

**Identifizierung und Charakterisierung
zellulärer Interaktionspartner des minoren
Kapsidproteins L2 des
Humanen Papillomvirus 16**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Marc Andre Schneider
geb. am 09.10.1982 in Hachenburg

Mainz, 2011

Wissenschaftliche Publikationen

Schneider MA, Spoden GA, Florin L, Lambert C. (2011): Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell Microbiol.* 2011 Jan;13(1):32-46.

Präsentationen auf internationalen Tagungen

- | | |
|----------------------|---|
| Vortrag | 8 th Workshop 'Cell Biology of Viral Infections' of the German Society of Virology (GfV) in Deidesheim, October 5 th -7 th 2009. |
| Posterpräsentationen | 21 st Annual Meeting of the GfV (Society for Virology) and the DVV in Freiburg, March 23 th -26 th 2011. |
| | 1 st International Symposium: Protein Trafficking in Health and Disease in Hamburg, May 26 th -28 th 2010. |
| | The 19 th Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" (GfV, Society for Virology) in Leipzig, March 18 th -21 st 2009. |

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	HUMANE PAPILLOMVIREN	1
1.1.1	GESCHICHTE DER PAPILLOMVIREN	1
1.1.2	EPIDEMIOLOGIE	2
1.1.3	DAS HPV-GENOM	2
1.1.4	DIE KAPSID-STRUKTUR	4
1.1.5	DER HPV-INFEKTIONSZYKLUS	5
1.2	DER MOTORPROTEIN-KOMPLEX DYNEIN	13
1.2.1	DIE ROLLE DER LEICHTEN KETTEN IM DYNEINKOMPLEX	15
1.3	DIE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN DER T-BOX-FAMILIE	16
1.3.1	DIE T-BOX-PROTEINE TBX2 UND TBX3	18
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
2	MATERIAL	22
2.1	GERÄTE UND LABORMATERIALIEN	22
2.2	CHEMIKALIEN	23
2.3	FERTIGREAGENZIEN UND KITS	23
2.4	ANTIKÖRPER	24
2.4.1	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	24
2.4.2	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	25
2.5	HÄUFIG VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN	25
2.6	ENZYME	27
2.7	PLASMIDKONSTRUKTE	27
2.7.1	PLASMIDKONSTRUKTE FÜR DAS HEFE-2-HYBRID-PROJEKT	27
2.7.2	PLASMIDKONSTRUKTE FÜR DAS DYNEIN-PROJEKT	28
2.7.3	PLASMIDKONSTRUKTE FÜR DAS TBX2-PROJEKT	30
2.8	OLIGONUKLEOTIDE	33
2.9	BAKTERIENSTÄMME	34
2.10	BAKTERIENKULTUREN	34
2.11	HEFEN	35
2.12	HEFEMEDIEN	35
2.13	CDNA-BANK	35
2.14	ZELLKULTUREN, MEDIEN UND ZUSÄTZE	36
2.15	GRÖßENSTANDARDS	37
3	METHODEN	38
3.1	POLYMERASEKETTENREAKTION	38
3.1.1	STANDARD-PCR	38
3.1.2	MUTAGENESE-PCR	39
3.2	HEFE-2 HYBRID-SYSTEM	41
3.2.1	AMPLIFIKATION DER CDNA-BANK	41
3.2.2	TRANSFORMATION DER HEFEN MIT DEM KÖDER	42
3.2.3	TEST AUF TRANSAKTIVIERENDE EIGENSCHAFTEN DER BEUTE	43
3.2.4	TRANSFORMATION DER HEFEN MIT DER BEUTE	44
3.2.5	ISOLATION VON PLASMID-DNA AUS HEFE	44
3.2.6	RÜCKTEST DER INTERAKTION IM HEFE-2-HYBRID-SYSTEM	44
3.2.7	NACHWEIS DER EXPRESSION VON KÖDER- UND BEUTE-PROTEINEN IN DER HEFE	45
3.3	ZELLKULTUR	45
3.3.1	KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN	45
3.3.2	DNA-TRANSFEKTION VON ADHÄRENTEN SÄUGERZELLEN	46
3.3.3	REPORTERGEN-ASSAY	46
3.3.4	RNA-INTERFERENZ (SIRNA)	48
3.3.5	HERSTELLUNG VON PSEUDOVIREN	49
3.3.6	INFEKTIONSASSAY NACH SIRNA-VERMITTELTER DEPLETION ZELLULÄRER PROTEINE	50
3.3.7	EINBRINGEN VON ANTIKÖRPERN IN ZIELZELLEN	51
3.3.8	LDH-ASSAY	51
3.3.9	KOIMMUNPRÄZIPITATION	52
3.3.10	IMMUNPRÄZIPITATION MIT MAGNETISCHEN KUGELN (μ MACS SYSTEM)	53

3.3.11	IMMUNPRÄZIPITATION MIT PROTEIN A/G-AGAROSE	55
3.3.12	CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION.....	56
3.3.13	IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE.....	58
3.3.14	ENTPARAFFINIEREN VON PARAFFINSCHNITTEN	59
3.3.15	TYPISIERUNG DER CIN-GEWEBESCHNITTE.....	59
3.3.16	ENTPARAFFINIEREN UND IMMUNHISTOCHEMIE DER CIN-SCHNITTE	60
3.3.17	MIKROSKOPISCHE DOKUMENTATION.....	61
3.4	ARBEITEN MIT BAKTERIEN.....	61
3.4.1	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON GST-FUSIONSPROTEINEN IN <i>E.COLI</i>	61
3.4.2	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	62
3.4.3	GST-IMMOBILISIERUNG	63
4	ERGEBNISSE	65
4.1	HEFE-2-HYBRID-SCREENING.....	65
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION VON L2 MIT DEM DYNEIN-KOMPLEX.....	69
4.2.1	DYNLT1 UND L2 WERDEN IN DER HEFE EXPRIMIERT.....	69
4.2.2	DIE EXPRESSION VON L2 FÜHRT ZU EINER RELOKALISATION VON DYNLT1.....	69
4.2.3	L2 INTERAGIERT MIT DYNLT1	71
4.2.4	EIN POTENTIELLES DYNLT1-INTERAKTIONSMOTIV VON L2 IST FÜR L2-VERMITTELTE RELOKALISATION VON DYNLT1 ENTBEHRlich.....	72
4.2.5	L2 INTERAGIERT AUCH MIT DYNLT3, EINER WEITEREN LEICHTEN KETTE DER TCTEX-GRUPPE.....	73
4.2.6	DIE LEICHTE KETTE DYNLT3 WIRD EBENFALLS DURCH L2 IN DEN ZELLKERN REKRUTIERT, NICHT ABER DYNLL1 UND DIE MITTELSCHWERE KETTE DYNC111	75
4.2.7	DYNLT1 UND DYNLT3 KOLOKALISIEREN NACH DER EXPRESSION VON L2 MIT DEM PML-PROTEIN IM ZELLKERN.....	76
4.3	DIE ROLLE DER LEICHTEN KETTEN DYNLT1 UND DYNLT3 BEI DER INFEKTION.....	78
4.3.1	HPV16 L2 KOLOKALISIERT WÄHREND INFEKTION MIT DEN LEICHTEN KETTEN	78
4.3.2	DIE DEPLETION DER LEICHTEN KETTEN INHIBIERT DIE INFEKTION VON HPV16.....	80
4.3.3	DIE TRANSIENTE EXPRESSION DER LEICHTEN KETTEN DYNLT1 UND DYNLT3 ERHÖHT DIE INFEKTION MIT HPV16-PSEUDOVIREN.....	83
4.3.4	DIE DEPLETION VON DYNLT1 UND DYNLT3 FÜHRT ZU EINER PERINUKLEÄREN AKKUMULATION VON L2	84
4.3.5	DIE INFEKTION MIT HPV16-PSEUDOVIREN LÄSST SICH MIT ANTIKÖRPERN GEGEN DYNLT1 UND DYNLT3 INHIBIEREN	85
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION VON L2 MIT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN TBX2 UND TBX3.....	86
4.4.1	TBX2 UND L2 WERDEN IN DER HEFE EXPRIMIERT.....	86
4.4.2	L2 INTERAGIERT MIT TBX2 UND TBX3 <i>IN VITRO</i>	87
4.4.3	DIE EXPRESSION VON TBX2 UND TBX3 FÜHRT ZU EINER RELOKALISATION VON L2.....	88
4.5	DIE ROLLE VON TBX2 UND TBX3 IM REPLIKATIONSZYKLUS VON HUMANEN PAPILLOMVIREN.....	91
4.5.1	TBX2 UND TBX3 REGULIEREN DIE KONTROLLREGION DES HPV-GENOMS.....	91
4.5.2	TBX2 UND TBX3 INHIBIEREN AUCH DIE KONTROLLREGION ANDERER HPV-TYPEN.....	93
4.5.3	L2 KOLOKALISIERT MIT ENDOGENEM TBX2 IN MCF-7 ZELLEN UND KANN DIE LCR MIT TBX2 UND TBX3 REGULIEREN	94
4.5.4	DIE INHIBITION DER KONTROLLREGION DURCH TBX2 UND TBX3 IST DOSIS-ABHÄNGIG.....	96
4.5.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKALISATION DER TBX2-INTERAKTIONSDOMÄNE INNERHALB DER KONTROLLREGION VON HPV16.....	98
4.5.6	EINE MURINE DNA-BINDEDEFIZIENTE TBX2-MUTANTE IST NICHT MEHR IN DER LAGE, DIE KONTROLLREGION VON HPV16 ZU REGULIEREN.....	100
4.5.7	DIE EXPRESSION VON L2 FÜHRT ZU EINER RELOKALISATION VON TBX2 R122/123E, NICHT ABER VON TBX2	102
4.5.8	TBX2 UND TBX3 BINDEN AN DIE KONTROLLREGION VON HPV18.....	105
4.5.9	HPV16L2 KOLOKALISIERT AUCH <i>IN VIVO</i> MIT TBX2.....	108

5	DISKUSSION	111
5.1	IDENTIFIZIERUNG ZELLULÄRER INTERAKTIONSPARTNER VON HPV16 L2 MIT HILFE DES HEFE-2-HYBRID-SYSTEMS	112
5.2	DIE ROLLE DER LEICHTEN KETTEN DYNLT1 UND DYNLT3 BEI DER HPV16- INFEKTION	114
5.2.1	L2 BINDET AN DIE LEICHTEN KETTEN DYNLT1 UND DYNLT3 DES DYNEIN KOMPLEXES.....	115
5.2.2	DIE ROLLE VON DYNLT1 UND DYNLT3 BEI DER INFEKTION MIT HPV16.....	116
5.3	CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTION VON L2 MIT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN TBX2 UND TBX3.....	120
5.3.1	L2 BINDET AN DIE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN TBX2 UND TBX3	121
5.3.2	DIE ROLLE VON TBX2 UND TBX3 IM REPLIKATIONSZYKLUS VON HPV16	123

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1-1: STRUKTUR DES HPV16-GENOMS	3
ABBILDUNG 1-2: AUFBAU DER KONTROLLREGION VON HPV16	3
ABBILDUNG 1-3: 3D-REKONSTRUKTION DER KAPSIDSTRUKTUR VON HPV16.....	4
ABBILDUNG 1-4: PRODUKTIVER LEBENSZYKLUS VON HUMANEN PAPILLOMVIREN	6
ABBILDUNG 1-5: ÜBERSICHT DER HPV16-INFESTION.....	7
ABBILDUNG 1-6: FUNKTIONSÜBERSICHT DER ONKOGENE E6 UND E7	12
ABBILDUNG 1-7: STADIEN DER ZERVIKALEN INTRAEPITHELIALEN NEOPLASIE (CIN) NACH EINER HPV-INFESTION. 13	
ABBILDUNG 1-8: AUFBAU DER MIKROTUBULI	14
ABBILDUNG 1-9: AUFBAU DES DYNEIN-KOMPLEXES.	14
ABBILDUNG 1-10: REGULATIONSMECHANISMEN DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.	17
ABBILDUNG 1-11: ALLGEMEINE STRUKTUR DER T-BOX-PROTEINE	18
ABBILDUNG 1-12: REGULATION DES SENESZENZ ÜBER DEN ARF/MDM2/P53/P21 ^{CIP1} – SIGNALWEG.....	20
ABBILDUNG 2-1: PROTEIN-GRÖßENSTANDARD	46
ABBILDUNG 2-2: DNA-GRÖßENSTANDARD	37
ABBILDUNG 3-1: PRINZIP DER PLASMID-MUTAGENESE.....	40
ABBILDUNG 3-2. PRINZIP DES HEFE-2-HYBRIDSYSTEMS HYBRID HUNTER™.....	41
ABBILDUNG 3-3: PRINZIP DER RNA-INTERFERENZ NACH siRNA-TRANSFEKTION.....	49
ABBILDUNG 3-4: PRINZIP DES CYTOTOXICITY DETECTION KIT ^{PLUS} (LDH).	52
ABBILDUNG 3-5: PRINZIP DER CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION	57
ABBILDUNG 4-1: TEST DER KÖDER, POSITIV- UND NEGATIVKONTROLLE AUF DAS REPORTERSYSTEM IM HYBRID HUNTER™.....	65
ABBILDUNG 4-2: EINFLUSS VON 3-AT AUF DIE BILDUNG DES AUXOTROPEN MARKERS HISTIDIN BEI UNTERSCHIEDLICHEN L2-MUTANTEN.....	66
ABBILDUNG 4-3: ERGEBNIS DES HEFE-2-HYBRID-SCREENINGS MIT L2.	67
ABBILDUNG 4-4: NACHWEIS DER EXPRESSION VON L2 280-473 (KÖDER) UND DYNLT1 (BEUTE) IN HEFEZELLEN. 69	
ABBILDUNG 4-5: HPV L2 KOLOKALISIERT MIT DYNLT1 IN IMMUNFLUORESCENZSTUDIEN ZUR INTRAZELLULÄREN LOKALISATION VON L2 UND DYNLT1.....	70
ABBILDUNG 4-6: DYNLT1 KOLOKALISIERT MIT DER MITTELSCHWEREN KETTE DYNC111 DES DYNEINKOMPLEXES. 70	
ABBILDUNG 4-7: L2 INTERAGIERT MIT DYNLT1.....	71
ABBILDUNG 4-8: DIE DELETIONSMUTANTE L2 1-454 FÜHRT WIE L2WT ZU EINER RELOKALISATION VON DYNLT1	72
ABBILDUNG 4-9: L2 WIRD BEI DER IMMOBILISIERUNG VON GST-DYNLT1 UND GST-DYNLT3 KOGEFÄLLT.	73
ABBILDUNG 4-10: L2 INTERAGIERT MIT HA-DYNLT1 UND HA-DYNLT3.	74
ABBILDUNG 4-11: DIE EXPRESSION VON L2 FÜHRT ZU EINER AKKUMULATION VON DYNLT3 IM NUKLEUS.....	75
ABBILDUNG 4-12: HA-DYNLT3 UND HA-DYNLL1 KOLOKALISIEREN MIT DER MITTELSCHWEREN KETTE DYNC111 DES DYNEINKOMPLEXES.	76
ABBILDUNG 4-13: DYNLT1 UND DYNLT3 KOLOKALISIEREN MIT L2 AN DEN ND-10.....	77
ABBILDUNG 4-14: DIE KOLOKALISATION VON DYNLT1 UND DYNLT3 MIT DEM PML-PROTEIN IST NACH DER EXPRESSION VON L2 SIGNIFIKANT ERHÖHT.	78
ABBILDUNG 4-15: NACH DER INFESTION MIT HPV16-PSEUDOVIREN KOLOKALISIERT L2 MIT DYNLT1 UND DYNLT3.....	79
ABBILDUNG 4-16: 24 H NACH DER INFESTION MIT HPV16-PSEUDOVIREN KOLOKALISIEREN DYNLT1 UND DYNLT3 MIT L2 UND DEM PML-PROTEIN IM ZELLKERN.....	80
ABBILDUNG 4-17: DEPLETION VON DYNLT1 UND DYNLT3 IN HeLa- UND HaCaT-ZELLEN DURCH RNA-INTERFERENZ.	81
ABBILDUNG 4-18: DER siRNA-KNOCKDOWN VON DYNLT1 UND DYNLT3 FÜHRT ZU EINER INFESTIONINHIBITION IN HeLa-ZELLEN.....	82
ABBILDUNG 4-19: DIE INFESTION VON HaCaT-ZELLEN MIT HPV16-PSEUDOVIREN WIRD DURCH DIE DEPLETION VON DYNLT1 UND DYNLT3 INHIBIERT.	82
ABBILDUNG 4-20: DIE ÜBEREXPRESSION VON DYNLT1 UND DYNLT3 FÜHRT ZU EINER STEIGERUNG DER HPV-INFESTIÖSITÄT.	83
ABBILDUNG 4-21: DIE DEPLETION VON DYNLT1 UND DYNLT3 FÜHRT ZU EINER PERINUKLEÄREN AKKUMULATION VON L2 NACH DER INFESTION MIT HPV16-PSEUDOVIREN.....	84
ABBILDUNG 4-22: DIE INFESTION MIT HPV16-PSEUDOVIREN KONNTE DURCH SPEZIFISCHE ANTIKÖRPER GEGEN DYNLT1 UND DYNLT3 GEHEMT WERDEN.	85
ABBILDUNG 4-23: TBX2 UND L2 WERDEN IM HEFESTAMM L40 EXPRIERT.	86
ABBILDUNG 4-24: L2 INTERAGIERT MIT TBX2 UND TBX3.....	88

ABBILDUNG 4-25: DIE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN TBX2 UND TBX3 KOLOKALISIEREN MIT DNA.	89
ABBILDUNG 4-26: DIE EXPRESSION VON TBX2 UND TBX3 KANN ZU EINER VERÄNDERTEN LOKALISATION VON L2 IM NUKLEUS FÜHREN.	90
ABBILDUNG 4-27: TBX2 UND TBX3 REGULIEREN DIE KONTROLLREGION VON HPV16.	91
ABBILDUNG 4-28: EXPRESSIONSKONTROLLE ZU ABB. 4-27.	92
ABBILDUNG 4-29: TBX2 UND TBX3 INHIBIEREN AUCH DIE KONTROLLREGION VON HPV18 UND HPV11.	93
ABBILDUNG 4-30: L2 KOLOKALISIERT MIT ENDOGENEM TBX2 IN MCF-7-ZELLEN.	94
ABBILDUNG 4-31: TBX2 UND TBX3 REGULIEREN ZUSAMMEN MIT L2 DIE LCR IN MCF-7-ZELLEN.	95
ABBILDUNG 4-32: EXPRESSIONSKONTROLLE ZU ABB. 4-31.	95
ABBILDUNG 4-33: DIE INHIBITION DER KONTROLLREGION VON HPV16 DURCH TBX2 BZW. TBX3 IST DOSIS-ABHÄNGIG.	97
ABBILDUNG 4-34: KONTROLLREGION VON HPV16 UND FÜR ABB. 4-34 UND 4-35 VERWENDETE DELETIONS-KONSTRUKTE.	98
ABBILDUNG 4-35: DIE PROMOTORAKTIVITÄT DER HPV16-KONTROLLREGION (LCR) NIMMT MIT VERKÜRZUNG DER SEQUENZ DEUTLICH AB.	99
ABBILDUNG 4-36: EINFLUSS VON TBX2 AUF DIE AKTIVITÄT UNTERSCHIEDLICHER LCR-DELETIONSMUTANTEN.	99
ABBILDUNG 4-37: DIE MURINE DNA-BINDEDEFIZIENTE MUTANTE Tbx2 R122/123E HAT KEINEN INHIBITORISCHEN EINFLUSS AUF DIE HPV16 LCR (TEIL 1).	100
ABBILDUNG 4-38: DIE MURINE DNA-BINDEDEFIZIENTE MUTANTE Tbx2 R122/123E HAT KEINEN INHIBITORISCHEN EINFLUSS AUF DIE HPV16 LCR (TEIL 2).	101
ABBILDUNG 4-39: DIE DNA-BINDEDEFIZIENTE MUTANTE Tbx2 R122/123E INTERAGIERT MIT L2.	102
ABBILDUNG 4-40: DIE MURINE MUTANTE Tbx2 R122/123E KOLOKALISIERT IM GEGENSATZ ZUM WILDTYP NICHT MEHR MIT DNA.	103
ABBILDUNG 4-41: DIE MURINE MUTANTE Tbx2 R122/123E KOLOKALISIERT PARTIELL MIT PML-PROTEINEN. ...	103
ABBILDUNG 4-42: DIE MURINE MUTANTE Tbx2 R122/123E KOLOKALISIERT MIT L2.	104
ABBILDUNG 4-43: TBX2 UND TBX3 WERDEN BEI DER CHROMATIN-IP SPEZIFISCH PRÄZIPITIERT.	105
ABBILDUNG 4-44: VERWENDETE PRIMERPAARE FÜR DEN NACHWEIS DER LCR18 NACH DER CHROMATIN-IP	106
ABBILDUNG 4-45: TBX2 BZW. TBX3 BINDEN AN DIE KONTROLLREGION VON HPV18 (TEIL 1).	106
ABBILDUNG 4-46: TBX2 BZW. TBX3 BINDEN AN DIE KONTROLLREGION VON HPV18 (2).	107
ABBILDUNG 4-47: NACHWEIS VON HPV16-E1 IN ZERVIX-GEWEBESCHNITTEN.	108
ABBILDUNG 4-48: HPV16L1 UND L2 WERDEN IM HPV16-TYPISIERTEN CERVIX-GEWEBE EXPRIMIERT.	109
ABBILDUNG 4-49: L2 KOLOKALISIERT MIT TBX2 IN DEN OBEREN SCHICHTEN DER HPV16-POSITIVEN PATIENTENPROBE.	109
ABBILDUNG 4-50: MODELL DER HPV16-INFESTION MIT BETEILIGUNG DER LEICHTEN KETTEN DYNLT1 UND DYNLT3 DES DYNEINKOMPLEXES.	119
ABBILDUNG 4-51: MODELL DER HPV16-INFESTION MIT BETEILIGUNG VON TBX2	127

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1: ZELLULÄRE ZIELPROTEINE VON E6 UND E7	10
TABELLE 1-2: VIRALE INTERAKTIONSPARTNER DES DYNEINKOMPLEXES	15
TABELLE 1-3: TBX2- UND TBX3-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN KREBSARTEN	19
TABELLE 2-1: GERÄTE UND LABORMATERIALIEN	22
TABELLE 2-2: FERTIGREAGENZIEEN UND KITS	23
TABELLE 2-3: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	24
TABELLE 2-4: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER FÜR IMMUNFLUORESZENZEN	25
TABELLE 2-5: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER FÜR WESTERNBLOT.....	25
TABELLE 2-6: PCR-PRIMER FÜR ALLE IN DIESER ARBEIT HERGESTELLTEN KONSTRUKTE.....	33
TABELLE 2-7: DNA-PRIMER FÜR SEQUENZIERUNG.....	33
TABELLE 2-8: siRNA-NUKLEOTIDE FÜR RNA-INTERFERENZEXPERIMENTE.....	33
TABELLE 2-9: ZELLKULTURMEDIEEN UND ZUSÄTZE	36
TABELLE 3-1: STANDARD-PCR-ANSATZ.....	39
TABELLE 3-2: STANDARD-PCR-PROGRAMM.....	39
TABELLE 3-3: MUTAGENESE-PCR-ANSATZ	40
TABELLE 3-4: PCR-PROGRAMM DER MUTAGENESE-PCR.....	40
TABELLE 3-5: TEST DER BEUTE AUF TRANSAKTIVIERUNG.....	43
TABELLE 3-6: HÄUFIG VERWENDETE ZELLZAHLEN UND DNA-MENGEN DER REPORTERGEN-ASSAYS.....	47
TABELLE 3-7: HÄUFIG VERWENDETE ZELLZAHLEN FÜR RNA-INTERFERENZ	49
TABELLE 3-8: VERWENDETE ANTIKÖRPER FÜR DIE CHROMATIN-IP.....	58
TABELLE 4-1: ZUSAMMENFASSUNG DES HEFE-2-HYBRID-SCREENINGS	67
TABELLE 4-2: LOKALISATION UND FUNKTION DER IM 2-HYBRID-SCREENING IDENTIFIZIERTEN INTERAKTIONSPARTNER VON L2	68

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren

Am 6. Oktober 2008 erhielt Harald zur Hausen den Medizin-Nobelpreis für die Entdeckung, dass eine Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV) Krebs auslösen kann. Dieser Erkenntnis liegen jahrzehntelange Forschungen zu Grunde.

1.1.1 Geschichte der Papillomviren

Die Erforschung der Papillomviren begann mit der Untersuchung des klinischen Erscheinungsbildes einer HPV-Infektion. Die meisten HPV-Typen verursachen Warzen auf Haut (Papillome) und Schleimhäuten (Condylome), wodurch sich auch der Name der Virus-Familie, Papillomaviridae, ableitet. Bereits in den 30er Jahren wurde beobachtet, dass gefilterte Extrakte aus Kaninchenwarzen Läsionen auf der Haut anderer Kaninchen verursachen können (Shope et al., 1933). Es konnte dabei auch festgestellt werden, dass das *Cottontail Rabbit Papillomavirus* (CRPV) bei einigen Kaninchen kanzerogen wirkt. Neben dem CRPV wurde der Fokus der Wissenschaft in den 70er und Anfang der 80er Jahre vor allem auf die Erforschung der Bovinen Papillomviren (BPV) gelegt. Der erste molekularbiologische Nachweis von Papillomvirus-DNA geht auf das Jahr 1977 zurück, als man BPV-DNA in mehreren Tumorgeweben von Pferden fand (Lancaster et al., 1977). Mit der Entwicklung von molekularbiologischen Methoden wie Klonierung, Sequenzierung und der Polymerase-Ketten-Reaktion verschob sich der Fokus der Forschung mehr und mehr auf das Humane Papillomvirus, wenngleich das erste vollständig sequenzierte Genom das des BPV1 war (Chen et al., 1982). Im gleichen bzw. folgenden Jahr wurden die Genome der humanen Typen HPV1 und HPV6 (Danos et al., 1982, Schwarz et al., 1983) erfolgreich sequenziert. 1983 bzw. 1984 wurden auch die HPV-Typen 16 und 18 durch Sequenzierung nachgewiesen (Durst et al., 1983, Boshart et al., 1984). Diese beiden Hoch-Risiko-Typen werden heute in etwa 70% aller Zervixkarzinome detektiert. Mittlerweile sind weit über 120 verschiedene HPV-Typen bekannt (de Villiers et al., 2004, Calleja-Macias et al., 2005), von denen mindestens 18 Karzinome verursachen können oder kanzerogenes Potential besitzen (Munoz et al., 2003).

1.1.2 Epidemiologie

Humane Papillomviren sind mit einem breiten Spektrum an Krankheitsbildern assoziiert, so z.B. mit gutartigen Warzen auf Haut und Schleimhäuten, vor allem bei Kindern, bis hin zu Gebärmutterhals-, Penis- oder Rachenkarzinomen. In über 99% aller Zervixkarzinome konnte HPV-DNA nachgewiesen werden (Walboomers *et al.*, 1999). Die Prävalenz einer HPV-Infektion im Laufe des Lebens eines sexuell aktiven Erwachsenen beträgt weltweit etwa 60% (Eckert *et al.*, 1999, Ho *et al.*, 2002). 2002 gab es etwa 1,9 Mio. Krebsfälle, denen eine Infektionskrankheit zu Grunde lag, was einem Anteil von 17,8% aller weltweiten Krebsfälle entspricht (Parkin, 2006). Dabei gingen 5,2% und damit etwa 550 000 Krebsfälle auf eine Infektion mit Humanen Papillomviren zurück. Der Großteil aller Fälle von Zervixkarzinomen trat in den Entwicklungsländern in Afrika und Südostasien auf (83%). Seit 2006 sind zwei Impfstoffe verfügbar, die gegen HPV16 und 18 schützen. Diese beiden Hochrisiko-Typen sind für etwa 70% aller Zervixkarzinomfälle verantwortlich (Munoz *et al.*, 2004). Aktuelle Studien zur Wirksamkeit zeigen, dass sowohl der Impfstoff Gardasil (Merck) als auch Cervarix (Glaxo-Smith-Kline) einen Schutz von nahezu 100% vor einer Infektion mit HPV16 und HPV18 bietet (2007, Einstein *et al.*, 2009).

1.1.3 Das HPV-Genom

Nach der Analyse der ersten Sequenzierungen von HPV und BPV (Heilman *et al.*, 1982, Engel *et al.*, 1983) wurde das Genom der Papillomviren in drei Segmente eingeteilt: eine nichtkodierende Region, eine Region, die für nicht-Struktur-Proteine codiert (*early (E) genes* = frühe Gene) und eine Region, die für die beiden Kapsidproteine codiert (*late (L) genes* = späte Gene). Das Genom liegt als zirkuläre, doppelsträngige DNA vor und ist, je nach HPV-Typ, zwischen 7,4 und 8,2 kb groß. Wie in Abbildung 1-1 dargestellt, kodiert es für acht virale Proteine, wobei alle drei Leseraster genutzt werden (Chen *et al.*, 1982). Die frühen Gene erfüllen eine Vielzahl regulatorischer Funktionen wie z.B. die Regulation der Zellproliferation infizierter Zellen, die Steuerung der Expression viraler Gene oder die Regulation der Replikation des viralen Genoms. Die späten Gene L1 und L2 hingegen bilden am Ende des viralen Vermehrungszyklus das Kapsid aus, in welches die virale DNA schließlich verpackt wird. Die Expression der frühen Gene E6, E7, E1, E2, E4 und E5 steht unter der Kontrolle eines frühen Promotors (Abb. 1-2, p97 bei HPV16), der in den undifferenzierten Suprabasalzellen konstitutiv aktiv ist (Hummel *et al.*, 1992). Dieser liegt innerhalb der Kontrollregion (long control region (LCR)) des Genoms. Die LCR befindet sich zwischen dem poly-Adenylierungssignal des späten Gens L1 und der Startsequenz des frühen Gens E6.

Innerhalb der LCR befindet sich auch der Replikationsursprung des viralen Genoms (Fehrmann *et al.*, 2003). Die Expression der späten Gene L1 und L2 steht unter der Kontrolle eines späten Promotors (p670 bei HPV16), der außerhalb der LCR liegt und durch die Ausdifferenzierung der Keratinozyten aktiviert wird.

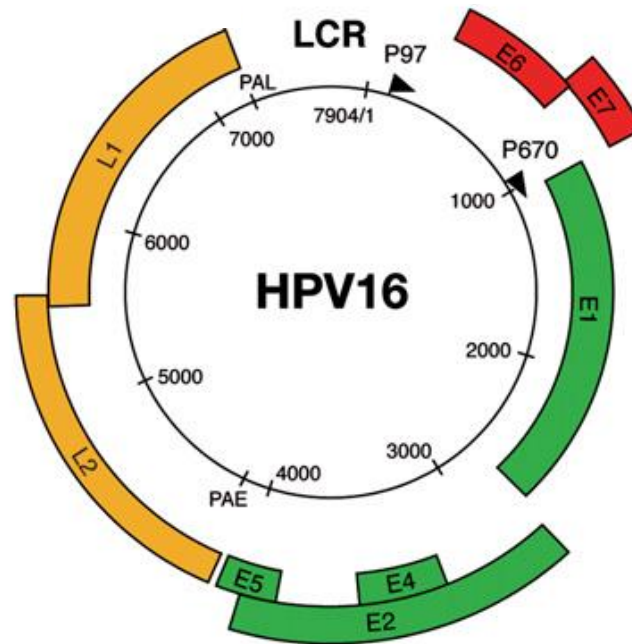


Abbildung 1-1: Struktur des HPV16-Genoms

Das Genom von HPV16 umfasst 7904 Basen und codiert für acht Gene. Es wird in drei Region unterteilt: eine nicht-kodierende Sequenz, die frühen (early = E) und die späten (late = L) Gene. Die frühen Gene (rot und grün dargestellt) stehen dabei unter der Kontrolle des p97-Promotors, während die Expression der späten Gene durch den Promotor p670 kontrolliert wird. Der p97-Promotor befindet sich in einem nicht-codierenden Kontrollbereich des Genoms (Long Control Region = LCR). (Abbildung verändert nach Doorbar, 2006)

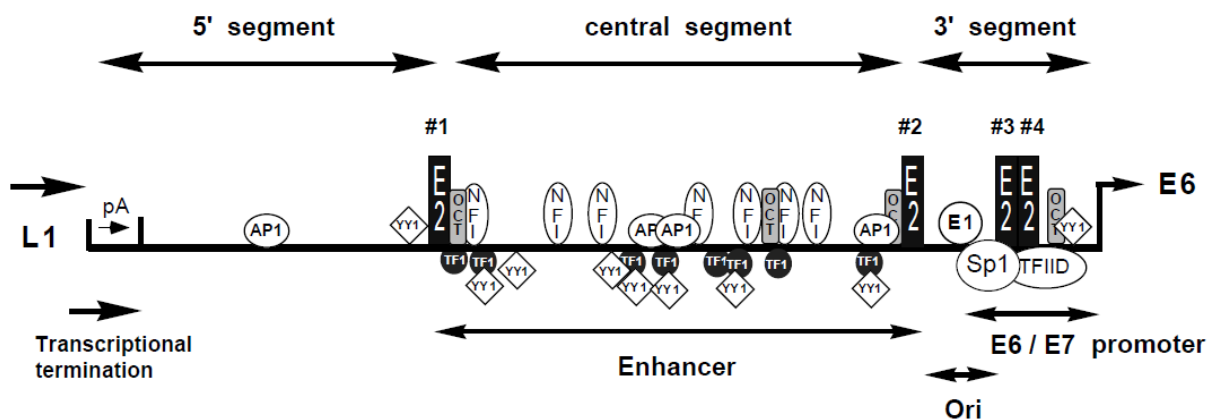


Abbildung 1-2: Aufbau der Kontrollregion von HPV16

Die Kontrollregion befindet sich zwischen dem poly-Adenylierungssignal von L1 und dem Beginn des frühen Gens E6. Sie wird in drei Segmente unterteilt, ein 5'-Segment, ein 3'-Segment und ein zentrales Segment. Im 3'-Segment und vor allem im zentralen Segment befinden sich viele Bindestellen für virale (E1 und E2) und zelluläre Transkriptionsregulatoren (AP1, NFI, YY1, TF1, OCT, TFIID und Sp1). Der Replikationsursprung befindet sich im 3'-Segment der LCR. Abbildung nach Connor *et al.*, 1995

Durch diesen Promotor werden auch die Gene E2, E4 und E5 transkribiert (Grassmann *et al.*, 1996). Die Kontrollregion wird unterteilt in ein 5`- und 3`-Segment sowie ein zentrales Segment. Das zentrale Segment stellt dabei vor allem eine Binderegion für transkriptionsaktiverende Proteine zellulären und viralen Ursprungs dar (Cripe *et al.*, 1987, Gloss *et al.*, 1987, Chin *et al.*, 1989, Chong *et al.*, 1991).

1.1.4 Die Kapsid-Struktur

Alle Humanen Papillomviren besitzen ein sphärisches Kapsid, das sich aus dem majoren Kapsid-Protein L1 und dem minoren Protein L2 zusammensetzt. Das HPV-Kapsid beinhaltet insgesamt 360 Kopien des L1-Proteins, die 72 pentamere Kapsomere ausbilden (Belnap *et al.*, 1996).

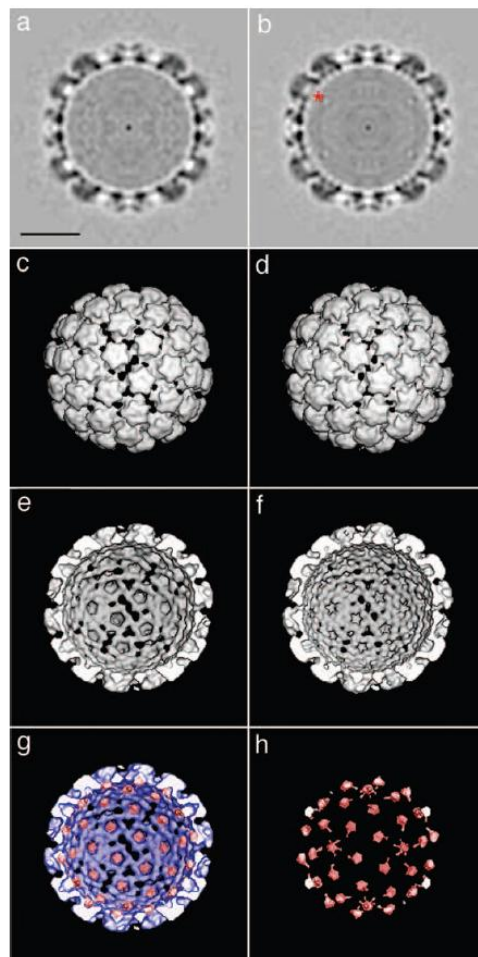


Abbildung 1-3: 3D-Rekonstruktion der Kapsidstruktur von HPV16

Dargestellt sind Computerrekonstruktionen eines Kapsids, das nur L1 Moleküle enthält a/c/e, bzw. eines vollständigen L1/L2-Kapsids b/d/f. Abb. a und b zeigen einen Querschnitt durch das Kapsid. Die höhere Dichte in den L1/L2-Kapsiden ist mit einem Stern markiert. Abb. c und d zeigen die Ansicht des Kapsids mit und ohne L2. L2 sitzt auf der Innenseite der L1-Kapsomere (g/h). Abbildung nach Buck *et al.*, 2008

Die Kapsomere sind durch die C-Termini der L1-Moleküle sowie durch interkapsomere Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Day *et al.*, 2009, Sapp *et al.*, 2009).

Das minore Kapsidprotein L2 befindet sich zu großen Teilen auf der Innenseite der Virushülle und liegt in 12-72 Kopien vor (Volpers *et al.*, 1995, Becker *et al.*, 2004, Buck *et al.*, 2008). Die Interaktion von L1 und L2 scheint nicht-kovalent zu sein (Volpers *et al.*, 1995). L2 besitzt eine gut charakterisierte hydrophobe L1-Bindedomäne am C-Terminus und wahrscheinlich eine weitere am N-Terminus (Okun *et al.*, 2001, Finnen *et al.*, 2003). Möglicherweise bildet L2 ein Netzwerk innerhalb des Kapsids aus, das dieses stabilisiert (Buck *et al.*, 2008).

1.1.5 Der HPV-Infektionszyklus

1.1.5.1 Ein Überblick

Humane Papillomviren sind wie alle Viren darauf angewiesen, ihren Wirt zu infizieren, um die Replikation des Genoms und damit das eigene „Überleben“ zu sichern. Infiziert werden die basalen Epithelzellen von Haut und Schleimhäuten und der Vermehrungszyklus Humaner Papillomviren ist eng mit der epithelialen Zelldifferenzierung assoziiert (Abb. 1-4) (Longworth *et al.*, 2004). Die epidermale Differenzierung der Zellen ist durch eine Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren reguliert. Dazu gehören z.B. die Familie der AP-1 Proteine (Eckert *et al.*, 1997), Proteine der POU-Domäne (Ryan *et al.*, 1997), der NF- κ B-Familie (Seitz *et al.*, 1998) und CCAAT/enhancer Bindeproteine (Maytin *et al.*, 1999). Analysen der Kontrollregionen verschiedener HPV-Typen zeigten, dass diese Transkriptionsfaktoren die Regulation des frühen Promotors beeinflussen (zusammengefasst in Thierry, 2009).

Mit Hilfe der frühen Gene E1 und E2 sowie zellulärer Faktoren wird das Genom zu etwa 20-100 Kopien pro infizierter, basaler Zelle repliziert (Lambert, 1991, Stubenrauch *et al.*, 1999). Durch die Expression der frühen Gene E6 und E7 werden die basalen Zellen zur Proliferation angeregt, wodurch es zu einer Gewebeneubildung und damit einer Verstärkung der produktiven Infektion kommt (Stubenrauch *et al.*, 1999).

In der suprabasalen Schicht wird der späte Promotor aktiviert, sodass die Expression der Gene L1 und L2 zusammen mit E4 zur Bildung der Kapside und schließlich zur Freilassung reifer Viren in den verhornten Zellschichten führt (Meyers *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1995, Flores *et al.*, 1999).

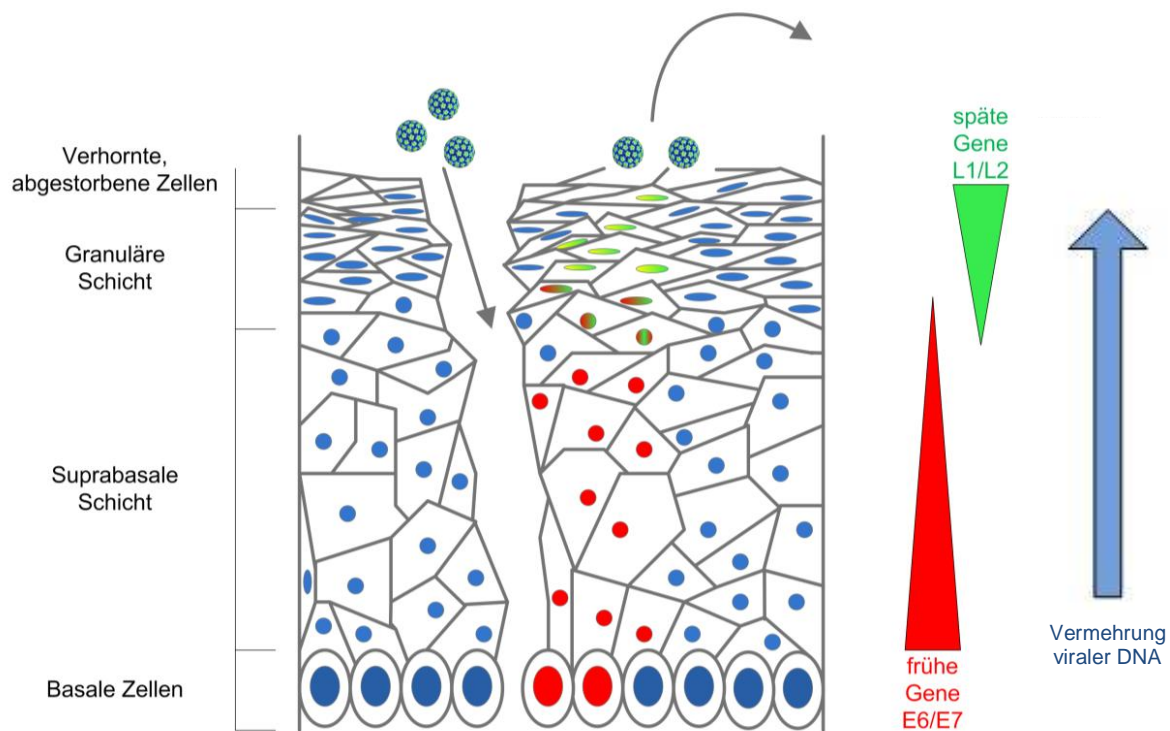


Abbildung 1-4: Produktiver Lebenszyklus von Humanen Papillomviren

Nach Mikroläsionen werden basale Epithelzellen durch Papillomviren infiziert. Die Expression der frühen Gene E6 und E7 führt zur Transformation der Zelle und zur Amplifikation und Integration des viralen Genoms. In den oberen Schichten wird der frühe Promotor inhibiert und durch die Aktivierung des späten Promotors beginnt die Expression der viralen Kapsidgene L1 und L2. Die reifen Kapside werden durch das Absterben der obersten Zellschichten freigesetzt.

1.1.5.2 Die Invasion von Humanen Papillomviren in die Wirtszelle

Es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, welche Komponenten an der Aufnahme von Humanen Papillomviren beteiligt sind. Auch wenn in der Regel Keratinozyten die Zielzellen von Papillomviren sind, so wurde z.B. für bovine Papillomviren aber auch HPV11 und Pseudoviren (PsV) verschiedener HPV-Typen gezeigt, dass sie an ein breites Spektrum von Zellen binden können (Roden *et al.*, 1994, Muller *et al.*, 1995). Ein Grund für dieses breite Spektrum besteht darin, dass die Viren zuerst Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) binden können (Abb. 1-5), die sich auf der Oberfläche und in der extrazellulären Matrix von Säugerzellen befinden. HSPGs besitzen vielfältige Funktionen bei der Zell-Adhäsion und der Internalisierung von Liganden (Lindahl *et al.*, 1998). Die Interaktion von Papillomviren mit HSPGs erfolgt über Lysinreste des Kapsidproteins L1 (Knappe *et al.*, 2007). Durch die Bindung an HSPGs kommt es im Kapsid zu einer Konformationsänderung und zu einer Übertragung des Kapsids auf einen sekundären Rezeptor (Selinka *et al.*, 2003, Day *et al.*, 2008a). Verschiedene mögliche Rezeptoren werden teilweise kontrovers diskutiert. Ein bereits 1997 beschriebener möglicher Rezeptor für HPV6 ist $\alpha 6$ -Integrin (Evander *et al.*,

1997), während er bei einer Infektion mit HPV11 und HPV33-PsV nicht benötigt wird (Giroglou *et al.*, 2001, Shafti-Keramat *et al.*, 2003). Auf der Oberfläche der Zellen konnte eine Kolokalisation der Viren mit Tetraspaninen beobachtet werden (Spoden *et al.*, 2008). Tetraspanine befinden sich in den Membranen vieler Zellen und können sich zu einem Verbund zusammenlagern. Dadurch können auf der Zelloberfläche Mikrodomänen entstehen (Le Naour *et al.*, 2006), die möglicherweise an der Aufnahme von HPV beteiligt sein können. So kolokalisierte L1 bereits zehn Minuten nach der Infektion mit den Tetraspaninen CD63 und CD151 auf der Zelloberfläche (Spoden *et al.*, 2008).

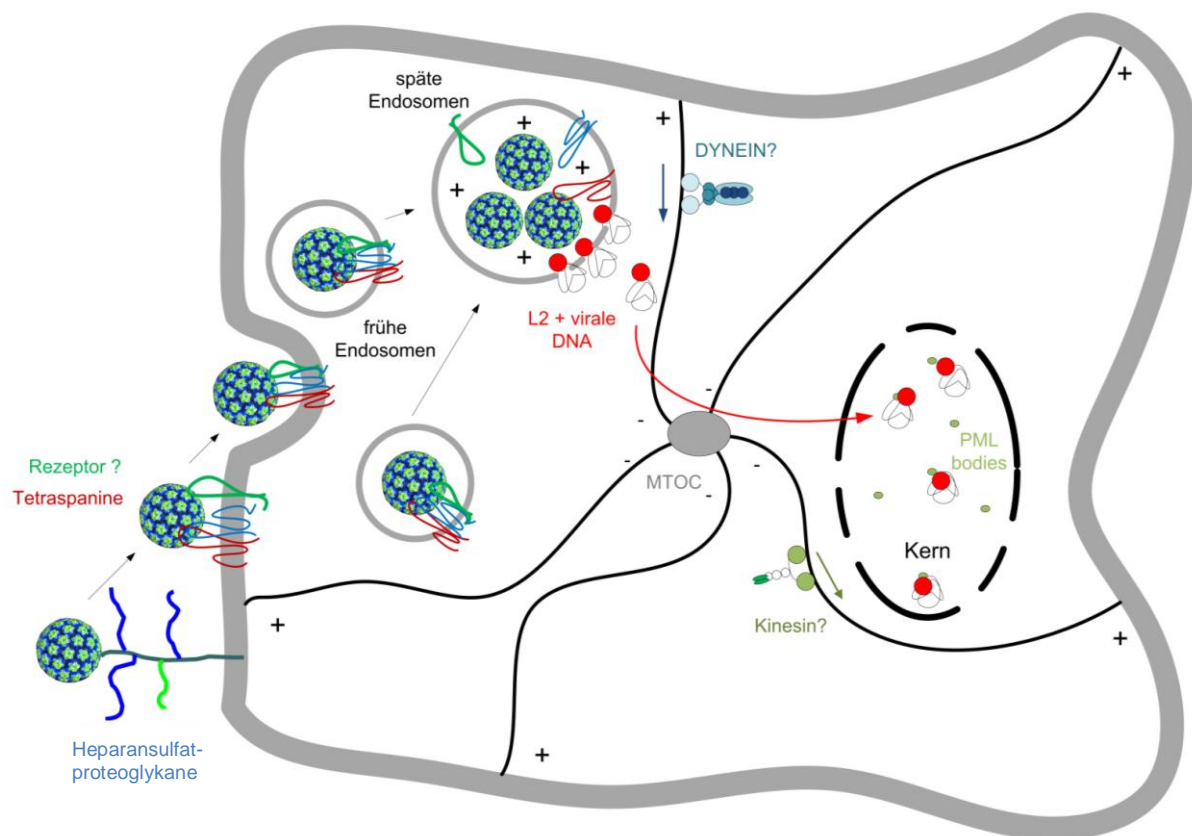


Abbildung 1-5: Übersicht der HPV16-Infektion

Nach der Bindung an Heparansulfatproteoglykane wird das Virus auf einen unbekanntem sekundären Rezeptor übertragen. Bei der Aufnahme in die Endosomen kolokalisieren die Viren mit Tetraspaninen. Nach der Ansäuerung der späten Endosomen brechen die Kapside auf und L2 transportiert die virale DNA unter Beteiligung des Dyneinkomplexes zum Zellkern. Im Kern akkumuliert L2 mit der DNA an PML-Proteinen innerhalb der Nukleären Domänen (ND10).

Mit Hilfe von VLPs (Virus Like Partikels) und PsV wurde festgestellt, dass L2 nicht für die Bindung und die Aufnahme der Viren benötigt wird (Selinka *et al.*, 2003), obwohl L2-Peptide an der Oberfläche binden können und aufgenommen werden (Kawana *et al.*, 2001). Wahrscheinlich kommt es nach der Bindung der Viren an die HSPGs zu einer Umlagerung des Kapsids, die dazu führt, dass L2 zugänglich wird und ein Teil noch auf der Oberfläche

von einer Konvertase (Furin) gespalten wird (Richards *et al.*, 2006, Day *et al.*, 2008b). Diese Spaltung ist notwendig für die erfolgreiche Infektion.

Die genaue Endozytose der Viren ist noch nicht verstanden, wobei der Aufnahmeweg für HPV16 Clathrin- und Caveolin-unabhängig ist (Spoden *et al.*, 2008). Nach der Endozytose werden die Kapside durch eine Ansäuerung der späten Endosomen aufgebrochen und das Genom entpackt (Day *et al.*, 2004). L2 besitzt am C-Terminus eine Membranstabilisierende Sequenz, die benötigt wird um das Endosom zusammen mit der viralen DNA zu verlassen (Kamper *et al.*, 2006). Der L2/DNA-Komplex wird mit Hilfe der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert, indem L2 mit dem Motorprotein Dynein interagiert (Florin *et al.*, 2006). Dort lagert sich L2 zusammen mit der DNA an nukleären Domänen (ND10) an (Day *et al.*, 2004).

1.1.5.3 *Manifestation des viralen Genoms*

Nachdem das virale Genom in den Zellkern gelangt ist, werden die frühen Gene E1 und E2 exprimiert, die für die Replikation und Transkription des viralen Genoms benötigt werden (Chiang *et al.*, 1992). E2 kommt dabei die Rolle des viralen Transkriptionsregulators zu, während E1 das Replikations-Initiator-Protein ist (Demeret *et al.*, 1998). Der Replikationsursprung konnte auf eine 60-80 bp-Sequenz eingegrenzt werden, die sich in der Kontrollregion (siehe auch Abb. 1-2) des HPV-Genoms befindet (Chiang *et al.*, 1992). Innerhalb des Replikationsursprungs befinden sich eine unvollständige palindromische Erkennungssequenz für E1 und drei palindromische Bindestellen für E2, die zu einer Aktivierung der Replikation des viralen Genoms führen. E1 besteht, abhängig vom HPV-Typ, aus 605-650 Aminosäuren und besitzt eine N-terminale Domäne, innerhalb der sich die DNA-Bindestelle befindet. Obwohl E1 auch in hohen Konzentrationen als Monomer in Lösung vorliegt, bindet es die DNA als Dimer. Die Mutation der Dimerisierungsdomäne führt dazu, dass E1 nicht mehr an die DNA bindet und diese nicht mehr repliziert werden kann (Enemark *et al.*, 2000, Schuck *et al.*, 2005). Das Protein E2 bildet bei der Replikation einen Komplex mit E1 (Blitz *et al.*, 1991), der an den Replikationsursprung (Ori) bindet. E2 löst sich dann wieder von der DNA ab und die rekrutierten E1-Proteine bilden einen dihexameren Ring. Die Assoziation von E1 mit zellulären Hitzeschockproteinen wie Hsp40 und Hsp70, fördern die Bildung dieses Komplexes (Lee *et al.*, 1999). Durch die Interaktion mit der zellulären DNA-Polymerase-Primase und dem Einzelstrang-DNA-Bindeprotein A (RPA) rekrutiert E1 die zelluläre Replikationsmaschinerie an den viralen Initiationskomplex (Park *et al.*, 1994, Loo *et al.*, 2004). E2 besitzt neben der Regulation der Replikation auch die Funktion der Regulation des frühen Promotors p97 (HPV16), unter dessen Kontrolle die

Expression von E6 und E7 stehen. Je nach Konzentration von E2 kann der Promotor an- oder abgeschaltet werden. E2 konkurriert bei der Bindung an die LCR mit zellulären Transkriptionsfaktoren wie dem TATA-Box Binding Protein (TBP), TFIID und SP1 (Bouvard *et al.*, 1994b, Demeret *et al.*, 1994). Bei geringen Konzentrationen von E2 werden nur zwei der vier Bindestellen von E2 im LCR besetzt, was zu einer Aktivierung des p97-Promotors führt (Demeret *et al.*, 1998). Bei einer hohen Expression von E2 bindet es an alle vier Bindestellen und verdrängt die zellulären Transkriptionsregulatoren SP1 und TFIID, was in einer Inhibition der Transkription von E6 und E7 resultiert (Rose *et al.*, 1998). Nach der Replikation des Genoms verankert E2 die viralen Episomen an den humanen Chromosomen, damit diese bei der Mitose an die Tochterzellen weitergegeben werden können (You *et al.*, 2004).

1.1.5.4 *Stimulation der Zellproliferation*

Die Infektion mit Humanen Papillomviren geht einher mit einer starken Proliferation der suprabasalen Schicht des infizierten Gewebes. Bei der Infektion der Gebärmutter durch HPV16 geht dies vor allem auf die Expression der viralen Proteine E6 und E7 zurück. Nach der Infektion kommt es oftmals zu einer Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom (Schwarz *et al.*, 1985). Nach der Integration bleiben nur die Gene E6 und E7 intakt und werden daher vermehrt transkribiert. E6 und E7 üben eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen aus, die letztlich in der Proliferation der Zellen resultieren. Ein Großteil der Zielproteine von E6 (Tab. 1-1) spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Apoptose und der Zellproliferation, während E7 hauptsächlich Zellzyklusproteine bindet (Narisawa-Saito *et al.*, 2007). Sowohl E6 als auch E7 besitzen DNA-Bindedomänen (Zinkfinger), mit denen sie direkt als Transkriptionsfaktoren fungieren können. Die Bindung von E6 an ein Zielprotein führt meist zu dessen proteasomalen Abbau über den Ubiquitin-Weg (Scheffner *et al.*, 1993). Das bekannteste Beispiel ist der Abbau von p53. Das Protein p53 kontrolliert die Integrität des zellulären Genoms und verhindert die Zellteilung, wenn Schäden an der DNA vorliegen (Scheffner *et al.*, 1990).

E7 kontrolliert vor allem den Zellzyklus. Durch die Bindung an den p21- und p27-Promotor kann E7 die Expression von Zyklinen inhibieren, die für Regulation des Zellzyklus durch Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) benötigt werden (Zerfass-Thome *et al.*, 1996, Funk *et al.*, 1997). Zusätzlich bewirkt E7 den direkten Abbau des Retinoblastom-Proteins pRb. Dieses Protein kann die Expression von Mitgliedern der E2F-Familie inhibieren (Cobrinik, 2005). Die Bindung von E7 führt über den Abbau von pRb damit zu einer Beschleunigung des Zellzyklus.

Tabelle 1-1: Zelluläre Zielproteine von E6 und E7

Target molecules of E6	Implicated/observed biological effect
E6AP/p53	Degradation of p53/suppression of apoptosis ⁽⁹⁾
PDZ-domain-containing proteins	Degradation of PDZ proteins/loss of cell polarity ⁽³⁸⁻⁵¹⁾
CAL	Deregulation of the vesicular trafficking processes ⁽⁷¹⁾
NFX1-91	Degradation of NFX1-91/activation of hTERT, immortalization ⁽⁵⁶⁾
Paxillin	Interference in the association of paxillin and focal adhesion kinase ⁽⁷²⁾
IRF3	Inhibition of IRF-3's transcriptional activity thereby inhibiting the IFN-induced signaling ⁽⁷⁾
Bak	Degradation of Bak/suppression of apoptosis ⁽²¹⁾
FADD	Degradation of FADD/suppression of apoptosis ⁽²²⁾
Procaspase 8	Degradation of procaspase 8/suppression of apoptosis ⁽²²⁾
GADD34/PP1	Suppression of apoptosis ⁽⁷³⁾
Tyk2	Impairment of Tyk2 activation thereby inhibiting IFN-induced signaling ⁽⁷⁴⁾
CBP/p300	Down-regulation of p53 activity by targeting the transcriptional coactivator ⁽⁷⁵⁾
MCM7	Induction of chromosomal abnormalities ⁽⁷⁶⁾
TSC2 (tubulin)	Activation of mTOR signaling ⁽⁵³⁾
BRCA1	Release the inhibition of ER signaling ⁽⁷⁷⁾
Target molecules of E7	Implicated/observed biological effect
pRb family proteins	Disruption of pRb-E2F complexes thereby initiating the E2F mediated transcription ⁽⁹⁾
Cyclin A	Regulation of cell cycle (binding through pRb) ⁽⁶⁰⁾
Cyclin E	Regulation of cell cycle (binding through p107) ⁽⁶¹⁾
p27	Binding to and subsequent inactivation of the CDK inhibitor p27 ⁽⁶²⁾
p21	Binding to and subsequent inactivation of the CDK inhibitor p21 ⁽⁶³⁾
AP1	Interaction with and transactivation of the AP1 family of transcription factors ⁽⁷⁸⁾
TBP	Deregulation of the TBP mediated transcription ⁽⁷⁹⁾
S4 subunit of the 26 S proteasome	Targeting of pRb for degradation ⁽⁸⁰⁾
MPP2	Activation of MPP2-specific transcriptional activity ⁽⁸¹⁾
hTid 1	Genome replication ⁽⁸²⁾
p48	Down-regulation of IFN α -mediated signal transduction ⁽⁶⁴⁾
M2 pyruvate kinase	Modulation of type M2 pyruvate kinase activity ⁽⁸³⁾
p600	Contribution to anchorage-independent growth and transformation ^(65,66)
Mi2	Form complex with HDAC to promote the E2F2-mediated transcription ⁽⁵⁹⁾
IRF1	Abrogation of transactivation function of IRF1 ⁽⁸⁾

CDK, cyclin-dependent kinase; ER, estrogen receptor; HDAC, histone deacetylases; IFN, interferon; IRF, interferon regulatory factor; pRb, retinoblastoma.

