

**Zelluläre Ko-Repressoren als funktionelle Interaktoren des  
Papillomvirus E8<sup>E</sup>2C-Proteins**

DISSERTATION

der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von Jasmin Fertey  
aus Ludwigsburg

Tübingen 2010

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 07. 2010

Dekan: Prof. Dr. Mallot

1. Berichterstatter: PD Dr. Stubenrauch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rammensee

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Klassifizierung und Pathogenität humaner Papillomviren</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Lebenszyklus und Replikation der Papillomviren</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Genomorganisation der Papillomviren</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Wirkmechanismus der viralen E6 und E7 Onkoproteine</b>	<b>6</b>
<b>2.5 Virale Regulatorproteine</b>	<b>9</b>
2.5.1 Das E2 Protein	9
2.5.2 Das E8 <sup>A</sup> E2C-Protein	11
<b>2.6 Transkriptionskontrolle durch Chromatin modifizierende Proteine</b>	<b>14</b>
<b>2.7 CHD-Proteine</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Der N-CoR-Komplex</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Methoden</b>	<b>49</b>
3.2.1 Mikrobiologische Methoden	49
3.2.2 DNA-Methoden	51
3.2.3 Zellkultur-Methoden	54
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden	59

<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Untersuchung der E8<sup>E2C</sup>-Proteine verschiedener Hochrisiko-HPV-Typen</b>	<b>76</b>
4.1.1 Die E8-spezifische Repressionsaktivität ist unter den E8 <sup>E2C</sup> Proteinen verschiedener Hochrisiko-Papillomviren konserviert	76
4.1.2 HPV31 E8 <sup>E2C</sup> interagiert mit dem N-CoR-Komplex	81
4.1.3 HPV16, 18 und 31 E8 <sup>E2C</sup> interagieren mit HDAC3	85
4.1.4 Die E8 <sup>E2C</sup> -Proteine von HPV16, 18 und 31 blockieren das Zellwachstum von HeLa-Zellen	87
4.1.5 Die E8 <sup>E2C</sup> -Proteine von HPV 16, 18 und 31 induzieren die Expression von p53 und p21	89
4.1.6 Die 31E8 Domäne kann durch eine zelluläre KRAB-Domäne funktionell ersetzt werden	91
<b>4.2 Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit CHD6</b>	<b>96</b>
4.2.1 Der Aminoterminus von CHD6 interagiert mit dem C-Terminus von HPV31 E8 <sup>E2C</sup>	96
4.2.2 Die Bindung von E8 <sup>E2C</sup> an CHD6 ist unter verschiedenen Hochrisiko-HPV-Typen konserviert.	100
4.2.3 CHD6 und E8 <sup>E2C</sup> kolokalisieren in der Zelle	104
4.2.4 HPV31 E8 <sup>E2C</sup> -Mutanten mit einer verminderten Bindung an CHD6 sind in ihrer transkriptionellen Repression gehemmt	106
4.2.5 Die Bindung von 31E8 <sup>E2C</sup> an CHD6 ist nicht DNA-vermittelt	112
4.2.6 Eine Reduktion der CHD6-Expression moduliert die E8 <sup>E2C</sup> -vermittelte Repression auf den endogenen E6/E7 Promoter in HPV-positiven Zellen	114



4.2.7 Die Bindung an CHD6 moduliert die Repression, aber nicht die Aktivierung durch 31E2	117
<b>4.3 Die Einfluss der E8 Repressordomäne auf die Aktivität von E2</b>	<b>119</b>
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>123</b>
<b>5.1 Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit CHD6</b>	<b>124</b>
<b>5.3 Die 31E8 und die E2TA Domäne kann durch eine zelluläre KRAB-Domäne funktionell ersetzt werden</b>	<b>130</b>
<b>5.4 Verschiedene Wege der Repression führen zum Ziel</b>	<b>132</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>136</b>
<b>7. PUBLIKATIONEN</b>	<b>152</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>152</b>
<b>9. AKADEMISCHER LEBENSLAUF</b>	<b>154</b>

### 1. Zusammenfassung

Das E2 Gen von Papillomviren kodiert für mehrere Regulatorproteine, welche die Transkription und Replikation des viralen Genoms kontrollieren und somit die Expression der viralen Onkoproteine modulieren. Da das E2 Gen häufig durch Integration in das Genom der Wirtszelle in Zervixkarzinomen deletiert ist, wurde postuliert, dass Störungen in der Onkogenexpression zur malignen Progression beitragen könnten. Neben dem vollständigen E2 Protein kodieren mehrere humane Papillomviren (HPV) für ein E8<sup>E2C</sup> Protein, das ein potenter Repressor der viralen Transkription und Genomreplikation ist. Das HPV31 E8<sup>E2C</sup> Protein besteht aus der E8 Repressordomäne und der E2C Domäne, welche sequenzspezifische Bindung an DNA und Dimerisierung zwischen E2 Proteinen vermittelt. Vorbefunde legten nahe, dass E8<sup>E2C</sup> zelluläre Proteine wie Histondeacetylasen rekrutiert und so als Repressor fungiert. Um den Mechanismus der E8<sup>E2C</sup>-vermittelten Repression genauer aufzuklären, wurden einerseits ein genetischer Screen in Hefe durchgeführt und andererseits 31 E8<sup>E2C</sup> und assoziierte Proteine aus humanen Zellen quantitativ immunopräzipitiert. Dadurch konnten das „Chromodomain Helicase DNA binding protein 6“ (CHD6) sowie Komponenten des „nuclear receptor corepressor complex“ (N-CoR) als neue Interaktionspartner identifiziert werden. CHD6 ist Teil eines Multiproteinkomplexes, der vermutlich Transkription reguliert. Die Bindung von CHD6 erfolgte über die E2C Domäne und die des N-CoR Komplex über die E8 Repressordomäne. Beide Interaktionen sind hochkonserviert, da sie auch für die E8<sup>E2C</sup> Proteine von HPV16 und 18 nachweisbar waren.

Mutationsanalysen der 31E2C Domäne und RNA Interferenz-Experimente belegten, dass die E8<sup>E2C</sup>/CHD6 Interaktion zur transkriptionellen Repression des E6/E7 Promoters beiträgt. CHD6 interagiert auch mit 31E2 und dies trägt zur transkriptionellen Repression aber nicht zur Aktivierung durch E2 bei. Mutationsanalysen von 16, 18 und 31E8<sup>E2C</sup> belegten, dass die Rekrutierung des N-CoR Komplexes für deren Repressionsaktivität wichtig ist. Ein artifiziereller Repressor bestehend aus der KRAB-Domäne des zellulären KOX1 Proteins und der 31E2C Domäne verhielt sich funktionell wie E8<sup>E2C</sup>, was nahelegt, dass die Repression des E6/E7 Promoters keine spezifische Eigenschaft viraler Proteine ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die transkriptionelle Repression durch E8<sup>E2C</sup> durch die Rekrutierung unterschiedlicher Multiproteinkomplexe sowohl über die E8 Repressordomäne als auch über die E2C-Domäne vermittelt wird.

## 2. Einleitung

### 2.1 Klassifizierung und Pathogenität humaner Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom, die zusammen mit den animalen Papillomviren die Familie der Papillomaviridae bilden. Die Viruspartikel tragen keine Hülle, haben eine ikosaedrische Form und besitzen einen Durchmesser von ca. 55 nm. Bisher wurden über 100 verschiedene HPV-Typen identifiziert, die einen strikten Gewebetropismus für Keratinozyten der Haut und Schleimhaut besitzen (Knipe 2007). Von großer klinischer Bedeutung ist die kausale Rolle von bestimmten Papillomviren bei der Entstehung von Karzinomen des Anogenitaltraktes, v. a. der Zervix. In über 99,7% der Zervixkarzinome kann HPV-DNA nachgewiesen werden (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Der häufigste nachgewiesene HPV-Typ in diesen Tumoren ist HPV16 (ca. 50% der Fälle), gefolgt von HPV18, 45 und 31 (Walboomers, Jacobs et al. 1999). Im Gegensatz dazu sind die HPV-Typen 6 und 11 hauptsächlich mit gutartigen Läsionen des Genitalbereichs, so genannten Feigwarzen, und niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien assoziiert. Dieses unterschiedliche karzinogene Potential der verschiedenen HPV-Typen führte zur Klassifizierung in eine Gruppe mit niedrigem ("low risk") und einer Gruppe mit hohem Risiko ("high risk") für die Entstehung von Tumoren (de Villiers, Fauquet et al. 2004; Munoz, Bosch et al. 2004). Dies kulminierte im Jahr 2005 in der Klassifizierung der HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 als Typ 1 Karzinogene für den Menschen durch die WHO (Cogliano, Baan et al. 2005).

## 2.2 Lebenszyklus und Replikation der Papillomviren

Der Lebenszyklus der Papillomviren ist abhängig vom Differenzierungsgrad des Epithels der Wirtszelle (Knipe 2007). 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 (Sedman and Stenlund 1996; Stubenrauch and Laimins 1999). Mit zunehmender Differenzierung des Epithels kommt es zur verstärkten Replikation der viralen DNA, zu einer starken Expression der späten Gene und schließlich zur Bildung infektiöser Viruspartikel (Knipe 2007); (Stubenrauch and Laimins 1999) (Abb.1).

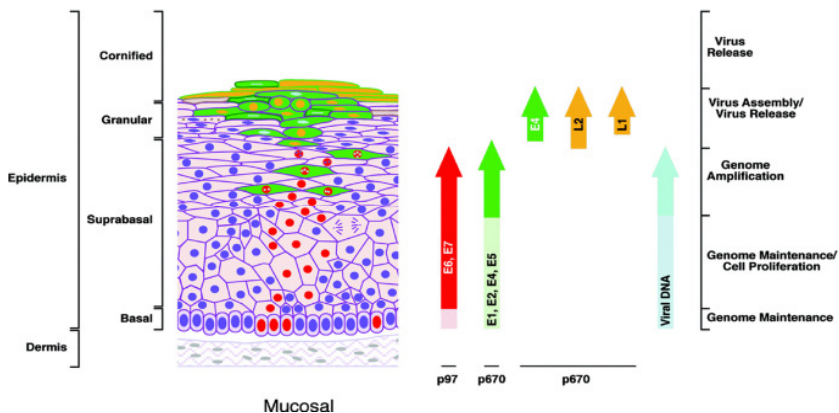


Abb. 1: (Modifiziert nach (Doorbar 2006): Die virale Genexpression korreliert mit dem Differenzierungsstatus der Wirtszelle. In den Basalzellen und unteren Epithelschichten liegt das Virusgenom in niedrigen Kopienzahlen vor. E6 und E7 (rot dargestellt) werden vom frühen Promotor exprimiert (hier für HPV16 als p97 bezeichnet). Die Expression von E1, E2, E4 und E5 (grün dargestellt) wird möglicherweise vom differenzierungsabhängigen Promotor p670 initiiert. Die Expression der Kapsid-Proteine L1 und L2 (orange dargestellt) folgt der Amplifikation des Genoms, so dass der Zusammenbau der Virionen erfolgen kann.

### 2.3 Genomorganisation der Papillomviren

Alle Papillomviren besitzen ein doppelsträngiges zirkuläres DNA-Molekül von ca. 8 kB Größe, welches in drei Bereiche eingeteilt werden kann. Eine frühe Region (early, E), eine späte Region (late, L) und eine regulatorische Region ( long control region (LCR), non-coding region (NCR), upstream regulatory region (URR)). Diese drei Bereiche sind bei allen Papillomviren durch zwei Poly-Adenylierungssignale getrennt: dem frühen pA und dem späten pA, die sich am Anfang und Ende der späten Region befinden. Die späte Region umfasst ungefähr 40% des Genoms und kodiert für die Strukturproteine L1 und L2, die zusammen das Kapsid bilden (Abb.2).

Die nichtkodierende Region umfasst einen Bereich von ungefähr 850 Basenpaaren (10% des Virusgenoms) und hat keine proteinkodierende Funktion. Sie beinhaltet den Replikationsursprung (Ustav, Ustav et al. 1991; Kanaya, Kyo et al. 1997; Sen, Bromberg-White et al. 2002) sowie mehrere Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren, wie das TATA-Box bindende Protein (TBP), SP1, AP1, Oct1, YY1 und TEF1 (Kanaya, Kyo et al. 1997; Hubert, Kanaya et al. 1999; Sen, Bromberg-White et al. 2002)

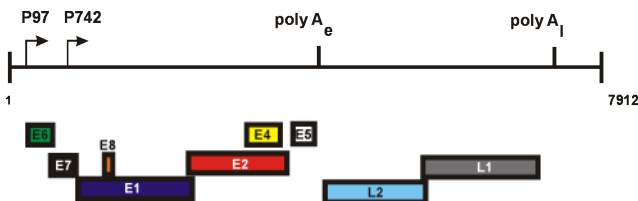


Abb. 2: Die Organisation des Genoms von HPV31. Früher (p97) und später (p742) Promotor sind durch Pfeile markiert. Die Poly-Adenylierungssignale, die die frühen von der späten Region trennen sind ebenfalls eingezeichnet.

Die frühe Region der humanen Papillomviren umfasst über 50% des kompletten Virusgenoms ausgehend von seinem 5`-Ende und kodiert für sechs offene Leserahmen (E1, E2, E4, E5, E6 und E7) (Danos, Katinka et al. 1982), die einzelne Proteine translatieren (Abb.2). Außerdem konnte für einige Papillomviren ein E8-Leserahmen identifiziert werden (Abb.2). Dieser Leserahmen wird vermutlich nur von einer gespleissten mRNA in Form des E8<sup>E2C</sup> Fusionsproteins exprimiert (Choe, Vaillancourt et al. 1989; Rotenberg, Chiang et al. 1989; Doorbar, Parton et al. 1990; Palermo-Dilts, Broker et al. 1990; Snijders, van den Brule et al. 1992; Stubenrauch, Hummel et al. 2000; Jeckel, Loetzsch et al. 2003).

Die Expression der polycistronischen Transkripte von Hochrisiko-HPV-Typen wird durch den frühen Promotor (HPV16:P97, HPV18:P105, HPV31:P97) und den späten Promotor (HPV16:P672; HPV31:P742) reguliert (Hummel, Hudson et al. 1992) (Abb. 2). Der frühe Promoter wird hauptsächlich durch Cis-Elemente in der LCR kontrolliert.

## **2.4 Wirkmechanismus der viralen E6 und E7 Onkoproteine**

Die viralen Onkogene E6 und E7 spielen eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung. Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Wechselwirkungen gehört die des viralen E6-Proteins mit dem zellulären Tumorsuppressor-Protein p53. Das p53-Protein vermittelt die Blockade des Zellzyklus in der G1-Phase und ermöglicht so die Reparatur von DNA-Schäden oder induziert Apoptose, wenn die DNA irreparabel geschädigt ist. Der p53-vermittelte Zellzyklusblock beruht auf der Transaktivierung von p21 (Levine 1997), einem Inhibitor von Zyklin-

abhängigen Kinasen (cdk). Zusammen mit der Ubiquitin-Ligase E6-AP (*E6 associated protein*) bindet E6 an p53, führt zu seiner Ubiquitinierung und dadurch zu seiner verstärkten Degradation durch das Proteasom (Huibregtse, Scheffner et al. 1991) (Abb. 3). Die Fähigkeit an p53 zu binden bzw. seinen Abbau zu beschleunigen, ist mit der transformierenden Aktivität der E6 Proteine gekoppelt und ist bei den Hochrisiko-HPV-Typen am stärksten ausgeprägt (Mantovani and Banks 2001). Aufgrund der Degradation von p53 führt E6 zur Aufhebung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und verhindert somit die p53-induzierte Apoptose.

Die E7-Proteine der Hochrisiko-HPV-Typen können an Mitglieder der Retinoblastoma-Proteinfamilie binden (pRB, p107 und p130) und so deren Funktionen inhibieren (Jones and Munger 1996). Diese Tumorsuppressor-Proteine sind in der Zelle normalerweise mit Mitgliedern der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie assoziiert und inaktivieren diese (Abb. 3). Vor dem Eintritt in die S-Phase wird pRB durch Zyklin-abhängige Kinasen phosphoryliert und als Folge E2F freigesetzt. E2F aktiviert daraufhin zahlreiche Gene, die für die DNA-Synthese benötigt werden (Stevaux and Dyson 2002). Wenn E7 an RB-Proteine bindet, bewirkt dies die Freisetzung von E2F und damit den Wegfall des Zellzyklusblocks in der G1-Phase und ermöglicht so die DNA-Synthese (Thomas, Pizzey et al. 1998). Des Weiteren bindet E7 an die cdk-Inhibitoren p21 und p27 und verhindert so, dass diese den Zyklin/cdk2-Komplex während des G1/S-Übergangs blockieren (Funk, Waga et al. 1997; Helt, Funk et al. 2002).



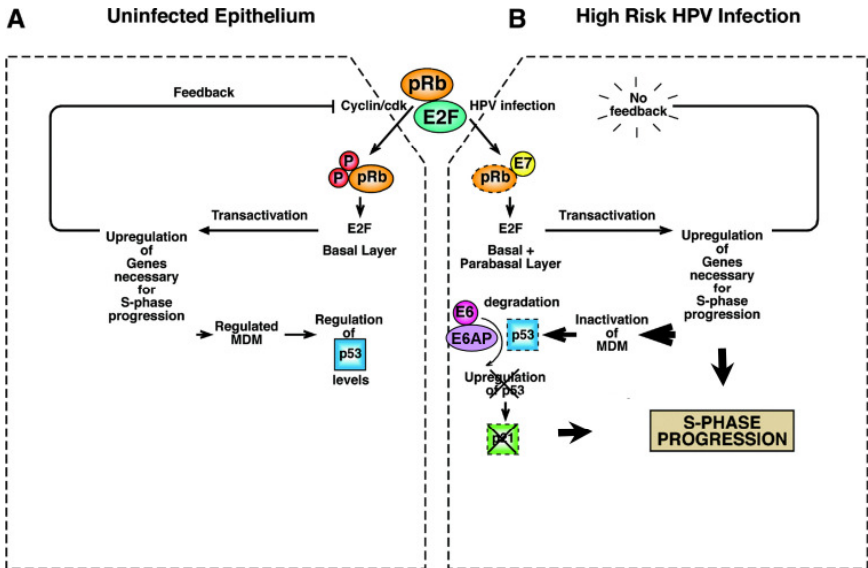


Abb. 3 (modifiziert nach (Doorbar 2006): Die Infektion mit Hochrisiko-HPV-Typen führt zur Deregulation des Zellzyklus und unkontrollierten Teilung der Zelle.

A: Der Normalzustand in einer nicht infizierten Zelle. pRb, welches mit E2F assoziiert vorliegt, kontrolliert die Expression vieler zellulärer Proteine die für das Fortschreiten des Zellzyklus verantwortlich sind. Die Phosphorylierung von Rb führt zur Freisetzung von E2F, dies führt zur Transaktivierung von Genen, die MDM2 regulieren und damit die Stabilität von p53 beeinflussen, wodurch bei Schäden während der Teilung der Zelle ein Zellzyklusarrest oder Apoptose ausgelöst werden kann. Außerdem sorgt p53 für die Transaktivierung von p21 einem Inhibitor von Zyklin-abhängigen Kinasen (cdk).

B: In der Anwesenheit von Hochrisiko-HPV-Typen wird die Regulation des Zellzyklus verändert, wodurch der Wiedereintritt in die S-Phase in HPV-infizierten Zellen ausgelöst wird. Durch Bindung von HR-HPV E7 wird pRb von E2F dissoziiert und somit E2F freigesetzt. Durch die Freisetzung von E2F wird die Expression von Proteinen stimuliert, die den G1/S-Übergang der Zelle steuern. Die Zelle geht ohne Kontrolle in die S-Phase über, da zusätzlich durch E6 und E6AP p53 degradiert wird. Der normalerweise durch p53-vermittelte Zellzyklusblock, der durch die Transaktivierung von p21 induziert wird, kann nicht mehr stattfinden. Es kommt zur unkontrollierten Teilung der Zelle.

Die Folge der E6/E7-Expression ist die Aufhebung der Zellzykluskontrolle durch das Ausschalten der zellulären Tumorsuppressoren p53 und pRB und somit eine unkontrollierte Teilung der Zelle. In HPV-positiven Zervixkarzinomen kann eine kontinuierliche Expression der E6/E7-Gene nachgewiesen werden (Schwarz, Freese et al. 1985; Jeon and Lambert 1995).

## 2.5 Virale Regulatorproteine

### 2.5.1 Das E2 Protein

Das E2-Protein ist der Regulator der viralen Transkription und Replikation. Es bindet als Dimer an seine Bindestelle 5'-ACCN<sub>6</sub>GGT-3' (E2 Bindungsstelle, E2BS), die in mehreren Kopien in der LCR des viralen Genoms vorliegt (McBride, Romanczuk et al. 1991). Das E2-Protein verfügt über eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (ca. 200 AS) und eine C-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (ca. 90 AS) (Abb. 4). Beide Domänen sind unter den verschiedenen Papillomviren stark konserviert (McBride, Romanczuk et al. 1991). Zwischen ihnen liegt eine in Länge und AS-Zusammensetzung sehr variable Domäne, die so genannte Hinge-Region, die ein Kernlokalisierungssignal enthält (Klucevsek, Wertz et al. 2007).

E2 aktiviert die Genomreplikation durch Interaktion mit dem viralen E1 Protein, das ATPase- und ATP-abhängige Helikase-Aktivität besitzt (Sedman and Stenlund 1995). E2 rekrutiert E1 so zum viralen Replikationsursprung, der aus einer niedrig affinen E1-Bindestelle,

flankiert von zwei E2BS, besteht (Mohr, Clark et al. 1990; Seo, Muller et al. 1993; Frattini and Laimins 1994).

E2 inhibiert auch die Aktivität des frühen Hauptpromotors, der u.a. für die Expression der Onkoproteine E6 und E7 verantwortlich ist. In Zervixkarzinomzelllinien wird bei der Integration des Genoms der Hochrisiko-HPV in die Wirts-DNA häufig der E2-ORF unterbrochen. Dadurch entfällt die durch E2 vermittelte Repression der E6- und E7-Transkription, wodurch die Onkogene stärker exprimiert werden, was möglicherweise die maligne Entartung begünstigt (Schneider-Maunoury, Croissant et al. 1987; Turek 1994; Park, Hwang et al. 1997; Corden, Sant-Cassia et al. 1999; Pett, Alazawi et al. 2004). Wird E2 von HPV16, -18, -31 oder dem Bovinen Papillomvirus 1 (BPV1) in HPV-positive Zervixkarzinomlinien wie HeLa eingebracht, die kein endogenes E2 exprimieren, so wird die E6/E7 Expression reprimiert. Dies führt zur Reaktivierung der p53- und pRB-Signalwege, was zu einer Blockade des Zellwachstums in der G1-Phase führt und Apoptose oder irreversible Seneszenz auslöst (Hwang, Riese et al. 1993; Dowhanick, McBride et al. 1995; Hwang, Naeger et al. 1996; Desaintes, Demeret et al. 1997; Naeger, Goodwin et al. 1999; Wells, Francis et al. 2000; Wu, Goodwin et al. 2000; Johung, Goodwin et al. 2007; Stubenrauch, Straub et al. 2007).

Die Repression des frühen viralen Promotors wird durch Bindung von E2 an die promotor-proximalen E2BS 3 und 4 vermittelt (Romanczuk, Thierry et al. 1990; Thierry and Howley 1991; Dong, Broker et al. 1994; Stubenrauch, Zobel et al. 2001). Als Repressionsmechanismen werden die Verdrängung zellulärer Transkriptionsfaktoren (SP1, TBP) von ihren in unmittelbarer Nähe der E2BS gelegenen Bindungsstellen (Dong, Broker et al. 1994; Tan, Leong et al. 1994; Demeret, Desaintes et al.

1997; Stubenrauch, Lim et al. 1998) und die Verdrängung des basalen Transkriptions-Initiationskomplex durch eine direkte Wechselwirkung von E2 diskutiert (Hou, Wu et al. 2000). Kürzlich wurde durch mehrere unabhängige Gruppen das zelluläre „Bromodomain containing Protein 4“ (Brd4) als Interaktor für E2 identifiziert. (Ilves, Maemets et al. 2006; McPhillips, Oliveira et al. 2006; Wu, Lee et al. 2006; Schweiger, Ottinger et al. 2007; Senechal, Poirier et al. 2007). Die Interaktion von E2 mit Brd4 erfolgt über den N-Terminus und spielt bei der transkriptionellen Repression des E6/E7-Promotors eine wichtige Rolle. Durch die Bindung von E2 an Brd4 wird die Bindung des Elongationsfaktors P-TEFb an das integrierte virale Chromatin verhindert, was zu einer Inaktivierung von P-TEFb und schließlich zur Repression der viralen Transkripte führt (Yan, Li et al. 2009).

Interessanterweise konnte die E2TA-Domäne bisher nicht durch zelluläre oder virale Transkriptionsaktivatordomänen ersetzt werden. VP16- oder spi-E2C Fusionsproteine aktivierten E2-abhängige Reporterplasmide, waren aber nicht in der Lage den E6/E7 Promotor zu inhibieren und einen Wachstumsarrest in HeLa-Zellen zu induzieren (Dowhanick, McBride et al. 1995; Goodwin and DiMaio 2000; Nishimura, Ono et al. 2000).

### **2.5.2 Das E8<sup>E2C</sup>-Protein**

Neben dem vollständigen E2 Protein konnten bei verschiedenen Papillomvirus-Typen Transkripte für alternativ gespleisste E2 Proteine nachgewiesen werden, in welchen der E8 Leserahmen mit dem E2 Gen verknüpft wird. Bisher wurden so genannte E8<sup>E2C</sup>-Transkripte für die

HPV Typen 1, 11, 16, 31 und 33 beschrieben (Rotenberg, Chiang et al. 1989; Doorbar, Parton et al. 1990; Chiang, Broker et al. 1991; Snijders, van den Brule et al. 1992; Stubenrauch, Hummel et al. 2000). Auch bei animalen Papillomviren wie dem Cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) und BPV1 konnte derartige Transkripte identifiziert werden (Choe, Vaillancourt et al. 1989; Jeckel, Loetzsch et al. 2003). Das E8<sup>E2C</sup> Transkript enthält einen offenen Leserahmen mit einem einzelnen ATG-Startkodon (HPV16: nt. 1264, HPV31: nt. 1259 des jeweiligen HPV-Genoms), benutzt eine Spleissdonor-Stelle (HPV16: nt. 1301, HPV31: nt. 1296) im E1 ORF und wird an eine Spleissakzeptor-Stelle im E2 ORF (HPV 16: nt. 3356, HPV 31: nt. 3295) gespleisst (Doorbar, Parton et al. 1990; Stubenrauch, Hummel et al. 2000). Das E8<sup>E2C</sup> Protein besteht aus einer N-terminalen E8-Domäne aus 12 Aminosäuren, die mit der "Hinge"- und DNA-Bindungs-/Dimerisierungsdomäne von E2 (E2C) verknüpft ist (Abb. 4).

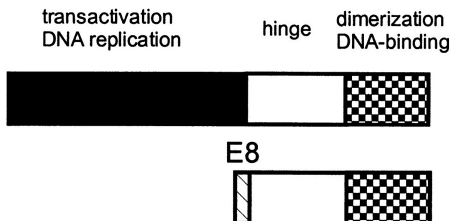


Abb. 4 (Stubenrauch, Zobel et al. 2001): Schematische Darstellung des E2 und des E8<sup>E2C</sup>-Proteins von HPV31. Die E2-Proteine bestehen aus einem variablen N-Terminus, einer gemeinsamen flexiblen Hinge-Region und dem C-Terminus, der für die DNA-Bindung und Dimerisierung zuständig ist. Bei E8<sup>E2C</sup> ist statt der Transaktivierungsdomäne nur eine kurze Repressionsdomäne vorhanden.

HPV16 und 31 E8<sup>E2C</sup> Knock-out Genome zeigen eine dramatisch erhöhte virale Replikation (Stubenrauch, Hummel et al. 2000; Lace, Anson et al. 2008). Dies beruht auf der Fähigkeit von E8<sup>E2C</sup> die virale Transkription und den viralen Replikationsursprung zu inhibieren (Stubenrauch, Hummel et al. 2000; Stubenrauch, Zobel et al. 2001; Zobel, Iftner et al. 2003; Stubenrauch, Straub et al. 2007; Lace, Anson et al. 2008).

Mutationsanalysen des 31E8<sup>E2C</sup> Proteins ergaben, dass neben der E2C Domäne auch der E8-Anteil für die effiziente Transkriptions- und Replikationsinhibition benötigt wird (Stubenrauch, Zobel et al. 2001). Insbesondere die unter alpha-PV konservierten Aminosäurereste K5, W6 und K7 der E8 Domäne sind entscheidend für die Repressionsaktivität und eine Mutation dieser Reste im HPV31 Genom führte zu einer Überreplikation der viralen Genome vergleichbar mit HPV31E8<sup>E2C</sup> „Knock-out“-Mutanten (Zobel, Iftner et al. 2003).

Der E8-Anteil ist eine transferierbare Repressionsdomäne (Zobel, Iftner et al. 2003) und wird für einen Wachstumsarrest durch Repression der E6/E7-Onkogenexpression in HeLa-Zellen benötigt (Stubenrauch, Straub et al. 2007).

Dies legte nahe, dass der E8-Anteil zelluläre Faktoren rekrutiert und so die Transkription und Replikation inhibiert. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von zellulären Histondeacetylasen (HDAC) die transkriptionelle Repression durch E8<sup>E2C</sup> partiell aufhebt (Ammermann, Bruckner et al. 2008). Allerdings hatte dies keinen Einfluss auf die Repression der Replikation (Ammermann, Bruckner et al. 2008). Protein-Interaktionsstudien ergaben, dass E8<sup>E2C</sup> über den E8-Anteil an die Klasse I HDAC1, 2, 3, den Ko-Repressor TRIM28,

sowie an die Histonmethyltransferase SETDB1 bindet (Ammermann, Bruckner et al. 2008).

Klasse I HDAC Moleküle sind in der Regel Bestandteile unterschiedlicher Multikomponenten-Korepressorkomplexe wie Sin3, NURD, REST oder SMRT/N-CoR, die Chromatin-verändernde Eigenschaften besitzen (Jepsen and Rosenfeld 2002).

## **2.6 Transkriptionskontrolle durch Chromatin modifizierende Proteine**

In eukaryotischen Zellen ist die DNA in Protein-Komplexe, das Chromatin, verpackt. Die grundlegende Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein Komplex, in welchem die DNA ein Oktamer von Histon-Molekülen umwindet. Eine Konsequenz der Verpackung eukaryotischer DNA ist, dass die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zu den Promotoren beeinträchtigt ist. Zur Initiation und Elongation der Transkription werden somit weitere, unter anderem Chromatin-modifizierende Faktoren benötigt, die den abzulesenden DNA-Abschnitt entweder für die Transkription freilegen, oder ihn unzugänglich machen. Die Chromatin-modifizierenden Faktoren können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die eine Gruppe ist energieabhängig, die in Form von ATP für den Prozess notwendig ist, und werden auch als „Chromatin Remodeling Maschinen“ bezeichnet. Die andere Gruppe agiert als Enzym und modifiziert Histone posttranslational, indem funktionelle Gruppen an die N-Termini der Histone angehängt werden. Chromatin Remodeling Maschinen sind Multi-Protein-Komplexe (z.B. SWI/SNF, ISWI oder Mi2/NuRD Familien). Sie besitzen eine ATPase, die Energie durch die Hydrolyse von ATP freisetzt und dem Komplex

erlaubt, die Struktur des Nukleosoms zu modifizieren. Untersuchungen von Faktoren, die die reguläre Anordnung von Nukleosomen während des Aufbaus des Chromatins beeinflussen, führte zur Identifizierung von mehreren Multi-Protein-Komplexen, die die Nukleosomen „verschieben“ können, um Bereiche für die Transkription freizulegen oder zu blockieren. Die Gemeinsamkeit dieser Faktoren ist deren Größe (durchschnittlich 0,5-2 MDa) und deren Zusammensetzung aus mehreren Untereinheiten, einschließlich der ATPase.

