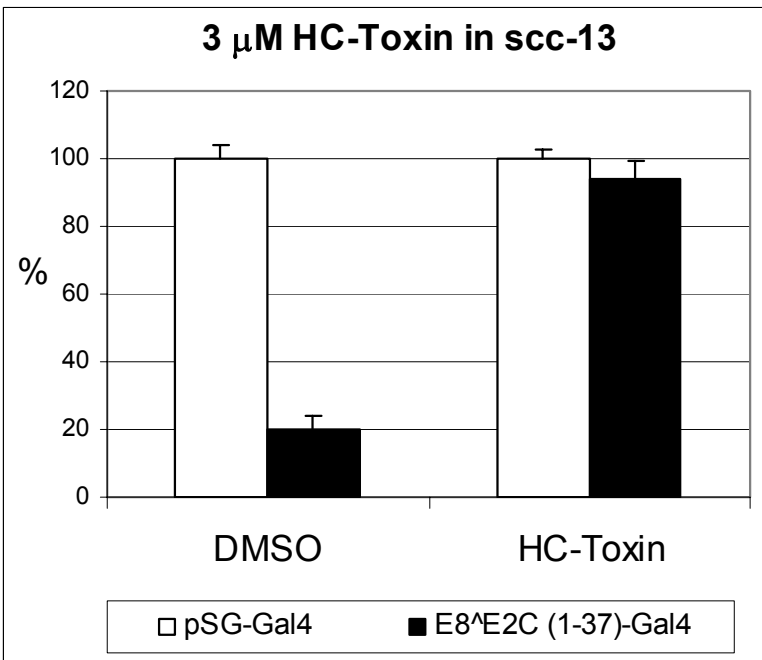
Daneben kann die Transkription des Reporterkonstrukts jedoch auch unabhängig von Histon-Deacetylasen inhibiert werden, wie KRAB-GAL4 und TRIM28-GAL4 zeigen.

Als weiterer Kontrollversuch wurde das Experiment wiederholt mit einem Expressionsplasmid für das natürliche E8<sup>E2C</sup> und einem Reporterplasmid mit minimalem Promoter, jedoch ohne GAL4-Bindestellen. Es wurden die gleichen MS-275 und HC-Toxin Konzentrationen verwendet wie oben beschrieben. Es zeigte sich, dass die Inhibitoren auch die Repressorfunktion des kompletten E8<sup>E2C</sup> beeinträchtigen können (Abbildung 16).

#### 4.1.4 HC-Toxin neutralisiert transkriptionelle E8-Repressorfunktion in scc-13 Zellen vollständig

Um einen Vergleich zu den für die Replikationsassays verwendeten scc-13 Zellen zu erhalten, wurde der Luciferase-Reporterassay mit E8<sup>E2C</sup> (1-37)-GAL4 und dem Reporterplasmid pC18-SP1-4XGAL4-LUC in diesen Zellen wiederholt.

Es zeigte sich, dass die Transkriptionsaktivität des Reporters in die-



**Abb. 17: HDACi Luciferase-Reporterassay in scc-13**

Zellen wurden mit dem Luziferasereporterplasmid pC18-SP1-4xGAL4-luc und Expressionsplasmiden für GAL4 (leere Balken) oder E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 (ausgefüllte Balken) kotransfiziert und mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt und die Enzymaktivität bestimmt.

sen Zellen nicht nur teilweise, sondern praktisch vollständig durch Zugabe von 3  $\mu\text{M}$  HC-Toxin wieder hergestellt werden kann. Das Ergebnis dieses Versuchs erlaubte es somit grundsätzlich, die in dieser Arbeit vorwiegend genutzten Assays für Transkriptionsrepression und für Replikationsrepression miteinander zu vergleichen.

## **4.2 Die E8-Domäne interagiert spezifisch mit den Klasse I Histon-Deacetylasen HDAC 1, 2 und 3**

Nach dem Nachweis, dass Histondeacetylase-Inhibitoren die transkriptionelle Repressorfunktion von E8<sup>E2C</sup> aufheben können, sollte untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen E8<sup>E2C</sup> und HDACs existiert. Da die beiden Klasse I HDACs 1 und 2 als Bestandteile große, Chromatin modifizierender Komplexe bekannt waren (siehe Einleitung), wurden die drei Klasse I HDACs 1, 2 und 3 ausgewählt.

### **4.2.1 Affinitätsgereinigte GST-E8<sup>E2C</sup>-Fusionsproteine weisen einen hohen Reinheitsgrad auf**

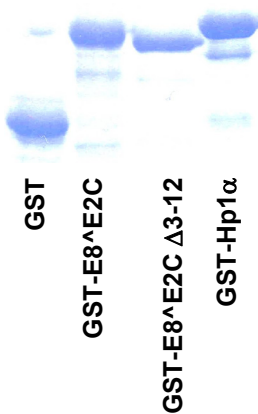
Entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll wurden mit einem GST-Tag versehene Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und anschließend affinitätsgereinigt. Die im Anschluss an die Aufreinigung durchgeführte Analyse mittels SDS-PAGE zeigte durchgängig befriedigende Ausbeuten und eine hohe Reinheit der induzierten

Fusionsproteine sowie das erwartete Molekulargewicht der Proteine (Abb. 18).

Neben GST-E8<sup>Δ</sup>E2C wurde stets die funktionell inaktive Deletionsmutante GST-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12 sowie als Negativkontrolle das GST-Protein allein aufgereinigt und in den nachfolgenden Experimenten (GST-Pulldown Experimente oder Koimmunpräzipitationen) eingesetzt. In einigen Fällen wurde als weitere Kontrolle das aufgereinigte

**Abb. 18: Coomassie-gefärbtes Gel zum Nachweis der affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteine**

Anhand der SDS-PAGE Nachweise nach der Affinitätsreinigung wurde vor den GST-Pulldown-Versuchen die Ausbeute und Reinheit der Fusionsproteine bestimmt.



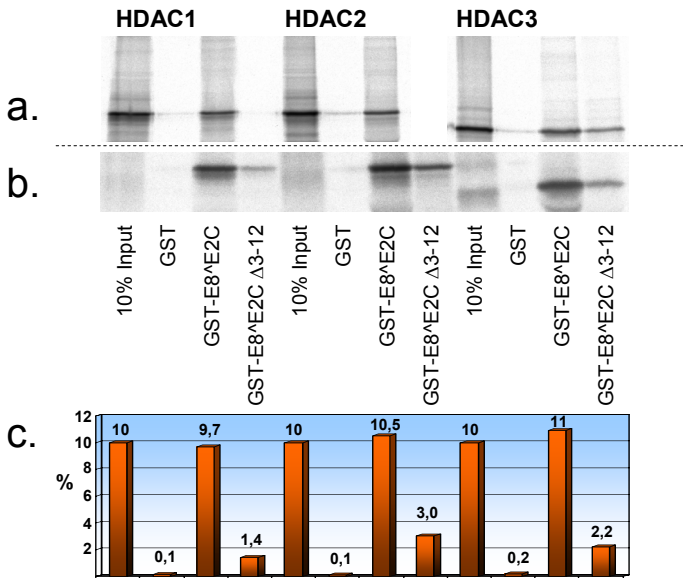
GST-HP1 $\alpha$  Fusionsprotein eingesetzt, da HP1 $\alpha$  ein gut untersuchtes Protein mit zahlreichen bekannten Interaktionspartnern ist und somit ggf. als Positivkontrolle diene.

Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde vor den Pulldown-Experimenten ein Mengenabgleich vorgenommen, d.h. die eingesetzten Menge der drei bzw. vier an Agarose-Matrix gebundenen Fusionsproteine wurde so angepasst, dass in jedem Reaktionsgefäß die gleiche Menge Fusionsprotein zum Einsatz kam. Um eine Verfälschung der Er-

gebnisse durch unterschiedliche Mengen anwesender Agarose-Matrix auszuschließen, wurden ggf. entsprechende Mengen äquibrierter „leerer“ Glutathion-Agarose addiert.

#### 4.2.2 Klasse I-Histon-Deacetylasen interagieren in Pull-down-Experimenten mit E8<sup>Δ</sup>E2C

Um eine Interaktion zwischen E8<sup>Δ</sup>E2C und verschiedenen Histon-Deacetylasen abzufragen, wurden Pull-down-Experimente mit <sup>35</sup>S-



**Abb. 19: GST-Pulldown von *in vitro* translatierten Klasse I HDACs aus Kaninchen Retikulozyten-Extrakt**

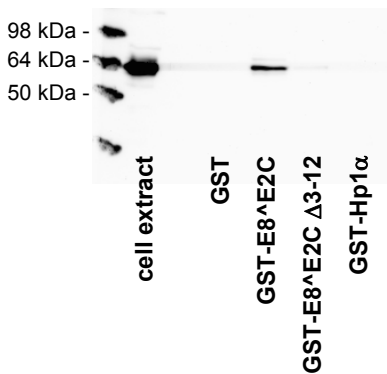
(a) Pull-down mit IVT HDAC1-3; (b) Wiederholung des Versuchs von (a), hier wurde der Input nicht als Vergleich aufgetragen; (c) Umrechnung der gemessenen Werte in Prozent, bezogen auf den 10% Input.

Methionin bzw. Cystein radioaktiv markierten Proteinen durchgeführt. Die drei Klasse I-Histon-Deacetylasen (HDAC1, 2 und 3) wurden *in vitro* translatiert und mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin bzw.  $^{35}\text{S}$ -Cystein markiert. Anschließend wurden Aliquots der translatierten Proteine zu an Sepharose-Matrix gebundenen GST-Fusionsproteinen gegeben und zwei Stunden bei 4°C im Überkopftaumler inkubiert. Die eingesetzten Proteinmengen der GST-Fusionsproteine wurden dabei jeweils abgeglichen, so dass vergleichbare Mengen für jeden Ansatz verwendet wurden (siehe Abbildung 19). Nach siebenmaligem Waschen mit NP40 Puffer (0,1% Igepal 630) wurden die Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie quantifiziert.

Es zeigte sich, dass alle drei Klasse I HDACs in einem ähnlichen Ausmaß (ca. 10% des Inputs) an GST-E8<sup>E2C</sup> binden, nicht jedoch an GST allein. Die funktionell inaktive Deletionsmutante GST-E8<sup>E2C</sup>  $\Delta$ 3-12 wurde erheblich schwächer gebunden (um den Faktor 3-6), was nahe legt, dass die Interaktion über die E8-Repressor-domäne erfolgt.

#### **4.2.3 HDAC3-GAL4 kann mit GST-E8<sup>E2C</sup> aus Zellextrakten präzipitiert werden**

Die beiden HDACs 1 und 2 sind weitgehend homolog und hinsichtlich ihrer Funktion gut untersucht. Ein großer Teil der vorhandenen Proteine kommt in großen Proteinkomplexen vor; unter anderem bilden sie den Ausgangskomplex für die großen, in der Heterochromatisierung aktiven Multiproteinkomplexe wie NuRD oder SAP



**Abb. 20: GST-Pulldown von HDAC3-GAL4 aus Gesamtzell-extrakten**

(siehe Einleitung). Daher wurden die weiteren Untersuchungen auf die Interaktion mit HDAC3 fokussiert, über die wesentlich weniger bekannt ist. Sie kommt sowohl gebunden an große Komplexe als auch in größeren Anteilen frei im Zellkern vor.

Um HDAC3 aus Zell-extrakten mittels GST-Fusionsproteinen und anschließendem Western Blot nachweisen zu können, wur-

de die GAL4-DNA-Bindedomäne an HDAC3 kloniert.

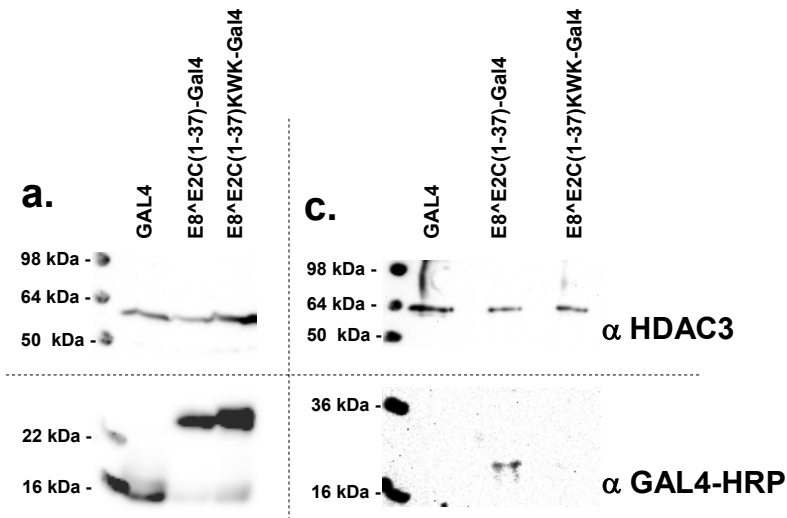
Der entsprechende Vektor wurde in 12 100mm-Schalen  $\Phi$ NX-Zellen transfiziert und die Gesamtzell-extrakte aus je 3 Schalen zu gleichen Mengen an Sepharose-Matrix gebundene GST-Fusionsproteinen gegeben (GST; GST-E8<sup>E2C</sup>; GST-E8<sup>E2C</sup>  $\Delta$ 3-12; GST-HP1a). Nach zwei Stunden Inkubation im Überkopftaumler bei 4°C wurde siebenmal mit NP40-Puffer (0,1% Igepal 630) gewaschen und die Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert (HRP-gekoppelter Antikörper gegen GAL4). Im Western Blot zeigte sich eine deutliche Bande bei der



erwarteten Proteinmasse des GAL4-Fusionsproteins von 64 kDa in den Spuren des Zellextraktes und beim GST-E8<sup>Δ</sup>E2C. Eine sehr viel schwächere Bande ist in der Spur der funktionell inaktiven GST-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12 Deletionsmutante zu erkennen (Abb. 20).