1.1.5.5 Vegetative Genomamplifikation

In der fortschreitenden Infektion mit Papillomviren steht die Genomamplifikation im Vordergrund, denn sie ist die Voraussetzung für die Bildung neuer Viren. Durch einen bisher noch nicht geklärten Mechanismus kommt es in den oberen suprabasalen Zellschichten zu einem Umschalten von der Expression der Gene, die unter der Kontrolle frühen Promotor stehen hin zu einer Expression der Gene, die durch den späten Promotor (p670 bei HPV16) kontrolliert werden (Hummel *et al.*, 1992). Dadurch werden die Gene E1, E2, E4 und E5 verstärkt exprimiert. Die Expression von E1 und E2 erhöht die Amplifikation des Genoms, während E4 und E5 vielfältige Aufgaben übernehmen können. E5 ist nach der Expression vor allem im Golgi und Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert (Conrad *et al.*, 1993) und kann z.B. Keratinozyten transformieren, die DNA-Synthese stimulieren, andere Onkogene anschalten und verschiedene Signalwege in der Zelle aktivieren (Bouvard *et al.*, 1994a, Gu *et al.*, 1995, Valle *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1996, Auvinen *et al.*, 1997). Über die Rolle von E4 ist wenig bekannt. Es wird offensichtlich für den viralen Lebenszyklus benötigt (Davy *et al.*, 2005, Wilson *et al.*, 2005). So kann E4 einen Arrest des Zellzyklus in der G2-

Phase verursachen. Möglicherweise soll damit die optimale virale DNA-Replikation unterstützt werden.

1.1.5.6 *Viruszusammenbau und -freisetzung*

Der letzte Schritt des Infektionszyklus einer HPV-Infektion ist der Zusammenbau des Kapsids und die Freisetzung der Viren. Nach der Amplifikation des Genoms akkumuliert erst L2 und dann L1 im Zellkern an den ND10-Strukturen (Florin *et al.*, 2002a). Das Umschalten von der Amplifikation des viralen Genoms hin zum Signal der Verpackung durch die Expression der Gene L1 und L2 wird wahrscheinlich durch gezielte RNA-Prozessierung von viraler prä-mRNA bewirkt (Schwartz, 2008). Verschiedene Prozessierungssequenzen im HPV-Genom werden dabei durch zelluläre Proteine kontrolliert. Der Zusammenbau der Kapside sowie die Verpackung der viralen DNA in infektiöse Partikel erfolgt im Zellkern (Becker *et al.*, 2004). Im Zytoplasma lagern sich zunächst jeweils fünf L1-Moleküle zu den pentameren Kapsomeren zusammen, die anschließend durch die Interaktion der C-terminalen Kernlokalisationssequenz (NLS) des L1-Proteins mit dem Transportrezeptorkomplex Kap α 2/Kap β 1 in den Kern importiert werden (Nelson *et al.*, 2002). Die Interaktion der Kapsomere mit den beiden Importinen verhindert den vorzeitigen Zusammenbau der Kapside im Zytoplasma (Bird *et al.*, 2008). L2 löst im Kern Sp100 von den ND-10 ab und rekrutiert Daxx in den Zellkern (Florin *et al.*, 2002a, Florin *et al.*, 2002b). Die in den Kern transportierten L1-Kapsomere werden durch L2 zu den ND10 rekrutiert (Day *et al.*, 1998), wo der Zusammenbau der Kapside und die DNA-Verpackung stattfinden. Der C-Terminus von L1 ist für Bindung und Verpackung der DNA dabei essentiell (Schafer *et al.*, 2002). Neben L1 wird auch E2 zu den ND10 rekrutiert. Wahrscheinlich wird das virale Genom durch E2 in räumliche Nähe des Kapsids gebracht (Day *et al.*, 1998). Während dieses Prozesses findet eine Stabilisierung der Kapside durch die Ausbildung von interkapsomeren Disulfidbrücken statt (Buck *et al.*, 2005b). Durch das Absterben der obersten Zellschichten erfolgt die Freisetzung der reifen Viren.

1.1.5.7 *Kanzerogenese*

Etwa 20 % aller Krebserkrankungen weltweit werden durch eine Infektion mit Viren ausgelöst (Parkin, 2006), wovon jede vierte Erkrankung auf eine HPV-Infektion zurückgeht. Bis heute sind mindestens 18 HPV-Typen bekannt, die kanzerogenes Potential besitzen (Munoz *et al.*, 2003). Die Entstehung eines Tumors nach der Infektion mit einem Hoch-Risiko-HPV-Typen

geht dabei vor allem auf die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 zurück, die den zellulären Stoffwechsel in vielfältiger Weise regulieren (Abb. 1-6). So können E6 und E7 bereits im frühen Stadium der Infektion die Immunantwort der Wirtszelle unterdrücken, indem sie über Interferon-regulierende Faktoren (IRF) die Synthese des *Major Histocompatibility Complex I* (MHC I) inhibieren (Um *et al.*, 2002). MHC I-Moleküle präsentieren nach der Infektion u.a. Virus-Antigene auf der Zelloberfläche, um das Immunsystem zu aktivieren. Neben dem in 1.1.5.4 beschriebenen Abbau von p53 reguliert E6 die Apoptose über die Stimulation der Telomerase-Expression und die Inhibition des Proteins Bak, das Poren in der mitochondriale Membran bilden kann (Horikawa *et al.*, 2003, Autret *et al.*, 2009).

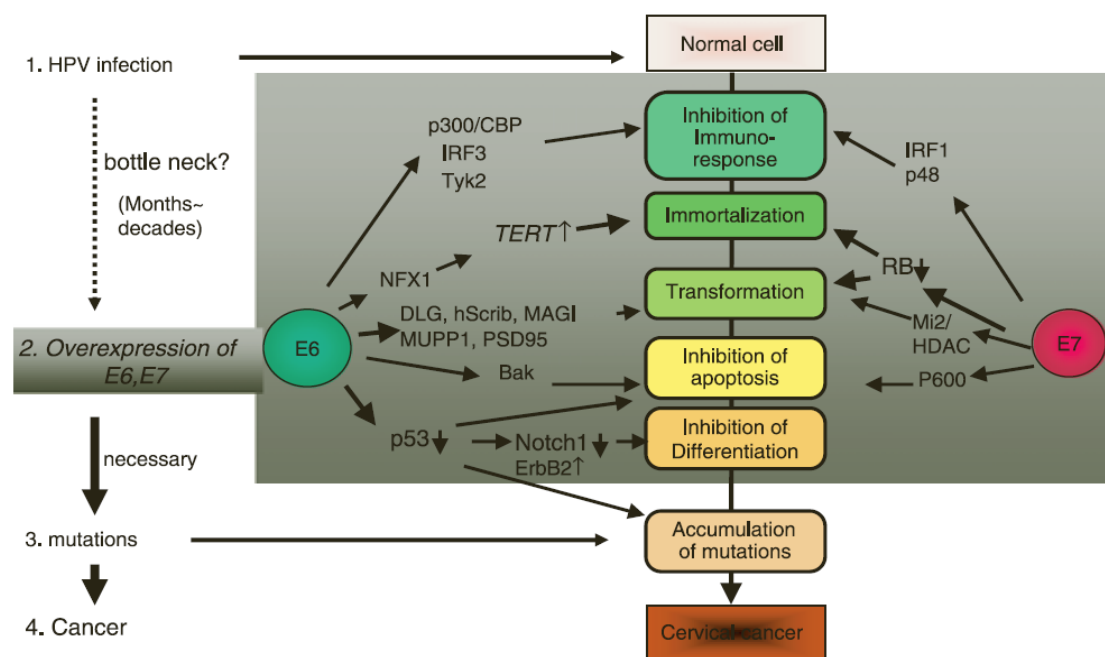


Abbildung 1-6: Funktionsübersicht der Onkogene E6 und E7.

Nach der Infektion mit einem Hoch-Risiko-Typ führt die Expression von E6 und E7 zu einem Umprogrammieren der Zelle. Eine Vielzahl zellulärer Proteine wird in ihrer Expression reguliert, um die Zellproliferation zu erhöhen. Abbildung nach Narisawa-Saito and Kiyono, 2007

Letztlich führt die Expression der Onkogene E6 und E7 zu einer Akkumulation von Mutationen in der Zelle und zu einer fortschreitenden Veränderung des infizierten Epithelgewebes (Abb. 1-7). Der Grad der Veränderung des Gewebes (Neoplasie) durch eine HPV-Infektion wird in drei Stufen eingeteilt, abhängig von der Transformation der suprabasalen Zellen durch E6 und E7 und der Amplifikation der viralen DNA. Im ersten Stadium der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN I) werden die frühen Gene E6/E7 in den unteren suprabasalen Zellen exprimiert. Gleichzeitig findet eine Expression der späten Proteine L1 und L2 sowie die Reifung der Viren in den oberen Zellschichten statt. Je weiter

die Transformation der unteren Zellschichten und die damit verbundene unkontrollierte Proliferation der suprabasalen Zellen fortschreitet, desto weniger reife Viren werden in den oberen Schichten gebildet. Im Zervixkarzinom schließlich können keine späten Proteine mehr nachgewiesen werden. Die Morphologie der Epithelzellen innerhalb des Gewebes zeigt keine Differenzierung der einzelnen Schichten mehr.

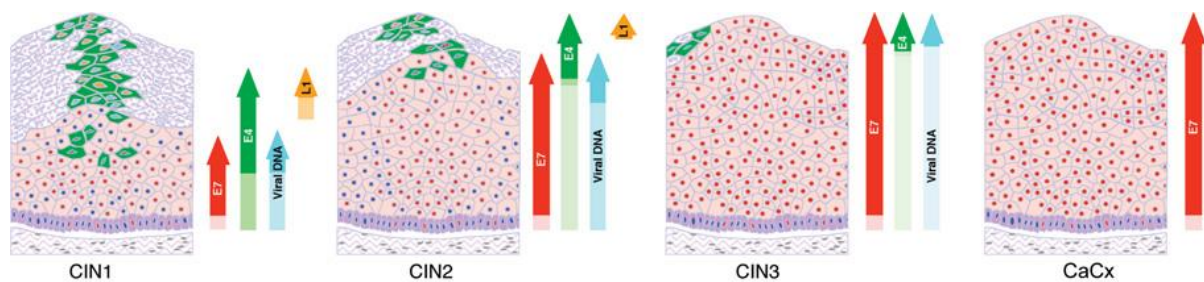


Abbildung 1-7: Stadien der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) nach einer HPV-Infektion.

Die verschiedenen Stadien der CIN werden durch das Expressionsprofil der viralen Proteine bzw. den Grad der Veränderung des Gewebes charakterisiert. Die basalen Zellen (blaue Kerne) werden infiziert und die Expression von E6 und E7 (roter Pfeil, bzw. rote Kerne) führt zu einer Transformation der Zellen. In frühen Stadien der Gewebeneubildung (CIN I-II) findet in den oberen Schichten des Gewebes die vermehrte Genomamplifikation (blauer Pfeil) durch die Expression des E4-Proteins statt (grüner Pfeil, bzw. grüne Zellen). Darüber hinaus werden die späten Kapsidproteine L1 und L2 (gelber Pfeil/gelbe Kerne) für die Morphogenese neuer Viren exprimiert. Je weiter die Veränderung des Gewebes voranschreitet, desto stärker ist das Expressionsprofil viraler Gene verändert. Ein Gewebe des CIN III-Stadiums zeichnet sich dadurch aus, dass die Expression der frühen Gene E6 und E7 nahezu das vollständige Epithel durchzieht und fast keine granuläre Zellschicht mehr vorhanden ist, in der Kapsidproteine gebildet werden. Abbildung nach Doorbar, 2006

1.2 Der Motorprotein-Komplex Dynein

Die gesamte Zelle ist durchzogen von einem Netz aus Filamentsystemen. Dazu gehören Mikrotubuli, Aktinfilamente sowie Intermediärfilamente. In ihrer Gesamtheit werden diese Filamentsysteme als Zytoskelett bezeichnet. Zu den wichtigsten Funktionen des Zytoskeletts zählt der gerichtete Transport von Frachtmolekülen. Motorproteine fungieren dabei als spezifische Transporter. Sie wandern entlang dieser Filamente und transportieren Moleküle gerichtet zu ihrem jeweiligen Zielkompartiment. Mikrotubuli bestehen aus 13 einzelnen Protofilamenten, die aus α - und β -Dimeren des Tubulins aufgebaut sind (Abb. 1-8). Die Mikrotubuli laufen am Zentrosom zusammen, das aus γ -Tubulin besteht. Das besondere am Aufbau der Protofilamente ist, dass die Anordnung der Untereinheiten dazu führt, dass die Mikrotubuli eine Polarisierung erhalten. Das Ende, welches zur äußeren Zellmembran hin polymerisiert, ist positiv geladen (β -Untereinheit), während das Ende des Tubulus, welches zum Zentrosom hin polymerisiert (α -Untereinheit), negativ geladen ist. Diese Polarisierung ermöglicht den gerichteten Transport. Der Motorprotein-Komplex Dynein transportiert Moleküle retrograd von der Peripherie der Zelle hin zum Zentrosom, während der Transport

in äußere Bereiche der Zelle durch Kinesin gewährleistet wird (Paschal *et al.*, 1987, Holzbaur *et al.*, 1994, Vale *et al.*, 2000).

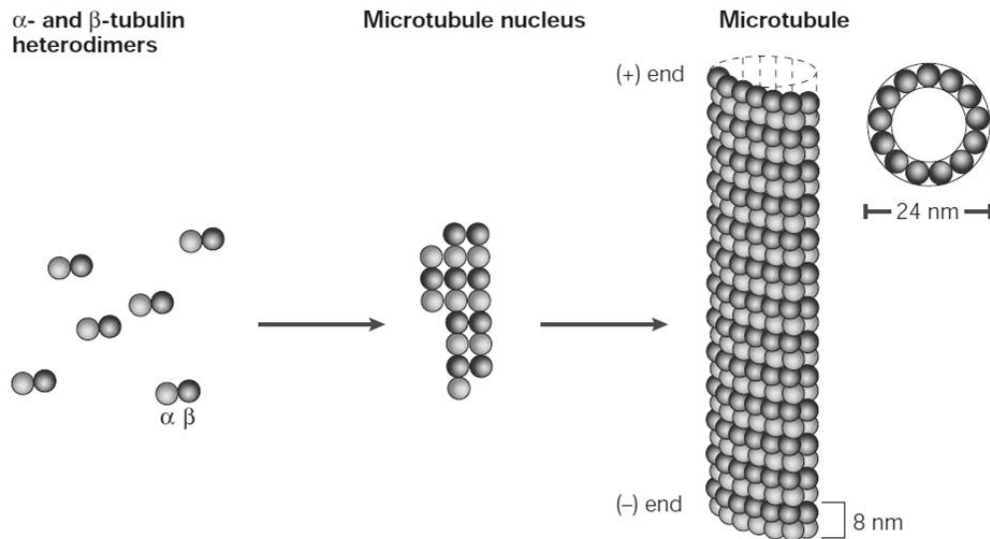


Abbildung 1-8: Aufbau der Mikrotubuli.

Mikrotubuli entstehen durch Polymerisation von α - und β -Untereinheiten des Tubulins (links). Ein Tubulus wird aus 13 Protofilamenten gebildet und weist eine Polarisierung auf (rechts). Abbildung nach Jordan und Wilson, 2004

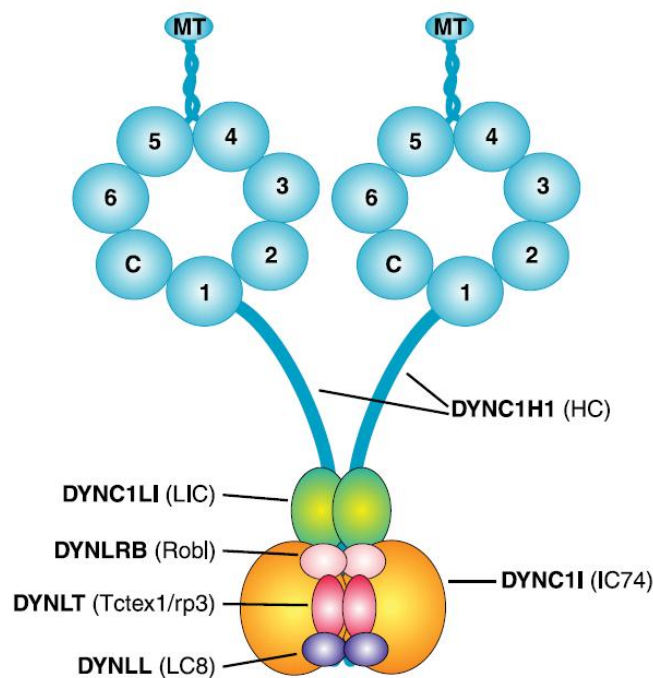


Abbildung 1-9: Aufbau des Dynein-Komplexes.

Die schweren Ketten des Dyneinkomplexes vermitteln die ATP-Hydrolyse und damit die Bewegung entlang der Mikrotubuli. Die mittelschweren, leichten mittelschweren und leichten Ketten binden verschiedene Moleküle und verknüpfen diese mit dem Dyneinkomplex. Abbildung nach Pfister *et al.*, 2006

Der Multiproteinkomplex Dynein besteht aus zwei schweren Ketten (DYNC1H1, Nomenklatur siehe Pfister *et al.*, 2005), aus einem Dimer der mittelschweren Ketten (DYNC1I), der leichten mittelschweren Ketten (DYNC1LI) und je einem Dimer der drei Familien von leichten Ketten (DYNLL, DYNLT, DYNLRB, siehe Abb. 1-9).

Die schweren Ketten hydrolysieren ATP und führen die Bewegung entlang der Mikrotubuli aus (Carter *et al.*, 2008, Roberts *et al.*, 2009). Die mittelschweren und leichten mittelschweren Ketten sind direkt mit den schweren Ketten assoziiert (Habura *et al.*, 1999, Tynan *et al.*, 2000).

1.2.1 Die Rolle der leichten Ketten im Dyneinkomplex

Die mittelschweren Ketten stellen das Bindeglied zu den sechs leichten Ketten des Komplexes dar (Vallee *et al.*, 2004). Diese übernehmen, wie auch die mittelschweren Ketten, vor allem die Aufgabe der Bindung von zellulären Proteinen. Während die Familien der leichten Ketten DYNLL und DYNRB Heterodimere im Dyneinkomplex ausbilden können, liegen die Mitglieder der DYNLT-Familie im Komplex stets als Homodimere vor. Der heterodimere Komplex aus DYNLT1-DYNLT3 ist nicht in der Lage, die mittelschwere Kette zu binden (Lo *et al.*, 2007b). Die leichten Ketten DYNLT1 (auch bekannt als Tctex-1) und DYNLT3 (auch bekannt als rp3) weisen eine Aminosäuresequenzhomologie von 55% auf. Die Sekundärstrukturen beider Proteine sind nahezu identisch. Interessanterweise ähneln sich die Sekundärstrukturen der leichten Ketten aus der DYNLL-Familie (auch bekannt als LC8) und die der leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3, obwohl diese keine Sequenzähnlichkeit aufweisen (Mok *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2005).

Tabelle 1-2: Virale Interaktionspartner des Dyneinkomplexes

Virus (Protein)	Dynein-Interaktionspartner	Quelle
Adenovirus (Kapsiduntereinheit Hexon)	DYNC1I1, DYNC1LI1, DYNLL1	(Bremner <i>et al.</i> , 2009)
Afrikanisches Schweinefiebertivirus (Strukturprotein p54)	DYNLL1	(Alonso <i>et al.</i> , 2001)
Kaninchenparvovirus (Kapsidproteine VP1 und 2)	DYNC1I1	(Suikkanen <i>et al.</i> , 2003)
Foamyvirus (Gag-Protein)	DYNLL1	(Petit <i>et al.</i> , 2003)
HSV1 (Kapsidprotein VP26, Nicht-Strukturprotein UL34)	DYNC1I1, DYNLT1, DYNLT3	(Sodeik <i>et al.</i> , 1997, Douglas <i>et al.</i> , 2004)
HIV1 (unbekannt)	DYNC1I1	(McDonald <i>et al.</i> , 2002)
Tollwutvirus (Phosphoprotein P)	DYNLL1	(Rasalingam <i>et al.</i> , 2005)
Poliovirus (Rezeptor CD155)	DYNLT1	(Mueller <i>et al.</i> , 2002)

Die dritte Familie der leichten Ketten, DYNLRB (auch bekannt als roadblock) zeigt weder Sequenz- noch Strukturähnlichkeiten zu den beiden anderen Familien der leichten Ketten (Song *et al.*, 2005). Besonders für die leichten Ketten, aber auch für die mittelschweren und die leichten mittelschweren Ketten wurde eine Vielzahl von zellulären Interaktionspartnern beschrieben (Bauch *et al.*, 1998, Nagano *et al.*, 1998, Tai *et al.*, 1999, Schwarzer *et al.*, 2002, Pfister *et al.*, 2006, Lo *et al.*, 2007a, Jung *et al.*, 2008, Wanschers *et al.*, 2008). Jedoch sind nicht nur zelluläre Proteine auf den Transport der Motorproteine angewiesen. Eine Vielzahl von Viren (Tab. 1-2) interagiert nach der Aufnahme direkt oder indirekt mit dem Dyneinkomplex (zusammengefasst in Dohner *et al.*, 2005, Greber *et al.*, 2006). 2009 konnte mit Immunfluoreszenzstudien gezeigt werden, dass Adenoviren bei der Infektion mit der mittelschweren, der leichten mittelschweren und der leichten Kette DYNLL1 kolokalisieren (Bremner *et al.*, 2009). Die Herpes-Simplex-Virus 1 Proteine pUL9, pUL34 und pUL35 binden bei der Infektion ebenfalls den Motorproteinkomplex Dynein (zusammengefasst in Diefenbach *et al.*, 2008). Neben der Transportfunktion wurden in den letzten Jahren auch Dynein-unabhängige Funktionen der leichten Ketten entdeckt. So konnte gezeigt werden, dass DYNLT1 das Wachstum von Dendriten und Axonen reguliert (Chuang *et al.*, 2005) und DYNLT3 als Transkriptionsfaktor im Zellkern agieren kann (Yeh *et al.*, 2005).

1.3 Die Transkriptionsfaktoren der T-box-Familie

Als Transkriptionsfaktoren bezeichnet man Proteine, die ein DNA-Bindemotiv besitzen und die Kontrolle des Übergangs von DNA zu mRNA regulieren (Karin, 1990). Das humane Genom wird von etwa 2600 Transkriptionsfaktoren kontrolliert (Babu *et al.*, 2004), wobei oftmals Kofaktoren an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. So steuern Histon-(De)Acetylasen, Methylasen oder auch Kinasen als Kofaktoren die Transkription, obwohl sie im klassischen Sinne keine DNA-Bindedomäne besitzen (Brivanlou *et al.*, 2002). Die Regulation der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren kann auf verschiedene Weisen stattfinden (Abb. 1-10). Die einfachste Einheit der Transkriptionsregulation erfolgt durch die direkte Bindung eines Transkriptionsfaktors an sein Zielgen (a). Oftmals werden Gene aber durch mehrere Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren reguliert, da sie mehrere Bindemotive für Transkriptionsfaktoren besitzen können (b). Es kommt ebenfalls vor, dass viele verschiedene Gene Bindestellen für denselben Transkriptionsfaktor besitzen (z.B. TATA-Box). Meist werden Cluster von Genen gemeinsam reguliert (c), sodass letztlich große, regulierte Netzwerke (d) in der Zelle entstehen (z.B. Signalkaskaden wie NF- κ B, MAP-Kinase, etc.). Die T-box-Proteine stellen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar. Der Name leitet sich von einer Maus ab, bei der die heterozygote Mutation eines Gens zu einem

verkümmerten Schwanz führte. Die homozygote Mutante war letal und dieses Gen wurde als *Brachyury* (brachy = engl. für kurz/klein) oder auch als T (tail = engl. für Schwanz) bezeichnet. 1992 wurde das *Omb*-Gen in *Drosophila* als weiteres verwandtes Gen entdeckt (Pflugfelder *et al.*, 1992).

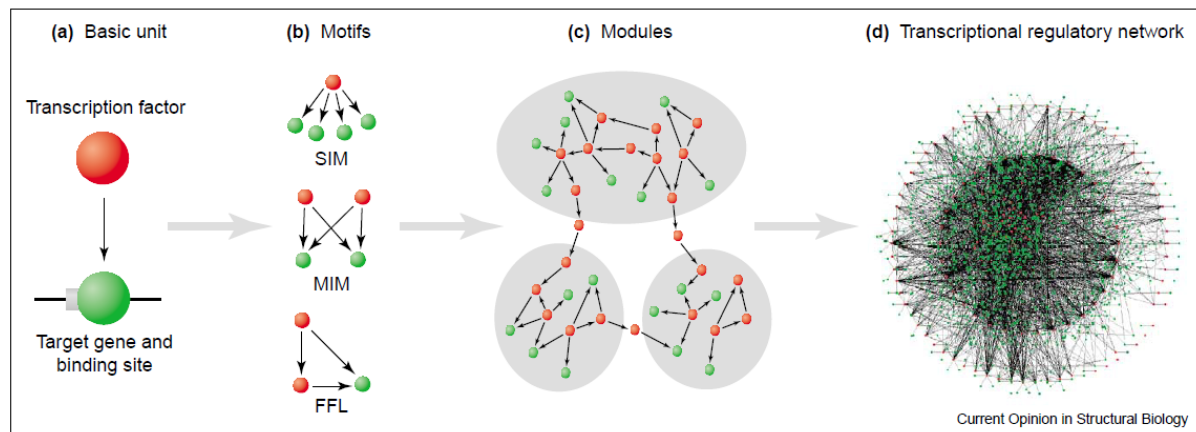


Abbildung 1-10: Regulationsmechanismen der Transkriptionsfaktoren.

a) Die Basiseinheit besteht aus einem Transkriptionsfaktor, seinem Zielgen und deren regulatorischer Interaktion. b) Die Basiseinheiten interagieren oftmals mit Hilfe verschiedener Motive. So können Gene über ein spezifisches Motiv von einem Transkriptionsfaktor reguliert werden (single input motif = SIM), oder Motive für mehrere Transkriptionsfaktoren besitzen (multiple input motif = MIM). Außerdem ist es möglich, dass ein Transkriptionsfaktor einen anderen erst aktivieren muss, um das Zielgen zu kontrollieren (feed-forward loop = FFL). c) Durch diese Motive können vielfältige regulatorische Einheiten entstehen, die letztlich ein Netzwerk zur Kontrolle ganzer Prozesse darstellen können (d). Abbildung nach Babu *et al.*, 2004

Heute ist bekannt, dass T-box-Proteine vor allem in der Entwicklungsbiologie von großer Bedeutung sind. Sie wurden bis heute in einer Vielzahl von Organismen nachgewiesen und sind in vielen Entwicklungsstadien von Geweben wie Nervensystem, Skelett, Niere, Lunge und dem Muskel exprimiert (zusammengefasst in Papaioannou *et al.*, 1998). Der allgemeine Aufbau der T-box-Proteine ist in Abb. 1-11 dargestellt. Alle T-box-Proteine zeichnen sich durch eine phylogenetisch hochkonservierte und charakteristische DNA-Bindedomäne aus, die T-box. Bis heute sind 14 humane T-box-Proteine bekannt, die in nach phylogenetischen Analysen in fünf Unterfamilien eingeordnet wurden: T, TBR 1, TBX1, TBX2 und TBX6 (Wilson *et al.*, 2002). 1993 wurde eine palindromische DNA-Sequenz [TTT(G/C)ACACCTAGGTGTGAA] als Erkennungsmotiv für Brachyury ausgemacht (Kispert *et al.*, 1993). Neuere Untersuchungen zeigten, dass eine Kernsequenz [AGGTGTGAAA] innerhalb des Palindroms ausreicht, um T-box-Proteine zu binden (Carreira *et al.*, 1998, Sinha *et al.*, 2000). Es gibt allerdings auch T-box-Proteine, die an eine DNA-Sequenz binden, die nicht auf die palindromische Sequenz zurückgeht (Carreira *et al.*, 1998, Ghosh *et al.*, 2001, Lingbeek *et al.*, 2002). Zwar ist die T-box bei allen Mitgliedern der T-box-Familie

hochkonserviert, es zeigte sich aber, dass die Zielspezifität wahrscheinlich auf kleine Punkt-Mutationen innerhalb der T-box zurückgeht (Conlon *et al.*, 2001).

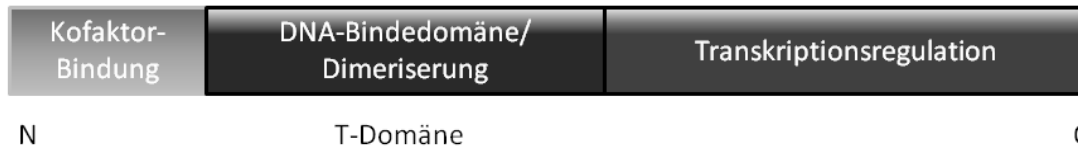


Abbildung 1-11: Allgemeine Struktur der T-box-Proteine

Die DNA-Bindedomäne (T-box) befindet sich im mittleren Bereich der T-box-Proteine, während die transkriptionsregulierenden Domänen am C-Terminus liegen. Die Bindung möglicher Kofaktoren könnte über den N-Terminus erfolgen.

Innerhalb der T-box liegt eine Dimerisierungsdomäne. Für das T-box-Protein Brachyury wurde gezeigt, dass es als Dimer an die DNA kann (Minguillon *et al.*, 2003). Am C-Terminus befinden sich überwiegend transkriptionsregulierende Domänen. T-box-Proteine können dabei als Aktivator oder Repressor fungieren (Kispert *et al.*, 1995, Paxton *et al.*, 2002). Eine mögliche Bindestelle für Kofaktoren wird in der N-terminalen Region des Proteins vermutet.

1.3.1 Die T-box-Proteine TBX2 und TBX3

TBX2 und TBX3 gehören zur TBX2-Unterfamilie der T-box-Proteine und sind zu 54% identisch in ihrer Aminosäuresequenz. TBX2 besteht aus 712 Aminosäuren (AS), während TBX3 723 (Isoform 1) bzw. 743 (Isoform 2) AS besitzt und das größte Protein der T-box-Familie darstellt. Im menschlichen Genom liegen die Gene für TBX2 und TBX4 sowie TBX3 und TBX5 jeweils als Cluster auf den Chromosomen 17 bzw. 12 vor (Agulnik *et al.*, 1996). Wahrscheinlich gab es im Laufe der Evolution eine Duplikation des TBX2/TBX4-Clusters oder des TBX3/TBX5-Clusters, da sich Gene für TBX2 und TBX3 bzw. TBX4 und TBX5 sehr stark ähneln. Wie bei den meisten anderen T-box-Proteinen auch, stammt der größte Teil der Information über TBX2 und TBX3 aus embryonalen Entwicklungsstudien. Die meisten Studien befassten sich mit dem räumlichen und zeitlichen Expressionsprofil der T-box-Proteine während der Entwicklung, im speziellen der Organogenese (Showell *et al.*, 2004). Mutationen im TBX3-Gen führen zum Ulnar-Mammary-Syndrom (Bamshad *et al.*, 1997), Mutationen im TBX5-Gen zum Holt-Oram's-Syndrom mit charakteristischen Defekten des Herzens und der Extremitäten (Li *et al.*, 1997). TBX2 wurde bis heute mit keinem genetischen Defekt in Verbindung gebracht, beeinflusst aber entscheidend die Entwicklung der Extremitäten, des Herzens und der Milchdrüsen (Rowley *et al.*, 2004, Plageman *et al.*,

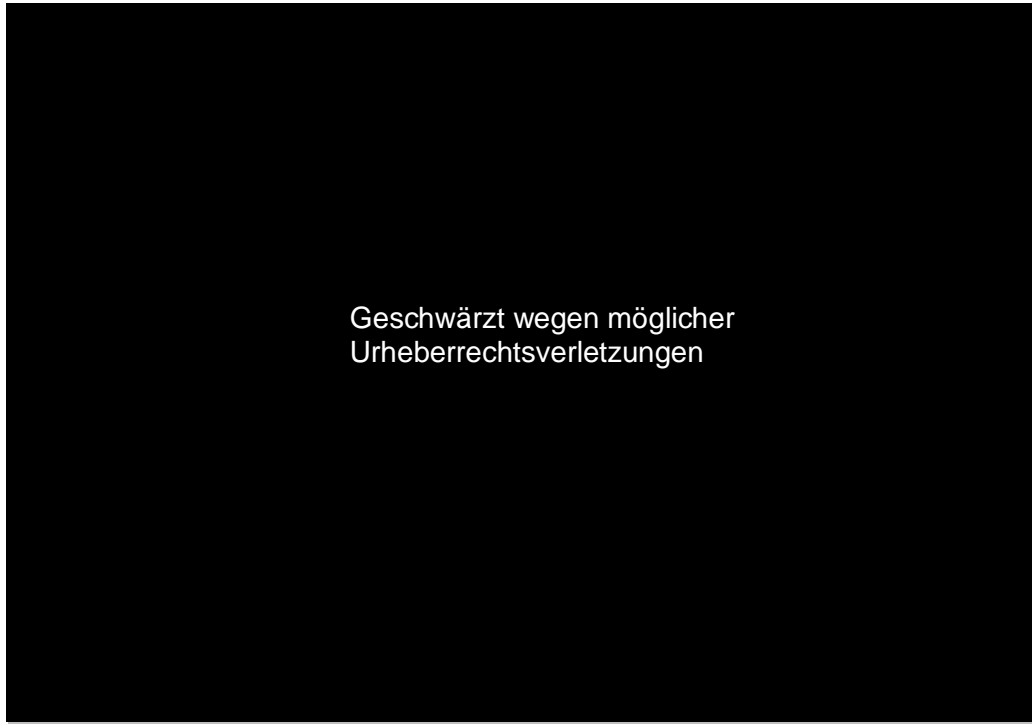
2005, King *et al.*, 2006). Die genaue Ursache der Entwicklungsdefekte ist dabei noch nicht bekannt. In den letzten Jahren wurde aber deutlich, dass verschiedene Signalkaskaden der Zellproliferation und -differenzierung mit der Expression von TBX2 und TBX3 assoziiert sind (zusammengefasst in Abrahams *et al.*, 2010). Während die meisten T-box-Proteine transkriptionsaktivierende Eigenschaften besitzen, sind TBX2 und TBX3 die einzigen T-box-Proteine, die als Transkriptionsrepressoren fungieren können (Carreira *et al.*, 1998, He *et al.*, 1999). Die Repressions-Domänen von TBX3 konnte durch verschiedenste Deletions-Mutanten näher bestimmt werden (Carlson *et al.*, 2001). Demnach befinden sich Repressions-Domänen zwischen AS 123-200 und AS 567-623. Daneben konnte aber auch eine aktivierende Domäne ermittelt werden (AS 423-500). Eine weitere Repressionsdomäne innerhalb der AS 90-110 scheint charakteristisch für TBX2 und TBX3 zu sein und ähnelt keiner anderen bisher bekannten Repressionsdomäne (Dong *et al.*, unpublizierte Daten). Die Bindung an die DNA wird möglicherweise über eine Interaktion mit Histonen und Histondeacetylasen vermittelt (Demay *et al.*, 2007, Yarosh *et al.*, 2008).

Tabelle 1-3: TBX2- und TBX3-Expression in verschiedenen Krebsarten
 ND = nicht bestimmt

Name	Cancer	Ratio (%) elevated in tumor specimens
TBX2	Breast	50%–80%
	Pancreas	50%–60%
	Melanoma	63% (12/19 melanoma cell lines)
TBX3	Breast	70%–90%
	Ovarian	69%
	Pancreas	ND
	Melanoma	57% (8/14 melanoma cell lines)
	Liver	79%–87%
	Cervical	ND
	Lung	ND

TBX2 und TBX3 besitzen jedoch nicht nur wichtige Funktionen bei der Organogenese, sondern sind offensichtlich auch bei der Entstehung von Tumoren beteiligt. Auffällig ist, dass in einer Vielzahl von Karzinomen die Expression von TBX2 und/oder TBX3 hochreguliert ist (Tab. 1-3, zusammengefasst in Lu *et al.*, 2010). Der genaue Zusammenhang zwischen der Expression von TBX2 und TBX3 und der Entstehung von Krebs ist dabei noch nicht verstanden. Die Regulierung des Zellzyklus scheint dabei aber eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine Kombination von Zyklinen, Zyklin-abhängigen Kinasen und deren Inhibitoren kontrollieren und regulieren die Zellproliferation, den Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz. Die Seneszenz ist ein wirksamer Kontrollmechanismus der Zelle gegen Krebs. Sie zeichnet sich durch Wachstumshemmung der Zellen, durch eine Verkürzung der

Telomere oder auch durch die Induktion von Stresssignalen aus (Roninson, 2003). Einer der bekanntesten Mechanismen für die Regulation von zellulärer Seneszenz ist der ARF/MDM2/p53/p21^{CIP1}-Signalweg (Abb. 1-12, zusammengefasst in Sherr *et al.*, 2000). DNA-Schädigungen oder die Deregulation von Zellzyklus-regulierenden Proteinen (z.B. E2F, ras, c-Myc) führen dazu, dass die Proteine p14^{ARF} und p16^{INK4a} aktiviert werden. Die Expression von P16^{INK4a} resultiert im G₁-Zellzyklusarrest. Die Induktion von p14^{ARF} induziert über den Abbau von MDM2 die Expression von p53 und damit zum Einleiten der Apoptose oder einem Zellzyklusarrest. Ein Target von p53 ist dabei p21^{CIP1}, ein Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK2 und CDK4 (Waldman *et al.*, 1995). Für TBX2 und TBX3 konnte gezeigt werden, dass sie sowohl die Expression von p14^{ARF} (bzw. des homologen p19^{ARF} im murinen Modell) als auch von p21^{CIP1} inhibieren können, was in einer starken Unterdrückung der Seneszenz resultiert (Jacobs *et al.*, 2000, Carlson *et al.*, 2002, Prince *et al.*, 2004).



Geschwärzt wegen möglicher
Urheberrechtsverletzungen

Abbildung 1-12: Regulation des Seneszenz über den ARF/MDM2/p53/p21^{CIP1} – Signalweg

Eine DNA-Schädigung oder Deregulation von Zellzyklus-regulierenden Genen führt zur Aktivierung und Expression von p16^{INK4a} und p14^{ARF}. p16^{INK4a} kann über eine Hemmung des CDK4-Cyclin-D1-Komplexes den Zellzyklusarrest in der G1-Phase vermitteln. P14^{ARF} führt zu einer Destabilisierung und zum Abbau von Mdm2, einem Inhibitor von p53. Dadurch kann p53 als transkriptioneller Aktivator über p21 einen Zellzyklusarrest bewirken, bzw. die Expression Apoptose-fördernder Gene begünstigen.

Ein weiterer Signalweg, der den Zellzyklus und die Seneszenz kontrolliert ist der Retinoblastom Protein (pRB)-Signalweg. Dabei kommt die Regulation des Zellzyklus vor allem über die Bindung von pRB an Mitglieder der E2F-Familie zustande (Weinberg, 1995,

Dyson, 1998). Aktuelle Studien haben gezeigt, dass TBX2 auch mit dem pRB-Signalweg assoziiert ist (Vormer *et al.*, 2008, Vance *et al.*, 2010). Die Bindung von TBX2 an die DNA wird demnach durch die Interaktion mit pRB verstärkt. Eine Mutation in TBX2, die die Interaktion mit pRB zerstörte beeinflusste auch die Bindung an andere Targets, sodass die Interaktion mit pRB wahrscheinlich eine wichtige Funktion in der Zellzykluskontrolle darstellt. Zudem ergaben Microarray-Analysen haben eine Vielzahl von Genen mit Zellzyklusbeteiligung von TBX2 reguliert werden können (Vance *et al.*, 2010). Eine erhöhte Expression von TBX2 (Liu *et al.*, 2010) und TBX3 (Lyng *et al.*, 2006) wurde auch in Zervixkarzinomen detektiert. In Studie von 2010 wurde TBX2 in 52% aller HPV16-positiven Zervixkarzinome nachgewiesen, jedoch nur in 2% der gesunden Probandinnen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

L2 besitzt mannigfaltige Aufgaben während der Infektion von HPV. Es wird bereits auf der Oberfläche geschnitten, überquert die endosomale Membran nach dem Zerfall des Kapsids, transportiert die virale DNA in den Zellkern und führt letztlich dazu, dass die virale DNA an den ND10 repliziert werden kann. An wahrscheinlich all diesen Prozessen sind zelluläre Kofaktoren beteiligt. Aktuell sind jedoch nur wenige zelluläre Proteine, wie z.B. das Hitzeschockprotein HSP70 oder der Transkriptionsfaktor Daxx, als Interaktionspartner von L2 näher charakterisiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Systems neue zelluläre Interaktionspartner zu identifizieren und die Interaktion dieser Proteine mit L2 in weitergehenden Versuchen zu charakterisieren.

2 Material

2.1 Geräte und Labormaterialien

Tabelle 2-1: Geräte und Labormaterialien

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler AE 100	Mettler
Blotkammer	Trans Blot Cell	BioRad
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus 6000	Heraeus
Brutschrank (Bakterien)		WTC Binder
Elektrophorese-Kammer, horizontal (DNA)		LMS GmbH Labortechnik (Dossenheim)
Elektrophorese-Kammer vertikal (Protein)		BRL Life Technologies
ELISA-Reader	Multiscan RC Model 351	Thermo Labsystems
FACS-Gerät	FACScan	Becton Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	ZEISS
Geldokumentation	Transillumination BioDocAnalyse	Biometra
Geltrockner	GelDryer MGD-4534	VWR
Heizblock ohne Rotation	Blockthermostat BT 1303	HLC
Heizblock mit Rotation	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Inkubationsschüttler	Certomat	Sartorius
Laborwaage	BL 1500S	Sartorius
Lichtmikroskop	Wilovert S AFL	Hund Wetzlar
Luminometer (Röhrchen)	Röhrchen Luminometer Lumat LB9507	Berthold Technologies
Luminometer (Platten)	Tristar LB 941	Berthold Technologies
Magnetrührer	IKAMAG REC-G	Janke & Kunkel
Mikrowellengerät	Micromat	AEG
Netzgeräte DNA-Gele	Gene Power Supply GPS200/400	Pharmacia
Netzgeräte Protein-Gele	ECPS 3000/150 Standard-Powerpack P25	Pharmacia Biometra
Netzgeräte Blotkammer	PowerPack P25 PHERO-stab.500	Biometra Biotec-Fischer
pH-Meter	pH Level 2	InoLab
Pipetten	P10, P20, P200, P1000	GILSON
Pipettierhilfen	Pipetus®-akku	Hischmann Laborgeräte
qRT-Cycler	7300 Taqman®	Applied Biosystems
Rotoren	SW55 GS 3, GSA	Beckmann Du Pont Instruments NUAIRE
Sterilbank	NU-440-400E (Class II)	Biological safety cabinets
Schüttler	Certomat R Certomat HK	B. Braun B. Braun
Schüttler (Überkopf)	Reax2	Heidolph
Thermocycler	T-Gradient	Biometra
Ultrazentrifuge	L8-70M	Beckman
UV-Transilluminator	TFX-35-MC	Vilber Lourmat
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
Vortexer	MS1 Minishaker	JK
Wasserbad	W12D	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH
Wipp-Schüttler	Rocky	Heraeus
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Megafuge 1.0 Laborfuge 400R Biofuge Pico Biofuge fresco	Du Pont Instruments Heraeus Heraeus Heraeus Heraeus

Alle Plastikwaren wurden von den Firmen Falcon / Becton Dickinson, Greiner und Sarstedt verwendet. Glaswaren stammten von der Firma Schott. Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Laborchemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem, Becton Dickinson, GE Healthcare, Gibco BRL, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia-LKB Biotechnology, Roche, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich. Die verwendete Nitrozellulose-Membran stammte von der Firma Schleicher und Schüll.

2.3 Fertigreagenzien und Kits

Tabelle 2-2: Fertigreagenzien und Kits

Produkt	Hersteller	Verwendung
<i>BioRad Protein Assay</i>	BioRad	Proteinkonzentrationsbestimmung
<i>Fluoprep</i>	bioMérieux	Einbettmedium für Immunfluoreszenzen
<i>β-Gal-Juice PLUS</i>	p.j.k	Lumineszenzsubstrat
<i>β-Gal Triggering Reagent</i>	p.j.k	Lumineszenzsubstrat
<i>Cell Culture Lysis Reagent</i>	Promega	Lyse von eukaryotischen Zellen
<i>Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)</i>	Roche	Zytotoxizitätstest
<i>Gluthatione Sepharose™ 4B</i>	GE Healthcare	Proteinaufreinigung
<i>Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA free (100x)</i>	Thermo Scientific	Protease-Inhibitor
<i>Hybrid Hunter™</i>	Invitrogen	Hefe-2-Hybrid-System
<i>Hoechst 33342</i>	Sigma Aldrich	DNA-Farbstoff
<i>JetPEI™ DNA transfection reagent</i>	Polyplus transfection™	DNA-Transfektion
<i>Lipofectamine™ 2000</i>	Invitrogen	DNA-Transfektion
<i>Lipofectamine™ RNAiMax</i>	Invitrogen	RNA-Transfektion
<i>MATra-A Reagent</i>	IBA BioTAGnology	DNA-Transfektion
<i>MCP Protein Precipitation Reagent</i>	Epicentre® Biotechnologies	Proteinpräzipitation
<i>NucleoBond® Xtra Midi</i>	Macherey und Nagel	DNA-Isolierung aus Bakterien
<i>μMacs GFP Tagged Protein Isolation Kit</i>	MACS Milteny Biotec	Immunpräzipitation
<i>μMacs HA Tagged Protein Isolation Kit</i>	MACS Milteny Biotec	Immunpräzipitation
<i>peqGOLD Pwo Polymerase</i>	Peqlab	Polymerase für PCR
<i>peqGOLD Plasmid Minipräp Kit I</i>	Peqlab	Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Tab. 2.2: Fertigreagenzien und Kits (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller	Verwendung
<i>Perfect Plasmid Maxi</i>	Eppendorf	Plasmid-Isolierung aus Bakterien
<i>peqGOLD Gel Extraction Kit</i>	Peqlab	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen und PCR
<i>Protein A/G PLUS Agarose</i>	Santa Cruz Biotechnology	Immunpräzipitation
<i>PULSin™</i>	Polyplus transfection	Einbringen von Protein
<i>Simple CHIP™ Kit</i>	Cell Signaling	Chromatin Immunpräzipitation
<i>SimplyBlue™ Safestain</i>	Invitrogen	Färbelösung für Proteine
<i>Taq DNA Polymerase</i>	New England Biolabs	Polymerase für PCR
<i>Western Lightning™ Plus-ECL</i>	Perkin Elmer inc.	Western-Blot Detektion (ECL)
<i>Yeastmaker™ Carrier DNA</i>	Clontech	Hering-DNA für Hefe-2-Hybrid

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2-3: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Klon	Verdünnung	Quelle
Anti-β-Actin	Maus monoklonal	AC-15	WB 1:10000	Sigma Aldrich
Anti-DYNLT1 (Tctex-1)	Kaninchen polyklonal		IF 1:300	ProteinTechGroup
Anti-DYNLT1 (Tctex-1)	Maus monoklonal		WB 1:1000	K.Pfister
Anti-DYNLT3 (rp3)	Maus monoklonal	R1	WB 1:1000 IF 1:400	Sigma Aldrich
Anti-DYNLL1 (LC8)	Maus monoklonal	4Pin	WB 1:50	BD
Anti-FLAG	Kaninchen polyklonal		IF 1:2000	Rockland
Anti-FLAG	Maus monoklonal	M2	WB 1:10000	Sigma Aldrich
Anti-GFP	Maus monoklonal	JL-8	WB 1:10000	Clontech
Anti-HA	Ratte monoklonal	3F10	IF 1:100-1:500	Roche
Anti-HA	Maus monoklonal	16B12	WB 1:5000	Convance
Anti-Lex A	Maus monoklonal	2-12	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Myc	Maus monoklonal	9E10	WB 1:10000 IF 1:1000	Clontech
Anti-PML	Maus monoklonal	PG-M3	IF 1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-PML	Kaninchen polyklonal		IF 1:500	Chemicon
Anti-TBX2	Ziege polyklonal	C-17	WB 1:1000 IF 1:250	Santa Cruz Biotechnology

Tab. 2.3: Primäre Antikörper (Fortsetzung)

Antikörper	Spezies	Klon	Verdünnung	Quelle
Anti-TBX2	Maus polyklonal	62-2	WB 1:1000 IF 1:250	C.Goding
Anti-TBX2	Kaninchen polyklonal		IHC 1:15	Sigma Aldrich
Anti- α -Tubulin	Maus monoklonal	B-5-1-2	WB 1:10000 IF 1:1000	Sigma Aldrich
Anti-L1	Maus monoklonal	33L1-7	IF 1:10	M. Sapp
Anti-L1	Kaninchen polyklonal	K75	IF 1:400 IHC 1:1000	M. Sapp
Anti-L2	Maus monoklonal	33L2-1	WB 1:250 IF 1:500 IHC 1:500	M. Sapp
Anti-L2	Kaninchen polyklonal	K18	IF 1:400	M. Sapp

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2-4: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzen

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	Ziege	Alexa Fluor 488	1:400	Invitrogen
		Alexa Fluor 546	1:400	
		Alexa Fluor 647	1:125	
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor 488	1:250	Invitrogen
		Alexa Fluor 546	1:250	
		Alexa Fluor 647	1:125	
Anti-Ratte	Ziege	Dylight™ 549	1:250	Dianova

Tabelle 2-5: Sekundäre Antikörper für Westernblot

Antikörper	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	Ziege	<i>Horse Radish Peroxidase</i>	1:5000	Dianova
Anti-Kaninchen	Ziege	<i>Horse Radish Peroxidase</i>	1:10000	Dianova
Anti-Ziege	Kaninchen	<i>Horse Radish Peroxidase</i>	1:8000	Dianova

2.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

DNA-Probenpuffer, 6x: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylene Cyanol
15 % (v/v) Ficoll Type 400

DPBS / 9,5 mM MgCl₂: 1 x PBS (siehe unten)
9,5 mM MgCl₂

DPBS / 9,5 mM MgCl ₂ / 0,8 M NaCl:	1 x PBS (siehe unten) 9,5 mM MgCl ₂ 800 mM NaCl
Protein-Probenpuffer, 1x: (nach Lämmli)	50 mM Tris (pH 6,8) 2 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Protein-Probenpuffer, 5x:	250 mM Tris (pH 6,8) 8 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerin 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
Lösung B: (für SDS-PAGE nach Laemmli)	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Lösung C: (für SDS-PAGE nach Laemmli)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
PBS, 10x, pH 7,4:	1,37 M NaCl 27 mM KCl 11,5 mM KH ₂ PO ₄ 65 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 <i>dd</i> H ₂ O
TAE-Puffer, 10x, pH 8,0: (für Agarosegele)	400 mM Tris 200 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Western Blot Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Strip-Puffer für Nitrozellulosemembranen:	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 2 % (w/v) SDS 0,1 M β-Mercaptoethanol
Ponceau S-Lösung:	0,1 % (w/v) Ponceau S 3 % (v/v) Trichloressigsäure

2.6 Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme, die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP) und die DNA Polymerase I (*Large Klenow Fragment*) wurden von New England Biolabs bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt. Die T4-DNA-Ligase stammte von Fermentas, von Sigma Aldrich wurde die Benzonase[®] Nuklease verwendet.

2.7 Plasmidkonstrukte

2.7.1 Plasmidkonstrukte für das Hefe-2-Hybrid-Projekt

- pHybLex/Zeo:** Vektor für Köder, Zeocinresistenz. (Invitrogen)
- pHybLexZeo 16L1wt:** Codonoptimiertes HPV16L1wt wurde über *EcoR I* und *Kpn I* in pHybLexZeo einkloniert, Zeocinresistenz.
- pHybLexZeo 16L2wt:** Codonoptimiertes HPV16L2wt wurde über *EcoR I* in pHybLexZeo einkloniert, Zeocinresistenz.
- pHybLexZeo 16L2 1-330:** Ein codonoptimiertes Fragment von HPV16L2 wurde über *EcoR I* in pHybLexZeo einkloniert, Zeocinresistenz.
- pHybLexZeo 16L2 150-473:** Ein codonoptimiertes Fragment von HPV16L2 wurde *blunt* über *Pvu II* und *Kpn I* in pHybLexZeo einkloniert, Zeocinresistenz.
- pHybLexZeo 16L2 280-473:** Ein codonoptimiertes Fragment von HPV16L2 wurde über *EcoR I* in pHybLexZeo einkloniert, Zeocinresistenz.
- pJG4-5:** Vektor für Beute, Ampicillinresistenz. (Invitrogen)
- pJG4-5 DYNLT1:** Beute-Vektor, indem sich die vollständige cDNA von DYNLT1 befindet; über *EcoR I* und *Xho I* einkloniert, Ampicillinresistenz.
- pJG4-5 TBX2:** Beute-Vektor, indem sich die cDNA von TBX2 befindet; über *EcoR I* und *Xho I* einkloniert, Ampicillinresistenz.

2.7.2 Plasmidkonstrukte für das Dynein-Projekt

- pEGFP-C2:** Expressionsvektor für GFP, Kanamycinresistenz. (Clontech)
- pEGFP-C2 DYNLT1:** In den Vektor pEGFP-C2 wurde DYNLT1wt über *EcoR I* einkloniert, Kanamycinresistenz.
- pCMV-Myc:** Expressionsvektor, bei dem exprimierte Proteine mit einem Myc-Tag versehen sind, Ampicillinresistenz. (Clontech)
- pCMV-Myc DYNLT1:** DYNLT1 wurde über *EcoR I* und *Kpn I* in pCMV-Myc einkloniert, Ampicillinresistenz.
- pQE-GST:** In den Expressionsvektor pQE-60 (Qiagen) wurde das GST-Gen über die *Nco I*-Schnittstelle mit *BspH I* und *Nco I* kloniert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von U. Kutay, ETH Zürich)
- pGEX-5X-1 DYNC111:** In den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-5X-1 wurde die *Dynein Intermediate Chain*, Isoform b (DYNC111) über *EcoR I* einkloniert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von R.J. Diefenbach, Sydney)
- pGEX-5X-1 DYNLT1:** In den Expressionsvektor pGEX-5X-1 wurde die *Dynein Light Chain Tctex-1* (DYNLT1) über *EcoR I* und *Xho I* einkloniert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von R.J. Diefenbach, Sydney)
- pGEX-5X-1 DYNLT3:** In den Expressionsvektor pGEX-5X-1 wurde die *Dynein Light Chain rp3* (DYNLT3) über *EcoR I* und *Xho I* einkloniert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von R.J. Diefenbach, Sydney)

- pGEX-5X-1 DYNLL1:** In den Expressionsvektor pGEX-5X-1 wurde die *Dynein Light Chain* LC8 (DYNLL1) über *EcoR I* und *Xho I* einkloniert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von R.J. Diefenbach, Sydney)
- pCMV-HA:** Expressionsvektor, bei dem exprimierte Proteine mit einem Myc-Tag versehen sind, Ampicillinresistenz. (Clontech)
- pCMV-HA DYNLT1:** DYNLT1 wurde mit *EcoR I* und *Kpn I* in den Vektor pCMV-HA einkloniert, Ampicillinresistenz.
- pCMV-HA DYNLT3:** DYNLT3 wurde *blunt/ sticky* über *Bgl II/BamH I* und *Not I* in den Vektor pCMV-HA einkloniert, Ampicillinresistenz.
- pCMV-HA DYNLL1:** In den Expressionsvektor pCMV-HA wurde DYNLL1 *blunt/sticky* über *Bgl II/BamH I* und *Not I* einkloniert, Ampicillinresistenz.
- pCMV-Myc DYNC111:** In den Expressionsvektor pCMV-Myc wurde DYNC111 *blunt/sticky* über *Bgl II/BamH I* und *Not I* einkloniert, Ampicillinresistenz.
- pcDNA 3.1 (+):** Vektor für stabile oder transiente Expression in Säugerzellen, Ampicillinresistenz. (Invitrogen)
- pcDNA 3.1 (+) Luciferase:** Das Luciferase-Gen wurde aus dem Vektor pGL3 basic (s.u.) mit *Hind III* und *Xba I* ausgeschnitten und in die MCS des Vektors pcDNA 3.1 (+) eingefügt, Ampicillinresistenz.
- pUF3/hu16L2:** codonoptimiertes HPV16 L2-Gen, über *Not I* und *Hind III* in den Vektor pUF3 AVV#893-Vektor kloniert, Ampicillinresistenz. (Leder *et al.*, 2001)

- pUF3/hu16L2 1-454:** codonoptimiertes HPV16 L2 1-454 wurde über *Not I* und *Hind III* in den Vektor pUF3 AAV#893-Vektor einkloniert, Ampicillinresistenz. (Kamper *et al.*, 2006)
- pUF3/hu16L2 1-461:** codonoptimiertes HPV16 L2 1-461 wurde *Sac II* und *Hind III* in den Vektor pUF3 AAV#893-Vektor kloniert, Ampicillinresistenz. (Kamper *et al.*, 2006)
- pShell16L1-16L2wt:** Expressionsvektor für die Kapsidproteine L1 und L2, wobei der Vektor nicht wieder verpackt werden kann, Ampicillinresistenzgen. (Leder *et al.*, 2001, Buck *et al.*, 2006)
- pShell16L1-16L2-3xHA:** L2wt aus dem Vektor pShell16L1-16L2wt wurde über *Xba I* und *EcoR V* entfernt und durch L2-3xHA ersetzt. Dieses wurde über *Nhe I* in die kompatiblen Schnittstellen *Xba I* und *EcoR V* eingefügt, Ampicillinresistenz.

2.7.3 Plasmidkonstrukte für das TBX2-Projekt

- pGL3 basic:** Promotor-Reporterplasmid, welches das Luciferase-Gen enthält, Ampicillinresistenz. (Promega)
- pGL3 LCR16:** Die Basen 7232-94 der *Long control region* (LCR) von HPV16 über *HindIII* in pGL3-Basic Vektor kloniert, Ampicillinrestistenz. (Baldwin *et al.*, 2004)
- pGL3 LCR16 7454-94:** Die Basen 7232-7453 des LCR16 wurden mit Hilfe von *EcoR I* und *Xho I* aus dem Vektor pGL3 LCR16 deletiert und der Vektor wurde religiert, Ampicillinresistenz.
- pGL3 LCR16 7564-94:** In den Vektor pGL3 Basic wurde wurden die Basen 7564-94 des LCR16 über *Xho I* und *Hind III* integriert, Ampicillinresistenz.

- pGL3 LCR16 7756-94:** Die Basen 7232-7756 des LCR16 wurden mit Hilfe von *Sma I* und *Pme I* aus dem Vektor pGL3 LCR16 entfernt und der Vektor wurde blunt religiert, Ampicillinresistenz.
- pGL3 LCR16 Tbe20:** Mit einer Mutagenese-PCR auf den Vektor pGL3 LCR16 wurde eine mögliche Bindestelle von TBX2 im LCR von HPV16 mutiert, Ampicillinresistenz.
- pGL3 LCR16 7454 Tbe20:** Mit einer Mutagenese-PCR auf den Vektor pGL3 LCR16 7454-94 wurde eine mögliche Bindestelle von TBX2 im LCR von HPV16 mutiert, Ampicillinresistenz.
- pGL3 LCR16 7564 Tbe20:** Mit einer Mutagenese-PCR auf den Vektor pGL3 LCR16 7564-94 wurde eine mögliche Bindestelle von TBX2 im LCR von HPV16 mutiert, Ampicillinresistenz.
- pGL3 p97:** Die Basen 7003-114 der LCR16 wurden über *Hind III* und *Nco I* in den Vektor pGL3 basic integriert, Ampicillinresistenz. (Kukimoto *et al.*, 2006)
- pGL3 p670:** Die Basen 7003-868 der LCR16 wurden über *Pst I* und *Nco I* in den Vektor pGL3 basic integriert, Ampicillinresistenz. (Kukimoto *et al.*, 2006)
- pGL4.20 puro LCR11:** In den Vektor pGL4.20 puro wurde die LCR von HPV11 über *Sac I* und *Bgl II* integriert, Ampicillinresistenz. (Schweiger *et al.*, 2007)
- pGL4.20 puro LCR18:** In den Vektor pGL4.20 puro wurde die LCR von HPV18 über *Sac I* und *Bgl II* integriert, Ampicillinresistenz. (Schweiger *et al.*, 2007)
- pGL4.20 puro:** Aus dem Vektor pGL4.20 puro LCR11 wurde die LCR11-Sequenz mit Hilfe von *Sac I* und *Bgl II* entfernt und der Vektor *blunt* religiert.