Posttranslationale Modifikationen der Histone: Bezeichnet das Anhängen oder Entfernen von funktionellen Gruppen wie z.B. Acetyl-, Methyl- oder Phosphatgruppen, wodurch die Histone modifiziert werden. Dadurch können Proteine, die diese Modifikationen erkennen an die Histone binden. Die am besten charakterisierte Modifikation ist die Acetylierung von Lysinen. Hierbei gibt es zwei gegenläufigen Enzymaktivitäten: Das Anhängen von Acetylgruppen durch Histon-Acetyl-Transferasen (HATs) und das Entfernen durch Histondeacetylasen (HDACs).

HDACs wurden als Komponenten von Multi-Protein-Komplexen nachgewiesen, die an der transkriptionellen Repression beteiligt sind (NuRD, REST, N-CoR). In diesen Komplexen wurden auch Faktoren der Mi-2 Familie (Mi-2 $\alpha$  und Mi-2 $\beta$  auch CHD3 und 4 genannt) nachgewiesen, die zu den SWI/SNF Chromatin Remodeling Maschinen gehören, und zeigen so eine Verbindung zwischen Remodeling von Nukleosomen und Histonmodifikationen während der transkriptionellen Repression.



## 2.7 CHD-Proteine

Die CHD-Proteine bilden eine eigenständige Gruppe innerhalb der SWI/SNF-Gruppe der Chromatin Remodeling Proteine. CHD steht für „Chromodomain Helicase DNA-binding Protein“ und fasst die wichtigsten strukturellen Merkmale dieser Proteinfamilie zusammen. Die CHD Proteine, besitzen neben einer SWI/SNF-ähnlichen Helicase/ATPase-Domäne, sowie einer DNA-bindenden Domäne zwei N-terminale Chromodomänen, die direkt an modifizierte Histone binden können (Hall and Georgel 2007) (Abb.5). Die Proteinfamilie besteht aus 9 Mitgliedern. Alle Mitglieder weisen eine Größe zwischen 220 und 300 kDa auf. Die CHD-Familie wird in drei Unterfamilien unterteilt, basierend auf der An- oder Abwesenheit zusätzlicher C-terminaler Domänen (Woodage, Basrai et al. 1997; Aubry, Mattei et al. 1998; Schuster and Stoger 2002; Thompson, Gotoh et al. 2003; Flaus, Martin et al. 2006) (Abb.5). Die CHD-Proteine werden oft als Bestandteile großer Multi-Protein-Komplexe identifiziert und wurden bisher bei einer Vielfalt von eukaryoten Organismen gefunden, einschließlich *Caenorhabditis elegans*, Hefen, *Drosophila*, Mäusen und Menschen.

Obwohl den CHD-Proteinen bisher viele verschiedene Funktionen zugeschrieben wurden, gibt es doch einige Gemeinsamkeiten: Eine große Anzahl der CHD-Proteine scheint Bestandteil größerer Komplexe zu sein. Man könnte CHD-Proteine daher generell als transkriptionelle Ko-Regulatoren bezeichnen. Die Funktionen der CHD-Proteine sind ambivalent. Es gibt Berichte, die einzelne Vertreter mit Aktivierung, gleichzeitig aber auch mit Repression der Transkription in Verbindung bringen.

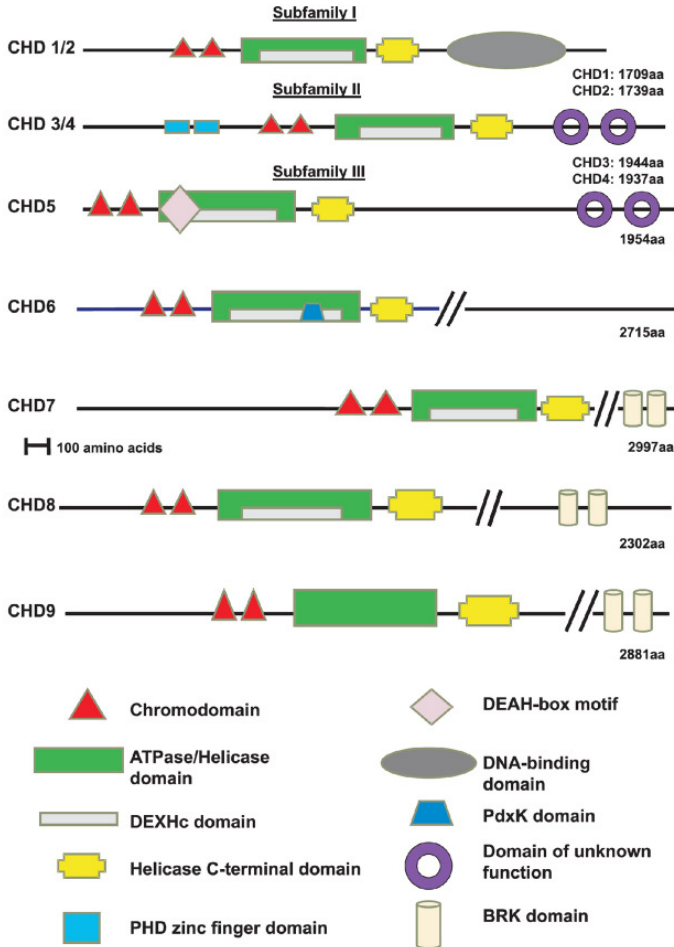


Abb. 5 (Hall and Georgel 2007): Die CHD-Proteine werden in drei Unterfamilien eingeteilt (Subfamily I-III). Die für die Proteinfamilie charakteristischen Tandem-Chromodomänen und ATPase/Helicase-Domänen sowie die variablen funktionellen Domänen im C-Terminus und die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Proteine sind angegeben.

Interessanterweise scheint ein Teil der CHD-Proteine eine wichtige Rolle während der Entwicklung und Differenzierung zu spielen da Experimente mit Knock-out Mäusen für CHD6 schwere Entwicklungsdefekte aufweisen (Lathrop, Chakrabarti et al.), oder gar im Fall von CHD5 und CHD8 embryonal letal sind (Bagchi, Papazoglu et al. 2007; Nishiyama, Oshikawa et al. 2009).

## 2.8 Der N-CoR-Komplex

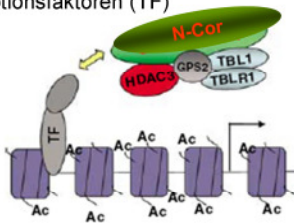
Der N-CoR-Komplex ist ein Ko-Repressor-Komplex, der die transkriptionelle Repression durch Rekrutierung Histon-modifizierender Enzyme an bestimmte Promotoren unterstützt. Das „Nuclear receptor Corepressor 1“-Protein (N-CoR1) nach dem der Komplex benannt ist, ist ein transkriptioneller Ko-Regulator, der mehrere Domänen enthält, die mit nukleären Rezeptoren interagieren. Zu diesen Rezeptoren gehören u.a. Retinoid-, Thyroid-, Östrogen- und PPAR-Rezeptoren u. a. (Glass and Rosenfeld 2000). Der N-CoR-Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten mit einer Gesamtgröße von ca. 1,5-2 MDa. Unterschiedliche biochemische Aufreinigungen gefolgt von massenspektrometrischen Analysen identifizierten als Bestandteile dieses Komplexes wiederholt N-CoR1, HDAC3, TBL1, TBLR1 sowie GPS2 (Li, Wang et al. 2000; Zhang, Kalkum et al. 2002; Yoon, Chan et al. 2003). Diese Komponenten stellen den so genannten „Core-Komplex“ dar. HDAC3 wird als die Komponente des N-CoR-Komplexes vermutet, die eine stabile Bindung des Komplexes an Chromatin und somit eine Repression der Transkription ermöglicht (Abb. 6). TBL1

(Transducin  $\beta$ -like 1) und TBLR1 (Transducin  $\beta$ -like related 1) interagieren direkt mit N-CoR1 aber nicht mit HDAC3 (Guenther, Lane et al. 2000; Zhang, Kalkum et al. 2002). Die Funktionen dieser beiden Proteine überlappen teilweise, beide sind essentiell für die transkriptionelle Repression durch Thyroid- Rezeptoren und anderen Transkriptionsfaktoren (Guenther, Lane et al. 2000; Yoon, Chan et al. 2003). TBL1 und TBLR1 sind für die ligandenabhängige, proteasomale Degradation von N-CoR1 durch die E3-Ubiquitinligase mSiah2 verantwortlich, indem sie als spezifischer Adaptor für die Rekrutierung des 19S Proteasomkomplexes fungieren (Perissi, Aggarwal et al. 2004). Über die Rolle von GPS2 im N-CoR-Komplex ist bisher nur wenig bekannt.

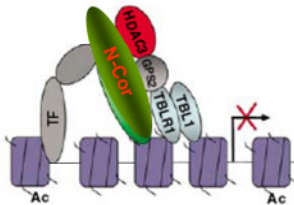
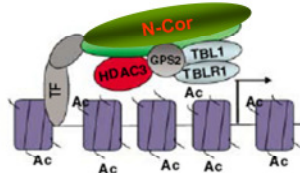
Zusätzlich können weitere HDACS wie HDAC1 (Jones, Sachs et al. 2001), HDAC4 und HDAC5 (Huang, Zhang et al. 2000), Brg1, eine SWI/SNF-ATPase, Trim28 ein transkriptioneller Ko-Repressor (Underhill, Qutob et al. 2000) oder die Histon-Demethylase JMJD2A (Zhang, Yoon et al. 2005) mit dem N-CoR Core-Komplex assoziiert sein.

Da HDACs meistens Teil von Multikomponenten-Korepressorkomplexen sind, sollten weitere zelluläre Interaktionspartner für 31E8<sup>E2C</sup> identifiziert und charakterisiert werden. Hierzu wurde ein genetischer Screen in Hefe und eine biochemische Aufreinigung des 31E8<sup>E2C</sup> Proteins und assoziierten Proteinen aus humanen Zellen durchgeführt. Dies zeigte, dass der E8-Anteil den N-CoR-core-Komplex rekrutiert und der E2C Anteil, das bisher wenig charakterisierte CHD6 Protein bindet. Weiterhin wurden die E8<sup>E2C</sup>-Proteine der HPV Typen 16 und 18 aus infizierten Zelllinien kloniert und vergleichend mit dem HPV31 E8<sup>E2C</sup> Protein untersucht.

1. Interaktion N-Cor mit Transkriptionsfaktoren (TF)



2. Deacetylierung der Histone durch HDAC3



3. Interaktion N-Cor mit deacetylierten Histonen

4. Stabilisierung des Komplexes Führt zu transkriptioneller Repression

Abb. 6: Modifiziert nach (Karagianni and Wong 2007): Die Regulation der transkriptionellen Repression durch den N-Cor Core-Komplex Die Komponenten des „Core-Komplex“ sowie deren Bindungsmechanismus sind schematisch dargestellt.

### 3. Material und Methoden

#### Verwendete Abkürzungen

A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Tissue Type Culture Collection"
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute ("counts per minute")
CS	Kälberserum
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes, minimal essentielles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm

---

GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
luc	Luziferase-Gen
μ	micro
M	Molar
min	Minute
MBP	Maltose Binding Protein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Normal
Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N´,N´,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

U	Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
V/V	Volumen-/Volumenverhältnis
W/V	Gewichts-/Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Gerät und Bezeichnung	Hersteller
Blotkammer, gross, Transblot	BioRad
CO <sub>2</sub> -Inkubator, C200	Labotect
Durchlichtmikroskop, DM IRB	Leica
Fluoreszenzmikroskop, M200	Zeiss
Feinwaage, GJ und 770	Kern
Horizontal-EP-Kammer (DNA-Gele) Sub Cell GT; Mini-Sub Cell GT ; Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
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
Magnetständer MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec



Magnet $\mu$ MACS™ Seperator	Miltenyi Biotec
PCR-Maschine, PTC 200	MJ Research
pH-Meter, pH 526	WTW
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf
Photometer, ND-1000	NanoDrop®
Phosphoimager, Fujifilm BAS-1800	Fuji
Pipetten, Pipetman 10, 20, 200 und 1000	Gilson
Schüttelinkubator, Certomat IS	B. Braun Biotech Int.
Schüttler,	
Thermomixer 5436	Eppendorf
ThermoStat Plus	
Rocky 3D	Perkin-Elmer
Sonifizierer, SonoPuls	Bandelin
Spannungsversorgung	BioRad
PowerPac 200,	
PowerPac 3000	
Sterile Werkbank, HeraSafe	Heräus
Szintillationszähler, 1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Vakuum-Geltrockner, Model 583 Gel Dryer	BioRad
Vertikal-EP-Kammer (Proteingele), Mini Protean 3 Cell	BioRad
Wasserbad, WB 10	Memmert
Vakuum-Absaugvorrichtung, VacuSafe	IBS

Zentrifugen

5810R, 5417R und 5417C

Eppendorf

Sorvall

Du Pont-  
Instruments

Zählkammer, Neubauer 0.100mm Tiefe;  
0.0025mm<sup>2</sup>

Assistent

**3.1.2 Kleingeräte/ Material**

Gel-Blotting-Filterpapier,

Whatman

Faltenfilter, MN 403¼; 11cm Durchm.

Macherey&Nagel

Kryoröhrchen, Cellstar Cryo.s

Greiner

Magnet-Säulen µMACS® columns

Miltenyi Biotec

Nitrocellulose-Membran, Protran 0,22 µm

Whatman

PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2ml

Biozym

Plastikküvetten, UVette

Eppendorf

Plastikpipetten, 2, 5, 10, 25, 50 ml

Becton/Dickinson

Pipettenspitzen, gestopft, 10, 20, 200, 1000 µl

Molecular Bio  
Products

Pipettenspitzen,

0,5-10 µl (transparent)

Biozym®

10-200 µl (Gelb)

Greiner

200-1000 µl (Blau)

PS-Röhrchen steril, 55\*12mm;15ml

Greiner

PS-Röhrchen steril, 55\*12mm;50ml

Greiner

PCR-Reaktionsgefäße PCR-Softtubes 0.2 ml,

Biozym®

Reaktionsgefäße,1,5 ml, 2 ml

Eppendorf

---

Sterilfilter, 0,2 µm	Millipore
Zellkulturplatten, 24x10mm, 6x 35mm	Nunc
Zellkulturschalen, 35 mm, 60 mm, 100 mm, 150mm	Nunc
96-well Platten, schwarz	Peqlab

### 3.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden entsprechen dem Reinheitsgrad p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

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

### 3.1.4 Fertige Reagenzsysteme

- Rapid-DNA-Ligation Kit (Fermentas)
- SuperSignal West Dura, SuperSignal West Femto (Pierce)
- Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

- Plasmid Mini Kit (Qiagen)
- Plasmid Midi Kit (Qiagen)
- Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
- SybrGreen Mastermix (Eurogentec)
- TNT Quick Coupled Transcription/ Translation Systems für T7 bzw. SP6 Promotor (Promega)
- $\mu$ MACS HA Isolation Kit (Miltenyi Biotec) HA-IP
- $\mu$ MACS myc Isolation Kit (Miltenyi Biotec) myc-IP

### 3.1.5 Radioaktive Nukleotide

Folgende radiaktive Reagenzien wurden von Amersham Pharmacia bezogen:

- $^{35}\text{S}$ -Methionin, 1 mCi

Folgende radiaktive Reagenzien wurden von Perkin Elmer bezogen:

- $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP, 250 $\mu$ Ci
- $^{35}\text{S}$ -Methionin, Easy tag, 250 $\mu$ Ci

### 3.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Fermentas
- New England Biolabs

Sonstige Enzyme

- Alkalische Phosphatase (New England Biolabs)
- Proteinase K (Fermentas)

- Pyrobest DNA-Polymerase (Takara)
- RNase A (Roche)
- T4-DNA-Ligase (Fermentas)
- T4-Polynukleotidkinase (Invitrogen)
- Mikrokokken Nuklease (Fermentas)

### 3.1.7 Antikörper

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

#### Primärantikörper

<u>Antigen</u>	<u>Quelle</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung</u>
HA-probe	Rabbit polyclonal	Santa Cruz BT	1:1.500
HA	Mouse monoclonal	Covance	1:1000
HA	Rat	Santa Cruz BT	1:1000
HA (ChIP-grade)	Mouse monoclonal	abcam	-
TRIM28 (=KRIP-1)	Mouse monoclonal	Transduction Laboratories	1:3000
CHD6 (2174C2a)	Mouse monoclonal	abcam	1:100
CHD6 (2174C2a)	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT	1:100
HDAC3	Rabbit polyclonal	Cell signalling	1:500

## Material und Methoden

---

N-CoR1	Rabbit polyclonal	Bethyl Laboratories	1:1000
Gal4-DBD	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT	-
MBP (HRP-gekoppelt)	Mouse monoclonal	New England Biolabs	1:1000
$\alpha$ -Tubulin	Mouse monoclonal	BD Biosciences	1:1000
TBLR1	Mouse monoclonal	Santa Cruz BT	1:500

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

<u>Antigen</u>	<u>Quelle</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung im</u>
Rabbit	Swine	DAKOCytomation	1:3.000
Mouse	Rabbit	DAKOCytomation	1:3.000
Goat	Rabbit	DAKOCytomation	1:3.000
Rat	Rabbit	DAKOCytomation	1:3.000
Mouse True blot	n. a.	eBioscience	1:1000
Protein-A	Staphylococcus aureus	Calbiochem	1:5000

## Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper

<u>Antigen/Fluorophor</u>	<u>Quelle</u>	<u>Firma</u>	<u>Verdünnung in der Immunfluoreszenz</u>
Rabbit-Alexa 488	Donkey	invitrogen	1:1.000
Mouse-Alexa 555	Donkey	invitrogen	1:1.000
Ratte-Alexa 488	Goat	invitrogen	1:1.000

### 3.1.8 Marker

#### DNA-Längenstandards

- 1 kb-DNA-Ladder (Invitrogen)
- GeneRuler (Fermentas)

#### Protein-Größenstandards

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

### 3.1.9 Oligonukleotide

pdrive 302 f	CAGACGCGTTACGTATCGGAT
pdrive 332 r	TAGCCTAGGCTCGAGAAGCTT
HPV31 ori 7793 for	AAACTGCCAAGGTTGTGTCA
HPV31 ori 48 rev	CCACTTTCGGTCACTCCC
HPV31 ori 61 rev	CGTTTTCGGTTCACTACT
E8 <sup>Δ</sup> E2C XmnI for	ATGGCAATACTGAAGTG
pSG E8 <sup>Δ</sup> E2C 1225 XbaI rev	GAGTCTAGAGTCGAGTCGA

CHD6 F2	TCTTCCTTCAATAGATGAAAATGAAA
CHD6 F3	CAATGTCTGATGCCTCTGTCAA
CHD6 1420 rev	TAGCTCCCACGTGCTTTCTT
CHD6 1856 rev	GGGCGTCTCTGTACACCATT
CHD6 in pMal 179for	ATGAAAATGAAAATACAGAAAAAAGAGAAGCA GTTG
E2C EcoRi F	ACTGATGAATTTCGCATGCACAAACCAAAC
CHD6 in pMal 1420revHindIII	ATATATATAAGCTTTGACTCCCACGTGCTTTC
CHD6 in pMal 1856revHindIII	ATATATATAAGCTTGGGCGTCTCTGTACACCA TT
E8 <sup>+</sup> E2C 111rev Stop Sall	TATAGATGTGCGACCTAGATGTGGTGGTGTGT TGGC
pMal 31E2 XmnI for	ATGGAGACTCTTTCTCAACG
E2C sph for 1	CAGCTGCATGCACAAACCAAACA
E2C 161/162 A rev 2	ATTTAAAAAATCGTCTGCTGCTGATGT
E2C 161/162 A for 3	ATAAGTACATCAGCAGCAGACGATTTT
E2C Bam rev 4	AGATCTGGATCCTAAATAGTCATTGCTCC
HPV16 1258 F	AGCGGGTATGGCAATACTGA
HPV16 3913 R	GCACACAAAAGCAAAGCAAA
16 E8E2C HA F	CCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTG
16 E8E2C HA R	CAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGG
18E8 RI F	ATATAGAATTCTATGGCTGTTCTG
HPV18 1288 for	AAAAAGGCGGCTGTTTACAA
HPV18 3996 rev	GGACATGGCAGCACACATAC
18E2C Bam R	ATATAGGATCCTTACATTGTCTATG
18E8E2C HA-F	CCGTATTCCAGCACCTACCCATACGATGTTCC AGATTACGCTGTGTCCGTGGGCACC
18 E8E2C HA-R	GGTGCCACGGACACAGCGTAATCTGGAACA TCGTATGGGTAGGTGCTGGAATACGG
HPV31 45-70 sense	GTGGTGAACCGAAAACGGTTGGTATA



HPV31 45-70 antisense	CACCACTTGGCTTTTGCCAACCATAT
HPV31 ori 7793 for	AAACTGCCAAGGTTGTGTCA
HPV31 ori 61 rev	CGTTTTCGGTTCCACCACT
E2C BsrGI for	TGGACATGTACAGATGGAAAACAT
E2C T 159 A for	TATATAAGTGCATCACAAAGAGAC
E2C T 159 A rev	ATCGTCTCTTTGTGATGCACTTAT
E2C R 162 A for	ATAAGTACATCACAAAGCAGACGATTTT
E2C R 162 A rev	ATTTAAAAAATCGTCTGCTTGTGATGT
E2C N 167 A for	GAT TTT TTA GCA ACT GTA AAA ATA
E2C N 167 A rev	TATTTTTACAGTTGCTAAAAAATC
E2C Bam Y 181 A rev	AGATCTGGATCCTAAATAGTCATTGCTCCTGT
E2C Bam rev	AGATCTGGATCCTAAATAGTCATATATCCTGT
pSG 1167 rev	ACCACAACCTAGAATGCAGTGAA
E8 <sup>+</sup> E2C HA NheI for	ACATTAGCTAGCGAATTCATGGCAATAC

### 3.1.10 Plasmide und Vektoren

pC18 SP1 luc (Zobel, Iftner et al. 2003): vom Luziferase-Reporterplasmid pAluc (Dong, Stubenrauch et al. 1994) abgeleitetes Plasmid, das vier synthetische E2-Bindungsstellen und zwei synthetische SP1-Bindungsstellen 5' von der TATA-Box und dem Initiator-Element des späten Adenovirus-Hauptpromotors enthält.

pC18 SP1 4xGal4 luc (Zobel, Iftner et al. 2003): pC18 SP1 luc-Plasmid, das neben den vier E2-Bindungsstellen und zwei SP1-Bindungsstellen, vier zusätzliche Gal4-Bindestellen 5' von der TATA-Box und dem Initiator-Element des späten Adenovirus-Hauptpromotors enthält.

pcDNA5.1 FR/TO CHD6 (Schuster and Stoger 2002): eukaryonter Expressionsvektor, in den die humane CHD6 cDNA-Sequenz über KpnI und NotI inkloniert wurde

pcDNA CHD6 T7: pcDNA5.1 FR/TO CHD6 Plasmid in das zusätzlich eine T7 Promotorsequenz 5' vor der CHD6-Sequenz über BspTI inkloniert wurde um *in vitro*-Translation zu ermöglichen.

pDrive (Qiagen): kommerziell erhältlicher, bereits linearisierter Klonierungsvektor, der U-Überhänge an den 3' Enden besitzt um PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen direkt zu ligieren. Das klonierte PCR-Produkt steht je nach Orientierung unter der Kontrolle eines T7- oder SP6-Promoters.

pDrive CHD6 F2-1420: pDrive-Vektor, der die Aminosäuren 1-474 von humanem CHD6 unter der Kontrolle eines SP6-Promoters enthält.

pDrive CHD6 F2-1856: pDrive-Vektor, der die Aminosäuren 1-559 von humanem CHD6 unter der Kontrolle eines SP6-Promoters enthält.

pET42b(+) (Novagen): IPTG-induzierbarer bakterieller Expressionsvektor, der die Überexpression von GST- und Polyhistidin-Fusionsproteinen ermöglicht.

pET42b-31E8<sup>Δ</sup>E2C (Ammermann, Bruckner et al. 2008): von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, das die gesamte codierende Sequenz für HPV31 E8<sup>Δ</sup>E2C enthält.

pET42b-31E8<sup>E2C</sup> Δ3-12 (Ammermann, Bruckner et al. 2008): von pET-42b(+) abgeleitetes Plasmid, das die codierende Sequenz für HPV31 E8<sup>E2C</sup> ohne die Sequenz für die Aminosäuren 3-12 enthält.

pGL31URR luc (Stubenrauch, Colbert 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.

pGL18URR luc (Stubenrauch, Straub et al. 2007): von pGL3-Basic (Promega) abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, in dessen MluI/NcoI-Restriktionsstellen die komplette regulatorische Region von HPV18 mit dem frühen Promotor P105 (HPV18 Nt. 7127-105) eingeführt wurde.

pGL31URR 4xGAL4 (Zobel, Iftner et al. 2003): ein von pGL31URR abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid, in dessen HindIII-Restriktionsstelle ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit vier GAL4-Bindungsstellen inseriert wurde

pGBKT7-31E8<sup>E2C</sup>: Von pGBKT7 (Clontech) abgeleiteter Hefe-Expressionsvektor, der ein Fusionsprotein aus 31E8<sup>E2C</sup> und der Gal4 DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 1-147) exprimiert. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den ADH-Promotor angetrieben. Zur *in-vitro*-Translation des inklonierten Proteins ist ein T7-Promotor nach der Gal4 DBD vorhanden.

pIRES puro3 (Clontech): kommerziell erhältlicher Vektor, der eine „internal ribosome entry site“ des encephalomyokarditis virus (ECV) unter der Kontrolle eines CMV-Promoters enthält. Die IRES erlaubt die Translation von zwei offenen Leserahmen von einer mRNA. Der Vektor enthält zudem eine Puromycin-Resistenz am Ende der IRES. Bei Selektionsdruck wird so sichergestellt, dass das Gen von Interesse exprimiert wird, da die Resistenzbildung nur erfolgt, wenn die gesamte Expressionskassette abgelesen wird.

pIRES puro 31E8<sup>E2C</sup> HA: pIRES puro-Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) mit einem HA-Epitop in der nicht codierenden Hinge-Region enthält.

pIRES puro 31E8<sup>E2C</sup> HA myc: pIRES puro-Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) mit einem HA-Epitop und einem zusätzlichen myc-Epitop in der Hinge-Region enthält.

pIRES puro 31E8<sup>E2C</sup> KWK HA: pIRES puro-Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) mit einem HA-Epitop in der Hinge-Region enthält. Die Aminosäuresequenz KWK an der Stelle 5, 6, 7 des Proteins sind durch AEA ersetzt worden.

pIRES neo2 (Clontech): siehe pIRESpuro3. Der Unterschied besteht nur in der Antibiotika-Resistenz. pIRESneo2 enthält eine Neomycin-Resistenz.

pIRES neo 31E8<sup>E2C</sup> HA: pIRES neo-Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) mit einem HA-Epitop in der nicht codierenden Hinge-Region enthält.

pMalC2X (New England Biolabs): IPTG-induzierbarer bakterieller Expressionsvektor, der die Überexpression von MBP-Fusionsproteinen ermöglicht.

MBP-31E8<sup>E2C</sup> von pMalC2X abgeleitetes Plasmid, das die gesamte codierende Sequenz für HPV31 E8<sup>E2C</sup> enthält.

MBP-31E8<sup>E2C</sup> 1-91: von pMalC2X abgeleitetes Plasmid, das die Sequenz für HPV31 E8<sup>E2C</sup> von Aminosäure 1 bis 91 enthält.

MBP-31E8<sup>E2C</sup> 92-184: von pMalC2X abgeleitetes Plasmid, das die Sequenz für HPV31 E8<sup>E2C</sup> von Aminosäure 53 bis 184 enthält.

MBP-31E2 von pMalC2X abgeleitetes Plasmid, das die gesamte codierende Sequenz für HPV31 E2 enthält.

MBP-31E8<sup>E2C</sup> T159A HA: von pMal-E8<sup>E2C</sup> abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Threonin 159 des HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

MBP-31E8<sup>E2C</sup> R162A HA: von pMal-E8<sup>E2C</sup> abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Arginin 162 des HPV31

E8<sup>A</sup>E2C-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

MBP-31E8<sup>A</sup>E2C N167A HA: von pMal-E8<sup>A</sup>E2C abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Asparagin 167 des HPV31 E8<sup>A</sup>E2C-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

MBP-31E8<sup>A</sup>E2C Y181A HA: von pMal-E8<sup>A</sup>E2C abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Tryptophan 181 des HPV31 E8<sup>A</sup>E2C-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

MBP-31E8<sup>A</sup>E2C 118/119: von pMal E8<sup>A</sup>E2C abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäuren Lysin und Cystein an Position 118/119 des HPV31 E8<sup>A</sup>E2C-Proteins, die für die DNA-Bindung eine wichtige Rolle spielen, durch Methionin und Arginin ersetzt wurden.

MBP-CHD6 1-474: von pMalC2X abgeleitetes Plasmid, in das die codierende Sequenz für die Aminosäuren 1-474 von CHD6 eingefügt wurde.

pSG5 (Stratagene): eukaryontes Expressionsplasmid, bei dem die Expression des inserierten Gens unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotors steht.

pSG-GAL4 (Zobel, Iftner et al. 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-31E8<sup>E2C</sup> (Stubenrauch, Zobel et al. 2001): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) enthält.

pSG-31E8<sup>E2C</sup> (1-37)-GAL4 (Zobel, Iftner et al. 2003): von pSG5-GAL4 abgeleitetes Expressionsplasmid, in dessen EcoRI-Restriktionsstelle das EcoRI-Restriktionsfragment (Aminosäuren 1-37) aus HPV31 E8<sup>E2C</sup> eingefügt wurde.

pSG-16E8<sup>E2C</sup>: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV16 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV16 nt. 1258-3913) enthält

pSG-18E8<sup>E2C</sup>: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV18 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV18 nt. 1288-3996) enthält

pSG-31E8<sup>E2C</sup> HA (Stubenrauch, Straub et al. 2007): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV31 nt. 1259-1296 und 3295-3810) sowie ein HA-Epitop im nicht konservierten Hinge-Bereich enthält.

pSG-31E8<sup>E2C</sup> T159A HA: von pSG5 HPV31 E8<sup>E2C</sup> HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Threonin 159 des HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

pSG-31E8<sup>E2C</sup> R162A HA: von pSG5 HPV31 E8<sup>E2C</sup> HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Arginin 162 des HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

pSG-31E8<sup>E2C</sup> N167A HA: von pSG5 HPV31 E8<sup>E2C</sup> HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Asparagin 167 des HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

pSG-31E8<sup>E2C</sup> Y181A HA: von pSG5 HPV31 E8<sup>E2C</sup> HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Tryptophan 181 des HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Proteins durch Alanin ersetzt wurde und das zudem ein HA-Epitop enthält.

pSG-16E8<sup>E2C</sup> HA: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV16 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV16 nt. 1258-3913), sowie ein HA-Epitop im nicht konservierten Hinge-Bereich enthält

pSG-18E8<sup>E2C</sup> HA: von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV18 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV18 nt.