#### 4.2.4 Koimmunpräzipitation von HDAC3-STREP und E8<sup>Δ</sup>E2C(1-37)-GAL4

Um die Interaktion von E8<sup>Δ</sup>E2C und HDAC3 *in vivo* zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurde ein



**Abb. 21: Coimmunpräzipitation von GAL4-Fusionsproteinen und Strep-HDAC3**

(a,b) Immunoblot-Nachweis der überexprimierten Strep-HDAC3 und GAL4-Fusionsproteine im Gesamtzellextrakt durch  $\alpha$ HDAC3 (a) und  $\alpha$ -GAL4 (b). (c, d) Immunoblot-Nachweis der an Streptactin Matrix gebundenen Strep-HDAC3 und GAL4-Fusionsproteine durch  $\alpha$ HDAC3 (c) und  $\alpha$ -GAL4 (d).

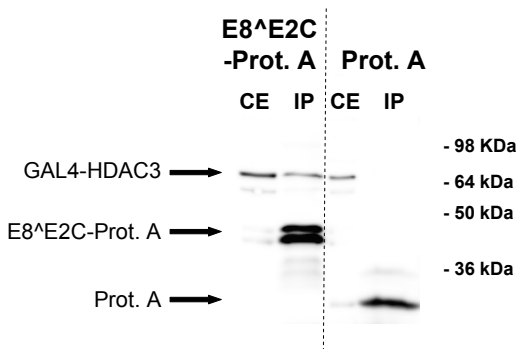
STREP-Tag-HDAC3 Fusionsprotein konstruiert. Mit Hilfe dieses Tags kann das Fusionsprotein über eine STREP-Tactin-gekoppelte Matrix präzipitiert werden. In je eine 100mm-Schale  $\Phi$ NX-Zellen wurden 10  $\mu$ g HDAC3-STREP und 10  $\mu$ g des potenziellen Interaktionspartners kotransfiziert (pSG GAL4, pSG E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 oder pSG E8<sup>E2C</sup>(1-37)KWK-GAL4).

Nach 48 h Inkubation wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und zwei Stunden mit 20  $\mu$ l STREP-Tactin-Sepharose Matrix inkubiert (4° C, Überkopftaumler). Nach sieben Waschgängen wurden die Matrices mit SDS-Probenpuffer aufgeköcht und die eluierten Proteine auf SDS-PAGE aufgetragen. Im Western Blot wurden die Interaktionsköder (HRP-gekoppelter Antikörper gegen GAL4) und die HDAC3-STREP-Proteine (Kontrolle des Inputs) detektiert.

Die Abb. 21 a und b zeigten, dass vergleichbare Mengen des HDAC3-STREP sowie der GAL4-Proteine in allen Zellextrakten enthalten waren. Ebenso konnte nach den Waschgängen aus der eluierten STREP-Tactin-Sepharose jeweils vergleichbare Mengen HDAC3-STREP für alle Proben nachgewiesen werden. Bei der Detektion auf GAL4 hingegen war nur in der Spur für E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 eine Bande sichtbar, nicht in der Kontrolle (GAL4) oder der Spur der funktionell inaktiven KWK-Mutante, was nahe legt, dass die E8-Domäne spezifisch mit HDAC3 interagiert.

#### 4.2.5 Koimmunpräzipitation von überexprimiertem HDAC3-GAL4 mit E8<sup>Δ</sup>E2C-Protein A

Nach der Präzipitation über das HDAC3-Fusionsprotein wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem das komplette E8<sup>Δ</sup>E2C-



**Abb. 22: Koimmunpräzipitation von GAL4-HDAC mit E8<sup>Δ</sup>E2C-Prot. A aus Gesamtzellextrakt**

Der Nachweis erfolgte im Immunoblot mit  $\alpha$  GAL4

E8<sup>Δ</sup>E2C-ProtA Fusionsprotein kodiert, das über IgG-Sepharose präzipitiert werden kann.

In je 3 100mm Schalen wurden die pZOME Expressionsplasmide mit und ohne E8<sup>Δ</sup>E2C-Fusionsprotein sowie ein HDAC3-GAL4 Expressionsplasmid in  $\Phi$ NX Zellen transfiziert und das Protein A anschließend aus dem Gesamtzellextrakt über Protein A/G-

Protein mit einem Tag versehen wurde, um in einem Koimmunpräzipitations-Experiment den Interaktionspartner mit einem Antikörper im Western Blot nachzuweisen.

Hierzu wurde auf Basis von pZOME ein Expressionsplasmid hergestellt, welches ein

Sepharose-Matrizes präzipitiert. Der Nachweis des Interaktionspartners HDAC3-GAL4 erfolgte nach SDS-PAGE und Western Blot über einen anti-GAL4-Antikörper.

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass GAL4-HDAC3 in beiden Gesamtzellextrakten vorliegt und nur in der Spur mit E8<sup>E2C</sup>-Protein A präzipitiert wurde, nicht jedoch in der nur Protein A enthaltenden Kontrolle. Der Interaktionsnachweise von E8<sup>E2C</sup> und HDAC3 konnte somit auch mit dem vollständigen E8<sup>E2C</sup> Protein und bei einer umgekehrten Anordnung von Köder- und Beuteprotein in der Koimmunpräzipitation erbracht werden.

### **4.3 HDAC-Inhibitoren haben keine Wirkung auf die Replikationsrepressionsaktivität von E8<sup>E2C</sup>**

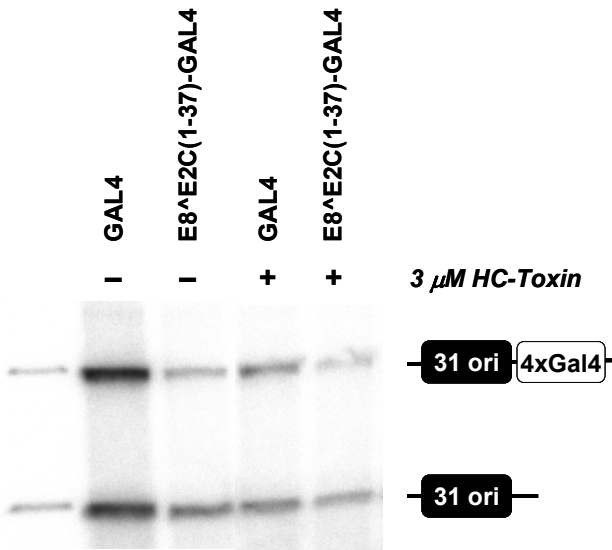
Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass E8<sup>E2C</sup> mit Klasse I HDACs interagiert, dass diese Wechselwirkung mindestens teilweise verantwortlich ist für die Transkriptionsrepression durch E8<sup>E2C</sup> und dass die Repression durch E8<sup>E2C</sup> durch HDAC-Inhibitoren neutralisiert werden kann.

Nach der Wirkung der Klasse I HDAC-Inhibitoren HC-Toxin und MS-275 auf die transkriptionelle Repression durch E8<sup>E2C</sup> und den Hinweisen auf eine Interaktion mit Klasse I HDACs wurde nun die Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf die HPV E8-vermittelte Replikationsrepression untersucht.

Hierfür wurden wie oben beschrieben scc-13 Zellen mit Replikationsursprungsreporterplasmiden mit (pGL31URR-4xGAL4) und

ohne (p31ori) GAL4-Bindungsstellen sowie Expressionsplasmiden für E1, E2 und GAL4-Fusionsproteine kotransfiziert.

In der Auswertung war es so möglich, die Werte für den Reporter mit GAL4-Bindestellen auf den Reporter ohne GAL4-Bindestellen zu beziehen (interner Standard).



**Abb. 23: Transienter Replikationsassay mit HC-Toxin**

Nach Ernte der Zellen wurden Hirtextrakte hergestellt, die niedermolekulare DNA isoliert und anschließend mittels DpnI-Verdau die methylierte, nicht replizierte Plasmid-DNA entfernt. Es verblieb die in der Inkubationszeit neu replizierte Plasmid-DNA der beiden Reporterplasmide mit/ ohne GAL4-Bindestellen. Die Plasmidmenge wurden mittels Southern Blot radioaktiv über eine <sup>32</sup>P-markierte Sonde detektiert.

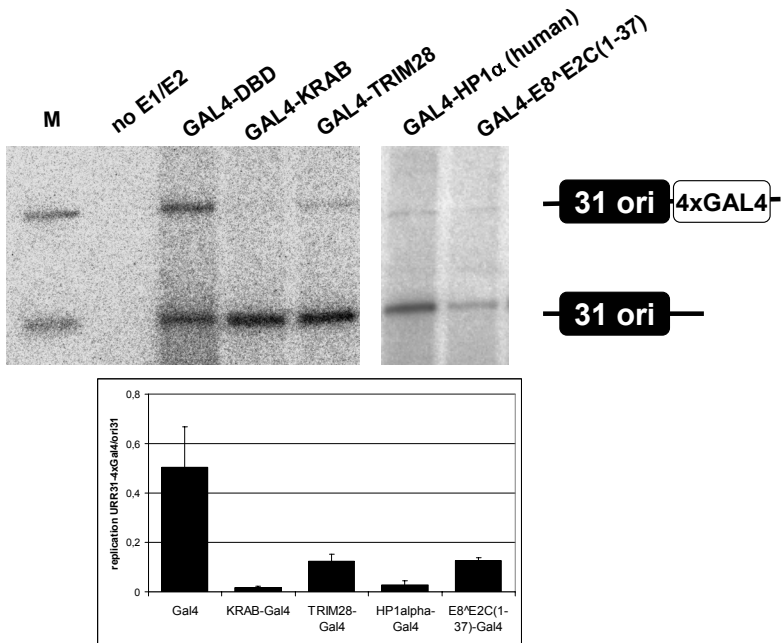
Das HC-Toxin (Endkonzentration wie im Transkriptionsreporter-Assay 3  $\mu$ M) wurde 5 h nach Ende der Transfektion auf die Zellen gegeben und diese weitere 14 Stunden inkubiert.

Nach der Auswertung konnte dem HDAC-Inhibitor kein eindeutiger Effekt zugeordnet werden. Bezieht man nach der Quantifikation die Werte der HPV31ori-4XGAL4-Banden auf die jeweilige HPV31ori-Bande, kommt es zwar zu einer geringen relativen Abnahme der Replikationsrepression durch E8<sup>E2C</sup>(1-37)-GAL4 nach Zugabe von HC-Toxin. Diese Zunahme beruht jedoch nicht auf stärker werdenden 31ori-4XGAL4-Banden, sondern auf der schlechteren Replikation des p31ori-Vergleichsplasmids, d.h. der schwächer werdenden Kontrollbande (Abbildung 23). Diese relative Zunahme kann damit nicht auf einen spezifischen, über die GAL4-Fusionsproteine bzw. die GAL4-Bindestellen auf der DNA wirkenden HC-Toxin-Effekt zurückgeführt werden. Somit spielt die für die Transkriptionsrepression demonstrierte Beteiligung von HDAC-Aktivität bei der Repression der HPV31ori-Replikation keine Rolle.

Dieses unerwartete Ergebnis legte einen Mechanismus zur Vermittlung der Replikationsrepression nahe, der ganz oder teilweise unterschiedlich ist von dem zur Transkriptionsrepression, zumindest aber ohne die Mitwirkung von Histon-Deacetylase-Aktivität auskommt.

#### 4.4 Die HDAC-unabhängigen Transkriptionsfaktoren HP1 $\alpha$ , TRIM28 und die KRAB-Domäne hemmen die Replikation des HPV31 Ursprungs

In Abb. 15 wurde bereits gezeigt, dass TRIM28 und die KRAB-Domäne unabhängig von HDACs die Transkription minimaler Pro-



**Abb. 24: Transienter Replikationsassay für TRIM28, HP1 $\alpha$ , KRAB mit Quantifizierung**

Für die Auswertung wurden die Werte für den 31ori mit GAL4-Bindestellen bezogen auf den p31ori ohne Bindestellen, d.h. es fand ein Abgleich der Werte mit/ohne GAL4-Bindestellen innerhalb der gleichen experimentellen Bedingungen statt.

motoren reprimieren können.

Aus diesem Grund wurde nun die Wirkungskette KRAB-TRIM28-HP1 auch im Replikationsassay untersucht. Dies sollte Klarheit bringen, ob die Replikation von HPV31 ori auch von anderen, HDAC-unabhängigen Transkriptionsfaktoren reprimiert werden kann.

Es wurden die drei GAL4-Fusionsproteine HP1 $\alpha$ , TRIM28 und KRAB-Domäne und jeweils parallel E8<sup>Δ</sup>E2C(1-37)-GAL4 im gleichen transienten HPV31 ori-Replikationssystem wie oben beschrieben untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Replikation nach Zugabe der für die drei an GAL4 fusionierten Transkriptionsfaktoren HP1 $\alpha$ , TRIM28 und KRAB-Domäne codierenden Expressionsplasmide. Alle drei untersuchten Transkriptionsfaktoren können somit sehr effizient die Replikation des HPV31 ori unterbinden, wenn sie über die GAL4-DBD bzw. GAL4-Bindestellen auf dem Reporter an den HPV31 ori gebracht werden.