- pGL4.20 puro LCR16:** Aus dem Vektor pGL3 LCR16 wurde die LCR mit *Hind III* in den Zielvektor pGL4.20 puro einkloniert.
- pGL4.20 puro LCR16
-SV40 Promotor:** Aus dem Vektor pGL4.20 puro LCR16 wurde mit *BamH I* und *Sal I* die Puromycin-Kassette inkl. des SV40 Promotors entfernt und der Vektor *blunt* religiert, Ampicillinresistenz.
- pT-Rex-DEST30:** Eukaryotischer Expressionsvektor aus dem Gateway®-System, Neomycinresistenz. (Invitrogen)
- pT-Rex-DEST30/
TBX2-3xFLAG:** Humanes TBX2-3xFLAG wurde mit dem Gateway®-System (Invitrogen) in den Vektor pT-Rex-DEST30 einkloniert, Neomycinresistenz. (zur Verfügung gestellt von G. O. Pflugfelder)
- pT-Rex-DEST30/
TBX3-3xFLAG:** Humanes TBX3-3xFLAG wurde mit dem Gateway®-System (Invitrogen) in den Vektor pT-Rex-DEST30 einkloniert, Neomycinresistenz. (zur Verfügung gestellt von G. O. Pflugfelder, Mainz)
- p3xFLAG-CMV14/
mTbx2:** In den Vektor p3xFLAG-CMV14 wurde murines Tbx2wt über *BamH I* einkloniert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von C.Goding, Oxford)
- p3xFLAG-CMV14/
mTbx2 RR122/123EE:** Im Vektor p3xFLAG-CMV14 wurde die DNA-Bindestelle von Tbx2wt mutiert, Ampicillinresistenz. (zur Verfügung gestellt von C. Goding, Oxford)

2.8 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2-6 und 2-7 angegebenen Oligonukleotide wurden von den Firmen biomers oder Sigma bezogen.

Tabelle 2-6: PCR-Primer für alle in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte.

Zur Verdeutlichung der mutierten Tbe20-Sequenz innerhalb der Mutagenese-Primer wurde diese grau markiert.
rev = reverse; forw = forward

Primerbezeichnung	Primersequenz
16L2- <i>EcoR</i> / M280-5'	5'-AAA GAA TTC ATG GAC CCC GAC TTC CTG GAC-3'
DYNLT1-(<i>EcoR</i> /)M-5'	5'-GGG AAT TCT CAT GGA AGA CTA CCA GGC TGC G-3'
DYNLT1-114S(<i>Kpn</i> /)-3'	5'-GGG GTA CCT TAG AGG ATG AAC TAG AGA CAA AAG GAG-3'
LCR rev. <i>Hind</i> III	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC-3'
LCR forw. 7564	5'-ATT CTC GAG GTT TTC CTG ACC TGC ACT GCT TGC CC-3'
LCR18 7595-7613 forw.	5'-GGC GCA CCT GGT ATT AGT C-3'
LCR18 7733-7754 rev.	5'-CAT GAA AGT AGT TGT ACA AGC C-3'
LCR18 7735-7757 forw.	5'-CTT GTA CAA CTA CTT TCA TGT CC-3'
18E6 104-124 rev.	5'-GCG CCA TAG TAT TGT GGT GTG-3'
16E1 forw. Primer	5'-ATA GGT ATG TTA GAT GAT GCT ACA-3'
16E1 rev. Primer	5'-CAC GTC CTT GAG AAA AAG GAT-3'
Tbe20 Mutagenese forw. Primer	5'-CAT TTG TAA AAC TGC ACA TGG GAA ACC GCA AAC CGA TTT TGG GTT ACA C-3'
Tbe20 Mutagenese rev. Primer	5'-GTG TAA CCC AAA ATC GGT TTG CGG TTT CCC ATG TGC AGT TTT ACA AAT G-3'

Tabelle 2-7: DNA-Primer für Sequenzierung.

rev = reverse; forw = forward

Primerbezeichnung	Primersequenz
pHybLex/Zeo	5'-AGG GCT GGC GGT TGG GGT TAT TCG C-3'
pHybLex/Zeo rev.	5'-GAG TCA CTT TAA AAT TTG TAT ACA C-3'
pJG4-5 Forward Primer	5'-CCA GCC TCT TGC TGA GTG GAG ATG-3'
pJG4-5 Reverse Primer	5'-GAC AAG CCG ACA ACC TTG ATT GGA G-3'
T7 (pcDNA 3.1(+))	5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3'
BGH reverse (pcDNA 3.1 (+))	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AAG-3'
CMV forw. (pCMV-HA/Myc/-14)	5'-CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3'
pGEX 5' (pGEX-Vektoren)	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'
pGEX 3' (pGEX-Vektoren)	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'
RVprimer3 (pGL3)	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC-3'

Tabelle 2-8: siRNA-Nukleotide für RNA-Interferenzexperimente.

siRNA-Bezeichnung	Sequenz	Quelle
DYNLT1 A	CCACAAAUGUAGUAGAACAAtt	Applied Biosystems
DYNLT1 B	GAGGCUAUAGAAAGCGCAAtt	Qiagen
DYNLT3 A	GGGCAUAUGUCUCUGCUAAtt	Qiagen
DYNLT3 B	CAUAGUAAUUGGCAGAUUAtt	Sigma
DYNLL1 A	CAGAATAGCCTACATTTGTATt	Qiagen
DYNLL1 B	GCACUGCAGCCUAAAUUCct	Sigma
TBX2	CGCUAUAAGUCCACAACUtt	Sigma
Kontroll-siRNA	AllStars Negative Control siRNA	Qiagen

2.9 Bakterienstämme

***Escherichia coli* DH5α:**

F' *proA*+*B*+ *lacI*_q (Δ *lacZ*) M15 zzf::Tn10 (*Tet*^R) / *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*) U169 (Φ 80 Δ (*lacZ*)

M15) *glnV44 gyrA96* (*Nal*_R) *recA1 endA1 thi-1 hsdR7*

(NEB 5-alpha chemisch kompetente *E.coli*, New England BioLabs)

***Escherichia coli* XL10-Gold:**

endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *tet*^R
F'[*proAB lacI*^q Δ M15 Tn10(*Tet*^R *Amy Cm*^R)]

(Stratagene XL10-Gold Ultracompetent Cells, Stratagene)

***Escherichia coli* TG1:**

F' [*traD36 proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15]*supE thi-1* Δ (*lac-proAB*) Δ (*mcrB-hsdSM*)5, (*r_Km_K*)

(Phage Display Electrocompetent Cells, Lucigen)

***Escherichia coli* Survival:**

F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ*_M15_*lacX74 recA1 ara_139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU*
galK rpsL (*Str*_R) *endA1 nupG tonA::Ptrc-ccdA*

(One Shot® *ccdB* Survival™ T1 Phage-Resistant Cells, Invitrogen)

2.10 Bakterienkulturen

Bakterienkulturen wurden standardmäßig in LB-Medium angesetzt. Für feste Nährböden wurde jeweils 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt. Die Bakterienselektion wurde mit dem Antibiotikum durchgeführt, das dem Resistenzgen des jeweiligen Vektors entsprach (siehe 2.1.8.). Ampicillin wurde dabei mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Kanamycin von 50 µg/ml und Zeocin von 25 µg/ml eingesetzt.

LB (Luria-Bertani)-Medium:

0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) Trypton
1 % (w/v) NaCl
pH 7,0

LB (Luria-Bertani)-Medium (low salt): 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) NaCl
pH 7,5

SOC-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
2% (w/v) Trypton
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucose

2.11 Hefen

***Saccharomyces cerevisiae* L40:**

MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3)URA3::(8lexAop-lacZ) GAL4
(Hybrid Hunter™, Invitrogen, Darmstadt)

2.12 Hefemedien

Für die Kultivierung der Hefen wurden diese entweder in Vollmedium (YPD-Medium) oder den autotrophen Aminosäuremarkern entsprechend in Selektionsmedium (YC-Medium) angesetzt. Die Zusammensetzung der Medien erfolgte nach Herstellerangaben (Hybrid Hunter™, Invitrogen).

2.13 cDNA-Bank

Für die Hefe-2-Hybrid-Analyse wurde eine cDNA-Bank aus einer humanen Fibroblastenzelllinie (W138, Guyris *et al*, 1993) verwendet.

2.14 Zellkulturen, Medien und Zusätze

HeLa:	Humane Zervixkarzinomzelllinie, HPV18 positiv
HaCaT:	Humane, spontan immortalisierte epitheliale Zelllinie der Haut
MCF-7:	Humane Adenokarzinomzelllinie der Brust
HEK 293TT:	Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, enthält zusätzlich zweimal das T-Antigen von SV40 (Buck et al., 2004; Pear et al., 1993)
Cos-7:	Fibroblastenzelllinie isoliert aus der Niere von <i>Cercopithecus aethiops</i> (Grüne Meerkatze), trägt das T-Antigen des Simian Virus (SV40)
NHEK:	Normale humane epidermale Keratinozyten

Tabelle 2-9: Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller	Verwendung
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA Laboratories	Standard-Zellkulturmedium
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Zusatz für Standardmedium
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAA Laboratories	Zusatz für Standardmedium
Ciprofloxacin (2 mg/ml)	Fresenius Kabi	Zusatz für Standardmedium
Pyruvat (100 mM)	Gibco	Zusatz für Standardmedium
Hygromycin B (50 mg/ml)	Roth	Selektionsantibiotikum für HEK 293TT
Keratinocyte Growth Medium 2	PromoCell	Wachstumsmedium für primäre Keratinozyten
Keratinocyte-SFM	Gibco	Wachstumsmedium für primäre Keratinozyten
HepesBSS (30mM Hepes)	PromoCell	Waschlösung für primäre Keratinozyten
Trypsin/EDTA-Lösung (0,04 % / 0,03 %)	PromoCell	Ablösen der primären Keratinozyten
Trypsin-Neutralisierungslösung	PromoCell	Neutralisierung der Trypsinierung

2.15 Größenstandards

Protein-Standard-Marker für SDS-PAGE:

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas

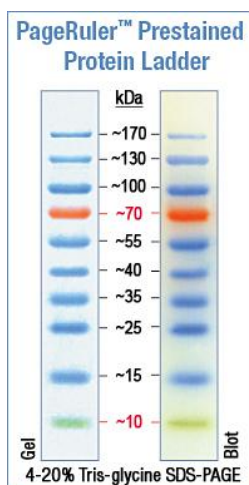


Abbildung 2-1: Protein-Größenstandard

DNA-Leiter für Agarosegele:

peqLab 1kb DNA-Leiter, peqLab

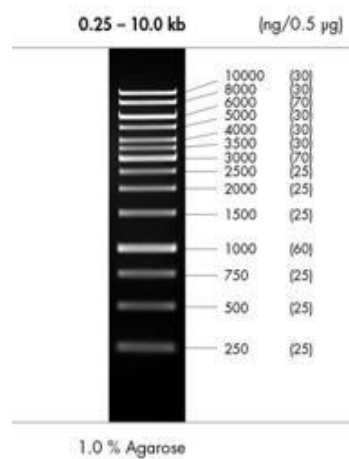


Abbildung 2-2: DNA-Größenstandard

3 Methoden

Grundlegende Methoden, die hier nicht näher aufgeführt oder nur kurz beschrieben sind, wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1994) durchgeführt. Dazu zählen:

- Anlegen von Bakterienkulturen in flüssigen und festen Kulturmedien
- Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung von Enden linearer DNA-Fragmente mit *Calf Intestinal Phosphatase*
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

Die Präparation von Plasmid-DNA (mini, midi bzw. maxi), Aufreinigung von PCR-Produkten und die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgten durch die entsprechenden Kits (siehe Tab. 2-2) gemäß den Herstellerangaben.

3.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR, (Mullis *et al.*, 1986) wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation von spezifischen PCR-Fragmenten (3.1.1 und 3.3.10) oder Generierung von DNA-Mutationen (3.1.2) verwendet.

3.1.1 Standard-PCR

Für viele in dieser Arbeit erstellte Klonierungen wurden Primer verwendet, die eine integrierte Schnittstelle für ein Restriktionsenzym enthielten. Die gewünschten Fragmente wurden erst mittels PCR amplifiziert, anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und in die Zielvektoren kloniert. Tab. 3-1 gibt einen für die Klonierungen häufig verwendeten Standard-PCR-Ansatz und Tab 3-2 ein Standard-PCR-Programm an. Die

Standard-PCR wurde ebenfalls für die HPV-Typisierung von Gewebeschnitten (siehe 3.3.12.1) und für die Chromatin-IP (ChIP, siehe 3.3.10) verwendet.

Tabelle 3-1: Standard-PCR-Ansatz

PCR-Zusatz	Eingesetzte Menge
Template	100 ng
Primer Forward + Reverse 10 pmol/µl	je 1,5 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
PCR-Puffer 10x	5 µl
Pwo Polymerase	1 µl
Wasser	ad 50 µl

Tabelle 3-2: Standard-PCR-Programm

Zeit	Temperatur	Vorgang
5 min	95°C	Denaturierung
1 min	95°C	Denaturierung
1 min	$T_m - 5^\circ\text{C}$	Anlagerung
30 sec- 1 min/kb	68-72°C	Elongation
5 min	68-72°C	Finale Elongation

} 30-40 x

3.1.2 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR wurde für die gezielte Mutation einer bzw. mehrerer Basen einer bestimmten DNA-Sequenz verwendet. Mittels gegenläufiger mutagener Primer wird das gesamte Plasmid amplifiziert und dabei die Mutation inseriert (Abb. 3.1, Schritt 2). Nach der Neusynthese der Plasmid-DNA durch die PCR-Reaktion wird ein Dpn I-Verdau durchgeführt (Schritt 4). Das Restriktionsenzym Dpn I baut gezielt die methylierte Ausgangs-DNA (Template) ab, sodass nur die neu synthetisierten und nicht-methylierten, mutierten Plasmide erhalten bleiben. Für die Mutation der TBE20 im LCR von HPV16 wurden die in Tab. 2-6 angegebenen Mutagenese-Primer verwendet. Der Mutagenese-Ansatz setzte sich wie in Tab. 3-3 angegeben zusammen. Die anschließende PCR wurde wie in Tab. 3-4 angegeben durchgeführt. Nach der PCR wurde die ursprüngliche Template-DNA durch einen Dpn I-Verdau (1,5 µl) für 2h bei 37°C abgebaut, 5 µl des Ansatzes in kompetente *E.coli* DH5α transformiert und auf Selektionsplatten ausplattiert. Je drei Klone wurden bei der Firma Genterprise (Mainz) sequenziert.



Abbildung 3-1: Prinzip der Plasmid-Mutagenese

Das Ausgangsplasmid wird denaturiert (1). Nach dem Anlagern der Primer (2) und findet die Elongation der neuen DNA-Stränge statt (3). Die methylierte Ausgangs-DNA wird nach der Amplifikation durch enzymatischen Verdau abgebaut (4), sodass nur die neu synthetisierten Plasmide erhalten bleiben.

Tabelle 3-3: Mutagenese-PCR-Ansatz

PCR-Zusatz	Eingesetzte Menge
Template	20 ng
Primer Forward + Reverse 10 pmol/μl	je 1,5 μl
dNTPs 10 mMol	2 μl
PCR-Puffer 10x	5 μl
Pwo Polymerase	1,2 μl
Wasser	Ad 50 μl

Tabelle 3-4: PCR-Programm der Mutagenese-PCR

Zeit	Temperatur	Vorgang
2 min	95°C	Denaturierung
1 min	95°C	Denaturierung
45 sek	55-60°C	Anlagerung
2 min (kb)	68°C	Elongation
10 min	68°C	Finale Elongation

} 20 x

3.2 Hefe-2 Hybrid-System

Dem in dieser Arbeit durchgeführten Hefe-2-Hybrid-Screening lag das Hybrid Hunter™-System (Invitrogen) zu Grunde. Mit Hilfe dieses Systems können unbekannte Interaktionspartner eines beliebigen Proteins gesucht werden. Das zu untersuchende Protein wird dabei als Köder (*bait*) verwendet, mit dem die Beute „gefangen“ wird (Abb. 2-3). Der Köder besitzt eine DNA-Bindedomäne (A), die Beute eine transaktivierende Domäne (B). Kommt der Köder durch eine Interaktion mit der Beute in räumlicher Nähe zusammen, wird ein Reportersystem bestehend aus dem LacZ-Gen und einem autotrophen Marker angeschaltet (C).

Als Köder im Hefe-2-Hybrid-Screening wurde in dieser Arbeit das L2-Protein von HPV16 benutzt. Als Beute diente eine cDNA-Bank aus einer Lungenfibroblastenzelllinie, die in den Vektor pJG4-5 inkloniert wurde (Gyuris *et al.*, 1993).

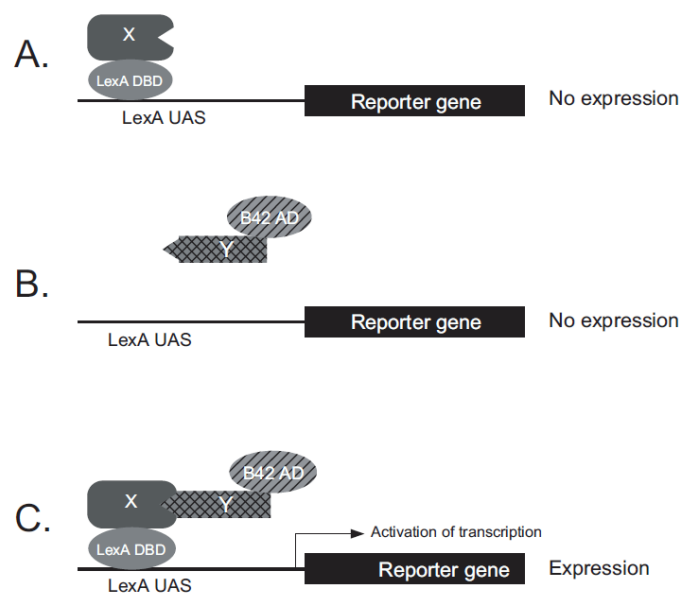


Abbildung 3-2. Prinzip des Hefe-2-Hybrid-Systems Hybrid Hunter™.

Das Protein X ist an eine DNA-Bindedomäne fusioniert (A), während das Protein Y eine DNA-Aktivierungsdomäne für das Reportersystem besitzt (B). Liegen beide Proteine allein vor, können sie das Reportersystem nicht aktivieren. Interagieren beide Proteine miteinander, kommen Binde- und Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe und das Reportersystem wird aktiviert (C). DBD: DNA binding domain; AD: activating domain; UAS: upstream activating sequence

3.2.1 Amplifikation der cDNA-Bank

Zuerst wurde die Amplifikation der cDNA-Plasmidbank durchgeführt. Je 120 ng der cDNA-Bank wurden dafür 30 min mit 50 µl kompetenten *E.coli* DH5α-Zellen auf 4°C inkubiert und anschließend 60 sek bei 42°C erhitzt. Nach dem Hitzeschock wurden die kompetenten

Zellen in 850 µl SOC-Medium aufgenommen. Der Ansatz wurde 45 min bei 37°C inkubiert und mit 600 µl LB-Medium auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufgefüllt. Je 300 µl Zellen wurden dann auf eine 15 cm-Kulturschalen mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *E. coli*-Klone mit 2 ml LB-Medium abgeschabt und die Kulturschale mit einem weiteren Milliliter LB-Medium nachgespült. Die Suspensionen wurden vereinigt, auf 2x 500 ml LB-/Amp-Medium aufgeteilt und 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen durch Zentrifugation pelletiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben (*peqGOLD Plasmid Minipräp Kit 1*, Peqlab) isoliert. Insgesamt wurde aus etwa 2×10^8 Klonen DNA isoliert und etwa 10 mg Plasmid gewonnen.

3.2.2 Transformation der Hefen mit dem Köder

Für die Transformation eines Plasmids (z.B. Köder) in *S. cerevisiae* wurde zuerst eine Kolonie des Stamms L40 in 5 ml YPD + 0,1% Adenin (= YPAD) über Nacht bei 30°C angezogen. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf eine optische Dichte OD_{600} von 0,4 verdünnt und in 50 ml YPAD für weitere 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur im 50 ml Zentrifugegefäß bei 1750 x g für 8 min bei RT pelletiert und in 40 ml 1x TE-Puffer resuspendiert (Vortexer). Die Kultur wurde erneut für 8 min bei 1750 x g pelletiert und in 2 ml 1x LiAc/0,5x TE resuspendiert. Während einer 10 minütigen Inkubation der Kultur bei RT wurde geschertes Heringssperma 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Für jede Transformation wurden 1 µg Plasmid-DNA, 160 µg gescherte Heringssperma-DNA und 700 µl 1x LiAc/40% PEG-3350/1x TE vorgelegt. Nach Zugabe von 400 µl Hefesuspension wurde der Ansatz für 10 sek gemischt (Vortexer) und ein 15 minütiger Hitzeschock bei 42°C (Wasserbad) durchgeführt. Nach dem Hitzeschock wurde der Transformationsansatz bei 2800 x g für 20 sek zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 1 ml YPAD resuspendiert (Vortexer). Nach einer 1 stündigen Inkubation bei 30 Grad (Schüttler) wurde der Transformationsansatz in 1 ml 1x TE-Puffer gewaschen (20 sek, 2800 x g) und in 1 ml 1x TE-Puffer aufgenommen. 300 µl des Ansatzes wurden dann auf einer vorgewärmten Agarplatte (YPAD + Zeocin) ausplattiert und für 3-7 Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.3 Test auf transaktivierende Eigenschaften der Beute

Um auszuschließen, dass das Reportersystem im Hefe-2-Hybrid-System bereits durch die Beute angeschaltet wird, wurden die verschiedenen L2-Konstrukte, Positiv- und Negativkontrollen auf ihre transaktivierenden Eigenschaften untersucht.

Die zuvor auf dem Vollmedium gewachsenen Klone wurden in 50 µl Wasser aufgenommen und erneut auf Agarplatten ausgetropft (3-5 µl). Die Hefen wurden dabei unter den entsprechenden Selektionen für die verschiedenen Tests (Tab.3-5) erneut für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Für die Aktivierung des auxotrophen Markers Histidin (His) wurden die Hefen auf Agarplatten ausgetropft, die kein His enthielten (YC + Ade + Leu + Trp).

Für den Test auf die Aktivierung des *LacZ*-Gens (β -Galaktosidase-Filterassay) wurden zuerst 20 ml Z-Puffer mit 54 µl β -Mercaptoethanol und 334 µl x gal (20 mg/ml) gemischt und in eine Petrischale ($\emptyset = 15$ cm) mit zwei Lagen Whatmanpapier gegeben. Mit einem Rundfilter (14 cm) wurde ein Abklatsch der Hefeklone von der Agarplatte gemacht. Anschließend wurde der Filter (Klone auf der Oberseite) für 30 sek auf eine in flüssigem Stickstoff schwimmende Aluminiumschale gegeben und dann für 5 sek kurz eingetaucht. Der Filter wurde danach (Klone auf der Oberseite) in die Petrischale mit Whatmanpapier und Z-Puffer gelegt und für 30 min bis mehrere Stunden in einen 30°C-Inkubator gegeben. Die entwickelten Filter wurden getrocknet und eingescannt.

Tabelle 3-5: Test der Beute auf Transaktivierung.

3-AT: 3-Amino-Triazol; β -Gal: β -Galaktosidase

Test	Medium
His-Auxotrophiemarker	YC + Ade + Leu + Trp + Zeocin
β -Gal-Filterassay	YC + Ade + Leu + Trp + His + Zeocin
3-AT-Test	YC + Ade + Leu + Trp + 3-AT + Zeocin
Positivkontrolle	YC + Ade + Leu + Trp + His + Zeocin

Um unspezifische Transaktivierung von bestimmten Köder-Konstrukten zu unterdrücken, wurde 3-Aminotriazol (3-AT) in verschiedenen Konzentrationen zu den Agarplatten zugegeben, auf die die Klone ausgetropft wurden. Für das Screening wurde letztlich eine Konzentration von 2,5 mM 3-AT für den Köder L2 150-473 gewählt.

3.2.4 Transformation der Hefen mit der Beute

Analog der Transformation der Hefen mit dem Köder wurde die Beute in die Hefeklone eingebracht, die bereits einen Köder enthielten. Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert (YC + Ade + Leu) und für 3-7 Tage bei 30°C inkubiert. Die größten Kolonien wurden dann gepickt, in 50 µl Wasser verdünnt und erneut auf Selektionsplatten ausgetropft. Alle Klone, die auch nach der zweiten His-Selektion weiterhin positiv waren, wurden auf entsprechenden Agarplatten ausgetropft (YC + Ade + Leu + His) und mit dem β-Gal-Filterassay (s.o.) auf die Aktivierung des *LacZ*-Gens überprüft.

3.2.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Hefe

Nach der His- und β-Gal-Selektion, wurden die positiven Klone aufgeschlossen, um das cDNA-Plasmid mit der unbekanntes Beute aus der Hefe zu isolieren. Dafür wurden die entsprechenden Klone in 4 ml YPAD über Nacht auf dem 30°C-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Hefen eine Minute bei 13000 x g im 1,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert und in 250 µl der Lösung 1 (*peqGOLD Plasmid Minipräp Kit I*) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde dann mit etwa 50-100 µl Glaskugeln (0,42 - 0,6 mM) versetzt und 5 min gemischt (Vortexer). Anschließend wurden die Zellen nach dem Protokoll für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien (*peqGOLD Plasmid Minipräp Kit I*) behandelt. Abweichend davon wurden die Hefen nach Zugabe der Lösung 2 für 5 min bei RT inkubiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte in 25 µl zweifach-destilliertem Wasser. Anschließend wurden 10 µl des Eluats in TG1-Zellen transformiert. Je drei Bakterienklone wurden pro Transformation verwendet, um die Plasmid-DNA zu isolieren. Nach der Isolation der Plasmide aus den Bakterien wurden diese, sofern nach der Restriktion mit EcoR I und Xho I ein bzw. mehrere Integrate sichtbar waren, sequenziert und analysiert.

3.2.6 Rücktest der Interaktion im Hefe-2-Hybrid-System

Alle Plasmide, die aus den Hefen bzw. Bakterien isoliert werden konnten, wurden erneut in die Hefen transformiert, wenn diese mit einem Protein aus der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) im richtigen Leseraster übereinstimmten. Dabei wurden die Plasmide sowohl mit dem Köder, als auch Negativ- und Positivkontrollen in die Hefen transformiert. Die Transformation und Selektion wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

3.2.7 Nachweis der Expression von Köder- und Beute-Proteinen in der Hefe

Die positiven Hefe-Klone wurden in 150 ml YPAD-Medium überimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Kultur für 15 min bei 3100 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml PBS aufgenommen und die Suspension auf zwei 15 ml Reaktionsgefäß aufgeteilt und erneut für 10 min bei 4000 x g pelletiert. Die Pellets wurden dann in je 1,5 ml Hefe-Aufschlusspuffer (1x PBS, 0,1% Triton X-100, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 1 mM NaF, Leupeptin und Aprotinin (je 1 µg/ml)) aufgenommen. Nach der Zugabe von 2 ml Glaskugeln wurden die Hefen auf Eis 10 x 20 sek (Output Control 5, Duty Cycle 50%, kleiner Schallkopf) und 1 min konstant (Output Control 5, Duty Cycle 100%) mittels Ultraschall aufgeschlossen und danach 1 min mit dem Vortexer gemischt. Die Hefesuspension wurde in neue 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 8 min bei 3100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 8500 x g zentrifugiert.

Das Lysat wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Immunoblot. Dabei wurden der Köder mit einem LexA-Antikörper und die Beute mit einem HA-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis der Expression von TBX2 und L2 1-280 wurde von Konstanze Scheffer im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Kultivierung von Zelllinien

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Inkubationsschritte bei 37°C und 5 % CO₂ in dafür vorgesehenen Brutschränken. Alle unter 2.1.14 aufgelisteten Zelllinien wurden als Einschicht-Kulturen in Plastik-Gewebekulturflaschen kultiviert.

Die Anzucht erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Rinderserum (FCS), 5 µg/ml Ciprofloxacin und 1 % (v/v) nichtessentieller Aminosäuren. Das Medium für MCF-7 enthielt zusätzlich 1 mM Natrium-Pyruvat. HEK 293TT-Zellen wurden 1x wöchentlich zusätzlich mit 200 µg/ml Hygromycin B bis zur nächsten Passage inkubiert. Primäre Keratinozyten (NHEK) wurden in speziellem Medium für primäre Keratinozyten kultiviert.

Zum Passagieren wurden konfluente und adhärente Zellrasen mit PBS/EDTA 2,5 mM gewaschen, in Trypsin/EDTA vom Gefäßboden abgelöst (3-10 min, 37°C) und abhängig vom Versuchsansatz im entsprechenden Medium verdünnt.

Primäre Keratinozyten wurden bei etwa 70 % Konfluenz mit Hepes/BSS gewaschen, mit Trypsin/EDTA bei RT abgelöst (10-15 min), mit Trypsin-Neutralisierungslösung behandelt und entsprechend dem Versuchsansatz in Medium verdünnt.

Für die Langzeitlagerung von Zellen wurden von frisch aufgetauten und kultivierten Zelllinien Aliquots in 90 % (v/v) FCS / 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kryoröhrchen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden dabei zunächst für 2-5 Tage in mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen bei -80°C aufbewahrt und anschließend in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt.

3.3.2 DNA-Transfektion von adhärennten Säugerzellen

Um DNA in Zellen einzubringen, wurden diese nach Herstellerangaben mit den jeweiligen Transfektionsreagenzien transfiziert. Die Zelllinien HeLa, MCF-7 und HEK 293TT wurden mit *Lipofectamine*TM 2000 transfiziert, wobei jeweils nur $\frac{3}{4}$ der im Protokoll angegebenen Menge von *Lipofectamine*TM 2000 verwendet wurde. Vier Stunden nach der Transfektion erhielten die Zellen frisches Medium, um Reste des Transfektionsansatzes zu entfernen. Bei HEK 293TT-Zellen wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. NHEK und HaCaT Zellen wurden zum Einbringen von DNA mit dem *JetPEI*TM DNA transfection reagent behandelt. Auch hier erfolgte ein Mediumwechsel nach 5 Stunden Inkubationszeit.

3.3.3 Reporteragen-Assay

Im Rahmen des TBX2-Projekts wurde der Einfluss von TBX2 auf die Kontrollregion (LCR) des HPV-Genoms untersucht. Dazu wurden verschiedene LCR-Konstrukte vor ein Luciferasegen kloniert. Der LCR dient damit als Promotor und die Luciferaseaktivität steht in direktem Zusammenhang mit der Promotoraktivität.

Die Luciferase ist eine Oxidoreduktase, die in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) und Mg^{2+} die oxidative Dekarboxylierung von Luciferin katalysiert. Die bei dieser Reaktion entstehende Energie wird in Form von Licht bei einer Wellenlänge von 560 nm emittiert.

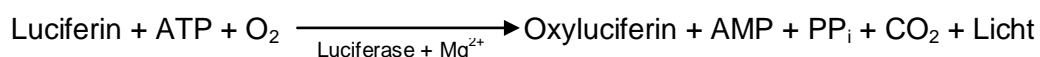


Tabelle 3-6: Häufig verwendete Zellzahlen und DNA-Mengen der Reporter-gen-Assays

Format	Zelllinie	Zellzahl	LCR-Plasmid	DNA 1	DNA 2	β -Gal-Reporter
12-well	HeLa	170 000	0,5 μ g	0,5 μ g	0,5 μ g	0,2 μ g
24-well	HeLa	70 000	0,2 μ g	0,2 μ g	0,2 μ g	0,2 μ g
			0,3 μ g	0,3 μ g	///	0,2 μ g
12-well	MCF-7	240 000	0,5 μ g	0,5 μ g	0,5 μ g	0,2 μ g
12-well	HaCaT	220 000	0,6 μ g	0,6 μ g	0,6 μ g	0,2 μ g
24-well	HaCaT	120 000	0,25 μ g	0,25 μ g	0,25 μ g	0,25 μ g
			0,4 μ g	0,4 μ g	///	0,2 μ g
12-well	293TT	300 000	0,5 μ g	0,5 μ g	0,5 μ g	0,2 μ g
12-well	NHEK	150 000	0,6 μ g	0,6 μ g	0,6 μ g	0,2 μ g
24-well	NHEK	60 000	0,4 μ g	0,4 μ g	///	0,2 μ g

Für diese Untersuchungen wurden die verschiedenen Zelllinien wie unter 3.3.2 angegeben transfiziert. Die Zellzahlen und DNA-Mengen, die für die einzelnen Versuche verwendet wurden, sind in Tab 3-6 aufgelistet. Die Versuche wurden in der Regel in drei bzw. vier Parallelen durchgeführt und mindestens ein weiteres Mal wiederholt.

Die Auswertung erfolgte nach 24 h. Dazu wurden die Zellen kurz mit kaltem PBS gewaschen und für 5 min bei -20°C eingefroren. Darauf folgte die Lyse mit 300 μ l (12-well) bzw. 250 μ l (24-well) *Cell Culture Lysis Reagent* (Promega). Die Zellen wurden mit einer Pipettenspitze vom Boden der Wells abgelöst und für 15 min in der Platte bei RT lysiert. Daraufhin wurden die Zellen mehrere Male auf- und abpipettiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 3 min bei 13200 x g abzentrifugiert. 100-180 μ l des Lysats wurden für den Luciferasenachweis verwendet. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit dem Tristar LB941 oder LB9507 (Berthold). Für die Messung wurden 100-180 μ l Lysat und 50 μ l Luciferase-Substrat-Puffer eingesetzt. Die Messdauer betrug 10-20 Sekunden.

Luciferase-Substratpuffer: 5 0 mM Tris/Cl (pH 7.8)
 15 mM MgSO₄
 20 mM DTT
 0,5 mM EDTA
 0,5 mM Luciferin
 0,5 mM Coenzym A
 0,5 mM ATP

In jedem Versuchsansatz wurde ein Expressions-Plasmid für die β -Galaktosidase kotransfiziert (siehe Tab. 3.6). Das Gen stand dabei unter dem SV40-Promotor und der Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität diente als Abgleich für die Transfektionseffizienz, da die Expression bzw. Aktivität der β -Galaktosidase konstant sein sollte. Für die Messung der

β -Galaktosidaseaktivität wurden der *β -Gal-Juice PLUS* und das *β -Gal Triggering Reagent* (beide p.j.k.) verwendet. Von den Lysaten wurden je 10-50 μ l in einer 96-well-Platte vorgelegt und mit 50 μ l des *β -Gal-Juice PLUS* gemischt. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurden 50 μ l des *β -Gal Triggering Reagents* zugegeben und die Lysate für weitere 3 min in der Dunkelheit inkubiert. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde ebenfalls im Tristar LB941 für 2-5 sek gemessen. Die einzelnen Werte der Drei- bzw. Vierfachbestimmungen der Luciferasemessung wurden dann durch den entsprechenden Einzelwert der β -Galaktosidasemessung geteilt, um mögliche Transfektionsdifferenzen auszugleichen.

Ein Teil der Lysate der jeweiligen Parallelen wurde vereinigt, mit SDS-Probenpuffer aufgeköcht und für den Nachweis der exprimierten Proteine mittels Immunoblot verwendet.

3.3.4 RNA-Interferenz (siRNA)

Um eine Depletion endogener Wirtszellproteine mittels RNA-Interferenz herbeizuführen, wurden synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNA) in Zielzellen transfiziert. Die siRNA wird durch den zellulären RISC-Komplex erkannt, der daraufhin siRNA-homologe messenger-RNA in der Zelle abbaut (Abb. 3-3). Dieser Abbau resultiert schließlich in einer verminderten Proteinexpression. Die siRNAs wurden von den Firmen Qiagen und Sigma-Aldrich bezogen. Sowohl HeLa-, als auch HaCaT-Zellen und primäre Keratinozyten wurden mit siRNAs unter Verwendung von *Lipofectamine™ RNAiMax* nach Herstellerangaben transfiziert. Die Zellen wurden dabei am Vortag ausgesät und in der Regel für 48h mit den entsprechenden siRNAs (siehe Tab. 2-8) transfiziert. Die Endkonzentration der transfizierten siRNAs betrug dabei 30 nM.

Die eingesetzten Zellzahlen für die unterschiedlichen Zelllinien sind in Tab. 3-7 angegeben. Die Depletion der entsprechenden zellulären Proteine wurde mittels Immunoblot nachgewiesen.

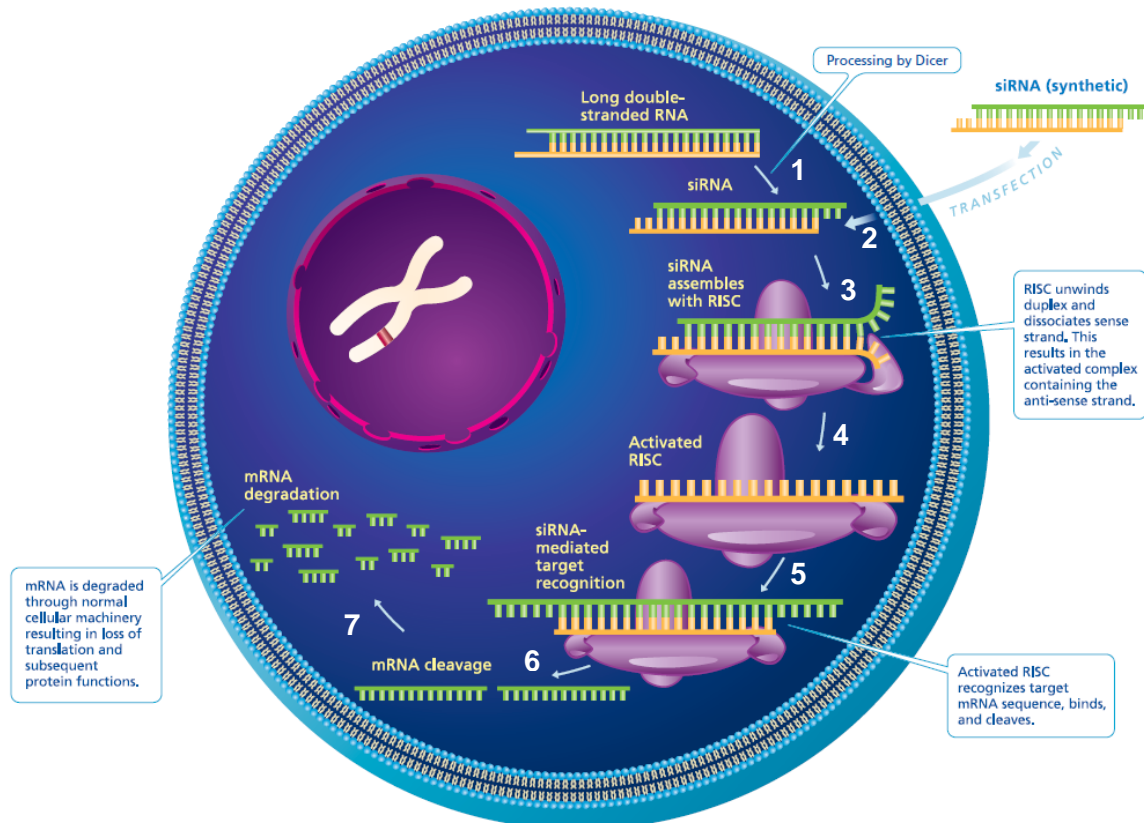


Abbildung 3-3: Prinzip der RNA-Interferenz nach siRNA-Transfektion.

Die Translation von *messenger-RNA* und damit die Expression endogener Proteine kann durch den Einsatz von *short interfering RNA* reduziert werden. Dabei wird zelluläre doppelsträngige RNA durch einen *Dicer* in kleinere RNA-Moleküle (siRNA) geschnitten (1). Alternativ kann siRNA auch durch Transfektion in die Zielzellen eingebracht werden (2). Der RISC-Komplex erkennt die siRNA und entwindet den Doppelstrang (3), wodurch der Komplex aktiviert wird (4). Bindet eine zur siRNA homologe messenger-RNA an den RISC-siRNA-Komplex, wird diese gespalten (6) und abgebaut (7), was in einer verminderten siRNA-Expression resultiert. mRNA = *messenger RNA*; siRNA = *short interfering RNA*; RISC = *RNA induced silencing complex*; Quelle: www.sigmaaldrich.com

Tabelle 3-7: Häufig verwendete Zellzahlen für RNA-Interferenz
WB = Westernblot

Well-Größe	Zelllinie	Zellzahl	Versuch
24-well	HeLa	25 000	Infektionsassay
		50 000	WB-Nachweis
24-well	HaCaT	40 000	Infektionsassay
		80 000	WB-Nachweis

3.3.5 Herstellung von Pseudoviren

In verschiedenen Versuchsansätzen wurden Zellen mit Pseudoviren infiziert. Diese tragen anstelle des viralen Genoms ein Markerplasmid und lassen sich nach einer von Chris Buck entwickelten Methode in hoher Menge in Säugerzellen herstellen (Buck *et al.*, 2004, Buck *et al.*, 2005a, Buck *et al.*, 2005b).

HEK293TT-Zellen wurden dafür in 150 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Codonoptimiertes HPV16L1 und L2 bzw. L2-3xHA sowie das Markerplasmid pcDNA 3.1(+) Luciferase wurden zu gleichen Teilen mit Hilfe des MATra-A-Reagenz (IBA BioTAGnology) nach Herstellerangaben transfiziert. Etwa 5 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf zwei 15 cm-Schalen aufgeteilt. Die Expression der viralen Proteine erfolgte für insgesamt 48 h. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/EDTA (2,5 mM) gewaschen und mit 2x 20 ml DPBS/MgCl₂ (9,5 mM) ab gespült und aufgenommen. Die Zellen wurden 7 min bei 300 x g und RT pelletiert und das Pellet in 500 µl DPBS / MgCl₂ (9,5 mM) aufgenommen. Das Volumen sollte dann etwa 700 µl betragen. Es wurden 35 µl 10% Brij58 (0,5 % (v/v)) und 378 U Benzonase (Sigma-Aldrich) zugegeben und der Ansatz unter gelegentlichem mischen (Vortexer) für 20-24 h bei 37°C inkubiert. Durch das Detergenz Brij58 werden Zellwände aufgelöst und das Enzym Benzonase baut freie, nicht verpackte DNA ab. Darüber hinaus ist die ausgedehnte Inkubationszeit essentiell für die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen L1-Molekülen benachbarter Kapsomere (Buck *et al.*, 2005b). Nach der Maturation wurden die Zellen 5 min auf Eis gekühlt und die Wirkung der Benzonase durch Zugabe von 0,8 M NaCl gestoppt. Der Ansatz wurde für weitere 10 min auf Eis gekühlt und anschließend Zellbruchstücke durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 2000 x g von den Viren getrennt. Der Überstand konnte direkt für die Aufreinigung der Viren mittels Ultrazentrifugation im Dichtegradienten weiterverwendet werden. Dazu wurde unter Verwendung von *OptiPrep* (Sigma-Aldrich) ein Stufengradient gegossen. *Optiprep* besteht aus einer 60 %igen (w/v) Iodxanollösung in Wasser. Der Stufengradient eignet sich sehr gut zur Trennung der Viren von anderen zellulären Bestandteilen und leeren Kapsiden. Mit PBS / NaCl (0,8 M) und der 60%igen *Optiprep*-Lösung wurden Lösungen von 39%, 33% und 27% *OptiPrep* hergestellt und für 1-1,5 h in SW55-Röhrchen äquilibriert (je 1,4 ml 39%, gefolgt von 1,4 ml 33% und 1,4 ml 27%). Nach der Überschichtung mit den maturierten Viren wurden die Ansätze für 3 ½ h bei 16°C und 45 000 rpm (SW-55 Rotor) in einer Ultrazentrifuge aufgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden die Ansätze in je 300 µl-Fractionen aufgeteilt und die Infektiösität der Fractionen bestimmt. Dafür wurden HeLa-Zellen im 24-well mit je 1 µl der Fractionen für 24 h infiziert und die Luciferaseaktivität wie unter 3.2.3 beschrieben gemessen. Die stärksten Fractionen wurden vereint, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.6 Infektionsassay nach siRNA-vermittelter Depletion zellulärer Proteine

Um den Einfluss der siRNA-vermittelten Depletion eines zellulären Proteins auf die Infektion mit HPV16 zu untersuchen, wurde nach siRNA-Transfektion ein Infektionsassay

durchgeführt. Dabei wurden HeLa- und HaCaT-Zellen für 48 h mit den entsprechenden siRNAs (30 nM) nach Herstellerangaben transfiziert und anschließend für 24 h mit 1 µl der unter 3.3.5 hergestellten Pseudoviren infiziert. Als Pseudogenom diente hierbei ein Luciferaseplasmid. Um die Luciferaseaktivität zu messen, wurden die Zellen wie unter 3.3.3 angegeben lysiert und das Lysat im Luminometer analysiert. Um die Vitalität der Zellen zu messen, wurde die LDH-Aktivität (LDH-Assay, siehe 3.3.8) gemessen. Die einzelnen Werte der Luciferasemessung wurden dabei durch die Einzelwerte der LDH-Messung geteilt. Die Expression der Luciferase der mit siRNA-behandelten Zellen wurde verglichen mit Zellen, die mit einer *non-template* Kontroll-siRNA (Qiagen) transfiziert und ebenfalls mit Pseudoviren infiziert wurden.

3.3.7 Einbringen von Antikörpern in Zielzellen

Um zu untersuchen, ob spezifische Antikörper gegen DYNLT1, DYNLT3 und DYNLL1 die Infektion mit Pseudoviren hemmen können, wurden diese mit *PULSin*TM (Polyplus Transfection) in das Zytoplasma von Zielzellen eingebracht. Dafür wurden 80tsd HeLa-Zellen bzw. 100 tsd HaCaT-Zellen in ein 24well ausgesät und am nächsten Tag nach Herstellerangaben mit 1 µg Antikörper und *PULSin*TM-Reagenz behandelt. Nach 3-4 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen dabei für 16-24h mit 1 µl Pseudoviren infiziert. HaCaT-Zellen wurden nach dem Mediumwechsel mit Trypsin/EDTA abgelöst und in neuem Medium in Lösung infiziert. Als Kontrolle wurden Kontroll-IgG-AK verwendet und Zellen mit der gleichen Konzentration an NaN₃ (17 mM) behandelt, welche den verwendeten AK zugesetzt war. Die Zellen wurden am nächsten Tag wie unter 3.3.3 beschrieben lysiert und die Luciferaseaktivität und Vitalität der Zellen (LDH-Assay, siehe 3.3.8) gemessen. Die einzelnen Werte der Luciferasemessung wurden dabei durch die Einzelwerte der LDH-Messung geteilt. Als Kontrolle für die Effektivität des Einbringens von Protein ins Zytoplasma wurde das Protein R-Phycoerythrin (*PULSin*TM) verwendet. Dieses kann mit einem Laser bei 488 nm angeregt werden und emittiert Licht bei 575 nm. Die Effizienz des Einbringens wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.3.8 LDH-Assay

10 µl des Lysats aus dem Infektionsassays oder Antikörperassay wurden für die Messung der Vitalität der Zellen mit dem *Cytotoxicity Detection Kit*^{PLUS} (LDH) (Roche) verwendet. Die Vitalität der Zellen steht in direktem Zusammenhang mit der Aktivität der

Laktatdehydrogenase (LDH), da dieses Protein direkt am Energiestoffwechsel der Zelle beteiligt ist. Die LDH setzt in der Zelle Laktat zu Pyruvat um, wobei NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird (Abb. 3.4). Im Kit wird in einem zweiten Schritt Tetrazolium zugeführt, welches durch $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Es entsteht dadurch Formazan, welches colorimetrisch gemessen werden kann.

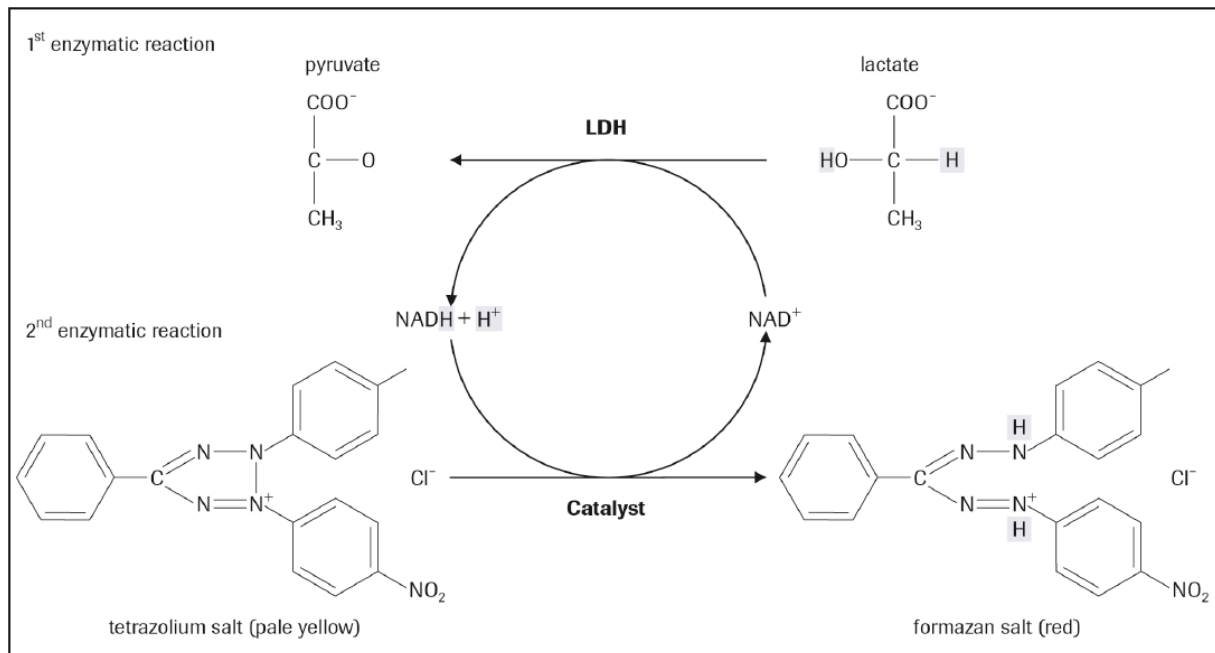


Abbildung 3-4: Prinzip des Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH).

Die zelluläre Laktatdehydrogenase (LDH) setzt Laktat zu Pyruvat um, wodurch NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Dieser kann wiederum verwendet werden, um mit Hilfe eines Katalysators Tetrazolium zu Formazan umzuwandeln. Die Umsetzung zu Formazan ist somit ein Maß für die Menge der LDH, die zum Umsatz von Laktat in der Zelle zur Verfügung steht. Quelle: www.roche-applied-science.com

3.3.9 Koimmunpräzipitation

Um die Interaktion von L2 mit DYNLT1 bzw. TBX2 im Säugerzellsystem zu bestätigen, wurden Immunpräzipitationsstudien durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Zielprotein mittels spezifischer Antikörper an einer Matrix immobilisiert. Damit können Interaktionspartner ebenfalls gebunden werden. Nach der Elution der Komplexe lassen sich diese mittels Immunoblot nachweisen. Die Interaktion zwischen L2 und DYNLT1 bzw. L2 und TBX2 wurden in dieser Arbeit in beide Richtungen bestätigt, d.h. sowohl über die Immobilisierung von L2, als auch über die von DYNLT1 bzw. TBX2.

3.3.10 Immunpräzipitation mit magnetischen Kugeln (μ Macs System)

Eine Möglichkeit der Immunpräzipitation (IP) ist die gezielte Immobilisierung von GFP-, YFP-, oder HA-fusionierten Proteinen über magnetische Kugeln, an denen bereits GFP-spezifische Antikörper gebunden sind (*μ Macs GFP Tagged Protein Isolation Kit* und *μ Macs HA Tagged Protein Isolation Kit*, MACS Milteny Biotech).

GFP-DYNLT1 + L2

Für die IP mit GFP-DYNLT1 und L2 wurden je 900tsd HeLa-Zellen auf zwei 6cm-Schalen (GFP + L2 und GFP-DYNLT1 + L2) ausgesät und am nächsten Tag mit *Lipofectamine 2000TM* nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS (+Protease-Inhibitoren PMSF/NaF) gewaschen und mit je 600 μ l Lysepuffer 1 lysiert.

Lysepuffer 1: 50 mM HEPES, pH 7,0
 0,1% NP40
 0,2 mM PMSF
 1 mM NaF

Lysepuffer 2: 50 mM HEPES, pH 7,0
 150 mM NaCl
 0,1% NP40
 0,2 mM PMSF
 1 mM NaF

Die Zellen wurden mit einem Schaber eingesammelt und je zwei gleiche Schalen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Ansätze wurden mit je 1,2 ml Lysepuffer 2 versetzt und gemischt (Vortexer). Anschließend folgte ein Aufschluss der Zellen durch Ultraschall mit 3x 20 Ultraschallzyklen (20% Duty Cycle, Output Control 3, kleiner Schallkopf). Die Zellen wurden anschließend noch einmal gemischt (Vortexer), kurz zentrifugiert, auf zwei silikonisierte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, für 10 min bei 7800 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände wieder in einem 15 ml-Reaktionsgefäß vereint.

60 μ l des Lysats (5%) wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bis zum Ende der IP bei -20°C aufbewahrt (= Input). Für die Immunpräzipitation wurde 1 ml des Lysats mit 50 μ l der GFP-Kugeln (*μ Macs GFP Tagged Protein Isolation Kit*) versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die magnetische Säulenmatrix wurde am nächsten Tag mit 200 μ l Macs-Lysepuffer gewaschen, bevor die Lysate auf diese aufgetragen wurden. Danach wurden diese 4x mit 200 μ l Waschpuffer 1 und 1x mit 100 μ l Waschpuffer 2

gewaschen, bevor die Proteine nach Protokoll in 50 µl Elutionspuffer eluiert wurden. Die Proben wurden zusammen mit dem Input auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mittels der in Tab. 2-3 angegebenen Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.

YFP-L2 + TBX2-3xFLAG und TBX3-3xFLAG

Die Zellen wurden in 6cm-Schalen ausgesät und nach Herstellerangaben mit *Lipofectamine 2000TM* transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, für 5 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit 2 ml DMEM/ FCS in 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 7 min und 300 x g. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert. Es folgte ein Gefrier-Tau-Zyklus für 5 min bei -80°C. Die Zellen wurden dann in 1 ml Lysepuffer (µMACS System), 1mM DTT und Proteaseinhibitor-Mix (Thermo Scientific) aufgenommen. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe oben) und das Lysat im silikonisierten 1,5 ml Reaktionsgefäß für 30 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Zelllysate wurde danach für 10 min bei 7800 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues silikonisiertes Reaktionsgefäß überführt. 25 µl des Lysats wurden mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und bei -20°C gelagert. Zum restlichen Lysat wurden jeweils 50 µl der magnetischen Kugeln (*µMacs GFP Tagged Protein Isolation Kit*) gegeben und für 35 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Säulen wurden mit 200 µl Lysepuffer vorgewaschen und mit den Lysaten beladen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Säulen dreimal mit 500 µl Waschpuffer 1 (µMACS) und einmal mit 250 µl Waschpuffer 2 (µMACS) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte nach Protokoll. Die Eluate wurden zusammen mit den Lysatkontrollen (Input) auf ein SDS-Gel geladen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den in Tab 2-3 angegebenen Antikörpern.

YFP-L2 + mTbx2-3xFLAG und mTbx2-R122/123E-3x-FLAG

Die Immunpräzipitation von YFP-L2 und murinem Tbx2-3xFLAG bzw. der murinen Mutante Tbx2 R122/123E-3xFLAG erfolgte analog der IP mit TBX2 bzw. TBX3. Hierbei wurde kein Ultraschall durchgeführt, weshalb die pelletierten Zellen in nur 400 µl Lysepuffer aufgenommen wurden. Außerdem wurden für den Input 10% Lysat verwendet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den in Tab 2-3 angegebenen Antikörpern.

HA-DYNLT1 und HA-DYNLT3 + L2

Für die IP von HA-DYNLT1 bzw. HA-DYNLT3 und L2 wurden Kugeln verwendet, die mit einem anti-HA-Antikörper kovalent beladen werden (*µMacs HA Tagged Protein Isolation Kit*). Bei dieser IP wurde ebenfalls auf die Ultraschallbehandlung verzichtet. Die Lyse und auch die Immunpräzipitation erfolgten wie bei der vorherigen IP. Es wurden 10% des Lysats für den Input verwendet und die Proteine mit den in Tab 2-3 angegebenen Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen.

3.3.11 Immunpräzipitation mit Protein A/G-Agarose

Bei dieser Art der Immunpräzipitation wurde das Lysat nach dem Aufschluss der Zellen zuerst mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe durch Zugabe von Protein A/G-Agarose immobilisiert.

L2 + GFP und GFP-DYNLT1

Für die Immunpräzipitation von L2 und GFP bzw. GFP-DYNLT1 wurden die Lysate wie oben beschrieben (GFP-DYNLT1 + L2) hergestellt. 5% des Lysats wurden abgenommen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen (Input). Je 1 ml Lysat wurde über Nacht mit 50 µl des monoklonalen L2-1-Antikörpers bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jedem Ansatz 60 µl mit 1 ml Waschpuffer vorgewaschene Protein A/G-Agarose-Kugeln (Santa Cruz Biotechnology) zugegeben und 2 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler gemischt. Die Agarose wurde dann dreimal mit 950 µl Lysepuffer 1 gewaschen und jeweils 3 min bei 4°C und 600 x g zentrifugiert. Der Ansatz wurde schließlich für 5 min mit 75 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand zusammen mit dem Input auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die gefällten Proteine wurden mit den in Tab 2-3 aufgeführten Antikörpern im Immunoblot nachgewiesen.

TBX2-3xFLAG und TBX3-3xFLAG + L2

Die Fällung von TBX2-3xFLAG bzw. TBX3-3xFLAG mit L2 wurde ebenfalls mit Protein A/G-Agarose durchgeführt. 900tsd HeLa-Zellen wurden wie oben angegeben transfiziert, die Zellen gewaschen und mittels Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch einen Gefrier-Tau-Zyklus aufgebrochen. Pro Ansatz wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer (µMACS), 1 mM DTT und Proteaseinhibitoren (Thermo Scientific) lysiert und mit Ultraschall wie beschrieben aufgeschlossen. Die Lysate wurden wie angegeben

zentrifugiert und der Überstand in ein neues, silikonisiertes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. 5% des Lysats wurden in SDS-Probenpuffer aufgekocht (Input). Das restliche Lysat wurde 30 min bei 4°C mit 50 µl Protein A/G-Agarose-Kugeln auf dem Überkopfschüttler vorinkubiert. Die Kugeln wurden durch kurze Zentrifugation (30 sek bei max. RPM) bei RT abzentrifugiert und der Überstand in ein neues silikonisiertes Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden erst für 1h mit 1 µl anti-FLAG (Maus) Antikörper (= 5 µg) und dann 1h mit 50 µl Protein A/G-Agarose-Kugeln bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Lysate wurden daraufhin dreimal mit 950 µl Waschpuffer gewaschen und jeweils 3 min bei 4°C und 500 x g abzentrifugiert.

Waschpuffer: 500 mM NaCl
1% NP40
0,5% Natrium-Deoxycholat
0,1% SDS
50 mM Tris pH 8,0
Proteaseinhibitormix (Thermo Scientific)

Die Protein A/G-Agarose-Kugeln wurden anschließend mit 100 µl SDS-Probenpuffer eluiert und aufgekocht. Die Hälfte des Eluats wurden zusammen mit dem Input auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit den in Tab. 2-3 angegebenen Antikörpern nachgewiesen.