1288 – 3996), sowie ein HA-Epitop im nicht konservierten Hinge-Bereich enthält

pSX-31E2 HA (Stubenrauch et. al. 2007): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E2, sowie ein HA-Epitop im nicht konservierten Hinge-Bereich enthält

pSX-31E2 (Stubenrauch, Lim et al. 1998): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, das die kodierende Sequenz für HPV31 E2 enthält

pSG-KRAB-GAL4 (Zobel, Iftner et al. 2003): von pSG424 (Sadowski & Ptashne, 1989) abgeleitetes Expressionsplasmid, das die KRAB-Domäne (Aminosäuren 1-74) aus dem KOX1-Protein, fusioniert mit der GAL4-DNA Bindedomäne, enthält.

pSG-KRAB-E2C: von pSG424 (Sadowski & Ptashne, 1989) abgeleitetes Expressionsplasmid, das die KRAB-Domäne (Aminosäuren 1-74) aus dem KOX1-Protein, fusioniert an die E2C DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von HPV31 E2, enthält.

pSG-KRAB-HA: von pSG424 (Sadowski & Ptashne, 1989) abgeleitetes Expressionsplasmid, das die KRAB-Domäne (Aminosäuren 1-74) aus dem KOX1-Protein, sowie ein HA-Epitop enthält.

pLKO.1 (sigma-aldrich): kommerziell erhältlicher shRNA-Vektor ohne codierende shRNA-Sequenz, der zudem eine Puromycin-Resistenz enthält.

pLKO.1-shCHD6 (sigma-aldrich): kommerziell erhältlicher shRNA-Vektor der eine shRNA gegen CHD6 enthält. Im Set waren 5 shRNAs enthalten, davon wurden zwei, die beide in der codierenden Sequenz liegen und eine vergleichbar gute Reduktion der Proteinlevel zeigten für Experimente verwendet (416-> shCHD6-1: hCHD6 mRNA-Sequenz 1211-1231, 417-> shCHD6-2: hCHD6 mRNA-Sequenz 2255-2275)

### 3.1.11 DNA-Sequenzierung

Sequenzierreaktionen wurden bei der Firma GATC Biotech in Konstanz durchgeführt.

### 3.1.12 Bakterienstämme

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

### 3.1.13 Eukaroyote Zelllinien

<u>Bezeichnung/Referenz</u>	<u>Beschreibung</u>
HeLa (Gey et al.,1952)	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie
Phoenix	retrovirale Verpackungszelllinie, basierend auf HEK293T

HEK239T <b>Human Embryonic Kidney</b> (Graham et al., 1977)	Humane embryonale Nierenzelllinie, immortalisiert mit Adenovirus E1A und SV40 Large-T-Antigen
HEK 293T pRESpuro	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid stabil transfiziert wurde
HEK 293T pRESpuro E8 <sup>Δ</sup> E2C HA	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>Δ</sup> E2C HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
HEK 293T pRESpuro E8 <sup>Δ</sup> E2C HA-myc	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>Δ</sup> E2C HA myc exprimiert, stabil transfiziert wurde
HEK 293T pRESpuro E8 <sup>Δ</sup> E2C KWK HA	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>Δ</sup> E2C KWK HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
HeLa shCHD6_1	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie, die mit einem shRNA-Vektor der eine shRNA gegen humanes CHD6 exprimiert, stabil transduziert wurde.

HeLa shCHD6_2	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie, die mit einem shRNA-Vektor der eine shRNA gegen humanes CHD6 exprimiert, stabil transduziert wurde.
HeLa shControl	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie, die mit einem shRNA-Vektor, der eine Kontroll-shRNA die gegen kein Zellprotein gerichtet ist, exprimiert, stabil transduziert wurde.
RTS3b (Purdie et al. 1993)	Spontan immortalisierte, p53 defiziente Keratinozyten-Zelllinie
RTS3b pIRESpuro	RTS3b-Zelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid stabil transfiziert wurde
RTS3b pIRESpuro E8^E2C HA	RTS3b-Zelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid welches HPV31 E8^E2C HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
RTS3b pIRESpuro E8^E2C KWK HA	RTS3b-Zelllinie, die mit einem puromycinresisten Plasmid welches HPV31 E8^E2C KWK HA exprimiert, stabil transfiziert wurde

### 3.1.14 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 Extract, 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)	30 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

### 3.1.15 Medien für Zellkultur

DMEM FKS	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 50 mg/l Gentamycin (Invitrogen) mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS; Seromed) für HeLa, Phoenix und 293T, sowie 293T Derivate
----------	---

DMEM CS	Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit 50 mg/l Gentamycin (Invitrogen) mit 10 % Kalbsserum (CS; Invitrogen) für NIH3T3-J2
E-Medium	Adenin ( $1,8 \times 10^{-3}$ M), Hydrocortison (417 µg/ml), Insulin (50 µg/ml), Transferrin (50 µg/ml), T3 ( $2 \times 10^{-11}$ M), Choleratoxin ( $1 \times 10^{-8}$ M), 50 % DMEM, 50 % DMEM/Ham´s F12 1:1, 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS, Seromed)
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

### 3.1.16 Häufig benutzte Puffer und Lösungen

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
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)
1x TE Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA
NP40 Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA, 0,1% (v/v) Igepal 630, 1mM DTT, Protease-Inhibitoren
5x DNA-Ladepuffer	100 mM Tris-Acetat pH 7,5 25 % (v/v) Glycerol, 25 mM EDTA, 0.25 % (w/v) Xylencyanol 0,25 % (v/v) Bromphenolblau, 15 % (w/v) Ficoll, 1 % (v/v) SDS

## Material und Methoden

---

Column-Puffer	200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Igepal 630, 1 mM DTT, Protease-Inhibitoren
Eosin-Färbelösung	178 ml Ethanol p.a., 2 ml Eisessig, 20 ml 1%-ige Eosinlösung (w/v)
Luziferaseassay-Lysispuffer	100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,8, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mM DTT
Luziferaseassay-Assaypuffer	100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,8, 15 mM $\text{MgSO}_4$ , 5 mM ATP
2x HBS	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7,0
ChIP-Puffer - SNS-B	1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Igepal 630



ChIP-Puffer - RSB	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 3 mM MgCl <sub>2</sub>
ChIP-Puffer - LSB	100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Igepal 630
ChIP-Puffer - LiCl-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM LiCl, 0,5 % Natrium-Deoxycholat, 0,5 % (v/v) Igepal 630, 1 mM EDTA
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) SDS, 0,1% (v/v) Natrium-Deoxycholat, 1 % (v/v) NP-40, 1mM DTT, Protease-Inhibitoren
NET-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% (v/v) Igepal 630, 1mM DTT, Protease-Inhibitoren

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Fähigkeit zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA (Kompetenz) von *Escherichia coli* Bakterien wurde durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{RbCl}_2$  und  $\text{MnCl}_2$  erreicht (Ausubel et al., 1990; Hanahan, D., 1983). Dabei wurden 490 ml LB-Flüssigmedium mit 10 ml *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (bei  $\lambda=600$  nm,  $\text{OD}_{600}$ ) von 0.45 im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 30 min auf Eis belassen und 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml TFB1 (10 mM MES, 100 mM  $\text{RbCl}_2$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 5.8, 50 mM  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM  $\text{RbCl}_2$ , 75 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 6.5, 15% Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 3.1.1.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen

Für die Transformation wird die Hitzeschockmethode nach Ausubel et al., 1990; Hanahan, D. 1983 verwendet. Zu 100  $\mu\text{l}$  tiefgefrorenen kompetenten *E.coli* gibt man 10  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes und inkubiert die kompetenten *E.coli* Bakterien 30 Minuten auf Eis. Der Hitzeschock erfolgt bei 42°C für 60 Sekunden, anschließend wird der Ansatz 1 Minute auf Eis abgekühlt. Nach Inkubation auf Eis für 30 Minuten

werden 400µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien anschließend 30 Minuten bei 37°C inkubiert. 100µl des Transformationsansatzes werden anschließend auf ampicillinhaltigen (100µg/ml) LB-Platten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden in Übernachtkulturen vermehrt und auf rekombinante DNA untersucht.

### **3.1.1.3 Kulturen für Plasmidisolierung**

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmid-DNA wurde stets der *E.coli* Stamm DH5α 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 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin.

3 ml Übernachtkulturen 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 µl einer Übernachtkultur oder direkt aus der cryokonservierten Probe angeimpft und bei 37°C 16-18 h im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Langzeit-Lagerung wurden 500 µl Bakteriensuspension mit 500 µl Bakterien-Einfriermedium versetzt und bei -80°C eingefroren.

### **3.2.2 DNA-Methoden**

#### **Standardmethoden**

Folgende Methoden wurden nach Protokollen gemäß Ausubel et al., 1990 durchgeführt:

- Aufreinigung der DNA mittels Phenol/Chloroform
- Ethanolfällung von DNA und RNA
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten
- Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

#### **3.2.2.1 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 50-200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop) bestimmt.

#### **3.2.2.2 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.

### **3.2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

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

### **3.2.2.4 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA**

Die Oligonukleotidpaare wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst (Endkonzentration jeweils 1 µg/µl). Zu 25 µl 2x Annealingpuffer wurden jeweils 12,5 µl von den gelösten Oligonukleotiden gegeben und in einem ThermoCycler unter den folgenden Bedingungen inkubiert:

5min bei 95 °C

10min bei 70 °C

0.1 %s auf 60 °C

10min bei 60 °C

0.1 %s auf 50 °C

10min bei 50 °C

0.1 %s auf 40 °C

10min bei 40 °C

0.1 %s auf 25 °C

10min bei 25 °C

0.1 %s auf 4 °C

∞ bei 4 °C

### **3.2.2.5 Radioaktive 5'-Endmarkierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden**

Für Pull-Down-Assays mit DNA-bindenden Proteinen wurden doppelsträngige Oligonukleotide mittels  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP 5'-endmarkiert. Die 5'-Endmarkierung erfolgte mit dem Enzym Polynukleotidkinase des Bakteriophagen T4, das den Transfer des N-terminalen  $\gamma$ -Phosphats von ATP auf das freie 5'-OH-Ende der DNA katalysiert. 200 ng doppelsträngiges Oligonukleotid wurden mit 50  $\mu$ Ci  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, 10 U T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) und dem dazugehörigen "Forward"-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l 30 min bei 37°C radioaktiv markiert. Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotids von freiem  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP erfolgte über eine Gelfiltrationssäule (NucTrap Probe Purification Columns, Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Aktivität des aufgereinigten Oligonukleotids wurde mit einem Szintillationszähler gemessen.

### **3.2.2.6 Quantitative Real-Time PCR**

Die quantitative Real-Time PCR der Chromatin-Immunopräzipitate wurde mit dem ABI 5700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierzu wurde ein kommerziell erwerblicher MasterMix (Eurogentec), der alle nötigen Komponenten wie dNTPs, Polymerase etc. sowie SYBR Green enthält, benutzt. SYBR Green lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein, somit kann die Zunahme der entstandenen PCR-Produkte sofort am Ende jedes Zyklus bestimmt werden. Im idealen Fall zeigt diese Kurve deutlich den linear exponentiellen Anstieg der PCR-Produktmenge während der Reaktion. Als Mengenstandard für die virale Kopienzahl diente das Virusgenom von HPV18 oder von

HPV31, welche in ein Plasmid kloniert wurden (pHPV18, pModBR HPV31, Ruesch, unpubliziert). Davon wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Verdünnungen für  $10^2$ ,  $10^4$  und  $10^6$  Kopien immer mitgemessen. In der Regel wurde pro Ansatz 10µl Mastermix, 0.6 µm Primer und 5µl DNA in einem Gesamtansatz von 20µl zusammen in eine schwarze 96 well Platte (Peqlab) pipettiert und mit einer selbstklebenden Abdeckfolie verschlossen. Die PCR lief nach folgendem Programm ab:

Denaturierung	15 min bei 95 °C	1 Zyklus
Amplifikation		40 Zyklen
	Annealing	30 sec 55 °C
	Elongation	30 sec bei 72 °C
Schmelzkurve	Hochheizen auf 95 °C,	
		60 °C, 2 min
		0,1 °C/sec bis 95 °C

Die Auswertung erfolgte nach Exportieren der Daten in Microsoft Excel

### 3.2.3 Zellkultur-Methoden

#### 3.2.3.1 Kultivierung von Säugerzellen und Arbeiten mit Säugerzellen

Alle verwendeten Zellen wurden als "Monolayer"-Kultur bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und humidifizierter Atmosphäre in Plastik-Gewebekulturschalen (nunc) kultiviert.

Zum Teilen konfluenten Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml sterilem PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml serumhaltigem Medium inaktiviert, die Zellen aufgenommen und vereinzelt. HeLa-Zellen wurden in DMEM/10% FKS und Gentamicin kultiviert und maximal im Verhältnis 1:8 geteilt. Phoenix-Zellen wurden im Verhältnis 1:20 geteilt und weiter kultiviert. RTS3b und Derivate wurden in E-Medium mit 10% FKS gehalten und maximal im Verhältnis 1:6 geteilt.

### **3.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zelllinien von einer 10 cm Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums bei RT 5 min bei 250 g zentrifugiert. Der Zellrückstand wurde in kaltem Einfriermedium (HeLa und 293T sowie 293T Derivate: 70% DMEM, 20% FKS, 10% DMSO; RTS3b und Derivate: 70% E-Medium, 20% FKS, 10% Glycerol) resuspendiert und zumeist auf mehrere Einfrierröhrchen verteilt, die zunächst in einer Einfrierbox langsam 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 Einfrierröhrchens in 10 ml Medium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.



### 3.2.3.3 Transfektion von Humanzellen

#### Transfektion mit einem Komplexbildner

Die Transfektion von Humanzellen erfolgte mit dem liposomenbasierten Komplexbildner FuGene HD (Roche) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Plastik-Gewebekulturschalen ausgesät (Zelldichte bei Aussaat:  $1,5 \times 10^5$  pro 35 mm-Schale,  $3 \times 10^5$  pro 60 mm-Schale,  $1,5 \times 10^6$  pro 100 mm-Schale). Die zu transfizierenden DNAs wurden gegebenenfalls in sterilem Wasser verdünnt. Pro Transfektionsansatz wurden ein steriles PS-Röhrchen mit jeweils 50  $\mu$ l OptiMEM (35 mm-Schale; 250  $\mu$ l für 60 mm; 500  $\mu$ l für 100 mm) vorbereitet. Die DNA wurde in der entsprechenden Menge mit FuGene HD im Verhältnis 5:2 (5  $\mu$ l Transfektionsreagenz auf 2  $\mu$ g DNA) pipettiert. Das Gemisch wurde durch Vortexen durchmischt und 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde bei den Zellen das Medium gewechselt. Anschließend wurde das DNA-Gemisch langsam in das Medium gegeben.

#### Transfektion mit der Calcium-Phosphat-Methode

Die Transfektion der Phönix-Zellen nach CaPO<sub>4</sub>-Präzipitationsprinzip für 100 mm-Schalen wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst wurde das Medium gewechselt, dabei das Volumen auf 8 ml reduziert und 25  $\mu$ M Chloroquine zugegeben. Anschließend wurde das Transfektions-Gemisch angesetzt. Dieses bestand aus 20  $\mu$ g Plasmid-DNA, 124  $\mu$ l 2M CaCl<sub>2</sub> sowie 876  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O, für größere Schalen wurde alles entsprechend hochgerechnet. Das Transfektions-Gemisch wurde mit der Pipettierhilfe kontinuierlich „aufgeblubbert“ dabei wurde langsam 1 ml 2xHBS zugegeben.

Danach wurde das DNA/CaCl<sub>2</sub>/HBS-Gemisch 1 bis max. 2 Minuten präzipitieren gelassen und tropfenweise auf die Phönix-Zellen gegeben. Nach 12 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen geerntet und für die Chromatin-Immunopräzipitationsexperimente benutzt.

### **3.2.3.4 Luziferase-Reporteranalyse**

Die transkriptionelle Aktivität von Promotorkonstrukten wurde indirekt durch die Expression des Luziferase-Reportergens bestimmt. Je  $3 \times 10^4$  Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät und am folgenden Tag mit den entsprechenden DNA-Mengen (in der Regel wurden 50 ng Reporterplasmid und 10 ng Expressionsplasmid verwendet) transfiziert. Luziferase-Reporteranalysen wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit 200 µl kaltem PBS gewaschen und mit 150 µl kaltem Lysepuffer pro Vertiefung lysiert. Anschließend wurden 50 µl Zellextrakt zu 100 µl Assay-Puffer gegeben und die Luziferase-Aktivität sofort im Luminometer vermessen.

Um den methodisch bedingten Schwankungen entgegenzuwirken, wurde jeder Messwert im Duplikat gemessen, d.h. es wurden für jeden Wert zwei Schälchen mit Zellen angesetzt, transfiziert und gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte relativ zu einem Bezugswert. Als Bezugswert diente der gemessene Durchschnittswert der beiden Wiederholungen für die Kombination Luziferase-Reporterplasmid/ leerer Expressionsvektor (d.h. z.B. das pSG Plasmid ohne E8<sup>Δ</sup>E2C) wurde als 100% gesetzt, d.h. die nicht inhibierte Transkription des Luziferase-Gens unter den gegebenen Bedingungen.

Die nach Transfektion verschiedener anderer Expressionsvektoren im gleichen Experiment gemessenen Werte wurden hierzu in Relation gesetzt, d.h. Wert/ Bezugswert. Bei einem aktivierend wirkenden Expressionsplasmid entstehen somit Vielfache von 1, bei einer Repression der Luziferase-Transkription Werte unter 1.

### **3.2.3.5 Infektion humaner Zellen mit Lentiviren**

Die Transduktion lentiviraler Partikel erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Zunächst wurden  $3 \times 10^4$  Zellen in frischem Zellkulturmedium für jedes Konstrukt in Zellkulturplatte mit 12 Vertiefungen ausgesät. Jede Transduktion wurde im Duplikat angesetzt.

Anschließend wurde Hexadimethrinbromid (Chloroquine) bis zu einer Endkonzentration von  $8 \mu\text{g/ml}$  zu jedem Well gegeben und sanft gemischt.

Hexadimethrinbromid verstärkt die Transduktion bei den meisten Zelltypen indem es die lysosomalen DNasen durch Neutralisieren des pH-Werts innerhalb der Vesikel hemmt. Die lentiviralen Partikel wurden dann zu den entsprechenden Ansätzen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 2 gegeben und sanft gemischt.

Am nächsten Tag wurde frisches Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Am darauf folgenden Tag wurde dieses durch frisches puromycinhaltiges Medium ersetzt, dieses wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

### **3.2.3.6 Koloniereduktionsassay**

Die Zellen wurden am Vortag wie oben beschrieben zur Transfektion ausgesät. Es wurde stets eine 60mm-Schale pro Ansatz benutzt. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten wie im Abschnitt 3.3.3 beschrieben transfiziert.

Anschließend wurden die Zellen einer 60mm-Schale am nächsten Tag auf eine 100mm-Schale überführt. Wiederum am nächsten Tag wurde das Selektionsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum hinzugegeben. In der Regel wurde mit 0,4µg/ml Puromycin oder 500µg/ml Geneticin selektioniert. Die Selektion wurde nach 12 Tagen beendet. Die verbliebenen Kolonien wurden einmal mit PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton für 2 Minuten bei RT fixiert. Nach dem Trocknen der Platten wurde für 5 Minuten Eosin-Lösung zugegeben und die Zellen anschließend noch einmal mit PBS gespült. Nach dem Trocknen der Platten, konnten die Kolonien gezählt werden.

## **3.2.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.4.1 Bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen**

Die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Bakterien erfolgte mit dem pET-Expressionssystem (Novagen).

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 (T7lac) kontrolliert. Der lac-Repressor reprimiert nicht nur diesen Promotor, sondern auch den lacUV5-Promotor der T7-RNA-Polymerase. Auf diese Weise wirken sich toxische Effekte der eingebrachten Fusionsproteine erst nach Induktion der Promotoren mit IPTG aus, das zu einer Ablösung des lac-Repressors von der Operatorsequenz führt. Lysozym wirkt als zusätzlicher Repressor der T7 RNA-Polymerase und erleichtert den Aufschluss der Bakterien bei der Aufreinigung der Fusionsproteine. Am 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. Nach 16-18 Stunden wurde LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol im Verhältnis 1:10 mit der Vorkultur beimpft und bis zu einer OD ( $\lambda=600$  nm, OD<sub>600</sub>) von 0,6 bis 0,7 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 3 h bei 25°C mit 0,4 mM IPTG auf einem Schüttler induziert. Die Ernte der induzierten Bakterien erfolgte für 10 min bei 4°C und 4000 rpm. Die erhaltenen Rückstände (jeweils von 1 L Kultur) wurden vorsichtig mit 6 ml eiskaltem, mit Proteinaseinhibitoren (Complete Mini EDTA-free, Roche) versetztem PBS resuspendiert (ab hier erfolgten alle Schritte stets gekühlt bzw. auf Eis und in Anwesenheit von Proteinaseinhibitoren). Der Aufschluss der induzierten Bakterien erfolgte durch Sonifizieren (30 sec, 40% Leistung, ein durchgehender Impuls) und anschließende Zugabe von 1/10 Vol. 10% TX-100 (Endkonz. 1%). Die Zelltrümmer und denaturierten Aggregate der aufgeschlossenen Zellen wurden durch zweimaliges

Zentrifugieren von 10 min bei 12.000 g und 4°C pelletiert und der Überstand jeweils in ein neues Falcongefäß überführt.

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

Am nächsten Morgen wurde die Matrix in eine kleine Chromatographie-Säule überführt. Nach Durchlauf des Überstands wurde 5x mit je 10 ml PBS (+Protease-inhibitoren) und 5x mit je 10 ml NP40-Puffer (0,1 % Igepal 630, ebenfalls mit Proteaseinhibitoren) gewaschen.

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

### **3.2.4.2 Bakterielle Expression von MBP-Fusionsproteinen**

Da mit der Expression von MBP-Fusionsproteinen eine höhere Ausbeute an aufgereinigtem Protein erreicht wurde, wurden die meisten Konstrukte die als GST-Fusionsprotein exprimiert wurden, in pMalC2X umkloniert. Die Expression von MBP-Fusionsproteinen mit dem pMal-Expressionssystem (Novagen) erfolgte in *E. coli* Rosetta2-Bakterien. Bei Rosetta2 handelt es sich um einen *E. coli* Stamm, welcher das Plasmid pRARE enthält. Von diesem werden sieben tRNAs exprimiert, die in *E. coli* selten vorkommende Codons erkennen. Dies kann die Expression eukaryotischer Proteine verbessern.

Für die Aufreinigung wurde zunächst eine Bakterien-Vorkultur, die 10 % des Hauptkulturvolumens umfasste, in ampicillinhaltigem Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach 16-18 h wurde die Vorkultur auf das Volumen der Hauptkultur aufgefüllt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,7 kultiviert.

Danach wurde die Kultur für 20 min bei 20°C inkubiert und im Anschluss 0,5 mM IPTG zur Induktion der Proteinexpression zugegeben. Nach 3 h Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min; 4°C; 4000 g).

Die erhaltenen Bakterien wurden auf Eis in Column-Puffer (200mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 1 mM DTT, Proteaseinhibitoren) resuspendiert (1 ml Column-Puffer für 100 ml Bakterienkultur) und die Bakterien mit 40% Intensität und einer Impulsdauer von 0,5 s/sec über Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0.1 Vol % Igepal 630 erfolgte das Abzentrifugieren der Zelltrümmer (15 min; 4°C; 15000 g) und die Inkubation des Überstandes mit Amylose-Resin (Novagen). Pro 1L Startkultur wurden 250-500 µl Matrix eingesetzt und über Nacht bei 4°C im Überkopf-Taumler inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Matrix 7- bis 8-mal mit jeweils 1 ml Column-Puffer mit 0,1% Igepal 630 gewaschen. Nach Zugabe von Natriumazid wurde die Matrix mit dem gebundenen Fusionsprotein bei 4°C gelagert bzw. per SDS-Page und anschließender Coomassie-Färbung die Ausbeute und Reinheit bestimmt.

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

Die Zusammenstellung des Ansatzes erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Pro 50 µl Reaktion wurden folgende Ansätze (stets auf Eis) pipettiert:

- 40 µl TNT Quick Master Mix
- 1 µg Plasmid DNA/ Reaktion (nicht mehr als 8 µl)

Die Reaktion wurde auf 48 µl mit sterilem nukleasefreiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt, anschließend wurde im Isotopenlabor 2 µl der <sup>35</sup>S-markierten Aminosäure (i.d.R. <sup>35</sup>S Methionin) zugegeben.

Bei Mehrfach-Ansätzen wurden alle Mengen entsprechend vervielfacht. Der Ansatz wurde bei 30 °C für 60 Minuten inkubiert und anschließend 1 Minute bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz für GST-/MBP-Pulldown Experimente verwendet.

### 3.2.4.4 Herstellung von Zellextrakten aus eukaryoten Zellen

Die Zellen (1x100mm Schale) wurden in 1 ml eiskaltem PBS abgeschabt und abzentrifugiert (30 sec. bei 20.000x g und 4 °C). Der Zellrückstand wurde für 10 min auf Eis in 500 µl NP40-Puffer lysiert. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (10 min @ 20.000x g @ 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Rückstand verworfen. Wenn möglich wurde sofort weitergearbeitet und die Zellextrakte nicht eingefroren. Bei größeren Zellkulturschalen und Zellmengen wurde die verwendete Menge PBS zum Ernten und NP40-Puffer für die Lyse angepasst.

Je nach Zelllinie waren für die effiziente Lyse unterschiedliche Konzentrationen Igepal 630 notwendig. Für RTS3b- und 293T-Zellen wurden in der Regel mit 0,1 % Igepal 630 im Puffer gute Ergebnisse



erzielt. Für HeLa-Zellen wurde in der Regel 0,5 % Igepal 630 im Puffer benutzt.

### 3.2.4.5 GST- und MBP-Pulldown Experimente

Es wurden zwei Varianten von Pulldown Experimenten durchgeführt. Bei der ersten Variante wurden die aufgereinigten Fusionsproteine mit *in vitro* translatierten, d.h.  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteinen durchgeführt, d.h. ein an GST- oder MBP-Agarose gebundenes Protein wurde hinsichtlich seiner Interaktion mit dem *in vitro* translatierten Interaktionskandidaten überprüft. Bei der zweiten Variante 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 bzw. Amylose-Resin gebundenen Proteinmengen abgeglichen, in dem gleiche Mengen der Matrix, an die das Fusionsprotein gebunden war, bei 95° C aufgekocht und aufgetragen wurden. Das Gel wurde anschließend Coomassie gefärbt um die Proteine sichtbar zu machen. Pro Reaktionsansatz wurden nun ca. 0,1 µg Fusionsprotein, gebunden an der entsprechenden Matrix, zu 1 ml NP40 Puffer gegeben (dazu wurde eine an der Spitze abgeschnittene Pipettenspitze in die abgesetzten Beads versenkt und die Beads vorsichtig aufgenommen). Beim Mengenabgleich der eingesetzten, an die Matrix gebundenen Fusionsproteine, wurde großen Wert darauf gelegt, gleiche Mengen der jeweiligen Fusionsproteine 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-Gel 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 Abweichungen beim Volumen der Matrix ergaben, wurde ggf. mit äquilibrierter Matrix aufgefüllt. Die Beads wurden nun 1 min bei 500 rpm und 4 ° C abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen.

Zu der Matrix wurde nun zunächst 300 µl NP40-Puffer gegeben und anschließend das radioaktiv-markierte Protein zu jeweils gleichen Teilen. Die Bindungsreaktion wurde 2 h bei 4 ° C im Überkopf-Taumler inkubiert. Bei Pulldown-Experimenten mit Zellysate wurde zu der Matrix nach dem Abzentrifugieren direkt das Zellysate gegeben und ebenfalls für ca. 2 h bei 4 ° C im Überkopf-Taumler 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 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% aufgekocht und anschließend 1 min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **3.2.4.6 Radioaktiver Pulldown mit $^{32}\text{P}$ -endmarkierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden**

Die Untersuchung der DNA-Bindung der aufgereinigten Fusionsproteine erfolgte in einem modifizierten McKay-Assay (McKay 1983). Hierfür wurden  $^{32}\text{P}$ -endmarkierte, doppelsträngige Oligonukleotide welche HPV31 E2BS4 entsprachen, zusammen mit den an Beads gebundenen, aufgereinigten MBP-Fusionsproteinen bzw. MBP allein als Kontrolle inkubiert. Hierfür wurden in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  mit jeweils 10  $\mu\text{l}$  Beads, ca. 100000 cpm des  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten Oligonukleotids und finalen Konzentrationen von 10 mM HEPES (pH 7,9), 125 mM NaCl, 1 mM DTT, Proteaseinhibitoren, sowie 75 mg Poly(dI-dC):Poly(dI-dC)/ml als Kompetitor, die Bindungsreaktion angesetzt und für 20 min in einem gekühlten Schüttelblock bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit frischem Bindungs-Puffer wurden die überbleibenden Beads mit dem gebundenen Oligonukleotid in einem Szintillationsmessgerät gemessen und so die Menge an gebundenem  $^{32}\text{P}$ -endmarkierten Oligonukleotids bestimmt.

### **3.2.4.7 Immunopräzipitation**

Eine alternative Methode zur Analyse möglicher Bindungspartner war die Ko-immunopräzipitation (Ko-IP), die in der Regel aus Zellextrakten durchgeführt wurde, in die zuvor transient oder stabil das Köderprotein bzw. Kontrollen eingebracht wurden. Für diese Art von Versuch wurden 293T Zellen transient transfiziert oder stabil E8<sup>A</sup>E2C-HA bzw. -HA-myc exprimierende 293T Zellen verwendet. Für transiente Expression wurden ca.  $2,5 \times 10^6$  Zellen (1x150mm Schale), für eine Einschnitt-Koimmunopräzipitation ca.  $1 \times 10^7$  Zellen (4x150mm Schalen) und für

die quantitative Zweischnitt-Koimmunopräzipitation ca.  $3 \times 10^8$  Zellen (30x150mm Schalen) verwendet.

Wie oben beschrieben wurden die Zellen geerntet und Extrakte angefertigt. Das Zelllysat (0,5- 4 ml) wurde mit 20 bzw. 150  $\mu$ l magnetischen  $\mu$ MACSTM Anti-HA Microbeads (Miltenyi Biotec) versetzt und 30 Minuten auf einem Schüttler auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die Säulen ( $\mu$ MACS® columns, Miltenyi Biotec) im Magnetständer platziert, mit 200  $\mu$ l LP äquilibriert, und anschließend wurde das Zelllysat/bead-Gemisch auf die Säule gegeben. Danach wurde 2 x mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Diese Schritte wurden alle bei 4 °C durchgeführt.