In der im Rahmen dieser Dissertation kobetreuten Diplomarbeit von Markus Bruckner wurde das Experiment mit den oben genannten und einer Reihe weiterer Proteine wiederholt und zeigte für TRIM28-GAL4, HP1 $\alpha$ -GAL4, KRAB-GAL4 und E8<sup>Δ</sup>E2C(1-37)-GAL4 das gleiche Ergebnis.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass E8<sup>Δ</sup>E2C über eine Wechselwirkung mit HP1 $\alpha$  und/ oder TRIM28 die Replikation inhibieren könnte.



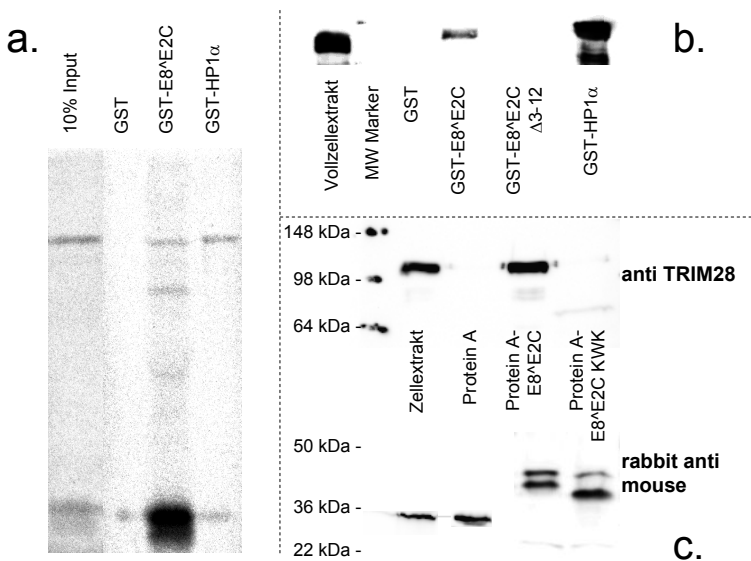
## 4.5 TRIM28, aber keines der HP1-Proteine interagiert mit E8<sup>E2C</sup>-Domäne

Das Trio aus KRAB-Domäne, TRIM28 und HP1 $\alpha$  wurde in dieser Arbeit zunächst als Vergleichsmöglichkeit genutzt, um die Repressorfunktion von E8<sup>E2C</sup> einem anderen, unabhängig von HDAC-Aktivität funktionierenden System gegenüberzustellen. Hierbei funktioniert TRIM28 als Korepressor, der einerseits über seine PHD und Bromodomäne die große Familie der Krüppel associated box (KRAB) Zink Finger Proteine bindet und auf der anderen Seite die Chromoshadow-Domäne des Heterochromatin Protein 1. Jedes der >220 KRAB-ZFP enthält am N-terminalen Ende die 75 Aminosäuren große KRAB-Domäne, die direkt an TRIM28 bindet. Auf diese Weise dient TRIM28 als Adaptor für eine große Zahl unterschiedlicher, spezifisch DNA-bindender KRAB-ZFP und vermittelt jeweils den Kontakt zu HP1, das eine zentrale Rolle bei der Heterochromatisierung spielt (Schultz DC et al 2001, Schultz DC et al 2002).

Nach dem Nachweis, dass der gut untersuchte Transkriptionsfaktor HP1 $\alpha$  sowie der Kofaktor TRIM28 sehr effektiv den HPV31ori in transienten Replikationsassays reprimieren können, wurden beide hinsichtlich einer möglichen Interaktion mit E8<sup>E2C</sup> untersucht. Sowohl eine Interaktion mit TRIM28, aber auch die Wechselwirkung mit HP1 wären wertvolle Hinweise darauf, wie E8<sup>E2C</sup> seine Repression vermittelt.

#### 4.5.1 *In vitro* translatiertes <sup>35</sup>S-TRIM28 bindet im GST-Pulldown an E8<sup>Δ</sup>E2C

Mit <sup>35</sup>S-Methionin-markiertem, *in vitro* synthetisiertem TRIM28 wurden GST-Pulldowns durchgeführt. Hierfür wurde neben GST-E8<sup>Δ</sup>E2C auch jeweils gleiche Mengen der GST-Domäne allein sowie als Positivkontrolle das als Interaktionspartner für TRIM28 publi-



**Abb. 25: Interaktion von E8<sup>Δ</sup>E2C und TRIM28**

(a) Interaktion von GST Proteinen mit <sup>35</sup>S-markiertem TRIM28 (b) Interaktion von GST Proteinen mit endogenem TRIM28 aus Gesamtzellextrakt. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte über αTRIM28. (c) Interaktion von E8<sup>Δ</sup>E2C-Prot A mit dem endogenem TRIM28. Der Nachweis im Immunoblot erfolgte über αTRIM28 (oben) und der Protein A Fusionen über IgG (unten).

zierte GST-HP1 $\alpha$  eingesetzt.

In der anschließenden SDS-PAGE und Autoradiographie zeigte sich bei dem für TRIM28 erwarteten Molekulargewicht von 105 kDa eine Interaktion in den Spuren von GST-E8<sup>E2C</sup> und GST-HP1 $\alpha$ , nicht aber in der Kontrollspur mit GST alleine (Abb. 24a). Die etwas stärkere Interaktion zwischen TRIM28 und HP1 $\alpha$  kann auf die Oligomerisierung von HP1 $\alpha$  zurückgeführt werden.

In Abbildung 23 fällt beim GST-Pulldown weiter eine sehr starke Bande im Bereich von 23 kDa auf. Hierbei handelt es sich um ein Fragment des 105 kDa großen TRIM28-Proteins, das neben der Input-Spur auch in den anderen beiden Spuren zu finden ist. In keiner jedoch so deutlich wie in der GST-E8<sup>E2C</sup>-Spur, wo ca. 80 % des Inputs mit GST-E8<sup>E2C</sup> präzipitiert wurden. Ob dies auf eine sehr effiziente Bindung infolge einer durch Denaturierung entstandenen Proteinfaltung oder auf eine frei gelegte Bindungsstelle für E8<sup>E2C</sup> zurückgeführt werden muss, kann nach diesem Experiment nicht ausgesagt werden.

Die Proteinstruktur von TRIM28 weist am N-terminalen Ende zwei beieinander liegende Domänen (PHD und Bromodomäne) auf, die unter anderem für die Bindung von TRIM28 an Mi-2 $\alpha$  (CHD3, eng verwandt mit CHD4, einem zentralen Bestandteil des NuRD-Komplexes) sowie SETDB1, einer Histon-Methyltransferase verantwortlich sind (Schultz et al 2002). Gemeinsam besitzen die beiden Domänen 216 Aminosäuren und haben so ungefähr das Molekulargewicht des im Pulldown-Experiments gefundenen Fragments (23

kDa). Diese Aussage ist jedoch recht spekulativ; ob es sich tatsächlich um dieses Fragment handelt, muss hier offen bleiben.

#### **4.5.2 Endogenes TRIM28 kann mit GST-E8<sup>E2C</sup> spezifisch aus Gesamtzellextrakten präzipitiert werden**

Nach dem Pulldown mit *in vitro* exprimiertem TRIM28 wurde der Versuch mit  $\Phi$ NX-Zellextrakt wiederholt. Aus je 17 Schalen wurden für GST-E8<sup>E2C</sup>, die funktionell inaktive Mutante GST-E8<sup>E2C</sup> $\Delta$ 3-12 sowie für GST-HP1 $\alpha$  als Positiv- und für GST als Negativkontrolle Gesamtzellextrakte hergestellt und mit den jeweiligen GST-Fusionsproteinen präzipitiert.

Der Nachweis des präzipitierten endogenen TRIM28 erfolgte im Western Blot (Abbildung 23(b)). Wie beim GST-Pulldown aus dem Retikulozyten-Lysat zeigte sich eine spezifische Interaktion für das GST-E8<sup>E2C</sup> sowie für die Positivkontrolle GST-HP1 $\alpha$ , nicht jedoch für GST allein oder für die funktionell inaktive Mutante GST-E8<sup>E2C</sup> $\Delta$ 3-12. Erneut fällt die Interaktion für GST-HP1 $\alpha$  vermutlich aufgrund der oben ausgeführten Oligomerisierung des GST-HP1 $\alpha$  sowie einer Verstärkung des HP1 $\alpha$ -Inputs durch endogenes HP1 $\alpha$ , das durch Oligomerisierung gebunden werden kann.

#### **4.5.3 Koimmunpräzipitation von TRIM28 mit E8<sup>E2C</sup>-Protein A Fusionsprotein**

Für eine Koimmunpräzipitation wurden je zehn 100 mm-Schalen  $\Phi$ NX-Zellen mit Expressionsplasmiden für E8<sup>E2C</sup>-Protein A, der

funktionell inaktiven Mutante E8<sup>Δ</sup>E2C KWK-Protein A und Protein A transfiziert.

Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und aus dem Gesamtzellextrakt das Fusionsprotein mittels Protein A/G-Matrix präzipitiert.

Aus dem Präzipitat wurde nach siebenmaligem Waschen mittels SDS-PAGE und Western Blot das in den Zellen vorliegende endogene TRIM28 angefärbt.

Abbildung 23(c) zeigt eine deutliche Bande für TRIM28 beim erwarteten Molekulargewicht von 105 kDa nur in der E8<sup>Δ</sup>E2C-Protein A und in der Kontrollspur (Zellextrakt), nicht aber in den Spuren für Protein A (Negativkontrolle) oder bei der nicht funktionellen Mutante E8<sup>Δ</sup>E2C KWK-Protein A.

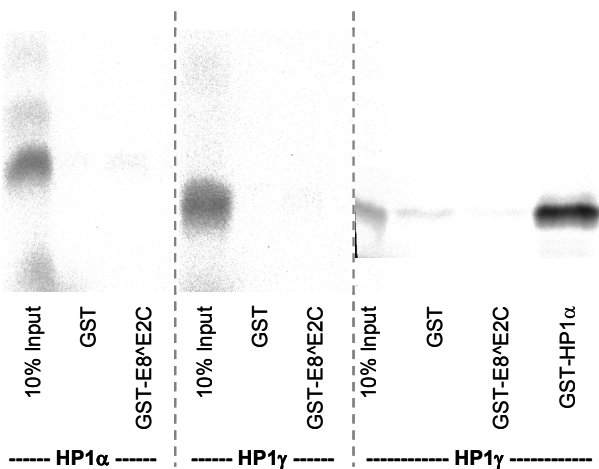
Die beiden GST-Pulldown Experimente sowie das Ergebnis der Koimmunpräzipitation des endogen vorliegenden TRIM28 weisen deutlich auf die spezifische Interaktion der funktionalen E8-Domäne bzw. des vollständigen und funktionalen E8<sup>Δ</sup>E2C Proteins mit TRIM28 hin, nicht aber der Kontrollen oder der nicht funktionalen Deletionsmutante bzw. der E8<sup>Δ</sup>E2C KWK-Mutation. Dies legt nahe, dass TRIM28 ein Kofaktor für die Vermittlung der Repressorfunktion von E8<sup>Δ</sup>E2C ist. Dies eröffnet für die Vermittlung der Replikationsrepression mindestens einen möglichen, von HDAC-Aktivität unabhängigen Pfad. Die Interaktion mit TRIM28 warf nun die Frage auf, ob die Effektorfunktion über den bekannten TRIM28-

Interaktionspartner HP1 erfolgte und ob eine Wechselwirkung von E8<sup>Δ</sup>E2C mit HP1 nachweisbar wäre.

#### 4.5.4 Die HP1-Proteine binden nicht an E8<sup>Δ</sup>E2C

Die HP1-Proteine HP1 $\alpha$  und HP1 $\gamma$  wurden im GST-Pulldown hinsichtlich ihrer Bindung an E8<sup>Δ</sup>E2C getestet. Hierfür wurden jeweils in Kaninchen Retikulozyten-Lysat *in vitro* synthetisierte, <sup>35</sup>S-Cystein markierte Proteine mit GST-E8<sup>Δ</sup>EC und GST inkubiert.

Es zeigte sich keine Interaktion mit GST oder GST-E8<sup>Δ</sup>E2C. Für HP1 $\gamma$  wurde das Experiment wiederholt, diesmal zusätzlich mit GST-HP1 $\alpha$  als Positivkontrolle. Auch in diesem Experiment konnte keine Interaktion zwischen GST-E8<sup>Δ</sup>E2C gezeigt werden, jedoch



eine sehr deutliche Interaktion zwischen den beiden HP1-Isoformen. Eine direkte Interaktion zwischen HP1 und E8<sup>Δ</sup>E2C konnte somit nicht nachgewiesen werden. Da

**Abb. 26: GST-Pulldown mit <sup>35</sup>S-markierten HP1-Proteinen**

HP1 als Interaktionspartner von TRIM28 bekannt ist, bleibt die indirekte Interaktion via TRIM28 – u.U. abhängig von weiteren Faktoren – zumindest eine Möglichkeit. Nachdem die Versuchsergebnisse HP1 als primärer Vermittler der Effektorfunktion zur Replikationsrepression wenig wahrscheinlich erscheinen lassen, war die Frage wieder offen, welche Proteine – mit oder ohne Vermittlung des Kofaktors TRIM28 – die entscheidende Aktivität vermitteln, die zur wirksamen Repression der Replikation notwendig ist.

#### **4.6 Die E8-Domäne interagiert mit Histon-Methyltransferasen**

TRIM28 interagiert mit KRAB-Zink Finger Proteinen und HP1 und weiteren Proteinen wie z.B. Histonmethyltransferasen (Schutz DC et al, 2001).

Die Methylierung von Histonen – unter anderem am Lysinrest 9 des Histons 3 – durch Histon-Methyltransferasen (HMT) ist langlebiger als die Histon-Acetylierung und notwendige Voraussetzung für die Bindung von HP1 an das Chromatin.