3.3.12 Chromatin-Immunpräzipitation

Das Prinzip der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ähnelt dem einer Protein-IP (Abb. 3-3). Bei der ChIP werden DNA-bindende Proteine an das Chromatin fixiert. Das Chromatin wird dann geschnitten und das gewünschte Protein mit einem spezifischen Antikörper immobilisiert. Bindet das Protein an eine vermutete DNA-Sequenz, so lässt sich diese nach der IP mittels PCR nachweisen. HeLa-Zellen sind stabil mit einem Bruchstück der viralen DNA von HPV18 transformiert (Schwarz *et al.*, 1985). Dabei sind die Kontrollregion und große Teile des Genoms von HPV18 integriert, es werden aber nur noch die Onkogene E6 und E7 exprimiert. Im Rahmen des TBX2-Projekts sollte untersucht werden, ob TBX2 an die Kontrollregion des HPV-Genoms von HPV18 in HeLa-Zellen binden kann.

Für die Chromatin-IP wurde das *SimpleCHIPTM Enzymatic Chromatin IP Kit* (Cell Signaling) verwendet. Fünf 15cm-Schalen mit je 1,6 mio HeLa Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit je 1 µg Kontrollplasmid (pcDNA 3.1(+)), 1 µg TBX2-3xFLAG oder 1 µg

TBX3-3xFLAG mit *JetPEI™ DNA transfection reagent* (Polyplus Transfection) nach Herstellerangaben transfiziert.

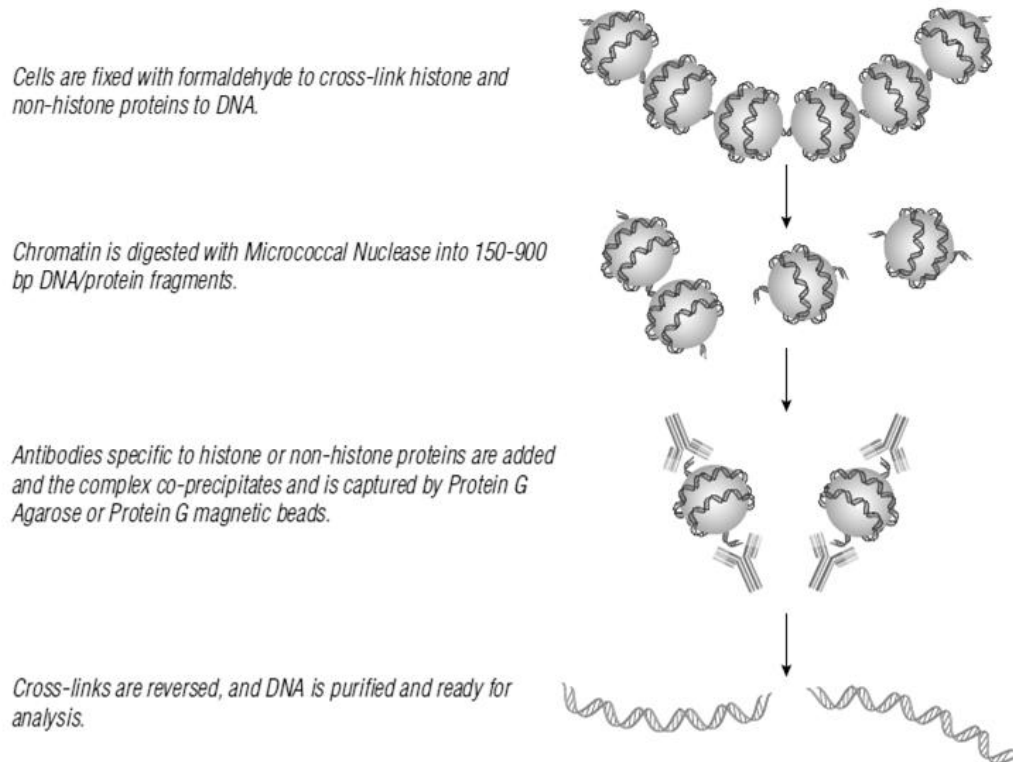


Abbildung 3-5: Prinzip der Chromatin-Immünpräzipitation

Chromatin-bindende Proteine werden an das Chromatin fixiert, die DNA durch eine Nuklease zwischen Histonen gespalten und die Chromatin-bindenden Proteine über spezifische Antikörper gefällt. Bindet das Protein an eine gewünschte Sequenz, lässt sich diese schließlich mit Hilfe einer PCR amplifizieren. Quelle: www.cellsignal.com

Die Zellen wurden nach dem im ChIP-Kit beschriebenen Protokoll lysiert. Dabei wurde die Konzentration des Chromatins gemessen und die Integrität nach dem *Micrococcal Nuclease*-Verdau mit Hilfe eines Agarosegels überprüft. Das Chromatin wurde verwendet, um die in Tab 2-6 angegebenen Primer mit einer Standard-PCR für den Nachweis des LCR18 zu testen (= Input).

Vor der IP wurde das Lysat mit den magnetischen Kügelchen präabsorbiert. 90 µl der Kügelchen wurden mit 800 µl ChIP-Puffer (Cell Signaling) und 16 µl gescherter Hering-Sperma-DNA (Clontech) für 1h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen zweimal mit 1 ml ChIP-Puffer gewaschen und 700 µl ChIP-Puffer aufgenommen. Die Kügelchen wurden dann mit je 10 µg Chromatin der entsprechenden Transfektionen gemischt (30 µg K + 300 µl Kügelchen; 20 µg TBX2 + 200 µl Kügelchen; 20 µg TBX3 + 200 µl Kügelchen; siehe Tab. 3-8) und für 45 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen, in neue silikonisierte Reaktionsgefäße überführt, zu

gleichen Teilen aufgeteilt (entspricht je 10 μg Chromatin) und über Nacht mit den angegebenen Antikörpern (Tab. 3-8) inkubiert.

Tabelle 3-8: Verwendete Antikörper für die Chromatin-IP
AK = Antikörper

Probe	Antikörper	Eingesetzte Menge des AK
K	α -FLAG Maus	2 μg
K	α -Kaninchen Kontroll-IgG	2 μg
K	α -Histon H3	10 μl
TBX2-3xFLAG	α -Maus Kontroll-IgG	2 μg
TBX2-3xFLAG	α -FLAG Maus	2 μg
TBX3-3xFLAG	α -Maus Kontroll-IgG	2 μg
TBX3-3xFLAG	α -FLAG Maus	2 μg

Am nächsten Tag wurden 210 μl (je 30 μl /Ansatz) magnetische Kugeln mit 800 μl ChIP-Puffer und 16 μl Hering-Sperma-DNA gemischt und für 45 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Kugeln wurden dann zweimal mit je 1 ml ChIP-Puffer gewaschen und in 210 μl ChIP-Puffer aufgenommen. Zu den IPs wurden schließlich je 30 μl der präabsorbierten Kugeln zugegeben und diese für 2 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die weitere Behandlung, Elution, Aufreinigung und PCR der ChIP wurde nach Protokoll durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine parallel durchgeführte IP mit TBX2 und TBX3 nach der Elution mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein Protein-Gel aufgetragen.

3.3.13 Immunfluoreszenzmikroskopie

Um den Einfluss zellulärer Proteine auf den Lebenszyklus von HPV genauer verstehen zu können, wurde die Lokalisation viraler und zellulärer Proteine durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze gewählt, um die Virus-Wirt-Interaktion näher zu charakterisieren. Es wurden Immunfluoreszenzstudien sowohl mit endogenen als auch transient exprimierten Proteinen durchgeführt. Zusätzlich wurde auch die Lokalisation des L1- und L2-Proteins von Pseudoviren nach der Infektion von Zellkulturen analysiert.

HeLa-Zellen (80- 120tsd) wurden im 12-well auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h mit *Lipofectamine*[™] 2000 nach Herstellerangaben transfiziert, um Proteine transient zu exprimieren. Gegebenenfalls wurden die Zellen anschließend mit 16L1-L2-3xHA-Pseudoviren für 8-24 h infiziert. Die Zellen wurden dann mit kaltem PBS (+ Aprotinin und Leupeptin) gewaschen und mit kaltem Methanol (-20°C) für 2-10 min bei -20°C fixiert und

permeabilisiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 30-60 min bei RT mit PBS (+ Protease-Inhibitoren) / BSA (1%) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das PBS / BSA vollständig abgesaugt und der primäre AK in 50 µl PBS / BSA in der entsprechenden Verdünnung (siehe Tab. 2-3) auf die Deckgläschen gegeben. In einer feuchten Kammer wurden die Präparate daraufhin für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen (10 min) und die Präparate wieder für 15 min mit PBS / BSA blockiert. Das PBS/BSA wurde vollständig abgesaugt und der sekundäre AK in 50 µl PBS / BSA in entsprechender Verdünnung auf die Zellen gegeben. Für die Kernfärbung wurde zusätzlich Hoechst 33342 (Bisbenzimid; Sigma) in einer Verdünnung von 1:10000 zugegeben. Nach einer Inkubation von 40-45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Zellen zuerst dreimal mit PBS / BSA (20 min), dann dreimal mit PBS (10 min) gewaschen und kurz getrocknet, bevor die Deckgläschen mit Fluoroprep (bioMérieux) auf Objektträgern eingebettet wurden. Die trockenen Präparate konnten so bei 4°C gelagert oder direkt für die Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

3.3.14 Entparaffinieren von Paraffinschnitten

Um die Lokalisation von L2 und TBX2 im humanen Scheimhautgewebe zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Cotarelo (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz) Schnitte von Patientinnen mit zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) der Grade I-II angefertigt. Diese wurden in einem ersten Schritt mit Hilfe einer PCR auf HPV16 typisiert. Aus abgehobelten Paraffinschnitten wurden nach einem Protokoll von Herrn Dr. Springer (Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz) zuerst die DNA isoliert und das HPV16E1-Gen mit spezifischen Primern amplifiziert. Im zweiten Schritt wurden die Schnitte eines positiven Präparats für die Immunhistochemie mit Antikörpern angefärbt.

3.3.15 Typisierung der CIN-Gewebeschnitte

Um das Gewebe zu entparaffinieren wurde es in 1 ml Xylol aufgenommen und anschließend mind. 1 min gemischt (Vortexer). Die Proben wurden dann für 1 min bei 13000 x g und RT pelletiert, der Überstand abgenommen und die Proben zwei weitere Male mit Xylol entparaffiniert. Danach wurde 1 ml 100% Ethanol zugegeben, die Ansätze für mind. 60 sek gemischt (Vortexer), 1 min bei 13000 x g und RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde ebenfalls zwei Mal wiederholt. Das Pellet wurde im Heizblock bei 45°C getrocknet und danach mit 270 µl Lysepuffer 10 min bei 100°C inkubiert.

Lysepuffer: 50 mM Tris-Cl, pH 8,0
 150 mM NaCl
 5 mM EDTA, pH 8,0
 1% SDS (w/v)

Die Proben wurden daraufhin kurz auf Eis abgekühlt, anzentrifugiert und mit 30 µl Proteinase K (10 mg / ml) versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 56°C mit 800 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Proben kurz bei 13000 x g und RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis ausgeführt. Zum Lysat wurden 150 µl MPC *Protein Precipitation Reagent* (Epicentre) gegeben und die Proben für 10 sek gemischt (Vortexer). Nach der Proteinfällung wurden die Reaktionsgefäße für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt (Vortexer). Die Proben wurden 10 min bei 13000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Proben zweimal mit 1 ml 70% EtOH gewaschen und die pelletierte DNA bei 45°C im Heizblock getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl 5 mM Tris-Cl, pH 8,0 aufgenommen und 1 min gemischt (Vortexer). Die DNA-Konzentration wurde bestimmt und eine Standard-PCR mit 200 ng Template durchgeführt. Die HPV16E1 positiven Schnitte wurden für die weitere Immunhistochemie verwendet.

3.3.16 Entparaffinieren und Immunhistochemie der CIN-Schnitte

Die Paraffinschnitte wurden zuerst zweimal für je 20 min mit Xylol inkubiert. Anschließend wurden die Präparate durch eine absteigende Alkoholreihe (90%, 70%, 50%) jeweils für 10 min rehydriert und danach für 10 min in destilliertem Wasser inkubiert. Um die Epitope der nachzuweisenden Proteine besser zugänglich zu machen, wurden die Schnitte dreimal 3 min in 10 mM Zitronensäure (pH 6,0) in der Mikrowelle aufgeköcht. Danach wurden die Proben 15 min mit PBS inkubiert, die Schnitte für die spätere Antikörper-Behandlung mit einem Fettstift eingekreist und für ca. 1 h bei RT mit PBS (+ Proteaseinhibitoren) / BSA (1%) geblockt. Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung (siehe Tab. 2-3) in 50 µl PBS/BSA auf die Präparate getropft und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die weitere Antikörperbehandlung der Schnitte erfolgte wie unter 3.3.11 angegeben.

3.3.17 Mikroskopische Dokumentation

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop und einer Zeiss AxioCam Digitalkamera bei verschiedenen Vergrößerungen erstellt. Die Darstellung und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Axiovision Software 4.7. Die aufgenommenen Bilder wurden als TIFF-Dokumente exportiert und in Photoshop CS2 (Adobe) weiterbearbeitet.

Für die Quantifizierung der Kolo-kalisation von DYNLT1 und dem PML-Protein wurden alle Bilder mit einer identischen Belichtungszeit und als Z-Stapel aufgenommen. Sowohl bei den Kontrollen als auch den L2-transfizierten Zellen wurde jeweils nur das Bild des Stapels mit der höchsten Kolo-kalisation von DYNLT1 und PML verwendet. Es wurden zudem keine Veränderungen an Kontrast oder Helligkeit durchgeführt. Zur Auswertung der Kolo-kalisation wurde ein Schwellenwert für alle Bilder gewählt und eine *Pixel-by-Pixel*-Analyse mit dem mitgelieferten Axiovision Kolo-kalisationsmodul durchgeführt. Bei der Kolo-kalisationsanalyse mit HA-DYNLT1 bzw. HA-DYNLT3 und L2 nach Überexpression wurden die kolo-kalisierenden Pixel (HA-DYNLT1 bzw. -DYNLT3 und PML) durch die im Bild enthaltene Gesamtzahl der Zellkerne geteilt. Bei der Analyse der Kolo-kalisation nach der Infektion mit HPV16L1-L2-3xHA-Pseudoviren wurde das Verhältnis kolo-kalisierender Pixel (L2-3xHA und PML) auf die Gesamtanzahl an L2-Pixeln bezogen.

Die Analyse der TBX2/L2-Gewebeschnitte erfolgte mit dem Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany) und der LSM Software ZEN 2008.

3.4 Arbeiten mit Bakterien

3.4.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in *E.coli*

Für den Nachweis der Interaktion von L2 mit verschiedenen Dynein-Komponenten wurden Fusionsproteine von DYNLT1, DYNLT3, DYNLL1 und DYNC111 mit Gluthation-S-Transferase (GST) verwendet, um die Proteine gezielt aufzureinigen. Die Plasmide der GST-Konstrukte wurden nach einem Standardprotokoll in TG1-Zellen transformiert. Anschließend wurde jeweils ein Klon in 5 ml LB-Medium (+ Amp.) bei 37°C angeimpft. Mit 30 µl der Überkultur wurden dann 200 ml LB-Medium (+ Amp.) angesetzt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit 800 ml LB-Medium (+ Amp.) auf einen Liter Gesamtvolumen aufgefüllt und die Expression der Proteine für 4 h bei 28°C und 140 rpm mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach der Induktion wurden die Bakterien 15 min auf Eis gekühlt und anschließend 20 min bei 4°C und 4900 x g

pelletiert. Das Pellet wurde mit 50 ml kaltem PBS resuspendiert, auf fünf 15 ml Reaktionsgefäß verteilt und erneut pelletiert (15 min bei 4°C und 3100 x g). Eines der jeweiligen Pellets wurde weiterbehandelt, die anderen vier auf -80°C gelagert.

Während des Aufschlusses wurden pro Pellet 200 µl Glutathionsepharose 4B-Kugeln in je einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS auf Eis quellen gelassen. Diese wurden anschließend 3 min bei 4°C und 600 x g zentrifugiert, das PBS abgenommen und die Kugeln bis zum Gebrauch auf Eis gelagert.

Das Pellet wurde in 4 ml GST-Interaktionspuffer (1x PBS, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 1 mM NaF, Leupeptin und Aprotinin (je 1 µg/ml)) resuspendiert (Vortexer). Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Suspension wurde dafür fünfmal für 20 sek auf Eis aufgeschlossen (Output Control 5, Duty Cycle 100%, großer Schallkopf). Nach dem Aufschluss wurden die Proben 5 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert, der Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend ein weiteres Mal für 20 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert.

Die Überstände wurden dann auf die vorgequollenen Glutathionsepharose-Kugeln gegeben und 3 h auf dem Überkopfrad bei 4°C inkubiert. Die Kugeln wurden fünfmal mit je 1 ml GST-Interaktionspuffer gewaschen (3 min bei 4°C und 600 x g) und in 1 ml GST-Interaktionspuffer aufgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der GST-Proteine wurde nach der Bradford-Methode (siehe 3.4.2) bestimmt.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration der aufgereinigten GST-Dynein-Proteine zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Dafür wurden 795 µl Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, 5 µl der verschiedenen GST-Proteine und 200 µl der Bradfordlösung (BioRad) zugegeben. Der Ansatz wurde kurz gemischt (Vortexer), 10 min bei RT inkubiert und erneut gemischt. Anschließend wurde die OD₅₉₅ gemessen. Die Konzentration der Protein-Lösung lässt sich daraus folgendermaßen ableiten:

$$C_{[\text{mg/ml}]} = 42,875/N \times \text{OD}_{595}$$

N = Menge der eingesetzten Probe in µl

42,875 = Standardfaktor

3.4.3 GST-Immobilisierung

Die aufgereinigten GST-Dynein-Fusionsproteine wurden für eine GST-Immobilisierung mit L2 verwendet. Dabei wurden die Fusionskonstrukte mit Zelllysate aus HeLa-Zellen inkubiert, in denen L2 exprimiert wurde.

800.000 HeLa-Zellen wurden pro Ansatz in eine 6cm-Schale ausgesät und am nächsten Tag für 24h mit *Lipofectamine™ 2000* nach Herstellerangaben mit L2 transfiziert. Die Schalen wurden einmal mit PBS gewaschen, die Zellen mit Trypsin / EDTA abgelöst in 1 ml Medium in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen 5 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Durch einen Gefrier-Tau-Zyklus bei -80°C wurden die Zellen aufgeschlossen, mit 1,2 ml GST-Interaktionspuffer pro Ansatz versetzt und auf silikonisierte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt.

GST-Interaktionspuffer: 1x PBS
 0,5% Triton X-100
 1 mM DTT
 0,2 mM PMSF
 1 mM NaF
 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin

GST-Waschpuffer: 1x PBS
 500 mM NaCl
 1% Triton X-100
 0,5% Natrium-Deoxycholat
 0,2% SDS
 Proteaseinhibitor-Mix (Thermo Scientific)

Die Zellen wurden 20 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert, im 15 ml Reaktionsgefäß vereint und anschließend mit Ultraschall behandelt (3x 20 Zyklen, 30% Duty Cycle, Output Control 30%, großer Schallkopf). Die Ansätze wurden dann wieder auf silikonisierte Reaktionsgefäße verteilt und erneut für 20 min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 4°C und 7900 x g. Die Überstände wurden abgenommen und in einem 15 ml Reaktionsgefäß vereinigt. 60 µl (5%) des Lysates wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf -20°C gelagert (= Input). Zu je 1 ml Lysat wurde je 5 µg GST, -DYNLT1, -DYNLT3, -DYNLL1 bzw. 10 µg GST-DYNC111 zugegeben und die Proben über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler gemischt. Am nächsten Tag wurden 40 µl Sepharose 4B-Kugeln je Probe mit 1 ml GST-Interaktionspuffer gemischt, kurz zentrifugiert und zu jeder Probe hinzugefügt. Die Proben wurden fünfmal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und jeweils 3 min bei 4°C und 600 x g zentrifugiert. Mit 75 µl

SDS-Probenpuffer wurden die Proben aufgeköcht, 1 min bei 13000 x g zentrifugiert und zusammen mit dem Input in einem SDS-Gel aufgetrennt und L2 im Immunoblot nachgewiesen.

Für den Nachweis der GST-Konstrukte wurden diese in gleichen Mengen (s.o.) in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit einer Färbelösung (SimplyBlue™ Safestain, Invitrogen) angefärbt. Das Gel wurde anschließend über Nacht in eine 6%ige Glycerinlösung gelegt und am nächsten Tag bei 56°C für 3-4h Vakuum-getrocknet und gescannt.

4 Ergebnisse

4.1 Hefe-2-Hybrid-Screening

Ziel dieser Arbeit war es, neue zelluläre Interaktionspartner des minoreren Kapsidproteins L2 zu identifizieren und charakterisieren. Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems lassen sich unbekannte Interaktionspartner in einem relativ einfachen System finden.

Zuerst wurde L2wt als Köder in den Hefestamm *S.cerevisiae* L40 transformiert und auf transaktivierende Eigenschaften untersucht. Dafür wurde der Hefeklon auf eine Selektionsplatte ausgetropft, der die Aminosäure His fehlte. Unter diesen Bedingungen konnten die Hefen nur wachsen, wenn das Reportersystem durch den Köder aktiviert wurde.

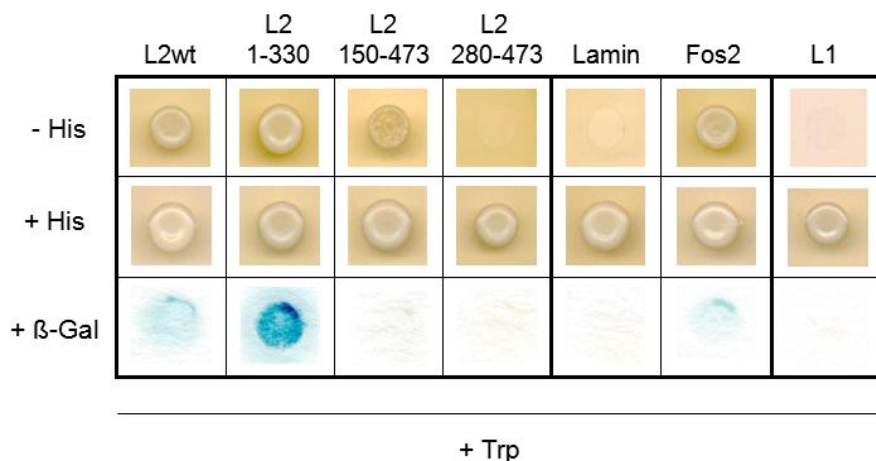


Abbildung 4-1: Test der Köder, Positiv- und Negativkontrolle auf das Reportersystem im Hybrid Hunter™. Die transformierten Hefeklone wurden auf Selektionsplatten ohne Histidin ausgetropft, um die transaktivierenden Eigenschaften der Köder auf den auxotrophen Marker zu testen (obere Zeile). Von den Selektionsplatten mit Histidin (mittlere Zeile) wurde ein β -Galaktosidase-Filterassay durchgeführt, um die Aktivität des zweiten Reporters, der β -Galaktosidase, zu testen (untere Zeile). Als Negativkontrollen für das Screening wurden die im Hybrid Hunter™ enthaltene Kontrolle Lamin und 16L1wt verwendet. Als Positivkontrollen wurden die Kontrolle des Systems (Fos2) und L2 1-330 getestet. Für alle weiteren Experimente wurde L2 1-30 als Positivkontrolle verwendet. Allen Selektionsplatten wurde Tryptophan zugefügt, da in die jeweiligen Hefen keine Beute transfiziert wurde. His = Histidin; β -Gal = β -Galaktosidase; Trp = Tryptophan

Bei L2wt konnte eine Aktivierung des Reportersystems festgestellt werden (Abb. 4-1, Spalte 1), weshalb Deletionsmutanten von L2 hergestellt und im System getestet wurden. Die N-terminale Mutante L2 1-330 (Spalte 2) zeigte dabei eine stärkere Aktivierung des Reportersystems und konnte nicht für das Screening verwendet werden. Die Mutante L2 150-473 (Spalte 3) konnte ebenfalls auf der Selektionsplatte ohne Histidin wachsen, führte aber zu keiner Aktivierung des *LacZ*-Gens. Mit Hilfe von 3-Amino-Triazol (3-AT) wurde versucht, die Bildung von Histidin zu unterdrücken. 3-AT wurde als kompetitiver Inhibitor der

Imidazol-Glycerolphosphat-Dehydratase beschrieben, welches das Produkt des *Histidin*-Gens darstellt (Kanazawa *et al.*, 1988). Wie in Abb. 4-2 dargestellt, lässt sich das Wachstum der Hefen, die mit der L2-Mutante 150-473 transformiert wurden, durch die Zugabe von 2 mM 3-AT hemmen. Die L2-Mutante 280-473 zeigte keine Aktivierung der Reportergene und wurde deshalb für das Hefe-2-Hybrid-Screening ohne Zugabe von 3-AT eingesetzt (Abb. 4-1, Spalte 4). Als Negativkontrollen für das Screening wurden die Proteine Lamin (Spalte 5) und HPV16 L1 (letzte Spalte) verwendet, die ebenfalls keine Aktivierung des *Histidin*- oder *LacZ*-Gens zeigten. Für die Transformation der cDNA-Bank mit der Mutante L2 150-473 wurde eine Konzentration von 2,5 mM 3-AT verwendet.

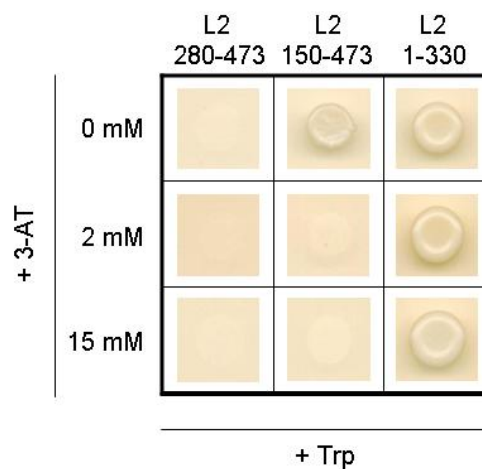


Abbildung 4-2: Einfluss von 3-AT auf die Bildung des auxotrophen Markers Histidin bei unterschiedlichen L2-Mutanten.

Die mit den L2-Deletionsmutanten transformierten Hefeklone wurden auf Selektionsplatten ohne His ausgetropft. Zusätzlich enthielten die Platten verschiedene Konzentrationen von 3-AT (0-15 mM) für die Reduktion der Histidin-Bildung und Tryptophan, da keine Beute in die jeweiligen Hefen transformiert wurde. 3-AT = 3-Amino-Triazol; Trp = Tryptophan

Im Hefe-2-Hybrid-Screening mit L2 280-473 und 150-473 wurden insgesamt $2,6 \times 10^7$ einzelne Hefeklone transformiert. Nach der His-Selektion waren 292 Klone positiv, von denen wiederum 189 eine gut sichtbare β -Galaktosidaseaktivität aufwiesen. Tabelle 4-1 fasst die Ergebnisse des Hefe-2-Hybrid-Screenings zusammen. Alle Hefen, die Histidin bildeten und eine starke β -Gal-Aktivität zeigten, wurden aufgeschlossen, die Plasmide isoliert, in *E.coli* transformiert, aufgereinigt und sequenziert. Aus vielen Hefen ließen sich keine Plasmide isolieren bzw. waren keine *E.coli*-Transformanten auf den Selektionsplatten gewachsen. Daneben gab es auch *E.coli*-Transformanten, die ein leeres Plasmid enthielten. Meist wurden drei *E.coli*-Transformanten pro Plasmidtransformation aufgeschlossen, da es auch möglich war, dass die Hefen bei der Transformation zwei Beute-Plasmide erhielten.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung des Hefe-2-Hybrid-Screenings

Köder	His-Selektion	β -Gal-Selektion	sequenziert	Proteine im Leseraster	positiv im Rücktest
L2 280-473	253	163	60	25	4
L2 150-473	39	26	25	5	3
Summe	292	189	85	30	7

Es wurden so insgesamt 85 Plasmide sequenziert. Da Proteine auf der DNA in drei verschiedenen Leserastern kodiert sein können, wurden die Sequenzen auf ihren Leseraster hin untersucht. Von den 85 sequenzierten Plasmiden befanden sich die DNA-Sequenzen für 30 Proteine im Leseraster des Vektors. Die isolierten Plasmide wurden im Rücktest mit L2 280-473 in die Hefen transformiert und mit Hilfe der Reportergene selektioniert. Letztlich blieben sieben Proteine auch nach diesem Rücktest positiv (Abb. 4-3).

Beute	-His			+His			β -Gal		
	nK	pK	L2	nK	pK	L2	nK	pK	L2
DYNLT1									
Myb Protein									
Dysadherin									
Gelsolin									
Obscurin-like 1									
Centrosmal Protein 68kDa									
TBX2									

Abbildung 4-3: Ergebnis des Hefe-2-Hybrid-Screenings mit L2.

Alle nach dem Hefe-2-Hybrid-Screening und Rücktest positiven Klone wurden zusammen mit dem Köder, Negativ- und Positivkontrolle auf Selektionsplatten ohne und mit His aufgetragen. DYNLT1 und Gelsolin wurden als Interaktionspartner von L2 150-473 identifiziert, die übrigen fünf mit L2 280-473. Von den Platten mit His wurde ein β -Gal-Filterassay durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden Lamin und L1, als Positivkontrolle L2 1-330 verwendet. nK = Negativkontrolle; pK = Positivkontrolle; His = Histidin; β -Gal = β -Galaktosidase

DYNLT1 und Gelsolin wurden als Interaktionspartner von L2 150-473 identifiziert, die übrigen fünf Proteine wurden mit L2 280-473 gefunden. TBX2 schaltete dabei in geringem Maße das

His-Reporter gen an, nicht aber das LacZ-Gen. Mit Ausnahme von TBX2 (7x) wurden alle in Abb. 4-3 aufgelisteten Proteine nur ein Mal im Screening gefunden. Drei der potentiellen Interaktionspartner von L2 sind Transkriptionsfaktoren (Tab. 4-2), vier Proteinen sind mit dem Zytoskelett assoziiert und eines ist in Membranen zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von L2 mit DYNLT1 und TBX2 sowohl im Säugerzellsystemen als auch *in vivo* untersucht und näher charakterisiert.

Tabelle 4-2: Lokalisation und Funktion der im 2-Hybrid-Screening identifizierten Interaktionspartner von L2

Protein	Lokalisation	Funktion	Quelle
Dysadherin	Membran, Oberfläche	reguliert E-Cadherin und Zell-Adhäsion	(Nam <i>et al.</i> , 2007) (Wu <i>et al.</i> , 2004)
DYNLT1	Zytosol, Mikrotubuli Zellkern	Motorprotein, Bestandteil des Dynein-Komplexes	(Makokha <i>et al.</i> , 2002)
Centrosomal Protein 68kDa	Zytosol, Mikrotubuli	Organisation der Centrosomstruktur; EGF-Signalkaskade	(Chen <i>et al.</i> , 2007) (Graser <i>et al.</i> , 2007)
Gelsolin	Zytosol, Aktin	Aktinregulator, polymerisiert Aktinfilamente	(Liao <i>et al.</i> , 2011) (Archer <i>et al.</i> , 2005)
Obscurin-like 1	Zytosol, Zytoskelett	Verknüpft Zytoskelett mit Membranen; Autophagie	(Geisler <i>et al.</i> , 2007)
TBX2	Zellkern	Transkriptionsrepressor, Organ-Morphogenese	(Abrahams <i>et al.</i> , 2010)
Myb Protein P42POP	Zellkern	Transkriptionsrepressor, Profilinregulator	(Lederer <i>et al.</i> , 2005)

4.2 Charakterisierung der Interaktion von L2 mit dem Dynein-Komplex

4.2.1 DYNLT1 und L2 werden in der Hefe exprimiert

In einem ersten Schritt der Charakterisierung der Interaktion von L2 und der leichten Kette DYNLT1 wurde die Expression der Proteine im positiven Hefeklon nachgewiesen. Die Expression beider Proteine stellt die Voraussetzung für die Interaktion und damit das Anschalten des Reportersystems dar. Abbildung 4-4 zeigt die Expression des Köders L2 280-473 (A, Spur 3) sowie der Beute DYNLT1 (B, Spur 2) in der Hefe.

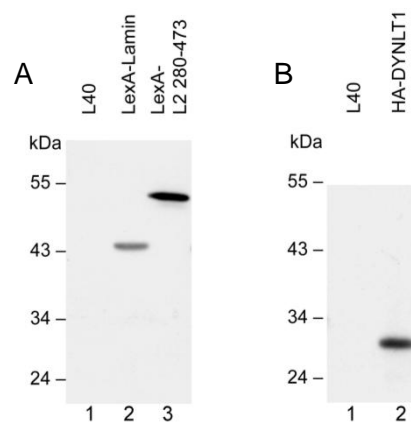


Abbildung 4-4: Nachweis der Expression von L2 280-473 (Köder) und DYNLT1 (Beute) in Hefezellen.

Der Nachweis der Expression der Negativkontrolle LexA-Lamin und des Köders LexA-L2 280-473 (A) erfolgte mit einem LexA-Antikörper. Die Expression der Beute DYNLT1 wurde mit einem HA-Antikörper kontrolliert (B).

4.2.2 Die Expression von L2 führt zu einer Relokalisation von DYNLT1

Nachdem die Expression und damit die Interaktion von L2 und DYNLT1 in der Hefe bestätigt werden konnte, wurde die Interaktion beider Proteine in Säugerzellen näher charakterisiert, indem Immunfluoreszenzstudien durchgeführt wurden. Dafür wurde L2 entweder allein transient transfiziert und zusammen mit endogenem DYNLT1 analysiert oder mit DYNLT1 kotransfiziert (Abb. 4-5). Endogenes DYNLT1 (Bild links oben) zeigt genau wie transient exprimiertes HA- bzw. Myc-DYNLT1 (Bild links Mitte bzw. unten) eine punktuelle Verteilung, die größtenteils im Zytoplasma zu finden ist. Wie in Abb. 4-6 zu sehen ist, kolokalisierte HA-DYNLT1 mit der mittelschweren Kette des Dyneinkomplexes (DYNC111). L2 fand sich nach der Expression in definierten Kernbereichen (Abb. 4-5), bei denen es sich um das PML-Protein (auch als nukleäre Domänen (ND10) bezeichnet) handelt (Day *et al.*, 1998). Wurde DYNLT1 mit L2 koexprimiert (Abb. 4-5, Spalten 2-4), fand eine Reorganisation der Verteilung

von DYNLT1 statt. Es wurde zusammen mit L2 in den Zellkern rekrutiert und lagerte sich dort ebenfalls an dem PML-Protein (vgl. Abb. 4-12) an.

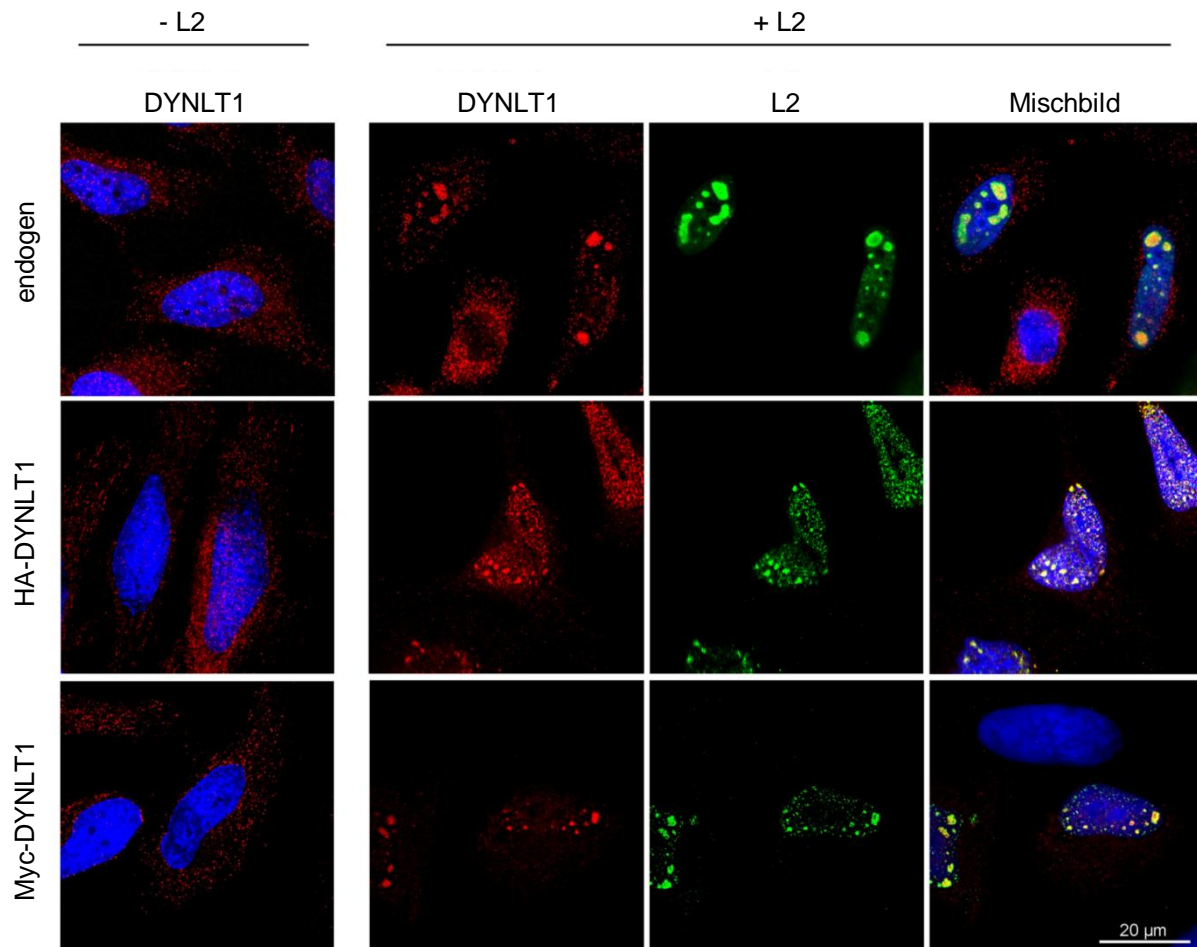


Abbildung 4-5: HPV L2 kolokalisiert mit DYNLT1 in Immunfluoreszenzstudien zur intrazellulären Lokalisation von L2 und DYNLT1.

HeLa-Zellen waren entweder untransfiziert oder wurden für 24h mit einem Expressionsvektor für HA-DYNLT1 oder Myc-DYNLT1 transient transfiziert (linke Spalte). Endogenes DYNLT1 wurde mit einem polyklonalen Kaninchen anti-DYNLT1-Antikörper (AK), HA-DYNLT1 mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-AK und Myc-DYNLT1 mit einem monoklonalen Maus anti-Myc-AK über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Zusätzlich wurde L2 für 24h transient transfiziert (Spalten 2-4) und mit dem monoklonalen Antikörper 33L2-1 detektiert. Für die DNA-Färbung wurde Hoechst 33342 verwendet.

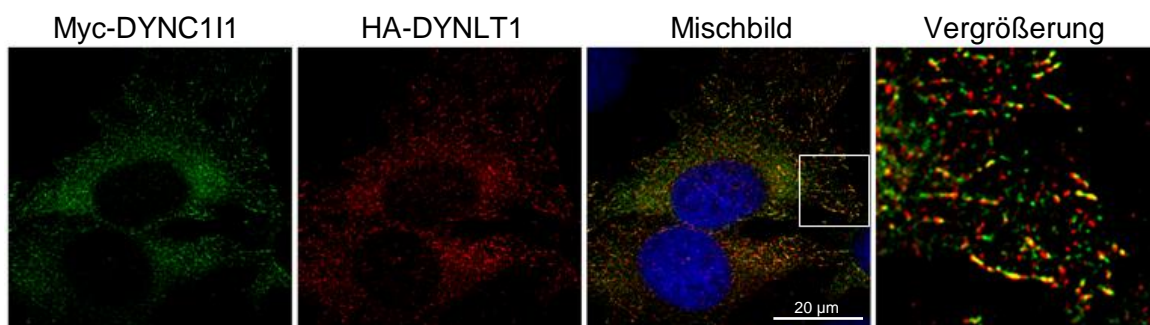


Abbildung 4-6: DYNLT1 kolokalisiert mit der mittelschweren Kette DYNC111 des Dyneinkomplexes.

Myc-DYNC111 und HA-DYNLT1 wurden transient in HeLa-Zellen transfiziert und für 24 h exprimiert. DYNC111 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-Myc-Antikörper (AK) nachgewiesen, DYNLT1 mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-AK. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Das letzte Bild stellt die Vergrößerung des markierten Ausschnitts im Mischbild dar.

4.2.3 L2 interagiert mit DYNLT1

Neben der Analyse der intrazellulären Verteilung von L2 und DYNLT1 mittels Immunfluoreszenz wurde die Interaktion von L2 und DYNLT1 durch Immunpräzipitationsstudien untersucht. Dazu wurde L2 zusammen mit einem GFP-DYNLT1-Fusionskonstrukt in Säugerzellen transient transfiziert und entweder L2 oder DYNLT1 durch spezifische Präzipitation extrahiert. Mittels Westernblot wurde untersucht, ob je nach Fällung L2 oder DYNLT1 kopräzipitiert wurden (Abb. 4-7).

Die Spuren 1-3 zeigen die Expression der jeweiligen Konstrukte. Nach der Fällung von GFP-DYNLT1 durch einen GFP-spezifischen Antikörper (Spur 5, unterer Blot) wurde eine Kopräzipitation von L2 festgestellt (Spur 5, oberer Blot). Um die Spezifität der Bindung zu kontrollieren, wurde eine Koexpression von L2 und GFP durchgeführt (Spur 4). Die Fällung des GFP-Proteins (Spur 4, unterer Blot) ergab nur eine sehr geringe Kofällung von L2 (Spur 4, oberer Blot). Darüber hinaus wurden die Lysate dazu verwendet, L2 mit einem L2-spezifischen Antikörper zu präzipitieren. Abb. 4-7 zeigt, dass nur GFP-DYNLT1 kopräzipitiert wurde, wenn L2 exprimiert wurde (Spur 3), nicht aber GFP (Spur 2). Auch wurde GFP-DYNLT1 nicht unspezifisch präzipitiert (Spur 1).

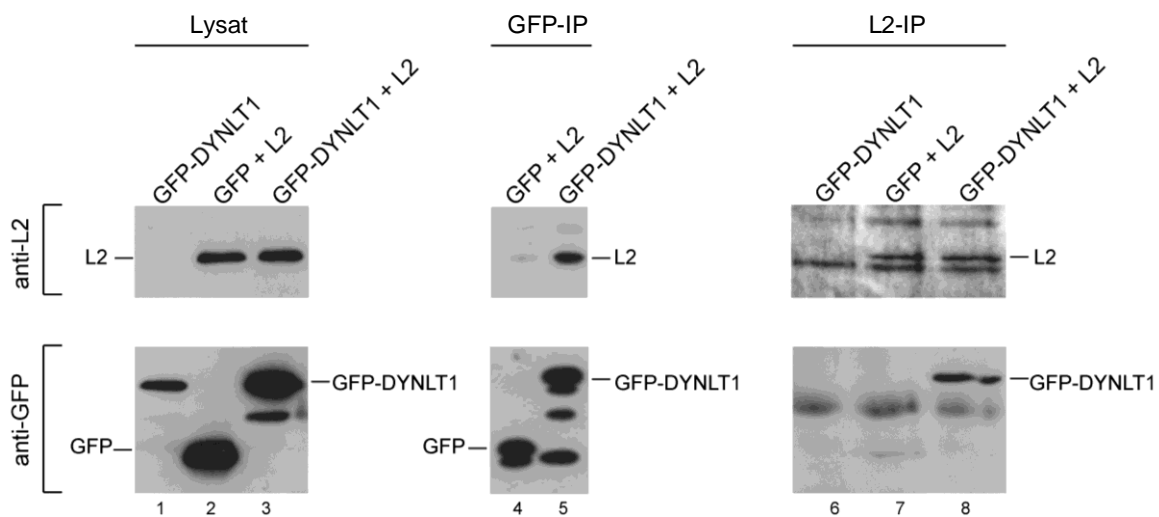


Abbildung 4-7: L2 interagiert mit DYNLT1.

HeLa Zellen wurden transient transfiziert und GFP-DYNLT1, GFP + L2 und GFP-DYNLT1 + L2 wurden für 30h exprimiert. Die Expression der Proteine wurde mit einem Immunoblot nachgewiesen (links). Die Lysate wurden verwendet, um die jeweiligen Proteine mit spezifischen Antikörpern zu fällen (Mitte und rechts). Die Fällung von GFP und GFP-DYNLT1 erfolgte dabei mit dem monoklonalen Maus anti-GFP-Antikörper (J1-8), für L2 wurde der monoklonale Maus anti-33L2-1-Antikörper verwendet. Die Westernblots in der oberen Reihe wurden jeweils mit einem L2-spezifischen Antikörper, die in der unteren Reihe mit einem GFP-spezifischen Antikörper analysiert.

4.2.4 Ein potentielles DYNLT1-Interaktionsmotiv von L2 ist für L2-vermittelte Relokalisation von DYNLT1 entbehrlich

Die Interaktion von HPV16L2 mit dem Dynein-Komplex wurde bereits in einer früheren Arbeit (Florin *et al.*, 2006) gezeigt. Unklar blieb jedoch, an welchen Komponenten des multimeren Komplexes L2 bindet. Viele Proteine, die mit der leichten Kette DYNLT1 interagieren besitzen eine spezifische Peptidsequenz (K/R, K/R, X, X, K/R), mit Hilfe derer sie an DYNLT1 binden können (Bauch *et al.*, 1998, Nagano *et al.*, 1998, Mueller *et al.*, 2002). HPV16L2 besitzt ebenfalls eine Peptidsequenz, die einer potentiellen Bindestelle für DYNLT1 entspricht. Diese basische Sequenz (**RKRRKR**) befindet sich am C-Terminus von L2 (AS 456-461).

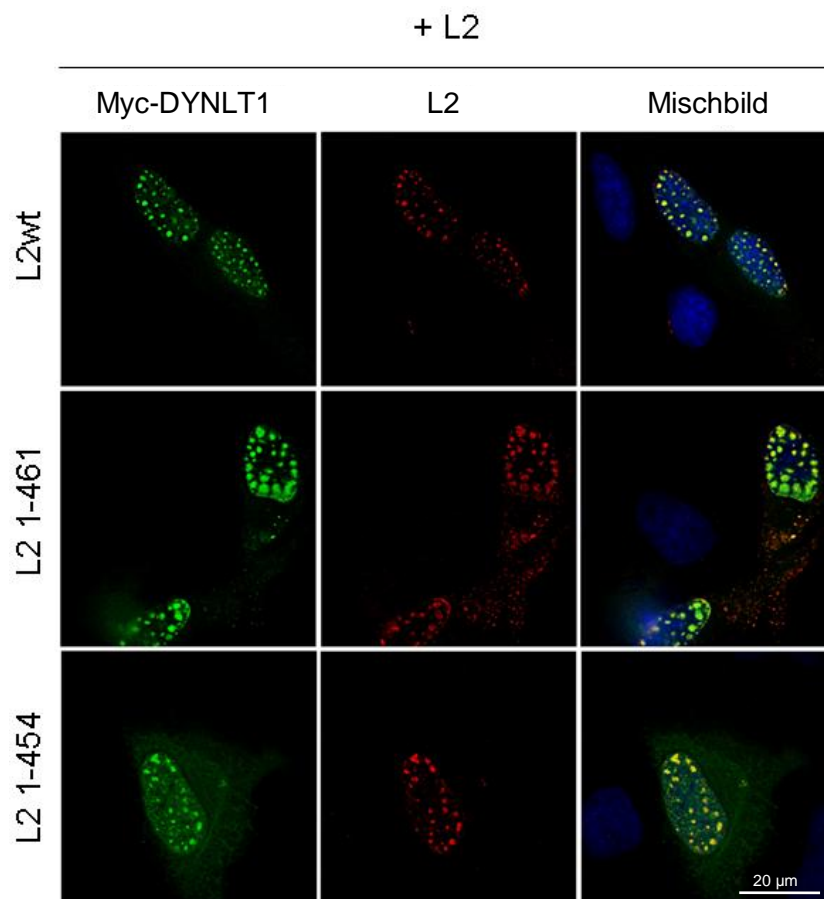


Abbildung 4-8: Die Deletionsmutante L2 1-454 führt wie L2wt zu einer Relokalisation von DYNLT1. Myc-DYNLT1 wurde zusammen mit L2wt, L2 1-461 oder L2 1-454 für 24h in HeLa-Zellen koexprimiert. DYNLT1 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-Myc-Antikörper detektiert, L2 mit einem polyklonalen Kaninchen anti-L2 Antikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Um zu untersuchen, ob diese Sequenz für die Interaktion mit DYNLT1 benötigt wird, wurden Immunfluoreszenzstudien mit entsprechenden L2-Deletionskonstrukten und dem

Fusionskonstrukt Myc-DYNLT1 durchgeführt. Myc-DYNLT1 zeigte ohne die Koexpression von L2 die gleiche zytoplasmatische Verteilung wie auch endogenes DYNLT1 (siehe Abb. 4-5 und 4-6). Bei Koexpression mit den L2-Deletionsmutanten zeigte sich, dass sowohl die Mutante 1-461, die das oben genannte Motiv enthält (Abb. 4-8, Zeile 2), als auch die Mutante 1-454, die es nicht mehr enthält (Zeile 3), noch in der Lage waren, mit DYNLT1 im Zellkern zu akkumulieren.

4.2.5 L2 interagiert auch mit DYNLT3, einer weiteren leichten Kette der Tctex-Gruppe

Es konnte bisher gezeigt werden, dass L2 mit DYNLT1 interagiert und dass die Interaktion zu einer Relokalisation von DYNLT1 in der Zelle führt. Um eine mögliche Bindung weiterer Dynein-Komponenten an L2 zu untersuchen, wurden die leichten Ketten DYNLT1, DYNLT3 und DYNLL1 sowie die mittelschwere Kette DYNC111 an Gluthation-S-Transferase fusioniert, in *E.coli* exprimiert und mittels Gluthation-Sepharose gereinigt.

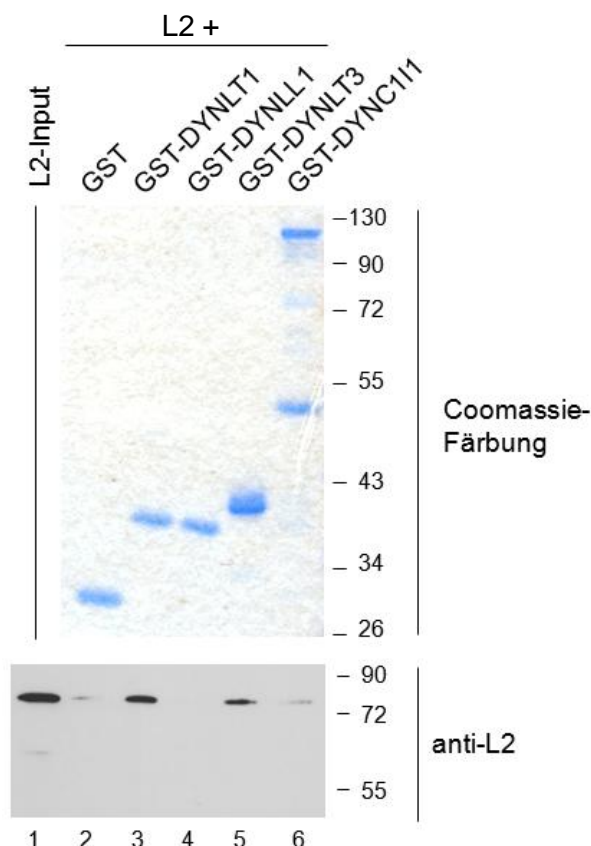


Abbildung 4-9: L2 wird bei der Immobilisierung von GST-DYNLT1 und GST-DYNLT3 kogefällt.

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert und L2 für 24h exprimiert. Die in *E.coli* exprimierten und aufgereinigten GST-Konstrukte wurden mit den Lysaten inkubiert und L2 nach der Elution im Immunoblot mit einem spezifischen Maus anti-33L2-1-Antikörper nachgewiesen (unten). Die GST-Konstrukte wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend angefärbt (oben). Für die GST-Immobilisierung und den Nachweis der GST-Konstrukte im Gel wurden je 5 µg der aufgereinigten Fusionskonstrukte verwendet (DYNC111 = 10 µg).

Zelllysate aus HPV16L2 exprimierenden HeLa-Zellen wurden anschließend mit den unterschiedlichen Dynein-Komponenten inkubiert. Die GST-Fusionskonstrukte wurden durch Gluthation-Sepharose immobilisiert und die L2-Interaktion analysiert (Abb. 4-9). L2 konnte im Immunoblot sowohl bei einer Immobilisierung mit GST-DYNLT1 (Spur 3), als auch mit GST-DYNLT3 (Spur 5) nachgewiesen werden. Keine Bindung von L2 war bei der Immobilisierung mit der leichten Kette DYNLL1 (Spur 4) zu beobachten. Bei der Präzipitation mit der mittelschweren Kette DYNC111 (Spur 6) und der Kontrolle (Spur 2) war im Immunoblot lediglich eine sehr schwache L2-Bande zu erkennen.

Um die Ergebnisse des GST-Assays zu bestätigen, wurde des Weiteren eine Immunpräzipitation mit HA-DYNLT1 bzw. HA-DYNLT3 und L2 durchgeführt. Abb. 4-10 zeigt die Expression der Proteine (linke Abbildung) und die spezifische Fällung der leichten Ketten mit Hilfe eines an magnetische Beads gekoppelten Antikörpers (rechte Abbildung, unten). Zu sehen ist, dass L2 spezifisch kogefällt wurde, wenn HA-DYNLT1 bzw. HA-DYNLT3 gefällt, nicht aber, wenn ein Kontrollvektor transfiziert wurde (rechte Abbildung, oben).

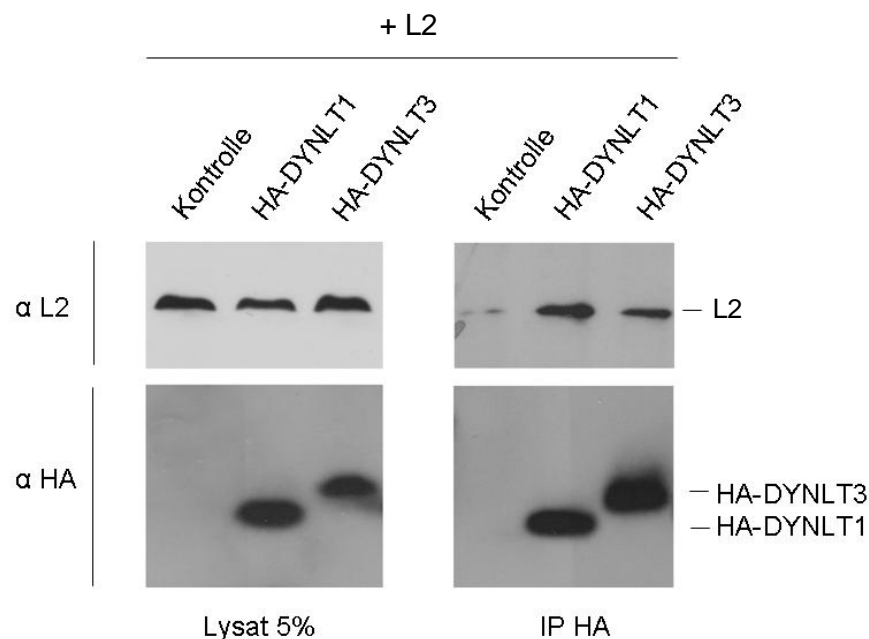


Abbildung 4-10: L2 interagiert mit HA-DYNLT1 und HA-DYNLT3.

HeLa-Zellen wurden transient mit L2 und entweder HA-DYNLT1, HA-DYNLT3 oder einem Kontrollvektor kotransfiziert. Zur Kontrolle der Expression wurden 5% des Lysats im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert (linke Spalte). HA-DYNLT1 und HA-DYNLT3 wurden aus dem Lysat mit einem HA-spezifischen Antikörper immobilisiert und die Präzipitate ebenfalls durch einen Immunoblot untersucht. Die leichten Ketten wurden mit einem monoklonalen Maus anti-HA-Antikörper nachgewiesen, L2 mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper.

4.2.6 Die leichte Kette DYNLT3 wird ebenfalls durch L2 in den Zellkern rekrutiert, nicht aber DYNLL1 und die mittelschwere Kette DYNC111

Nachdem die Interaktionsstudien darauf hinwiesen, dass L2 sowohl an DYNLT1 als auch an DYNLT3 bindet, sollte dieser Befund auch mit Immunfluoreszenzstudien untersucht werden. Dafür wurde L2 zusammen mit HA-DYNLT3, HA-DYNLL1 bzw. HA-DYNC111 koexprimiert (Abb. 4-11). Die leichte Kette HA-DYNLT3 zeigte, ähnlich wie HA-DYNLT1, eine punktuelle Verteilung im gesamten Zytoplasma (linke Spalte, oben). HA-DYNLL1 hingegen war hauptsächlich an den äußeren Rändern der Zelle lokalisiert, aber auch im Nukleus (linke Spalte, Mitte), während bei der mittelschweren Kette HA-DYNC111 eine Gleichverteilung im Zytoplasma zu erkennen war.

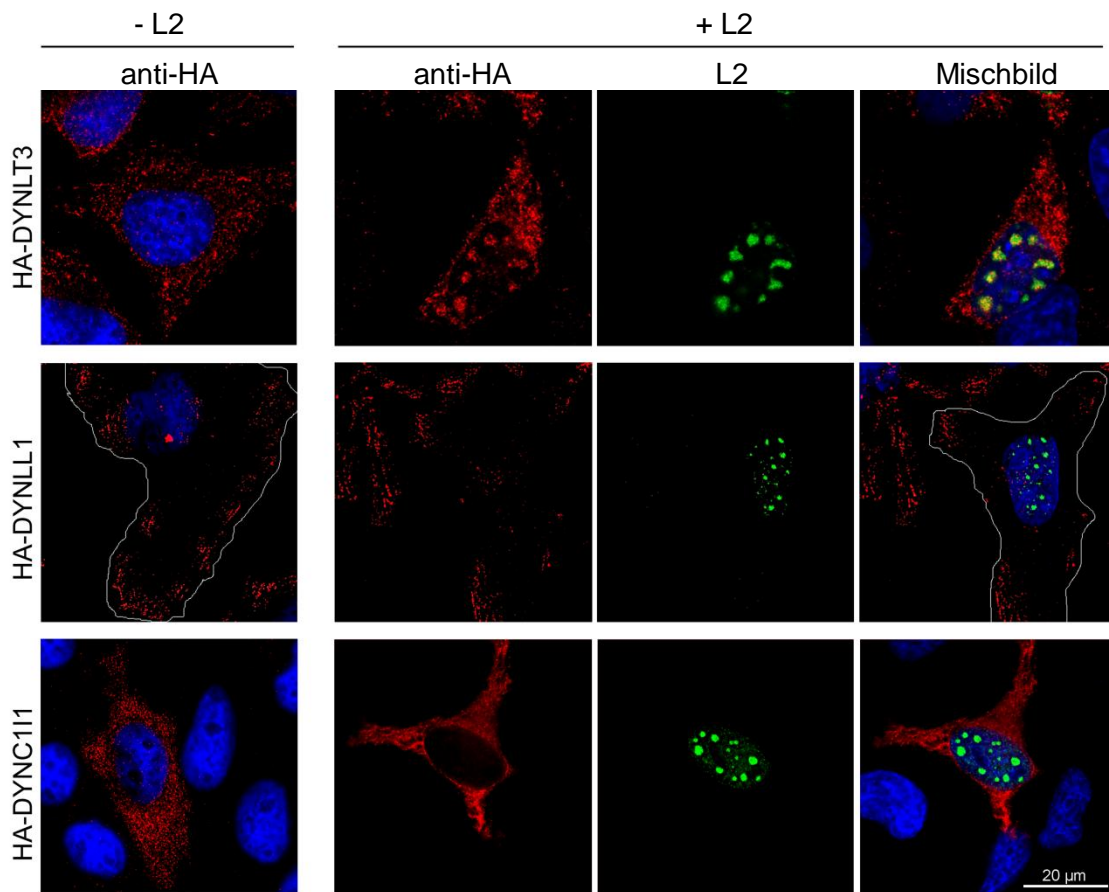


Abbildung 4-11: Die Expression von L2 führt zu einer Akkumulation von DYNLT3 im Nukleus.