Für die Einschnitt-Koimmunopräzipitation wurden die Beads in 50 $\mu$ l 4xSDS Puffer aufgekocht und die Eluate mittels Immunoblot auf die Anwesenheit der entsprechenden Interaktionspartner hin untersucht. Für die quantitative Zweischnitt-Immunopräzipitation wurde 20  $\mu$ l in sterilem Wasser gelöstes HA-Peptid (5mg/ml; Sigma-Aldrich®) zu 130  $\mu$ l Lysispuffer gegeben. Davon wurden zunächst 20  $\mu$ l und nach fünfminütiger Inkubation bei RT weitere 50  $\mu$ l auf die Säule gegeben. Dann wurden nochmals 20  $\mu$ l Lysispuffer auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und stellt das Eluat dar. Für den zweiten Präzipitationsschritt wurde das Eluat 30 Minuten auf Eis im Schüttler mit 50  $\mu$ l magnetischen  $\mu$ MACSTM Anti-cMyc Microbeads (Miltenyi Biotec) inkubiert. Anschließend wurde 1 x mit 1 ml Lysispuffer gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurden auf die Säule 30  $\mu$ l 95 °C heißer SDS-Probenpuffer gegeben und die Säule aus dem Magnetfeld genommen. Danach wurden noch mal 50 $\mu$ l SDS-Probenpuffer auf die Säule gegeben, der Durchfluss aus der Säule gedrückt und 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Der resultierende Überstand wurde auf einem

SDS-Gel aufgetrennt, das Gel gefärbt und spezifische Banden massenspektrometrisch untersucht oder durch Western Blot auf die Anwesenheit der potenziellen Bindungspartner analysiert.

#### **3.2.4.8 Chromatin-Immunopräzipitation**

Die Zellen (pro Ansatz ca.  $2,5 \times 10^7$  Zellen) wurden zunächst mit 10ml PBS gewaschen, anschließend wurden für die Vernetzung von DNA und Proteinen 15 ml PBS mit 1% Formaldehyd auf die Platte gegeben. Die Zellen wurden max. 10 min unter Schütteln inkubiert, anschließend wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 1,5 ml Glycin (1,25 M) gestoppt. Die Zellen wurden nochmals mit 10 ml PBS gewaschen, dann in 5 ml PBS abgeschabt und in Gefäßen auf Eis gesammelt. Restliche Zellen auf den Platten wurden noch mal mit 5 ml PBS abgespült. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 2000 rpm und 4°C. Das erhaltene Pellet wurde in 5 ml RSB aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Um Zellkerne zu erhalten, wurden die Zellen in einem Dounce-Homogenisator unter Benutzung des engen Pistills 15-20mal hoch- und heruntergezogen. Das Homogenisat wurde 5 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde wiederum in 5 ml RSB resuspendiert und 2 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in 5 ml SNS B resuspendiert, und 2 min bei 2000 rpm abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde in einem 50 ml Falcon 40 ml LSB + Sucrose vorbereitet. Der Rückstand wurde in 2,7 ml LSB + 300  $\mu$ l 20% Sarcosyl (v/v) resuspendiert, und die Zellsuspension mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf die vorgelegte Sucroselösung geschichtet. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm 4°C wurde das

Pellet in 3 ml TE-Puffer aufgenommen. Es folgte ein Sonifizierungsschritt (2x 1 min 30 sek, 0,2 Impulse pro Sekunde bei 40% Leistung). Anschließend wurde bei  $OD_{260}$  die DNA-Konzentration der Lösung gemessen. Dafür wurde die Probe 1:100 mit Wasser verdünnt und in einem Photometer die Absorption gemessen. Danach erfolgte der Mikrokokkennuklease-Verdau: Pro 1 mg DNA wurden 10 U Enzym eingesetzt. Nach Zugabe von  $9\mu\text{l}$  1 M  $\text{CaCl}_2$  (Endkonz: 3 mM), wurde der Ansatz 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM EGTA + 11 x NET gestoppt und der Ansatz 3 min bei 13000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt. 10 –20 % der für die IP verwendeten Menge Chromatinlösung wurden als Input verwendet, daher wurden  $10\mu\text{l}$  Proteinase K dazugegeben und die Proben bei  $55^\circ\text{C}$  über Nacht in einem Heizblock inkubiert. Die restliche Chromatinlösung (500 – 750 $\mu\text{g}$ ) wurden mit  $2\mu\text{g}$  des entsprechenden Antikörpers versetzt und über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in Überkopf-Taumler inkubiert.

Pro Ansatz wurden am nächsten Tag  $20\mu\text{l}$  Protein-A/G-Beads (Santa Cruz BT) mit 1 ml PBS gewaschen. Die Beads wurden zu dem jeweiligen IP-Ansatz gegeben, das Ganze wurde für weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit 3x 1 ml RIPA-Puffer, 3 x 1 ml LiCl-Puffer und 3x 1 ml TE-Puffer gewaschen.

Die Beads wurden in  $200\mu\text{l}$  TE + 1% SDS aufgenommen, für 15 min im Heizblock bei  $37^\circ\text{C}$ , unter starkem Schütteln inkubiert, anschließend 1 min bei 500rpm abzentrifugiert und der Überstand mit  $200\mu\text{l}$  TE versetzt. Nach Zugabe von  $10\mu\text{l}$  ProteinaseK erfolgte ein eine Inkubation über Nacht bei  $55^\circ\text{C}$ .

Nach zweimaliger Phenol-Chloroform-Extraktion wurde das Pellet in 20µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und auf die Anwesenheit von Virus-DNA mit Real-Time PCR überprüft. Für die Auswertung wurden die Daten in Microsoft Excel exportiert und die Anreicherung in den einzelnen Immunpräzipitationsreaktionen relativ zur Ausgangsmenge (Input) bestimmt.

#### **3.2.4.9 SDS-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die 6-15 %-ige Trenngel-Lösung wurde direkt nach der Zugabe des Polymerisationsstarters APS zwischen zwei vertikale Glasplatten (Spacerabstand 0,75 mm oder 1,5 mm) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, mit Wasser nachgewaschen und anschließend das 4% Sammelgel gegossen.

Als Größenstandard wurden in kleinen Gelen 5 µl und in großen Gelen 10 µl „SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard“ (Invitrogen) oder „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) benutzt. Die Gelelektrophorese von kleinen Gelen erfolgte circa 45-60 min in 1x SDS-Puffer bei 200V. Die Gelelektrophorese von großen Gelen erfolgte circa 18 h in 1x SDS-Puffer bei 65V.

#### **3.2.4.10 Silberfärbung von Proteinen**

Die Methode der Silberfärbung dient der Sichtbarmachung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Dabei binden Silberionen an freie

Sulfhydryl- und Carboxylgruppen der Aminosäuren und werden nach Formalinfixierung zu freiem metallischem Silber reduziert (Rabilloud 1990). So können die Proteine als braune Banden in dem Gel sichtbar gemacht werden.

Um die Proteine anzufärben, wurden die Gele zunächst 30 min in eine Glasschale mit Fixierlösung überführt. Nach diesen 30 min wurde die Fixierlösung entfernt und der Sensibilisierungslösung hinzugegeben. Es folgten drei fünfminütige Waschschriffe mit Wasser. Anschließend wurde das Gel 30 min mit der Silbernitratlösung behandelt, bevor ein weiteres Mal mit Wasser gewaschen wurde. Danach wurde der Entwickler auf das Gel gegeben und nach Sicht inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde die Glycin-Stopp-Lösung auf das Gel gegeben und nach weiteren 30 min durch Wasser ersetzt.

Von der Silbernitratlösung wurden 400 ml auf das Gel gegeben, von allen anderen Lösungen wurden 500 ml auf das Gel gegeben. Alle Lösungen wurden mit einer 50 ml Einweg-Pipette komplett entfernt, bevor die nächste Lösung hinzu gegeben wurde. Um eine Keratin-Kontamination zu verhindern, wurden das Gießen des Gels, die SDS-PAGE und die Silbernitratfärbung in einer keratinfreien Umgebung durchgeführt. Alle benutzten Geräte wurden gründlich unter fließendem Wasser gespült und anschließend mit 70% EtOH und fusselfreien Tüchern gereinigt. Da Latexstaub ebenfalls zu Kontaminationen führen kann wurden keine Latex- sondern Nitril-Handschuhe verwendet. Außerdem wurden alle Arbeitsschritte der Silberfärbung unter einer Sterilbank durchgeführt.

Während der ganzen Prozedur wurde das Gel bei etwa 60 rpm geschwenkt.



Nach dem Einscannen des Gels wurden die Banden, die im Massenspektrometer analysiert werden sollten, markiert und ausgeschnitten. Das Einscannen des Gels, das Ausschneiden der Banden und die massenspektrometrische Analyse wurden im Proteom-Center Tübingen von Dr. S Jung durchgeführt.

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

Für den nachfolgenden immunologischen Nachweis 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 wenige Minuten 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 90 min bei konstant 90 V in einer Tank-Blotkammer mit Kühlschleife unter ständigem Rühren. In der Regel wurde für den Transfer CAPS-Puffer (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol) mit einem pH-Wert von 10,3 verwendet.

### **3.2.4.12 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 Waschschrte erfolgten unter Bewegung.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1 h bei RT bei 4°C in Blocklösung (5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST Puffer) inkubiert. Die Erstantikörper wurden wie unter Abschnitt 3.1.7 angegeben in Blocklösung 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 x angegeben in Blocklösung verdünnt und für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nach der Wiederholung der Waschschrte erfolgte die Detektion mit dem Chemilumineszenz-Kit SuperSignal West Dura oder Femto (Pierce). Um bei Ko-immunopräzipitationen im Bereich von 25 bzw. 50 kDa nicht die leichte und schwere Kette der denaturierten Immunoglobuline zu detektieren, wurden z.T. spezielle Sekundäntikörper verwendet. Diese erkennen nur die nativen IgGs, die an die Membran gebunden sind. Für IP und Immunoblot mit anti-rabbit-Primäntikörpern wurde als Sekundär-Antikörper HRP-gekoppeltes ProteinA verwendet, für anti-mouse-Primäntikörper wurde als Sekundär-Antikörper mouse true-blot (eBioscience) verwendet.

### **3.2.4.13 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Proteinen**

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden zunächst Zellen auf Glasplättchen ausgesät und diese am nächsten Tag 1 x mit PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton für 2 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Glasplättchen mit PBS mit 3% BSA und den entsprechenden Primärantikörpern für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,05% Triton-X-100 wurden die Glasplättchen mit PBS mit 3% BSA und den entsprechenden Sekundärantikörpern für 45-60 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und DAPI-Färbelösung (1:40000 Verdünnung in PBS) für 20 Sekunden zugegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,05% Triton-X-100 wurden die Glasplättchen mit Fluoroprep (Biomérieux) eingedeckelt und auf Objektträgern fixiert. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert M200 Mikroskop gemacht.

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

Michael Winkler (Universität Kiel) führte in Kollaboration zu dieser Arbeit einen Yeast-2-Hybrid Screen durch (das System wurde im Detail unter Durfee, 1993 beschrieben). Hierzu wurde ein Fusionsprotein von 31E8<sup>E2C</sup> und dem C-terminal fusionierten Gal4 Hefe-Transkriptionsfaktor hergestellt und dann der Fusionsproteinkodierende Vektor pGBKT7-31E8<sup>E2C</sup> in den Hefestamm Y153 eingebracht. Die in Trp- wachsenden Hefen wurden mit einem weiteren Expressionsplasmid transformiert, der neben einer humanen Lymphozyten cDNA Genbank auch das LEU2 Gen enthielt. Die

Hefeklone, die beide Proteine exprimierten (die auf Trp-/Leu- Medien anwachsen), wurden mit 25mM 3-Aminotriazol selektioniert.

Von Michael Winkler wurden im Primärscreen 73 Hefeklone identifiziert und an uns übergeben. Aus diesen Hefeklonen wurde das die cDNA-Sequenz enthaltende Expressionsplasmid gewonnen und in ultrakompetente E. coli transformiert. Mittels Qiagen Mini-Präp Kit wurde das Plasmid gewonnen, mit Restriktionsenzymen eine Testspaltung durchgeführt und die Sequenz der cDNA bestimmt.

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

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der E8<sup>E2C</sup>-Proteine verschiedener Hochrisiko-HPV-Typen

#### 4.1.1 Die E8-spezifische Repressionsaktivität ist unter den E8<sup>E2C</sup> Proteinen verschiedener Hochrisiko-Papillomviren konserviert

Bisher wurden E8<sup>E2C</sup>-Transkripte für HPV1, HPV11, HPV16, HPV31 und 33 beschrieben (Rotenberg, Chiang et al. 1989; Doorbar, Parton et al. 1990; Chiang, Broker et al. 1991; Snijders, van den Brule et al. 1992; Stubenrauch, Hummel et al. 2000). Dies ließ vermuten, dass möglicherweise alle HPV derartige Transkripte exprimieren. Da bisher nur detaillierte Untersuchungen am 31 E8<sup>E2C</sup> Protein durchgeführt wurden, sollten zusätzlich weitere E8<sup>E2C</sup> Proteine von den prävalentesten Hochrisiko-HPV-Typen 16 und 18 kloniert werden und mit dem 31 E8<sup>E2C</sup> Protein verglichen werden. Die Transkripte von HPV16 und 31 E8<sup>E2C</sup> enthalten einen offenen Leserahmen mit einem einzelnen ATG-Startkodon (HPV16: nt.1264, HPV31: nt.1259 des HPV-Genoms), benutzen eine Spleissdonor-Stelle (HPV16: nt. 1301, HPV31: nt. 1296) im E1 ORF und werden an eine Spleissakzeptor-Stelle im E2 ORF (HPV 16: nt. 3356, HPV 31: nt. 3295) gespleisst (Doorbar, Parton et al. 1990; Stubenrauch, Hummel et al. 2000) (Abb.7). Eine Sequenzanalyse des HPV18 Genoms ergab, dass ein potentieller E8 Leserahmen zwischen nt. 1323-1357 lokalisiert ist und in einem Spleissdonorsignal (AG\_GT) endet.

Um zu untersuchen, ob entsprechende Transkripte in Zellen mit replizierenden HPV18 Genomen (5-18) vorhanden sind, wurde eine RT-PCR mit einem Primer an nt.1288 oberhalb des 18E8 Gens und einem

Primer am Ende des E2 Leserahmens durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels RT-PCR das beschriebene 16E8<sup>E2C</sup> Transkript aus Zellen mit replizierenden HPV16 Genomen (W12) amplifiziert (Doorbar, Parton et al. 1990). In beiden Fällen konnte ein PCR Produkt von ca. 600 nt. nachgewiesen werden. Klonierung und Sequenzierung der Amplifikate ergab, dass die HPV18E8<sup>E2C</sup> cDNA aus einem Exon von nt.1288-1357 und einem Exon von nt. 3434 to 3996 besteht (Abb. 7). Die Translation dieser RNA zeigt ein Fusionsprotein, welches aus 11 Aminosäureresten von 18E8 und den Aminosäureresten 206 bis 365 von 18E2 besteht. 18E8<sup>E2C</sup> unterscheidet sich geringfügig im E8-Anteil von HPV16 und 31E8<sup>E2C</sup> (Abb.7). Besonders auffällig ist der große Anteil basischer Aminosäuren (Lysin und Arginin). Das Alanin an Position 2, das Arginin an Position 10 sowie das in HPV31 funktionell wichtige KWK-Motiv, ist im E8-Anteil unter den HPV-Typen 16, 18 und 31 sehr gut konserviert (Abb. 7).

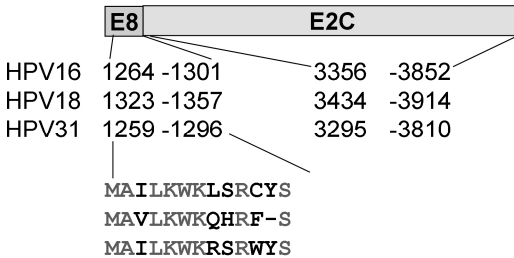


Abb. 7: Die E8<sup>E2C</sup>-Proteine von HPV16, 18 und 31 sind stark konserviert. Die Nukleotid-Positionen im Genom sind angegeben. Alle drei Proteine besitzen die funktionell wichtigen Aminosäuren K5W6K7 im N-Terminus.

Zur funktionellen Analyse wurden Kotransfektionsexperimente mit Expressionsvektoren für die verschiedenen E8<sup>E2C</sup> Proteine und unterschiedlichen Luziferasereportervektoren in HeLa Zellen durchgeführt. Im Plasmid pGL31URR luc wird das Luziferase-Gen vom HPV31 E6/E7 Promoter (nt. 7067-7912/1-107) exprimiert. Plasmid pGL31URR BS2, 3, 4 mt ist identisch mit pGL31URR luc, jedoch sind E2BS2, 3 und 4 durch Mutagenese inaktiviert (Stubenrauch, Zobel et al. 2001). Im Konstrukt pGL18 URR luc wird das Luziferase-Gen vom HPV18 E6/E7 Promoter (nt. 7127-7857/1-105) exprimiert und ist somit vergleichbar mit pGL31URR luc. Weiterhin wurde das Plasmid pC18 SP1 luc verwendet, in welchem Luziferase unter der Kontrolle eines minimalen Adenovirus major late Promotor steht und das zusätzlich vier E2BS oberhalb des Promotors enthält (Stubenrauch, Zobel et al. 2001). Die Expression der unterschiedlichen E8<sup>E2C</sup> Proteine reprimierte die Aktivität aller verwendeten Reporter (Abb. 8). Die Kotransfektion von 16E8<sup>E2C</sup> und 18E8<sup>E2C</sup> resultierte in einer Repression der Basalaktivität von P97 bzw. P105 in Anwesenheit aller vier E2BS (pGL31URR luc bzw. pGL18 URR luc) in vergleichbarer Stärke wie 31E8<sup>E2C</sup>. In einigen Fällen war die Repression sogar stärker (HeLa, pGL31URRluc 0,007-fach für HPV16 bzw. 0,021-fach für HPV18 wie in Abb. 8 dargestellt). Auch die Basalaktivität des Reporterplasmids pC18 SP1 luc ließ sich durch 16, 18 und 31E8<sup>E2C</sup> gleichermaßen reprimieren. Die Basalaktivität des Reporterplasmids pGL31URR BS2, 3,4 mt, mit welchem die E8-abhängige Fernrepressionsaktivität gemessen werden kann, wurde von 16 und 31 E8<sup>E2C</sup> in vergleichbarer Weise reprimiert (0,086- bzw. 0,081-fach). Es wurde auch durch 18E8<sup>E2C</sup> reprimiert, allerdings war die Repression ca. 4-mal schlechter (0,33-fach) als durch 16 oder 31E8<sup>E2C</sup>.

Zusammengenommen lässt dies darauf schließen, dass die E8<sup>Δ</sup>E2C-Proteine der Hochrisiko-HPV-Typen 16, 18 und 31 den selben Effekt auf HPV-Promotoren besitzen.

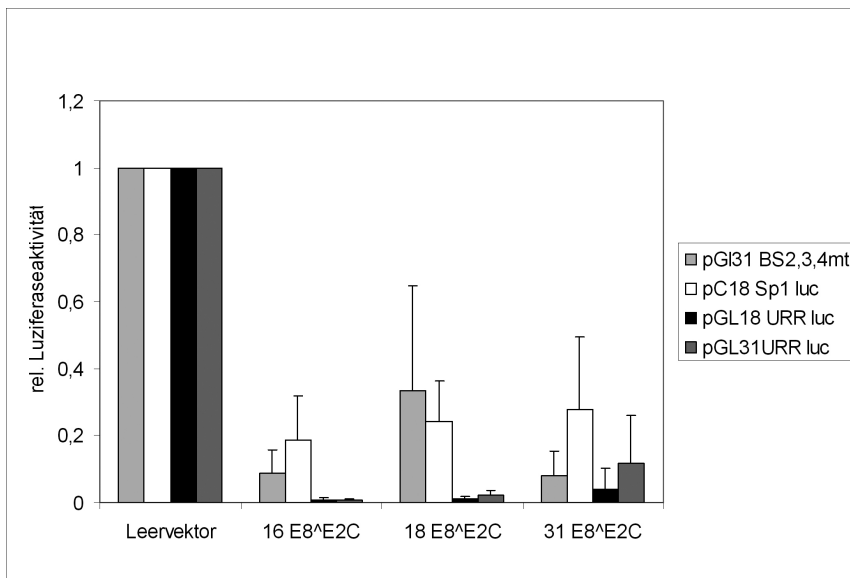


Abb. 8: Luziferasereporteranalyse in HeLa-Zellen: Jeweils 50 ng der unterschiedlichen Reporterplasmide wurden mit je 10 ng Expressionsplasmid des jeweiligen E8<sup>Δ</sup>E2C-Proteins bzw. des leeren Vektors kotransfiziert. Die Luziferaseaktivität in Leervektor-transfizierten Zellen wurde als 1 definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. Für jeden Reporter wurden mindestens 4 unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um zu untersuchen, ob für die Repression der E8-Anteil notwendig ist, wurde das KWK-Motiv von 16 und 18 E8<sup>Δ</sup>E2C mutiert und dann in Kotransfektionsexperimenten mit den Reporterplasmiden pC18 SP1 luc und p18URR-luc in HeLa Zellen untersucht (Abb. 9).



Die Expression der KWK-Mutanten führte in allen Fällen auf beiden untersuchten Reporterkonstrukten zu einer verminderten Repression des Reporters gegenüber dem Wildtyp-Protein. Dieser Effekt fällt bei HPV18 jedoch schwächer aus als bei HPV16 oder 31. Auf dem E2-abhängigen pC18 SP1 luc-Reporterplasmid wurde bei HPV18 ein 5-facher Unterschied in der Repression gegenüber dem Wildtyp beobachtet, bei HPV16 ein 26-facher bzw. bei HPV31 ein 17-facher Unterschied. Das pGL18 URR luc-Reporterplasmid zeigte bei HPV16 einen 12-fachen Unterschied der Repression gegenüber dem Wildtyp, wohingegen bei HPV31 nur ein 2,6-facher bzw. bei HPV18 ein 3-facher Unterschied gemessen wurde. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Mutation der Aminosäuren KWK im E8-Anteil bei HPV16, 18 und 31 E8<sup>E2C</sup> zu einem Verlust der Repressionsaktivität gegenüber dem Wildtyp-Protein führt. Dieser Verlust ist bei 18E8<sup>E2C</sup> KWK auf dem pC18 SP1 luc-Reporterplasmid nicht so ausgeprägt wie bei 16 und 31 E8<sup>E2C</sup> KWK. Ein Grund dafür könnte die gering abweichende Aminosäuresequenz im E8-Anteil von HPV18 sein (Abb. 7). Allerdings bestand auf dem pGL18 URR luc-Reporterplasmid in der Repressionsaktivität zwischen 18 und 31E8<sup>E2C</sup> KWK kein großer Unterschied gegenüber dem Wildtyp-Protein.

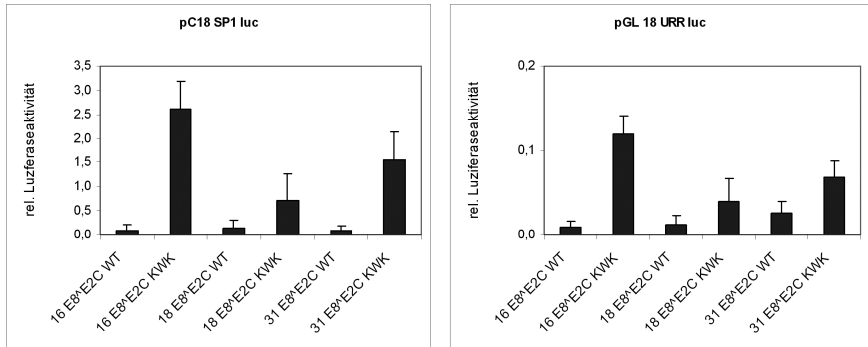
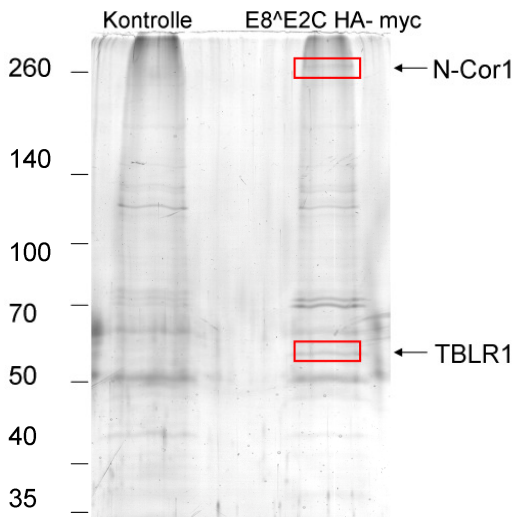


Abb. 9: Luziferasereporteranalyse in HeLa-Zellen: Es wurden jeweils 50 ng Reporterplasmid mit je 10 ng Expressionsplasmid des jeweiligen E8<sup>E2C</sup>-Proteins mit der dazugehörigen KWK-Mutante bzw. des leeren Vektors kotransfiziert. Die Luziferaseaktivität in Leervektor-transfizierten Zellen wurde als 1 definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. Es wurden für jedes Reporterplasmid mindestens 3 unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 4.1.2 HPV31 E8<sup>E2C</sup> interagiert mit dem N-CoR-Komplex

Als bekannter Interaktionspartner für HPV31 E8<sup>E2C</sup> wurde bisher neben dem Ko-Repressor Trim28 unter anderem die Histone-Deacetylase3 (HDAC3) identifiziert (Ammermann, Bruckner et al. 2008). Diese Interaktion ist auf den E8-Anteil zurückzuführen und findet nicht statt, wenn das funktionelle KWK-Motiv mutiert ist. Um weitere Interaktionspartner zu identifizieren, wurde das 31E8<sup>E2C</sup> Protein quantitativ immunoprecipitiert. Hierzu wurde eine 293T Zelllinie generiert, die stabil 31E8<sup>E2C</sup>-HA-myc exprimiert. Als Kontrolle wurden 293T Zellen benutzt, die den leeren pIRES-puro Vektor tragen. Zellextrakte von je 30 konfluenten 150 mm Schalen wurden zuerst mit einem anti-HA Antikörper präzipitiert, gebundene Komplexe mit HA-

Peptid eluiert und dann mit anti-myc Antikörper nochmals präzipitiert. Eluierte Proteine wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 10). Interaktoren, welche spezifisch für 31E8<sup>Δ</sup>E2C-HA-myc waren wurden dann massenspektrometrisch analysiert.



Sequenz	Länge	Protein Name	Mascot score
GTAGAIQ EGSITR	13	cDNA FLJ50924, highly similar to Nuclear receptor corepressor 1; <b>Nuclear receptor corepressor 1</b>	48.72
LWDVDR	6	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1; Transducin beta-like 1X-related protein 1; Nuclear receptor corepressor/HDAC3 complex subunit <b>TBLR1; TBL1-related protein 1</b> ; cDNA FLJ55712, highly similar to F-box-like/WD repeat protein TBL1XR1	15.24

Abb. 10: (oben) Silbergefärbtes Proteingel nach Zweischritt-Koimmunopräzipitation mit HA- und myc-Antikörpern aus 293T-Zellen, die stabil 31E8<sup>Δ</sup>E2C-HA-myc enthalten. Als Kontrolle wurden Zellen benutzt, die den leeren Vektor beinhalten. Auf der linken Seite ist ein Größenstandard in kDa angegeben. Die rot markierten Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch durch das Proteom-Center Tübingen analysiert. Die Ergebnisse sind unten dargestellt. Die Peptidsequenzen und die entsprechenden Proteine der massenspektrometrischen Analyse der im oberen Bild markierten Banden durch das Proteom-Center Tübingen.

In den Banden wurden u.a. spezifische Peptidsequenzen für die zellulären Proteine N-CoR1 und TBLR1 identifiziert (Abb. 10). Beide Proteine sind zusammen mit HDAC3 Bestandteile des so genannten N-CoR „Core“-Komplexes, welcher als Ko-Repressor für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren dient (Glass and Rosenfeld 2000). Zur Validierung der Interaktoren wurden Extrakte aus stabilen Zelllinien, welche 31E8<sup>E2C</sup>-HA oder 31E8<sup>E2C</sup>-KWK-HA exprimieren, mit einem anti-HA Antikörper präzipitiert (Abb.11). Die Immunopräzipitate wurden dann in Immunoblotanalysen auf die Anwesenheit von N-CoR1, HDAC3 und TBLR1 untersucht. Dies ergab, dass N-CoR1, HDAC3 und TBLR1 nur aus Zellen mit dem Wildtyp 31 E8<sup>E2C</sup>-HA präzipitiert wurden, aber nicht von der KWK-Mutante oder Leervektor-Kontrollzellen. Zusammen mit den Ergebnissen, die HDAC3 und N-CoR1 als Interaktionspartner identifiziert haben (Powell, Smith et al. ; Ammermann, Bruckner et al. 2008), lässt dies den Schluss zu, das 31E8<sup>E2C</sup> über den E8-Anteil den N-CoR1/HDAC3/TBLR1 Komplex rekrutiert und so die Transkription inhibiert.

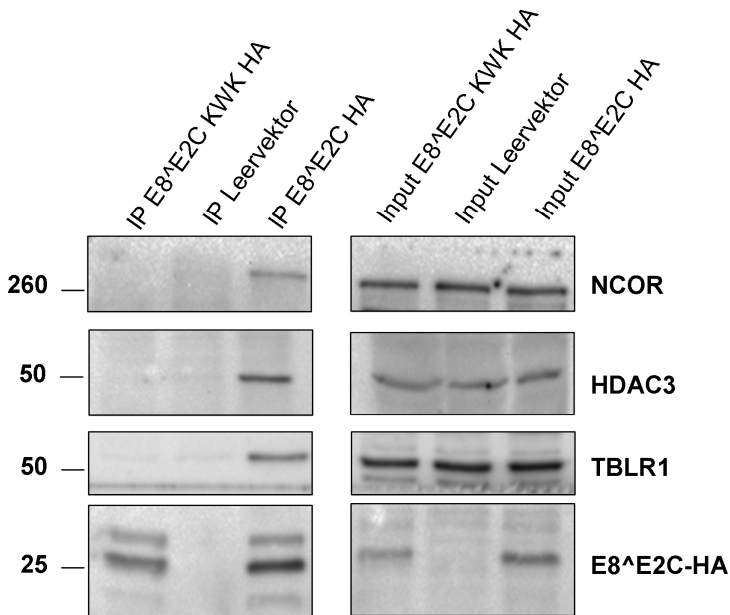


Abb. 11: HPV31E8<sup>Δ</sup>E2C interagiert mit Komponenten des N-CoR-Komplexes, und diese Interaktion ist abhängig von einem intaktem KWK-Motiv. Aus Zellen, die stabil 31E8<sup>Δ</sup>E2C sowie die entsprechende KWK-Mutante exprimieren, wurden Gesamtzelletrakte hergestellt und eine Einschnitt-Koimmunopräzipitation mit Magnet Beads, an die ein Antikörper gegen HA gekoppelt war, durchgeführt. Die Anwesenheit von N-CoR, HDAC3, TBLR1 und HA im Zellysat (Input) und in den Präzipitaten (IP) wurde durch Immunoblotanalysen mit spezifischen Antikörpern überprüft. Auf der linken Seite ist ein Größenstandard in kDa angegeben.