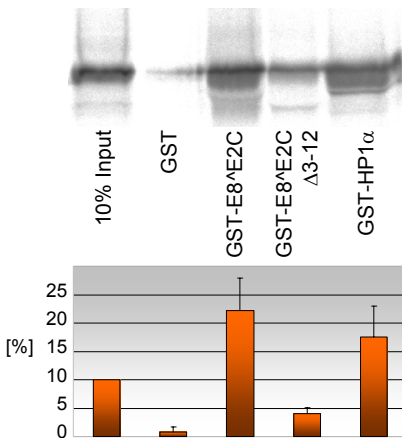
Vaute et al (2002) wiesen eine funktionelle und physische Interaktion zwischen der HMT SUV39H1 und Histon-Deacetylasen 1, 2 und 3 nach und zeigten eine Bindung des N-terminalen Teils von SUV39H1 an den aus HDAC 1 und 2 bestehenden Kernkomplex der großen Heterochromatin-Komplexe SIN3 und NuRD.

TRIM28 ist Bestandteil großer Proteinkomplexe, in denen auch Methyltransferasen eine Rolle spielen (Craig 2004, Jepsen und Rosen-

feld 2002), und Schultz et al (2002) zeigten eine direkte Interaktion von TRIM28 und der HMT SETDB1. Beide Proteine, SUV39H1 und SETDB1, verfügen über eine SET-Domäne. SETDB1 wird insbesondere mit der Trimethylierung von Histon 3 Lysin 9 (H3K9) in Verbindung gebracht.

Die beiden HMTs SUV39H1 und SETDB1 wurden daher als mögliche Interaktionspartner von E8<sup>Δ</sup>E2C näher betrachtet.

#### 4.6.1 <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes SUV39H1 bindet in Pull-down-Experimenten an GST-E8<sup>Δ</sup>E2C



**Abb. 27: GST-Pulldown mit <sup>35</sup>S-markiertem SUV39H1**

Autoradiographie (oben) und auf 10% Input bezogene Quantifizierung (unten).

Mit <sup>35</sup>S-Methionin markiertem, *in vitro* synthetisiertem SUV39H1 wurden GST-Pulldowns durchgeführt. Hierfür wurde neben GST-E8<sup>Δ</sup>E2C und GST-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12 auch jeweils gleiche Mengen der GST-Domäne allein sowie als Positivkontrolle das als Interaktionspartner für SUV39H1 publizierte GST-HP1 $\alpha$  (Craig 2004) eingesetzt.

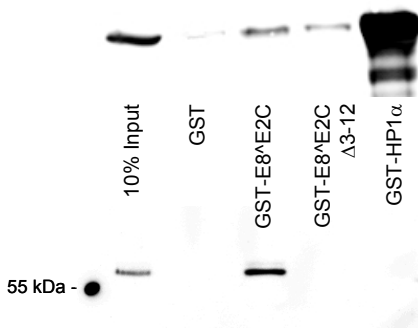
In der anschließenden SDS-PAGE und Autoradiographie zeigte sich bei der für SUV39H1 erwarteten Größe eine Interaktion in den Spuren von GST-E8<sup>Δ</sup>E2C und



GST-HP1 $\alpha$ , nicht aber in der Kontrollspur mit GST alleine. Die Interaktion mit GST-E8 $\Delta$ E2C  $\Delta$ 3-12 fiel um mehr als den Faktor 5 schwächer aus. Die quantitative Auswertung der Banden aus vier Experimenten ist in Abb. 25 jeweils relativ zu 10% des Inputs wiedergegeben.

#### 4.6.2 Überexprimiertes SUV39H1-myc kann mit GST-Proteinen aus Zellextrakten präzipitiert werden

Anschließend wurde die GST-Präzipitation nach dem bekannten Protokoll in zwei Varianten aus Gesamtzellextrakt durchgeführt. Zunächst wurden 16 100mm-Schalen  $\Phi$ NX-Zellen mit pCMV



**Abb. 28: GST-Pulldown von SUV39H1-myc aus  $\Phi$ NX-Gesamtzellextrakten**

Es sind zwei Versuche abgebildet: oberhalb der Beschriftung wurde als Kontrolle auch GST-HP1 $\alpha$  verwendet, unterhalb nur GST, GST-E8 $\Delta$ E2C sowie die Deletionsmutante

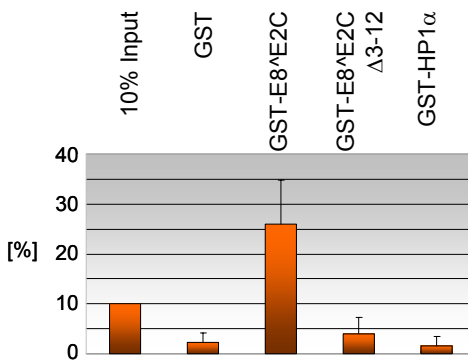
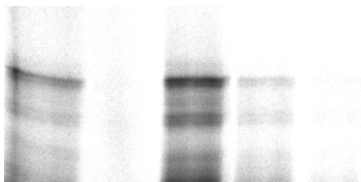
(myc)3-SUV39H1 Expressionsplasmid transfiziert und die Gesamtzellextrakte auf die vier Ansätze (GST; GST-E8 $\Delta$ E2C; GST-E8 $\Delta$ E2C $\Delta$ 3-12 und GST-HP1 $\alpha$ ) verteilt. In einem weiteren Experiment wurden fünf  $\Phi$ NX-Zellkulturschalen transfiziert und die Gesamtzellextrakte auf drei Ansätze (GST;

GST-E8<sup>E2C</sup>; GST-E8<sup>E2C</sup>Δ3-12) verteilt.

Der Nachweis von SUV-39H1 erfolgte nach SDS-PAGE im Western Blot. Die Interaktion zwischen SUV39H1-myc und dem GST-E8<sup>E2C</sup> Protein war 5fach stärker als zwischen dem SUV39H1-myc und dem funktionell inaktivem GST-E8<sup>E2C</sup>Δ3-12 Protein. Dieses Experiment zeigte eine Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit SUV39H1 und damit eine Verbindung von E8 zur Histon-Methylierung, die eine wichtige Rolle bei der Heterochromatisierung und somit bei der Repression der Replikation spielen könnte.

#### 4.6.3 <sup>35</sup>S-markiertes, *in vitro*-translatiertes SETDB1 bindet an GST-E8<sup>E2C</sup>

Mit <sup>35</sup>S-Methionin markiertem, *in vitro*-translatiertem SETDB1 wur-



den GST-Pulldowns durchgeführt. Hierfür wurde neben GST-E8<sup>E2C</sup> und GST-E8<sup>E2C</sup> Δ3-12 auch jeweils gleiche Mengen der GST-Domäne allein sowie GST-HP1α eingesetzt.

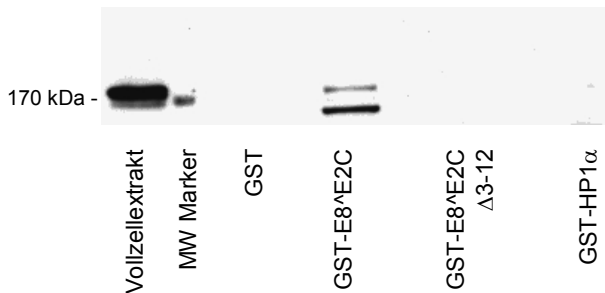
#### **Abb. 29: GST-Pulldown von radioaktiv markiertem SETDB1**

Autoradiographie (oben) und Quantifizierung bezogen auf den Input (unten)

In der anschließenden SDS-PAGE und Autoradiographie zeigte sich bei dem für SETDB1 erwarteten Molekulargewicht eine Interaktion nur in den Spur von GST-E8<sup>Δ</sup>E2C und eine um den Faktor 6 schwächere Bande in der Spur des inaktiven GST-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12, nicht aber in der Kontrollspur mit GST alleine oder von GST-HP1 $\alpha$ . Der quantitativen Auswertung der Banden lagen vier Experimente zugrunde.

#### 4.6.4 Endogenes SetDB1 kann mit GST-Fusionsproteinen aus Zellextrakten präzipitiert werden

Um die Interaktion zwischen E8<sup>Δ</sup>E2C und endogenem SETDB1 zu überprüfen, wurden GST-Pulldowns mit  $\Phi$ NX-Zellextrakten durchgeführt. Aus je 17 100mm-Schalen  $\Phi$ NX-Zellen pro Ansatz wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und mit GST, GST-E8<sup>Δ</sup>E2C, GST-



E8<sup>Δ</sup>E2CΔ3-12, GST-HP1 $\alpha$  zwei Stunden bei 4°C im Überkopftaunler inkubiert. Nach siebenmaligem Waschen mit NP40-Puffer

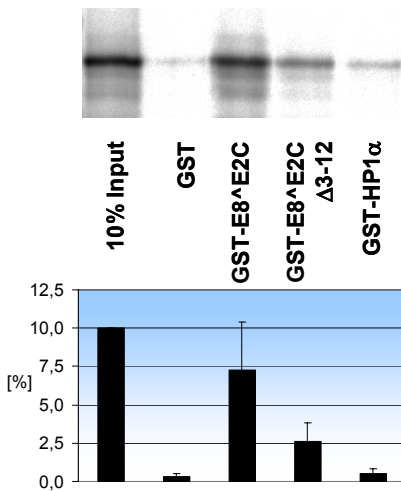
**Abb. 30: GST-Pulldown von endogenem SETDB1 aus Gesamtzellextrakten**

Der Nachweis erfolgte im Immunoblot mit  $\alpha$ SETDB1.

(0,1% Igepal 630) wurde mit SDS-Probenpuffer eluiert und eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Der in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendete  $\alpha$ SETDB1-Antikörper wurde vor der Verwendung zwei Stunden bei 4°C mit nativem und denaturiertem (3 Min. bei 95°C erhitztem) GST-E8<sup>E2C</sup> in 5% fettfreier Milch vorinkubiert, da in Vorexperimenten eine starke Kreuzreaktion mit GST-Protein beobachtet wurde. Beim erwarteten Proteingewicht zeigte sich im Western Blot eine deutliche Bande für den Pulldown mit GST-E8<sup>E2C</sup>, nicht jedoch in der Spur von GST-E8<sup>E2C</sup> $\Delta$ 3-12 oder in der Negativkontrolle (GST allein). Auch GST-HP1 $\alpha$  konnte kein SETDB1 binden (Abbildung 28).

Neben SUV39H1 wiesen diese Ergebnisse auf SETDB1 als weiteres mögliches Effektormolekül für die Vermittlung der Replikationsrepression hin. Im Gegensatz zu SUV39H1 spielt für SETDB1 eine direkte Interaktion mit HP1-Proteinen keine zentrale Rolle, so dass mit SETDB1 Hinweise auf einen weiteren Pfad zur Modifikation von Histonen vorliegen.

#### 4.7 *De novo* DNA-Methyltransferase DNMT3a bindet an die E8-Domäne



**Abb. 31: GST-Pulldown von IVT <sup>35</sup>S-markierter DNMT3a**

Autoradiographie des SDS-PAGE (oben) und Quantifizierung bezogen auf den Input (unten).

Nachdem mit SETDB1 und SUV39H1 zwei Histon-Methyltransferasen als Interaktionspartner von E8^E2C identifiziert wurden, die die Replikationsrepression unabhängig von Histon-Deacetylierung erklären können, wurde in den darauf folgenden Experimenten nach weiteren möglichen Interaktionspartnern entlang der Funktionskette gesucht, die zur Heterochromatisierung von Chromatin beitragen.

Wie in der Einleitung dargelegt, wird die Methylierung von

CpG-Dinukleotiden auf der DNA als einer der stabilisierenden Endpunkte der Heterochromatisierung gesehen (Craig 2004). Eine weitere als Interaktionspartner für E8^E2C in Frage kommende Proteinfamilie waren daher die DNA-Methyltransferasen. Die beiden bekanntesten Proteine dieser Familie sind DNMT1 und DNMT3a.

DNMT1 ist eine Wartungs-DNA-Methyltransferase, die keine bedeutende Rolle spielt bei *de novo* DNA-Methylierung zur Repression der Transkription oder der Replikation (Lande-Diner et al 2007, Spada et al 2007, Brown et al 2007, Damelin et al 2007).

Hingegen wird DNMT3a als wichtiger Akteur bei der Heterochromatisierung und dem Silencing von Chromatin und als möglicher Interaktionspartner von HP1, als direkter Interaktionspartner von SETDB1 sowie von HDAC1 und SUV39H1 beschrieben (Oda et al 2006, Li et al 2006, Lehnertz et al 2003, Fuks et al 2001, Fuks et al 2003). Im Gegensatz zu DNMT1 spielt DNMT3a somit vor allem bei der *de novo* DNA-Methylierung eine Rolle und wurde bereits mit einer Reihe der in dieser Arbeit bereits untersuchten Proteine assoziiert.

Im Zusammenhang mit E8<sup>Δ</sup>E2C wäre eine Rolle bei der langfristigen Repression der viralen Plasmide denkbar. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden GST-Pulldown Experimente mit <sup>35</sup>S-Methionin markierter, *in vitro*-translatierter DNMT3a durchgeführt. Neben GST-E8<sup>Δ</sup>E2C und GST-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12 wurden auch jeweils gleiche Mengen der GST-Domäne allein sowie GST-HP1 $\alpha$  als Kontrolle eingesetzt.

In der anschließenden SDS-PAGE und Autoradiographie zeigte sich eine deutliche Interaktion mit GST-E8<sup>Δ</sup>E2C und HP1 und eine um den Faktor 5 schwächere Bindung an das funktionell inaktive GST-E8<sup>Δ</sup>E2C Δ3-12.

Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass E8<sup>E2C</sup> gezielt die *de novo* DNA-Methyltransferase DNMT3a an E2-Bindungsstellen am HPV31 Ursprung rekrutiert und neben den Histonen so auch die DNA methyliert werden könnte.

#### **4.8 Im Y2H Screen binden Bestandteile großer Proteinkomplexe an E8<sup>E2C</sup>**

Neben der Abfrage bereits bekannter Akteure und Prozesse zur Heterochromatisierung bzw. zur Repression von Transkription und Replikation wurde auch der Versuch unternommen, mit einem unvoreingenommenen genetischen Screen neue Interaktionspartner von E8<sup>E2C</sup> zu identifizieren.

Hierzu wurden zwei Variationen des Yeast-2-Hybrid Systems eingesetzt.

In einem ersten Ansatz wurde mit Hilfe des Matchmaker-Systems von Clontech ein Y2H mit einer HeLa cDNA Bank und einem GAL4-E8<sup>E2C</sup>(1-37)-Fusionsprotein durchgeführt. Beim ersten Experiment wurde nach der Paarung auf drei Marker selektiert (Trp-/Leu-/His-). Es wuchsen nach 2-3 Wochen Hunderte sehr kleine Hefekolonien auf den Selektionsplatten, so dass eine weitere Analyse nicht möglich war.

Beim zweiten Experiment wurde nach der Paarung vierfach selektiert (Trp-/Leu-/His-/Ade-), was in sehr wenigen angewachsenen Kolonien resultierte.



**Abb. 32: GST-Pulldownexperiment mit IVT <sup>35</sup>S-markiertem NRBP bzw. RACK1**

Autoradiographie des SDS-PAGE.

Die einzigen interessant erscheinenden zwei Proteinsequenzen, RACK1 (4X) und NRBP (3X), wurden jeweils mehrfach isoliert und daher weiter verfolgt.

RACK1 (Receptor of activated protein c kinase) ist ein 35 kDa-Protein, das in sehr vielen Veröffentlichungen mit dem Hinweis auftaucht, es sei im Y2H gefunden worden. Es

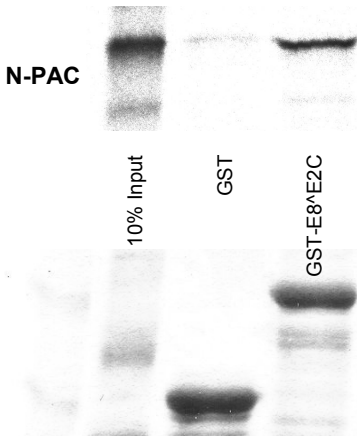
ist im Zytosol lokalisiert (Rigas et al, 2003).

NRBP (nuclear receptor binding protein) hat ein Molekulargewicht von 59,8 kDa und dient als Adaptorprotein, das Signalwege mit Beteiligung von SH2-Domänen enthaltende Proteine und nukleäre Rezeptoren verbindet (Hooper et al, 2000).

Mittels *in vitro* Translation und anschließendem GST-Pulldown wurde die mögliche Interaktion von NRBP und RACK1 mit E8<sup>E2C</sup> untersucht. Es war jedoch in drei wiederholten Experimenten keine Interaktion von RACK1 oder NRBP mit GST-E8<sup>E2C</sup> nachweisbar.

In Kollaboration mit Prof. Dr. Michael Winkler (Universität Ulm, mittlerweile Universität Kiel) wurde ein weiterer genetischer Yeast-





**Abb. 33: GST-Pulldown von IVT <sup>35</sup>S-markiertem N-PAC**

Autoradiography des SDS-PAGE (oben) und Coomassie Kontrollgel für den GST-Proteininput (unten).

two-Hybrid Screen nach Interaktionspartnern des E8^E2C Proteins in dessen Labor durchgeführt. Hierfür wurde der für ein E8^E2C-GAL4-Fusionsprotein kodierende Vektor pGBKT7-E8^E2C in den Hefestamm Y153 eingebracht. Die das E8^E2C-Fusionsprotein exprimierenden Hefen wurden mit einer an die Aktivator-domäne fusionierten cDNA-Bank transformiert. Es wurden 73 Klone gepickt, die Genbank-

Plasmide isoliert und probeverdaut.

Aus den 73 Klonen konnten in 27 Fällen Sequenzen gewonnen werden (die verbliebenen waren antisense, nicht in Frame oder nicht sequenzierbar). Unter diesen 27 Sequenzen waren neben dem erneuten Fund von RACK1 zwei neue Teilsequenzen. Die eine konnte dem Protein N-PAC, die andere dem großen Protein CHD6 zugeordnet werden.

N-PAC (auch: Nuclear Protein NP60) ist ein bislang kaum untersuchtes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 54 kDa und

spielt möglicherweise eine Rolle bei der Stress-induzierten Aktivierung von p38a innerhalb des p38 MAP Kinase Signalwegs (Fu et al., 2006).

CHD6 (Chromodomain helicase DNA binding protein 6) ist ein zur SNF2-Familie gehörendes, Chromatin-assoziiertes sehr großes Protein mit einem Molekulargewicht von 305 kDa. Es enthält zwei Chromodomänen, eine Helikase-Domäne und eine ATPase Domäne.

Ganz am Ende dieser Arbeit wurde ein dreifach wiederholtes GST-Pulldown Experiment mit N-PAC und GST bzw. GST-E8<sup>E2C</sup> durchgeführt. Es konnte eine deutliche Interaktion mit GST-E8<sup>E2C</sup> gezeigt werden. Was dies genau bedeutet, musste angesichts der noch weitgehend unbekanntem Funktion von N-PAC jedoch zunächst offen bleiben. Eine weitergehende Untersuchung des N-PAC Proteins war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich.

CHD6 ist insofern ein potenziell hoch interessanter möglicher Interaktionspartner von E8<sup>E2C</sup>, da SNF-Proteine wie z.B. MI-2 eine wichtige Rolle beim Umbau des Chromatins spielen und an den beiden großen in der Einleitung beschriebenen Komplexen beteiligt sind. Die Klonierung und anschließende GST-Interaktionsexperimente mit CHD6 waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

## 5 Diskussion

Die virale DNA-Replikation des HPV wird sowohl positiv als auch negativ durch die beiden viralen, sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteine E2 und E8<sup>E2C</sup> reguliert. Das HPV31 E2 Protein aktiviert die virale DNA-Replikation und reguliert die virale Genexpression/Transkription. Das HPV31 E8<sup>E2C</sup> Protein reprimiert die DNA-Replikation und wirkt als Repressor des frühen Promotors P97, der für die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 verantwortlich ist. Stubenrauch et al. (2001) zeigten, dass das E8<sup>E2C</sup> Protein eine neuartige E2-Bindungsstellen-abhängige, aktiv wirkende transkriptionelle Fernrepressionsaktivität besitzt. Sie zeigten weiter, dass hierfür die bei HPV hoch konservierte E8-Domäne verantwortlich ist und diese Domäne eine übertragbare funktionelle Einheit darstellt. Die minimale Größe dieses Repressorproteins lag bei 21 Aminosäuren für die Repression der Replikation und bei nur 12 Aminosäuren für die Transkriptionsrepression.

Aufgrund der Wirksamkeit der Repressorfunktion der HPV31 E8-Domäne auch bei der Replikation von EBV propagierten Zobel et al. (2003) einen über HPV31 hinaus allgemein gültigen Mechanismus für die Repression extrachromosomal replizierender karzinogener Viren.

Im Mittelpunkt der hier vorliegenden Arbeit stand die Frage nach dem Wirkmechanismus des Replikationsrepressors HPV31 E8<sup>E2C</sup>. Aufgrund der sehr geringen Größe und der Wirksamkeit auch auf die

Replikation von EBV wurde eine Interaktion mit zellulären Faktoren als wahrscheinlich angenommen. Eine Möglichkeit die Transkription und Replikation zu beeinflussen ist die Modifikation des Chromatins

Chromatinmodifikationen wurden lange Zeit vor allem im Zusammenhang mit der Regulierung der Genexpression, d.h. der Transkription diskutiert.

In der jüngeren Zeit wurde aber eine Rolle der Chromatinmodifikationen auch für die Kontrolle der Replikation deutlich. So ergaben Studien zunächst, dass die Replikation während der S Phase insgesamt in Euchromatin früher einsetzt als in Heterochromatin (Untersuchungen hierzu zusammengefasst in den Reviews von Cimbara und Groudine, 2001 und McNairn und Gilbert, 2003). Neuere Veröffentlichungen zeigen einen deutlichen Effekt von Histon-Acetylierung bzw. -Deacetylierung auf die Frequenz der Replikationsinitiation bei Hefe, Drosophila, Frosch-Oozyten und Säugerzellen (Vogelauer et al, 2002, Pappas et al 2004, Ivessa et al 2002, Aggarwal et al 2004, Kemp et al 2005).

Bei der Regulation der viralen Replikation gibt es zwei grundsätzliche Mechanismen. Kleine Tumoviren kodieren auf ihren Plasmiden Origin-bindende Proteine mit sowohl ATPase als auch Helikase-Funktion (Eichman et al. 2004). So bindet das T-Antigen von SV40 bzw. Polyomavirus spezifisch an DNA und besitzt gleichzeitig auch eine Helikase-Funktion. Dagegen codieren humane Papillomaviren

auf ihrem Genom für zwei getrennte virale Proteine E1 und E2, die spezifisch an DNA binden (E2) und ATP-abhängige Helikase-Funktion (E1) besitzen (Stenlund et al. 2003). Beide Mechanismen ermöglichen eine Initiation der Replikation unabhängig vom Zellzyklus der Wirtszelle.

Dem gegenüber kodieren die Gammaherpesviren KSHV und EBV nur jeweils für die DNA-bindenden Proteine EBNA1 bzw. LANA, die den Replikationsursprung erkennen aber keine Helikaseaktivität besitzen. Interessanterweise weisen beide eine strukturelle Homologie zu HPVE2 auf (Edwards et al. 1998, Bochkarev et al. 1996, Garber et al. 2002). Die Genome beider Viren replizieren nur einmal pro Zellzyklus und hierzu werden zelluläre Proteine benötigt. (Wang et al. 2005, Sugden et al. 2001). Entsprechend wurde eine Bindung von LANA/ EBNA1 an ORC *in vitro* nachgewiesen und ORC bindet an die viralen Replikationsursprünge *in vivo* (Stedman et al. 2004, Schepers et al. 2001, Lim et al. 2002).

Zhou et al. fanden 2005 eine Deacetylierung der Nukleosomen an OriP, die zeitlich zusammenfällt mit MCM Loading in der G1/S Phase des Zellzyklus. Diese spezifisch an Histon H3 vorgenommene Deacetylierung wurde durch HDACs 1 und 2 vermittelt und Behandlung mit dem Klasse I HDAC-Inhibitor TSA verhinderte Deacetylierung, MCM Loading und OriP DNA-Replikation. Die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen dem Protein SNF2h und HDAC1/2 (Hakimi et al. 2002) kann die Koordination von Chromatin Remode-

ling und Histon-Deacetylierung zumindest teilweise erklären. Eine Reihe weiterer Publikationen berichten von teilweise widersprüchlichen Chromatinmodifikationen und deren Auswirkung auf die Replikation von DNA am Beispiel von EBV OriP, KSHV Plasmid Origin und Hühner  $\beta$ -Globin Origins (Stedman et al. 2002, Danis et al. 2004, Vogelauer 2002, Aggarwal 2004, Prioleau 2003). Auch wenn sich kein eindeutiges oder einfaches Muster ablesen lässt, so wird doch deutlich, dass Chromatinmodifikationen eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Replikation sowohl zellulärer als auch episomaler viraler Genome spielen.

Aufgrund der zentralen Stellung der Acetylierung bzw. Deacetylierung von Histonen relativ am Anfang der „Befehlskette“ zur Bildung von Heterochromatin zur Regulation von Transkription und Replikation wurden in der hier vorliegenden Arbeit zunächst die Klasse I Histon-Deacetylasen (HDAC 1, 2 und 3) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe der HDAC-Inhibitoren MS-275 und HC-Toxin die durch E8<sup>^</sup>E2C hervorgerufene Repression der Transkription in scc-13-Zellen bzw. humanen primären Keratinozyten ganz oder teilweise aufgehoben wird. Die Interaktion der Klasse I HDACs 1, 2 und 3 mit HPV31 E8<sup>^</sup>E2C konnte in GST-Pulldown-Assays gezeigt werden. Überexprimierte HDAC3 wurde auf drei verschiedenen Wegen mit E8<sup>^</sup>E2C-Konstrukten koimmunpräzipitiert. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass E8<sup>^</sup>E2C mit allen drei Klasse I HDACs interagiert. Zudem wurde gezeigt, dass die Histon-

deacetylasen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Transkriptionsrepression durch E8<sup>E2C</sup> spielen, die durch Zugabe von Klasse I HDAC-Inhibitoren neutralisiert werden kann.

Überraschenderweise konnte bei Versuchen zur Replikationsrepression durch E8<sup>E2C</sup> mit den gleichen scc-13 Zellen die Replikation des HPV31 Ursprungs durch die Zugabe derselben Inhibitoren nicht wieder hergestellt werden. Dies weist darauf hin, dass für die Kontrolle der Replikation durch E8<sup>E2C</sup> ein gänzlich anderer Mechanismus oder zumindest ein unabhängig von Klasse I HDACs funktionierender, ergänzender Mechanismus existiert.