HeLa-Zellen wurden entweder mit HA-DYNLT3, HA-DYNLL1 und HA-DYNC111 transient transfiziert (linke Spalte) oder zusätzlich mit L2 kotransfiziert (Spalten 1-3). Die Proteine wurden 24h exprimiert und die Zellen mit Methanol fixiert. HA-DYNLT1, HA-DYNLT3 und HA-DYNC111 wurden mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-Antikörper angefärbt, L2 mit dem monoklonalen Antikörper 33L2-1.

Die leichten Ketten HA-DYNLT3 und HA-DYNLL1 kolokalisierten ebenso wie HA-DYNLT1 (vgl. Abb. 4-6) mit der mittelschweren Kette DYNC111 des Dynein-Komplexes (Abb. 4-12).

Die Expression von L2 führte dazu, dass HA-DYNLT3 ähnlich wie HA-DYNLT1 mit L2 im Nukleus akkumulierte (Abb. 4-11, obere Zeile). Im Gegensatz dazu hatte die Expression von L2 keinen Einfluss auf die Verteilung der leichten Kette HA-DYNLL1 und der mittelschweren Kette HA-DYNC111 (mittlere und untere Zeile).

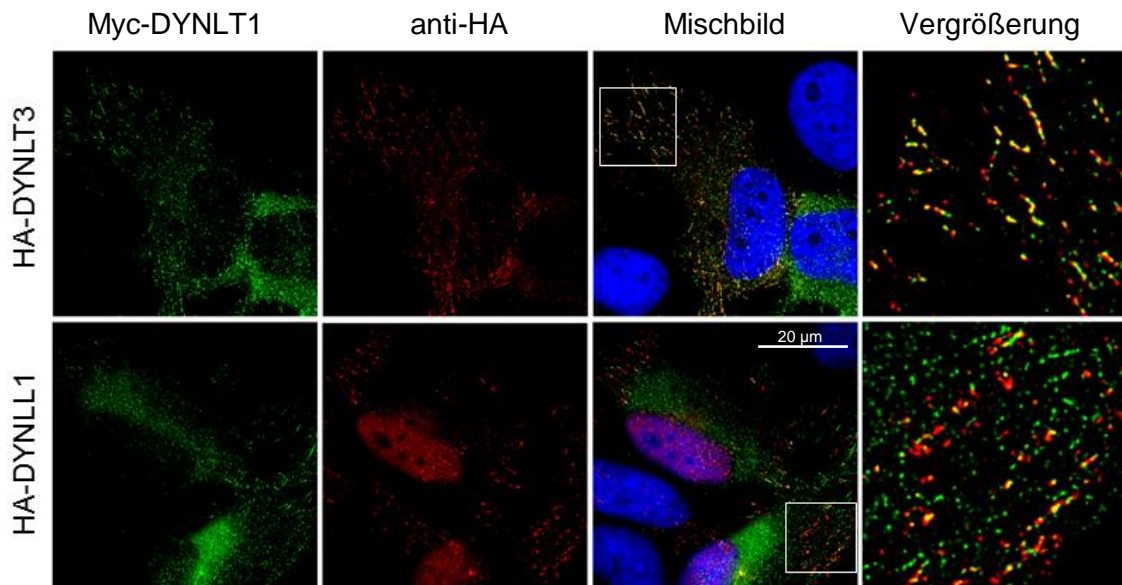


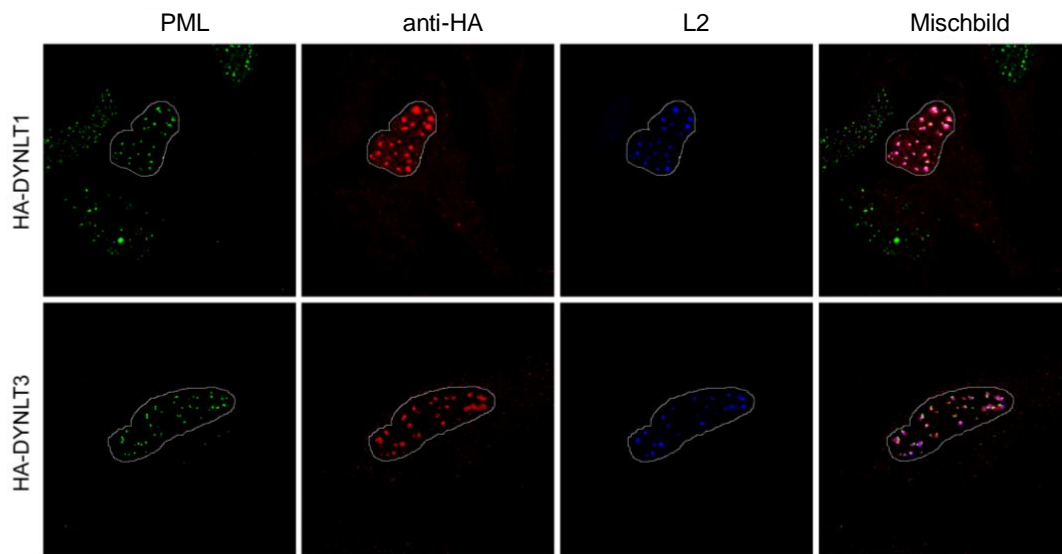
Abbildung 4-12: HA-DYNLT3 und HA-DYNLL1 kolokalisieren mit der mittelschweren Kette DYNC111 des Dyneinkomplexes.

HeLa Zellen wurden mit Myc-DYNC111 und HA-DYNLT3 oder HA-DYNLL1 kotransfiziert. Der Nachweis der leichten Ketten erfolgte mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-Antikörper, Myc-DYNLT1 wurden mit einem monoklonalen Maus anti-Myc-Antikörper detektiert. Die Kerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Das rechte Bild stellt eine Vergrößerung des markierten Ausschnitts im Mischbild dar.

4.2.7 DYNLT1 und DYNLT3 kolokalisieren nach der Expression von L2 mit dem PML-Protein im Zellkern

Im Rahmen der Fluoreszenzstudien wurde die Kolokalisation von DYNLT1 bzw. DYNLT3 und PML quantitativ bestimmt. Für diesen Ansatz wurden HeLa-Zellen sowohl mit HA-DYNLT1 bzw. HA-DYNLT3 allein als auch mit L2 kotransfiziert (Abb. 4-13, A). Zu erkennen war eine deutliche Kolokalisation von HA-DYNLT1 bzw. HA-DYNLT3 und PML nach der Expression von L2 (B). Um die Kolokalisation der Dyneinketten mit dem PML-Protein nach der Expression von L2 zu quantifizieren, wurden je 50 transfizierte Zellen mit Hilfe des Kolokalisationsmoduls der Software AxioVision (Zeiss) ausgewertet.

A



B

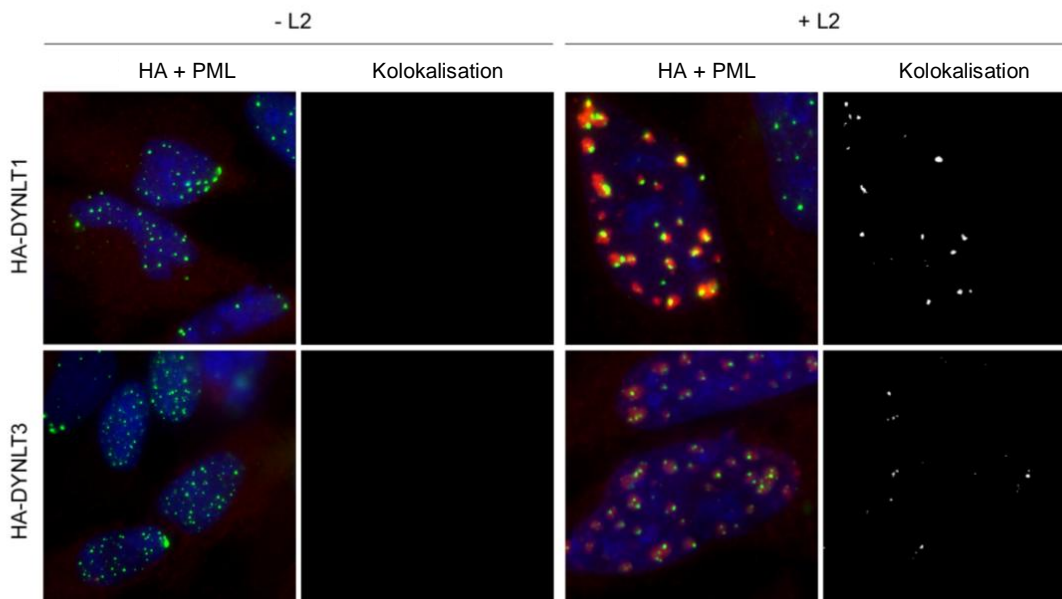


Abbildung 4-13: DYNL1 und DYNL3 kolokolisieren mit L2 an den ND-10.

HeLa-Zellen wurden entweder mit HA-DYNL1 oder HA-DYNL3 für 24 h transient transfiziert oder zusätzlich mit L2 kotransfiziert. Es wurde eine Dreifachfärbung durchgeführt, bei der die HA-Konstrukte mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-Antikörper (AK), L2 mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-AK und das PML-Protein mit einem polyklonalen Kaninchen anti-PML-AK nachgewiesen wurden (A). Um die Kolokalisation der Dyneinkonstrukte mit dem PML-Protein im Zellkern zu quantifizieren (B), wurden alle Bilder mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen und mit Hilfe der AxioVision-Software ausgewertet. Es wurde dabei ein Schwellenwert für die Helligkeit der kolokolisierenden Pixel festgelegt, um nur starke Kolokolisationen zu berücksichtigen. Dieser Schwellenwert wurde für alle Aufnahmen verwendet.

Diese Untersuchung ergab, dass die L2-Expression die Kolokolisation signifikant erhöhte (Abb. 4-14). Nach statistischer Auswertung ergab sich eine durchschnittliche Zahl von 303

kolokalisierender Pixel pro Zelle für DYNLT1 und 183 kolokalisierender Pixel pro Zelle für DYNLT3 (Abb. 4-14) mit dem PML-Protein.

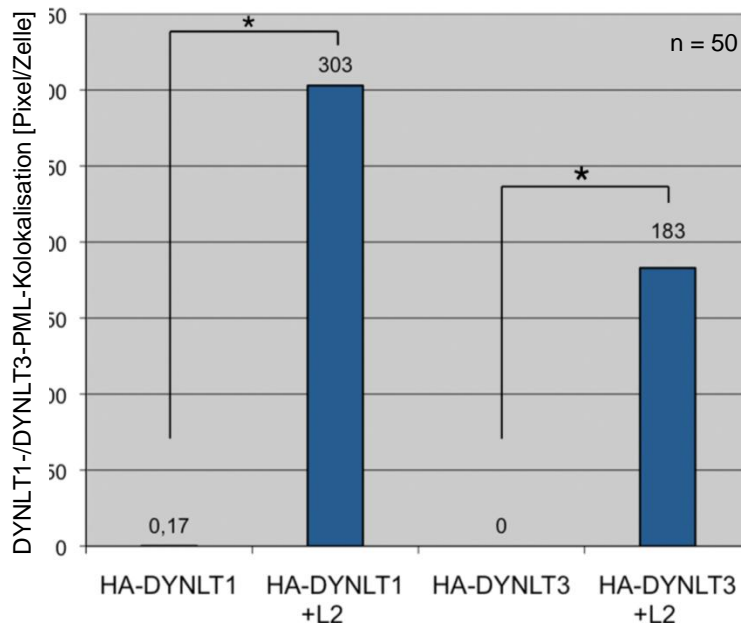


Abbildung 4-14: Die Kolokalisation von DYNLT1 und DYNLT3 mit dem PML-Protein ist nach der Expression von L2 signifikant erhöht.

Die Kolokalisation von DYNLT1 bzw. DYNLT3 mit dem PML-Protein aus Abb. 4-12 wurde mit Hilfe eines Kolokalisationsmoduls (Zeiss) bestimmt. n = 50 Zellen *P < 0,05 (t-test, gepaart, zweiseitig)

4.3 Die Rolle der leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 bei der Infektion

Die bisherigen Immunfluoreszenz- und Interaktionsstudien wiesen die Bindung von L2 an die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 des Dyneinkomplexes nach. Für Adenoviren, das benötigt wird (Leopold *et al.*, 2000, Mueller *et al.*, 2002, Douglas *et al.*, 2004).

4.3.1 HPV16 L2 kolokalisiert während Infektion mit den leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3

Um zu untersuchen, ob die Dyneinketten auch eine funktionelle Rolle im Infektionsweg von HPV16 besitzen, wurden im Folgenden Infektionsstudien mit HPV16-Pseudoviren durchgeführt. HeLa-Zellen wurden für acht Stunden infiziert und zunächst die Lokalisation der Kapsidproteine L1 und L2 sowie von DYNLT1 und DYNLT3 mittels Immunfluoreszenz untersucht.

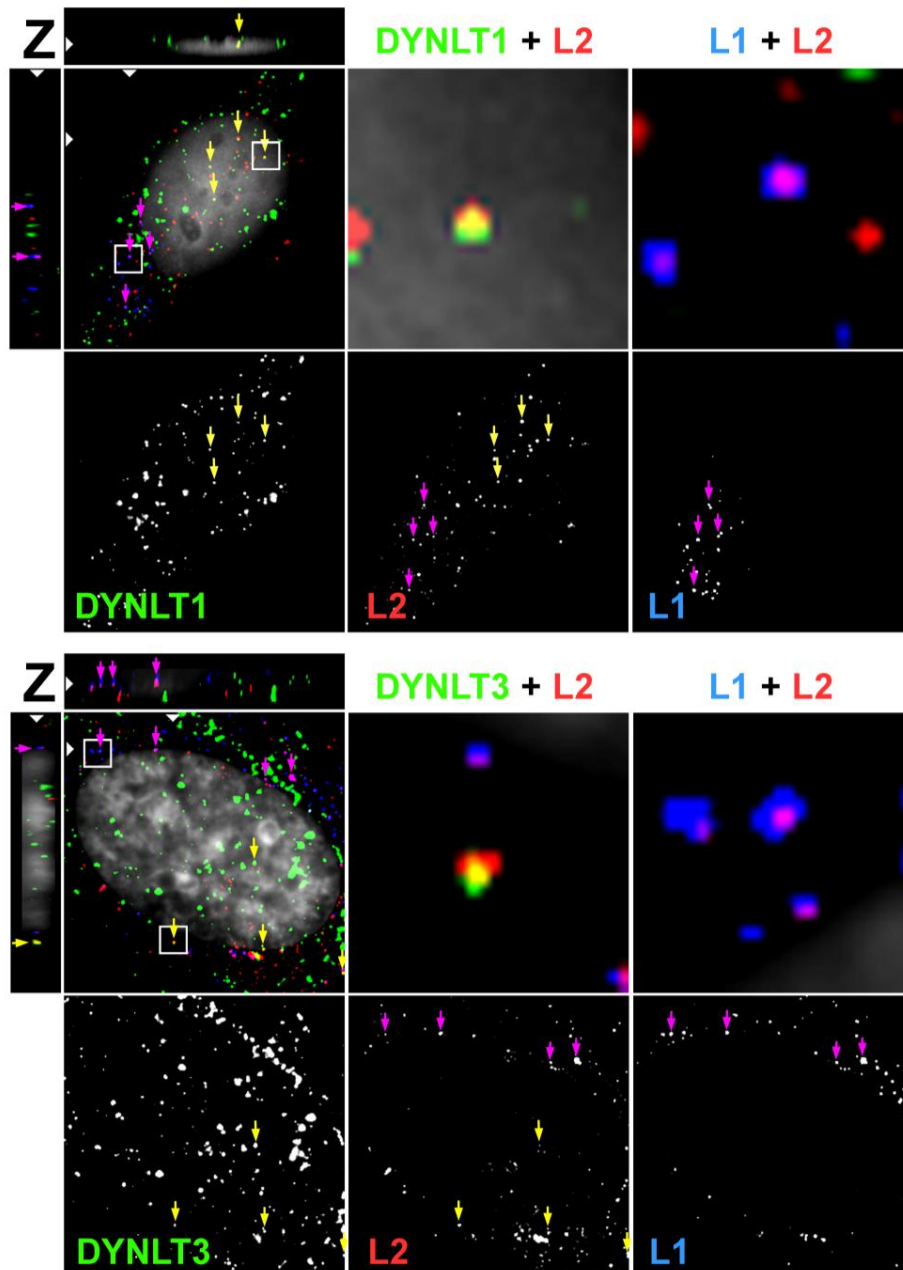


Abbildung 4-15: Nach der Infektion mit HPV16-Pseudoviren kolokalisiert L2 mit DYNLT1 und DYNLT3.

HeLa-Zellen wurden für 8 h mit 16L1-L2-3xHA-Pseudoviren infiziert und L1, L2 und die leichten Ketten mit einer Triplefärbung nachgewiesen. DYNLT1 (oben, grün) wurde mit einem polyklonalen Kaninchen anti-DYNLT1 Antikörper nachgewiesen, DYNLT3 (unten, grün) mit einem monoklonalen Maus anti-DYNLT3-Antikörper. L2 wurde mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-Antikörper, L1 mit einem monoklonalen Maus anti-33L1-7-Antikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt, der Übersichtlichkeit aber in grau dargestellt. Die Kolokalisation von L2 und DYNLT1 bzw. DYNLT3 ist mit gelben Pfeilen markiert, die Kolokalisation von L1 und L2 mit lila Pfeilen. Das linke obere Bild gibt jeweils das Mischbild aus den unteren drei Bildern an. Das Mischbild wird zusätzlich in Seitenansicht gezeigt (markiert durch ein Z). Die weißen Pfeile im Mischbild zeigen die Schnittebene an. Die beiden Bilder rechts oben stellen die Vergrößerung des markierten Bereichs im Mischbild dar.

Abb. 4-15 zeigt, dass die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 sowohl zytoplasmatisch, als auch im Zellkern mit L2 kolokalisierten (gelbe Pfeile). Bei der Betrachtung der Verteilung von L1 und L2, ist zu erkennen, dass L2 im Zytosol sowohl frei als auch in Assoziation mit L1 assoziiert vorlag (lila Pfeile). Es wurde für diese Immunfluoreszenzstudien ein L1-spezifischer

Antikörper verwendet, der L1 nur dann erkannte, wenn es nach der Ansäuerung in den Endosomen zu einer Konformationsänderung der Kapside gekommen war (Chen *et al.*, 2000, Spoden *et al.*, 2008). Es gab nur eine geringe Kolokalisation von L2 und DYNLT1 bzw. DYNLT3, wenn L2 zusammen mit 16L1 vorlag (lila Pfeile). War L2 nicht mit L1 assoziiert, konnte eine deutliche Kolokalisation mit DYNLT1 bzw. DYNLT3 beobachtet werden (gelbe Pfeile).

In Abb. 4-16 ist darüber hinaus zu erkennen, dass L2 24 h nach der Infektion mit HPV16-Pseudoviren, ähnlich wie nach der Überexpression (vgl. Abb. 4-13), am PML-Protein im Zellkern akkumuliert (Abb. 4-16, letzte Spalte, lila). Dazu lässt sich teilweise eine Kolokalisation der leichten Ketten und L2 mit dem PML-Protein im Kern beobachten (Abb. 4-16, letzte Spalte, Pfeile).

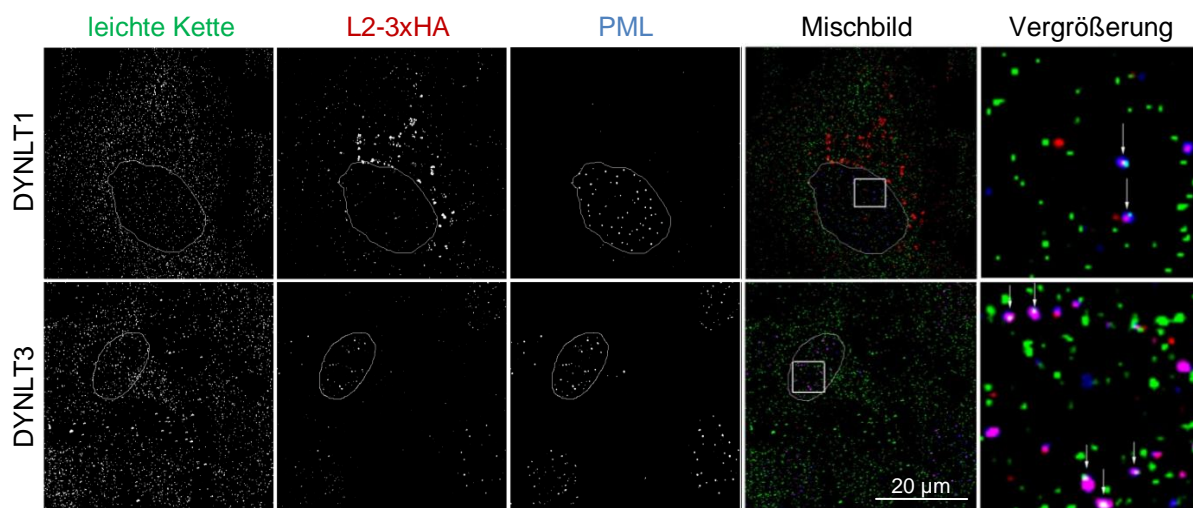


Abbildung 4-16: 24 h nach der Infektion mit HPV16-Pseudoviren kolokalisieren DYNLT1 und DYNLT3 mit L2 und dem PML-Protein im Zellkern.

HeLa-Zellen wurden für 24 h mit 16L1-L2-3xHA-Pseudoviren infiziert und mit Methanol fixiert. DYNLT1 wurde mit einem polyklonalen Kaninchen anti-DYNLT1-Antikörper detektiert, DYNLT3 mit einem monoklonalen Maus anti-DYNLT3-Antikörper. L2 wurde mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-Antikörper nachgewiesen, das PML-Protein mit einem monoklonalen Maus anti-PML-AK (bei DYNLT1) oder einem polyklonalen Kaninchen anti-PML-AK (bei DYNLT3) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, der Übersichtlichkeit wegen aber nur schematisch dargestellt. Mit L2- und PML-kolokalisierende leichte Ketten sind mit Pfeilen markiert (letzte Spalte).

4.3.2 Die Depletion der leichten Ketten inhibiert die Infektion von HPV16

Nachdem nun nachgewiesen werden konnte, dass DYNLT1 und DYNLT3 während der Infektion mit dem minoren Kapsidprotein L2 kolokalisieren, sollte die Frage geklärt werden, ob die beiden leichten Ketten für den Infektionsprozess von HPV16 funktionell benötigt

werden. In einem ersten Schritt erfolgte ein siRNA-vermittelter Abbau der leichten Ketten in HeLa- und HaCaT-Zellen. Zur siRNA-vermittelten Depletion des jeweiligen Proteins wurden in beiden Fällen zwei spezifische siRNAs entweder einzeln oder in Kombination verwendet. Nach der Transfektion der siRNAs wurden die Zellen mit Pseudoviren infiziert, die das Luciferaseplasmid enthielten und die Infektiosität anhand der Luciferaseaktivität ermittelt. Die Depletion der leichten Ketten wurde mittels Immunoblot kontrolliert (Abb. 4-17).

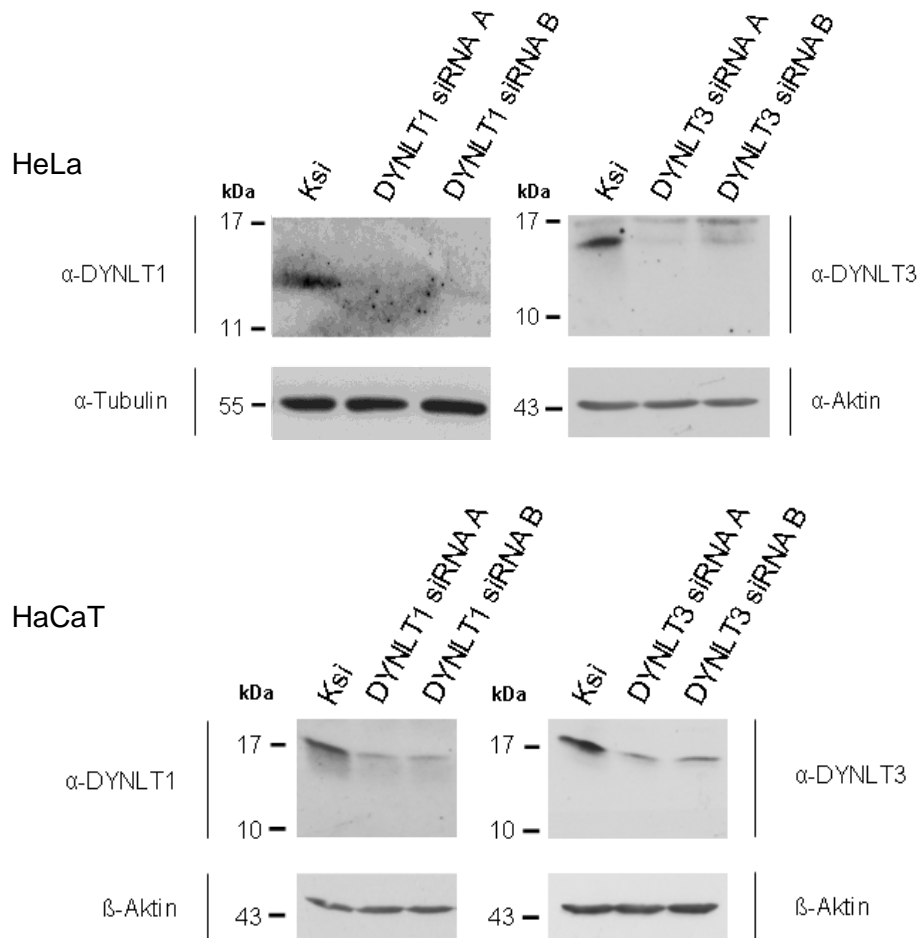


Abbildung 4-17: Depletion von DYNLT1 und DYNLT3 in HeLa- und HaCaT-Zellen durch RNA-Interferenz.

HeLa Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für einen Immunoblotnachweis von DYNLT1 und DYNLT3 verwendet. Der Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen Maus anti-DYNLT1-Antikörper bzw. monoklonalen Maus anti-DYNLT3-Antikörper. Als Ladekontrolle wurden zudem Aktin, bzw. Tubulin nachgewiesen.

Beide siRNAs gegen DYNLT1 (linke Spalte) und DYNLT3 (rechte Spalte) führten dabei zu einer starken Expressionsminderung ihrer Zielmoleküle sowohl in HeLa- (oben) als auch in HaCaT-Zellen (unten).

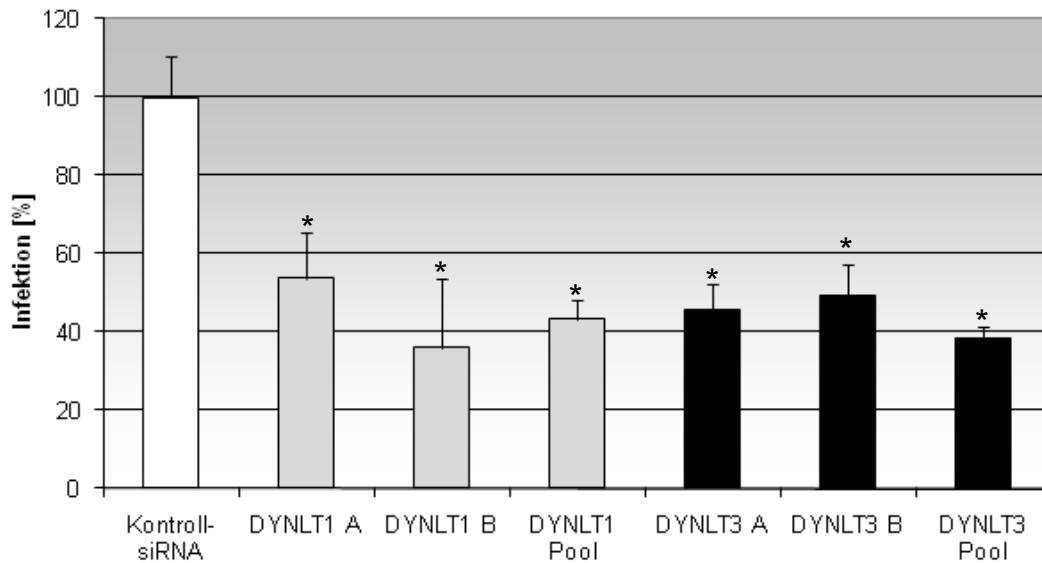


Abbildung 4-18: Der siRNA-Knockdown von DYNLT1 und DYNLT3 führt zu einer Infektionsinhibition in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen siRNAs transfiziert und für 24 h mit HPV16-Pseudoviren infiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Luciferase- sowie die LDH-Aktivität der Zellen gemessen. Die Luciferasewerte wurden auf die LDH-Aktivität angepasst. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

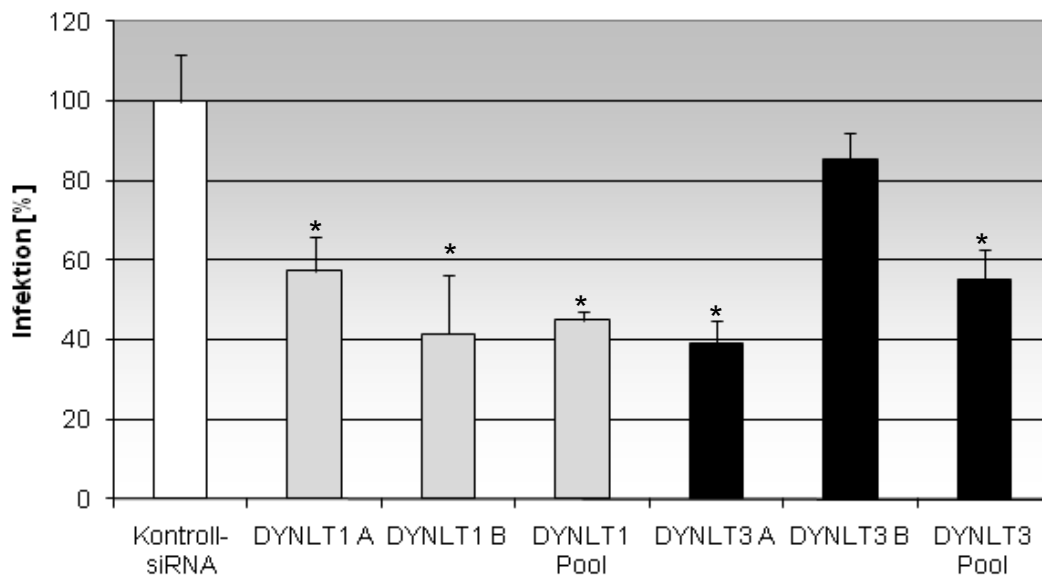


Abbildung 4-19: Die Infektion von HaCaT-Zellen mit HPV16-Pseudoviren wird durch die Depletion von DYNLT1 und DYNLT3 inhibiert.

HaCaT-Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen siRNAs transfiziert und anschließend für 24h mit HPV16-PsV infiziert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und LDH-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde an die LDH-Werte angeglichen. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

In HaCaT-Zellen führte die Depletion der leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 ebenfalls zu einer starken Reduktion der Infektion. So erreichte die Infektion nach der Depletion von DYNLT1 57 bzw. 42% bei der Einzeltransfektion, bzw. 45%, wenn beide siRNAs kombiniert verwendet wurden. Die Depletion von DYNLT3 führt zu einer Inhibition der Infektion auf 39 bzw. 85%. Wurden beide siRNAs zusammen verwendet, so ergab sich eine Restinfektion

von 55%, verglichen mit den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die beiden siRNAs gegen DYNLT1 konnten in HeLa-Zellen die Infektion gegenüber den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen auf 54 bzw. 36% reduzieren (Abb. 4-18). Kombinierte man die siRNAs, so erreichte die Infektion einen Wert von 43%. Wurde DYNLT3 depletiert, so wurde die Infektion auf 46 bzw. 49% inhibiert. Durch die Kombination der beiden DYNLT3-siRNAs wurde die Inhibition noch verstärkt (38% Infektion).

4.3.3 Die transiente Expression der leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 erhöht die Infektion mit HPV16-Pseudoviren

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von DYNLT1 und DYNLT3 zu einer Inhibition einer HPV-Infektion führte. Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Erhöhung der intrazellulären DYNLT1 und DYNLT3-Konzentration auf die Infektion hat. Dafür wurden HeLa- und HaCaT-Zellen mit HA-DYNLT1 oder HA-DYNLT3 transfiziert um am nächsten Tag mit Pseudoviren infiziert (Abb. 4-20).

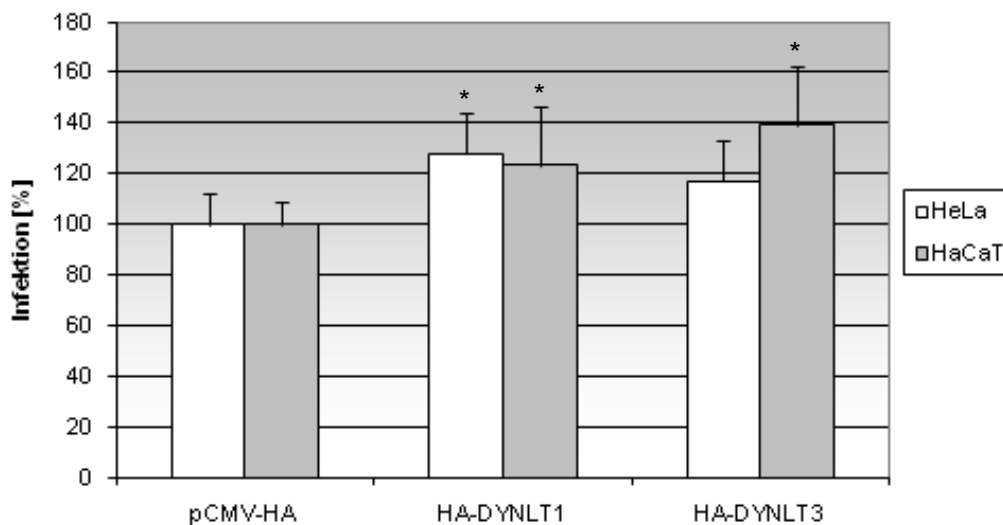


Abbildung 4-20: Die Überexpression von DYNLT1 und DYNLT3 führt zu einer Steigerung der HPV-Infektiosität.

HeLa- und HaCaT-Zellen wurden transient transfiziert und HA-DYNLT1 und -DYNLT3 für 24 h exprimiert. Es folgte eine Infektion mit HPV16-Pseudoviren für 24 h. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und LDH-Aktivität gemessen. Die Expression der Luciferase wurde an die der LDH normiert. *P<0,05 (t-test, gepaart, zweiseitig)

Eine Erhöhung der Proteinmenge von DYNLT1 und DYNLT3 sowohl in HeLa- (128 und 117%), als auch in HaCaT-Zellen (123 und 139%) resultierte dabei in einer Steigerung der Infektion mit HPV16-Pseudoviren.

4.3.4 Die Depletion von DYNLT1 und DYNLT3 führt zu einer perinukleären Akkumulation von L2

Da die Infektionsstudien gezeigt haben, dass die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 in der Infektionskette von HPV16 beteiligt sind, sollte mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien die Rolle der leichten Ketten bei der Infektion weiter charakterisiert werden.

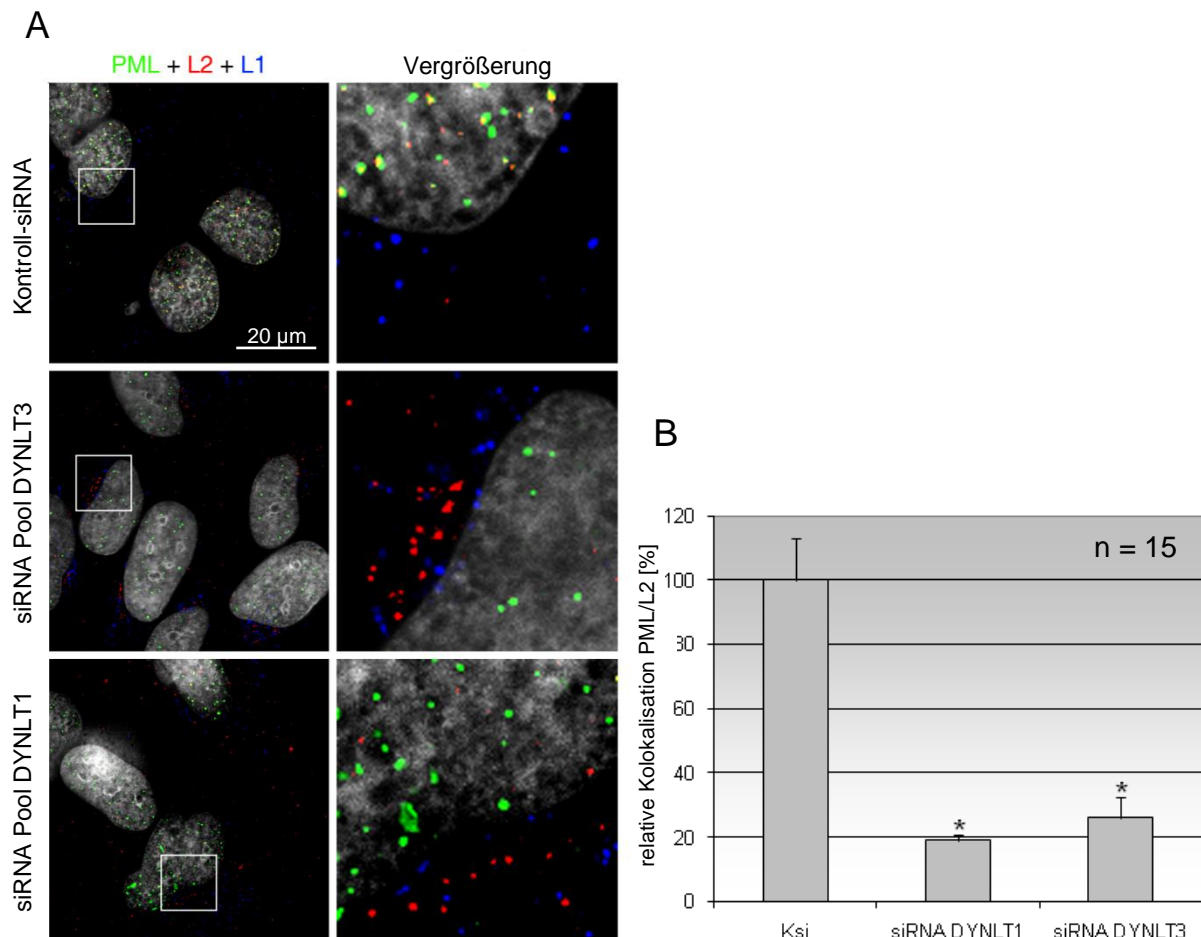


Abbildung 4-21: Die Depletion von DYNLT1 und DYNLT3 führt zu einer perinukleären Akkumulation von L2 nach der Infektion mit HPV16-Pseudoviren.

HeLa-Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen siRNAs behandelt und anschließend für 24 h mit HPV16L1-L2-3x-HA-Pseudoviren infiziert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. Das L1-Protein wurde mit einem monoklonalen Maus anti-33-L1-7-Antikörper, L2 mit einem monoklonalen Ratte anti-HA-Antikörper und das PML-Protein mit einem polyklonalen Kaninchen anti-PML-Antikörper nachgewiesen (A). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt, der Übersichtlichkeit wegen aber in grau dargestellt. Die rechte Spalte zeigt die Vergrößerung des im Mischbild markierten Bereichs. Die Kolo-kalisation von L2 und PML nach siRNA-Depletion wurde mit dem Axiovision Kolo-kalisationsmodul bestimmt (B). Je 15 Bilder (n = 15) wurden dabei mit derselben Belichtungszeit aufgenommen und unbearbeitet verwendet. *P<0,05 (t-test, gepaart, zweiseitig)

Hierbei wurde betrachtet, ob die Depletion der leichten Ketten einen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung von L1 und L2 hat. Dafür wurden HeLa-Zellen nach der siRNA-Depletion von DYNLT1 oder DYNLT3 für 24 h mit Pseudoviren infiziert. Bei der Infektion nach Transfektion der Kontroll-siRNA ist zu erkennen, dass der Großteil der L2-Moleküle im

Zellkern mit dem PML-Protein kolokalisiert (Abb. 4-21 A, Zeile 1). Wurden die leichten Ketten DYNLT1 oder DYNLT3 mit Hilfe von RNA-Interferenz gezielt depletiert, so ließ sich eine Akkumulation von L2 außerhalb des Zellkerns beobachten (Zeile 2 und 3). Ebenfalls zu erkennen ist, dass L2 nicht mehr mit L1 kolokalisierte. Die Kolokalisation von L2 und dem PML-Protein wurde mit Hilfe des Kolokalisationsmoduls der Software Axiovision (Zeiss) statistisch ausgewertet. Hierfür wurde die Kolokalisation mit und ohne siRNA-vermittelte Depletion der leichten Ketten in je 15 Bildern bestimmt. Abb. 4-21 B zeigt, dass die Kolokalisation von L2 und dem PML-Protein geringer war, wenn DYNLT1 (18%) oder DYNLT3 (31%) depletiert wurden.

4.3.5 Die Infektion mit HPV16-Pseudoviren lässt sich mit Antikörpern gegen DYNLT1 und DYNLT3 inhibieren

Neben der siRNA-Depletion gibt es auch die Möglichkeit, die Funktion zellulärer Proteine durch das Einbringen von neutralisierenden Antikörpern zu blockieren. Daher wurde in diesem Projekt auch versucht, mit einem Einbringen von Antikörpern in das Zellinnere die Funktion von DYNLT1 und DYNLT3 in der Infektionskette von HPV16 zu inhibieren. Wie in Abbildung 4-22 gezeigt, konnte die Infektion mit HPV16-Pseudoviren vor allem mit der Transfektion eines Antikörpers gegen DYNLT1 sowohl in HeLa-, als auch in HaCaT-Zellen signifikant inhibiert werden. Die Infektion konnte auf 36% gegenüber der Transfektion eines Kontrollantikörpers reduziert werden. Das Einbringen eines DYNLT3-Antikörpers inhibierte die Infektion um 22% (HeLa) bzw. 19% (HaCaT).

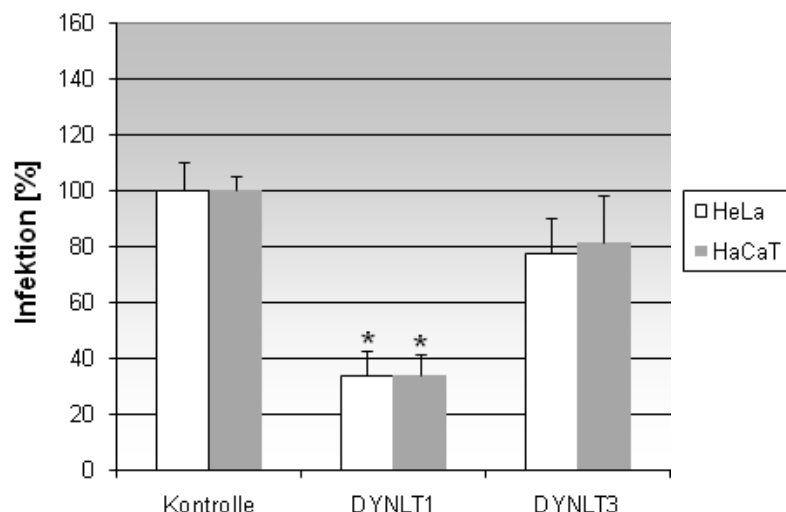


Abbildung 4-22: Die Infektion mit HPV16-Pseudoviren konnte durch spezifische Antikörper gegen DYNLT1 und DYNLT3 gehemmt werden.

HeLa- und HaCaT-Zellen wurden mit den entsprechenden Antikörpern transfiziert. 3 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen mit HPV16-Pseudoviren infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase- und LDH-Aktivität gemessen. Die Luciferasewerte wurden an die LDH-Aktivität angepasst. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

4.4 Charakterisierung der Interaktion von L2 mit den Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3

4.4.1 TBX2 und L2 werden in der Hefe exprimiert

Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems wurde neben der leichten Kette DYNLT1 auch der Transkriptionsfaktor TBX2 als spezifischer Interaktionspartner von L2 identifiziert (Abb.4-3). Die nachfolgenden Untersuchungen sollten die Spezifität und die funktionelle Bedeutung der Interaktion nachweisen. Zunächst wurde der entsprechende Hefeklon aufgeschlossen und die Expression von Köder und Beute mittels Immunoblot nachgewiesen. Der Aufschluss wurde von Konstanze Scheffer im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt und wird der Vollständigkeit wegen hier noch einmal gezeigt. L2 diente als Köder und wurde an eine LexA-DNA-Aktivierungsdomäne fusioniert. Die Beute, in dem Fall TBX2, wurde so in den Vektor inkloniert, dass sie eine N-terminale HA-Markierung besaß. Abb. 4-24 zeigt, dass sowohl der Köder L2 280-473 (A, Spur 2), als auch die Beute TBX2 im positiven Hefeklon exprimiert wurden (B, Spur 2).

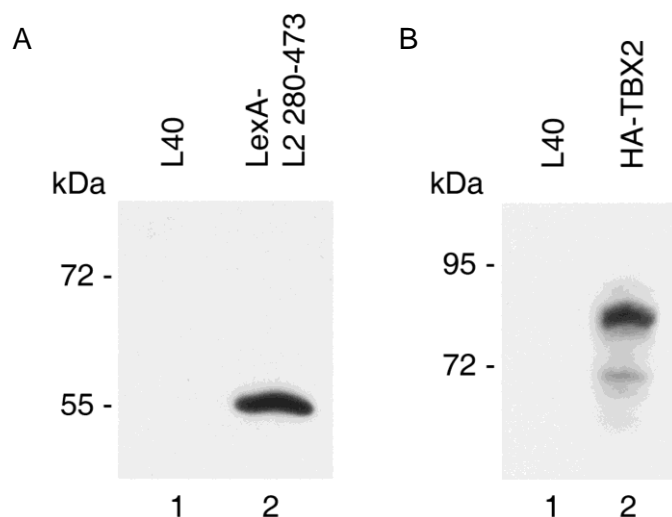


Abbildung 4-23: TBX2 und L2 werden im Hefestamm L40 exprimiert.

Der Nachweis der Expression des Köders (L2 280-473) und der Beute (TBX2) erfolgte mit einem Immunoblot. Als Negativkontrolle diente dabei ein untransfizierter Klon von L40. Für den Nachweis von L2 wurde ein monoklonaler Maus anti-LexA-Antikörper verwendet (A, Spur 2), TBX2 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-HA-Antikörper detektiert (B, Spur 2).

4.4.2 L2 interagiert mit TBX2 und TBX3 *in vitro*

Um die Interaktion von TBX2 und L2 auch *in vitro* zu bestätigen, wurden Koimmunpräzipitationen mit L2 und TBX2 durchgeführt. Die Interaktionsstudien wurden auf den Transkriptionsfaktor TBX3 erweitert, da die Aminosäuresequenz von TBX2 und TBX3 eine hohe Homologie (54,5%) aufweisen. Die Koimmunpräzipitationen wurden so durchgeführt, dass einerseits ein YFP-L2-Fusionsprotein mit Hilfe von GFP-spezifischen Antikörpern gefällt und die Interaktion mit TBX2 bzw. TBX3 anschließend mittels Westernblot untersucht wurde (Abb. 4-24 A + B). Andererseits wurde FLAG-markiertes TBX2 bzw. TBX3 immobilisiert und jeweils die Interaktion mit L2 analysiert (Abb. 4-24 C). Mit einem Teil des Zelllysats wurde die Expression der Proteine kontrolliert. Zunächst wurde TBX2 bzw. TBX3 mit YFP-L2 kotransfiziert. Als Kontrolle wurden die T-box-Proteine dabei mit YFP kotransfiziert. Es zeigte sich, dass die Expression von YFP-L2 im Gegensatz zu YFP deutlich schwächer war (Abb. 4-24 A/B, Spur 1 und 2). Zudem gab es eine zusätzliche Bande im unteren Bereich beider Spuren, die wahrscheinlich auf eine unvollständige Synthese oder einen Abbau der YFP-Konstrukte zurückgeht. Die Analyse der Präzipitate hingegen zeigte, dass in etwa gleiche Mengen von YFP-L2, bzw. YFP gefällt wurden (A/B, Spur 3 und 4). Entscheidend war jedoch, dass TBX2 bzw. TBX3 nur bei der Expression von YFP-L2 spezifisch kopräzipitiert wurden (A/B, Spur 4). Auch nach Fällung von TBX2 bzw. TBX3 erfolgte eine spezifische Kopräzipitation von L2 (Abb. 4-24 C, Spur 5 und 6). Um zu zeigen, dass keine unspezifische Bindung von L2 vorlag, wurde ein Kontrollvektor kotransfiziert (C, Spur 4).

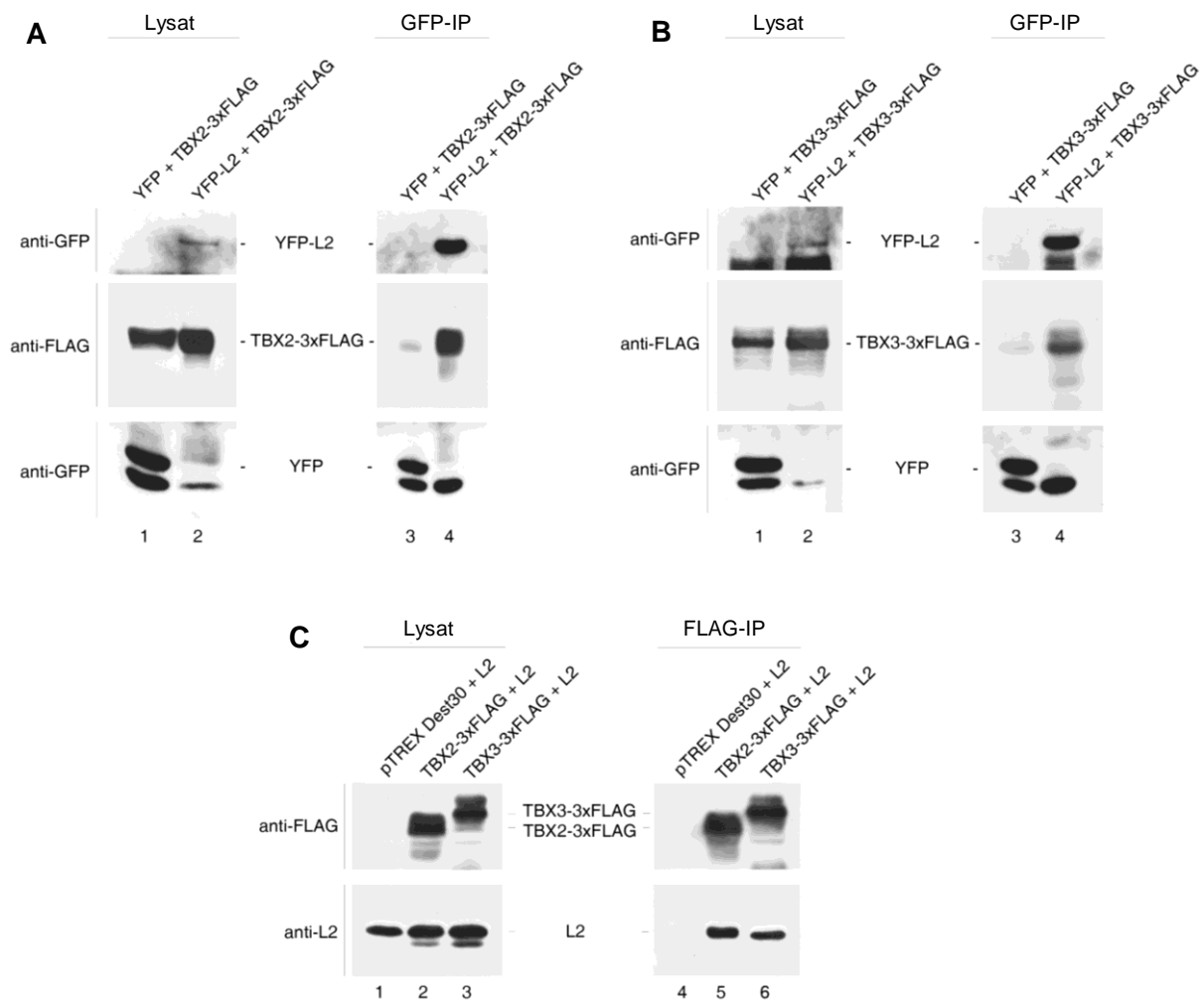


Abbildung 4-24: L2 interagiert mit TBX2 und TBX3.

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert und die Proteine für 30 h exprimiert. Die Expression der Proteine wurde im Immunoblot kontrolliert (A/B/C, linker Blot). Aus dem Zelllysat wurden YFP bzw. YFP-L2 immobilisiert und die Präzipitate durch einen FLAG- oder GFP-spezifischen Immunoblot analysiert (A/B, rechte Blots). Zusätzlich wurden aus Lysaten FLAG-markiertes TBX2 bzw. TBX3 mit einem monoklonalen Maus anti-FLAG-Antikörper gefällt und die Präzipitate mit einem FLAG- oder L2-spezifischen Immunoblot untersucht (C, rechte Blots). Für die Detektion der YFP-Konstrukte wurde ein monoklonaler Maus anti-GFP-Antikörper verwendet, für den Nachweis der FLAG-Konstrukte ein monoklonaler Maus anti-FLAG-Antikörper. L2 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper nachgewiesen.

4.4.3 Die Expression von TBX2 und TBX3 führt zu einer Relokalisation von L2

Nachdem die Interaktion von L2 und TBX2 bzw. TBX3 *in vitro* bestätigt werden konnte, sollten Immunfluoreszenzstudien nähere Informationen über die zelluläre Lokalisation von TBX2 bzw. TBX3 liefern. Endogenes TBX2 bzw. TBX3 konnten in HeLa- oder HaCaT-Zellen sowie humanen primären Keratinozyten (NHEK) weder im Immunoblot, noch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (für HeLa siehe auch (Carreira *et al.*, 1998)). Daher wurden für die Fluoreszenzstudien in HeLa-Zellen ein TBX2-FLAG bzw. TBX3-FLAG-

Fusionsprotein transient exprimiert. Wie Abb. 4-25 zeigt, wurden von beiden Proteinen unterschiedliche Verteilungsmuster festgestellt. Es war entweder eine punktuelle Verteilung im Zellkern (Zeile 1 und 3) oder eine starke Kolokalisation mit der zellulären DNA zu erkennen (Zeile 2 und 4). Ein geringer Anteil von TBX2 bzw. TBX3 lokalisierte außerhalb des Zellkerns im Zytoplasma (Zeile 1 und 3).

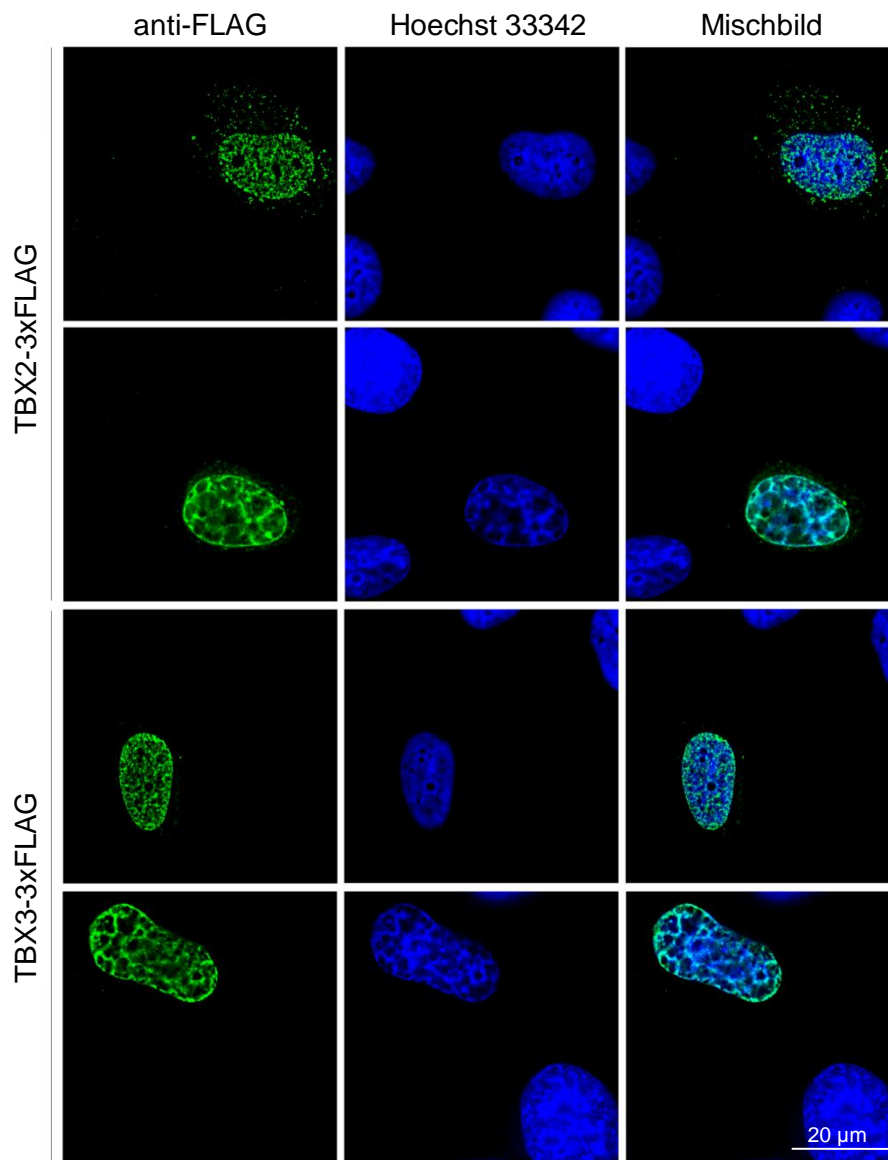


Abbildung 4-25: Die Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3 kolokalisieren mit DNA.

HeLa-Zellen wurden für 24 h transient transfiziert und TBX2-3xFLAG bzw. TBX3-3xFLAG für 24h exprimiert. Der Nachweis von TBX2 und TBX3 erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Antikörper. Die DNA wurden mit Hoechst 33342 gefärbt.

Die Koexpression von L2 veränderte das Verteilungsmuster von TBX2 bzw. TBX3 nicht (Abb. 4-26). In vielen Zellen hingegen konnte eine Relokalisation von L2 im Nukleus beobachtet werden. L2 kolokalisierte immer dann sehr stark mit TBX2 bzw. TBX3, wenn es

sich nicht an den ND10 befand (Zeile 1 und 3) und kolokalisierte dabei mit TBX2 bzw. TBX3 und der DNA. Dies konnte ohne die Expression von TBX2 nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 4-5). Akkumulierte L2 an den ND10, so konnte keine Kolokalisation mit TBX2 bzw. TBX3 beobachtet werden (Zeile 2 und 4).