### **4.1.3 HPV16, 18 und 31 E8<sup>E2C</sup> interagieren mit HDAC3**

Um herauszufinden, ob auch HPV16 und 18 E8<sup>E2C</sup> mit N-CoR1 Komponenten interagieren, wurden HA-Epitope in HPV16 und 18 E8<sup>E2C</sup> wt und KWK mit Proteine in der Hinge-Region an vergleichbaren Positionen wie in 31E8<sup>E2C</sup> in den entsprechenden Expressionsvektoren eingefügt. 293T Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren transfiziert und die Zellextrakte mit HA-Antikörpergekoppelten Magnetbeads präzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden dann auf die Anwesenheit von HDAC3 und E8<sup>E2C</sup> in Immunoblotanalysen überprüft (Abb. 12). Es ist deutlich zu sehen, dass auch HPV 16 und 18E8<sup>E2C</sup> mit HDAC3 interagieren. Des Weiteren ist zu sehen, dass nur die Wildtyp-Proteine mit HDAC3 interagieren, nicht aber die entsprechenden KWK-Mutanten (Abb. 12, Spur 2-7). Weiterhin war zu beobachten, dass die Mutation des KWK-Motivs bei HPV16, 18 und 31 zu erhöhten E8<sup>E2C</sup> Mengen führt (Abb. 12).

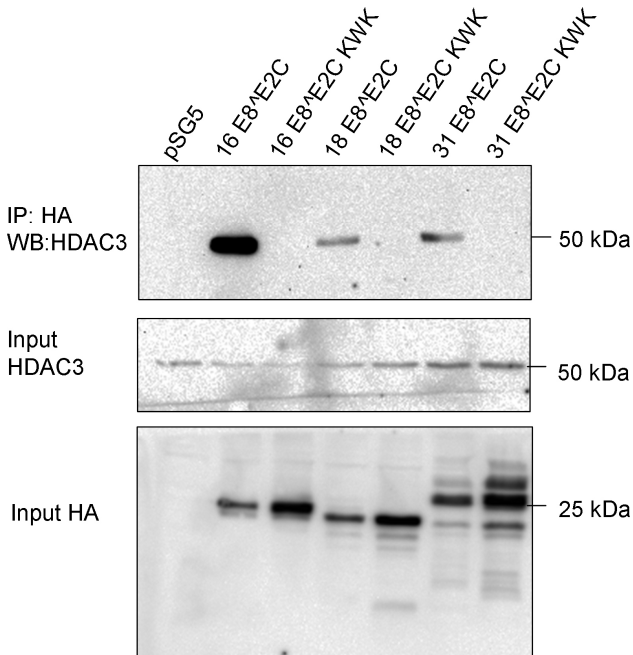


Abb. 12: Die Wildtyp-Proteine von HPV16, 18 und 31 interagieren mit HDAC3, und diese Interaktion ist abhängig von einem intakten KWK-Motiv. 293T Zellen (je 1x 150mm) wurden mit jeweils 3 µg DNA transfiziert, als Kontrolle diente der leere Vektor (pSG5). Nach 48h wurden die Zellen geerntet, Gesamtzelletrakte hergestellt und eine Ein-Schritt-Immunopräzipitation mit Magnet Beads, an die ein Antikörper gegen HA gekoppelt war, durchgeführt. Die Anwesenheit von HDAC3 und HA im Zellysate (Input) und in den Präzipitaten (IP) wurde durch Immunoblotanalysen überprüft. Auf der rechten Seite ist ein Größenstandard in kDa angegeben.

#### **4.1.4 Die E8<sup>E2C</sup>-Proteine von HPV16, 18 und 31 blockieren das Zellwachstum von HeLa-Zellen**

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass HPV31 E8<sup>E2C</sup> in der Lage ist, das Zellwachstum von HeLa-Zellen zu verhindern, indem es an den integrierten HPV18 E6/E7-Promoter bindet und so die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 hemmt (Stubenrauch, Straub et al. 2007). Um zu untersuchen, ob die E8<sup>E2C</sup> Proteine von HPV16 und 18 ebenfalls zu einem Wachstumsarrest in HeLa-Zellen führen, wurden HeLa-Zellen mit 16, 18 oder 31E8<sup>E2C</sup> exprimierenden Plasmiden und einem Puromycin-Resistenz Plasmid (pPur) in einem 5:1 Verhältnis kotransfiziert. Als Kontrolle wurde das leere Expressionsplasmid (pSG5) verwendet. Die Zellen wurden in puromycinhaltigem Medium für 12 Tage kultiviert und anschließend wurden die Zellen gewaschen, gefärbt und die Kolonien gezählt. Abbildung 13 zeigt die durchschnittliche Anzahl der gezählten Kolonien aus drei unabhängigen Experimenten im Verhältnis zum leeren Vektor. Die E8<sup>E2C</sup> Proteine von HPV 16, 18 und 31 zeigten alle eine verminderte Anzahl an Kolonien verglichen zur Kontrolle. Bei HPV16 und 18E8<sup>E2C</sup> waren reproduzierbar sogar weniger Kolonien vorhanden als bei 31E8<sup>E2C</sup>. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass alle getesteten E8<sup>E2C</sup>-Proteine den Wachstumsarrest hervorrufen können. Nach ca. 10 Tagen konnte bei den verbliebenen Zellen deutliche morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet werden (Abb. 14). Ähnliche Veränderungen waren in der Anwesenheit von 31 E2 zu beobachten, was nahelegt, dass diese eine Konsequenz der E6/E7 Repression sind.



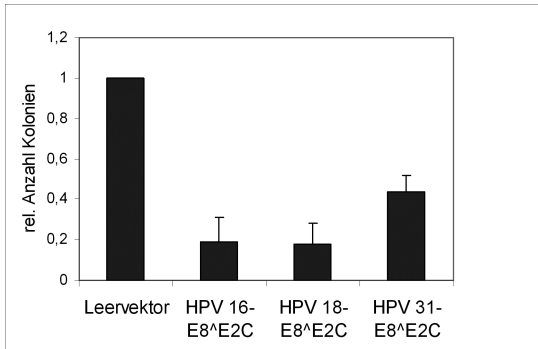
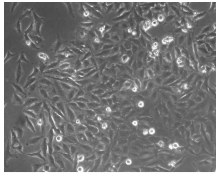
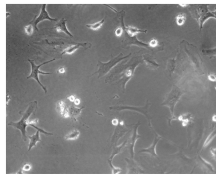


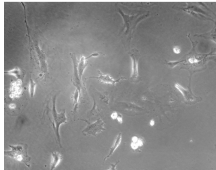
Abb. 13: Die Koloniebildung in HeLa-Zellen wird durch HPV16, 18 und 31 E8^E2C vermindert. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die E8^E2C-Proteine von HPV16, 18 und 31 sowie jeweils einem Puromycin-Resistenz gebenden Plasmid im Verhältnis 5:1 kotransfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor ohne E8^E2C. Nach Selektion der Zellen für 12 Tage mit 0,4µg/ml Puromycin wurden die Zellen gewaschen, gefärbt und die Kolonien gezählt. Die Anzahl der Kolonien in Anwesenheit des Leervektors wurde 1 gesetzt und die Anzahl Kolonien mit den jeweiligen Expressionsplasmiden darauf bezogen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind im Schaubild aufgetragen.



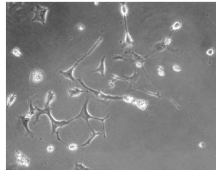
Leervektor



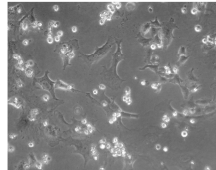
HPV 16 E8^E2C



HPV 18 E8^E2C



HPV 31 E8^E2C



HPV 31 E2

Abb. 14: Die Transfektion von HPV16, 18 und 31 E8^E2C induziert morphologische Veränderungen in HeLa-Zellen.  $3 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden in 60 mm-Schalen ausgesät und am folgenden Tag mit  $1 \mu\text{g}$  der entsprechenden Expressionsvektoren sowie einem Puromycinresistenz Plasmid im Verhältnis 5:1 kotransfiziert und für 10 Tage unter Puromycinselektion kultiviert. Als Positivkontrolle wurde HPV31 E2 mitgeführt, als Negativkontrolle diente der leere Vektor. Die Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert M200 Mikroskop im Phasenkontrast gemacht.

### 4.1.5 Die E8^E2C-Proteine von HPV 16, 18 und 31 induzieren die Expression von p53 und p21

Die Reduktion der Transkriptmenge von E6 und E7 nach Expression von 31E8^E2C führt zu einem Anstieg von p53 und p21 in der Zelle (Stubenrauch, Straub et al. 2007). Der Grund dafür ist, dass die Genprodukte von p53 und dem p53 Zielgen *CDKN1A/p21* durch die Papillomvirusproteine E6 und E7 der Degradation zugeführt werden (Howie, Katzenellenbogen et al. 2009; McLaughlin-Drubin and Munger

2009). Daher wurde untersucht, ob diese Proteine ebenfalls durch die Expression von E8<sup>^</sup>E2C von HPV16 und 18 induziert werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren für die HA-markierten E8<sup>^</sup>E2C-Proteine transfiziert und mittels Immunoblot die Proteinmenge von p53 und p21 analysiert. Wie in Abb. 15 gezeigt, erhöht die Expression von HPV 16, 18 und 31 E8<sup>^</sup>E2C-HA die p53 und p21 Proteinlevel gleichermaßen.

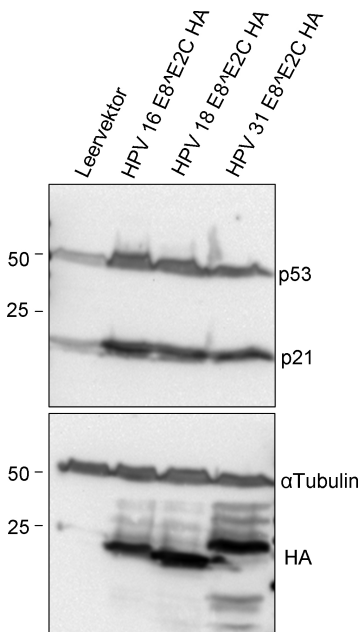


Abb. 15: Die verschiedenen E8<sup>^</sup>E2C-Proteine von HPV16, 18 und 31 induzieren p21 und p53.  $3 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden in 60 mm-Schalen ausgesät und am folgenden Tag mit je  $1 \mu\text{g}$  der entsprechenden Expressionsvektoren oder dem Leervektor als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet in SDS-Ladepuffer (Roti-load) lysiert und im Immunoblot auf die Anwesenheit von p21 und p53 überprüft (oben). Die Expression der transfizierten HA-markierten E8<sup>^</sup>E2C-Proteine wurde mittels Immunoblot auf HA überprüft (Abb. unten) Auf der linken Seite ist ein Größenstandard in kDa zu sehen.

Dies legt nahe, dass die beobachtete Induktion von p53 und *CDKN1A/p21* nach Überexpression der E8<sup>^</sup>E2C Proteine von HPV 16, 18 und 31 in HeLa auf die Repression des frühen Promotors und der damit verminderten E6/E7-Expression zurückzuführen ist.

#### **4.1.6 Die 31E8 Domäne kann durch eine zelluläre KRAB-Domäne funktionell ersetzt werden**

Die Repression des E6/E7 Promotors in HeLa Zellen (und somit die Wachstumsinhibition) durch Produkte des E2 Gens erfordert zusätzlich zum E2C Anteil die E2TA oder die E8 Domäne (Dowhanick, McBride et al. 1995; Hwang, Naeger et al. 1996; Desaintes, Demeret et al. 1997; Naeger, Goodwin et al. 1999; Wu, Goodwin et al. 2000; Stubenrauch, Straub et al. 2007).

Fusionsproteine zwischen E2C und zellulären (Spi-E2C) oder viralen (VP16-E2C) Transkriptionsaktivatordomänen können den HPV18 E6/E7 Promotor nicht inhibieren und somit auch keinen Wachstumsarrest auslösen (Dowhanick, McBride et al. 1995; Goodwin and DiMaio 2000; Nishimura, Ono et al. 2000).

Dies könnte bedeuten, dass nur die viralen Regulatorproteine den E6/E7 Promotor inhibieren können. Um zu testen, ob auch zelluläre Repressordomänen die viralen Domänen ersetzen können, wurde der E8-Anteil gegen die KRAB Repressionsdomäne des KOX-1-Proteins ausgetauscht (Abb. 16). Die KRAB Domäne (Krueppel-associated box) ist eine Repressionsdomäne, die nach Fusion mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne einen DNA-bindungsabhängigen, starken transkriptionellen Repressor darstellt (Margolin, Friedman et al. 1994). Die KRAB Domäne wirkt unabhängig von HDACs (Lorenz, Koczan et al. 2001; Ammermann, Bruckner et al. 2008), benutzt das TRIM28 und das HP1-beta Protein als transkriptionelle Ko-Repressoren (Groner, Meylan et al. 2010) und unterscheidet sich somit deutlich von 31E8<sup>E2C</sup> und E2 (Powell, Smith et al. ; Smith, White et al. ; Ammermann, Bruckner et al. 2008).

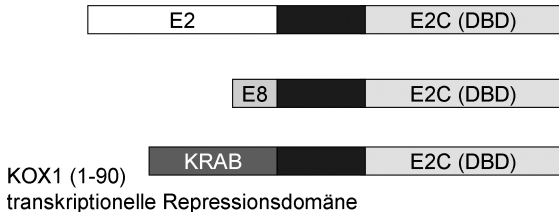


Abb. 16: Schematische Darstellung der 31E2-Proteine sowie des hergestellten künstlichen Repressorproteins KRAB-E2C. Die Hinge-Region ist schwarz, der E2C-Terminus grau unterlegt. Es wurde die KRAB-Domäne (Aminosäure 1-90) des zellulären KOX1-Repressorproteins an die Hinge-Region und den E2C-Teil von 31E8<sup>Δ</sup>E2C fusioniert.

Um die transkriptionellen Repressorfunktionen des KRAB-E2C Proteins zu untersuchen, wurden Luziferase-Reporteranalysen mit den Konstrukten pC18 SP1 luc, pGL31URR luc, pGL31URR BS 2, 3 4 mt und pGL18 URR luc durchgeführt. Das KRAB-E2C-Protein ist, wie 31E8<sup>Δ</sup>E2C auch, in der Lage alle getesteten Promotoren zu reprimieren (Abb. 17). Dieser Effekt ist zum Teil sogar stärker als die durch 31E8<sup>Δ</sup>E2C ausgeübte Repression. Während die Reporterkonstrukte pGL18 URR luc und pGL31 URR luc ca. 9 fach besser reprimiert werden als durch 31E8<sup>Δ</sup>E2C, ist auf den Plasmiden pGL31URR BS 2, 3 4 mt und pC18 Sp1 luc die beobachtete Repression nur ~2 fach stärker als die von 31E8<sup>Δ</sup>E2C (Abb. 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass die E8-Repressionsdomäne funktionell durch eine zelluläre Repressionsdomäne ersetzt werden kann.

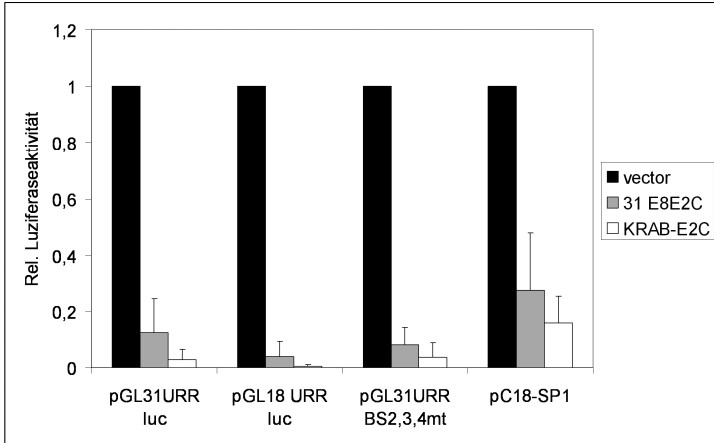


Abb. 17: Luziferasereporteranalyse in HeLa-Zellen: Jeweils 50 ng Reporterplasmid sowie je 10 ng Expressionsplasmid von 31E8<sup>E2C</sup>, KRAB-E2C oder des leeren Vektors wurden kotransfiziert und nach 48 Stunden gemessen. Die Luziferaseaktivität in Leervektor-transfizierten Zellen wurde als 1 definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. Es wurden für jedes Reporterplasmid mindestens 3 unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um zu untersuchen, ob KRAB-E2C das Wachstum von HeLa-Zellen inhibieren kann, wurden Koloniebildungsversuche wie oben beschrieben durchgeführt. In Abb. 18 ist die durchschnittliche Anzahl an Kolonien aus 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Das KRAB-E2C-Protein zeigt eine verminderte Anzahl an Kolonien verglichen mit dem leeren Vektor (ca. 40%), dies ist vergleichbar zu 31E8<sup>E2C</sup> (ebenfalls ca. 40%). Das HA-markierte KRAB-Protein ohne E2C-Anteil zeigte keine Reduktion in der Koloniezahl, was bestätigt, dass eine DNA-bindende Komponente für die Repression notwendig ist (Margolin, Friedman et al. 1994). Vergleichbar zu den HPV E8<sup>E2C</sup> Proteinen induzierte KRAB-E2C ähnliche morphologische Veränderungen der Zellen (Abb. 18).

Zusätzlich wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren für HA-markiertes 31E8<sup>E2C</sup>-Protein als Positivkontrolle, sowie HA-markiertes KRAB E2C transfiziert, und mittels Immunoblot die Proteinmenge von p53 und p21 analysiert. Wie bereits beschrieben führt die Reduktion von E6 und E7 nach Expression von 31E8<sup>E2C</sup> zu einem Anstieg von p53 und p21 in der Zelle (Stubenrauch, Straub et al. 2007). Wie in Abb. 18 gezeigt, erhöht die Expression von KRAB E2C HA und 31E8<sup>E2C</sup>-HA die p53 und p21 Proteinmenge gleichermaßen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Wachstumsarrest, der durch KRAB-E2C verursacht wird, ebenfalls durch Repression des E6/E7-Promotors vermittelt wird, und somit vergleichbar mit 16, 18 und 31E8<sup>E2C</sup> ist.

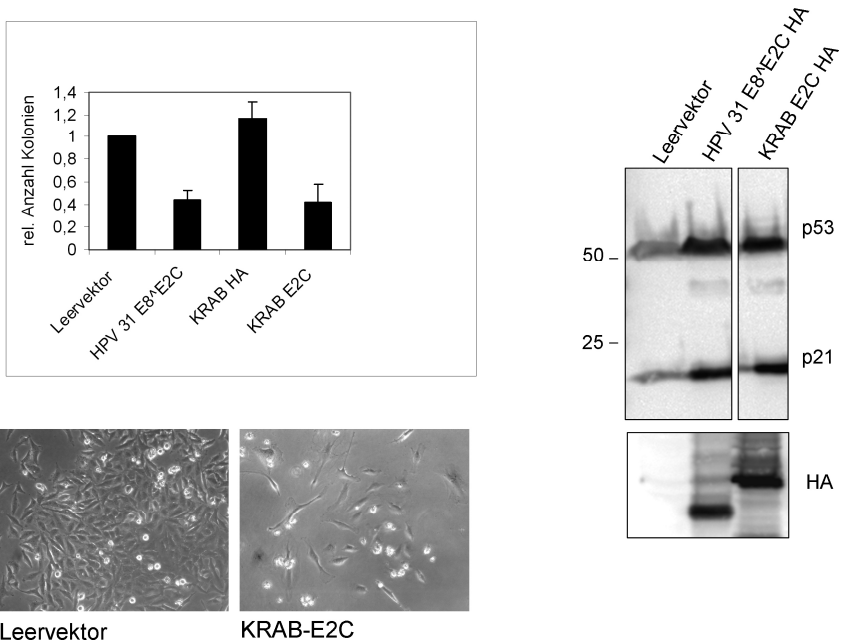


Abb. 18: (Abb. links oben) Die Koloniebildung in HeLa-Zellen wird durch KRAB-E2C vermindert. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für 31E8<sup>+</sup>E2C, KRAB-E2C, KRAB-HA, sowie jeweils einem Puromycinresistenz gebenden Plasmid im Verhältnis 5:1 transfiziert. Als Kontrolle diente der Leervektor. Nach Selektion der Zellen für 12 Tage mit 0,4µg/ml Puromycin wurden die Zellen gewaschen, gefärbt und die Kolonien gezählt. Der Die Anzahl der Kolonien in den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, wurde 1 gesetzt und jeweils der Quotient aus Leervektor und den jeweiligen Expressionsplasmiden gebildet. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind im Schaubild aufgetragen.

(Abb. links unten) Die Transfektion von KRAB-E2C induziert morphologische Veränderungen in HeLa-Zellen. Es wurden  $3 \times 10^5$  HeLa-Zellen in 60 mm-Schalen ausgesät und am folgenden Tag mit 1 µg des KRAB-E2C-Expressionsvektors sowie einem Puromycinresistenz gebenden Plasmid im Verhältnis 5:1 transfiziert und für 10 Tage unter Puromycinselektion kultiviert. Als Negativkontrolle diente der leere Vektor. (Abb. rechts) KRAB-E2C induziert p53 und p21 in vergleichbarer Menge wie 31E8<sup>+</sup>E2C.  $3 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden in 60 mm-Schalen ausgesät und am folgenden Tag mit je 1 µg Expressionsvektor für 31E8<sup>+</sup>E2C HA oder KRAB-E2C HA oder dem Leervektor als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet in SDS-Ladepuffer (Roti-load) lysiert und im Immunoblot auf die Anwesenheit von p21 und p53 überprüft (Abb oben links). Die Expression der transfizierten HA-markierten Proteine wurde mittels Immunoblot auf HA überprüft (Abb. links unten). Auf der linken Seite ist ein Größenstandard in kDa angegeben.



## 4.2 Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit CHD6

### 4.2.1 Der Aminoterminus von CHD6 interagiert mit dem C-Terminus von HPV31 E8<sup>E2C</sup>

Um weitere Faktoren aus der Wirtszelle zu identifizieren, die mit HPV31 E8<sup>E2C</sup> interagieren, wurde ein genetischer Yeast-two-Hybrid Screen in Zusammenarbeit mit M. Winkler (Universität Kiel) durchgeführt. Als Köder wurde das vollständige 31E8<sup>E2C</sup>-Protein fusioniert an den Hefe-Transaktivator Gal4 benutzt und damit eine cDNA Bank aus einer B-Zell-Lymphom-Zelllinie auf Interaktoren untersucht. Einer der so identifizierten Interaktoren war eine Teilsequenz des CHD6 Proteins (Aminosäuren 136-336), welches zur CHD-Proteinfamilie gehört. Zur Validierung der Interaktion *in vitro*, wurden aus durch HPV18 immortalisierten humanen Keratinozyten zwei Teilsequenzen von CHD6 (AS 1-474 und 1-559) kloniert, die den im Yeast-two-Hybrid Assay identifizierten Bereich beinhalteten (Abb. 19).

Bakteriell exprimierte E8<sup>E2C</sup> Fusionsproteine wurden aufgereinigt und mit *in vitro* translatierten radioaktiv markierten CHD6<sub>1-474</sub> und CHD6<sub>1-559</sub> inkubiert. Wie in Abb. 20 zu sehen ist, bindet nur das MBP-31E8<sup>E2C</sup> Fusionsprotein, aber nicht das als Negativkontrolle mitgeführte MBP, sowohl an das CHD6<sub>1-474</sub>, als auch an das CHD6<sub>1-559</sub>-Fragment, was die Bindung von 31E8<sup>E2C</sup> an CHD6 aus dem Yeast-two-Hybrid Assay bestätigt.

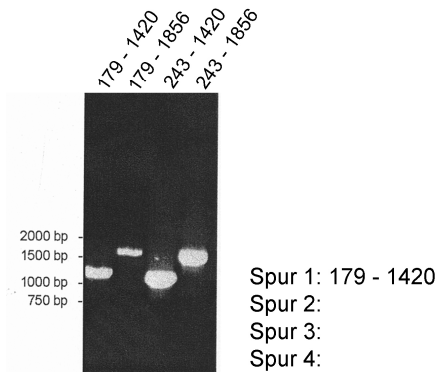
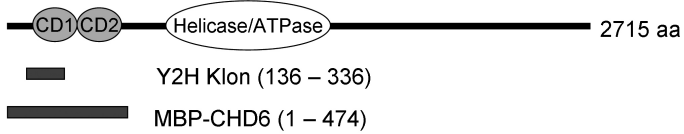


Abb. 19: N-terminale Fragmente von CHD6 wurden aus HPV18 positiven Zellen kloniert. Die vorhergesagte Struktur von CHD6 mit den funktionellen Domänen ist oben dargestellt (CD=Chromodomäne).

Das im Yeast-two-Hybrid-Assay identifizierte Fragment und das für die *in vitro* Interaktionen verwendete Fragment sind mit den entsprechenden Aminoäsurepositionen eingezeichnet.

Unten: Gelelektrophoretische Analyse von CHD6 spezifischen RT-PCR Produkte. Angegeben sind Nukleotid-Positionen bezogen auf die CHD6 Referenz RNA.

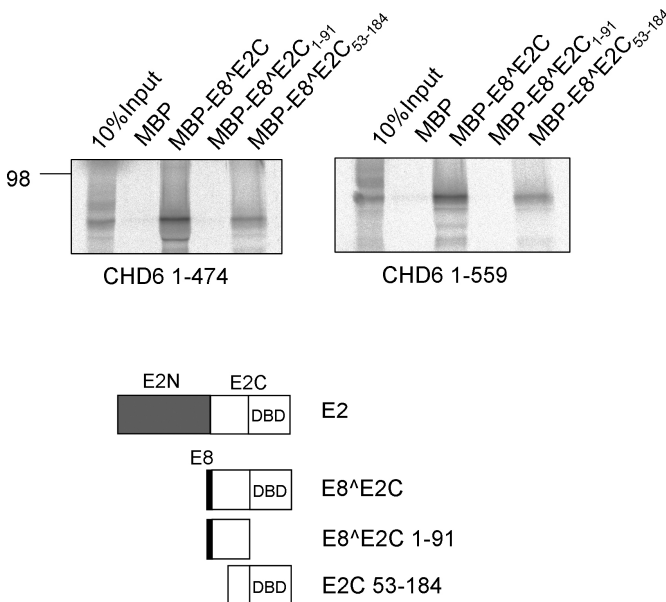


Abb. 20: Der C-Terminus von 31E8^E2C interagiert mit dem N-Terminus von CHD6

Gleiche Mengen von MBP als Kontrolle (Spur 2), MBP-31E8^E2C (Spur 3), MBP-31E8<sub>1-91</sub> (Spur 4) oder MBP-31E2C<sub>53-184</sub> (Spur 5) Fusionsproteinen wurden mit <sup>35</sup>S markierten, *in vitro* translatierten CHD6-Fragmenten inkubiert. Die entsprechenden MBP Fusionsproteine sind schematisch unten dargestellt. Auf der linken Seite ist ein Größenstandard in kDa angegeben. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Phosphoimaging dargestellt. In Spur 1 sind 10% der *in vitro* translatierten und für die Bindungsreaktion verwendeten Proteine gezeigt.

Um den interagierenden Bereich in 31E8^E2C weiter einzugrenzen, wurden Verkürzungen des MBP- 31E8^E2C Fusionsproteins hergestellt, die entweder nur den vorderen (MBP-31E8^E2C<sub>1-91</sub>) oder den hinteren Bereich (MBP-31E2C<sub>53-184</sub>) des 31E8^E2C-Proteins enthalten. Dadurch

konnte der interagierende Bereich auf den C-Terminus eingegrenzt werden, da der vordere Teil des 31E8<sup>E2C</sup>-Proteins keine Interaktion mit CHD6<sub>1-474</sub> zeigte (Abb. 20). Da E8<sup>E2C</sup> und E2 denselben C-Terminus besitzen, ließ dies vermuten, dass auch E2 mit CHD6 interagiert. Um dies zu untersuchen, wurde E2 *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert und mit einem MBP CHD6<sub>1-474</sub> Fusionsprotein inkubiert. Wie in Abb. 21 dargestellt interagiert 31E2 nur mit MBP-CHD6<sub>1-474</sub> jedoch nicht mit MBP.

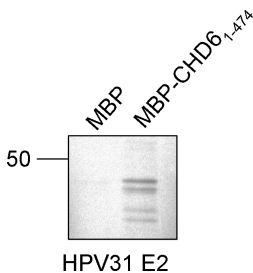


Abb. 21: E2 interagiert mit dem N-Terminus von CHD6  
Gleiche Mengen von MBP als Kontrolle (Spur 1) oder dem MBP-CHD6 1-474 Fusionsprotein (Spur 2), wurde mit <sup>35</sup>S markiertem, *in vitro* translatiertem HPV31 E2 Protein inkubiert. Bei den tiefer laufenden Banden handelt es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte. Auf der linken Seite ist ein Größenstandard in kDa angegeben. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Phosphoimaging dargestellt. Links: Größenmarker in kDa.

Dies lässt den Schluss zu, dass 31E2 und 31E8<sup>E2C</sup> über den C-Terminus mit CHD6 interagieren.

#### 4.2.2 Die Bindung von E8<sup>A</sup>E2C an CHD6 ist unter verschiedenen Hochrisiko-HPV-Typen konserviert.

Um herauszufinden, ob diese Interaktion unter verschiedenen Hochrisiko-HPV-Typen konserviert ist, wurden zusätzlich die E8<sup>A</sup>E2C-Proteine von HPV16 und 18 auf ihre Interaktion mit CHD6 überprüft. HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für 16E8<sup>A</sup>E2C-HA, 18E8<sup>A</sup>E2C-HA oder 31E8<sup>A</sup>E2C-HA transfiziert und Gesamtzelllysate hergestellt, die dann mit MBP und MBP-CHD6<sub>1-474</sub> inkubiert wurden. Wie in Abb. 22 zu sehen, interagieren alle drei E8<sup>A</sup>E2C-Proteine in gleichem Maße mit dem MBP-CHD6 Fragment, was darauf hindeutet, dass diese Interaktion zwischen verschiedenen Hochrisiko-HPV-Typen konserviert ist.

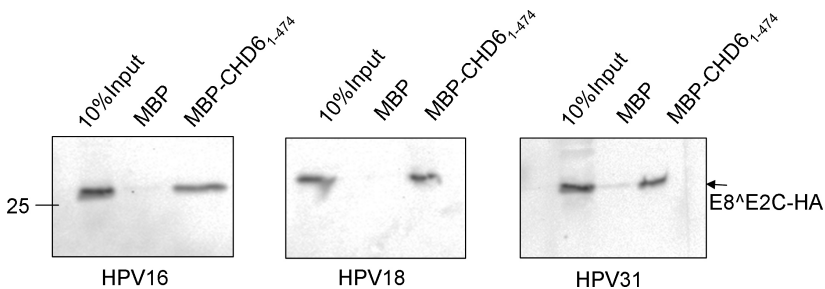


Abb. 22: Die Bindung von E8<sup>A</sup>E2C an CHD6 ist unter verschiedenen Hochrisiko HPV-Typen konserviert  
 Expressionsvektoren für HA-markierte E8<sup>A</sup>E2C-Proteine von HPV 16, 18 und 31 wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte hergestellt, und mit gleichen Mengen MBP als Kontrolle (Spur 2) und MBP-CHD6 1-474 (Spur 3) inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch Immunoblot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. Auf der linken Seite befindet sich ein Größenmarker in kDa.