In weiteren Replikationsassays wurde gezeigt, dass die unabhängig von Klasse I-HDACs funktionierenden Transkriptionsfaktoren TRIM28, HP1 $\alpha$  sowie die KRAB-Domäne (Lorenz et al. 2001) die Replikation von HPV31 URR mit gleicher Effizienz reprimieren konnten wie E8<sup>E2C</sup>, wenn sie mittels GAL4-DNA-Bindedomänen an die mit GAL4-versehene HPV31 URR gebracht wurden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Replikation der HPV31 URR prinzipiell auch von anderen, nicht im HPV-Genom codierten Transkriptionsfaktoren negativ reguliert werden kann. Sie warfen zudem die Frage auf, ob eines oder mehrere der untersuchten Moleküle der gesuchte Interaktionspartner von E8<sup>E2C</sup> zur Vermittlung der Replikationsrepression war.

In der Literatur wird das Zusammenspiel von TRIM28, HP1 und der KRAB-Domäne als Funktionskette beschrieben, in der die KRAB-

Domäne als Teil einer großen Familie von spezifisch DNA-bindenden Transkriptionsrepressoren das 108 kDa große Adaptormolekül TRIM28 bindet und dieses wiederum HP1 rekrutiert (Lechner et al. 2000). In Bindungsstudien konnte eine Bindung von E8<sup>E2C</sup> an HP1 $\alpha$  oder HP1 $\gamma$  nicht nachgewiesen werden. Dagegen band TRIM28 im GST-Pulldown an E8<sup>E2C</sup>. Die Interaktion wurde mit überexprimiertem TRIM28 und mit endogenem TRIM28 aus Zellkulturen in GST-Pulldowns und in Koimmunpräzipitationsexperimenten mit Protein A-Fusionsproteinen bestätigt. Dies demonstriert eine mögliche Rolle des KRAB-Domain-Korepressors TRIM28 auch bei der Vermittlung der Replikationsrepression von E8<sup>E2C</sup>. Eine eigene Repressionsaktivität von TRIM28 wurde trotz zahlreicher dahin gehenden Untersuchungen noch nicht publiziert; insofern ist die Beteiligung weitere Effektorproteine bei der Vermittlung der Repressionsfunktion wahrscheinlich, zumal für TRIM28 eine Reihe von Interaktionspartnern veröffentlicht wurden (Jepsen und Rosenfeld 2002).

Nachdem eine Rolle von HDACs bei der Replikationsrepression durch E8<sup>E2C</sup> nicht bestätigt werden konnte, musste die Methylierung von Histonen in Betracht gezogen werden. SETDB1 und SUV39H1 sind zwei gut untersuchte, aber deutlich unterschiedliche Histonmethyltransferasen (HMT). Die Histon H3-spezifische HMT SETDB1 kann über eine N-terminale Tudor Domäne an SIN3/HDAC1 und 2 binden und bei seiner Rekrutierung an einen Promotor



die Transkription unterdrücken. Dies geschieht auch unabhängig von seiner SET-Domäne und korreliert mit seiner Bindung an SIN3/HDAC1/2 (Yang et al. 2003). SETDB1 trägt neben der SET-Domäne noch eine methyl-CpG-bindende Domäne (Yang et al. 2003).

Die vorherige Methylierung des Lysin 9 von Histon H3 (H3K9) durch SUV39H1 ist Voraussetzung für die Bindung und anschließende Oligomerisierung von HP1-Proteinen, die einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Heterochromatisierung darstellt. Vaute et al. publizierten 2002, dass auch SUV39H1 unabhängig von seiner C-terminalen SET-Domäne (die die HMT-Funktion vermittelt) mit seinem N-terminalen Teil mit den HDACs 1,2 und 3 interagieren und an den HDAC-enhaltenden Core Histone Deacetylase Complex binden kann, der Bestandteil der großen Proteinkomplexe SAP und NuRD ist (siehe Einleitung, Abb. 7 und 8).

In der vorliegenden Arbeit konnten *in vitro* translatiertes SETDB1 und SUV39H1 in GST-Pulldown-Experimenten spezifisch mit E8<sup>E2C</sup> präzipitiert werden. Die Interaktion mit GST-E8<sup>E2C</sup> wurde anschließend mit in  $\Phi$ NX-Zellen überexprimiertem SUV39H1-myc bzw. endogenem SETDB1 bestätigt. Mangels eines HMT-Inhibitors konnte die funktionelle Rolle der HMTs für die Repression von Transkription oder Replikation nicht untersucht werden.

Die Interaktion mit den beiden HMTs weitete den potenziellen Wirkungsgrad von E8<sup>E2C</sup> deutlich aus; im Gegensatz zu den dynamischen Gleichgewichten von Histon-Acetylierung (durch HATs) und -

Deacetylierung (durch HDACS) wird die Methylierung von Histonen als längerfristig wirksame und weniger reversible Modifikation betrachtet, die insofern geeignet erscheint, eine dauerhaftere reprimierende Wirkung von E8<sup>E2</sup>C auf die Replikation der HPV31 URR zu erklären.

Nachdem eine Interaktion mit den HP1 Proteinen trotz mehrerer denkbarer indirekter Verbindungen (TRIM28 und SUV39H1) nicht gezeigt werden konnte, blieb in der allgemein angenommenen Wirkungskette zum Heterochromatin noch die Methylierung der DNA am Ursprung oder ausgehend vom Replikationsursprung bzw. den E2-Bindungsstellen zu untersuchen.

Die Modifizierung und das Remodeling von Chromatin hat über mehrere Proteine Berührungspunkte auch zur Modifikation der DNA selbst, die als sehr viel längerfristig wirksames Instrument gilt, einzelne Gene oder längere Abschnitte der DNA zu inaktivieren. Einerseits binden methyl-CpG-bindende Proteine an methylierte DNA und rekrutieren HDACs (Nan et al. 1998). Andererseits können HDACs auch direkt von den für die DNA-Methylierung verantwortlichen DNA-Methyltransferasen (DNMTs) an die DNA rekrutiert werden. Während die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) unmittelbar bei der Replikation die naszierenden DNA-Stränge methyliert (Chuang et al. 1997), nimmt die DNMT3a *de novo* Cytosin 5'-Methylierungen von CpG-Dinukleotiden vor (Okano et al. 1999, Ramsahoye et al. 2000).

Hinsichtlich der hier behandelten Fragestellung der negativen Regulierung von in Nukleosomen gepackten HPV-Genomen wurde daher die Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit der *de novo* DNA-Methyltransferase DNMT3a untersucht. Sie konnte mittels GST-Pulldown mit *in vitro* synthetisierter DNMT3a bestätigt werden.

Die dargestellten Ergebnisse erlauben, das bereits in der Einleitung abgebildete allgemeine Schema zum Ablauf der Heterochromatisierung mit den identifizierten Interaktionspartnern von E8<sup>E2C</sup> zu hinterlegen (Abb. 30). Es wird deutlich, dass E8<sup>E2C</sup> über eine direkte oder indirekte Verbindung zu allen Schlüsselspielern der Wirkungskette von transkriptionell aktivem Chromatin zu dauerhaft inaktiviertem Heterochromatin verfügt: E8<sup>E2C</sup> bindet an den Korepressor TRIM28, die drei Klasse I Histon-Deacetylasen 1, 2 und 3, an die Histon-Methyltransferasen SUV39H1 und SETDB1 und an die *de novo* DNA-Methyltransferase DNMT3a.

Ob ihrer sehr geringen Größe von nur 21 Aminosäuren ist es fraglich, ob die E8-Domäne mit all diesen Proteinen allein interagiert. Wahrscheinlicher scheint, dass – wie bei anderen Systemen zur Steuerung der Transkription oder der Replikation – E8 vor allem die Spezifität der Bindung vermittelt und an das Adaptorprotein TRIM28 bindet, das wiederum als Plattform für die Vermittlung einer Reihe von Effektorfunktionen dient. Diese Frage kann aber aus den hier vorgelegten Daten nicht mit Bestimmtheit beantwortet werden. Beim Betrachten der zahlreichen Querverbindungen zwischen fast allen

einzelnen Proteinen in diesem Wirkungskreis erscheint es aber ohnehin zweifelhaft, hier eine eins zu eins Zuordnung von Interaktionspartnern und Abläufen zu versuchen.

Auch zwischen den im Einzelnen gefundenen Interaktionspartnern finden sich in der Literatur eine Vielzahl von Wechselwirkungen: so interagieren sowohl SETDB1 als auch SUV39H1 mit den HDACs 1 und 2; TRIM28 interagiert neben einer Vielzahl weiterer Proteine mit SETDB1 und für DNMTs wurden direkte Interaktionen mit Klasse I HDACs und SETDB1 nachgewiesen – diese Aufzählung ist noch unvollständig und wird in den kommenden Jahren mit Sicherheit noch erweitert werden.

Unbeantwortet bleibt auch die Frage nach der Beteiligung großer makromolekularer Komplexe wie den in der Einleitung geschilderten SAP- und NuRD-Komplexen oder des ALL1-Komplex. Die Tatsache, dass die meisten der nachgewiesenen Bindungspartner von E8<sup>E2C</sup> mindestens einen der genannten Komplexe binden und im Falle von HDAC1/2 konstitutiver Teil beider Komplexe sind, macht die Beteiligung dieser Komplexe jedoch wahrscheinlich.

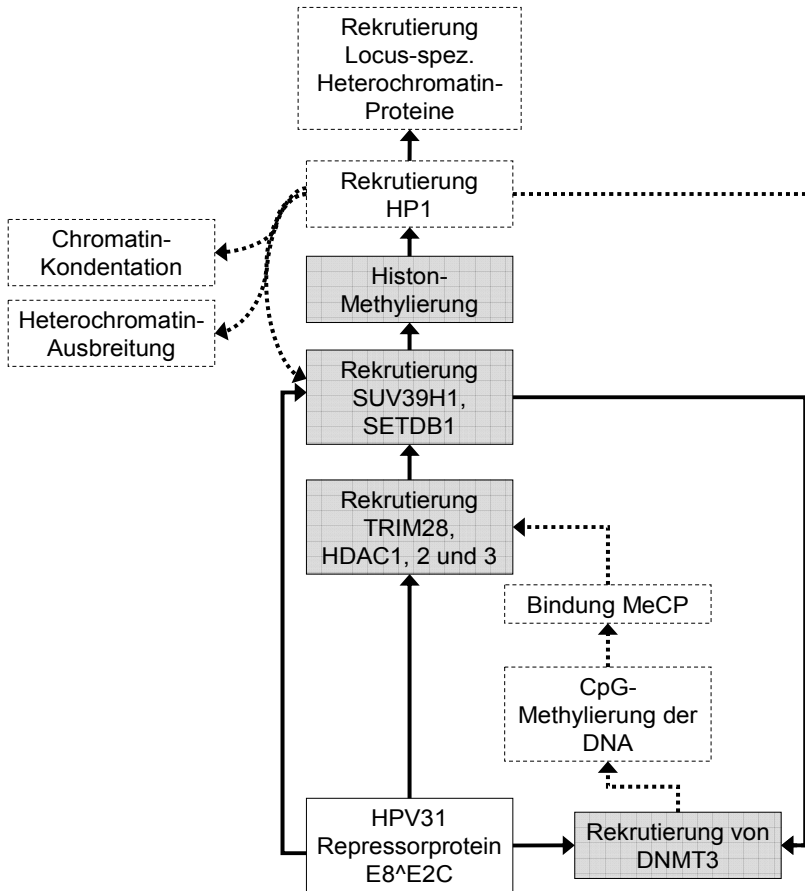
Entscheidender als die genauer Einordnung in ein klares zeitliches Ablaufschema oder der Nachweis noch zahlreicher denkbarer weiterer Interaktionspartner ist der mit dieser Arbeit geführte Nachweis, dass das virale HPV31 E8<sup>E2C</sup> die Repression der Replikation episomaler Plasmide mit Hilfe eines auch von anderen Transkriptionsrepressoren genutzten zellulären Korepressors vermittelt und für die notwendige Modifikation des viralen Chromatins Wechselwirkungen

– direkt oder indirekt – mit allen wichtigen Einheiten der zellulären Wirkungskette zur Heterochromatisierung eingehen kann.

Xie und Folk (2002) stellten für die ori-abhängige Replikation von Polyomavirus-DNA mit der hier vorliegenden Arbeit vergleichbare Untersuchungen an. Als zentrales Regulatorprotein wurde dort das Protein SIN3B untersucht. Wie auch in den hier geschilderten Ergebnissen gezeigt schließen die Autoren anhand ihrer Experimente eine bedeutende Rolle von HDACs bei der Repression der Replikation aus. Die Repression der Transkription kann jedoch durch die Zugabe des HDAC-Inhibitors TSA zumindest teilweise neutralisiert werden. Dies lässt auch für Polyomavirus zumindest eine Beteiligung von Histon-Deacetylierung an der Repression der Transkription, nicht aber an der Replikationsrepression vermuten. Die Autoren zeigen weiter mittels Überexpression von GAL4-Fusionsproteinen und anschließender Koimmunpräzipitation eine Bindung von Polyoma Large T Antigen an SIN3B. Da SIN3B als Gerüstprotein für zahlreiche andere Proteine fungiert, propagieren die Autoren daher einen HDAC-unabhängigen Mechanismus, in dem weitere, mit SIN3 assoziierte Proteinbestandteile des Heterochromatins die Replikationsrepression vermitteln.

Auf die Beteiligung großer Komplexe könnte auch ein Ergebnis aus dem ansonsten wenig ergiebigen Y2H-Screen deuten: hier wurde neben dem Protein N-PAC (mit noch völlig unbekannter Funktion) das über 300 kDa große Protein CHD6 gefunden. Es gehört wie Mi-

2β (chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4, CHD4), das wiederum häufiger Bestandteil des NuRD bzw. des ALL-1 Komplex ist, zur CHD-Familie.