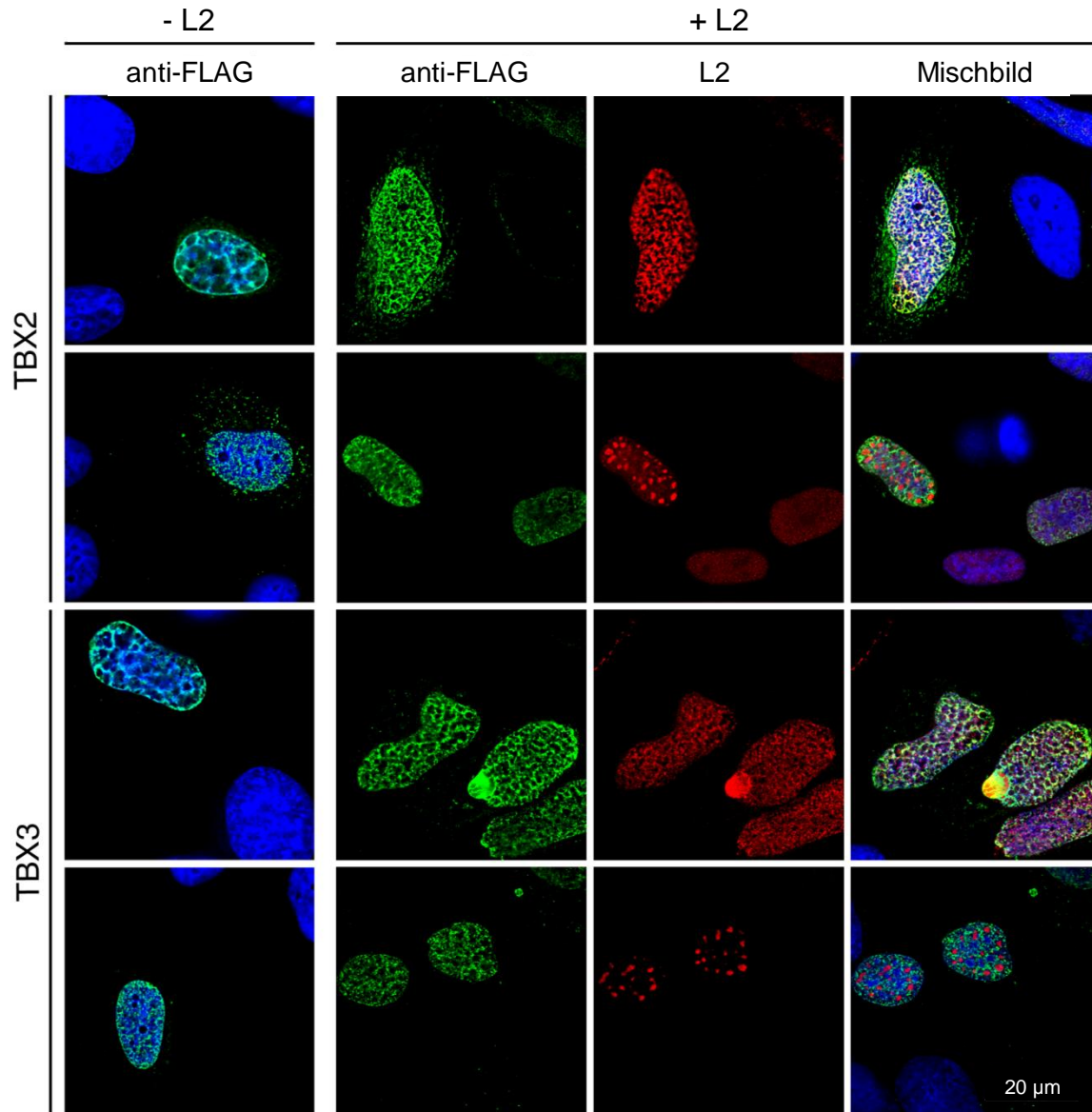


Abbildung 4-26: Die Expression von TBX2 und TBX3 kann zu einer veränderten Lokalisation von L2 im Nucleus führen.

HeLa-Zellen wurden entweder mit Expressionsvektoren für FLAG-markiertes TBX2 bzw. TBX3 transfiziert (Spalte 1) oder kotransfiziert mit einem Expressionsvektor für L2 (Spalten 2-4). Die Proteine wurden für 24 h exprimiert und die Zellen mit Methanol fixiert. Der Nachweis von TBX2 und TBX3 erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Antikörper, L2 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper detektiert. Die Färbung der Kerne erfolgte mit Hoechst 33342.

4.5 Die Rolle von TBX2 und TBX3 im Replikationszyklus von Humanen Papillomviren

Das Genom Humaner Papillomviren besitzt eine Kontrollregion, die den Bereich zwischen L2 und dem frühen Gen E6 ausfüllt (Chong *et al.*, 1990) und durch zelluläre, aber auch virale Proteine reguliert wird (siehe auch Abb. 1-1 und 1-2). Die Expression der frühen Gene E6 und E7 steht dabei unter der Kontrolle des Promotors p97. Die Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3 gehören zur Familie der T-box Proteine und besitzen eine für diese Familie charakteristische DNA-Bindedomäne (Agulnik *et al.*, 1995).

4.5.1 TBX2 und TBX3 regulieren die Kontrollregion des HPV-Genoms

In dieser Arbeit sollte die Funktion der Interaktion von TBX2 bzw. TBX3 und L2 näher charakterisiert werden. Da von TBX2 und TBX3 bekannt ist, dass sie an DNA binden und als Transkriptionsfaktoren fungieren können, sollte eine mögliche Beteiligung von TBX2 bzw. TBX3 an der Regulation der Kontrollregion des HPV16-Genoms untersucht werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass TBX2 und TBX3 mit L2 interagieren, weshalb auch getestet werden sollte, ob diese Interaktion die mögliche Regulation der LCR durch TBX2 bzw. TBX3 beeinflussen kann. Es wurde dabei ein Promotor-Reporter-Assay durchgeführt.

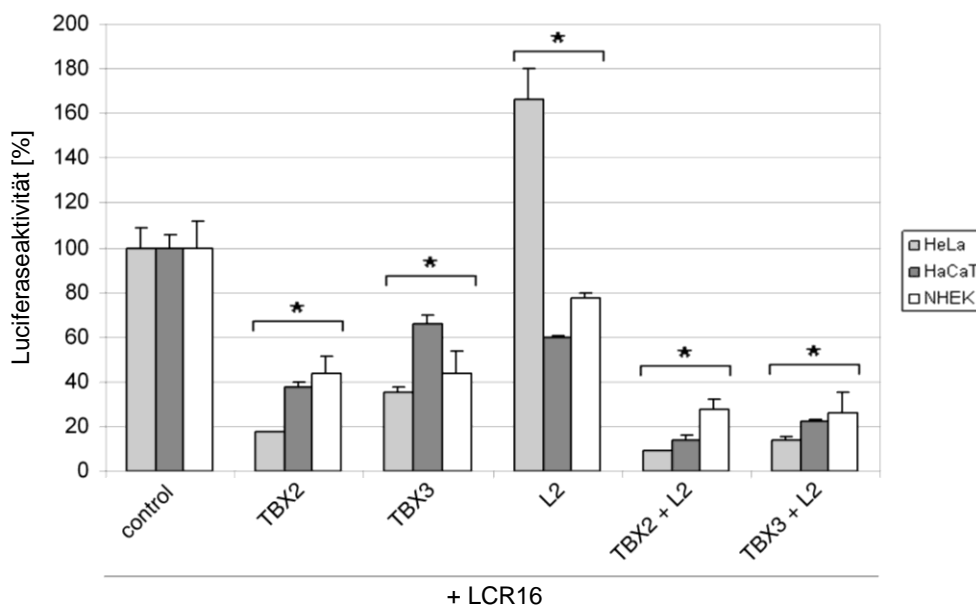


Abbildung 4-27: TBX2 und TBX3 regulieren die Kontrollregion von HPV16.

HeLa-, HaCaT und primäre humane NHEK-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert und die Proteine für 24 h exprimiert. Als Kontrolle wurde der Vektor pTREx-DEST30 verwendet. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Expression der β -Galaktosidase angepasst, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen zu berücksichtigen. Es wurden jeweils mindestens zwei Ansätze mit je drei Parallelen durchgeführt. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

Um die Aktivität bzw. Regulation der Kontrollregion von HPV16 zu untersuchen, wurde diese in einem Vektorkonstrukt vor ein Luciferase-Gen gesetzt (Baldwin *et al.*, 2004). Wenn die Expression z.B. durch Transkriptionsfaktoren inhibiert wird, so kann dies über eine geringere Umsetzung des Substrats gemessen werden. Somit steht die Aktivität der Luciferase in direktem Zusammenhang zur Expression. Wird dieses Promotorkonstrukt (im Weiteren als p97-Promotor bezeichnet) zusammen mit TBX2 und TBX3 exprimiert, so wurde die Expression und damit Aktivität der Luciferase sehr stark inhibiert (Abb. 4-27). Diese Inhibition der Expression konnte in verschiedenen Zelllinien, sowie in normalen primären Keratinozyten (NHEK) beobachtet werden. So inhibierte TBX2 bzw. TBX3 die Aktivität der Luciferase je nach Zelllinie auf 18-44 % (TBX2) bzw. 35-66% (TBX3), verglichen zur Kontrolle. Die Expression von L2 führte zu einer Aktivierung des p97-Promotors in HeLa-Zellen (166%) und einer Inhibierung des Promotors in HaCaT- und primären Zellen (60 bzw. 78%). Eine Koexpression von L2 mit TBX2 bzw. TBX3 führte allerdings in allen Zellen zu einer verstärkten Inhibition des p97-Promotors (9-28% bzw. 13-26% Luciferaseaktivität).

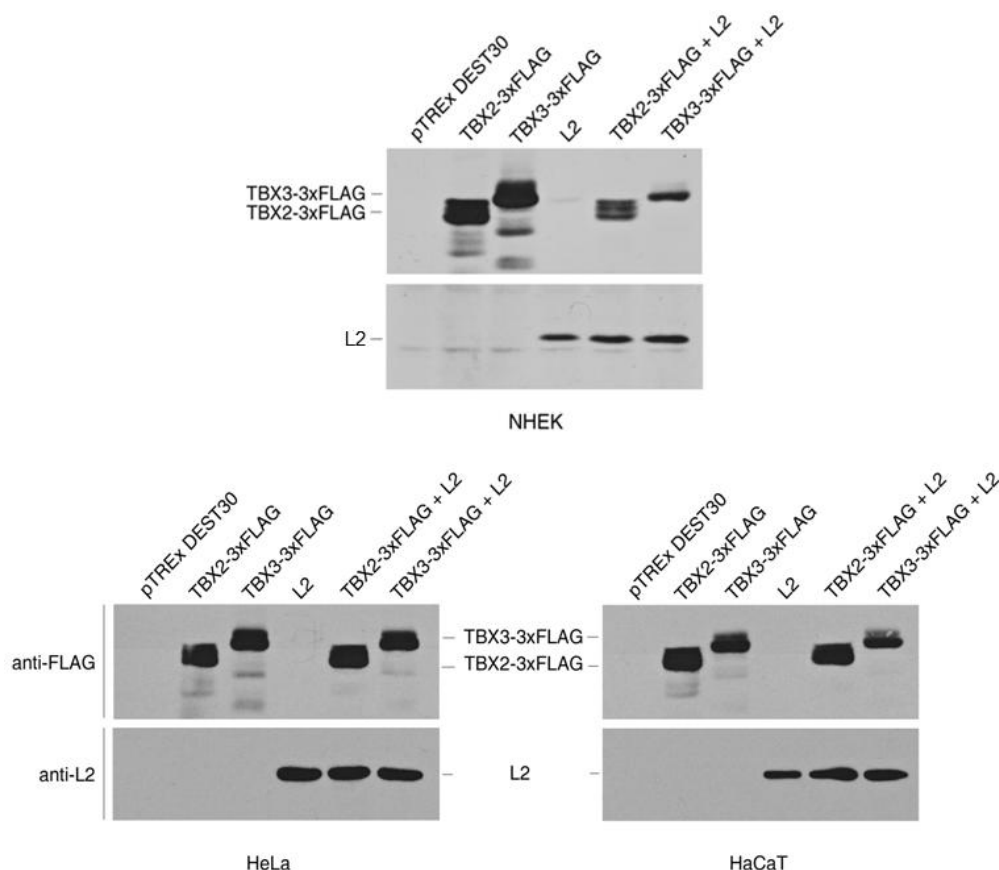


Abbildung 4-28: Expressionskontrolle zu Abb. 4-27.

HeLa- und HaCaT-Zellen sowie primäre humane Keratinozyten (NHEK) wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Expression der Proteine wurden die Zellen lysiert und ein Teil des Lysats für die Expressionskontrolle verwendet. Der Nachweis von TBX2 bzw. TBX3 erfolgte über einen monoklonalen Maus anti-FLAG-Antikörper. L2 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper detektiert.

Zusätzlich zum Promotorkonstrukt wurde ein Vektor für die transiente Expression der β -Galaktosidase (β -Gal) kotransfiziert, um der Messung eine gleichmäßige Transfektionseffizienz zu Grunde zu legen. Mit Hilfe der β -Gal-Aktivität wurden die Werte der Luciferaseaktivität normalisiert. Die Expression der jeweiligen Konstrukte wurde mittels Immunoblot kontrolliert. Abb. 4-28 zeigt, dass in allen drei Zelllinien die im Assay verwendeten Konstrukte exprimiert wurden.

4.5.2 TBX2 und TBX3 inhibieren auch die Kontrollregion anderer HPV-Typen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass TBX2 und TBX3 die Kontrollregion von HPV16 negativ regulieren können. In einem weiteren Versuchsansatz sollte geprüft werden, inwieweit die Kontrollregion anderer HPV-Typen von TBX2 und TBX3 reguliert werden können. Dafür wurde TBX2 bzw. TBX3 zusammen mit Promotorkonstrukten für HPV11 und HPV18 kotransfiziert. Abb. 4-29 zeigt, dass TBX2 und TBX3 in der Lage waren, sowohl die LCR von HPV18 als auch von HPV11 negativ zu regulieren. Die Inhibition der Luciferase-Aktivität konnte in HeLa-, HaCaT- und primären Zellen beobachtet werden, wobei die stärkste Inhibition bei allen HPV-Typen in primären Keratinozyten zu beobachten war.

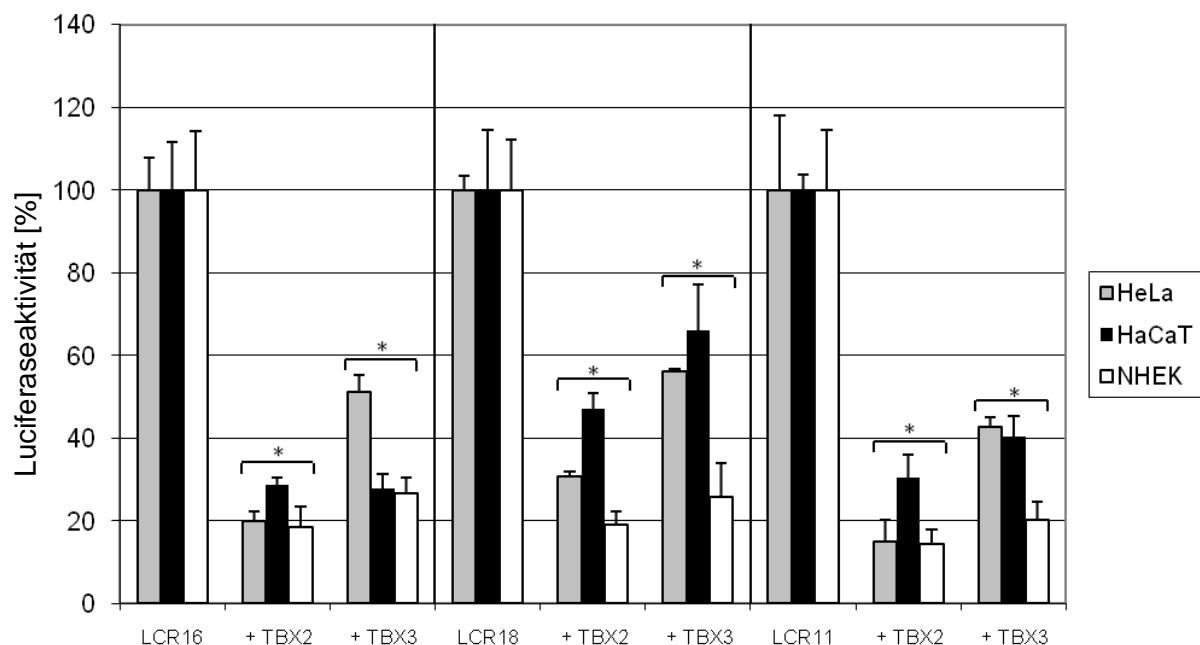


Abbildung 4-29: TBX2 und TBX3 inhibieren auch die Kontrollregion von HPV18 und HPV11.

HeLa- und HaCaT-Zellen sowie primäre Keratinozyten wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und die entsprechenden Proteine für 24 h exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Werte wurden entsprechend der Transfektionseffizienz auf die β -Galaktosidase-Werte angeglichen. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

4.5.3 L2 kolokalisiert mit endogenem TBX2 in MCF-7 Zellen und kann die LCR16 mit TBX2 und TBX3 regulieren

Wie bereits in Abschnitt 4.4.3 dargestellt, konnte in HeLa- und HaCaT-Zellen sowie primären Keratinozyten kein endogenes TBX2 bzw. TBX3 mittels Immunoblot nachgewiesen werden. Um zu untersuchen, ob L2 auch mit endogenem TBX2 kolokalisiert, wurden MCF-7-Zellen für Immunfluoreszenzstudien verwendet, da diese Brustkrebslinie TBX2 endogen exprimieren (Prince *et al.*, 2004). Endogenes TBX2 war in MCF-7-Zellen fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Abb. 4-30). L2 kolokalisierte nach transients Expression partiell mit endogenem TBX2 im Zellkern (A, letztes Bild), zeigte allerdings in MCF-7-Zellen nicht die typische Akkumulation.

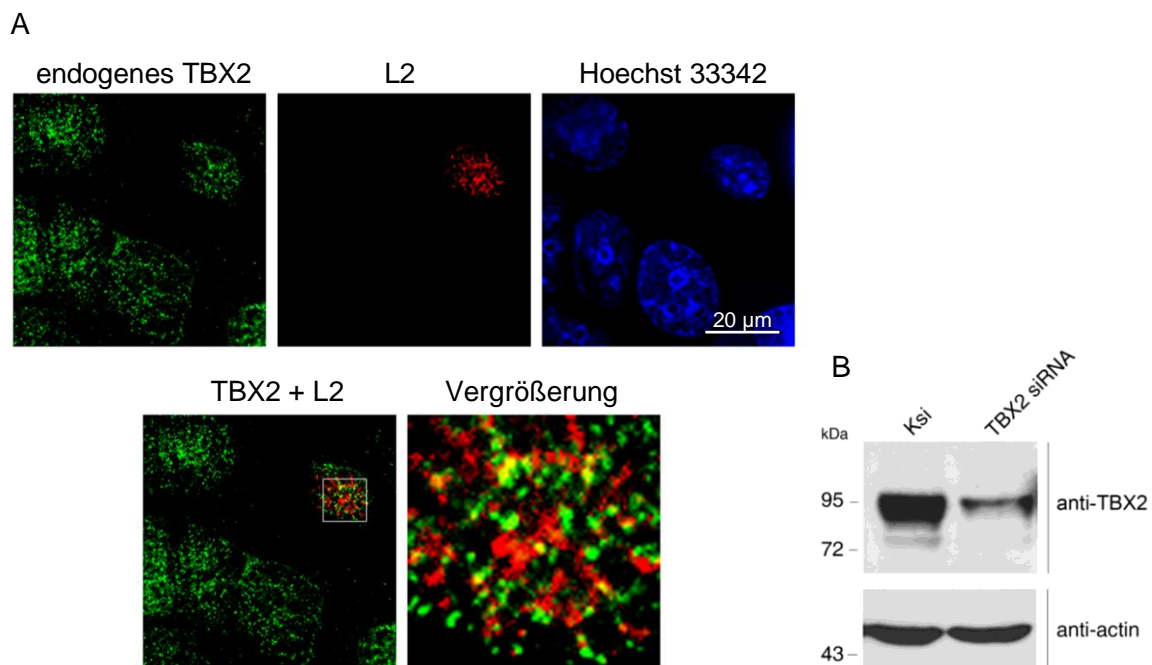


Abbildung 4-30: L2 kolokalisiert mit endogenem TBX2 in MCF-7-Zellen.

A) MCF-7-Zellen wurden transient transfiziert und L2 für 24 h exprimiert. Nach Methanol-Fixierung wurde TBX2 mit einem polyklonalen Ziege anti-TBX2-Antikörper und L2 mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper nachgewiesen. Die DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt. Der besseren Übersicht wegen ist die DNA-Färbung in der Vergrößerung nicht gezeigt. B) MCF-7-Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis von TBX2 im Immunoblot erfolgte mit einem polyklonalen Ziege anti-TBX2-Antikörper.

Die Kontrolle der Antikörperspezifität von TBX2 in MCF-7 erfolgte außerdem mittels siRNA im Immunoblot (Abb. 4-30 B). TBX3 konnte in MCF-7-Zellen weder im Immunoblot noch in der Immunfluoreszenz detektiert werden.

Der Reporter-Assay wurde ebenfalls in MCF-7-Zellen durchgeführt um zu untersuchen, ob es, wie in HeLa- und HaCaT-Zellen, zu einem additiven inhibitorischen Effekt auf die Luciferaseaktivität kommt, wenn L2 mit TBX2 bzw. TBX3 koexprimiert wird.

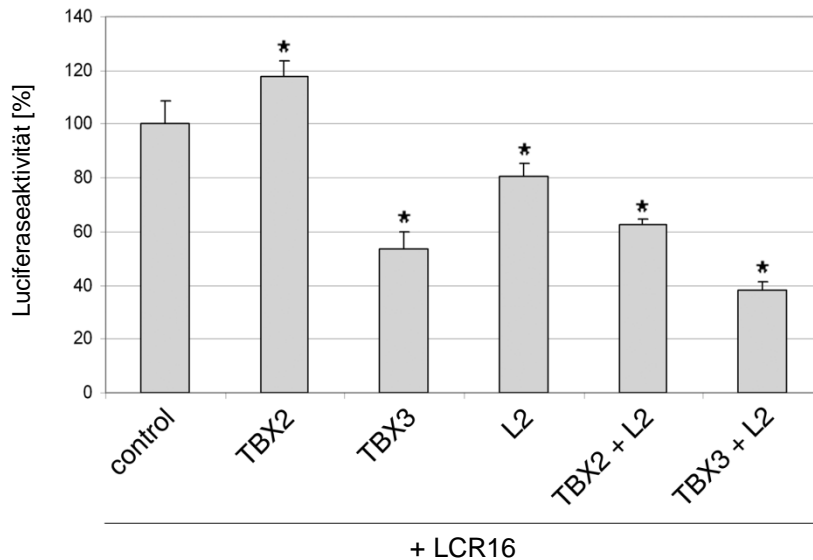


Abbildung 4-31: TBX2 und TBX3 regulieren zusammen mit L2 die LCR in MCF-7-Zellen.

MCF-7 Zellen wurden transient transfiziert und die angegebenen Proteine für 24h exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Werte wurden auf die Transfektionseffizienz (β -Gal) angeglichen. Es wurden jeweils mindestens zwei Ansätze mit je drei Parallelen durchgeführt. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

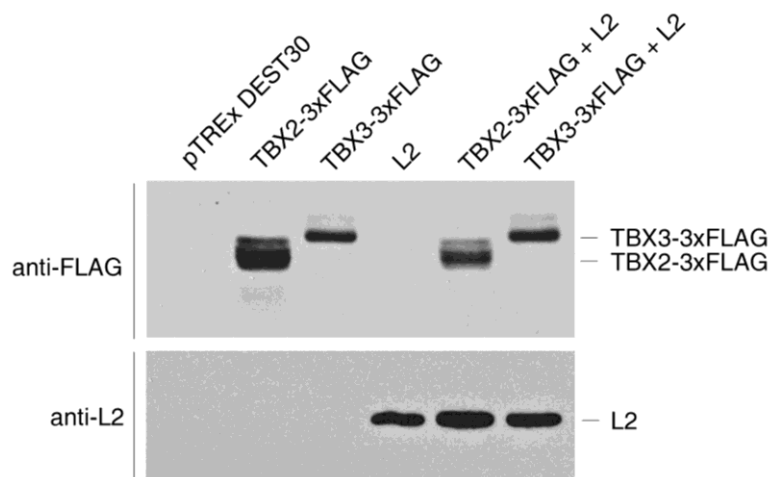


Abbildung 4-32: Expressionskontrolle zu Abb. 4-31.

Die für den LCR16-Assay in MCF-7 hergestellten Lysate wurden für den Immunoblotnachweis verwendet. TBX2 und TBX3 wurden mit einem monoklonalen Maus anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen, L2 mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper.

Der Assay zeigt, dass die Expression von TBX2 in MCF-7 zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität um 18% führte, während TBX3 die Aktivität auf 54% inhibieren konnte (Abb. 4-31). L2 allein inhibierte die LCR in geringem Maße. Wurde L2 zusammen mit TBX2 bzw. TBX3 exprimiert, konnte, wie bei HeLa und HaCaT-Zellen, eine deutlich stärkere Inhibition der Luciferase-Expression festgestellt werden (63% bzw. 38%). Die Expression der

verschiedenen Konstrukte wurde im Immunoblot überprüft. Abbildung 4-32 zeigt, dass alle Konstrukte in MCF-7-Zellen exprimiert wurden.

4.5.4 Die Inhibition der Kontrollregion durch TBX2 und TBX3 ist Dosis-abhängig

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen weisen darauf hin, dass TBX2 und TBX3 an der Regulation der Kontrollregion von HPV16 beteiligt sind. Um weitere Hinweise für die Spezifität der Beteiligung von T-box-Proteinen zu erhalten, wurde untersucht, ob es eine Dosis-abhängige Regulation des p97-Promotors gibt. Dafür wurden $1,7 \times 10^5$ HeLa- bzw. $2,2 \times 10^5$ HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Mengen von TBX2- bzw. TBX3-Plasmid-DNA sowie konstanten Mengen des LCR-Konstrukts kotransfiziert. Die Expression von TBX2 und TBX3 wurde im Immunoblot kontrolliert (Abb. 4-33 A/B, oben). Der Immunoblot zeigt, dass die Transfektion von verschiedenen Plasmid-DNA-Dosen zu einer Expression unterschiedlicher Proteinmengen führt. Für die Inhibition des p97 durch TBX2 in HeLa-Zellen waren geringeren Dosen nötig, als bei der Inhibition durch TBX3 (A/B, unten). So wurde die Aktivität der Luciferase in HeLa-Zellen durch TBX2 bereits bei 10 ng auf 40% reduziert, während TBX3 erst bei einer Dosis von 500 ng eine ähnlich starke Inhibition hervorrief (auf 28%). In HaCaT-Zellen wurden ähnliche Effekte beobachtet. Bei TBX2 war eine Dosis von 50 ng nötig, um die Luciferase-Aktivität auf 47 % zu senken, während für eine ähnlich starke Inhibition (auf 42%) 500 ng TBX3 nötig waren. Abb. 4-33 zeigt auch, dass TBX3 in geringeren Dosen sowohl in HeLa-, als auch in HaCaT-Zellen zu einer Erhöhung der Promotor-Aktivität führte.

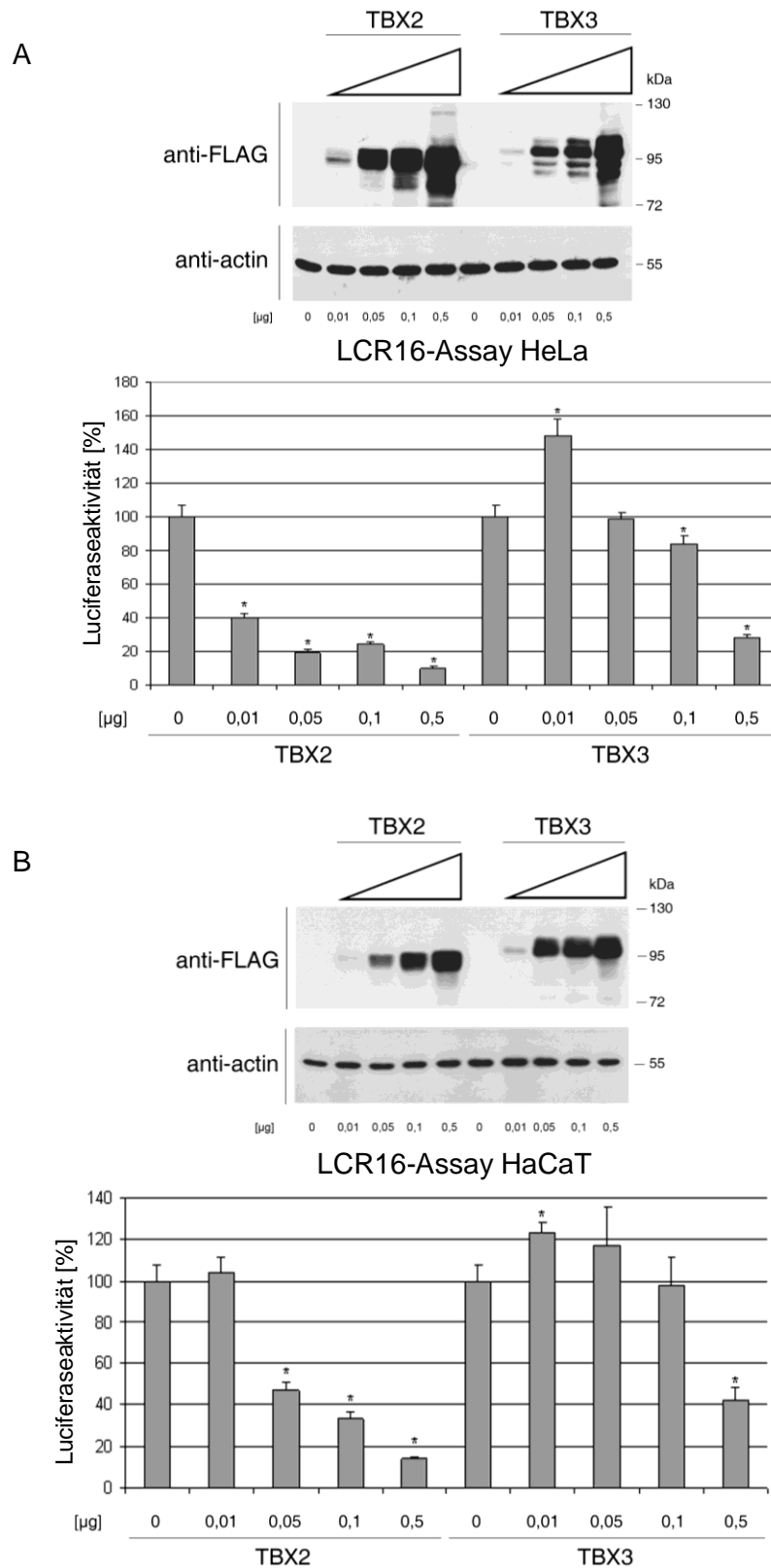


Abbildung 4-33: Die Inhibition der Kontrollregion von HPV16 durch TBX2 bzw. TBX3 ist Dosis-abhängig. HeLa- (A) und HaCaT- (B) Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten in den entsprechenden Mengen transient transfiziert und die Proteine für 24 h exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde an die der β -Galaktosidase angepasst, um die Transfektionseffizienz zu berücksichtigen. Teile der Lysate wurden mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und für den Immunoblotnachweis von TBX2 bzw. TBX3 auf ein SDS-Gel aufgetragen. TBX2 bzw. TBX3 wurden mit einem monoklonalen Maus anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

4.5.5 Untersuchungen zur Lokalisation der TBX2-Interaktionsdomäne innerhalb der Kontrollregion von HPV16

In der Literatur ist eine palindromische Erkennungssequenz (T) für die Bindung von TBX2 an DNA beschrieben (Sinha *et al.*, 2000). Es konnte dabei auch gezeigt werden, dass die halbe palindromische Sequenz (T/2) sowie ähnliche DNA-Motive in der Lage waren, TBX2 zu binden. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Pflugfelder wurde das HPV16-Genom nach möglichen Bindestellen durchsucht. Dafür wurden 40 validierte DNA-Bindemotive (Pflugfelder, persönliche Mitteilung) mit Hilfe des Programms „*Target Explorer*“ (Sosinsky *et al.*, 2003) verwendet. Zwei mögliche TBX2-Erkennungssequenzen wurden in der LCR gefunden (Abb. 4-34). Eine befindet sich nahe des 5'-Endes (TBE19, Basen 7332-7342), die zweite nahe des 3'-Endes (TBE20, Basen 7845-7853). Daneben gibt es eine weitere Sequenz, die im mittleren Bereich der LCR liegt und Ähnlichkeit zu einem möglichen Bindemotiv aufweist (7549-7556).

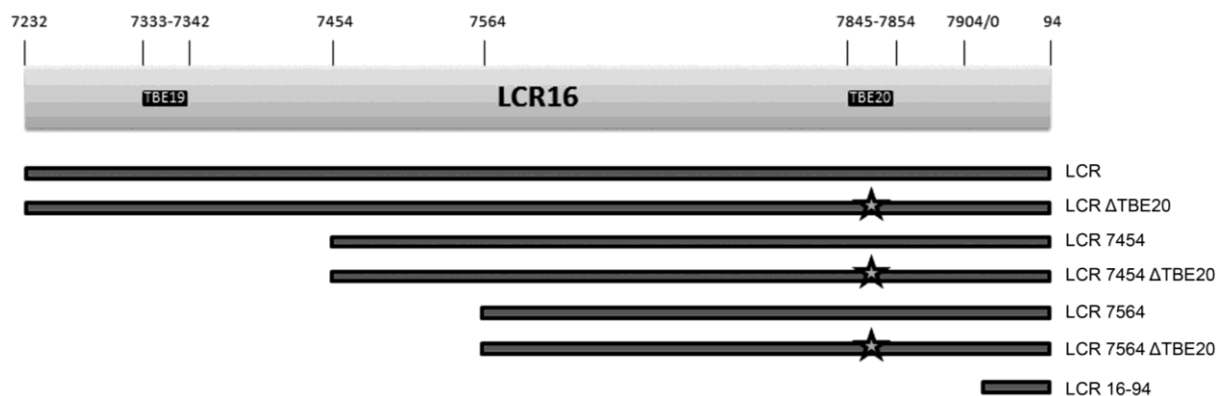


Abbildung 4-34: Kontrollregion von HPV16 und für Abb. 4-34 und 4-35 verwendete Deletionskonstrukte.

Mit Hilfe des „*Target Explorers*“ (Sosinsky *et al.*, 2003) konnten zwei mögliche TBX2-Interaktionsdomänen innerhalb der LCR von HPV16 detektiert werden (Δ TBE19 und Δ TBE20). Für die genauere Kartierung wurden verschiedene LCR-Deletionen und -Mutationen erzeugt, die eine oder beide TBEs nicht mehr enthielten. Zusätzliche Deletionen bzw. Mutationen wurden erzeugt, um den Bereich 7549-7556 zu deletieren, indem sich einen TBE-ähnliche Sequenz befindet. Das LCR-Deletionskonstrukt 16-94 wurde aufgrund seiner geringen Aktivität nur in HEK 293TT-Zellen exprimiert. TBE = TBX2-Binding-Element

Es wurden daher Deletions-Mutanten hergestellt, die diese Motive nicht mehr enthielten bzw. mit Hilfe einer Mutagenese-PCR mögliche Bindemotive mutiert. Die Promotor-Aktivität dieser Konstrukte wurde nach Transfektion in HeLa-Zellen im etablierten Luciferase-Test analysiert (Abb. 4-35). Die Promotoraktivität nahm dabei mit zunehmender Verkürzung der LCR ab. Nach der Deletion von etwa der Hälfte der Sequenz (LCR 7564) konnte nur noch eine Aktivität von 10% gegenüber der Vollängen-LCR festgestellt werden. Die Deletions-

Mutanten wurden anschließend mit TBX2 kotransfiziert, um zu untersuchen, ob TBX2 die LCR-Aktivität weiterhin regulieren kann.

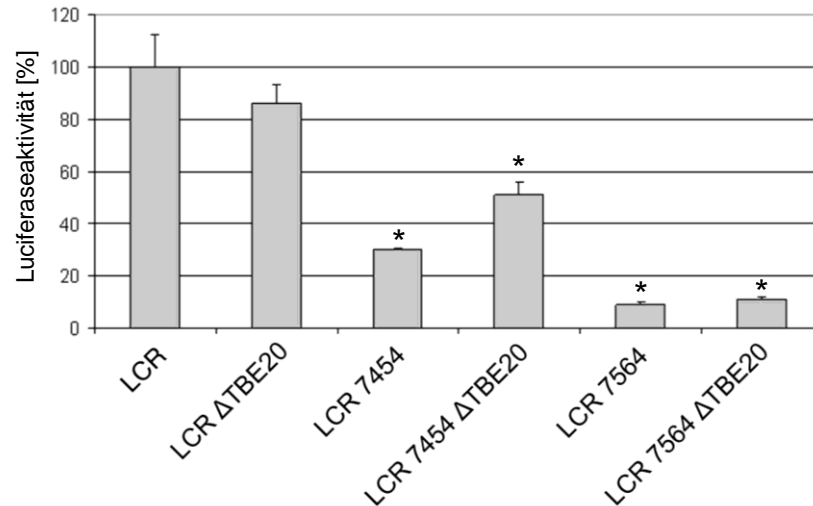


Abbildung 4-35: Die Promotoraktivität der HPV16-Kontrollregion (LCR) nimmt mit Verkürzung der Sequenz deutlich ab.

HeLa- Zellen wurden für 24 h mit den in Abb. 4-34 angegebenen Konstrukten transient transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Zusätzlich wurde die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen und die Luciferase-Werte auf diese normiert. TBE = TBX2-Binding-Element *P<0,05 (t-test, gepaart, zweiseitig)

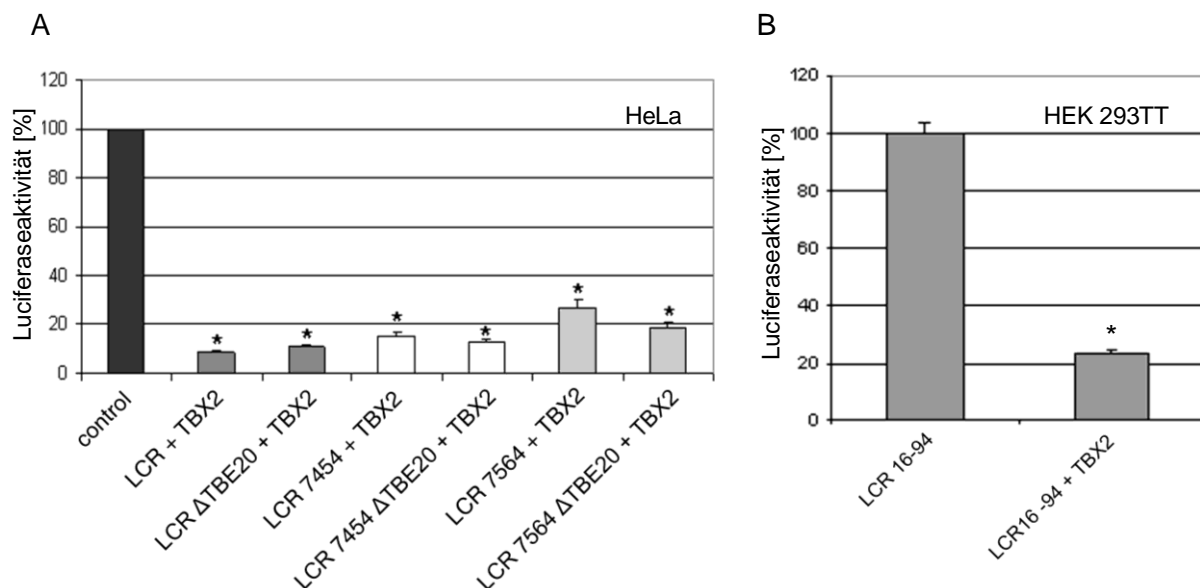


Abbildung 4-36: Einfluss von TBX2 auf die Aktivität unterschiedlicher LCR-Deletionsmutanten.

HeLa- und HEK 293TT-Zellen wurden für 24 h mit den in Abb. 4-34 angegebenen LCR-Konstrukten transient transfiziert. Als Kontrolle wurden die jeweiligen LCR-Konstrukte ohne TBX2 exprimiert und zur Vereinfachung als 100% dargestellt. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase-, sowie die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Expression der β -Galaktosidase normiert. TBE = TBX2-Binding-Element *P<0,05 (t-test, gepaart, zweiseitig)

Abb. 4-36 A zeigt, dass die Luciferase-Aktivität bei allen LCR-Deletionsmutanten durch TBX2 weiterhin sehr stark inhibiert werden konnte. Die Deletionsmutante LCR 16-94 (Abb. 4-36 B) wurde dabei nicht in HeLa-, sondern in HEK 293TT-Zellen untersucht, weil die Expression des Reporters in HeLa-Zellen zu gering war. Auch hier konnte eine Inhibition der Luciferase-Aktivität durch TBX2 beobachtet werden.

4.5.6 Eine murine DNA-bindedefiziente Tbx2-Mutante ist nicht mehr in der Lage, die Kontrollregion von HPV16 zu regulieren

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation von zwei Aminosäuren (R122/123E) in der DNA-Bindedomäne des murinen Tbx2 dazu führt, dass diese Mutante nicht mehr an DNA binden kann (Lingbeek *et al.*, 2002). Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die Mutante auf die Regulation der Kontrollregion von HPV16 hat. Als Kontrolle diente hierbei der murine Wildtyp von Tbx2. Abb. 4-37 A zeigt, dass murines Tbx2 die Kontrollregion von HPV16 in ähnlich starkem Maße inhibieren konnte wie TBX2 (43% gegenüber 29%). Die DNA-bindedefiziente Mutante allerdings hatte keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität. Die Expression der Konstrukte wurde im Immunoblot kontrolliert (Abb. 4-37 B).

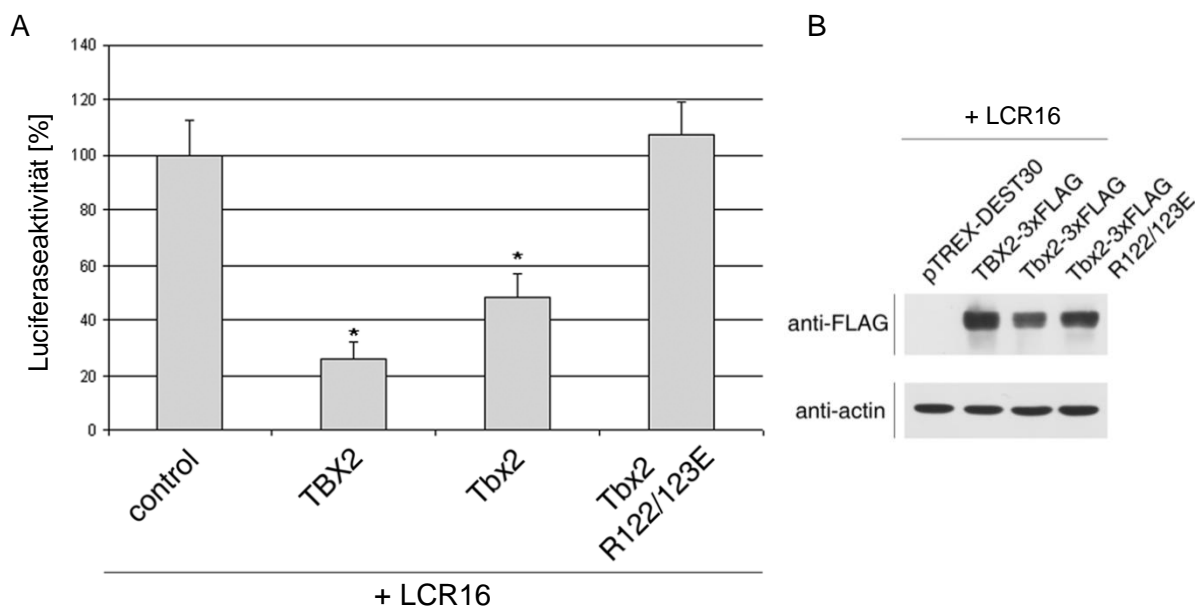


Abbildung 4-37: Die murine DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die HPV16 LCR (Teil 1).

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert und die angegebenen Konstrukte für 24 h exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt (A). Die Luciferase-Werte wurden auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert, um die Transfektionseffizienz zu berücksichtigen. Teile der Lysate wurden für den Nachweis der Expression der Konstrukte im Immunoblot verwendet. Für den Nachweis der Konstrukte wurde ein monoklonaler Maus anti-FLAG-Antikörper verwendet. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

Wurde zu den verschiedenen Konstrukten L2 koexprimiert (Abb. 4-38), so zeigte sich, dass sowohl im Fall des humanen TBX2 (23%) als auch bei Koexpression mit dem murinen Tbx2 (33%) die Inhibition der Luciferase-Aktivität noch verstärkt werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die Koexpression von L2 und der Mutante R122/123E eine Erhöhung der Luciferaseaktivität. Diese Erhöhung war vergleichbar mit dem Anstieg der Luciferaseaktivität, die bei alleiniger Expression von L2 in HeLa-Zellen beobachtet wurde.

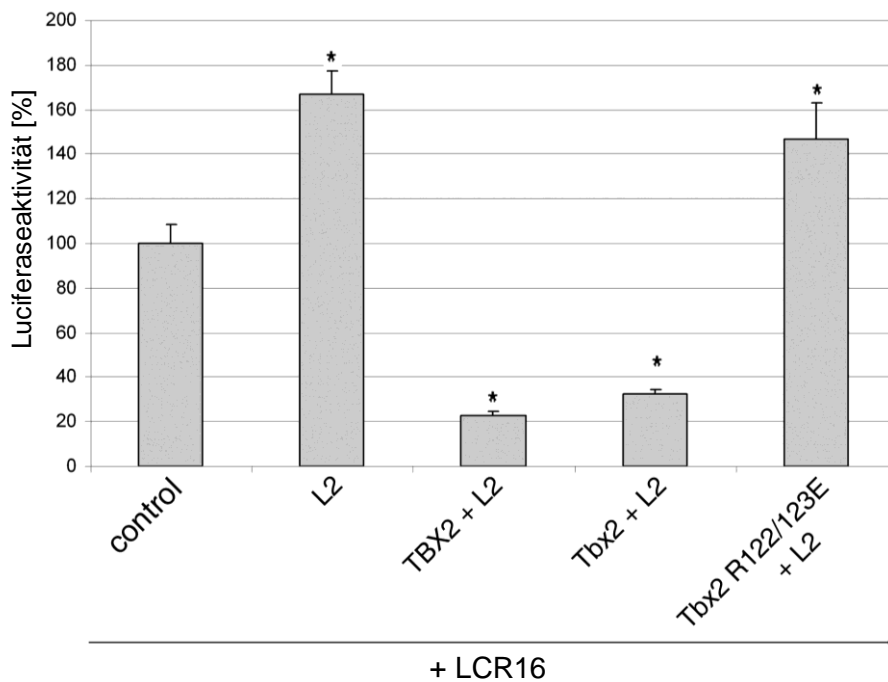


Abbildung 4-38: Die murine DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E hat keinen inhibitorischen Einfluss auf die HPV16 LCR (Teil 2).

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert und die angegebenen Konstrukte für 24 h exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und die Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität bestimmt. Die Luciferase-Werte wurden auf die β -Galaktosidase-Aktivität normiert, um die Transfektionseffizienz zu berücksichtigen. * $P < 0,05$ (t-test, gepaart, zweiseitig)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die murine Mutante Tbx2 R122/123E die Kontrollregion nicht inhibierte und auch kein additiver inhibitorischer Effekt bei Koexpression mit L2 beobachtet wurde, sollte mit einer Koimmunpräzipitation überprüft werden, ob die murine Mutante noch an L2 binden kann (Abb. 4-39). Dafür wurde Tbx2 R122/123E mit YFP-L2 kotransfiziert bzw. mit YFP als Kontrolle in HeLa-Zellen kotransfiziert. Die Expression von YFP-L2 war im Gegensatz zu YFP deutlich schwächer (Abb. 4-39 A, Spur 1 und 2). Zudem gab es auch hier (vgl. Abb. 4-27) eine zusätzliche Bande im unteren Bereich aller Spuren, die wahrscheinlich auf eine unvollständige Synthese oder einen Abbau der YFP-Konstrukte zurückgeht (A/B). Die Analyse der Präzipitate hingegen zeigte, dass in etwa vergleichbare

Mengen von YFP-L2, bzw. YFP gefällt wurden (B, Spur 1 und 2). Die murine DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E konnte hierbei jedoch nur bei Koexpression von YFP-L2 spezifisch kogefällt werden (B, Spur 2). Die Fällung von YFP führte zu keiner Kopräzipitation von Tbx2 R122/123E (B, Spur 1).

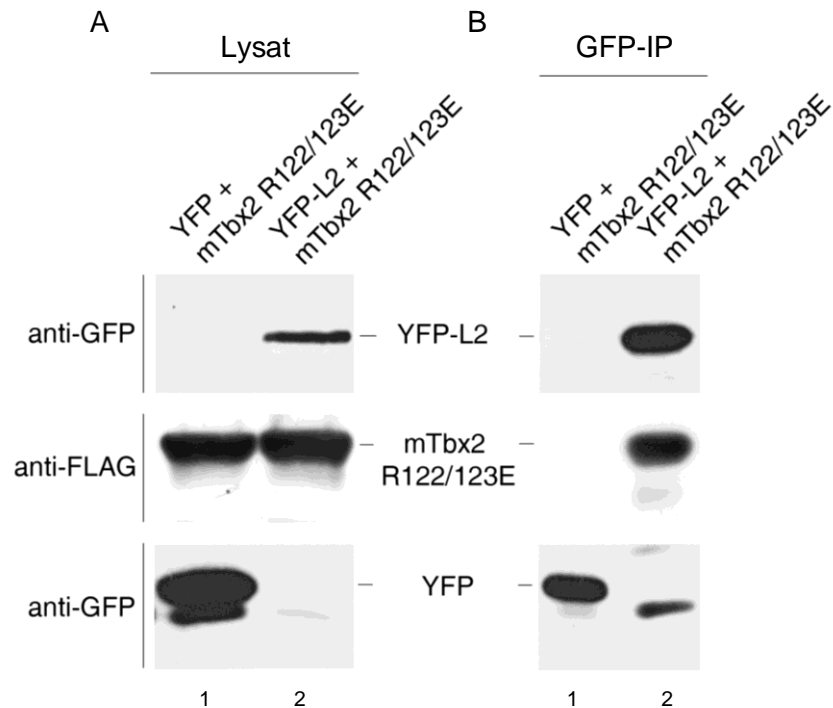


Abbildung 4-39: Die DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E interagiert mit L2.

HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für Tbx2 R122/123E und YFP-L2 bzw. YFP. 24 h nach Expression der Proteine wurden die Zellen lysiert und Teile des Lysats als Input verwendet (A) Die Lysate wurden weiterhin verwendet, um YFP bzw. YFP-L2 mit einem GFP-spezifisch Antikörper zu immobilisieren (B). Die Proteine wurden gewaschen, von der Matrix eluiert und die Kopräzipitation von Tbx2 R122/123E mit einem monoklonalen Maus anti-FLAG-Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. YFP bzw. YFP-L2 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-GFP-Antikörper detektiert.

4.5.7 Die Expression von L2 führt zu einer Relokalisation von Tbx2 R122/123E, nicht aber von Tbx2

Da im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, dass L2 auch an die murine DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E binden konnte, sollte das Verteilungsmuster der Mutante nach Koexpression von L2 mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien analysiert werden. Um zu vergleichen, ob das murine Tbx2 eine ähnliche zelluläre Verteilung wie humanes TBX2 aufweist, wurde in diesem Ansatz auch der murine Tbx2 Wildtyp mit L2 koexprimiert (Abb. 4-40). Murines Tbx2 kolokalisierte wie humanes TBX2 nach Überexpression in HeLa-Zellen mit der DNA im Zellkern (obere Reihe). Die DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E

kolokalisierte nicht mehr mit der DNA und akkumulierte im Zellkern teilweise (Abb. 4-40, untere Reihe) oder vollständig (Abb. 4-41) an DNA-freien Bereichen im Kern. Um den Bereich, indem Tbx2 R122/123E akkumulierte, näher zu bestimmen wurde eine Kofärbung mit dem PML-Protein durchgeführt (Abb. 4-41). Dabei konnte eine partielle Kolokalisation einiger Tbx2 R122/123E-Aggregate mit dem PML-Protein beobachtet werden (letztes Bild).

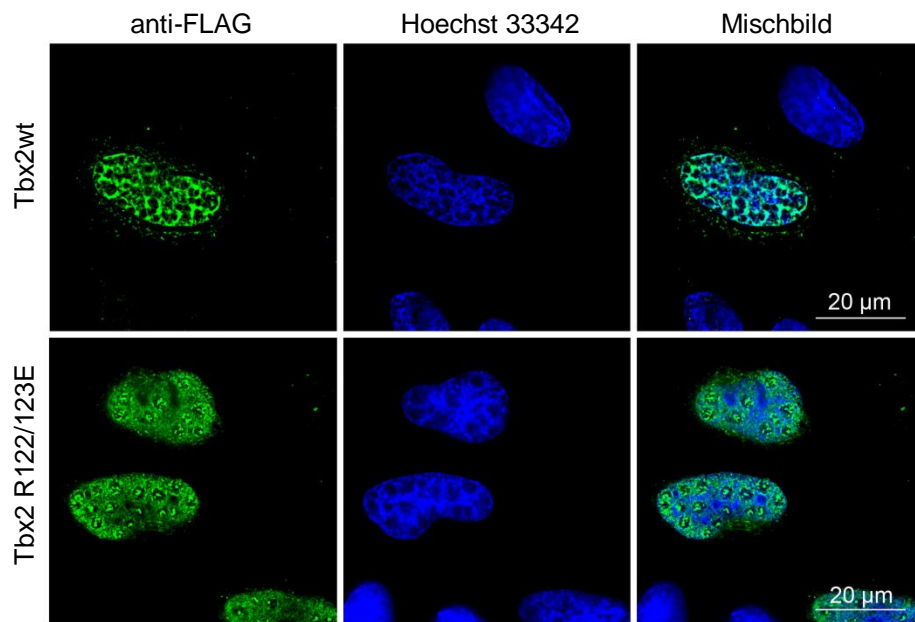


Abbildung 4-40: Die murine Mutante Tbx2 R122/123E kolokalisiert im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr mit DNA.

HeLa-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für FLAG-markiertes Tbx2 und Tbx2 R122/123E transfiziert. Die Proteine wurden 24 h exprimiert und die Zellen anschließend mit Methanol fixiert. Die Tbx2-Konstrukte wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Antikörper detektiert, die DNA wurde mit Hoechst 33342 gefärbt.

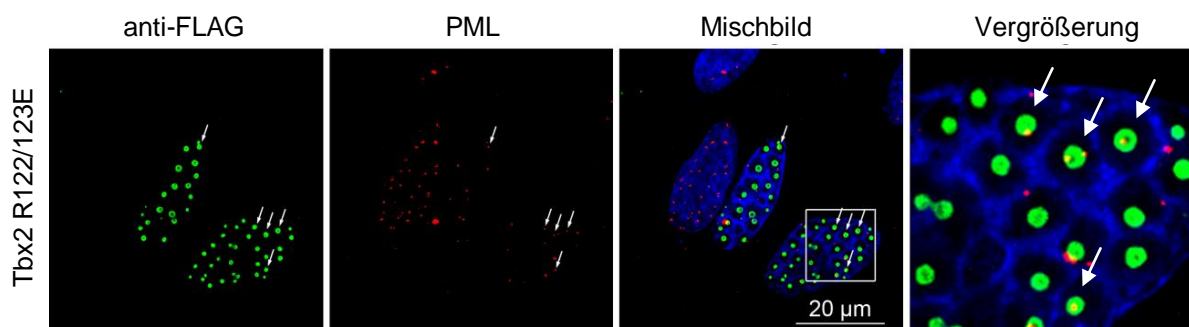


Abbildung 4-41: Die murine Mutante Tbx2 R122/123E kolokalisiert partiell mit PML-Proteinen.

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert und FLAG-markiertes Tbx2 R122/123E für 24 h exprimiert. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und Tbx2 mit einem polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Antikörper, PML mit einem monoklonalen Maus anti-PML-Antikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Vergrößerung stellt den mit einem Quadrat markierten Bereich des Mischbilds dar. Die Kolokalisation ist durch Pfeile hervorgehoben.

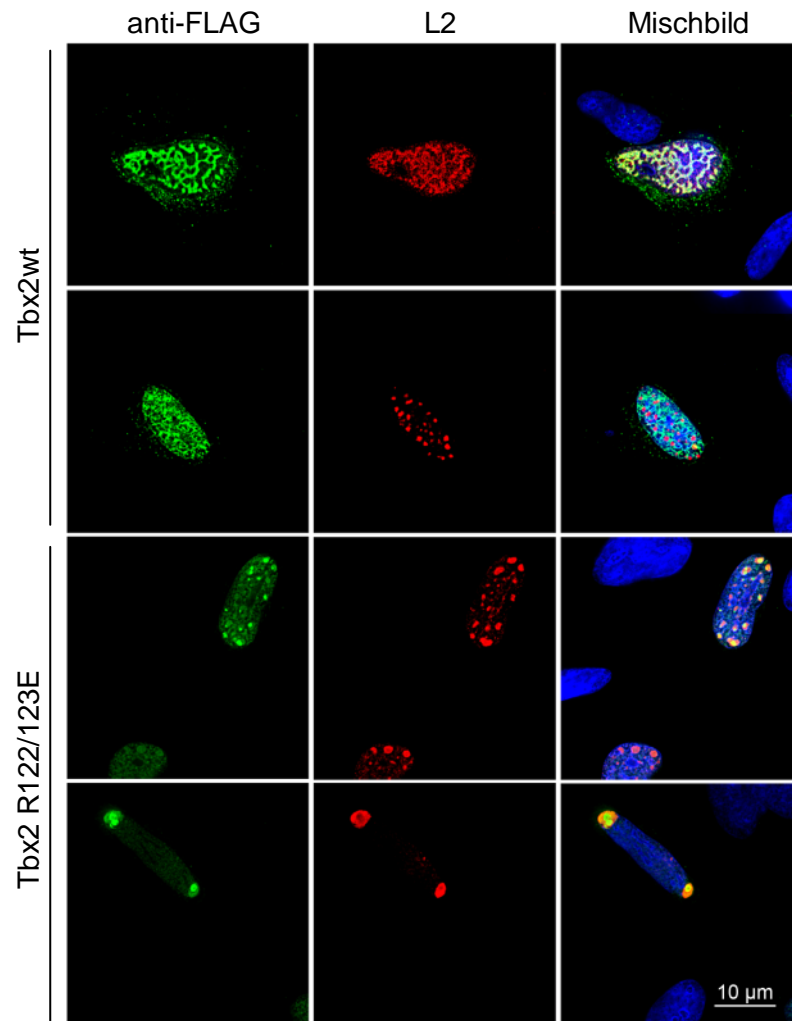


Abbildung 4-42: Die murine Mutante Tbx2 R122/123E kolokalisiert mit L2.