Da die Versuche bisher nur mit dem verkürzten CHD6 Fragment durchgeführt wurden, stellte sich die Frage, ob die beobachtete Interaktion auch mit dem vollständigen CHD6 Protein stattfindet. Hierfür wurden Gesamtzellextrakte aus HeLa-Zellen mit MBP und MBP-31E8<sup>E2C</sup>-Fusionsproteinen inkubiert. Die Anwesenheit von CHD6 wurde mittels Immunoblot und einem CHD6 Antikörper untersucht. Wie in Abb. 23 zu sehen erkennt der Antikörper eine Bande bei ungefähr 300 kDa, was der vorhergesagten Größe für CHD6 von 305 kDa entspricht. Um zu bestätigen, dass es sich hierbei um CHD6 handelt, wurden HeLa Zellen transient mit einem CHD6 Expressionsplasmid transfiziert und Zellextrakte durch Immunoblot getestet. Der Antikörper erkennt dieselben Banden, deren Intensität sich nach Überexpression deutlich verstärkt. Sowohl das endogene als auch das überexprimierte CHD6 Protein interagieren spezifisch mit MBP-31E8<sup>E2C</sup> und nicht mit der Negativkontrolle MBP (Abb. 23).

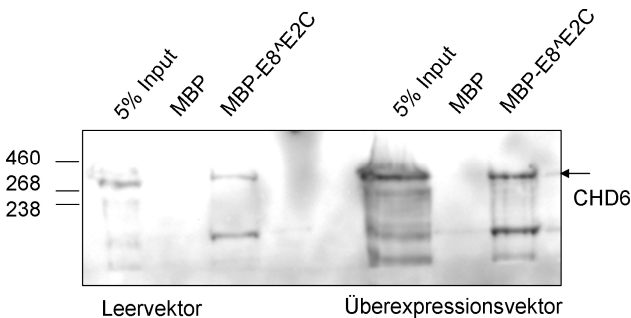


Abb. 23: E8<sup>E2C</sup> interagiert mit CHD6

Ein leerer Vektor (linke Seite) sowie ein Expressionsvektor für CHD6 (rechte Seite) wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 48h lysiert und mit gleichen Mengen MBP als Kontrolle (Spur 2 und 5) oder MBP-31E8<sup>E2C</sup> (Spur 3 und 6) inkubiert. 5% des Zellysats wurden als Input aufgetragen (Spur 1 und 4). Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit einem CHD6 Antikörper nachgewiesen. Auf der linken Seite befindet sich ein Größenmarker in kDa.

---

Um die Interaktion zwischen dem vollständigen CHD6 Protein und 31E8<sup>E2C</sup> weiter zu bestätigen, wurden Ko-Immunopräzipitationsversuche durchgeführt. Hierzu wurden 31E8<sup>E2C</sup>-HA exprimierende HEK 293T-Zellen benutzt. Gesamtzelllysate wurden mit einem HA-Antikörper inkubiert und die präzipitierten Proteine auf die Anwesenheit von CHD6 mittels Immunoblot und Antikörperinkubation überprüft. Wie Abb. 24 zeigt, konnte nur aus 31E8<sup>E2C</sup>-exprimierenden Zellen CHD6 kopräzipitiert werden, nicht jedoch aus der Kontrollzelllinie, die nur den leeren Expressionsvektor enthält. Als Kontrolle wurde die Anwesenheit von Trim28 überprüft, einem beschriebenen Interaktionspartner von 31E8<sup>E2C</sup> (Ammermann, Bruckner et al. 2008).

Diese Versuche deuten auf eine spezifische Interaktion zwischen 31E8<sup>E2C</sup> und CHD6 hin, die zwischen verschiedenen HPV-E8<sup>E2C</sup>-Proteinen konserviert ist.

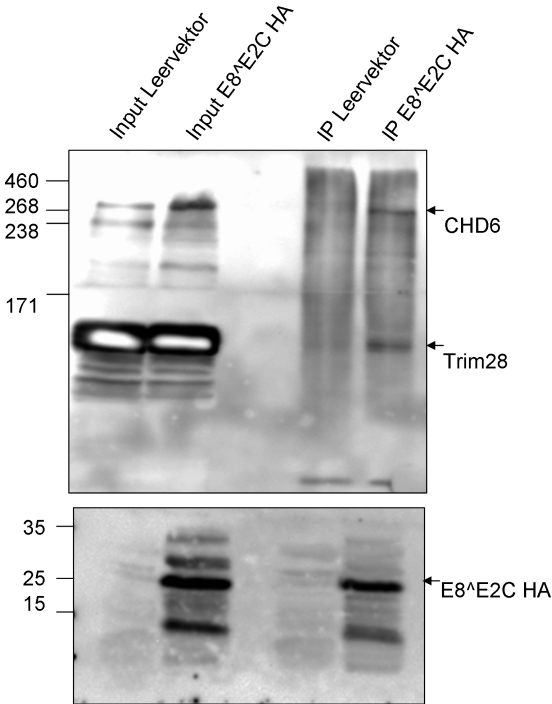


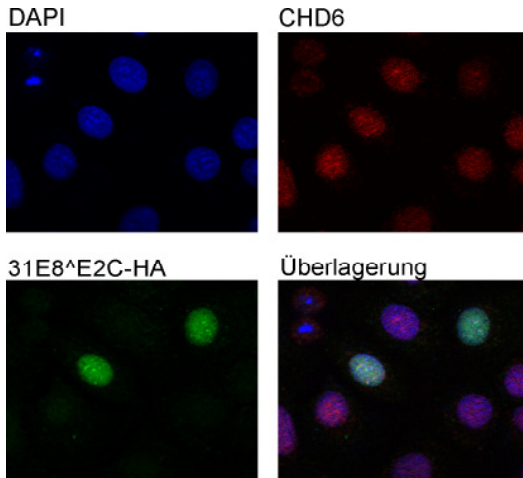
Abb. 24: E8<sup>E2C</sup> HA interagiert mit CHD6 in vivo  
Lysaten von 293T-Zellen, die stabil pIRES puro (Leervektor) oder pIRESpuro 31E8<sup>E2C</sup>-HA enthalten, wurden mit einem HA-Antikörper, der an magnetische Beads gekoppelt war, präzipitiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit anti-HA, anti-CHD6 oder anti-TRIM28 nachgewiesen. Links: Größenmarker in kDa. (Input = Zelllysat, IP = Immunpräzipitation)



### 4.2.3 CHD6 und E8<sup>E2C</sup> kolokalisieren in der Zelle

Um zu überprüfen, ob 31E8<sup>E2C</sup> und CHD6 in eukaryoten Zellen kolokalisieren, wurden 31E8<sup>E2C</sup>-HA exprimierende Zellen mit einem HA-Antikörper und einem CHD6-Antikörper inkubiert und über indirekte Immunfluoreszenz wurden die Proteine sichtbar gemacht. Die Proteinexpression von 31E8<sup>E2C</sup>-HA in der stabil transfizierten RTS3b-Zellpopulation ist sehr heterogen (Abb. 25), was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass keine Einzelklone beim Herstellen der stabilen Zelllinie expandiert wurden, sondern eine Mischkultur verwendet wurde. Wie in Abb. 25 zu sehen, zeigen beide Proteine starke nukleäre Signale, was mit bisherigen Berichten und Beobachtungen transient transfizierter Zellen übereinstimmt. (Lutz, Stoger et al. 2006; Stubenrauch, Straub et al. 2007).

Die quantitative Analyse der Überlagerung der Signale für beide Proteine ergab eine durchschnittliche Kolokalisation von ca. 50% bei einer Schwankung von +/- 20% (Abb. 25). Interessanterweise ist in einigen Zellen ein sehr hoher (~90%) in anderen Zelle wiederum ein sehr niedriger (~15%) Anteil an kolokalisierten Bereichen zu beobachten (Daten nicht gezeigt), was bedeuten könnte, dass kein stabiler Komplex gebildet wird, sondern dass die Komplexbildung möglicherweise Schwankungen unterliegt. Es konnte keine Verteilung von CHD6 in den negativen Zellen beobachtet werden, die sich von den 31E8<sup>E2C</sup>-HA positiven Zellen unterscheidet. Die nukleäre Lokalisation beider Proteine konnte ebenfalls in anderen Zellen bestätigt werden, die sowohl transient, als auch stabil mit 31E8<sup>E2C</sup> transfiziert wurden.



	Mittelwerte %
freies CHD6	11,65
freies HA	19,36
Kolokalisation	51,70
Hintergrund	17,29
Gesamt	100,00

Abb. 25: CHD6 kolokalisiert mit 31E8<sup>E2C</sup> HA in der Zelle (oben) Immunfluoreszenzanalyse von stabil 31E8<sup>E2C</sup>-HA exprimierenden RTS3b-Zellen. Die Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen HA und CHD6 inkubiert. Die verwendeten Sekundärantikörper waren gekoppelt an Fluoreszenzfarbstoffe (anti-rat-Alexa488 und anti-mouse-Alexa555), die DNA wurde mit DAPI angefärbt, die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop mit einem 63x Objektiv zusammen mit dem Apotom in den entsprechenden Fluoreszenz Filtersets für Cy3 und Cy5 aufgenommen. Eine repräsentative Aufnahme ist mit allen drei Kanälen dargestellt. (unten) Die Kolokalisierung wurde mit dem Kolokalisationsmodul für Zeiss Axiovision 4.5 bestimmt. Hierzu wurden die HA-positiven Zellen markiert, und die Grauwerte für jeden Pixel in jedem aufgenommenen Kanal bestimmt. Die Analyse wurde durchgeführt, indem die Daten in Microsoft Excel exportiert wurden und der Mittelwert der kolokalisierten Pixel in den markierten Zellen bestimmt wurde

#### **4.2.4 HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Mutanten mit einer verminderten Bindung an CHD6 sind in ihrer transkriptionellen Repression gehemmt**

Um weitere Hinweise auf die funktionellen Aspekte dieser Interaktion zu erhalten, wurde versucht, Mutationen im E2C-Anteil zu identifizieren, welche die Bindung von 31E8<sup>E2C</sup> an CHD6 beeinflussen. Basierend auf den veröffentlichten Strukturanalysen des 31E2C-Anteils wurden die Aminosäuren 159, 162, 167 und 181 ausgewählt, da sie sich an der Oberfläche des Proteins befinden und nicht an essentiell für die Dimerisierung oder die DNA-Bindung sind (Liang, Petros et al. 1996; Bussiere, Kong et al. 1998). Die mutierten Proteine wurden als MBP-31E8<sup>E2C</sup> Fusionsproteine exprimiert und aus Bakterien aufgereinigt. Vergleichbare Mengen an Fusionsprotein wurden mit Gesamtzellextrakt aus Zellen, in denen CHD6 transient überexprimiert wurde, inkubiert und die gebundenen CHD6 Proteine mittels Immunoblot nachgewiesen. In Abb. 26 sind die Bindungseffizienzen der einzelnen Mutationen nach Normalisierung auf die eingesetzte Proteinmenge dargestellt. Hierzu wurden die Extrakte mit einem Immunoblot auf MBP auf ihren Gehalt an eingesetztem Fusionsprotein untersucht und mittels der QuantityOne-Software quantitativ analysiert. Das Verhältnis zwischen CHD6-Signal und eingesetztem MBP-Fusionsprotein wurde bestimmt und auf die Menge an CHD6 im Input bezogen.

## Ergebnisse

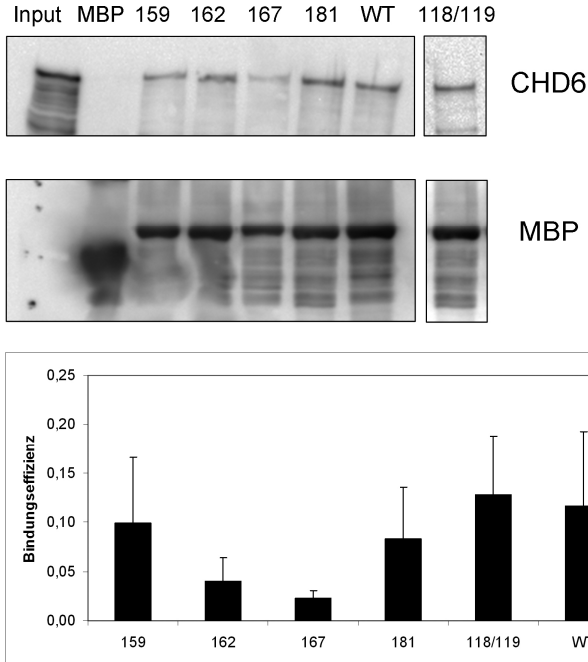


Abb.26,oben: Bakteriell exprimierte, aufgereinigte Fusionsproteine MBP, MBP-31E8<sup>E2C</sup> oder die angegebenen MBP-31E8<sup>E2C</sup> Punktmutanten wurden mit Gesamtzelllysät aus HeLa-Zellen, die CHD6 überexprimieren, inkubiert. Gebundenes CHD6 (oberer Teil) und MBP als Ladekontrolle (unterer Teil) wurde durch Immunoblot nachgewiesen. In der Spur Input wurden 5% des Gesamtzellextrakts aufgetragen. Es ist ein repräsentatives Experiment gezeigt. Unten: Quantifizierung der gebundenen CHD-Proteine im Verhältnis zu MBP. Die Signale im Western Blot für CHD6 und MBP wurden mit der QuantityOne-Software quantifiziert. Die CHD6 Signale wurden auf die MBP-Signale normalisiert und in Relation zur Ausgangsmenge gesetzt (Input). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 26 zu sehen vermindert der Austausch von T167 zu Alanin die Bindung an CHD6 um den Faktor 3 verglichen mit dem Wildtyp-Protein. Der Austausch R162 in Alanin reduzierte die Bindung um den Faktor 2. Im Gegensatz hierzu veränderte der Austausch der

---

Aminosäuren 159 und 181 die Bindung an CHD6 nicht. Zur funktionellen Analyse der Mutanten wurden transiente Transfektionsexperimente mit den Reporterplasmiden pGL18URR luc und pC18 SP1 luc in HeLa Zellen durchgeführt. Kotransfektionsexperimente mit Wildtyp 31E8<sup>E2C</sup> Expressionsplasmiden mit entweder pC18 SP1 luc oder pGL18URR luc reduzierten die gemessene Luziferase-Aktivität ca. 40-fach bzw. 60-fach. Mutation von T159 oder Y181 zu Alanin zeigten eine ähnliche Repression wie der Wildtyp (Abb. 27). Im Gegensatz hierzu zeigten T167A und R162A eine ~4-fach bzw. ~10-fach höhere Luziferase-Aktivität mit pC18 SP1 luc und pGL18URR luc als das 31E8<sup>E2C</sup> Wildtyp Protein, was mit dem Verlust der Bindung an CHD6 korreliert. Immunoblots zeigten, dass alle mutierten Proteine in gleichem Maße nach transienter Transfektion in der Zelle exprimiert werden.

## Ergebnisse

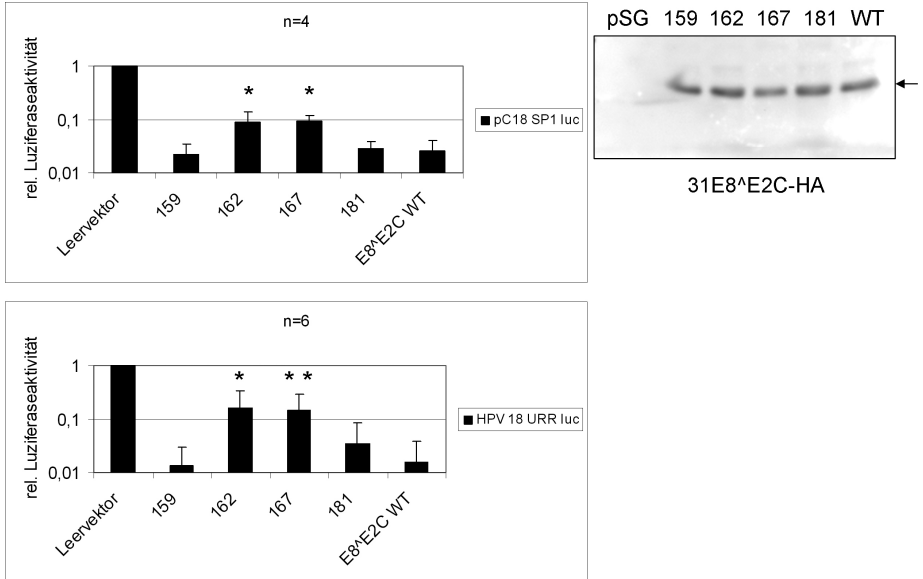


Abb.27:

Luziferasereporteranalyse in HeLa-Zellen (linke Seite): Es wurden jeweils 50 ng Reporterplasmid verwendet. Dazu wurden je 10 ng Expressionsplasmid von 31E8^E2C, der entsprechenden 31E8^E2C-Mutanten oder des leeren Vektors transfiziert. Nach 48h wurde die Luziferaseaktivität überprüft. Die Luziferaseaktivität in Leervektor-transfizierten Zellen wurde als 1 definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, Sternchen markieren die statistische Signifikanz (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ), die durch den Mann-Whitney-U-test ermittelt wurde. Rechts: HeLa-Zellen wurden mit je 1  $\mu$ g des Leervektors (pSG5) oder Expressionsplasmiden für wildtyp oder mutiertem 31E8^E2C transfiziert. Gesamtzelllysate wurden durch Immunoblotting mit einem anti-HA Antikörper analysiert.

Um zu überprüfen, ob auch die DNA-Bindung von E8<sup>E2C</sup> durch die Mutationen betroffen ist, wurden Pulldownexperimente mit einem <sup>32</sup>P-markierten, doppelsträngigen Oligonukleotid, welches die hochaffine E2BS4 von HPV31 enthält und den entsprechenden aufgereinigten MBP-Fusionsproteinen durchgeführt. Die Menge an gebundener DNA wurde in einem Szintillationszähler quantifiziert. MBP-31E8<sup>E2C</sup> präzipitierte ca. 12-mal mehr markiertes Oligonukleotid als MBP. Ebenso zeigten MBP-31E8<sup>E2C</sup><sub>1-91</sub>, welches keine DNA-Bindungsdomäne enthält, und MBP-31E8<sup>E2C</sup> 118/119, welches zwei Punktmutationen in der DNA-bindenden Helix trägt, kaum DNA-Bindungsaktivität. Wie in Abb. 28 zu sehen, binden die Mutanten T159A, R162A und Y181A das radioaktiv markierte Oligonukleotid in gleichem Maße wie das Wildtyp-Protein. Die Mutante N167A zeigte eine leicht verminderte DNA-Bindungsaktivität. Dies lässt darauf schließen, dass die verminderte Repressionsaktivität der beiden Mutanten R162A und N167A hauptsächlich auf eine verminderte Bindung an CHD6 und nicht auf fehlende DNA-Bindungsfähigkeit zurückzuführen ist.

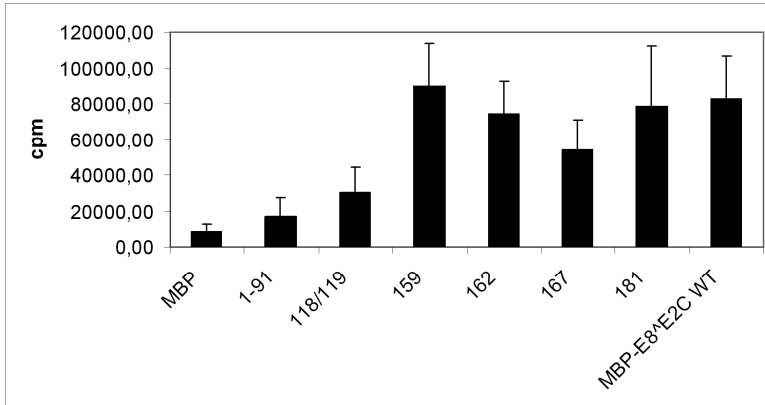


Abb. 28:

Bakteriell exprimierte und aufgereinigte Fusionsproteine von MBP, MBP-31E8<sup>E2C</sup>, den angegebenen MBP-31E8<sup>E2C</sup> Punktmutanten, einer DNA-bindungsdefizienten Mutante (118/119) oder einem Protein, bei dem der komplette C-Terminus fehlt (1-91), wurden mit <sup>32</sup>P-markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden, die eine 31E2-BS an Position 45-70 einschließen, inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gebundenen Oligonukleotide mit einem Szintillationzähler gemessen. Es sind die „counts per minute“ (cpm) aus sieben unabhängigen Experimenten aufgetragen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.



#### 4.2.5 Die Bindung von 31E8<sup>E2C</sup> an CHD6 ist nicht DNA-vermittelt

Um eine DNA-vermittelte Bindung zwischen E8<sup>E2C</sup> und CHD6 auszuschließen, wurde ein Pulldownexperiment mit GST-E8<sup>E2C</sup> und radioaktiv markiertem *in vitro*-translatiertem CHD<sub>1-474</sub> in Anwesenheit von 50µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, verändert deren Struktur und reduziert so DNA-Protein-Wechselwirkungen (Schroter, Maier et al. 1985). In Abb. 29 ist deutlich zu sehen, dass die Bindung in Anwesenheit von Ethidiumbromid stattfindet (Spur 3 und Spur 5).

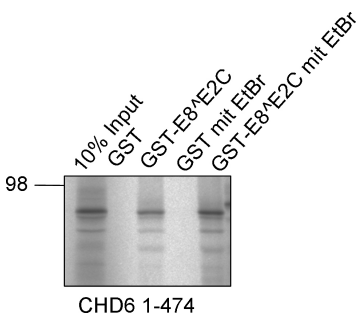


Abb. 29: Die Bindung von 31E8<sup>E2C</sup> an CHD6 ist DNA-unabhängig. Gleiche Mengen bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-als Kontrolle (Spur 2) GST-31E8<sup>E2C</sup> (Spur 3), GST mit EtBr (Spur 4) GST-31E8<sup>E2C</sup> mit EtBr (Spur 5) Fusionsproteine wurden mit *in vitro* translatierten, <sup>35</sup>S markiertem CHD6<sub>1-474</sub>-Fragment mit oder ohne Zugabe von 50µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) inkubiert um DNA-vermittelte Interaktionen zu verhindern. Links: Größenstandard in kDa. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Phosphoimaging dargestellt. In Spur 1 sind 10% der *in vitro* translatierten Proteine und für die Bindungsreaktion verwendeten Proteine gezeigt.

Dies deutet darauf hin, dass die Bindung nicht durch DNA vermittelt wird.

Zusätzlich bestätigt wurde dies durch die Verwendung der DNA-bindungsdefizienten Mutante MBP-31E8<sup>E2C</sup> 118/119 in Pulldown-Assays mit Gesamtzelllysaten. In Abb. 30 ist zu erkennen, dass die Bindung von MBP-31E8<sup>E2C</sup> und MBP 31E8<sup>E2C</sup> 118/119 an CHD6 vergleichbar ist (Abb. 30 rechts).

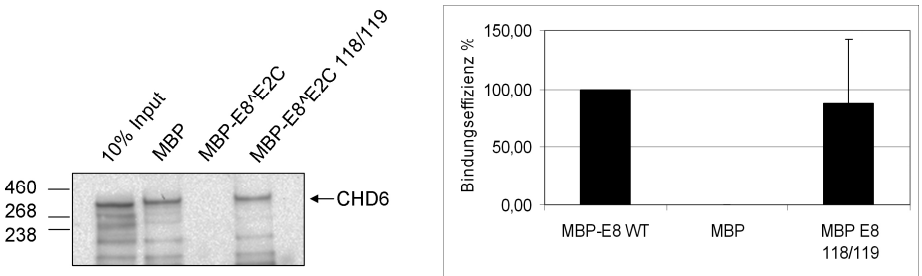


Abb. 30: Ein Überexpressionsvektor für CHD6 wurde in HeLa-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 48h lysiert und mit gleichen Mengen MBP als Kontrolle (Spur 3) und MBP-31E8<sup>E2C</sup> (Spur 2) und einer DNA-bindungsdefizienten Mutante MBP-31E8<sup>E2C</sup> 118/119 (Spur 4) inkubiert. 5% des Zelllysats wurden als Input aufgetragen (Spur 1). Gebundene Proteine wurden mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von CHD6 überprüft.

Quantifizierung der gebundenen CHD-Proteine im Verhältnis zum WT. Die Signale im Western Blot für CHD6 wurden mit der QuantityOne-Software quantitativ analysiert. Die CHD6 Signale wurden in Relation zum gebundenen Wildtypprotein gesetzt (MBP 31E8-WT). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.2.6 Eine Reduktion der CHD6-Expression moduliert die E8<sup>A</sup>E2C-vermittelte Repression auf den endogenen E6/E7 Promoter in HPV-positiven Zellen

Um die funktionellen Konsequenzen dieser Bindung weiter zu analysieren, wurden HeLa-Zellen generiert, in denen die CHD6-Expression durch Expression von shRNAs reduziert wurde. Es wurden zwei verschiedene shRNAs gegen CHD6 für die Experimente verwendet (shCHD6-1, shCHD6-2). Immunoblots zeigten, dass die CHD6-Proteinexpression in beiden Zelllinien im Vergleich zur Kontrollzelllinie auf ca. 35% reduziert war (Abb. 31).

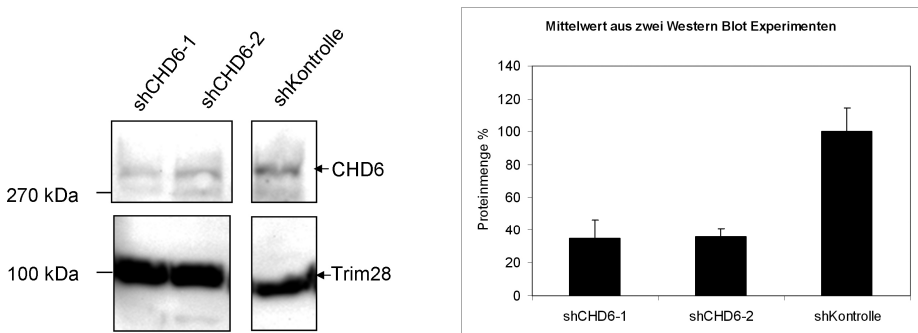


Abb. 31: Linke Seite: HeLa-Zellen wurden mit lentiviralen Partikeln, die ein Expressionsplasmid für eine shRNA gegen CHD6 oder eine KontrollshRNA trugen, infiziert und mit Puromycin selektioniert. Gesamtzellextrakte wurden durch Immunoblotting auf CHD6 überprüft. Als Ladekontrolle diente Trim28. Rechte Seite: Quantifizierung der CHD6-Proteinmenge in den shCHD6-Zellen im Verhältnis zur shKontrolle. Die Signalintensitäten wurden mit der QuantityOne-Software quantifiziert. Die CHD6 Signale der Kontroll shRNA wurden 100% gesetzt und der CHD6-Proteingehalt in den shCHD6-Zellen relativ dazu bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Bei beiden Zelllinien konnten keine morphologischen Effekte oder vermindertes Wachstum beobachtet werden. Um zu testen, ob die Reduktion der CHD6 Menge einen Einfluss auf die Repression des endogenen, integrierten 18E6/E7 Promotor durch 31E8<sup>E2C</sup> in HeLa-Zellen besitzt, wurden Koloniereduktionsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden HeLa-shKontrolle, HeLa-shCHD6-1- und HeLa-shCHD6-2-Zellen mit pRESneo-31E8<sup>E2C</sup>-HA oder pRESneo Plasmiden transfiziert. Die Koloniezahl wurde nach 12 Tagen Selektion mit G418 bestimmt. Bei den HeLa-shCHD6 -1, HeLa-shCHD6-1 und HeLa-shKontrolle Zellen die nur mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, wurden vergleichbare Koloniezahlen erreicht. Daraus lässt sich schließen, dass die Verminderung der CHD6 Expression an sich keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat (Abb. 32).

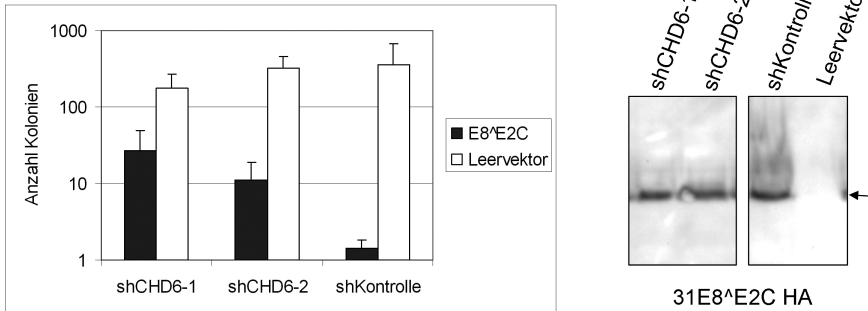


Abb. 32:

Abb. Links: Der 31E8<sup>E2C</sup>-vermittelte Wachstumsarrest in HeLa-Zellen wird durch shCHD6 abgeschwächt. HeLa-Zellen, die stabil shRNAs gegen CHD6 (shCHD6-1, shCHD6-2) oder eine kontroll-shRNA (shKontrolle) trugen, wurden mit pIRES neo (Leervektor) oder pIRES-neo 31E8<sup>E2C</sup> Plasmiden transfiziert. Nach Selektion der Zellen für 12 Tage mit 500µg/ml G418 wurden die Zellen gewaschen, gefärbt und die Kolonien gezählt. Die Anzahl der gebildeten Kolonien aus fünf unabhängigen Experimenten sind im Schaubild aufgetragen.

Rechts: shCHD6-1, shCHD6-2 oder Kontroll-shRNA (shKontrolle) HeLa Zellen wurden mit pIRES neo 31E8<sup>E2C</sup>-HA transfiziert. Als Kontrolle wurde HeLa shKontrolle mit dem pIRES neo Plasmid transfiziert. Lysate wurden im Immunoblot mit einem anti-HA Antikörper analysiert.

Die Expression von 31E8<sup>E2C</sup> führte zu durchschnittlich 1.4 Kolonien in der HeLa-shKontrolle Zelllinie (Abb. 32). Im Gegensatz hierzu stieg die Bildung von Kolonien in Anwesenheit von 31E8<sup>E2C</sup> in HeLa-shCHD6-1 und HeLa-shCHD6-2 Zelllinien auf 26.8 bzw. 11 an (Abb. 32).

Western-Blot Experimente bestätigten, dass die Proteinmengen von transient exprimierten 31E8<sup>E2C</sup> Proteins in allen Zelllinien vergleichbar waren, so dass ein dosisabhängiger Effekt von 31E8<sup>E2C</sup> ausgeschlossen werden konnte (Abb. 32, rechts). Da die Koloniebildungseffizienz mit der transkriptionellen Repression des endogenen E6/E7 Promotors durch 31E8<sup>E2C</sup> korreliert (Stubenrauch,

Straub et al. 2007), legen diese Ergebnisse nahe, dass die Interaktion zwischen CHD6 und E8<sup>E2C</sup> zur Repression des E6/E7 Promotors beiträgt.