**Abb. 34 (modifiziert nach Craig 2004): Mögliches Ablaufschema der Heterochromatisierung unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit**

In den von Craig skizzierten Ablauf der Heterochromatisierung (vgl. Seite 17) wurden die Ergebnisse dieser Arbeit eingesetzt. Proteingruppen, für die eine Interaktion mit E8<sup>E2C</sup> gezeigt werden konnte, sind mit einem Kasten mit durchgezogener Linie dargestellt und farbig hinterlegt, die Pfeile sind durchgezogen dargestellt. Nicht belegte Interaktionen und Pfade sind mit einem gestrichelten leeren Kasten bzw. einem gestrichelten Pfeil dargestellt.

Wie könnte nun ein konkretes Modell für die Begrenzung der Kopienzahl von high risk HPV31 durch die Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit zellulären Bestandteilen des Heterochromatins aussehen?

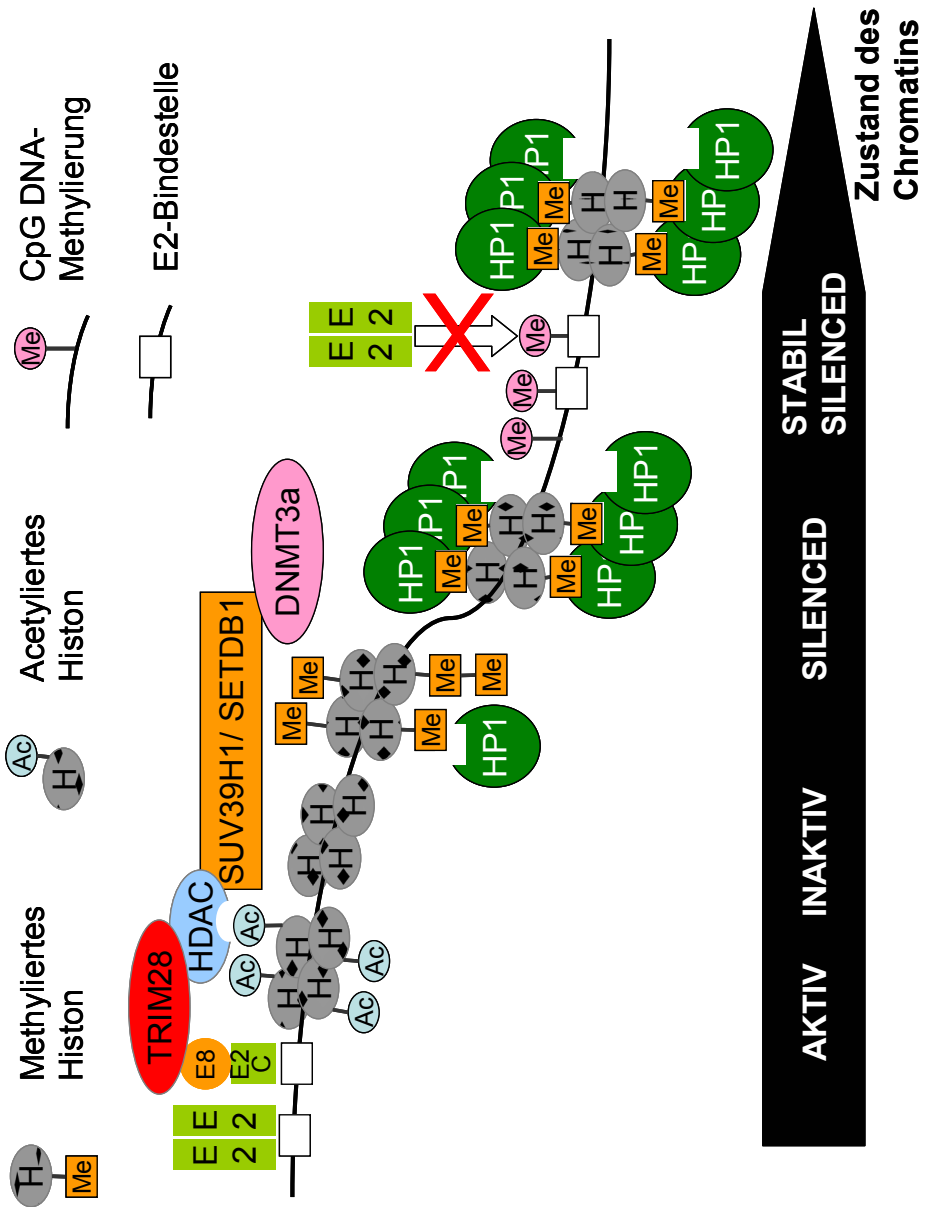
Für die Initiation der Replikation von extrachromosomalen HPV31 Genomen muss zwingend E2 an die in der URR liegenden E2-Bindestellen binden. Die Bindung von E8<sup>E2C</sup> über seine C-terminale E2-Domäne und die anschließende Rekrutierung des Korepressors TRIM28 markieren der Dreh- und Angelpunkt der E8<sup>E2C</sup>-Repressorfunktion und den Beginn umfassender Chromatinmodifikationen. Die Histone würden durch die HDACs 1,2 und 3 deacetyliert und anschließend durch SUV39H1 und SETDB1 methyliert. Hierdurch wird die Bindung von HP1 ermöglicht. Die Oligomerisierung von HP1 führt zur Stabilisierung des inaktiven Chromatins. Die DNA-Methylierung der CpG-Inseln in der HPV31 URR durch das über TRIM28, SETDB1 oder direkt über E8<sup>E2C</sup> rekrutierte DNMT3a stabilisiert die Heterochromatisierung dauerhaft. Denkbar wäre eine direkte CpG-Methylierung innerhalb der URR in Folge der Interaktion zwischen E8<sup>E2C</sup> und DNMT3a auch parallel zur Deacetylierung.

Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden innerhalb der E2-Bindungsstellen von HPV spielt eine Rolle bei der Kontrolle der Replikation, indem durch die DNA-Methylierung die Bindung des viralen Replikationsaktivators E2 an die E2-Bindestellen verhindert wird (Thain et al., 1996). In HPV16-infizierten Zellen ist der DNA-Methylierungsgrad der viralen long control region (LCR) episomaler



HPV16-Genome und hier insbesondere der E2-Bindestellen abhängig vom Differenzierungsgrad der Wirtszelle. Die CpG-Methylierung der HPV16 URR nahm in differenzierten gegenüber undifferenzierten Keratinozyten stark ab (Kim et al., 2003). Die Abnahme von CpG-Methylierung in der Kontrollregion des viralen Genoms würde in einem solchen Modell zu einer besseren E2-Bindung und in Folge zu einer höheren Amplifikation viraler Genome führen und korreliert zur *in vivo* bei high risk HPV beobachteten starken Zunahme der Replikation während der Differenzierung von basalen Zellen mit persistenter Infektion zu epithelialen Hautzellen mit produktiver Infektion.

Auch bei einem weiteren Virus mit persistenter Infektion, EBV, ist der latente Replikationsursprung OriP nicht methyliert, die benachbarten DNA-Segmente weisen jedoch Methylierungen auf (Falk et al., 1993; Li et al., 2003).



**Abb. 35: Modell zur E8<sup>E2C</sup>-vermittelten Heterochromatisierung des episomalen HPV31-Replikationsursprungs.**

Im Gegensatz zum zellulären Chromatin muss das extrachromosomale HPV-Genom nicht in jedem Zellzyklus repliziert werden. Insofern scheint es gut vorstellbar, dass von den 10-100 Kopien pro Zellkern in der persistenten Phase die Mehrzahl dauerhaft mit HP1 belegt, dicht gepackt und hinsichtlich Replikation und Transkription vollständig inaktiv ist. Die verbleibenden aktiven Genome wären Ausgangspunkt für die in der Persistenz nötige Genexpression, die wiederum durch das Gegenspiel von E2 und E8<sup>E2C</sup> dynamisch reguliert würde. Die dynamische Kontrolle der Transkription der wenigen aktiven Genome könnte durch das Gleichgewicht von Histon-Acetylierung und Deacetylierung erfolgen und durch die Bindung von E8<sup>E2C</sup> und die anschließende Rekrutierung von HDACs jeweils reversibel verändert werden; ein darüber hinaus gehendes, dauerhaftes Silencing durch weit fortgeschrittene Heterochromatisierung wäre für diese verbleibenden Genome jedoch nicht sinnvoll, im Gegenteil sogar gefährlich für die Aufrechterhaltung der persistenten Infektion. Dieses Modell würde auch erklären, warum die dynamische Kontrolle der Transkription durch die Zugabe von HDAC-Inhibitoren neutralisiert werden kann, nicht aber die dauerhaft über eine Anzahl weiterer Mechanismen und Wechselwirkungen abgesicherte Replikationsrepression.

Weiter gehende Untersuchungen zum Wirkmechanismus des E8<sup>E2C</sup> Proteins könnten den funktionellen Nachweis des hier aufgestellten Modells zum Gegenstand haben. Insbesondere der Nach-

weis der Interaktionspartner HDAC1, 2 und 3, SUV39H1, SETDB1 und DNMT3a in direkter Nähe zum Chromatin der HPV31 URR durch die ChIP-Technik (Chromatin Immunopräzipitation, hier wird die DNA chemisch mit den Proteinen in ihrer Umgebung verbunden, eine Immunpräzipitation gegen ein Protein durchgeführt und anschließend ein bekanntes DNA-Fragment mittels quantitativer PCR nachgewiesen) wäre sehr interessant.

Für das Wirkungsprinzip von E8<sup>E2C</sup> könnte von den zahlreichen verbleibenden Proteinen im Kontext der Heterochromatisierung insbesondere die festen Bestandteile der NuRD bzw. SIN3B-Komplexe sein, d.h. beispielsweise die Proteine RbAp46/ RbAp48 oder die zentralen Gerüst-Proteine SIN3B bzw. NCo-R/ SMRT.

Auch die Suche nach CpG-methylierten E2-Bindestellen in der HPV31 URR in Folge der Anwesenheit von E8<sup>E2C</sup> wäre eine wertvolle experimentelle Überprüfung des hier aufgestellten Modells.

## 6 Literaturverzeichnis

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

Aggarval BD, Calvi BR. Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature* 2004; 430: 372-6

Ahringer J. NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* 2000; 16:351–356.

Alland L, Muhle R, Hou H Jr, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 1997; 387(6628): 49-55.

Ayer DE. Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol* 1999; 9:193–198.

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

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

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16:6–21.

Bochkarev A, Barwell JA, Pfuetzner RA, Bochkareva E, Frappier L, Edwards AM. Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA. *Cell* 1996;84:791-800

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

Brown KD, Robertson KD. DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability. *Nat Genet.* 2007; 39(3):289-90.

Bruckner, M. Die Rolle von zellulären Transkriptionsfaktoren bei der Replikation humaner Papillomviren (HPV); Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Nov. 2005

Burke LJ, Baniahmad A. Co-repressors 2000. *FASEB J.* 2000; 13:1876-88.

Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14:155–164.

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

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

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

Chuang LS, Ian HI, Koh, TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 1997; 277: 1996-2000

Cimbora DM, Groudine M. The control of mammalian DNA replication: A brief history of space and timing. *Cell* 2001; 104: 643-6

Craig JM. Heterochromatin – many flavours, common themes. *Bioessays* 2005; 27: 17-28.

Damelin M, Bestor TH. Biological functions of DNA methyltransferase 1 require its methyltransferase activity. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(11): 3891-9.

Danis E, Brodolin K, Menut S, Maiorano D, Girard-Reydet C, Mechali M. Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 721-30

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

Demeret, C., C. Desaintes, M. Yaniv, and F. Thierry. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol.* 1997; 71: 9343-9349

Dhar, S. K., K. Yoshida, Y. Machida, P. Khaira, B. Chaudhuri, J. A. Wohlschlegel, M. Leffak, J. Yates, and A. Dutta. Replication from oriP of Epstein-Barr Virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* 2001; 106: 287-296



Dong, G., T. R. Broker, and L. T. Chow. Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements. *J. Virol.* 1994; 68: 1115-1127

Dong, X. P., F. Stubenrauch, E. Beyer-Finkler, and H. Pfister. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int. J. Cancer* 1994; 58: 803-808

Doorbar, J., A. Parton, K. Hartley, L. Banks, T. Crook, M. Stanley, and L. Crawford. Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line. *Virology* 1990; 178: 254-262

Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* 1991; 5: 1657-1671

Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 1993; 7: 555-569

Edwards AM, Bochkarev A, Frappier L. Origin DNA-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8: 49-53

Ehrenhofer-Murray AE. Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem.* 2004; 271: 2335-49.

Eichman BF, Fanning E. The power of pumping together; deconstructing the engine of a DNA replication machine. *Cell* 2004; 119:3-4

Falk, K. & I. Ernberg. An origin of DNA replication (oriP) in highly methylated episomal Epstein-Barr virus DNA localizes to a 4.5-kb unmethylated region. *Virology* 1993; 195: 608-615.

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. USA* 1994; 91: 12398-12402

Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 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: 2090-2100

Fu J, Yang Z, Wei J, Han J, Gu J. Nuclear protein NP60 regulates p38 MAPK activity. *J Cell Sci.* 2006; 119:115-23.

Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* 2001; 20(10):2536-44.

Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(9): 2305-12.