FLAG-markiertes Tbx2 bzw. Tbx2 R122/123E wurden alleine oder zusammen mit L2 in HeLa-Zellen transient exprimiert und die Zellen nach 24 h mit Methanol fixiert. Tbx2 bzw. die DNA-bindedefiziente Mutante Tbx2 R122/123E wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen, L2 mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper. Die Kerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt.

Die Verteilung von Tbx2 mit L2 lässt sich mit der des humanen TBX2 vergleichen (Abb. 4-41). Die Expression des murinen Wildtyps führte zu einer partiellen Relokalisation von L2 im Zellkern (vgl. Abb. 4-26). L2 kolokalisierte dabei mit Tbx2 und der DNA, wenn es nicht an den ND10 vorlag (Abb. 4-41, Zeile 1). Wenn L2 seine typische Akkumulation an den ND10 zeigte, konnte hingegen keine Kolokalisation mit Tbx2 beobachtet werden (Zeile 2). Im Gegensatz dazu kolokalisierte die murine Mutante Tbx2 R122/123E nahezu vollständig mit L2 (Zeile 3), wahrscheinlich an den ND10. Außerdem konnte in einigen Zellkernen beobachtet werden, dass sich L2 und Tbx2 R122/123E an den Polen des Zellkerns anhäuften (letzte Zeile).

4.5.8 TBX2 und TBX3 binden an die Kontrollregion von HPV18

Bisher konnte gezeigt werden, dass TBX2 und TBX3 die Promotorregionen verschiedener HPV-Typen negativ regulieren können. Mit Hilfe verschiedener LCR-Deletionen konnte die mögliche Bindestelle von TBX2 in der LCR auf die 3'-Region eingegrenzt werden. Im Folgenden wurde deshalb mit einer Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) untersucht, ob TBX2 und TBX3 tatsächlich an die Kontrollregion binden. Für dieses Experiment wurden HeLa-Zellen verwendet, bei denen Teile des HPV18-Genoms stabil integriert vorliegen, wozu auch die LCR gehört (Rosl *et al.*, 1989). Nach der Expression von TBX2 bzw. TBX3 wurde das Chromatin der Zellen isoliert und mit einer Nuklease verdaut, um anschließend TBX2 oder TBX3 durch Immunpräzipitation spezifisch zu fällen. Wenn TBX2 bzw. TBX3 die LCR von HPV18 gebunden haben, kann diese anschließend durch PCR nachgewiesen werden. Abb. 4-43 A zeigt, dass die Nuklease, die nach der Chromatinisolierung verwendet wurde, die DNA in 150-900 bp-Fragmente geschnitten hat. Die verwendete Mikrokoccus Nuklease spaltet spezifisch zwischen Histonclustern, um die das Chromatin in einem Abstand von etwa 150 bp gewickelt ist. Das so geschnittene Chromatin wurde für die ChIP eingesetzt. Ein Ansatz wurde dazu verwendet, die IP von TBX2 bzw. TBX3 mittels Immunoblot zu überprüfen (Abb. 4-43 B).

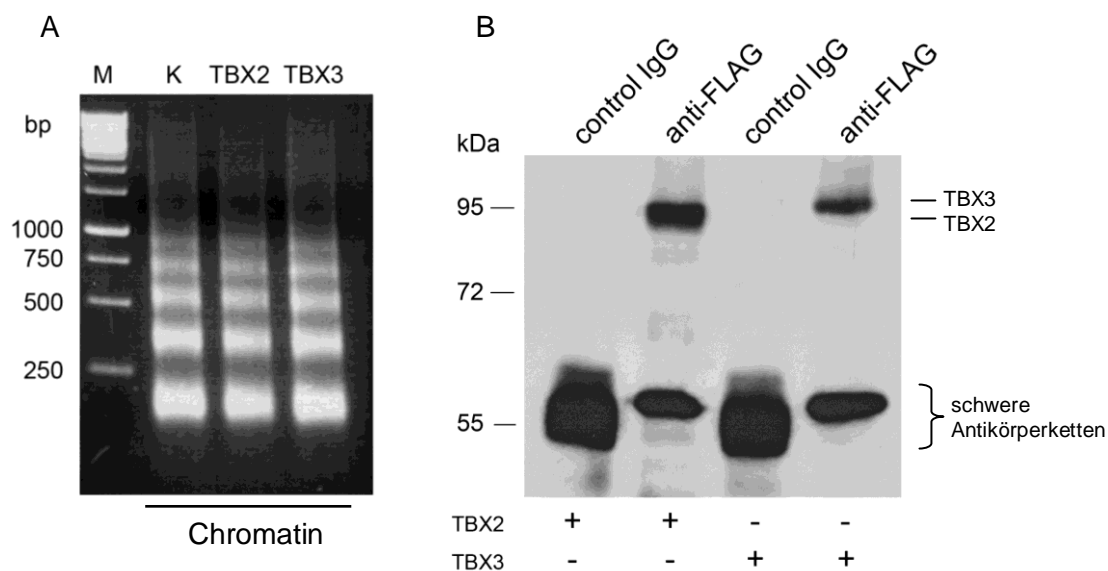


Abbildung 4-43: TBX2 und TBX3 werden bei der Chromatin-IP spezifisch präzipitiert.

HeLa-Zellen wurden transient transfiziert und TBX2 bzw. TBX3 für 48 h exprimiert. Die Proteine wurden an das Chromatin fixiert, das Chromatin isoliert und mit einer Nuklease geschnitten (A). Die an das Chromatin gebundenen Proteine wurden mit einem FLAG-spezifischen Antikörper gefällt und Teile der IP für einen Immunoblotnachweis von TBX2 bzw. TBX3 verwendet. TBX2 und TBX3 wurden mit einem monoklonalen Maus anti-FLAG-Antikörper detektiert (B).

TBX2 bzw. TBX3 konnten dabei spezifisch mit einem FLAG-Antikörper gefällt werden (B, Spur 2 und 4), nicht aber nach Inkubation mit einem Kontroll-IgG-Antikörper (B, Spur 1 und 3). Auf dem Immunoblot waren außerdem, bei etwa 55kDa, die schweren Ketten der Antikörper zu erkennen, die für die Immunpräzipitation von TBX2 bzw. TBX3 verwendet wurden.

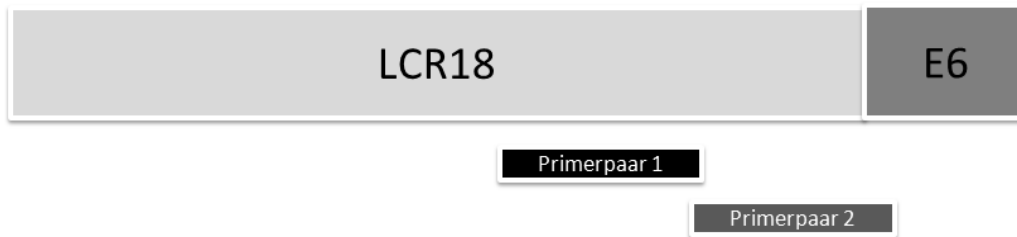


Abbildung 4-44: Verwendete Primerpaare für den Nachweis der LCR18 nach der Chromatin-IP

Für den Nachweis der Kontrollregion von HPV18 nach der ChIP mit TBX2 bzw. TBX3 wurden Primerpaare gewählt, die sich im hinteren Teil der Kontrollregion befinden.

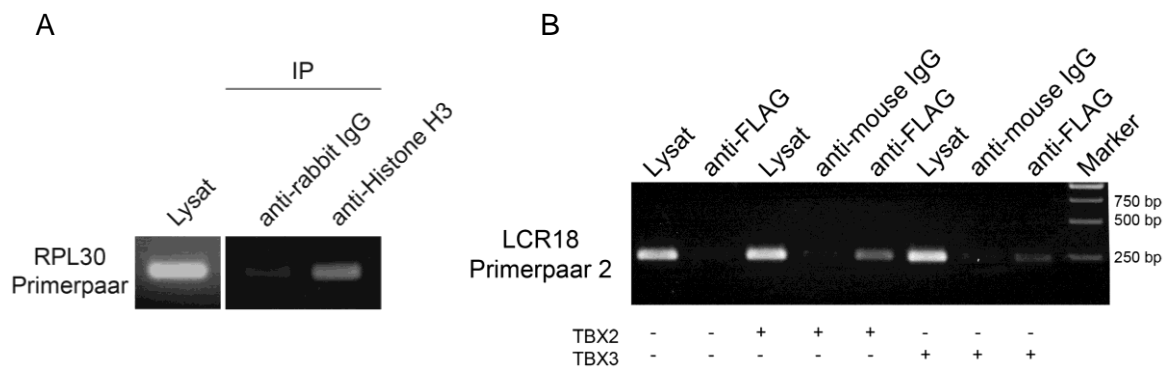


Abbildung 4-45: TBX2 bzw. TBX3 binden an die Kontrollregion von HPV18 (Teil 1).

In HeLa-Zellen wurden eine Kontrolle, FLAG-markiertes TBX2 oder TBX3 für 48 h transient exprimiert und die Proteine mit Formaldehyd an das Chromatin fixiert. Die Zellen wurden lysiert, das Chromatin isoliert, geschnitten und aufgereinigt. Teile des Chromatins wurden als Kontrolle für die Amplifikation der Positivkontrolle (A) und der LCR18 verwendet. Ein weiterer Teil des Chromatins wurde über Nacht mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper immobilisiert und die Ansätze gewaschen. Nach einem Proteinase K-Verdau wurde die Positivkontrolle (A, RPL30) bzw. die Kontrollregion von HPV18 (B, LCR18) mit den entsprechenden Primerpaaren aus den Ansätzen amplifiziert und die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen.

Nachdem die bisherigen Studien zur Lokalisation der Bindestelle von TBX2 darauf hindeuten, dass diese im hinteren Bereich des Promotors liegt, wurden für den Nachweis der LCR18 Primerpaare gewählt, die im hinteren Teil der Promotorsequenz binden können (Abb. 4-44). Um die Methode zu kontrollieren, wurde als Positivkontrolle das Protein Histon H3 gefällt und das Gen RPL30 mit spezifischen Primern amplifiziert (Abb. 4-45 A). Die Positivkontrolle zeigt, dass eine spezifische Bindung des Gens RPL30 an H3 nachgewiesen

werden konnte (Spur 3). Die Inkubation mit einem Kontroll-IgG führte nur zu einer sehr schwachen Amplifikation von RPL30 (Spur 2).

Abb. 4-45 B zeigt, dass der hintere Bereich der LCR18 (Primerpaar 2) nach der ChIP ebenfalls nur dann mittels PCR nachgewiesen werden konnte, wenn in den Zellen TBX2 oder TBX3 exprimiert wurde. In allen Chromatinaufreinigungen konnte die LCR18 mit dem Primerpaar 2 im Lysat nachgewiesen werden (Spur 1, 3 und 6). Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden zeigten nach Inkubation des Chromatins mit einem anti-FLAG-Antikörper ein nur sehr schwaches Amplifikat der LCR18 (Spur 2). Gleiches trifft für die Ansätze zu, in denen TBX2 bzw. TBX3 exprimiert und das Chromatin mit einem Kontroll-IgG-Antikörper gefällt wurde (Spur 4 und 7). Die Inkubation mit einem FLAG-Antikörper hingegen führte zu einer Amplifikation des hinteren Bereichs der LCR18, wobei das Amplifikat nach Expression von TBX2 (Spur 5) stärker war, als nach der Expression von TBX3 (Spur 8). Die Amplifikation der LCR18 mit dem Primerpaar 1 zeigte ähnliche Ergebnisse (Abb. 4-46), wobei die Amplifikate der LCR18 grundsätzlich um ein vielfaches schwächer waren, als die mit dem Primerpaar 2. Auch dieses LCR-Fragment konnte aus dem Lysat sehr gut amplifiziert werden (Spur 1-3). Eine Amplifikation der LCR18 konnte nur nach der Präzipitation von TBX2 bzw. TBX3 mit einem anti-FLAG-Antikörper beobachtet werden. (Spur 6 und 8). Die Präzipitation mit einem Kontroll-Antikörper zeigte keine Amplifikate (Spur 5 und 7).

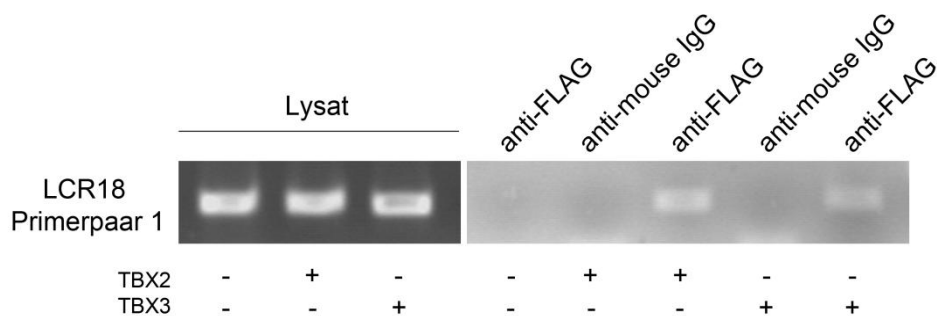


Abbildung 4-46: TBX2 bzw. TBX3 binden an die Kontrollregion von HPV18 (2).

In HeLa-Zellen wurden eine Kontrolle, TBX2 oder TBX3 für 48 h transient exprimiert und die Proteine mit Formaldehyd an das Chromatin fixiert. Die Zellen wurden lysiert und das Chromatin isoliert und aufgereinigt. Das aufgereinigte Chromatin wurde über Nacht mit den angegebenen Antikörpern inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper immobilisiert und die Ansätze gewaschen. Nach der Elution und einem Proteinase K-Verdau wurde die Kontrollregion von HPV18 mit dem entsprechenden Primer (LCR18 Primerpaar 1) amplifiziert und die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.5.9 HPV16L2 kolokalisiert auch *in vivo* mit TBX2

Unter Kapitel 4.4.2 konnte die Interaktion von L2 und TBX2 *in vitro* mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen gezeigt werden. Um die Rolle der Interaktion und Inhibition der Kontrollregion des HPV-Genoms durch TBX2 bzw. TBX3 im Kontext einer HPV-Infektion (*in vivo*) genauer zu verstehen, wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz untersucht, ob TBX2 in HPV16-positiven Cervix-Schnitten nachgewiesen und eine Kolokalisation mit HPV L2 beobachtet werden konnte. Dafür wurden in Paraffin-gebettete Zervix-Schnitte verwendet, die durch eine Multiplex-PCR im Rahmen von epidemiologischen Studien des Instituts für Pathologie auf 14 verschiedene Hochrisikotypen getestet wurden. Dabei wurden aber universelle Primer für nah verwandte HPV-Gruppen verwendet, so dass diese nicht eindeutig auf HPV16 typisiert wurden. Daher sollten in einem ersten Schritt 17 Gewebeschnitte mit spezifischen Primern für HPV16E1 eindeutig typisiert werden. Die Schnitte stammten zudem aus Patientinnen, die sich alle im CIN I-II-Stadium einer HPV-Infektion befanden. In diesen frühen Stadien der zervikalen Gewebsneubildung sollten sich L1 und L2 in den oberen Zellschichten mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien nachweisen lassen (vgl. Abb. 1-5). Für die Typisierung wurde die DNA aus den Paraffinschnitten isoliert und anschließend eine PCR auf das E1-Gen von HPV16 durchgeführt. Wie in Abb. 4-47 zu sehen ist, konnte in vier der 17 getesteten Patientinnen (Probe 1, 5, 13 und 17) das HPV16 E1-Gen amplifiziert werden. Die Probe Nummer 5 zeigte das stärkste Signal, weshalb Gewebeschnitte aus dieser Probe für Kolokalisationsstudien ausgewählt wurden.

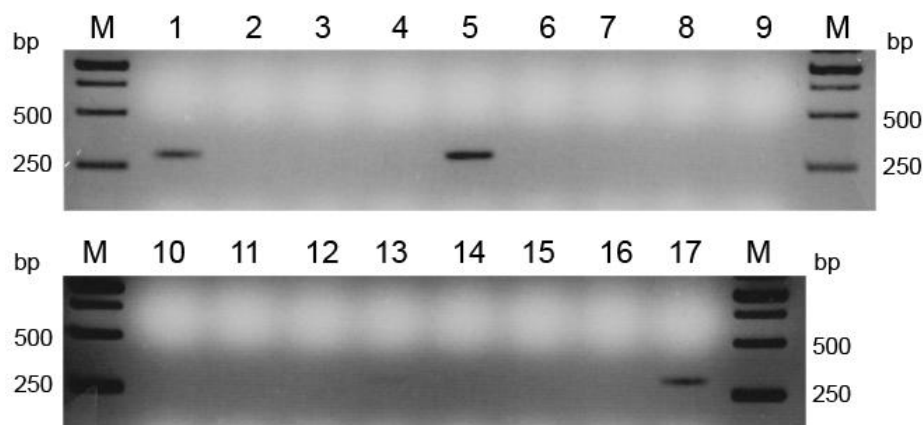


Abbildung 4-47: Nachweis von HPV16-E1 in Zervix-Gewebeschnitten.

Eingebettetes Cervix-Gewebematerial von 17 unterschiedlichen Patientinnen wurde aus Paraffin-Blöcken abgehobelt und einem Proteinase K-Verdau unterzogen. Anschließend wurde die DNA isoliert und eine PCR gegen das frühe Gen E1 von HPV16 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt. M: Marker, bp: Basenpaare

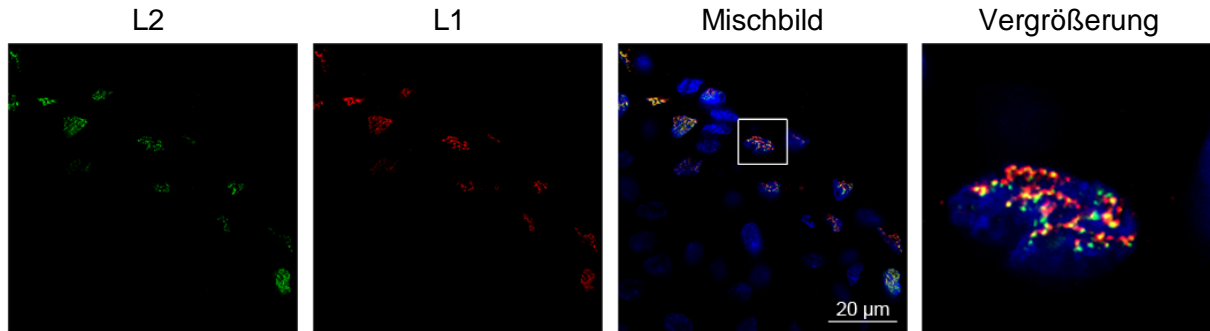


Abbildung 4-48: HPV16L1 und L2 werden im HPV16-typisierten Cervix-Gewebe exprimiert.

Der in Paraffin eingebettete Schnitt wurde mit Xylol entparaffiniert und rehydriert. L2 wurde mit einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper, L1 mit einem polyklonalen Kaninchen anti-L1-Antikörper (K75) detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Vergrößerung stellt den umrahmten Bereich des Mischbilds dar.

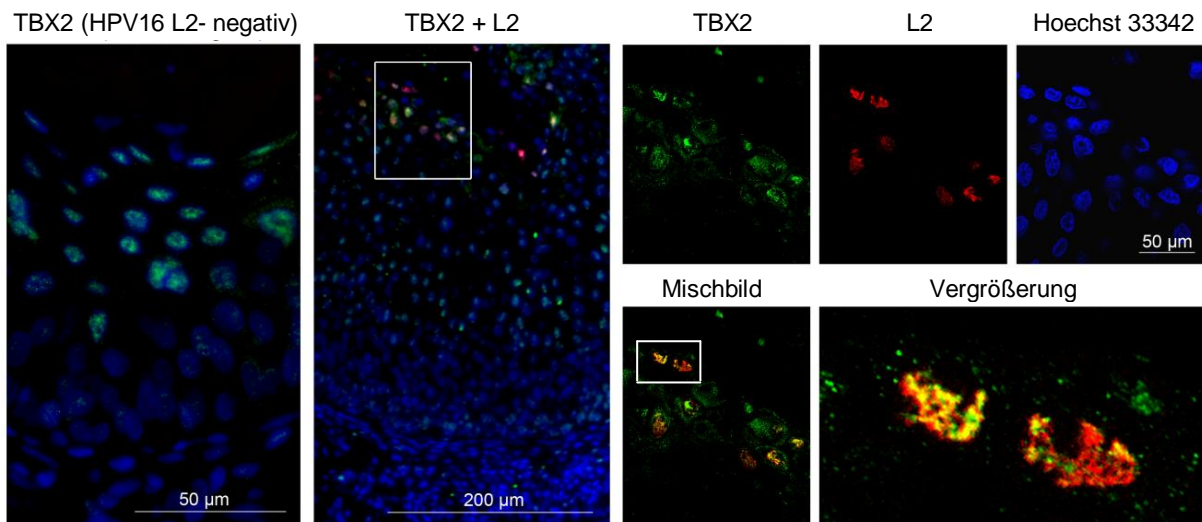


Abbildung 4-49: L2 kolokalisiert mit TBX2 in den oberen Schichten der HPV16-positiven Patientenprobe.

In Paraffin-gebettetes Cervixgewebe wurde entparaffiniert und rehydriert. TBX2 und L2 wurden mit einem polyklonalen Kaninchen anti-TBX2-Antikörper bzw. einem monoklonalen Maus anti-33L2-1-Antikörper kogefärbt. Die DNA wurde mit Hoechst 33342 nachgewiesen. Im untersuchten Schnitt wurden Bereiche ohne L2- (Übersichtsbild 1) und mit L2-Expression detektiert (Übersichtsbild 2). Die Bilder in der rechten oberen Reihe zeigen die Ausschnittsvergrößerung des Übersichtsbildes 2. Die Vergrößerung (Bild rechts unten) stellt den umrahmten Bereich des Mischbilds dar. Die Kolokalisation von TBX2 und L2 wurde im Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen.

Wie Abbildung 4-48 zeigt, waren sowohl L1-, als auch L2-Proteine in den oberen Schichten des Epithelgewebes exprimiert und kolokalisierten im Zellkern.

In einem nächsten Schritt wurde dann die Expression und Lokalisation von TBX2 in Zusammenhang mit der Expression von L2 untersucht. In einem HPV16 L2-negativen Bereich des Gewebes wurde TBX2, ähnlich wie L2, hauptsächlich in den oberen Schichten des Epithelgewebes exprimiert (Abb. 4-49, Bild links). TBX2 war dabei, wie auch in MCF-7- und nach Überexpression in HeLa-Zellen, hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Eine

detailliertere Untersuchung der nukleären Lokalisation zeigte eine deutliche Kolo­kalisierung von L2 und TBX2 in den oberen Epithelschichten des infizierten Gewebes (Abb. 1-49, Ausschnittsvergrößerung).

5 Diskussion

Das minore Kapsidprotein L2 von HPV16 übt eine Vielzahl essentieller Funktionen im viralen Infektionszyklus aus. Es ist sowohl an frühen Schritten der Virus-Invasion als auch an späten Mechanismen der Morphogenese funktionell beteiligt. Bereits nach der Bindung der Viren an HSPGs der Zelloberfläche von basalen Epithelzellen wird nach einer Konformationsänderung des Kapsids der N-Terminus des L2-Proteins für die Protease Furin zugänglich und gespalten (Richards *et al.*, 2006). Diese Spaltung ist essentiell für die Infektion der Viren. Möglicherweise wird dadurch eine weitere Konformationsänderung innerhalb der Kapsidstruktur hervorgerufen, welche eine Übertragung der Viren von ihrem Primärrezeptor HSPG auf einen spezifischen (bisher unbekannt) Sekundärrezeptor bewirkt (Sapp *et al.*, 2009). Nach der Aufnahme der Viren in Endosomen findet eine Ansäuerung dieser statt, die für die erfolgreiche Infektion benötigt wird. Wahrscheinlich kommt es dadurch zu einem Auseinanderbrechen der Kapside (Selinka *et al.*, 2002). L2 ist nun essentiell für den Durchtritt des Genoms durch die endosomale Membran. Es liegen Hinweise vor, dass dieser Membrandurchtritt von L2 selbst vermittelt wird, da sein C-Terminus Membran-penetrierende Eigenschaften besitzt (Kamper *et al.*, 2006). L2 und das virale Genom verbleiben in einem Komplex und L2 bewirkt durch die Bindung an den Dyneinmotorkomplex den Mikrotubuli-vermittelten Transport der viralen DNA zum Zellkern (Florin *et al.*, 2006). Im Kern der basalen Epithelzellen bewirkt L2 schließlich die Lokalisation des viralen Genoms an den Nukleären Domänen 10 (ND10) (Day *et al.*, 2004), wo wahrscheinlich die initiale Transkription und Replikation des viralen Genoms stattfindet. Im weiteren Infektionszyklus kommt es zu einem differenzierten Expressionsmuster der viralen Gene (Doorbar, 2006). In den oberen Schichten des Epithels werden vor allem die Kapsidproteine L1 und L2 exprimiert. Zusammen mit Hsc70 reichert sich L2 an den ND10 an (Florin *et al.*, 2004) und führt zu einer Reorganisation dieser Kernstrukturen (Florin *et al.*, 2002b). Weiterhin bewirkt es eine Rekrutierung von L1 an die ND10 (Florin *et al.*, 2002a), so dass neue Viren im Zellkern entstehen können.

Die vielfältigen Funktionen von L2 sind nur durch die Beteiligung zellulärer Kofaktoren möglich, von denen aber bisher nur wenige bekannt sind. In einer früheren Arbeit wurde ein Hefe-2-Hybrid-Screening beschrieben, durch das acht zelluläre Proteine als mögliche Interaktionspartner von HPV16 L2 identifiziert werden konnten (Gornemann *et al.*, 2002). Dabei wurde die Interaktion von L2 mit fünf Wirtzellproteinen (PATZ, PLINP, PMSP, TIN-AgRP und mit einem Protein einer unbekannt) cDNA (cDNA #79)) durch GST-Bindungsassays bestätigt. In weiteren Arbeiten konnte die Interaktion von L2 mit dem Dyneinkomplex (Florin *et al.*, 2006), dem Chaperon HSC70 (Florin *et al.*, 2004), den

Nukleären Domänen 10 (Day *et al.*, 2004) sowie dem Transkriptionsfaktor Daxx (Florin *et al.*, 2002b) gezeigt werden. In dieser Arbeit sollten mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems neue zelluläre Interaktionspartner von L2 identifiziert und die Funktion dieser bei der HPV-Infektion im Säugerzellsystem näher charakterisiert werden.

5.1 Identifizierung zellulärer Interaktionspartner von HPV16 L2 mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Systems

Das Hefe-2-Hybrid-System ist ein etabliertes System, um neue Interaktionspartner eines Proteins zu identifizieren (Fields *et al.*, 1989). In dieser Arbeit wurde HPV16 L2 als Köder an eine DNA-Bindedomäne fusioniert, als Beute diente eine cDNA-Plasmidbank, die an eine DNA-Aktivierungsdomäne fusioniert war. Kommen Beute und Köder in der Hefe in räumlicher Nähe zusammen, werden zwei Reportergene aktiviert. In einem ersten Schritt wurde in diesem System untersucht, ob L2 allein eine mögliche Aktivierung des Reportersystems auslösen kann. Dabei wurde beobachtet, dass der Wildtyp beide Reportergene anschalten kann. Unter Verwendung verschiedener Deletionsmutanten von L2 konnte der transaktivierende Bereich auf die Aminosäuren 1-280 eingegrenzt werden. Offensichtlich besitzt L2 innerhalb dieser Sequenz transkriptionsregulierende Domänen. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass die Bindung von L2 an das E2-Protein zu einer Regulation der transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von E2 führt (Okoye *et al.*, 2005). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass L2 bei der Infektion, nach dem Transport der viralen DNA in den Zellkern, direkt oder über die Bindung an Transkriptionsfaktoren dazu in der Lage ist, die Transkription des viralen Genoms zu aktivieren. Es ist weiterhin vorstellbar, dass L2 durch die Reorganisation zellulärer Proteine im Kern ein geeignetes Milieu für die initiale Transkription des viralen Genoms schafft. So konnte in früheren Studien die Reorganisation von Transkriptionsfaktoren wie Daxx und Sp100 gezeigt werden (Florin *et al.*, 2002b). Die Deletionsmutante L2 150-473 aktivierte das Reportersystem in geringem Maße, während bei der Mutante L2 280-473 keine Aktivierung des Reportersystems beobachtet wurde. Die Synthese von Histidin in der Hefe kann mit Hilfe von 3-AT unterdrückt werden (Kanazawa *et al.*, 1988), welches das Enzym IGP-Dehydratase hemmt. Die Mutante L2 150-473 wurde daher unter der Verwendung von 3-AT neben L2 280-473 als Köder für das Hefe-2-Hybrid-System verwendet. Im Screening wurden etwa $2,6 \times 10^7$ Hefeklone mit der cDNA-Bank transformiert, wobei der Großteil davon ($2,5 \times 10^7$) L2 280-473 als Köder beinhaltete. 189 positive Hefe-Klone verblieben nach zweimaliger Selektion, davon 26 mit dem Köder L2 150-473 und 163 mit L2 280-473. Diese wiesen sowohl eine Aktivierung des *Histidin*- als auch des *LacZ*-Gens auf. Wird die Anzahl der positiver Klone im Verhältnis zur

Transformationsrate betrachtet, so konnte im Falle von L2 280-473 einer von etwa $1,5 \times 10^5$ transformierten Hefeklonen das Reportersystem anschalten, bei L2 150-473 einer von etwa $2,3 \times 10^4$ Hefeklonen. Dies spricht dafür, dass das kürzere Fragment L2 280-473 möglicherweise weniger Proteine binden konnte, als das längere Fragment L2 150-473. Verglichen mit einem früheren Hefe-2-Hybridscreening mit L2wt als Köder (Gornemann *et al.*, 2002), in dem nach drei Selektionsrunden 56 positive Hefeklone übrig blieben, wurde in dieser Arbeit mit 189 positiven Klonen eine höhere Ausbeute erzielt. In dieser früheren Hefe-2-Hybrid-Analyse konnte keine Transaktivierung von L2 beobachtet werden. Möglicherweise ist die Transaktivierung des Reportersystems abhängig vom verwendeten Hefe-Stamm. Nach dem Screening mit L2 150-473 und L2 280-473 wurden die Plasmide aus den Hefen isoliert und sequenziert. Es zeigte sich, dass einige Hefeklone zwei Beute-Plasmide enthielten oder das Plasmid kein Integrat besaß. Die Sequenzierung der isolierten Plasmide ergab weiterhin, dass 42 Hefeklone eine Beute enthielten, deren cDNA sich nicht im richtigen Leseraster befand. Die cDNAs der verwendete Plasmidbank wurden mit *Xho I*-Oligo-dT-Primern generiert (Gyuris *et al.*, 1993) und mit Hilfe eines *Not I / EcoR I*-Adapters am 5'-Ende in den Zielvektor kloniert. Möglicherweise wurden einige cDNAs bei der Umschrift von mRNA in cDNA nicht vollständig synthetisiert, wodurch es zu Deletionen innerhalb der cDNA kam. Zusätzlich zeigten die Sequenzierungen, dass bei einigen Klonen der *Not I / Eco R I*-Adapter fehlte, was ebenfalls zu einem Verschieben des Leserasters führte. Daneben gab es 27 Klone, deren cDNAs 5'-UTR-Sequenzen ein Stoppcodon vor dem eigentlichen Gen enthielten und daher nicht transkribiert wurden. Auch dies ist wahrscheinlich auf die Generierung der Plasmidbank zurückzuführen. Vielleicht wurden in diesen „falsch positiven“ Klonen unspezifische Polypeptidketten generiert, die das Reportersystem aktivierten oder unspezifisch mit L2 interagierten. Des Weiteren gab es auch falsch-positive Ergebnisse durch Beute-Proteine, die in der Lage waren das Reportersystem L2-unabhängig anzuschalten. So wurde z.B. der Transkriptionsfaktor CXXC5, der als Transkriptionsaktivator beschrieben wurde (Zhang *et al.*, 2009), in zehn verschiedenen Klonen gefunden. Bedingt durch die eigenständige Aktivierung des Reportersystems von CXXC5 mit einem leeren Kontrollvektor, konnte keine Aussage getroffen werden, ob CXXC5 mit L2 interagieren kann oder nicht. Trotz der vermeintlich hohen Anzahl an „falsch positiven“ Interaktionen ist das Hefe-2-Hybridsystem ein geeignetes System, um Interaktionen zweier Proteine direkt zu detektieren. Zum einen sind Hefen einfach und robust in der Handhabung, zum anderen können sie als Eukaryoten, im Gegensatz zu *E.coli*, die exprimierten Proteine postranslational zu einem höheren Grad modifizieren (Tanner *et al.*, 1987, Russo *et al.*, 1995). Dies verbessert letztlich die Chance auf eine erfolgreiche Interaktion von exprimierten Säugerproteinen in der Hefe. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Screening verblieben sieben Interaktionspartner von L2, die auch nach der Retransformation der zuvor isolierten

cDNA-Plasmide in die Hefe positiv für beide Reportgene blieben. Für diese wurde gezeigt, dass sie an verschiedensten Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind. Dysadherin ist vor allem auf Membranen und der Zelloberfläche lokalisiert (Nam *et al.*, 2007), während DYNLT1, Cep68, Gelsolin und Obscurin-like 1 vor allem mit dem Zytoskelett assoziiert sind (Mok *et al.*, 2001, Archer *et al.*, 2005, Geisler *et al.*, 2007, Graser *et al.*, 2007). Die Proteine TBX2 und Myb P42POP sind als Transkriptionsfaktoren im Zellkern beschrieben (Lederer *et al.*, 2005, Abrahams *et al.*, 2010). Von den sieben Interaktionspartnern werden einige auch in Zusammenhang mit Gebärmutterhalskrebs gebracht. So zeigte eine Studie, dass 78% aller Patientinnen mit Zervixkarzinom eine um 2,2fach erhöhte Gelsolin-Expression im Tumorgewebe aufwiesen (Liao *et al.*, 2011). Immunhistochemische Analysen der Gebärmutter ergaben, dass Dysadherin im gesunden Gewebe fast ausschließlich in den basalen Epithelzellen der Gebärmutter exprimiert wird, in malignen Tumoren hingegen eine eher homogene Verteilung in der basalen, suprabasalen und granulären Schicht aufweist (Wu *et al.*, 2004). Auch der Transkriptionsfaktor TBX2 wird einer aktuellen Studie zufolge in Zervixkarzinomen verstärkt exprimiert (Liu *et al.*, 2010). Für den Dyneinkomplex wurde bereits 2006 gezeigt, dass er mit L2 interagiert (Florin *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurden nun zwei Schwerpunkte gesetzt. Es sollte zum einen näher untersucht werden, ob die Interaktion von HPV16 mit dem Dyneinkomplex über DYNLT1 zustande kommt und analysiert werden, für welchen Schritt im Infektionszyklus von HPV16 die Interaktion mit dem Dyneinkomplex von Bedeutung ist. Zum anderen wurde die Interaktion von L2 mit dem Transkriptionsfaktor TBX2 näher charakterisiert, da bereits frühere Studien einen Einfluss von L2 auf die Lokalisation unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren (Daxx und Sp100) nachweisen konnten (Florin *et al.*, 2002b). Vor allem sollte die Rolle von TBX2 und L2 bei der Transkriptionsregulation des viralen Genoms analysiert werden.

5.2 Die Rolle der leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 bei der HPV16-Infektion

Der intrazelluläre Transport von Proteinen benötigt verschiedene Motorproteine. Diese transportieren ihre Frachtmoleküle entlang des Zytoskeletts, welches in erster Linie aus Aktin- und Mikrotubulifilamenten besteht. Durch die Polarität der Mikrotubuli werden Proteine anterograd mit Hilfe des Kinesin-Motorproteinkomplex und retrograd durch den Dynein-/Dynactin-Motorproteinkomplex transportiert. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass L2 mit dem Dyneinkomplex kolokalisiert und interagiert (Florin *et al.*, 2006). Es wurde

postuliert, dass die Dynein/L2-Interaktion durch die leichte Kette DYNLT1 des Dyneinkomplexes vermittelt wird, da L2 ein Bindemotiv für DYNLT1 besitzt.

5.2.1 L2 bindet an die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 des Dyneinkomplexes

Da DYNLT1 im Hefe-2-Hybrid-Screening als Interaktionspartner von L2 identifiziert wurde, wurde in einem ersten Schritt die Interaktion im eukaryotischen Zellsystem näher charakterisiert. Die Bindung von L2 an DYNLT1 konnte dabei mit Koimmunpräzipitationsstudien und GST-Bindungsassays bestätigt werden. DYNLT1 bzw. DYNLT3 liegen im Dyneinkomplex als Homodimer vor (Lo *et al.*, 2007b). Daher könnte es sein, dass zwei L2-Moleküle pro Komplex gebunden werden. Da es Hinweise gibt, dass L2 wahrscheinlich eine komplexe Struktur innerhalb des viralen Kapsids ausbildet (Buck *et al.*, 2008), ist es ebenfalls denkbar, dass ein Homo-Oligomer-Komplex mit dem Dyneinmotor interagiert. Es wäre möglich, dass mehrere L2-Moleküle eine Art Käfig um die virale DNA ausbilden und nach Überwindung der endosomalen Membran mit Hilfe des Dyneinkomplexes zum Zellkern transportiert werden. Dies würde verhindern, dass die virale DNA durch zelluläre Abwehrmechanismen abgebaut werden kann, bevor sie den Zellkern erreicht. Es wurde bereits für verschiedene DNA-Viren beschrieben, dass deren Genom bei der antiviralen Verteidigung der infizierten Zellen durch den *toll-like-receptor 9* (TLR9) erkannt und anschließend abgebaut werden kann (zusammengefasst in Koyama *et al.*, 2008).

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen wurde die zelluläre Verteilung von DYNLT1 in Abhängigkeit von L2 untersucht. L2 akkumuliert nach transienter Expression typischerweise an den Nukleären Domänen 10 (ND10), an denen auch das PML-Protein lokalisiert ist (Day *et al.*, 2004). DYNLT1 war ohne eine L2-Expression gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Nach der Expression von L2 kolokalisierte DYNLT1 mit L2 zusammen im Zellkern an den ND10. Dies verdeutlicht, dass beide Proteine miteinander interagieren. Möglicherweise wird DYNLT1 im Zellkern für Dynein-unabhängige Prozesse benötigt. Eine Studie beschreibt, dass DYNLT1 Einfluss auf den Zellzyklus nehmen kann (Li *et al.*, 2011). Dabei führte die transiente Expression von phosphoryliertem DYNLT1 (DYNLT1^{T94E}) zu einem beschleunigten Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus. Daher wäre denkbar, dass DYNLT1 nach der Bindung an L2 auch regulatorische Aufgaben im Zellkern übernimmt, die z.B. über die Beschleunigung des Zellzyklus eine erhöhte Amplifikation des viralen Genoms begünstigen könnten.

Ein mögliches DYNLT1-Bindemotiv von L2 (AS 456-461), welches sich am C-Terminus des Proteins befindet, war für die Relokalisation von DYNLT1 in den Kern entbehrlich.

Offensichtlich besitzt L2 eine oder mehrere Bindedomänen für DYNLT1. Da DYNLT1 mit der L2-Deletionsmutante L2 280-473 im Hefe-2-Hybrid-Screening interagiert, weisen die Ergebnisse darauf hin, dass sich eine der möglichen Bindedomänen im mittleren oder hinteren Teil des L2-Proteins befindet (AS 280-473). Durch einen GST-Bindungsassay konnte die leichte Kette DYNLT3 als weiterer Bindepartner von L2 identifiziert werden. DYNLT1 und DYNLT3 zeigen eine Sequenzhomologie von 55% und eine sehr ähnliche Sekundärstruktur. Beide sind Mitglieder der DYNLT-Gruppe der leichten Ketten. Da der Dyneinkomplex immer nur ein Homodimer der leichten Kette DYNLT1 oder der leichten Kette DYNLT3 enthält, kann L2 theoretisch an jedes Dynein-Molekül binden. Dies bedeutet, dass der Transport von L2 entlang der Mikrotubuli durch die Tatsache, dass L2 offensichtlich beide leichte Ketten binden kann, effizient erhöht wird. Eine Interaktion mit der leichten Kette DYNLL1, die Mitglied der DYNLL-Gruppe ist sowie der mittelschweren Kette DYNC111 konnte nicht beobachtet werden. Die leichte Kette DYNLL1 weist keinerlei Sequenzhomologie zu DYNLT1 und DYNLT3 auf, zeigt aber trotzdem eine ähnliche Sekundärstruktur (Williams *et al.*, 2005), weshalb die Interaktions- und Immunfluoreszenzstudien auch mit DYNLL1 durchgeführt wurden. Die Immunfluoreszenzstudien mit transient exprimiertem L2 zeigten, dass nur DYNLT1 und DYNLT3 von L2 in den Zellkern rekrutiert werden konnten, nicht aber die leichte Kette DYNLL1 oder die mittelschwere Kette DYNC111. Dies könnte bedeuten, dass ein lineares Bindemotiv im DYNLT1- bzw. DYNLT3-Protein für die Interaktion mit L2 benötigt wird und keine Sekundärstruktur der leichten Ketten für die Bindung verantwortlich ist. Auch für DYNLT3 wurden bereits Dynein-unabhängige Funktionen beschrieben. Es wurde beobachtet, dass DYNLT3 als Transkriptionsmodulator im Zellkern fungieren kann und mit dem PML-Protein kolokalisierte (Yeh *et al.*, 2005). Daher ist es denkbar, dass DYNLT1 und DYNLT3 im Falle der HPV-Infektion im Zellkern Funktionen übernehmen könnten, die Dynein-unabhängig sind.

5.2.2 Die Rolle von DYNLT1 und DYNLT3 bei der Infektion mit HPV16

Erste Hinweise auf die funktionelle Rolle der Interaktion von L2 und DYNLT1 bzw. DYNLT3 lieferten Untersuchungen infizierter Zellen. Die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 kolokalisierten dabei auch bei der Infektion mit L2. Eine Kolokalisation im Zytosol wurde vor allem bei L2-Molekülen beobachtet, die nicht mehr mit L1 assoziiert waren. Dies deutet darauf hin, dass L2 die leichten Ketten erst bindet, nachdem das Kapsid aufgebrochen ist und L2 die Endosomen verlassen hat. Es gibt Hinweise, dass L1 im Gegensatz zu L2 in den Endosomen verbleibt und in Lysosomen abgebaut wird, da das L1-Protein spät in der Infektion mit dem lysosomalen Marker CD63 kolokalisierte (Spoden *et al.*, 2008). Die

Interaktion von L2 mit den leichten Ketten des Dyneinkomplexes vermittelt in dieser Phase des Infektionszyklus offensichtlich den gerichteten, Mikrotubuli-vermittelten Transport zum Zellkern. Für einige andere Viren wurde bereits die Beteiligung einer oder mehrerer Dynein-Komponenten während der Infektion nachgewiesen. Dies sind vor allem DNA-Viren, die ihr Genom in den Zellkern einschleusen müssen. DYNLT1 und DYNLT3 interagieren beispielsweise mit dem Kapsidprotein VP26 des Herpes-Simplex-Virus 1 und transportieren dieses während der Infektion in Richtung des Zellkerns (Douglas *et al.*, 2004). Andere Viren lassen sich nach der Aufnahme in Endosomen innerhalb dieser Vesikel durch das Zytoplasma transportieren. So werden z.B. Polioviren nach der Aufnahme über den Rezeptor CD155 in Vesikeln entlang der Mikrotubuli transportiert, indem CD155 an DYNLT1 bindet (Mueller *et al.*, 2002). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für HPV vorstellbar, denn unveröffentlichte Daten legen nahe, dass die Viren innerhalb der Endosomen auch mit dem spannungsabhängigen Ionenkanal VDAC1 interagieren könnten, der wiederum an DYNLT1 bindet (Schwarzer *et al.*, 2002). Mit Hilfe von VDAC1 als Adapter könnten folglich HPV-beladene Endosomen durch das Zytosol transportiert werden. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die Immunfluoreszenzstudien dieser Arbeit, die mit infizierten Zellen durchgeführt wurden. Diese weisen darauf hin, dass DYNLT1 und DYNLT3 nicht an der Aufnahme der Viren und der endosomalen Sortierung beteiligt sind. Denn auch nach der Depletion der leichten Ketten zeigte sich, dass die Viren innerhalb der Zelle entpackt werden und das Kapsidinnere zugänglich wird. Dadurch kann der L2/DNA-Komplex frei werden. Das Aufbrechen der Kapside wurde durch einen L1-Antikörper nachgewiesen, der ein Epitop im Kapsidinneren erkennt, welches in intakten Kapsiden nicht zugänglich ist (Spoden *et al.*, 2008). Frühere Studien wiesen nach, dass das Aufbrechen der Kapside in den späten Endosomen bzw. Lysosomen stattfindet (Kamper *et al.*, 2006). Folglich scheint der Übergang von frühen zu späten Endosomen unabhängig von den leichten Ketten des Dyneinkomplexes zu erfolgen. Weiterhin zeigten die Studien dieser Arbeit, dass auch in DYNLT1/3 depletierten Zellen eine Trennung von L1 und L2 im Zytoplasma stattfindet. Offensichtlich sind die leichten Ketten ebenfalls nicht für den Austritt des L2-Proteins aus den Endosomen notwendig. Allerdings verbleibt L2 in diesen Zellen im Zytoplasma und kann nicht zur Kernmembran bzw. in den Kern transportiert werden.

Neben der zytoplasmatischen Kolokalisation war L2 auch im Zellkern mit den leichten Ketten kolokalisiert. Nach gezielter Depletion bzw. Neutralisierung von DYNLT1 und DYNLT3 mit siRNAs bzw. Antikörpern befand sich L2 hingegen außerhalb des Zellkerns. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von L2 mit DYNLT1 bzw. DYNLT3 essentiell für den Eintritt in den Nukleus ist. Für Papillomviren wurde publiziert, dass die Zellteilung und damit das Auflösen der Kernmembran für die Infektion benötigt wird (Pyeon *et al.*, 2009). Influenzaviren hingegen transportieren ihr Genom über die Kernporen in den Zellkern und sind nicht

abhängig von der Auflösung der Kernmembran. Möglicherweise kann L2 während der Mitose, wenn die Kernmembran aufgelöst wird, mit Hilfe von DYNLT1 und DYNLT3 in den Zellkern gelangen. Ohne die Expression von L2 wurde eine gleichmäßige Verteilung der leichten Ketten im Zytosol beobachtet. Im Kern befanden sich nur sehr wenige DYNLT1- und DYNLT3-Moleküle. Wahrscheinlich sind die leichten Ketten auch am nukleären Transport zellulärer Proteine beteiligt, werden nach dem Transport in den Kern allerdings ins Zytosol zurückbefördert, um wieder in den Dyneinkomplex eingebaut zu werden. Scheinbar ist die Bindung an L2 aber so stark, dass sich DYNLT1 und DYNLT3 nicht oder nur in geringem Maße wieder von L2 ablösen können, um ins Zytosol zurückzugelangen.

Da sowohl für DYNLT1 als auch DYNLT3 Dynein-unabhängige Funktionen beschrieben wurden, muss in zukünftigen Studien untersucht werden, ob die leichten Ketten, zusätzlich zum Transport von L2 zum und in den Zellkern, noch weitere Funktionen im viralen Replikationszyklus besitzen. Möglicherweise nehmen DYNLT1 und DYNLT3 Aufgaben im Kern wahr, die für die initiale Transkription oder Replikation des viralen Genoms bei der Infektion oder für die Morphogenese benötigt werden. L2 wird im HPV-Infektionszyklus zwei Mal in den Zellkern transportiert; zu Beginn nach der Infektion und zu einem späten Stadium nach der Transkription des späten Promotors, um in neue Kapside eingebaut zu werden.

Ob der Transport von L2 bei der Morphogenese auf dem gleichen Wege über DYNLT1 und DYNLT3 geschieht, wie nach der Infektion, muss in weiteren Studien geklärt werden. Hierzu müsste die zelluläre Verteilung von transient exprimiertem L2 nach Depletion von DYNLT1 und/oder DYNLT3 untersucht werden. L2 besitzt mehrere Kernlokalisierungssequenzen (*nuclear localization signals* (NLS)), von denen gezeigt werden konnte, dass die N-terminale und die C-terminale NLS von L2 für die Bindung an nukleäre Importfaktoren benötigt werden (Darshan *et al.*, 2004). Bei der Infektion von Zellen mit Pseudoviren wird L2 allerdings durch Furin geschnitten, wobei der N-Terminus abgespalten wird (Richards *et al.*, 2006). Es ist daher denkbar, dass sich der Mechanismus des L2-Kernimports während der Invasion vom Kerntransport neu gebildeter L2-Moleküle während der Morphogenese unterscheidet. Möglicherweise werden DYNLT1 und DYNLT3 für beide Aufnahmewege benötigt. Es gibt jedoch bisher keine Hinweise dafür, dass das Auflösen der Kernmembran, wie bei der Infektion vermutet (Pyeon *et al.*, 2009), auch für die nukleäre Lokalisation von L2 nach der Expression notwendig ist.

Die Familien DYNLL, DYNLT und DYNRB der leichten Ketten des Dyneinkomplexes besitzen jeweils zwei Mitglieder (Pfister *et al.*, 2006). Die Mitglieder der DYNLL und DYNRB-Familie können dabei als Heterodimere im Dyneinkomplex vorliegen, während DYNLT1 und DYNLT3 nur als Homodimere mit der mittelschweren Kette assoziiert sind (Lo *et al.*, 2007b). In dieser Arbeit wiesen sowohl die Interaktionsstudien als auch die funktionalen Assays darauf hin, dass die Bindung an DYNLT1 durch L2 möglicherweise stärker ist, als die von L2

an DYNLT3. Ebenso zeigten die Immunfluoreszenzstudien nach L2-Expression, dass die Kolo-kalisation von DYNLT1 und dem PML-Protein, verglichen mit DYNLT3, wesentlich höher war. Sowohl die Depletion von DYNLT1 mittels siRNA als auch das Einbringen eines DYNLT1-spezifischen Antikörpers führte zu einer stärkeren Inhibition der Infektion, als die von DYNLT3. Daher ist es durchaus möglich, dass DYNLT3 bei der Infektion oder Morphogenese als sekundärer Transporter verwendet wird, wenn z.B. nicht genügend freie DYNLT1-Transportermoleküle in der Zelle zur Verfügung stehen.

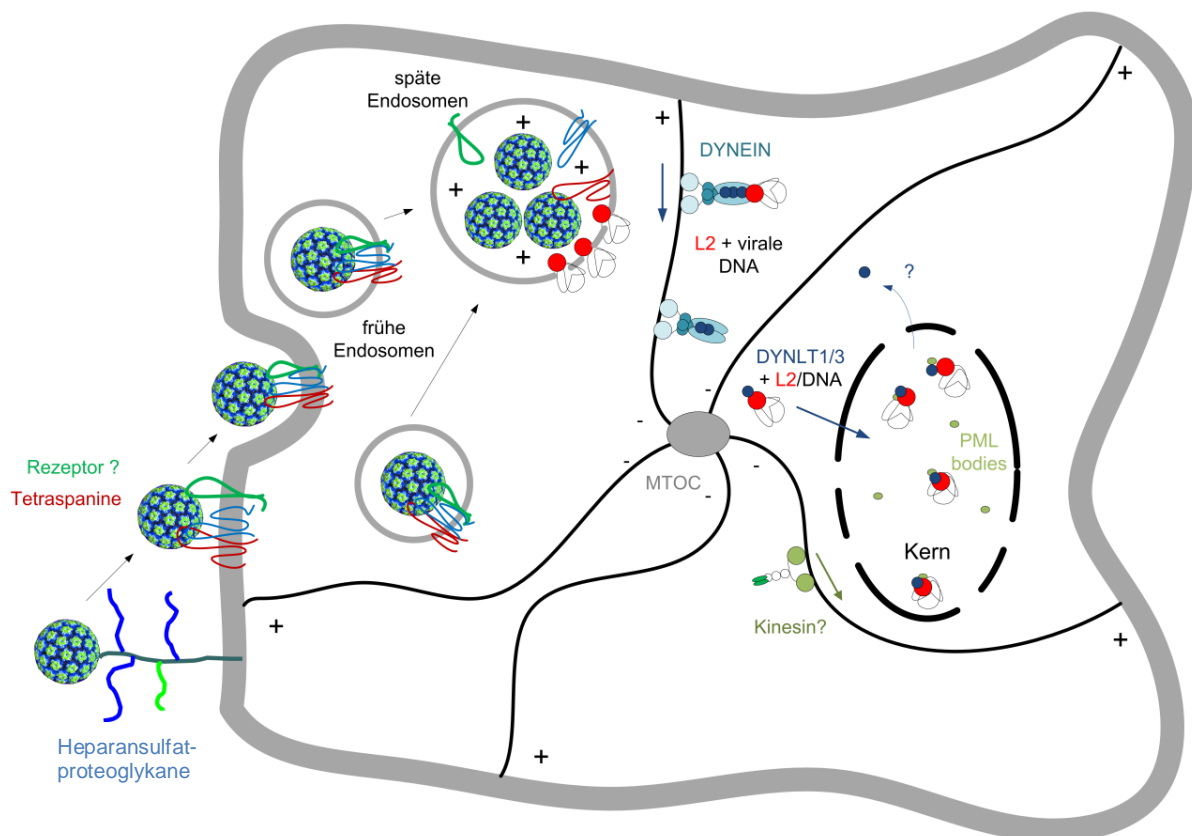


Abbildung 5-1: Modell der HPV16-Infektion mit Beteiligung der leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 des Dyneinkomplexes.

Die Viren binden an der Zelloberfläche an Heparansulfatproteoglykane und werden dann über einen unbekanntem Rezeptor in endosomale Strukturen internalisiert. Eine Beteiligung von Tetraspaninen konnte dabei nachgewiesen werden. Nach der Aufnahme in Endosomen werden diese angesäuert, was zum Aufbrechen der Kapside führt. L2 verlässt die Endosomen mit der viralen DNA und wird mit Hilfe von DYNLT1 und DYNLT3 in den Zellkern transportiert, wo es an den Nukleären Domänen 10 akkumuliert.

Zusammenfassend kann das Modell der Aufnahme und des Transports des viralen Genoms bei der Infektion durch die Ergebnisse dieser Arbeit erweitert werden (Abb. 5-1). Nach der Aufnahme der Viren in die Endosomen kommt es zu einer Ansäuerung der Virus-beladenen Vesikel. Das Kapsid bricht auf und L2 verlässt das Endosom gemeinsam mit der viralen

DNA. Anschließend bindet L2 die leichte Kette DYNLT1 oder DYNLT3 und wird mit Hilfe des Dyneinkomplexes entlang der Mikrotubuli in Richtung des Zellkerns transportiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bindung an DYNLT1 bzw. DYNLT3 essentiell für die erfolgreiche Infektion ist. Die leichten Ketten lösen sich wahrscheinlich vom Dyneinkomplex ab und transportieren L2 in den Zellkern, wo sie zusammen mit L1 an den ND-10 akkumulieren. Eine mögliche regulatorische Funktion von DYNLT1 und DYNLT3 im Zellkern muss in fortführenden Studien näher untersucht werden.

5.3 Charakterisierung der Interaktion von L2 mit den Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3

Transkriptionsfaktoren regulieren durch die Bindung an Promotoren eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Mehr als 2600 humane Transkriptionsfaktoren sind bisher bekannt (Babu *et al.*, 2004). Auch virale Promotoren können durch Transkriptionsfaktoren der infizierten Wirtszellen reguliert werden. Zu Beginn der 70er Jahre wurden durch Restriktionsanalysen die ersten Kartierungen viraler Genome durchgeführt (Danna *et al.*, 1971). Mit der Entwicklung der DNA-Sequenzierung konnten die Genome des SV40-Virus (Reddy *et al.*, 1978) und des Humanen Papillomvirus (Danos *et al.*, 1982) vollständig entschlüsselt werden. Das doppelsträngige HPV-Genom ist etwa 8 kb groß und codiert in allen drei Leserastern für insgesamt acht Proteine. Neben dem codierenden Bereich enthält das Genom auch einen nicht-kodierenden Bereich, der regulatorische Funktionen bei der Transkription des Genoms übernimmt. Diese Kontrollregion wird als *long control region* (LCR) bezeichnet und befindet sich auf dem Genom zwischen dem Gen für das Kapsidprotein L1 und dem frühen Gen E6. Innerhalb der Kontrollregion befindet sich der frühe Promotor, der die Expression der frühen Gene kontrolliert. Die Regulation des Promotor ist dabei an den Differenzierungsstatus der infizierten Keratinozyten gekoppelt (Hummel *et al.*, 1992) und kann durch virale und zelluläre Proteine reguliert werden. Nach der Infektion der basalen Keratinozyten transportiert L2 die virale DNA in den Zellkern, wo die initiale Transkription und Replikation stattfindet. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zu einer Inaktivierung des frühen und zur Aktivierung des späten Promotors in den oberen Zellschichten. Dabei werden die Gene E2, E4 und E5 gebildet, die zur Amplifikation des Genoms führen sowie die Kapsidproteine L1 und L2, die für den Einbau des Genoms in das Kapsid benötigt werden (Hummel *et al.*, 1992, Becker *et al.*, 2004). Die genaue Regulation des Umschaltens von der Expression der frühen Gene hin zu den späten Genen ist noch nicht verstanden. Das virale E2-Protein vermittelt dabei jedoch einen wichtigen Regulationsmechanismus, da es konzentrationsabhängig unterschiedliche Funktionen ausübt. (Bouvard *et al.*, 1994b). Niedrige Konzentrationen von

E2 aktivieren den frühen Promotor, während hohe Konzentrationen zu einer Inaktivierung führen. Daneben spielen zelluläre Proteine eine Rolle. So kann z.B. das Protein C/EBP den frühen Promotor inhibieren und den späten aktivieren (Kukimoto *et al.*, 2006).

5.3.1 L2 bindet an die Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3

In dieser Arbeit wurde TBX2 als Interaktionspartner von L2 im Hefe-2-Hybrid-Screening gefunden. TBX2 allein zeigte dabei eine leichte Aktivierung des *Histidin*-Gens, was wahrscheinlich auf die transkriptionsregulierende Eigenschaften von TBX2 zurückzuführen ist. Die Interaktionsstudien im Säugerzellsystem wurden auf TBX3 erweitert, da beide Proteine sich in ihrer Aminosäuresequenz zu etwa 54% gleichen. Die Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3 sind Mitglieder der Familie der T-box-Proteine. Alle T-box-Proteine besitzen eine DNA-Bindedomäne, die T-box, mit deren Hilfe sie an DNA binden können (Kispert *et al.*, 1993). TBX2 und TBX3 sind die einzigen Mitglieder der T-box-Genfamilie, die als Transkriptioninhibitoren fungieren können (Carreira *et al.*, 1998, He *et al.*, 1999). Mit Koimmunpräzipitationsstudien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass L2 auch in Säugerzellen mit TBX2 und TBX3 interagiert. Es wurden jedoch keine Interaktionsstudien mit aufgereinigten Proteinen durchgeführt. In zukünftigen Analysen wäre es daher wichtig zu klären, ob die Interaktion von L2 und TBX2 direkt oder indirekt erfolgt. Durch Immunfluoreszenzanalysen sollte die Lokalisation von TBX2 und TBX3 mit und ohne Koexpression von L2 untersucht werden. In HeLa-Zellen wird kein endogenes TBX2 exprimiert (Carreira *et al.*, 1998), weshalb die Kolokalisationsstudien mit transient exprimiertem TBX2 bzw. TBX3 durchgeführt wurden. Auch in HaCaT-Zellen sowie normalen primären Keratinozyten (NHEK) konnte im Rahmen dieser Arbeit kein TBX2 oder TBX3 nachgewiesen werden. Offensichtlich wird TBX2 in vielen undifferenzierten Zellen bzw. Zelllinien nicht gebildet. Endogen ist TBX2 in vielen Hautkrebszelllinien nachweisbar (Carreira *et al.*, 2000), wird allerdings in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus unterschiedlich stark exprimiert (Bilican *et al.*, 2006). Dabei konnte in synchronisierten B16 Melanoma-Zellen gezeigt werden, dass TBX2 vor allem in der G2-Phase hochreguliert war, während es in der S-Phase, sowie der Mitose nur gering exprimiert wurde.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei transienter Expression von TBX2 und TBX3 beide Proteine grundsätzlich das gleiche Verteilungsmuster aufweisen, was für die nahe Verwandtschaft beider Proteine spricht. Meist waren beide Proteine im Zellkern lokalisiert. Nur geringe Mengen konnten außerhalb des Kerns beobachtet werden. Im Kern waren beide Proteine entweder gleichmäßig verteilt oder zeigten eine starke Kolokalisation mit der DNA. Möglicherweise gibt es auch in transient transfizierten Zellen eine Regulation der Protein-

Menge bzw. der Verteilung. Es ist denkbar, dass TBX2 und TBX3 zu verschiedenen Stadien des Zellzyklus abgebaut oder umgelagert werden können, wodurch die verschiedenen Verteilungsmuster nach transienter Expression zu erklären wären.