### **4.2.7 Die Bindung an CHD6 moduliert die Repression, aber nicht die Aktivierung durch 31E2**

Um herauszufinden, ob die Bindung von E2 an CHD6 die transkriptionellen Eigenschaften durch E2 beeinflusst, wurden die für 31E8<sup>E2C</sup> charakterisierten Mutationen in 31E2 eingeführt.

Immunoblotanalysen der HA-markierten T347A, R350A, N355A und Y369A Mutanten bestätigten, dass diese in vergleichbarer Menge wie das Wildtyp-Protein exprimiert wurden. (Abb. 33, rechts). Transiente Luziferase-Reporteranalysen wurden mit den bereits beschriebenen Plasmiden pC18 SP1 luc und pG18URR luc sowie den verschiedenen mutierten 31E2-Proteinen in HeLa-Zellen durchgeführt.

Alle Mutanten zeigten eine vergleichbare (90-fache) aber im Vergleich zum 31E2 Wildtyp -Protein (140-fache) nicht statistisch signifikante, abgeschwächte Aktivierung des pC18 SP1 luc-Konstrukts (Abb. 33, oberer Teil). Da sich die entsprechenden E8<sup>E2C</sup> Mutanten in ihrer Bindung an CHD6 unterscheiden, legt das den Schluss nahe, dass CHD6 nicht zur Transaktivierung durch 31E2 beiträgt. Die Promotoraktivität des pGL18URR luc Konstrukts wurde durch das 31E2 Wildtyp-Protein auf 10% der Basalaktivität reprimiert. (Abb. 33, unterer Teil, E2 WT). Die Mutation von R350A oder N355A ergab einen statistisch signifikanten 3-fachen Anstieg in der Reporteraktivität, wohingegen T347A und Y369A sich wie das 31E2 Wildtyp-Protein verhielten (Abb. 33). Vergleichbar zu 31E8<sup>E2C</sup> zeigten nur die

Mutationen, die die Bindung an CHD6 negativ beeinflussen, eine reduzierte Repressionsaktivität des E6/E7 Promotors. Dies lässt den Schluss zu, dass CHD6 an der transkriptionellen Repression durch E8<sup>A</sup>E2C und E2 beteiligt ist.

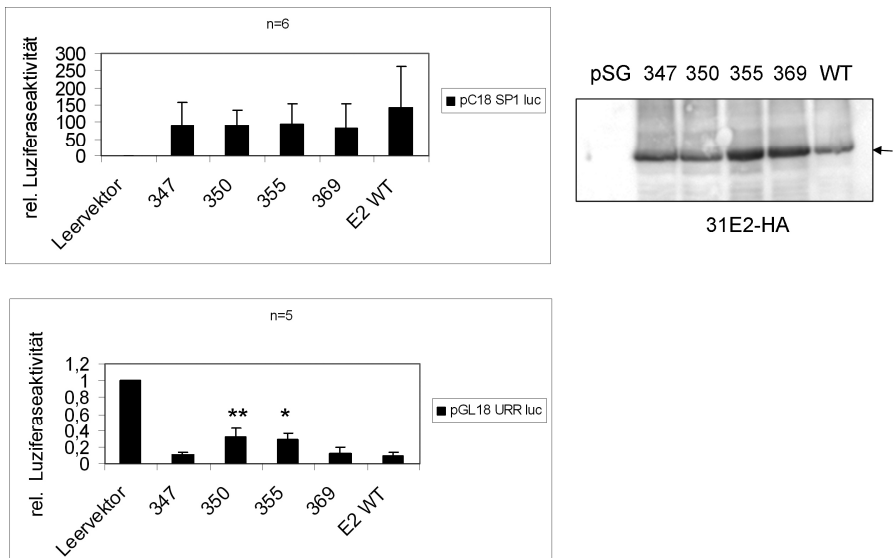


Abb. 33:

Luziferasereporteranalyse in HeLa-Zellen (linke Seite): Es wurden jeweils 50 ng Reporterplasmid verwendet. Dazu wurden je 10 ng Expressionsplasmid von 31E2, der entsprechenden 31E2-Mutanten oder des leeren Vektors transfiziert. Nach 48h wurde die Luziferaseaktivität bestimmt. Der Leervektor wurde als Basalwert definiert und auf 1 gesetzt, die anderen Werte wurden in Relation dazu gesetzt. Die Daten repräsentieren den Durchschnitt aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, Sternchen markieren die statistische Signifikanz (\*  $p > 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ), die durch den Mann-Whitney-U-test ermittelt wurde.

Für Immunoblot Experimente (rechte Seite) wurden HeLa-Zellen mit 1  $\mu$ g des Leervektors (pSG) dem 31E2 Wildtyp-Protein oder der entsprechenden Mutanten transfiziert. Gesamtzelllysate wurden hergestellt und per Immunoblotting auf die Anwesenheit von 31E2-HA sowie der Mutanten überprüft.

### **4.3 Die Einfluss der E8 Repressordomäne auf die Aktivität von E2**

Im Verlauf einer HPV Infektion sind gleichzeitig E2 und E8<sup>E2C</sup> vorhanden und beeinflussen sich vermutlich gegenseitig. Bisher wurden v.a. Bindungsstellenkompetition und Heterodimerbildung als regulatorische Mechanismen diskutiert (McBride, Byrne et al. 1989; Webster, Parish et al. 2000). Um zu testen, welchen Einfluss die E8 Repressordomäne auf die Transkriptionsaktivierung durch E2 und umgekehrt hat, wurden luziferasebasierte Promotoranalysen in HeLa Zellen durchgeführt.

Hierfür wurde als Reporterkonstrukt das Plasmid pC18 SP1 4xGAL4 luc verwendet, welches ein Derivat des pC18 SP1 luc Plasmids ist und zusätzlich zu den vier E2BS, vier GAL4-Bindungsstellen enthält. Dies ermöglicht es, E2 über E2BS und ein E8(1-37)-Gal4 Fusionsprotein über Gal4BS gleichzeitig an den Promotor zu rekrutieren. Um unterschiedliche Mengen von E2 zu E8(1-37)-Gal4 zu simulieren, wurden von einem Expressionsplasmid ansteigende Konzentrationen benutzt, während die Konzentration des anderen konstant gehalten wurde. Es wurden für diesen Versuch je 1, 10 oder 50 ng der Expressionsplasmide für E8(1-37)-Gal4 oder E2-HA sowie einer konstanten Menge von 10 ng für den jeweils anderen Partner, E8-Gal4 oder E2-HA, transfiziert (siehe Abb. 34). Die fehlende DNA-Menge wurde mit pSG5 ausgeglichen, so dass die Gesamtmenge der transfizierten DNA bei 110ng lag.



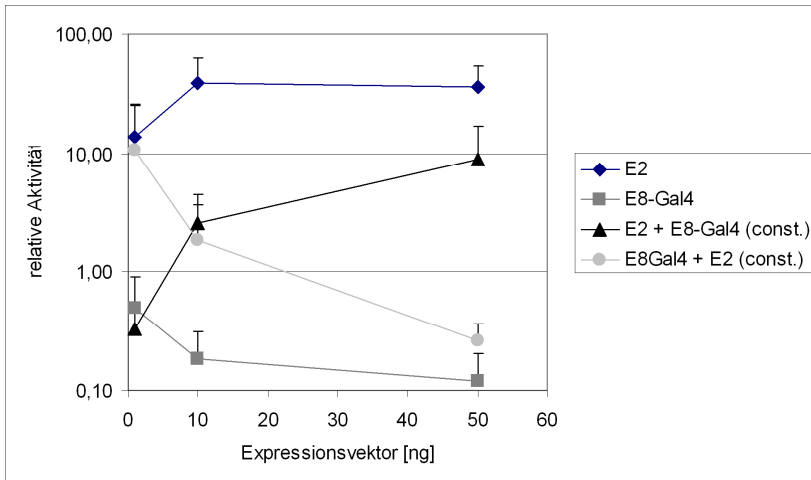


Abb. 34: Luziferasereporteranalyse in HeLa-Zellen: Es wurden 50 ng pC18 SP1 4xGal4 als Reporterplasmid verwendet. Die Mengen an transfizierter DNA der Expressionsplasmide 31E2-HA (E2), 31E8(1-37)-Gal4 (E8-Gal4) sind angegeben. Dabei wurde die Menge eines Partners konstant (const.) gehalten, die Menge des anderen erhöht. Um die transfizierte DNA-Menge insgesamt konstant zu halten, wurde die fehlende DNA-Menge mit pSG5 ausgeglichen. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Wurde nur 31E8<sup>E2C</sup>(1-37)-Gal4 transfiziert, wurde die Promotoraktivität von pC18 SP1 4xGal4 luc auf die Hälfte (0,5 bei 1 ng), bzw. ein Fünftel (0,19-fach bei 10ng) und ein Achtel (0,12-fach bei 50ng) reduziert. Wurde 31E2-HA alleine transfiziert, stieg die gemessene Luziferase-Aktivität von pC18 SP1 4xGal4 luc auf das 13,8-fache (1 ng), bzw. 39,2-fache (10 ng) und 35,9-fache (50 ng) der Basalaktivität.

Wenn die Menge von 31E8<sup>E2C</sup>(1-37)-Gal4 konstant gehalten wurde (10 ng) und ansteigende Mengen von E2-HA transfiziert wurden, betrug die gemessene Promotoraktivität von pC18 SP1 4xGal4 luc nur etwa

0,33-fach (1 ng), bzw. 2,55-fach (10ng) und 8,98-fach (50ng) der Basalaktivität. Beim umgekehrten Fall, wenn die Menge von 31E2-HA konstant gehalten wurde (10 ng) und ansteigende Mengen von 31E8<sup>E2C</sup>(1-37)-Gal4 transfiziert wurde, führte dies zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Repression durch 31E8<sup>E2C</sup>(1-37)-Gal4. Es wurden Promotoraktivitäten des pC18 SP1 4xGal4 luc-Reporterplasmids von etwa 10,79-fach (1 ng), bzw. 1,85-fach (10ng) und 0,27-fach (50ng) gegenüber der Basalaktivität gemessen. Interessanterweise gibt es einen Bereich, in dem beide Proteine vorhanden sind, aber die Aktivität des Promotors kaum beeinflusst wird (Abb. 34). Dies könnte bedeuten, dass sich im Persistenzzustand beide Proteine „neutralisieren“, um so eine konstitutive virale Genexpression zu ermöglichen. Eine Verschiebung zugunsten des Aktivators könnte zur produktiven Replikation führen, während eine Verschiebung zugunsten des Repressors zu einer Latenzphase führen könnte.

Um zu testen, ob die E8 Repressordomäne die DNA-Bindung von E2 beeinflusst, wurden Chromatin-Immunopräzipitationsassays durchgeführt. Hierzu wurden Phönix-Zellen mit dem pGL31URR 4x Gal4 Plasmid, welches die virale URR-Region mit vier zusätzlichen Bindestellen für Gal4 besitzt und Kombinationen von Expressionsvektoren für 31E2-HA, 31E8<sup>E2C</sup>(1-37)-Gal4 oder Gal4 alleine kotransfiziert. Die Expression der transfizierten Proteine wurde mittels Western Blot überprüft (Abb. 35). Formaldehyd-vernetzte Protein-DNA Komplexe wurden mit Gal4- oder HA-Antikörpern immunpräzipitiert und kopräzipitierte 31 URR DNA durch quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) detektiert. Abb. 35 zeigt, dass nach

Transfektion die entsprechenden Proteine an der LCR spezifisch zu detektieren sind. Die Bindung von E2 an die URR war ähnlich in der An- und Abwesenheit von Gal4 (0,01 bzw. 0.007) und ein ähnliches Ausmaß konnte auch in der Anwesenheit von E8(1-37)-Gal4 (0,01) beobachtet werden. Dies legt nahe, dass die E8- Repressionsdomäne nicht die DNA-Bindung von E2 beeinflusst und somit die Inhibition der E2 Aktivität auf einem anderen Mechanismus beruht.

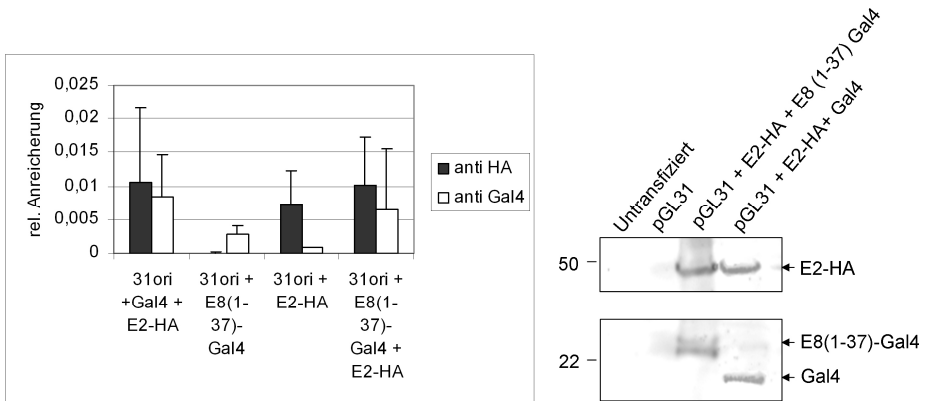


Abb. 35: (links) Chromatin-Immunopräzipitation: Es wurden insgesamt 20µg DNA mittels der Calcium-Phosphat-Methode in Phönix-Zellen transfiziert. Es wurden pGL31 URR (31 ori), pSX 31E2-HA (E2-HA), pSG 31E8(1-37)-Gal4 (E8(1-37)-Gal4 sowie zur Kontrolle pSG-Gal4 (Gal4) transfiziert. Die Immunopräzipitation der Protein-DNA-Komplexe erfolgte mit HA- und Gal4-Antikörpern. Anschließend wurden die gebundenen DNA-Abschnitte isoliert und mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Die Anreicherung der Signale wurde in Bezug zur Ausgangsmenge gesetzt. Es sind drei unabhängige Experimente dargestellt, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

(rechts) Immunoblot zur Überprüfung der Proteinexpression nach Transfektion: Gesamtzelllysate aus Phönix-Zellen, die mit pGL31 URR alleine, sowie mit pSG-E8(1-37)-Gal4 und pSX-E2-HA oder pSG-Gal4 transfiziert wurden. Die Anwesenheit von E2-HA und der Gal4-Konstrukte wurde mit einem HA- bzw. Gal4-Antikörper überprüft.

## 5. Diskussion

Das E2 Gen von Papillomviren kodiert für Regulatorproteine, die die Transkription und Genomreplikation positiv und negativ beeinflussen und somit die Expression der E6 und E7 Onkoproteine regulieren. Da das E2 Gen häufig in den HPV Genomen in Zervixkarzinomen deletiert ist, wurde postuliert, dass Störungen in der Regulation der Onkogenexpression zur malignen Progression beitragen könnten (Schneider-Maunoury, Croissant et al. 1987; Turek 1994; Park, Hwang et al. 1997; Corden, Sant-Cassia et al. 1999; Pett, Alazawi et al. 2004). Neben dem vollständigen E2 Protein konnten bei animalen PV wie BPV1 und CRPV und bei HPV1, 11, 16, 31 und 33 Transkripte für alternativ gespleisste E2 Proteine nachgewiesen werden, die als E8<sup>E2C</sup> bezeichnet werden (Choe, Vaillancourt et al. 1989; Rotenberg, Chiang et al. 1989; Doorbar, Parton et al. 1990; Lambert, Monk et al. 1990; Chiang, Broker et al. 1991; Snijders, van den Brule et al. 1992; Stubenrauch, Hummel et al. 2000; Jeckel, Loetzsch et al. 2003). E2 und E8<sup>E2C</sup> besitzen eine gemeinsame Hinge-Region sowie den C-Terminus, der für die sequenzspezifische DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlich ist, aber unterscheiden sich in ihren N-Termini.

Detaillierte Untersuchungen zur Funktion und zum Wirkmechanismus von E8<sup>E2C</sup> wurden bisher überwiegend mit HPV31 durchgeführt. Diese zeigten, dass ein Verlust von E8<sup>E2C</sup> im HPV31 Genom zu einer starken Überreplikation der viralen DNA führte und bei Langzeitexperimenten in einer Integration in das Wirtszell-Genom resultierte (Stubenrauch, Hummel et al. 2000). Ähnliche Effekte konnten

bei Mutationen im KWK Motiv der E8 Domäne beobachtet werden (Zobel, Iftner et al. 2003). Die E8 Domäne stellt eine transferierbare Repressordomäne dar und bindet an zelluläre Ko-Repressoren wie Klasse I HDACs, Trim28 und SETDB1 (Zobel, Iftner et al. 2003; Ammermann, Bruckner et al. 2008).

Durch zwei unterschiedliche Ansätze konnten neue Interaktionspartner für das 31E8<sup>E2C</sup> Protein identifiziert werden, die zur der transkriptionellen Repression beitragen.

### 5.1 Interaktion von E8<sup>E2C</sup> mit CHD6

Durch einen genetischen Screen in Hefe konnte CHD6 als Interaktionspartner von E8<sup>E2C</sup> identifiziert werden. Die Bindung erfolgt über den E2C Anteil und konnte durch Pull-down-, Ko-Immunopräzipitations- und Kolo-kalisationsexperimente bestätigt werden. RNA-Interferenz-Experimente mit CHD6 und Mutationsanalysen von 31E8<sup>E2C</sup> belegen, dass diese Interaktion zur transkriptionellen Repression von 31E8<sup>E2C</sup> beiträgt (Abb. 32). Dies könnte die ausgeprägte Repressionsaktivität auf transient transfizierten HPV URR Promotorkonstrukten des E2C-Teils von HPV 11, 16, 18 oder 31 erklären (Cripe, Haugen et al. 1987; Dong, Broker et al. 1994; Demeret, Desaintes et al. 1997; Stubenrauch, Zobel et al. 2001). Zudem konnte gezeigt werden, das HPV11 E2C in der Lage ist, in vergleichbarer Weise wie E2 die URR in einem *in vitro*-Transkriptionssystem zu reprimieren (Hou, Wu et al. 2000). Dieser Effekt wurde der Bindungsstellenkompetition zwischen E2 und zellulären Transkriptionsfaktoren wie SP1 und dem TATA-box-bindenden Protein zugeschrieben (Dostatni, Lambert et al. 1991;

Demeret, Yaniv et al. 1994; Dong, Broker et al. 1994; Tan, Leong et al. 1994). Da diese Kompetitions- und *in vitro*-Transkriptionsexperimente in der Anwesenheit von nukleären Extrakten oder Immun-aufgereinigten Komponenten aus HeLa Zellen durchgeführt wurden, besteht die Möglichkeit, dass CHD6 vorhanden war und zur Repression beitrug. CHD6 ist ein Ko-Aktivator für den zellulären Nrf2 Transkriptionsfaktor (Nioi, Nguyen et al. 2005), wohingegen die Daten der vorliegenden Arbeit eher auf eine Funktion als Ko-Repressor für 31E8<sup>E2C</sup> hindeuten. Bivalente Funktionen für CHD-Proteine als Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren wurden bereits für mehrere Familienmitglieder beschrieben. CHD3 und 4 wurden beide als Komponenten des NuRD-Komplexes identifiziert, der bei transkriptioneller Repression eine Rolle spielt (Xue, Wong et al. 1998). Allerdings wurde CHD3 auch als Ko-Aktivator für den c-myb Transkriptionsfaktor identifiziert (Saether, Berge et al. 2007). Vergleichbares gilt für CHD8. Es wurde als Repressor der HoxA2 Transkription, von beta-catenin Zielgenen sowie als Ko-Repressor für p53 während der frühen Maus-Embryogenese (Yates, Menon et al. ; Thompson, Tremblay et al. 2008; Nishiyama, Oshikawa et al. 2009) beschrieben. Allerdings ist CHD8 ebenso ein Aktivator für das ZyklinE2-Gen (Rodriguez-Paredes, Ceballos-Chavez et al. 2009). Auch für CHD7 wurde beschrieben, dass es ein Teil eines Ko-Repressor-Komplexes ist, der an PPAR- $\gamma$  bindet (Takada, Mihara et al. 2007), andererseits aber als transkriptioneller Aktivator der Transkription von Sox9, Twist und Slug fungiert und so die Bildung der Neuralleiste steuert (Bajpai, Chen et al.). Repressor-Aktivitäten des NuRD-Komplexes wurden auf die ATPabhängigen Chromatin Remodeling Aktivitäten von CHD3 und 4 sowie auf die Histon-Deacetylase-Funktion der HDACs 1 und 2 zurückgeführt (Denslow and Wade 2007). CHD8

rekrutiert einen Komplex aus WDR5/Ash2/RBBP5 um Hox2A und beta-catenin-Gene zu inhibieren (Yates, Menon et al. ; Thompson, Tremblay et al. 2008), wohingegen die p53-abhängige Transkription durch die Bildung eines trimeren p53/CHD8/Histon1-Komplex verhindert wird (Nishiyama, Oshikawa et al. 2009). Die PPAR- $\gamma$ -abhängige Transkription wird durch einen CHD7/SETDB1/NLK-Komplex inhibiert (Takada, Mihara et al. 2007). Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass CHD-Proteine Teil verschiedener großer Multiproteinkomplexe sind, die die Transkription unterschiedlicher Zielgene reprimieren können. Für CHD6 wurde berichtet, dass es Teil eines 2-3 MDa großen Komplexes in unstimulierten HeLa-Zellen ist, allerdings wurde nicht geklärt, welche Bestandteile dieser Komplex hat (Lutz, Stoger et al. 2006). Es ist möglich, dass E8<sup>E2C</sup> über CHD6 solch einen multimeren Proteinkomplex rekrutiert, der die transkriptionelle Repression vermittelt. Alternativ könnte E8<sup>E2C</sup> allerdings auch eine aktivierende Funktion von CHD6 blockieren.

Der Beitrag der E2C-Interaktion zur Repressionsaktivität von 31E8<sup>E2C</sup> scheint geringer zu sein als die der 31E8-Domäne. Eine Erklärung könnte sein, dass der CHD6-Proteingehalt durch shRNA-Interferenz nur auf ca. 35% reduziert wurde und dass die verbliebene Menge für die Repression ausreicht. Gleichermäßen behielten die 31E8<sup>E2C</sup>-Punktmutanten einen Teil ihrer Bindungsaktivität, wodurch der Beitrag von CHD6 zur Repression unterschätzt werden könnte.

Interessanterweise wurde berichtet, dass die Bildung einiger CHD-Proteine enthaltender Komplexe die Anwesenheit extrazellulärer Liganden erfordert. Beispielsweise wird die Formation des CHD7/SETDB1/NLK Repressorkomplexes nur in Anwesenheit von Wnt5 beobachtet (Takada, Mihara et al. 2007). Ein CHD6 enthaltender

Komplex bindet nur an PPAR $\alpha$  in Anwesenheit von dessen Liganden (Surapureddi, Yu et al. 2002). Somit ist es möglich, dass die Repressionsaktivität von CHD6 oder der E2C/CHD6 Interaktion durch extrazelluläre Liganden beeinflusst wird und dadurch eine Feinabstimmung des E6/E7 Promotors ermöglicht. CHD1 reprimiert die Transkription latenter HIV1-Genome, wodurch die HIV Reaktivierung verhindert wird (Vanti, Gallastegui et al. 2009). Somit könnte CHD6 eine modulatorische Rolle während der persistenten HPV Infektion *in vivo* spielen. Bindungsstudien und Mutationsanalysen zeigten, dass CHD6 auch zur transkriptionellen Repression durch HPV31 E2 beiträgt (Abb. 28 und 32). Es wurde gezeigt, dass das HPV8 E2 Protein an das zelluläre Integrin-beta-4-Gen (ITGB4) bindet und dessen Transkription hemmt (Oldak, Smola et al. 2004). Interessanterweise war diese Repression auch zu beobachten, wenn nur die E2C-Domäne von HPV8 E2 benutzt wurde (Oldak, Smola et al. 2004). Da die Interaktion zwischen CHD6 und HPV16E8<sup>E2C</sup>, 18E8<sup>E2C</sup>, 31E8<sup>E2C</sup> und 31E2 konserviert ist, besteht die Möglichkeit, dass CHD6 auch mit HPV8 E2 interagiert und zur Repression des ITGB4 Gens beiträgt. Dies wirft die Frage auf, ob die Expression weiterer potenzieller CHD6 Zielgene in der Zelle durch E8<sup>E2C</sup> oder E2 verändert wird.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die E2C-Domäne nicht nur spezifische Bindung an die DNA vermittelt, sondern auch eine Rolle bei der transkriptionellen Repression durch die Rekrutierung von CHD6 spielt.



## 5.2 Die E8 Domäne rekrutiert einen N-CoR1/HDAC3/TBLR1 Repressorkomplex

In einer quantitativen Zweischnitt-Immunopräzipitation von 31E8<sup>E2C</sup>-HA-myc aus 293T Zellen wurden zwei zelluläre Proteine kopräzipitiert, welche durch Massenspektrometrie als N-CoR1 und TBLR1 identifiziert wurden. Immunopräzipitationen bestätigten, dass N-CoR1 und TBLR1 nur mit dem Wildtyp 31E8<sup>E2C</sup> Protein, aber nicht mit der E8<sup>E2C</sup>-KWK Mutante interagierten. Dies galt auch für HDAC3. Da HDAC3/N-CoR1/TBLR1 mit TBL1 den so genannten N-CoR „Core“ Repressorkomplex bilden (Li, Wang et al. 2000; Zhang, Kalkum et al. 2002; Yoon, Chan et al. 2003), lässt dies vermuten, dass die Repressionsaktivität der E8 Domäne darauf beruht, dass der N-CoR1 Komplex an Ziel promotoren wie P97 rekrutiert wird. Ob die Interaktion direkt über HDAC3 oder eine der anderen Komplex-Komponenten wie z.B. TBLR1 vermittelt wird, ist bisher unklar und muss noch untersucht werden. Die Interaktion der 31E8-Domäne mit N-CoR, TBLR1 und HDAC3 konnte kürzlich ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden und siRNA Interferenz Experimente belegten, dass N-CoR1 und HDAC3 zur 31E8<sup>E2C</sup>-vermittelten Repression des E6/E7 Promoters beitragen (Powell, Smith et al.). Die Rolle des N-CoR Komplexes bei der Inhibition der E1/E2-abhängigen Replikation der viralen DNA durch die E8 Repressordomäne ist derzeit unklar, da HDAC Inhibitoren keinen Einfluss hatten (Ammermann, Bruckner et al. 2008). Die Inhibition der Replikation wurde auf die Interaktion von Trim28/KAP-1 mit 31E8<sup>E2C</sup> zurückgeführt (Ammermann, Bruckner et al. 2008), welches als Gerüst-Protein fungiert und auch als Komponente eines N-CoR-Korepressorkomplexes identifiziert wurde (Underhill, Qutob et al. 2000). Es ist daher möglich, dass unterschiedliche N-CoR

Komplexe durch E8<sup>E2C</sup> rekrutiert werden oder dass für die Repression der Transkription und Replikation unterschiedliche Komplexkomponenten verantwortlich sind. Dafür würden auch Untersuchungen sprechen, wonach siRNA Interferenz mit der Trim28/KAP1 oder SETDB1 Expression keinen Effekt auf die E8-abhängige transkriptionelle Repression der viralen LCR hatte (Powell, Smith et al.).

Die Klonierung und Sequenzierung der 18E8<sup>E2C</sup> cDNA zeigte eine hohe Konservierung der E8-Domäne, insbesondere des KWK Motivs, zwischen HPV16, 18 und 31. Vergleichende, funktionelle Analysen der E8<sup>E2C</sup> Proteine zeigten ähnliche transkriptionelle Repressionseigenschaften bei unterschiedlichen Reporterkonstrukten und in Koloniebildungsassays mit HPV18-positiven HeLa Zellen. Biochemische Untersuchungen belegten, dass 16 und 18E8<sup>E2C</sup> ähnlich wie 31E8<sup>E2C</sup> mit HDAC3 und CHD6 interagierten. Eine Mutation des konservierten KWK-Motivs verhinderte die Interaktion mit HDAC3 und führte zu einem Verlust der E8-abhängigen transkriptionellen Repression. Zusammengefasst legt dies nahe, dass nicht nur die Expression von E8<sup>E2C</sup> Proteinen sondern auch die Rekrutierung des N-CoR-Repressorkomplex durch die E8-Domäne und die Bindung an CHD6 über die E2C Domäne unter HPV hoch konserviert ist. Der Verlust der E8<sup>E2C</sup>-Expression bei HPV16 und HPV31 führt zur einer starken kurzfristigen Überreplikation der Genome (Stubenrauch, Hummel et al. 2000; Lace, Anson et al. 2008). Allerdings integrieren HPV31 E8<sup>E2C</sup>-Genome bei langfristiger Kultur in die Wirtschromosomen, während HPV16 E8<sup>E2C</sup>-Genome in ca. 10-fach höherer Kopienzahl extrachromosomal replizieren können

(Stubenrauch, Hummel et al. 2000; Lacey, Anson et al. 2008). Da HPV16 und 31 E8<sup>E2C</sup> funktionell sehr ähnlich sind, beruht dies vermutlich nicht auf grundlegend unterschiedlichen Eigenschaften der E8<sup>E2C</sup> Proteine, sondern vermutlich auf anderen viralen Proteinen, deren Expression durch E8<sup>E2C</sup> kontrolliert wird.

### **5.3 Die 31E8 und die E2TA Domäne kann durch eine zelluläre KRAB-Domäne funktionell ersetzt werden**

Der Wachstumsarrest in HeLa Zellen nach Einbringen von E2 oder E8<sup>E2C</sup> Proteinen verschiedener HPV-Typen beruht weitestgehend auf der Repression der E6/E7 Expression und der Reaktivierung der p53- und pRB-Signalwege (Hwang, Naeger et al. 1996; Naeger, Goodwin et al. 1999; Wu, Goodwin et al. 2000; Stubenrauch, Straub et al. 2007). Für diesen Vorgang ist der E2C Anteil essentiell, da er die Bindung an E2BS im E6/E7-Promotor ermöglicht und CHD6 rekrutiert (McBride, Romanczuk et al. 1991) (Abb. 20). Allerdings benötigen sowohl E2 als auch E8<sup>E2C</sup> zusätzlich die jeweiligen aminoterminalen Domänen, um den HPV18 E6/E7 Promotor in HeLa Zellen zu inhibieren und einen Wachstumsarrest zu induzieren (Goodwin and DiMaio 2000; Nishimura, Ono et al. 2000; Stubenrauch, Straub et al. 2007). Fusionsproteine zwischen E2C und zellulären (Spi-E2C) oder viralen (VP16-E2C) Transkriptionsaktivatordomänen können den HPV18 E6/E7 Promotor nicht inhibieren und auch keinen Wachstumsarrest induzieren (Dowhanick, McBride et al. 1995; Goodwin and DiMaio 2000; Nishimura, Ono et al. 2000). Im Gegensatz dazu war das KRAB-E2C Fusionsprotein, das aus der KRAB-Domäne des KOX-1-Proteins und dem E2C-Teil besteht, in der Lage, ebenso wie 31E8<sup>E2C</sup> einen

Wachstumsarrest in HeLa-Zellen auszulösen und p53 sowie p21 zu induzieren. Im Einklang damit inhibierte das KRAB-E2C Protein den E6/E7 Promoter und andere E2BS-haltige Promotorkonstrukte. Auch für KRAB-E2C war eine Bindung an E2BS notwendig, da die KRAB-Domäne alleine weder einen Rückgang der Koloniezahl, noch eine Induktion von p53 und p21 bewirkte (Abb. 18). Als molekularer Mechanismus der KRAB-induzierten Transkriptionsrepression wird die Rekrutierung von TRIM28 durch die KRAB-Domäne von spezifisch DNA-bindenden Transkriptionsrepressoren und die Rekrutierung von HP1 durch TRIM28 postuliert (Friedman, Fredericks et al. 1996; Kim, Chen et al. 1996; Moosmann, Georgiev et al. 1996; Lechner, Begg et al. 2000). Eine Möglichkeit wäre, dass die Rekrutierung von Trim28/KAP1 durch 31E8<sup>E2C</sup> oder KRAB-E2C zur Promotorrepression führt. Allerdings hat eine siRNA Interferenz mit TRIM28 keinen Einfluss auf die E8<sup>E2C</sup>-induzierte Promotorrepression (Powell, Smith et al.) und die KRAB Domäne reprimiert Transkription im Gegensatz zu E8<sup>E2C</sup> unabhängig von HDACs (Powell, Smith et al. ; Lorenz, Koczan et al. 2001; Ammermann, Bruckner et al. 2008). Zudem kann die KRAB-Domäne zusätzlich über einen anderen, Trim28/KAP1-unabhängigen Weg reprimieren (Itokawa, Yanagawa et al. 2009). Vergleichenden Untersuchungen zur Repression des E6/E7 Promotors durch E2 und 31E8<sup>E2C</sup> legen nahe, dass beide Proteine dies über unterschiedliche zelluläre Interaktionspartner erreichen: während E2 Brd4, EP400 und SMXC benutzt, rekrutiert E8<sup>E2C</sup> den N-CoR Komplex (Powell, Smith et al. ; Smith, White et al.). Zusammenfassend legt dies nahe, dass die Repression des endogenen HPV18 E6/E7 Promotors in HeLa Zellen durch die Rekrutierung unterschiedlicher Korepressormoleküle erreicht werden kann und somit keine spezielle Eigenschaft viraler Proteine ist.