Garber AC, Hu J, Renne R. Latency-associated nuclear antigen (LANA) cooperatively binds to two sites within the terminal repeat, and both sites contribute to the ability of LANA to suppress transcription and to facilitate DNA replication. *J Biol Chem* 2002; 277: 27401-11

Gey, G. O., W. D. Coffman, und M. T. Kubicek. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952; 12: 264-265

Ghosh MK, Harter ML. A viral mechanism for remodeling chromatin structure in G0 cells. *Mol Cell.* 2003;12: 255-60.

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

Hakimi MA, Bochar DA, Schmiesing JA, Dong Y, Barak OG, Speicher DW, Yokomori K, Shiekhattar R. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* 2002; 418: 994-8

Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE. Histone Deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 1997; 89: 341-347

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

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

Higuchi, R., B. Krummel, und R. K. Saiki. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study

of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 7351-7367

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

Hooper JD, Baker E, Ogbourne SM, Sutherland GR, Antalis TM. Cloning of the cDNA and localization of the gene encoding human NRBP, a ubiquitously expressed, multidomain putative adapter protein. *Genomics.* 2000 May 15; 66(1): 113-118.

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

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

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

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

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: 6070-6080

Ivessa AS, Zakian VA. To fire or not to fire: Origin activation in *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *Genes Dev* 2002; 16: 2459-64

Jacobs, S. A., S. D. Taverna, Y. Zhang, S. D. Briggs, J. Li, J. C. Eisenberg, C. D. Allis, and S. Khorasanizadeh. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* 2001; 20: 5232-5241

Jeckel, S., Loetzsch, E., Huber, E., Stubenrauch, F., and T. Iftner. 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: 8736-8744

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293:1074–1080.

Jeon, S., und P. F. Lambert. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92: 1654-1658

Jepsen K, Rosenfeld MG. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci.* 2002;115: 689-98.

Joung KE, Kim DK, Sheen YY. Antiproliferative effect of trichostatin A and HC-toxin in T47D human breast cancer cells. *Arch Pharm Res.* 2004; 27(6): 640-5.

Kanaya, T., S. Kyo, und 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: 159-69

Kemp MG, Ghosh M, Liu G, Leffak M. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A alters the pattern of DNA replication origin activity in human cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 325-36

Klumpp, D. J., F. Stubenrauch, und L. A. Laimins. Differential effects of the splice acceptor at nucleotide 3295 of human papillomavirus type 31 on stable and transient viral replication. *J. Virol.* 1997; 71: 8186-8194

Knopfler PS, Eisenman RN. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 1999; 99: 447-450

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 2001; 410:116–120.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 1997; 89: 349-56

Laimins, L. A. Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. *Seminars in Virology* 1996; 7: 305-313



Lambert, P. F., B. A. Spalholz, and P. M. Howley. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 1987; 50: 69-78

Lambert, P. F., N. L. Hubbert, P. M. Howley, and J. T. Schiller. Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J. Virol.* 1989; 63: 3151-3154

Lambert, P. F., B. C. Monk, and P. M. Howley. Phenotypic analysis of bovine papillomavirus type 1 E2 repressor mutants. *J. Virol.* 1990; 64: 950-956

Lande-Diner L, Zhang J, Ben-Porath I, Amariglio N, Keshet I, Hecht M, Azuara V, Fisher AG, Rechavi G, Cedar H. Role of DNA methylation in stable gene repression. *J Biol Chem.* 2007; 282(16): 12194-200.

Lechner MS, Begg GE, Speicher DW, Rauscher FJ. Molecular Determinants for Targeting Heterochromatin Protein 1-Mediated Gene Silencing: Direct Chromoshadow Domain-KAP-1 Corepressor Interaction Is Essential. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6449-6465

Lee, K. Y., T. R. Broker, and L. T. Chow. Transcription factor YY1 represses cell-free replication from human papillomavirus origins. *J. Virol.* 1998; 72: 4911-4917

Lee, D., B. Lee, J. Kim, D. W. Kim, and J. Choe. cAMP response element-binding protein-binding protein binds to human papillomavirus E2 protein and activates E2-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 7045-7051

Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol.* 2003; 13(14):1192-200.

Leight, E. R., and B. Sugden. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 2000; 10: 83-100

Lepik, D., and M. Ustav. Cell-specific modulation of papovavirus replication by tumor suppressor protein p53. *J. Virol.* 2000; 74: 4688-4697

Li, H. & J. Minarovits. Host cell-dependent expression of latent Epstein-Barr virus genomes: regulation by DNA methylation. *Adv. Cancer Res.* 2003; 89: 133-156.

Li H, Rauch T, Chen ZX, Szabo PE, Riggs AD, Pfeifer GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase

DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(28):19489-500.

Li, R., and M. R. Botchan. Acidic transcription factors alleviate nucleosome-mediated repression of DNA replication of bovine papillomavirus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1994; 91: 7051-7055.

Lim, D. A., M. Gossen, C. W. Lehman, and M. R. Botchan. Competition for DNA binding sites between the short and long forms of E2 dimers underlies repression in bovine papillomavirus type 1 DNA replication control. *J. Virol.* 1998; 72: 1931-1940

Lim C, Sohn H, Lee D, Gwack Y, Choe J. Functional dissection of latency-associated nuclear antigen 1 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus involved in latent DNA replication and transcription of terminal repeats of the viral genome. *J Virol* 2002; 76: 10320-31

Lorenz P, Koczan D, Thiesen H-J. Transcriptional Repression Mediated by the KRAB Domain of the Human C2H2 Zinc Finger Protein Kox1/ZNF10 Does Not Require Histone Deacetylation. *Biol Chem* 2001; 382: 637-644

Maldonado, E., M. Hampsey, and D. Reinberg. Repression: targeting the heart of the matter. *Cell* 1999; 99: 455-458

Mantovani, F., und L. Banks. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20: 7874-7887

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

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

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

McNairn AJ, Gilbert DM. Epigenomic replication: Linking Epigenetics to DNA replication. *Bioessays* 2003; 25: 647-56

Meehan RR. DNA methylation in animal development. *Semin Cell Dev Biol* 2003; 14:53-65.

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

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* 2003; 77(19):10186-201.

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

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

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

Münger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace, and V. L. Zaczyn. Biological activities and molecular tar-

gets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 7888-7898

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389

Nakamura T, Mori T, Tada S, Krajewski W, Rozovskaia T, Wassell R, Dubois G, Mazo A, Croce, CM, Canaani E. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 2002; 10: 1119-1128

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002; 108:475-487.

Oda M, Yamagiwa A, Yamamoto S, Nakayama T, Tsumura A, Sasaki H, Nakao K, Li E, Okano M. DNA methylation regulates long-range gene silencing of an X-linked homeobox gene cluster in a lineage-specific manner. *Genes Dev.* 2006; 20(24): 3382-94.

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

Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* 2001; 17:520–527.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-257

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

Park JH, Jung Y, Kim TY, Kim SG, Jong HS, Lee JW, Kim DK, Lee JS, Kim NK, Kim TY, Bang Yj. Class I Histone Deacetylase-Selective Novel Synthetic Inhibitors Potently Inhibit Human Tumor Proliferation. *Clin Canc Res* 2004; 10: 5271-5281.

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

Pappas Jr DL, Frisch R, Weinreich M. The NAD(+)-dependent Sir2p histone deacetylase is a negative regulator of chromosomal DNA replication. *Genes Dev* 2004; 18:769-81

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

Prioleau MN, Gendron MC, Hyrien O. Replication of the chicken beta-globin locus: Early-firing origins at the 5' HS4 insulator and the rho- and betaA-globin genes show opposite epigenetic modifications. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 3536-49

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

Ramsahoye BH, Biniszkiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch P. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5237-5242

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



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: 331-343

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

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

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

Rigas AC, Ozanne DM, Neals DE, Robson CN. The Scaffolding Protein RACK1 Interacts with Androgen Receptor and Promotes Cross-talk through a Protein Kinase C Signalling Pathway. *JBC* 2003; 278: 46087-46093

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

Rotenberg, M. O., L. T. Chow, and T. R. Broker. Characterization of rare human papillomavirus type 11 mRNAs coding for regulatory and structural proteins, using the polymerase chain reaction. *Virology* 1989; 172: 489-497

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: 5016-5024

Rusche, N. L., A. L. Kirchmaier, and J. Rine. The establishment, heritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 2003; 72: 481-516

Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(8): 4592-7.

Salghetti, S. E., S. Y. Kim, and W. P. Tansey. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J.* 1999; 18: 717-726

Salghetti, S. E., M. Muratani, H. Wijnen, B. Futcher, and W. P. Tansey. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000; 97: 3118-3123

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977; 24: 104-108

Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-1136

Schepers A, Ritzi M, Bousset K, Kremmer E, Yates JL, Harwood J, Diffley JF, Hammerschmidt W. Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J* 2001; 20: 4588-602

Schneider-Maunoury, S., O. Croissant, and G. Orth. Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *J. Virol.* 1987; 61: 3295-3298

Schultz DC, Friedman JR, Rauscher FJ. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 $\alpha$  subunit of NuRD. *Genes Dev* 2001; 15: 428-443.

Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ. SETDB1: a novel KAP-1 associated histone H3, lysine9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 2002; 16: 919-932.

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

Sen, E., J. L. Bromberg-White, und 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: 4798-4809

Silverstein RA, Ekwall K. Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet.* 2005; 47(1):1-17.

Simonini MV, Camargo LM, Dong E, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(5):1587-92.

Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* 2003; 19:629–639.

Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev.* 2007; 21(10): 1169-78.

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

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

Spada F, Haemmer A, Kuch D, Rothbauer U, Schermelleh L, Kremmer E, Carell T, Langst G, Leonhardt H. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for mainte-

nance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol.* 2007; 176(5): 565-71.

Stedman E, Deng Z, Lu F, Lieberman PM. ORC, MCM, and histone hyperacetylation at the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent replication origin. *J Virol* 2004; 24: 1406-17

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

Stenlund A. Initiation of DNA replication: Lessons from viral initiator proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 777-785

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

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

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.* 1998b; 72: 8115-8123

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

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

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

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

Sugden B, Leight ER. EBV's plasmid replicon: An enigma in cis and trans. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 258: 3-11

Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, et al. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 2001; 1:749–758.

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

Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996; 70: 7233-7235

Thiel G, Lietz M, Hohl M. How mammalian transcriptional repressors work. *Eur J Biochem.* 2004; 271(14): 2855-62.

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

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



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

Vaute O, Nicolas E, Vandell L, Trouche D. Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30/2: 475-481

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

Vogelauer M, Rubbi L, Lucas I, Brewer BJ, Grunstein M. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* 2002; 10: 1223-33

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

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

Walton JD. HC-toxin. *Phytochemistry* 2006; 67(14): 1406-13.

Wang J, Sugden B. Origins of bidirectional replication of Epstein-Barr virus: Models for understanding mammalian origins of DNA synthesis. *J Cell Biochem* 2005; 94: 247-256

Wade PA. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 2001; 23:1131-1137.

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

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

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

Yang L, Mei Q, Zielinska-Kwiatkowska A, Matsui Y, Blackburn ML, Benedetti D, Krumm AA, Taborski GJ jr, Chansky HA. An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts

with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors  
mSin3A/B. *Biochem J* 2003; 369: 651-657

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

Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 1997; 89: 357-364

Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D. The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 1998; 95: 279-289

Zhou J, Chau CM, Deng Z, Shiekhattar R, Spindler MP, Schepers A, Liebermann PM. Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *EMBO J* 2005; 24: 1406-17

Zobel T, Iftner T, Stubenrauch F. The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins. *Mol Cell Biol.* 2003; 22: 8352-62.

Zobel, T. Charakterisierung und Nachweis des E8<sup>^</sup>E2C Repressorproteins des humanen “high-risk” Papillomvirus Typ 31 (HPV 31). Dissertation der Fakultät für Biologie der Eberhard Karls Universität Tübingen, 2003.

## **7 Akademische Lehrer**

In alphabetischer Reihenfolge

Prof. Dr. Hans Bisswanger

Prof. Dr. Michael Duszenko

Prof. Dr. Peter Bohley

Prof. Dr. Karl Eisele

Prof. Dr. Bernd Hamprecht

Prof. Dr. Thomas Iftner

Prof. Dr. Gundram Jung

Prof. Dr. Dieter Mecke

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

PD Dr. Frank Stubenrauch

Prof. Dr. Dr. h.c.mult. Wolfgang Voelter

Prof. Dr. Ulrich Weber

Prof. Dr. Ulrich Weser

## 8 Akademischer Lebenslauf

### Promotion

Ab 4/2002 **Doktorarbeit** „Der Wirkmechanismus des Replikations-Repressorproteins E8<sup>^</sup>E2C bei Humanpapillomviren“.  
Institut für Medizinische Virologie, Sektion experimentelle Virologie, Universitätsklinikum Tübingen  
Anleitung: PD Frank Stubenrauch.

### Studium

10/1998-11/2001 **Studium der Biochemie** an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.  
Diplomarbeit: Konstruktion eines rekombinanten bispezifischen Antikörper-Dimers zur effizienten supraagonistischen T-Zell-Aktivierung über das CD28-Molekül (Note 1,0).  
Abschluss: Diplom in Biochemie am 14.11.2001 (Note: 2,0).

1998-1999 **Studium der Biochemie** an der State University of New York at Stony Brook, USA.

10/1995 – 6/1998 **Studium der Biochemie** an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
Vordiplom (Note: 2,0).

### Schule

1987 bis Juni 1994 **Geschwister-Scholl-Schule**, Tübingen  
Abitur mit allgemeiner Hochschulreife (Notendurchschnitt: 1,4).

1985-1987 **Feuerhägle-Gymnasium**, Tübingen

(Hamburg, 11.10.2007, Ingo Ammermann)