#### 5.4 Verschiedene Wege der Repression führen zum Ziel

Viele in den letzten Jahren veröffentlichte Untersuchungen haben gezeigt, dass es mehrere Möglichkeiten gibt, die Transkription zu regulieren. Die erste Möglichkeit bietet hierbei die Initiation der Transkription an den Promotoren der betreffenden Gene. Die eukaryotischen RNA-Polymerasen erkennen den Transkriptionsstartpunkt von Genen nur in Verbindung mit Transkriptionsfaktoren. Der RNA Polymerase II-Komplex (RNAPII) mit seinen assoziierten Transkriptionsfaktoren stellt den minimalen (basalen) Apparat für die Transkription dar. *In vivo* ist die basale Aktivität der RNAPII normalerweise durch die kompakte Organisation des Chromatins unterdrückt. Hier wird die Transkription erst durch regulatorische Transkriptionsfaktoren und deren Kofaktoren ermöglicht (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004; Roeder 2005). Die Rekrutierung von Kofaktoren, die die Chromatinstruktur in der Umgebung ihrer Zielgene beeinflussen, stellt eine weitere Möglichkeit der transkriptionellen Regulation dar. Kofaktoren verfügen oftmals über Enzymaktivitäten, mit der sie Histone, aber auch DNA, den basalen Transkriptionsapparat oder andere Transkriptionsfaktoren modifizieren können. Genreiche, transkriptionell aktive Abschnitte des Chromatins (Euchromatin) zeichnen sich gegenüber dem transkriptionell inaktiven Heterochromatin durch eine geringere Packungsdichte sowie durch spezifische Histonmodifikationen und -varianten aus.

Neben der Regulation der Chromatinstruktur und der Formation des Präinitiationskomplexes ist die Aktivität der Polymerase ein häufiger Angriffspunkt für transkriptionelle Regulation. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die C-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit des RNAPII-Komplexes. Sie wird innerhalb des Transkriptionszyklusses

reversibel phosphoryliert. Während verschiedener Phasen der Transkription weist die CTD unterschiedliche Phosphorylierungsmuster auf. Die CTD-Phosphorylierungen werden durch die Kinasen Cdk7, Cdk8 und Cdk9 katalysiert (Ramanathan, Rajpara et al. 2001; Washington, Ammosova et al. 2002; Pinhero, Liaw et al. 2004). Als molekularer Wirkmechanismus für die Transkriptionsrepression durch den N-CoR Komplex wurde postuliert, dass dies v.a. auf der Deacetylierung von Histonen und nicht-Histonproteinen durch HDAC3 beruht. HDAC3 inaktiviert den P-TEFb Komplex durch Deacetylierung der CDK9 Untereinheit und verhindert so die Phosphorylierung des CTD von RNA Polymerase II (Fu, Yoon et al. 2007). Außerdem führt der N-CoR-Komplex auch zu Chromatinmodifikationen, welche eine Repression der Transkription bewirken. HDAC3 deacetyliert spezifisch Histon H4 (H4) an mehreren Lysin (K5, K8, K12 und K16) (Karagianni and Wong 2007). Eine Konsequenz davon ist, dass Brd4, welches einen Aktivator von P-TEFb darstellt (Jang, Mochizuki et al. 2005), nicht mehr an H4 bindet (Zeng and Zhou 2002). Interessanterweise beruht die Transaktivierung und Repression durch E2 auf der Bindung des E2 Aminoterminus an Brd4 (Smith, White et al. ; McPhillips, Oliveira et al. 2006; Wu, Lee et al. 2006). Die Bindung von E2 an Brd4 verhindert die Phosphorylierung von P-TEFb, weil P-TEFb nicht in die aktive Form überführt werden kann und reprimiert so den E6/E7-Promotor (Yan, Li et al. 2009). Die Titrationsexperimente belegen, dass die E8 Repressordomäne die Transaktivierung durch E2 und E2 die Repression durch E8 beeinflusst (Abb.34). Dies könnte bedeuten, dass der E2 Aktivator über Brd4 und der E8<sup>E2C</sup> Repressor über HDAC3 P-TEFb als gemeinsame molekulare Zielstruktur benutzen, um so die Transkription auf Ebene der Transkriptionselongation zu regulieren.

Für CHD6 ist bekannt, dass es sowohl mit hypo- als auch mit hyperphosphorylierten Formen von RNA Polymerase II kolokalisiert (Lutz, Stoger et al. 2006). Das *Drosophila* Homolog von CHD7, Kis-L begünstigt die Elongation, indem es P-TEFb an den Promotor rekrutiert (Srinivasan, Dorighi et al. 2008). Außerdem wurde es als negativer Regulator der Histonmethylierung von Histon H3 K27 beschrieben (Srinivasan, Dorighi et al. 2008). Möglicherweise ist auch CHD6 an der Kontrolle der Transkriptelongation beteiligt.

Zusammengenommen könnte dies bedeuten, dass die transkriptionelle Repression durch E2 und E8<sup>E2C</sup> hauptsächlich durch die Hemmung der Aktivität der RNA Polymerase II vermittelt wird. Da ein derartiger Regulationsmechanismus vermutlich im Wesentlichen von den Mengen an E2 und E8<sup>E2C</sup> und deren Aktivität abhängt, ließen sich die unterschiedlichen Phasen im HPV Replikationszyklus wie initiale Etablierung nach Infektion, stabile Aufrechterhaltung in der Persistenzphase und Genomamplifikation nach Zelldifferenzierung durch Kontrolle der E2 und E8<sup>E2C</sup> Mengen erreichen.

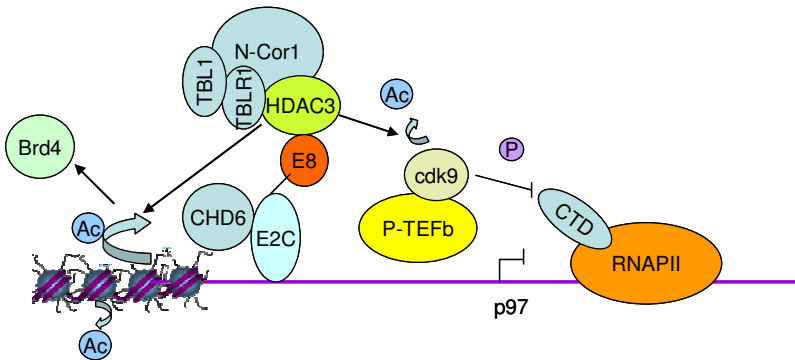


Abb. 36: Modell zur E8<sup>E2C</sup>-vermittelten transkriptionellen Repression des E6/E7-Promotors:

E8<sup>E2C</sup> rekrutiert über die E8-Domäne den N-CoR-Komplex. HDAC3 inaktiviert den P-TEFb Komplex durch Deacetylierung der CDK9 Untereinheit und verhindert so die Phosphorylierung des CTD von RNA Polymerase II. Zudem führt der N-CoR-Komplex zu Chromatinmodifikationen, welche eine Repression der Transkription bewirken. Durch die Deacetylierung von HDAC3 kann Brd4, welches einen Aktivator von P-TEFb darstellt, nicht mehr an acetylierte Histone binden.

Über die E2C-Domäne rekrutiert E8<sup>E2C</sup> den CHD6-Komplex, welcher die Nucleosomen verschiebt, oder über zusätzliche, bisher nicht identifizierte Komplexkomponenten weitere Chromatinmodifikationen vornimmt.

Die Elongation kann nicht fortgesetzt werden, da die CTD des RNAPII-Komplexes nicht phosphoryliert werden kann. Die Transkription des E6/E7-Promotors wird reprimiert.



## 6. Literaturverzeichnis

Ammermann, I., M. Bruckner, et al. (2008). "Inhibition of transcription and DNA replication by the papillomavirus E8-E2C protein is mediated by interaction with corepressor molecules." J Virol 82(11): 5127-36.

Aubry, F., M. G. Mattei, et al. (1998). "Identification of a human 17p-located cDNA encoding a protein of the Snf2-like helicase family." Eur J Biochem 254(3): 558-64.

Bagchi, A., C. Papazoglu, et al. (2007). "CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36." Cell 128(3): 459-75.

Bajpai, R., D. A. Chen, et al. "CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation." Nature 463(7283): 958-62.

Bussiere, D. E., X. Kong, et al. (1998). "Structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus serotype 31 at 2.4 Å." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 54(Pt 6 Pt 2): 1367-76.

Chiang, C. M., T. R. Broker, et al. (1991). "An E1M--E2C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is a sequence-specific transcription repressor." J Virol 65(6): 3317-29.

Choe, J., P. Vaillancourt, et al. (1989). "Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs." J Virol 63(4): 1743-55.

Cogliano, V., R. Baan, et al. (2005). "Carcinogenicity of human papillomaviruses." Lancet Oncol 6(4): 204.

Corden, S. A., L. J. Sant-Cassia, et al. (1999). "The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma." Mol Pathol 52(5): 275-82.

Cripe, T. P., T. H. Haugen, et al. (1987). "Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis." EMBO J 6(12): 3745-53.

Danos, O., M. Katinka, et al. (1982). "Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae." EMBO J 1(2): 231-6.

de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology 324(1): 17-27.

Demeret, C., C. Desaintes, et al. (1997). "Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of human papillomavirus type 18 viral oncogenes." J Virol 71(12): 9343-9.

Demeret, C., M. Yaniv, et al. (1994). "The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter." J Virol 68(11): 7075-82.

Denslow, S. A. and P. A. Wade (2007). "The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation." Oncogene 26(37): 5433-8.

Desaintes, C., C. Demeret, et al. (1997). "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis." EMBO J 16(3): 504-14.

Dong, G., T. R. Broker, et al. (1994). "Human papillomavirus type 11 E2 proteins repress the homologous E6 promoter by interfering with the binding of host transcription factors to adjacent elements." J Virol 68(2): 1115-27.

Dong, X. P., F. Stubenrauch, et al. (1994). "Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers." Int J Cancer 58(6): 803-8.

Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clin Sci (Lond) 110(5): 525-41.

Doorbar, J., A. Parton, et al. (1990). "Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line." Virology 178(1): 254-62.

Dostatni, N., P. F. Lambert, et al. (1991). "The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex." Genes Dev 5(9): 1657-71.

Dowhanick, J. J., A. A. McBride, et al. (1995). "Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein." J Virol 69(12): 7791-9.

Flaus, A., D. M. Martin, et al. (2006). "Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs." Nucleic Acids Res 34(10): 2887-905.

Frattini, M. G. and L. A. Laimins (1994). "Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A 91(26): 12398-402.

Friedman, J. R., W. J. Fredericks, et al. (1996). "KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain." Genes Dev 10(16): 2067-78.

Fu, J., H. G. Yoon, et al. (2007). "Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation." Mol Cell Biol 27(13): 4641-51.

Funk, J. O., S. Waga, et al. (1997). "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." Genes Dev 11(16): 2090-100.

Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." Genes Dev 14(2): 121-41.

Goodwin, E. C. and D. DiMaio (2000). "Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways." Proc Natl Acad Sci U S A 97(23): 12513-8.

Groner, A. C., S. Meylan, et al. (2010). "KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading." PLoS Genet 6(3): e1000869.

Guenther, M. G., W. S. Lane, et al. (2000). "A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness." Genes Dev 14(9): 1048-57.

Hall, J. A. and P. T. Georgel (2007). "CHD proteins: a diverse family with strong ties." Biochem Cell Biol 85(4): 463-76.

Helt, A. M., J. O. Funk, et al. (2002). "Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells." J Virol 76(20): 10559-68.

Hou, S. Y., S. Y. Wu, et al. (2000). "Alleviation of human papillomavirus E2-mediated transcriptional repression via formation of a TATA binding protein (or TFIID)-TFIIB-RNA polymerase II-TFIIF preinitiation complex." Mol Cell Biol 20(1): 113-25.

Howie, H. L., R. A. Katzenellenbogen, et al. (2009). "Papillomavirus E6 proteins." Virology 384(2): 324-34.

Huang, E. Y., J. Zhang, et al. (2000). "Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway." Genes Dev 14(1): 45-54.

- Hubert, W. G., T. Kanaya, et al. (1999). "DNA replication of human papillomavirus type 31 is modulated by elements of the upstream regulatory region that lie 5' of the minimal origin." J Virol 73(3): 1835-45.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." EMBO J 10(13): 4129-35.
- Hummel, M., J. B. Hudson, et al. (1992). "Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes." J Virol 66(10): 6070-80.
- Hwang, E. S., L. K. Naeger, et al. (1996). "Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene." Oncogene 12(4): 795-803.
- Hwang, E. S., D. J. Riese, 2nd, et al. (1993). "Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene." J Virol 67(7): 3720-9.
- Ilves, I., K. Maemets, et al. (2006). "Brd4 is involved in multiple processes of the bovine papillomavirus type 1 life cycle." J Virol 80(7): 3660-5.
- Ito, Y., T. Yanagawa, et al. (2009). "KAP1-independent transcriptional repression of SCAN-KRAB-containing zinc finger proteins." Biochem Biophys Res Commun 388(4): 689-94.
- Jang, M. K., K. Mochizuki, et al. (2005). "The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription." Mol Cell 19(4): 523-34.
- Jeckel, S., E. Loetzsch, et al. (2003). "Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of

transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus." J Virol 77(16): 8736-44.

Jeon, S. and P. F. Lambert (1995). "Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 92(5): 1654-8.

Jepsen, K. and M. G. Rosenfeld (2002). "Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes." J Cell Sci 115(Pt 4): 689-98.

Johung, K., E. C. Goodwin, et al. (2007). "Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence." J Virol 81(5): 2102-16.

Jones, D. L. and K. Munger (1996). "Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators." Semin Cancer Biol 7(6): 327-37.

Jones, P. L., L. M. Sachs, et al. (2001). "Multiple N-CoR complexes contain distinct histone deacetylases." J Biol Chem 276(12): 8807-11.

Kanaya, T., S. Kyo, et al. (1997). "The 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region acts as an enhancer which augments viral early expression through the action of YY1." Virology 237(1): 159-69.

Karagianni, P. and J. Wong (2007). "HDAC3: taking the SMRT-N-CoR road to repression." Oncogene 26(37): 5439-49.

Kim, S. S., Y. M. Chen, et al. (1996). "A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 93(26): 15299-304.

Klucsevsek, K., M. Wertz, et al. (2007). "Characterization of the nuclear localization signal of high risk HPV16 E2 protein." Virology 360(1): 191-8.

Knipe, D. H., PM; Griffin, DE (2007). Fields Virology, Lippincott Williams & Wilkins.

Lace, M. J., J. R. Anson, et al. (2008). "The E8--E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes." J Virol 82(21): 10841-53.

Lace, M. J., J. R. Anson, et al. (2008). "Functional mapping of the human papillomavirus type 16 E1 cistron." J Virol 82(21): 10724-34.

Lambert, P. F., B. C. Monk, et al. (1990). "Phenotypic analysis of bovine papillomavirus type 1 E2 repressor mutants." J Virol 64(2): 950-6.

Lathrop, M. J., L. Chakrabarti, et al. "Deletion of the Chd6 exon 12 affects motor coordination." Mamm Genome 21(3-4): 130-42.

Lechner, M. S., G. E. Begg, et al. (2000). "Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential." Mol Cell Biol 20(17): 6449-65.

Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell 88(3): 323-31.

Li, J., J. Wang, et al. (2000). "Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3." EMBO J 19(16): 4342-50.

Liang, H., A. M. Petros, et al. (1996). "Solution structure of the DNA-binding domain of a human papillomavirus E2 protein: evidence for flexible DNA-binding regions." Biochemistry 35(7): 2095-103.

Lorenz, P., D. Koczan, et al. (2001). "Transcriptional repression mediated by the KRAB domain of the human C2H2 zinc finger protein Kox1/ZNF10 does not require histone deacetylation." Biol Chem 382(4): 637-44.

Lutz, T., R. Stoger, et al. (2006). "CHD6 is a DNA-dependent ATPase and localizes at nuclear sites of mRNA synthesis." FEBS Lett 580(25): 5851-7.

Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." Oncogene 20(54): 7874-87.

Margolin, J. F., J. R. Friedman, et al. (1994). "Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains." Proc Natl Acad Sci U S A 91(10): 4509-13.

McBride, A. A., J. C. Byrne, et al. (1989). "E2 polypeptides encoded by bovine papillomavirus type 1 form dimers through the common carboxyl-terminal domain: transactivation is mediated by the conserved amino-terminal domain." Proc Natl Acad Sci U S A 86(2): 510-4.

McBride, A. A., H. Romanczuk, et al. (1991). "The papillomavirus E2 regulatory proteins." J Biol Chem 266(28): 18411-4.

McKay, R. (1983). "Immunoassay for sequence-specific DNA-protein interaction." Methods Enzymol 92: 138-46.

McLaughlin-Drubin, M. E. and K. Munger (2009). "The human papillomavirus E7 oncoprotein." Virology 384(2): 335-44.

McPhillips, M. G., J. G. Oliveira, et al. (2006). "Brd4 is required for e2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses." J Virol 80(19): 9530-43.



- Mohr, I. J., R. Clark, et al. (1990). "Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator." Science 250(4988): 1694-9.
- Moosmann, P., O. Georgiev, et al. (1996). "Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1." Nucleic Acids Res 24(24): 4859-67.
- Munoz, N., F. X. Bosch, et al. (2004). "Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective." Int J Cancer 111(2): 278-85.
- Naeger, L. K., E. C. Goodwin, et al. (1999). "Bovine papillomavirus E2 protein activates a complex growth-inhibitory program in p53-negative HT-3 cervical carcinoma cells that includes repression of cyclin A and cdc25A phosphatase genes and accumulation of hypophosphorylated retinoblastoma protein." Cell Growth Differ 10(6): 413-22.
- Nioi, P., T. Nguyen, et al. (2005). "The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation." Mol Cell Biol 25(24): 10895-906.
- Nishimura, A., T. Ono, et al. (2000). "Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition." J Virol 74(8): 3752-60.
- Nishiyama, M., K. Oshikawa, et al. (2009). "CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis." Nat Cell Biol 11(2): 172-82.
- Oldak, M., H. Smola, et al. (2004). "The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes." J Virol 78(19): 10738-46.

- Palermo-Dilts, D. A., T. R. Broker, et al. (1990). "Human papillomavirus type 1 produces redundant as well as polycistronic mRNAs in plantar warts." J Virol 64(6): 3144-9.
- Park, J. S., E. S. Hwang, et al. (1997). "Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers." Gynecol Oncol 65(1): 121-9.
- Perissi, V., A. Aggarwal, et al. (2004). "A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors." Cell 116(4): 511-26.
- Pett, M. R., W. O. Alazawi, et al. (2004). "Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes." Cancer Res 64(4): 1359-68.
- Pinhero, R., P. Liaw, et al. (2004). "Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II." Eur J Biochem 271(5): 1004-14.
- Powell, M. L., J. A. Smith, et al. "NCoR1 Mediates Papillomavirus E8;E2C Transcriptional Repression." J Virol.
- Rabilloud, T. (1990). "Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis." Electrophoresis 11(10): 785-94.
- Ramanathan, Y., S. M. Rajpara, et al. (2001). "Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences." J Biol Chem 276(14): 10913-20.
- Rodriguez-Paredes, M., M. Ceballos-Chavez, et al. (2009). "The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene." Nucleic Acids Res 37(8): 2449-60.

- Roeder, R. G. (2005). "Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells." FEBS Lett 579(4): 909-15.
- Romanczuk, H., F. Thierry, et al. (1990). "Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters." J Virol 64(6): 2849-59.
- Rotenberg, M. O., C. M. Chiang, et al. (1989). "Characterization of cDNAs of spliced HPV-11 E2 mRNA and other HPV mRNAs recovered via retrovirus-mediated gene transfer." Virology 172(2): 468-77.
- Saether, T., T. Berge, et al. (2007). "The chromatin remodeling factor Mi-2alpha acts as a novel co-activator for human c-Myb." J Biol Chem 282(19): 13994-4005.
- Schneider-Maunoury, S., O. Croissant, et al. (1987). "Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors." J Virol 61(10): 3295-8.
- Schroter, H., G. Maier, et al. (1985). "DNA intercalators induce specific release of HMG 14, HMG 17 and other DNA-binding proteins from chicken erythrocyte chromatin." EMBO J 4(13B): 3867-72.
- Schuster, E. F. and R. Stoger (2002). "CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases." Mamm Genome 13(2): 117-9.
- Schwarz, E., U. K. Freese, et al. (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." Nature 314(6006): 111-4.
- Schweiger, M. R., M. Ottinger, et al. (2007). "Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins." J Virol 81(18): 9612-22.

Sedman, J. and A. Stenlund (1995). "Co-operative interaction between the initiator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus in vivo and in vitro." EMBO J 14(24): 6218-28.

Sedman, J. and A. Stenlund (1996). "The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure." EMBO J 15(18): 5085-92.

Sen, E., J. L. Bromberg-White, et al. (2002). "Genetic analysis of cis regulatory elements within the 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle." J Virol 76(10): 4798-809.

Senechal, H., G. G. Poirier, et al. (2007). "Amino acid substitutions that specifically impair the transcriptional activity of papillomavirus E2 affect binding to the long isoform of Brd4." Virology 358(1): 10-7.

Seo, Y. S., F. Muller, et al. (1993). "Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E2 protein enhances binding of E1 protein to the BPV replication origin." Proc Natl Acad Sci U S A 90(7): 2865-9.

Sims, R. J., 3rd, R. Belotserkovskaya, et al. (2004). "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." Genes Dev 18(20): 2437-68.

Smith, J. A., E. A. White, et al. "Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression." Proc Natl Acad Sci U S A 107(8): 3752-7.

Snijders, P. J., A. J. van den Brule, et al. (1992). "Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6\* transcript species which are terminated at different early region poly(A) sites." J Virol 66(5): 3172-8.

- Srinivasan, S., K. M. Dorigi, et al. (2008). "Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II." PLoS Genet 4(10): e1000217.
- Stevaux, O. and N. J. Dyson (2002). "A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function." Curr Opin Cell Biol 14(6): 684-91.
- Stubenrauch, F., A. M. Colbert, et al. (1998). "Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions." J Virol 72(10): 8115-23.
- Stubenrauch, F., M. Hummel, et al. (2000). "The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes." J Virol 74(3): 1178-86.
- Stubenrauch, F. and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." Semin Cancer Biol 9(6): 379-86.
- Stubenrauch, F., H. B. Lim, et al. (1998). "Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31." J Virol 72(2): 1071-7.
- Stubenrauch, F., E. Straub, et al. (2007). "The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins." Int J Cancer 121(10): 2284-92.
- Stubenrauch, F., T. Zobel, et al. (2001). "The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31." J Virol 75(9): 4139-49.
- Surapureddi, S., S. Yu, et al. (2002). "Identification of a transcriptionally active peroxisome proliferator-activated receptor alpha -interacting cofactor complex in

rat liver and characterization of PRIC285 as a coactivator." Proc Natl Acad Sci U S A 99(18): 11836-41.

Takada, I., M. Mihara, et al. (2007). "A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation." Nat Cell Biol 9(11): 1273-85.

Tan, S. H., L. E. Leong, et al. (1994). "The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID." J Virol 68(10): 6411-20.

Thierry, F. and P. M. Howley (1991). "Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter." New Biol 3(1): 90-100.

Thomas, N. S., A. R. Pizzey, et al. (1998). "p130, p107, and pRb are differentially regulated in proliferating cells and during cell cycle arrest by alpha-interferon." J Biol Chem 273(37): 23659-67.

Thompson, B. A., V. Tremblay, et al. (2008). "CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes." Mol Cell Biol 28(12): 3894-904.

Thompson, P. M., T. Gotoh, et al. (2003). "CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system." Oncogene 22(7): 1002-11.

Turek, L. P. (1994). "The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer." Adv Virus Res 44: 305-56.

Underhill, C., M. S. Qutob, et al. (2000). "A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1." J Biol Chem 275(51): 40463-70.

Ustav, M., E. Ustav, et al. (1991). "Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1." EMBO J 10(13): 4321-9.

Vanti, M., E. Gallastegui, et al. (2009). "Yeast genetic analysis reveals the involvement of chromatin reassembly factors in repressing HIV-1 basal transcription." PLoS Genet 5(1): e1000339.

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol 189(1): 12-9.

Washington, K., T. Ammosova, et al. (2002). "Protein phosphatase-1 dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase-II." J Biol Chem 277(43): 40442-8.

Webster, K., J. Parish, et al. (2000). "The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway." J Biol Chem 275(1): 87-94.

Wells, S. I., D. A. Francis, et al. (2000). "Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways." EMBO J 19(21): 5762-71.

Woodage, T., M. A. Basrai, et al. (1997). "Characterization of the CHD family of proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 94(21): 11472-7.

Wu, L., E. C. Goodwin, et al. (2000). "E2F-Rb complexes assemble and inhibit cdc25A transcription in cervical carcinoma cells following repression of human papillomavirus oncogene expression." Mol Cell Biol 20(19): 7059-67.

Wu, S. Y., A. Y. Lee, et al. (2006). "Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing." Genes Dev 20(17): 2383-96.

- Xue, Y., J. Wong, et al. (1998). "NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities." Mol Cell 2(6): 851-61.
- Yan, J., Q. Li, et al. (2009). "Abrogation of the Brd4-P-TEFb Positive Transcription Complex by the Papillomavirus E2 protein Contributes to the Viral Oncogene Repression." J Virol.
- Yates, J. A., T. Menon, et al. "Regulation of HOXA2 gene expression by the ATP-dependent chromatin remodeling enzyme CHD8." FEBS Lett 584(4): 689-93.
- Yoon, H. G., D. W. Chan, et al. (2003). "Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1." EMBO J 22(6): 1336-46.
- Zeng, L. and M. M. Zhou (2002). "Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain." FEBS Lett 513(1): 124-8.
- Zhang, D., H. G. Yoon, et al. (2005). "JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2)." Mol Cell Biol 25(15): 6404-14.
- Zhang, J., M. Kalkum, et al. (2002). "The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2." Mol Cell 9(3): 611-23.
- Zobel, T., T. Iftner, et al. (2003). "The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins." Mol Cell Biol 23(22): 8352-62.



## 7. Publikationen

Von dieser Arbeit unabhängige oder bereits erschienene Publikationen:

**An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia.**

Sohn K, Senyürek I, [Fertey J](#), Königsdorfer A, Joffroy C, Hauser N, Zelt G, Brunner H, Rupp S.

[FEMS Yeast Res.](#) 2006 Nov;6(7):1085-93.

**The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins.**

Stubenrauch F, Straub E, [Fertey J](#), Iftner T.

[Int J Cancer.](#) 2007 Nov 15; 121(10):2284-92.

Publikationen in denen Teile dieser Arbeit veröffentlicht werden:

**Interaction of the papillomavirus E8<sup>E2C</sup> protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression**

[Fertey J](#), Ammermann I, Stoeger R, Winkler M, Iftner T, Stubenrauch F  
[J Virol](#), 2010 Sep; 84(18):9505-15

**Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk HPV E8<sup>E2C</sup> proteins and can also be achieved by a chimaeric artificial repressor**

[Fertey J](#), Hurst J, Straub E, Schenker A, Iftner T, Stubenrauch F  
[J Virol](#), in Revision

## 8. Danksagung

### Ich möchte mich herzlich bedanken bei

**PD Dr. Frank Stubenrauch** für die immer geduldige Bereitschaft, Probleme zu lösen, für die ausführliche und nette Betreuung der Arbeit und für die Möglichkeit, in dieser Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen.

**Prof. Dr. Thomas Iftner** für die Möglichkeit am Institut für medizinische Virologie und Epidemiologie, Sektion Experimentelle Virologie, diese Arbeit anfertigen zu können, und für die Ratschläge während der Besprechungen,

**Prof. Dr. Hans Georg Rammensee** für die Betreuung dieser Arbeit durch die Fakultät für Biologie und die Übernahme der Tätigkeit als Erstgutachter.

Besonderer Dank gilt **Elke Straub**, ohne deren bereitwillige Hilfe und Ratschläge diese Arbeit nicht in dieser Form hätte entstehen können. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner „Bench-nachbarin“ **Jeanette Reiser** für die vielen heiteren Momente, **Anna Manawapat** und **José Hurst** für die angenehmen Pausen zwischendurch, sowie **Peter Münch** für allerlei fachlichen Rat, und bei allen anderen (auch ehemaligen) Mitgliedern der AGs Iftner/Stubenrauch, für die Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Partner **Marcus Böhm**, der während der ganzen Jahre geduldig alle meine Launen ertragen hat und mich bisher in allen schwierigen Situationen unterstützt hat.

## 9. Akademischer Lebenslauf

- Ab 01.2006                      Promotion " **Zelluläre Ko-Repressoren als funktionelle Interaktoren des Papillomvirus E8<sup>E</sup>E2C-Proteins**" am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Sektion Experimentelle Virologie unter Anleitung von PD Dr. Frank Stubenrauch
- 10.2000-10.2005                Studium der Biologie an der Universität Hohenheim  
Hauptfach:            Mikrobiologie  
Nebenfächer:        Genetik  
    Medizinische Mikrobiologie  
Diplomarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik: **„Differentielle Genexpressionsanalysen von *Candida albicans* am vaginalen Infektionsmodell“** (Note 1,0)  
Abschluss: Diplom in Biologie (Note: 1,2) am 23.09.2005
- 08.1990-06.1999                Besuch des Goethe-Gymnasiums in Ludwigsburg  
Abschluss: Abitur (Note 2,5)