Wurden L2 und TBX2- bzw. TBX3 in HeLa-Zellen koexprimiert, so zeigte sich teilweise ein bis dato nicht bekanntes Verteilungsmuster von L2. Typischerweise ist L2 im Kern homogen verteilt oder akkumuliert an den ND10, wobei es Hinweise gibt, dass das nukleäre Verteilungsmuster konzentrationsabhängig ist (Kieback *et al.*, 2006). Bei geringeren Konzentrationen liegt L2 gleichmäßig im Zellkern vor, bei hohen Konzentrationen akkumuliert es an den ND10. In diesem Fall konnte keine Kolo-kalisation mit TBX2 bzw. TBX3 beobachtet werden. Lag L2 jedoch nicht mit den ND10 assoziiert vor, zeigte sich oftmals eine starke Kolo-kalisation mit TBX2 bzw. TBX3 und der DNA. Dies spricht dafür, dass die Interaktion von L2 mit TBX2 offensichtlich temporär, möglicherweise auch Zellzyklus-abhängig ist. Denkbar ist auch, dass die Bindung von L2 und TBX2 bzw. TBX3 indirekt zustande kommt und Adapterproteine die Interaktion regulieren. Solche Adapterproteine könnten z.B. Proteine aus dem SUMO-Signalweg sein, da TBX-2 aus *C. elegans* mit UBC-9 und GEI-17 interagiert (Roy Chowdhuri *et al.*, 2006). Auch für L2 konnte gezeigt werden, dass es sumoyliert werden kann und mit SUMO-Proteinen interagiert (Marusic *et al.*, 2010). Hierbei sind weiterführende Analysen wichtig, um zu klären, ob die Interaktion von L2 und TBX2 bzw. TBX3 in bestimmten Phasen des Zellzyklus zustande kommt oder ob SUMO-Proteine eine Rolle bei der Interaktion spielen. Diese Beobachtungen, dass TBX2 bzw. TBX3 L2 von den ND10 ablösen, stehen damit im Kontrast zu anderen Transkriptionsfaktoren, die mit L2 interagieren. Im Falle des Transkriptionsfaktors Daxx, führt die Expression von L2 zu einer Rekrutierung von Daxx zu den ND10 (Florin *et al.*, 2002b). Gleichzeitig wird der Transkriptionsfaktor Sp100 von den ND10 abgelöst. Hier jedoch wurde L2 durch die Expression von TBX2 bzw. TBX3 von den ND10 abgelöst. Es muss daher in weiteren Versuchen geklärt werden, welche Bedeutung die Ablösung des L2-Proteins von den ND10 hat. Die ND10 stellen eine Struktur im Kern dar, an der Transkriptionsprozesse der Zelle reguliert werden können (Shih *et al.*, 2007). Sowohl nach der Infektion als auch bei der späteren Morphogenese der Viren lagert sich L2 an den ND10 an. Die Rekrutierung von L2 durch TBX2 bzw. TBX3 führt möglicherweise dazu, dass L2-bindende Proteine, wie Daxx oder Sp100, ebenfalls von den ND10 entfernt werden. Dies könnte zu einer veränderten Transkription des viralen Genoms an den ND10 führen. Zudem wäre es interessant zu untersuchen, ob das Expressionsmuster von Daxx und/oder Sp100 nach der Expression von TBX2 bzw. TBX3 mit und ohne L2 verändert ist. Es sollte mittels Immunfluoreszenzanalysen auch geklärt werden, ob sich die Lokalisation der viralen DNA nach der Infektion verändert. Die virale DNA lagert sich normalerweise zusammen mit L2 an den ND10 an (Day *et al.*, 2004, Kamper *et al.*, 2006). Wenn L2 durch TBX2 bzw. TBX3 von den ND10 abgelöst wird,

wäre es wichtig zu wissen, ob sich die virale DNA weiterhin an den ND10 befindet oder mit L2 und TBX2 bzw. TBX3 kolokalisiert ist.

5.3.2 Die Rolle von TBX2 und TBX3 im Replikationszyklus von HPV16

Um die Funktion der Interaktion von L2 mit TBX2 bzw. TBX3 näher zu charakterisieren, wurde untersucht, ob TBX2 bzw. TBX3 einen regulatorischen Effekt auf den frühen Promotor von HPV16 hat und welche Rolle dabei das L2-Protein spielt. Dafür wurde die Kontrollregion (LCR) von HPV16 vor ein Luciferasegen kloniert, sodass die Aktivität des p97-Promotors über die Aktivität der Luciferase gemessen werden konnte. Es wurde in verschiedenen Zelllinien wie auch in normalen primären Keratinozyten (NHEK) gezeigt, dass die Expression von TBX2 bzw. TBX3 die Aktivität des Promotors auf etwa 20-40% reduzierte. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass TBX2 und TBX3 die einzigen Proteine der T-box-Familie sind, die transkriptionshemmend auf verschiedene zelluläre Promotoren wirken (Carreira *et al.*, 1998, He *et al.*, 1999). Dabei inhibieren TBX2 und TBX3 vor allem die Expression von Proteinen, die den Zellzyklus regulieren (p14^{ARF}, p21^{CIP}). Die Beteiligung von TBX2 und TBX3 an der Regulation viraler Promotoren ist bisher nicht bekannt. Es wäre daher in weiterführenden Analysen interessant zu schauen, ob TBX2 und TBX3 auch noch andere virale Promotoren regulieren können. L2 hingegen zeigte in HeLa-Zellen eine Aktivierung des Promotors, während dieser in allen anderen Zellen durch L2 um etwa 30% inhibiert wurde. Offensichtlich ist die Regulation der LCR durch L2 abhängig vom Proteom der verschiedenen Zelllinien. Da HeLa-Zellen HPV18-positiv sind, ist es denkbar, dass die Expression von E6 und E7 Einfluss auf die Funktion von L2 nehmen kann. Interessanterweise führte die Koexpression von TBX2 bzw. TBX3 und L2 zu einer deutlichen Verstärkung des inhibitorischen Effekts in allen Zellen. Offensichtlich können sowohl L2 als auch TBX2 bzw. TBX3 die Transkription der Luciferase über den p97-Promotor direkt oder indirekt regulieren. Möglicherweise konkurriert L2 mit den T-box-Proteinen um eine Bindung an den LCR. Wird L2 exprimiert, bindet es direkt oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren an die LCR und führt in HeLa-Zellen zu einer Steigerung der Transkription. Werden die T-box-Proteine exprimiert, könnten diese über L2 an die LCR binden und L2 von der LCR verdrängen. Interagiert L2 mit anderen Proteinen an den ND10, die zuvor zu einer Erhöhung der Transkription der LCR beitragen, könnten diese durch die Verdrängung von L2 durch TBX2 oder TBX3 ebenfalls von der LCR entfernt werden und die Transkription nicht mehr aktivieren. So ließe sich erklären, warum eine Erhöhung der Luciferaseaktivität in HeLa-Zellen nach der Expression von L2 in eine verstärkte Inhibition bei Koexpression mit TBX2 bzw. TBX3 umschlägt. Andererseits ist auch denkbar, dass die

Bindung von L2 an TBX2 bzw. TBX3 die Bindung an die DNA stabilisiert oder begünstigt, sodass die Inhibition der LCR verstärkt wird. So führte die Interaktion des Retinoblastom Proteins pRB mit dem murinen Tbx2 zu einer Verstärkung der Transkriptioninhibition von TBX2 auf den p21^{CIP1}-Promotor (Vance *et al.*, 2010).

Während der produktiven HPV-Infektion kommt es in den oberen Zellschichten des infizierten Gewebes zu einem Abschalten des frühen Promotors. Möglicherweise spielt neben dem E2-Protein auch L2 eine Rolle bei der Regulierung des Promotors. Für E2 konnte gezeigt werden, dass es die Transkription der frühen Gene konzentrationsabhängig reguliert (Bouvard *et al.*, 1994b, Demeret *et al.*, 1994). Vielleicht können durch die L2-Koexpression auch andere Transkriptionsfaktoren den inhibitorischen Effekt von TBX2 und TBX3 auf den p97-Promotor verstärken. L2 kann den Transkriptionsfaktor Daxx zu den ND10 rekrutieren (Florin *et al.*, 2002b). Möglicherweise beeinflusst die Rekrutierung von Daxx durch L2 ebenfalls die Regulierung p97-Promotors.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass neben dem p97-Promotor von HPV16, auch die frühen Promotoren von HPV11 und HPV18 durch TBX2 und TBX3 inhibiert werden. Dies weist darauf hin, dass die Regulation des frühen HPV-Promotors durch TBX2 und TBX3 möglicherweise unabhängig vom HPV-Typ ist, da der frühe Promotor von Hoch-Risiko-Typen (HPV16 und 18) wie auch eines Niedrig-Risiko-Typs (HPV11) inhibiert wurde. Eine murine, DNA-bindedefiziente Tbx2-Mutante zeigte in HeLa-Zellen hingegen keine Inhibition des p97-Promotors. Dies verdeutlicht, dass TBX2 wahrscheinlich an der Transkriptionsregulation des Promotors direkt oder indirekt beteiligt ist. Weiterhin wies die Mutante im Vergleich zu TBX2 oder zum murinen Wildtyp eine andere Verteilung im Zellkern auf. In etwa einem Drittel der transfizierten Zellen akkumulierte die Mutante in DNA-freien Bereichen des Zellkerns. Dort kolokalisierte sie zu Teilen mit dem PML-Protein, welches Teil der ND10 ist. In den übrigen Zellen war die Mutante gleichmäßig im Kern verteilt. Für TBX2wt konnte hingegen in dieser Arbeit und auch in einer anderen Studie keine Kolokalisation mit dem PML-Protein beobachtet werden (Bilican *et al.*, 2006). Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutante nicht mehr in der Lage war, DNA zu binden. Offensichtlich reicherte sich das Protein an den ND10 an. Einerseits werden die ND10-Domänen als Ort der Transkriptionsregulation betrachtet. Andererseits dienen diese Strukturen aber offensichtlich auch als Depots für zelluläre Proteine (Cho *et al.*, 1998), was der Grund für die Akkumulation der Tbx2-Mutante an den ND10 sein könnte. Wurde L2 koexprimiert, konnte eine sehr starke Kolokalisation mit L2 beobachtet werden, auch und vor allem, wenn sich dieses an den ND10 befand. Dies verdeutlicht, dass TBX2 offensichtlich mit L2 assoziiert bleibt, wenn es nicht an die DNA binden kann. Die L2-Interaktionsdomäne von TBX2 war dabei nicht beeinflusst, da die DNA-bindedefiziente Mutante von Tbx2 in Koimmunpräzipitationsstudien auch weiterhin mit L2 interagierte.

Mit Hilfe eines speziellen Programms (Target Finder) wurde das Genom von HPV16 auf mögliche TBX2-Bindestellen untersucht. Dafür wurde die publizierte DNA-Bindesequenz als Matrize verwendet (Sinha *et al.*, 2000). Zwei mögliche Bindestellen (TBE = *T-box binding element*), die das Programm ermittelt hat, befinden sich innerhalb der LCR. Eine befindet sich im mittleren Drittel (TBE19), eine weitere im hinteren Drittel der LCR. Durch Deletionsmutanten der LCR konnte die Interaktionsdomäne von TBX2 auf das 3'-Ende eingegrenzt werden, in welchem sich auch der p97-Promotor befindet. Diese Region weist allerdings keine beschriebene Konsensussequenz für die Bindung von TBX2 auf. Dies gilt ebenfalls für den Promotor des Gens *p14ARF* (Lingbeek *et al.*, 2002) sowie den Promotor des *trp-1*-Gens (Carreira *et al.*, 1998). Beide Promotoren werden ebenfalls durch TBX2 inhibiert, obwohl sie keine T-box-spezifische Erkennungssequenz besitzen. Daher ist es möglich, dass auch die LCR über ein bisher unbekanntes Motiv für die Interaktion von TBX2 und TBX3 verfügt. Denkbar ist auch, dass die Bindung indirekt erfolgt und über ein anderes Protein zustande kommt. In weiterführenden Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob TBX2 und TBX3 auch an andere TBEs im HPV-Genom binden können, um so auch die Expression verschiedener HPV-Proteine zu regulieren. Zu untersuchen wäre auch, ob TBX2 und TBX3 einen Einfluss auf die Replikation des HPV-Genoms nehmen können, da sich der Replikationsursprung ebenfalls im 3'-Bereich der Kontrollregion befindet. In den oberen Zellschichten der infizierten Keratinozyten kommt es zu einer starken Amplifikation des Genoms, bevor diese in die Kapside verpackt werden. Die genaue Regulation der Amplifikation ist nicht bekannt (Flores *et al.*, 1997). Bisher ist nur die Beteiligung der viralen Proteine E1 und E2 bekannt (Chiang *et al.*, 1992).

Dass TBX2 und TBX3 an die LCR binden können, wurde mit einer Chromatin-IP (ChIP) bestätigt. TBX2 und TBX3 wurden transient in HeLa-Zellen exprimiert, da in deren Genom Teile des HPV18-Genoms (inklusive der LCR) stabil integriert sind. Nach spezifischer Präzipitation der T-box-Proteine wurden assoziierte DNA-Fragmente durch eine spezifische PCR nachgewiesen. Dazu wurden zwei Primerpaare gewählt, die innerhalb der LCR18 binden. Es sowohl das 3'-Ende der LCR18, als auch ein mittlerer Bereich durch die PCR amplifiziert. Der mittlere Bereich wurde jedoch sehr viel schwächer amplifiziert. Dies könnte bedeuten, dass die Bindung von TBX2 bzw. TBX3 am 3'-Ende der LCR stattfindet.

Um die mögliche Bedeutung der Regulation der LCR und der Interaktion der Proteine in den Kontext einer Infektion zu bringen, wurden die Expression von TBX2 und L2 in Gewebeschnitten von Patientinnen untersucht, die eine HPV-Infektion im Stadium von CIN I-II besaßen. Da die Gewebeproben zuvor nur mittels Multiplex-PCR untersucht wurden, um zu ermitteln, ob eine Infektion mit einem Hochrisikotyp vorliegt, wurde zusätzlich eine HPV16-spezifische PCR durchgeführt. Von den 17 Proben zeigten vier einen Nachweis des HPV16E1-Gens, was einen Anteil von etwa 24% bedeutet. Dies entspricht auch den

Ergebnissen von epidemiologischen Studien des Robert-Koch-Instituts, bei denen HPV16 bei Patientinnen mit CIN I in etwa 25% aller Fälle nachgewiesen werden konnte (Epidemiologisches Bulletin, RKI, 2009). In einem zweiten Schritt wurde der Schnitt mit der stärksten Amplifikation von E1 für Koimmunfluoreszenzstudien mit L1 und L2 sowie L2 und TBX2 verwendet. L1 und L2 wurden in der granulären Schicht nachgewiesen und kolokalisierten sehr deutlich im Zellkern. Die Verteilung von TBX2 wurde zuerst in einer HPV16-negativen Probe untersucht. TBX2 zeigte einen Expressionsgradienten, der von der suprabasalen Schicht hin zur granulären Schicht stärker wurde. TBX2 war dabei fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert. In den oberen Schichten des Epithels findet die Morphogenese neuer Viren statt, wozu das virale Genom amplifiziert werden muss. Möglicherweise bewirkt TBX2 durch die Bindung an den p97-Promotor und die damit verknüpfte Inhibition des Promotors das Abschalten der Transkription und den Beginn der Genomreplikation. Ähnliche Beobachtungen konnten mit dem zellulären Protein C/EBP gemacht werden (Kukimoto *et al.*, 2006). C/EBP bindet und inhibiert den frühen Promotor p97 und aktiviert den späten Promotor p670 von HPV16 und reguliert somit die Expression des viralen Genoms. In den HPV16-positiven Schnitten konnte eine sehr deutliche Kolokalisation von L2 und TBX2 in den Zellkernen der oberen Zellschichten beobachtet werden. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse der Promotorstudien und deutet darauf hin, dass L2 in den oberen Schichten über die Bindung an TBX2 an einer verstärkten Inhibition des frühen Promotors beteiligt sein könnte. Die Expression von TBX2 im Zervix-Gewebe wurde bereits in den oberen Zellen der suprabasalen Zellschicht beobachtet, während L2 erst in der granulären Schicht detektiert werden konnte. Daher könnte es sein, dass die Abschaltung des frühen Promotors indirekt auch zu einer Induktion des späten Promotors führt. Wird L2 dann in den oberen Schichten exprimiert, wird der inhibitorische Effekt von TBX2 noch weiter verstärkt, damit schließlich in den obersten Zellen der granulären Schicht reife Viren entstehen.

Die Viren werden in den Zellkernen der oberen Zellschichten zusammgebaut und durch das Absterben der Zellen freigesetzt. Möglicherweise reguliert TBX2 durch die Interaktion mit L2 auch die Seneszenz der Wirtszellen. Die Inhibition des p97-Promotors führt zum Verlust der Funktion der viralen Proteine E6 und E7. Diese inhibieren eine Vielzahl Zellzyklus-abhängiger Prozesse, um die Proliferation der Zellen zu fördern und die Seneszenz zu verhindern (Narisawa-Saito *et al.*, 2007). Durch die Abschaltung der Expression von E6 und E7 könnten TBX2 und/oder TBX3 einen inhibitorischen Einfluss auf den Zellzyklus ausüben. Ob die Interaktion von L2 und TBX2 bzw. TBX3 einen Einfluss auf den Zellzyklus hat, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Obwohl TBX2 und TBX3 eine große Sequenzhomologie besitzen, sind in der Literatur auch unterschiedliche Funktionen der beiden T-box-Proteine beschrieben. Offen bleibt die Frage,

ob sie auch im Infektionszyklus von HPV16 und anderen Papillomvirustypen unterschiedliche Funktionen ausüben. Für die Kollokalisationsstudien in den Gewebeschnitten stand kein geeigneter Antikörper für TBX3 zur Verfügung. Daher wäre es wichtig, in zukünftigen Analysen auch die Expression von TBX3 im Gewebe zu untersuchen. Da die Ergebnisse der Interaktions- und Promotorstudien aber für beide Proteine sehr ähnlich waren, ist anzunehmen, dass auch TBX3 *in vivo* eine Rolle bei der Morphogenese von Papillomviren spielt. Weiterhin wäre es interessant zu sehen, ob TBX2 bzw. TBX3 auch mit dem L2-Protein anderer HPV-Typen interagiert und ob diese Interaktion auch in Gewebeschnitten nachzuweisen ist. Damit könnten die Ergebnisse aus den Promotorstudien sowie der Chromatin-IP sinnvoll ergänzt werden.

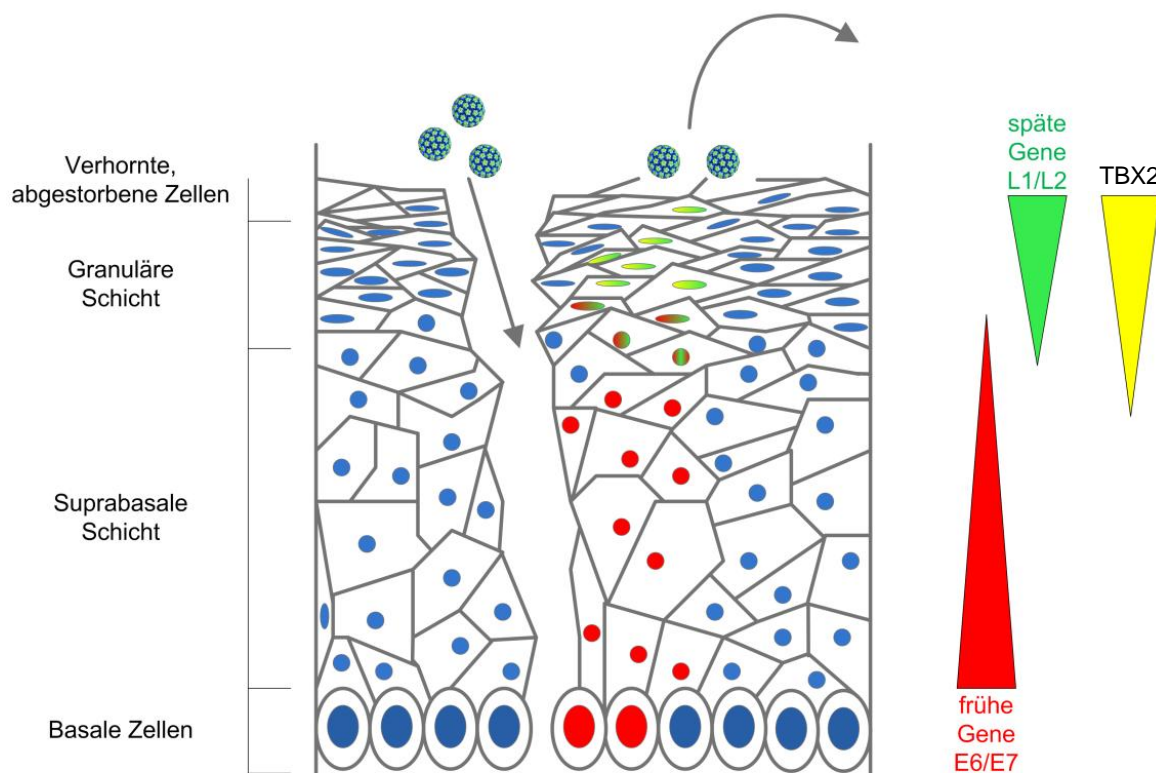


Abbildung 5-2: Modell der HPV16-Infektion mit Beteiligung von TBX2

Nach der Infektion der basalen Keratinozyten wird die Proliferation der infizierten Zellen durch die Expression von E6 und E7 mittels des frühen Promotors induziert. In den oberen Zellen der suprabasalen und granulären Schicht führt die Expression von TBX2 zu einem Abschalten des frühen Promotors. Durch die Induktion es späten Promotors werden L1 und L2 exprimiert und mit Hilfe von E4 und E5 das virale Genom amplifiziert. Schließlich kommt es zum Absterben der oberen Zellen und zur Freisetzung der reifen Viren.

Zusammenfassend kann das Modell der Virusinfektion mit den Ergebnissen dieser Arbeit erweitert werden (Abb. 4-2). Nach der Infektion von basalen Zellen der Haut, bzw. Schleimhaut findet dort die initiale Transkription des viralen Genoms über die Aktivierung des frühen Promotors statt. Durch die Expression von E6 und E7 kommt es zur vermehrten Proliferation der Zellen in der suprabasalen Schicht. TBX2 wird mit der Differenzierung der

Zellen in den oberen Bereichen der suprabasalen und granulären Schichten exprimiert und führt im Falle einer HPV-Infektion zu einer Inhibition des frühen Promotors. Der späte Promotor wird aktiviert und die Expression von L2 verstärkt den inhibitorischen Effekt von TBX2 auf den frühen Promotor. Durch die Expression von L1 und L2 werden neue Viren gebildet, die schließlich durch das Absterben der oberen Zellschichten frei werden und neue Zellen infizieren können.

6 Zusammenfassung

Das minore Kapsidprotein L2 des Humanen Papillomvirus 16 übernimmt mannigfaltige Aufgaben bei der Infektion. Eine Beteiligung zellulärer Proteine an diesen Aufgaben ist wahrscheinlich. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind aber nur wenige zelluläre Proteine als Interaktionspartner von L2 näher charakterisiert.

In dieser Arbeit wurden daher in einem ersten Schritt mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-Screenings neue, zelluläre Interaktionspartner von L2 identifiziert. Die Interaktion von L2 mit der leichten Kette DYNLT1 des Dyneinkomplexes und dem Transkriptionsfaktor TBX2 wurde in weiteren Versuchen näher charakterisiert.

Zunächst wurde die Interaktion von DYNLT1 mit L2 in der Hefe durch selektive Expression in Hefezellen verifiziert. Weiterhin wurde die Interaktion durch Koimmunpräzipitationsstudien im Säugerzellsystem reproduziert. Koimmunfluoreszenzstudien mit transient exprimiertem L2 zeigten, dass die Interaktion zu einer Relokalisation der leichten Kette in der Zelle führte. DYNLT1 akkumulierte dabei zusammen mit L2 an den ND10 im Zellkern. Mit Hilfe von GST-Interaktionsassays konnte die Interaktion mit DYNLT1 auch *in vitro* bestätigt werden. Darüber hinaus wurde bei diesen Studien beobachtet, dass L2 auch mit DYNLT3, einer weiteren leichten Kette des Dyneinkomplexes, interagiert. Die leichte Kette DYNLL1 hingegen sowie die mittelschwere Kette DYNC111 konnten nicht an L2 binden. Weiterhin zeigte sich in Kollokalisationsstudien, dass DYNLT3 ebenso wie DYNLT1 mit L2 an den ND10 im Zellkern akkumuliert, während die leichte Kette DYNLL1 und die mittelschwere Kette DYNC111 nicht durch L2 in den Zellkern relokalisiert werden. Insgesamt wiesen diese Studien darauf hin, dass die Interaktion von L2 mit dem Dyneinkomplex selektiv über die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 vermittelt wird.

Um die Rolle von DYNLT1 und DYNLT3 bei der Infektion mit HPV16 zu untersuchen, wurden die leichten Ketten mit Hilfe von RNA-Interferenz (siRNA) depletiert und die Zellen anschließend mit Pseudoviren infiziert. Die Depletion resultierte in einer stark verminderten Infektion, was darauf hindeutet, dass die Interaktion von L2 mit den leichten Ketten für eine erfolgreiche Infektion benötigt wird. Auch nach zytosolischer Applikation von DYNLT1- und DYNLT3-spezifischer Antikörper wurde die Infektion stark inhibiert. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass L2 bei der Infektion mit den leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 sowohl im Zytosol, als auch im Zellkern an den ND10 kollokalisieren. Nach der Depletion von DYNLT1 bzw. DYNLT3 akkumulierte L2 hingegen in perinukleärer Region des Zytoplasmas. L2 kollokalisierte dabei nicht mehr mit L1, was darauf schließen lässt, dass L2 die Endosomen verlassen hat und die leichten Ketten des Dyneinkomplexes daher nicht für den Austritt des L2-Proteins aus den Endosomen benötigt werden. Diese Ergebnisse legen insgesamt

vielmehr nahe, dass die leichten Ketten DYNLT1 und DYNLT3 bei der Infektion von HPV16 für den Dynein-vermittelten, zytoplasmatischen Transport des L2-Proteins zum Zellkern essentiell sind. Da L2 mit dem viralen Genom assoziiert ist, stellt dieser Transport einen entscheidenden Schritt im Infektionszyklus von HPV16 dar.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von L2 mit dem Transkriptionsfaktor TBX2 charakterisiert. Die Interaktion von L2 mit TBX2 und dem verwandten Protein TBX3 konnte mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsstudien in Säugerzellen bestätigt werden. Weiterhin wurden Koimmunfluoreszenzstudien mit L2 und TBX2 bzw. TBX3 durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisation der Proteine zu untersuchen. Dabei wurde beobachtet, dass die Expression von TBX2 oder TBX3 in einigen Zellen zu einer Relokalisation von L2 im Zellkern führte. L2, welches mit TBX2 bzw. TBX3 kolokalisierte, war nicht mehr an den ND10 lokalisiert. In den Zellen, in denen das L2-Protein weiterhin an den ND10 lokalisiert war, kolokalisierte es nicht mit TBX2 bzw. TBX3. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion temporär stattfindet.

Um die Funktion der Interaktion von L2 und den T-box-Proteinen im Infektionszyklus von HPV zu analysieren, wurden Promotor-Studien mit dem frühen Promotor p97 von HPV16 durchgeführt. Dieser befindet sich in der Kontrollregion (LCR) des HPV-Genoms und kontrolliert die Expression der frühen Gene E6 und E7. TBX2 und TBX3 inhibierten beide den frühen Promotor auf etwa 20-40% seiner ursprünglichen Aktivität. Sowohl in unterschiedlichen Zelllinien, als auch in primären Keratinozyten wurde der inhibitorische Effekt von TBX2 oder TBX3 durch die Expression von L2 verstärkt. Möglicherweise ist die Interaktion von L2 mit TBX2 bzw. TBX3 essentiell für das Abschalten des frühen Promotors in der späten Phase des Replikationszyklus. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass TBX2 und TBX3 auch die Promotoren von HPV18 und HPV11 inhibierten. Dies lässt vermuten, dass die Inhibition des frühen Promotors unabhängig vom Virustyp ist. Es wurden nachfolgend Deletionsmutanten der LCR von HPV16 erstellt die darauf hinwiesen, dass sich die Interaktionsdomäne von TBX2 und TBX3 innerhalb der letzten 80 Basen am 3'-Ende der LCR von HPV16 befindet. Dass die Bindung an die LCR wichtig für die Regulation des Promotors ist, konnte mit einer DNA-bindedefizienten Mutante des murinen Tbx2 gezeigt werden. Diese war nicht mehr in der Lage, die Aktivität des Promotors zu inhibieren. Mit Hilfe einer Chromatin-Immünpräzipitation konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass TBX2 und TBX3 den hinteren Bereich der Kontrollregion binden. Um Aufschluss über die Funktion der Interaktion von L2 und TBX2 bzw. TBX3 *in vivo* zu erhalten, wurde die Expression von TBX2 und L2 in HPV16-positiven CIN I-II-Gewebeschnitten analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass TBX2 einen Expressionsgradienten im Gewebe ausbildete. Während TBX2 in der unteren, suprabasalen Schicht nur schwach exprimiert wurde, nahm die nukleäre Expression zur granulären Schicht hin immer weiter zu. In den oberen Schichten des

infizierten Gewebes wurde eine deutliche Kollokalisierung von L2 und TBX2 im Zellkern detektiert.

Die Genexpression humaner Papillomviren im produktiven Replikationszyklus ist eng mit der Differenzierung der Epithelzellen von Haut und Schleimhaut assoziiert. In der unteren, granulären Schicht werden zunächst die frühen Virusproteine gebildet. In den oberen Schichten kommt es zu einem Umschalten der Expression hin zur Bildung der späten Proteine und der Genomamplifikation, was letztlich die Generierung reifer Viren bewirkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass TBX2 und/oder TBX3 an der Regulation der viralen Genexpression beteiligt sind und zusammen mit L2 zu einem Abschalten des frühen viralen Promotors in den oberen Zellschichten des infizierten Gewebes führen.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit konnten somit vier wichtige zelluläre Interaktionspartner des minoren Kapsidproteins L2 von HPV16 identifiziert und deren Funktion im viralen Infektionszyklus charakterisiert werden.

7 Literaturverzeichnis

- (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* **356**, 1915-1927.
- Abrahams, A., Parker, M.I. and Prince, S. (2010). The T-box transcription factor Tbx2: its role in development and possible implication in cancer. *IUBMB Life* **62**, 92-102.
- Agulnik, S.I., Bollag, R.J. and Silver, L.M. (1995). Conservation of the T-box gene family from *Mus musculus* to *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* **25**, 214-219.
- Agulnik, S.I., Garvey, N., Hancock, S., Ruvinsky, I., Chapman, D.L., Agulnik, I., *et al.* (1996). Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics* **144**, 249-254.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Canto, C., *et al.* (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol* **75**, 9819-9827.
- Archer, S.K., Claudianos, C. and Campbell, H.D. (2005). Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators. *Bioessays* **27**, 388-396.
- Autret, A. and Martin, S.J. (2009). Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol Cell* **36**, 355-363.
- Auvinen, E., Crusius, K., Steuer, B. and Alonso, A. (1997). Human papillomavirus type 16 E5 protein (review). *Int J Oncol* **11**, 1297-1304.
- Babu, M.M., Luscombe, N.M., Aravind, L., Gerstein, M. and Teichmann, S.A. (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 283-291.
- Baldwin, A., Pirisi, L. and Creek, K.E. (2004). NFI-Ski interactions mediate transforming growth factor beta modulation of human papillomavirus type 16 early gene expression. *J Virol* **78**, 3953-3964.
- Bamshad, M., Lin, R.C., Law, D.J., Watkins, W.C., Krakowiak, P.A., Moore, M.E., *et al.* (1997). Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet* **16**, 311-315.
- Bauch, A., Campbell, K.S. and Reth, M. (1998). Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase Ildelta. *Eur J Immunol* **28**, 2167-2177.
- Becker, K.A., Florin, L., Sapp, C., Maul, G.G. and Sapp, M. (2004). Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol* **78**, 1121-1128.
- Belnap, D.M., Olson, N.H., Cladel, N.M., Newcomb, W.W., Brown, J.C., Kreider, J.W., *et al.* (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol* **259**, 249-263.
- Bilican, B. and Goding, C.R. (2006). Cell cycle regulation of the T-box transcription factor tbx2. *Exp Cell Res* **312**, 2358-2366.
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J. and Garcea, R.L. (2008). Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol* **82**, 9848-9857.
- Blitz, I.L. and Laimins, L.A. (1991). The 68-kilodalton E1 protein of bovine papillomavirus is a DNA binding phosphoprotein which associates with the E2 transcriptional activator in vitro. *J Virol* **65**, 649-656.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W. and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* **3**, 1151-1157.
- Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z.M., Storey, A. and Banks, L. (1994a). The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* **203**, 73-80.

- Bouvard, V., Storey, A., Pim, D. and Banks, L. (1994b). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J* **13**, 5451-5459.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bremner, K.H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S.P. and Vallee, R.B. (2009). Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe* **6**, 523-535.
- Brivanlou, A.H. and Darnell, J.E., Jr. (2002). Signal transduction and the control of gene expression. *Science* **295**, 813-818.
- Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T. and Trus, B.L. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* **82**, 5190-5197.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* **78**, 751-757.
- Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2005a). Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* **119**, 445-462.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.Y., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2005b). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* **79**, 2839-2846.
- Buck, C.B., Thompson, C.D., Roberts, J.N., Muller, M., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2006). Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog* **2**, e69.
- Calleja-Macias, I.E., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, A.L., Chung, L.P., Collins, R.J., et al. (2005). Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *J Virol* **79**, 6565-6569.
- Carlson, H., Ota, S., Campbell, C.E. and Hurlin, P.J. (2001). A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 2403-2413.
- Carlson, H., Ota, S., Song, Y., Chen, Y. and Hurlin, P.J. (2002). Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. *Oncogene* **21**, 3827-3835.
- Carreira, S., Dexter, T.J., Yavuzer, U., Easty, D.J. and Goding, C.R. (1998). Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* **18**, 5099-5108.
- Carreira, S., Liu, B. and Goding, C.R. (2000). The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem* **275**, 21920-21927.
- Carter, A.P., Garbarino, J.E., Wilson-Kubalek, E.M., Shipley, W.E., Cho, C., Milligan, R.A., et al. (2008). Structure and functional role of dynein's microtubule-binding domain. *Science* **322**, 1691-1695.
- Chen, E.Y., Howley, P.M., Levinson, A.D. and Seeburg, P.H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* **299**, 529-534.
- Chen, J.J., Reid, C.E., Band, V. and Androphy, E.J. (1995). Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science* **269**, 529-531.
- Chen, S.L., Huang, C.H., Tsai, T.C., Lu, K.Y. and Tsao, Y.P. (1996). The regulation mechanism of c-jun and junB by human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. *Arch Virol* **141**, 791-800.
- Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G. and Harrison, S.C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**, 557-567.
- Chen, Y., Low, T.Y., Choong, L.Y., Ray, R.S., Tan, Y.L., Toy, W., et al. (2007). Phosphoproteomics identified Endofin, DCBLD2, and KIAA0582 as novel tyrosine

- phosphorylation targets of EGF signaling and Iressa in human cancer cells. *Proteomics* **7**, 2384-2397.
- Chiang, C.M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T.F., Broker, T.R. and Chow, L.T. (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5799-5803.
- Chin, M.T., Broker, T.R. and Chow, L.T. (1989). Identification of a novel constitutive enhancer element and an associated binding protein: implications for human papillomavirus type 11 enhancer regulation. *J Virol* **63**, 2967-2976.
- Cho, Y., Lee, I., Maul, G.G. and Yu, E. (1998). A novel nuclear substructure, ND10: distribution in normal and neoplastic human tissues. *Int J Mol Med* **1**, 717-724.
- Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M. and Bernard, H.U. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J Virol* **65**, 5933-5943.
- Chong, T., Chan, W.K. and Bernard, H.U. (1990). Transcriptional activation of human papillomavirus 16 by nuclear factor I, AP1, steroid receptors and a possibly novel transcription factor, PVF: a model for the composition of genital papillomavirus enhancers. *Nucleic Acids Res* **18**, 465-470.
- Chuang, J.Z., Yeh, T.Y., Bollati, F., Conde, C., Canavosio, F., Caceres, A. and Sung, C.H. (2005). The dynein light chain Tctex-1 has a dynein-independent role in actin remodeling during neurite outgrowth. *Dev Cell* **9**, 75-86.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796-2809.
- Conlon, F.L., Fairclough, L., Price, B.M., Casey, E.S. and Smith, J.C. (2001). Determinants of T box protein specificity. *Development* **128**, 3749-3758.
- Conrad, M., Bubb, V.J. and Schlegel, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* **67**, 6170-6178.
- Cripe, T.P., Haugen, T.H., Turk, J.P., Tabatabai, F., Schmid, P.G., 3rd, Durst, M., *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**, 3745-3753.
- Daniel, P. T. (2003a). Zellzyklus und Apoptose. In: Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien. Ganten, Ruckpaul. Heidelberg: Springer-Verlag, 130-174.
- Danna, K. and Nathans, D. (1971). Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2913-2917.
- Danos, O., Katinka, M. and Yaniv, M. (1982). Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J* **1**, 231-236.
- Darshan, M.S., Lucchi, J., Harding, E. and Moroianu, J. (2004). The I2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* **78**, 12179-12188.
- Davy, C.E., Jackson, D.J., Raj, K., Peh, W.L., Southern, S.A., Das, P., *et al.* (2005). Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol* **79**, 3998-4011.
- Day, P.M., Baker, C.C., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14252-14257.
- Day, P.M., Gambhira, R., Roden, R.B., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2008a). Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies. *J Virol* **82**, 4638-4646.
- Day, P.M., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (2008b). Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol* **82**, 12565-12568.

- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* **72**, 142-150.
- Day, P.M. and Schiller, J.T. (2009). The role of furin in papillomavirus infection. *Future Microbiol* **4**, 1255-1262.
- de Villiers, E.M., Gunst, K., Stein, H. and Scherubl, H. (2004). Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences. *Int J Cancer* **109**, 253-258.
- Demay, F., Bilican, B., Rodriguez, M., Carreira, S., Pontecorvi, M., Ling, Y. and Goding, C.R. (2007). T-box factors: targeting to chromatin and interaction with the histone H3 N-terminal tail. *Pigment Cell Res* **20**, 279-287.
- Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M. and Thierry, F. (1998). The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology* **242**, 378-386.
- Demeret, C., Yaniv, M. and Thierry, F. (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J Virol* **68**, 7075-7082.
- Diefenbach, R.J., Miranda-Saksena, M., Douglas, M.W. and Cunningham, A.L. (2008). Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Rev Med Virol* **18**, 35-51.
- Dohner, K., Nagel, C.H. and Sodeik, B. (2005). Viral stop-and-go along microtubules: taking a ride with dynein and kinesins. *Trends Microbiol* **13**, 320-327.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110**, 525-541.
- Douglas, M.W., Diefenbach, R.J., Homa, F.L., Miranda-Saksena, M., Rixon, F.J., Vittone, V., et al. (2004). Herpes simplex virus type 1 capsid protein VP26 interacts with dynein light chains RP3 and Tctex1 and plays a role in retrograde cellular transport. *J Biol Chem* **279**, 28522-28530.
- Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. and zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3812-3815.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**, 2245-2262.
- Eckert, L.O., Watts, D.H., Koutsky, L.A., Hawes, S.E., Stevens, C.E., Kuypers, J. and Kiviat, N.B. (1999). A matched prospective study of human immunodeficiency virus serostatus, human papillomavirus DNA, and cervical lesions detected by cytology and colposcopy. *Infect Dis Obstet Gynecol* **7**, 158-164.
- Eckert, R.L., Crish, J.F. and Robinson, N.A. (1997). The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev* **77**, 397-424.
- Einstein, M.H., Baron, M., Levin, M.J., Chatterjee, A., Edwards, R.P., Zepp, F., et al. (2009). Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin* **5**, 705-719.
- Enemark, E.J., Chen, G., Vaughn, D.E., Stenlund, A. and Joshua-Tor, L. (2000). Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell* **6**, 149-158.
- Engel, L.W., Heilman, C.A. and Howley, P.M. (1983). Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1. *J Virol* **47**, 516-528.
- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K. and McMillan, N.A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* **71**, 2449-2456.
- Fehrmann, F. and Laimins, L.A. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22**, 5201-5207.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S. and Garcea, R.L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **77**, 4818-4826.

- Flores, E.R., Allen-Hoffmann, B.L., Lee, D., Sattler, C.A. and Lambert, P.F. (1999). Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology* **262**, 344-354.
- Flores, E.R. and Lambert, P.F. (1997). Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* **71**, 7167-7179.
- Florin, L., Becker, K.A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., *et al.* (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. *J Virol* **80**, 6691-6696.
- Florin, L., Becker, K.A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Muller, M., *et al.* (2004). Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol* **78**, 5546-5553.
- Florin, L., Sapp, C., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2002a). Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* **76**, 10009-10014.
- Florin, L., Schafer, F., Sotlar, K., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2002b). Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology* **295**, 97-107.
- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B. and Galloway, D.A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**, 2090-2100.
- Geisler, S.B., Robinson, D., Hauringa, M., Raeker, M.O., Borisov, A.B., Westfall, M.V. and Russell, M.W. (2007). Obscurin-like 1, OBSL1, is a novel cytoskeletal protein related to obscurin. *Genomics* **89**, 521-531.
- Ghosh, T.K., Packham, E.A., Bonser, A.J., Robinson, T.E., Cross, S.J. and Brook, J.D. (2001). Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 1983-1994.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E. and Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**, 1565-1570.
- Gloss, B., Bernard, H.U., Seedorf, K. and Klock, G. (1987). The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J* **6**, 3735-3743.
- Gornemann, J., Hofmann, T.G., Will, H. and Muller, M. (2002). Interaction of human papillomavirus type 16 L2 with cellular proteins: identification of novel nuclear body-associated proteins. *Virology* **303**, 69-78.
- Graser, S., Stierhof, Y.D. and Nigg, E.A. (2007). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J Cell Sci* **120**, 4321-4331.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K.U. and Iftner, T. (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol* **70**, 2339-2349.
- Greber, U.F. and Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell* **124**, 741-754.
- Gu, Z. and Matlashewski, G. (1995). Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity. *J Virol* **69**, 8051-8056.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791-803.
- Habura, A., Tikhonenko, I., Chisholm, R.L. and Koonce, M.P. (1999). Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains. *J Biol Chem* **274**, 15447-15453.
- He, M., Wen, L., Campbell, C.E., Wu, J.Y. and Rao, Y. (1999). Transcription repression by Xenopus ET and its human ortholog TBX3, a gene involved in ulnar-mammary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10212-10217.
- Heilman, C.A., Engel, L., Lowy, D.R. and Howley, P.M. (1982). Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells. *Virology* **119**, 22-34.
- Ho, G.Y., Studentsov, Y., Hall, C.B., Bierman, R., Beardsley, L., Lempa, M. and Burk, R.D. (2002). Risk factors for subsequent cervicovaginal human papillomavirus (HPV)

- infection and the protective role of antibodies to HPV-16 virus-like particles. *J Infect Dis* **186**, 737-742.
- Holzbaur, E.L. and Vallee, R.B. (1994). DYNEINS: molecular structure and cellular function. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 339-372.
- Horikawa, I. and Barrett, J.C. (2003). Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* **24**, 1167-1176.
- Hummel, M., Hudson, J.B. and Laimins, L.A. (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* **66**, 6070-6080.
- Jacobs, J.J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P.M., *et al.* (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* **26**, 291-299.
- Jung, Y., Kim, H., Min, S.H., Rhee, S.G. and Jeong, W. (2008). Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kappaB through the redox-dependent interaction with IkappaBalpha. *J Biol Chem* **283**, 23863-23871.
- Kamper, N., Day, P.M., Nowak, T., Selinka, H.C., Florin, L., Bolscher, J., *et al.* (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* **80**, 759-768.
- Kanazawa, S., Driscoll, M. and Struhl, K. (1988). ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol Cell Biol* **8**, 664-673.
- Karin, M. (1990). Too many transcription factors: positive and negative interactions. *New Biol* **2**, 126-131.
- Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. and Kanda, T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* **75**, 2331-2336.
- Kieback, E. and Muller, M. (2006). Factors influencing subcellular localization of the human papillomavirus L2 minor structural protein. *Virology* **345**, 199-208.
- King, M., Arnold, J.S., Shanske, A. and Morrow, B.E. (2006). T-genes and limb bud development. *Am J Med Genet A* **140**, 1407-1413.
- Kispert, A. and Hermann, B.G. (1993). The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* **12**, 4898-4899.
- Kispert, A., Koschorz, B. and Herrmann, B.G. (1995). The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J* **14**, 4763-4772.
- Knappe, M., Bodevin, S., Selinka, H.C., Spillmann, D., Streeck, R.E., Chen, X.S., *et al.* (2007). Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **282**, 27913-27922.
- Koyama, S., Ishii, K.J., Coban, C. and Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine* **43**, 336-341.
- Kukimoto, I., Takeuchi, T. and Kanda, T. (2006). CCAAT/enhancer binding protein beta binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16. *Virology* **346**, 98-107.
- Lambert, P.F. (1991). Papillomavirus DNA replication. *J Virol* **65**, 3417-3420.
- Lancaster, W.D., Olson, C. and Meinke, W. (1977). Bovine papilloma virus: presence of virus-specific DNA sequences in naturally occurring equine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 524-528.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* **6**, 6447-6454.
- Leder, C., Kleinschmidt, J.A., Wiethe, C. and Muller, M. (2001). Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J Virol* **75**, 9201-9209.

- Lederer, M., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (2005). Profilin regulates the activity of p42POP, a novel Myb-related transcription factor. *J Cell Sci* **118**, 331-341.
- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G.V. and Choe, J. (1999). Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA. *Nature* **399**, 487-491.
- Leopold, P.L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K.K., Rodriguez-Boulan, E. and Crystal, R.G. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* **11**, 151-165.
- Li, A., Saito, M., Chuang, J.Z., Tseng, Y.Y., Dedesma, C., Tomizawa, K., *et al.* (2011). Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* **13**, 402-411.
- Li, Q.Y., Newbury-Ecob, R.A., Terrett, J.A., Wilson, D.I., Curtis, A.R., Yi, C.H., *et al.* (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* **15**, 21-29.
- Liao, C.J., Wu, T.I., Huang, Y.H., Chang, T.C., Wang, C.S., Tsai, M.M., *et al.* (2011). Overexpression of gelsolin in human cervical carcinoma and its clinicopathological significance. *Gynecol Oncol* **120**, 135-144.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (1998). Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* **273**, 24979-24982.
- Lingbeek, M.E., Jacobs, J.J. and van Lohuizen, M. (2002). The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem* **277**, 26120-26127.
- Liu, W.K., Jiang, X.Y. and Zhang, Z.X. (2010). Expression of PSCA, PIWIL1 and TBX2 and its correlation with HPV16 infection in formalin-fixed, paraffin-embedded cervical squamous cell carcinoma specimens. *Arch Virol* **155**, 657-663.
- Lo, K.W., Kogoy, J.M. and Pfister, K.K. (2007a). The DYNLT3 light chain directly links cytoplasmic dynein to a spindle checkpoint protein, Bub3. *J Biol Chem* **282**, 11205-11212.
- Lo, K.W., Kogoy, J.M., Rasoul, B.A., King, S.M. and Pfister, K.K. (2007b). Interaction of the DYNLT (TCTEX1/RP3) light chains and the intermediate chains reveals novel intersubunit regulation during assembly of the dynein complex. *J Biol Chem* **282**, 36871-36878.
- Longworth, M.S. and Laimins, L.A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 362-372.
- Loo, Y.M. and Melendy, T. (2004). Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* **78**, 1605-1615.
- Lu, J., Li, X.P., Dong, Q., Kung, H.F. and He, M.L. (2010). TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets. *Biochim Biophys Acta* **1806**, 268-274.
- Lyng, H., Brovig, R.S., Svendsrud, D.H., Holm, R., Kaalhus, O., Knutstad, K., *et al.* (2006). Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics* **7**, 268.
- Makokha, M., Hare, M., Li, M., Hays, T. and Barbar, E. (2002). Interactions of cytoplasmic dynein light chains Tctex-1 and LC8 with the intermediate chain IC74. *Biochemistry* **41**, 4302-4311.
- Marusic, M.B., Mencin, N., Lichen, M., Banks, L. and Grm, H.S. (2010). Modification of human papillomavirus minor capsid protein L2 by sumoylation. *J Virol* **84**, 11585-11589.
- Maytin, E.V., Lin, J.C., Krishnamurthy, R., Batchvarova, N., Ron, D., Mitchell, P.J. and Habener, J.F. (1999). Keratin 10 gene expression during differentiation of mouse epidermis requires transcription factors C/EBP and AP-2. *Dev Biol* **216**, 164-181.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M. and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* **159**, 441-452.
- Meyers, C., Frattini, M.G., Hudson, J.B. and Laimins, L.A. (1992). Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science* **257**, 971-973.

- Minguillon, C. and Logan, M. (2003). The comparative genomics of T-box genes. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**, 224-233.
- Mok, Y.K., Lo, K.W. and Zhang, M. (2001). Structure of Tctex-1 and its interaction with cytoplasmic dynein intermediate chain. *J Biol Chem* **276**, 14067-14074.
- Mueller, S., Cao, X., Welker, R. and Wimmer, E. (2002). Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J Biol Chem* **277**, 7897-7904.
- Muller, M., Gissmann, L., Cristiano, R.J., Sun, X.Y., Frazer, I.H., Jenson, A.B., *et al.* (1995). Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* **69**, 948-954.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Munoz, N., Bosch, F.X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., *et al.* (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* **111**, 278-285.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., *et al.* (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**, 518-527.
- Nagano, F., Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., *et al.* (1998). Interaction of Doc2 with tctex-1, a light chain of cytoplasmic dynein. Implication in dynein-dependent vesicle transport. *J Biol Chem* **273**, 30065-30068.
- Nam, J.S., Hirohashi, S. and Wakefield, L.M. (2007). Dysadherin: a new player in cancer progression. *Cancer Lett* **255**, 161-169.
- Narisawa-Saito, M. and Kiyono, T. (2007). Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* **98**, 1505-1511.
- Nelson, L.M., Rose, R.C. and Moroianu, J. (2002). Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* **277**, 23958-23964.
- Okoye, A., Cordano, P., Taylor, E.R., Morgan, I.M., Everett, R. and Campo, M.S. (2005). Human papillomavirus 16 L2 inhibits the transcriptional activation function, but not the DNA replication function, of HPV-16 E2. *Virus Res* **108**, 1-14.
- Okun, M.M., Day, P.M., Greenstone, H.L., Booy, F.P., Lowy, D.R., Schiller, J.T. and Roden, R.B. (2001). L1 interaction domains of papillomavirus L2 necessary for viral genome encapsidation. *J Virol* **75**, 4332-4342.
- Papaioannou, V.E. and Silver, L.M. (1998). The T-box gene family. *Bioessays* **20**, 9-19.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M.R. and Mohr, I.J. (1994). The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8700-8704.
- Parkin, D.M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**, 3030-3044.
- Paschal, B.M., Shpetner, H.S. and Vallee, R.B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol* **105**, 1273-1282.
- Paxton, C., Zhao, H., Chin, Y., Langner, K. and Reecy, J. (2002). Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription. *Gene* **283**, 117-124.
- Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., *et al.* (2003). Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J Cell Sci* **116**, 3433-3442.
- Pfister, K.K., Shah, P.R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A.A., *et al.* (2006). Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genet* **2**, e1.
- Pflugfelder, G.O., Roth, H. and Poeck, B. (1992). A homology domain shared between *Drosophila* optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* **186**, 918-925.

- Plageman, T.F., Jr. and Yutzey, K.E. (2005). T-box genes and heart development: putting the "T" in heart. *Dev Dyn* **232**, 11-20.
- Prince, S., Carreira, S., Vance, K.W., Abrahams, A. and Goding, C.R. (2004). Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* **64**, 1669-1674.
- Pyeon, D., Pearce, S.M., Lank, S.M., Ahlquist, P. and Lambert, P.F. (2009). Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog* **5**, e1000318.
- Rasalingam, P., Rossiter, J.P., Mebatsion, T. and Jackson, A.C. (2005). Comparative pathogenesis of the SAD-L16 strain of rabies virus and a mutant modifying the dynein light chain binding site of the rabies virus phosphoprotein in young mice. *Virus Res* **111**, 55-60.
- Reddy, V.B., Dhar, R. and Weissman, S.M. (1978). Nucleotides sequence of the genes for the simian virus 40 proteins VP2 and VP3. *J Biol Chem* **253**, 621-630.
- Richards, R.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T. and Day, P.M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1522-1527.
- Roberts, A.J., Numata, N., Walker, M.L., Kato, Y.S., Malkova, B., Kon, T., et al. (2009). AAA+ Ring and linker swing mechanism in the dynein motor. *Cell* **136**, 485-495.
- Roden, R.B., Kirnbauer, R., Jenson, A.B., Lowy, D.R. and Schiller, J.T. (1994). Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* **68**, 7260-7266.
- Roninson, I.B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* **63**, 2705-2715.
- Rose, B., Steger, G., Dong, X.P., Thompson, C., Cossart, Y., Tattersall, M. and Pfister, H. (1998). Point mutations in SP1 motifs in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol* **79 (Pt 7)**, 1659-1663.
- Rosl, F., Westphal, E.M. and zur Hausen, H. (1989). Chromatin structure and transcriptional regulation of human papillomavirus type 18 DNA in HeLa cells. *Mol Carcinog* **2**, 72-80.
- Rowley, M., Grothey, E. and Couch, F.J. (2004). The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**, 109-118.
- Roy Chowdhuri, S., Crum, T., Woollard, A., Aslam, S. and Okkema, P.G. (2006). The T-box factor TBX-2 and the SUMO conjugating enzyme UBC-9 are required for ABA-derived pharyngeal muscle in *C. elegans*. *Dev Biol* **295**, 664-677.
- Russo, S., Berkovitz Siman-Tov, R. and Poli, G. (1995). Yeasts: from genetics to biotechnology. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **14**, 133-157.
- Ryan, A.K. and Rosenfeld, M.G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev* **11**, 1207-1225.
- Sapp, M. and Bienkowska-Haba, M. (2009). Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J* **276**, 7206-7216.
- Schafer, F., Florin, L. and Sapp, M. (2002). DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo. *Virology* **295**, 172-181.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136.
- Schuck, S. and Stenlund, A. (2005). Role of papillomavirus E1 initiator dimerization in DNA replication. *J Virol* **79**, 8661-8664.
- Schwartz, S. (2008). HPV-16 RNA processing. *Front Biosci* **13**, 5880-5891.
- Schwarz, E., Durst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., Zech, R., Wolfsperger, E., et al. (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J* **2**, 2341-2348.

- Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. and zur Hausen, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-114.
- Schwarzer, C., Barnikol-Watanabe, S., Thinnes, F.P. and Hilschmann, N. (2002). Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1059-1070.
- Schweiger, M.R., Ottinger, M., You, J. and Howley, P.M. (2007). Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. *J Virol* **81**, 9612-9622.
- Seitz, C.S., Lin, Q., Deng, H. and Khavari, P.A. (1998). Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2307-2312.
- Selinka, H.C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N.D. and Sapp, M. (2003). Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol* **77**, 12961-12967.
- Selinka, H.C., Giroglou, T. and Sapp, M. (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**, 279-287.
- Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K. and Kirnbauer, R. (2003). Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* **77**, 13125-13135.
- Sherr, C.J. and Weber, J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 94-99.
- Shih, H.M., Chang, C.C., Kuo, H.Y. and Lin, D.Y. (2007). Daxx mediates SUMO-dependent transcriptional control and subnuclear compartmentalization. *Biochem Soc Trans* **35**, 1397-1400.
- Shope, R.E. and Hurst, E.W. (1933). Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med* **58**, 607-624.
- Showell, C., Binder, O. and Conlon, F.L. (2004). T-box genes in early embryogenesis. *Dev Dyn* **229**, 201-218.
- Sinha, S., Abraham, S., Gronostajski, R.M. and Campbell, C.E. (2000). Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2. *Gene* **258**, 15-29.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W. and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* **136**, 1007-1021.
- Song, J., Tyler, R.C., Lee, M.S., Tyler, E.M. and Markley, J.L. (2005). Solution structure of isoform 1 of Roadblock/LC7, a light chain in the dynein complex. *J Mol Biol* **354**, 1043-1051.
- Sosinsky, A., Bonin, C.P., Mann, R.S. and Honig, B. (2003). Target Explorer: An automated tool for the identification of new target genes for a specified set of transcription factors. *Nucleic Acids Res* **31**, 3589-3592.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C. and Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One* **3**, e3313.
- Stubenrauch, F. and Laimins, L.A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol* **9**, 379-386.
- Suikkanen, S., Aaltonen, T., Nevalainen, M., Valilehto, O., Lindholm, L., Vuento, M. and Vihinen-Ranta, M. (2003). Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* **77**, 10270-10279.
- Tai, A.W., Chuang, J.Z., Bode, C., Wolfrum, U. and Sung, C.H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* **97**, 877-887.
- Tanner, W. and Lehle, L. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta* **906**, 81-99.
- Thierry, F. (2009). Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* **384**, 375-379.

- Tynan, S.H., Gee, M.A. and Vallee, R.B. (2000). Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *J Biol Chem* **275**, 32769-32774.
- Um, S.J., Rhyu, J.W., Kim, E.J., Jeon, K.C., Hwang, E.S. and Park, J.S. (2002). Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett* **179**, 205-212.
- Vale, R.D. and Milligan, R.A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**, 88-95.
- Valle, G.F. and Banks, L. (1995). The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol* **76 (Pt 5)**, 1239-1245.
- Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D. and Barnhart, L.E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* **58**, 189-200.
- Vance, K.W., Shaw, H.M., Rodriguez, M., Ott, S. and Goding, C.R. (2010). The retinoblastoma protein modulates Tbx2 functional specificity. *Mol Biol Cell* **21**, 2770-2779.
- Volpers, C., Sapp, M., Snijders, P.J., Walboomers, J.M. and Streeck, R.E. (1995). Conformational and linear epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 identified by monoclonal antibodies to the minor capsid protein L2. *J Gen Virol* **76 (Pt 11)**, 2661-2667.
- Vormer, T.L., Fojijer, F., Wielders, C.L. and te Riele, H. (2008). Anchorage-independent growth of pocket protein-deficient murine fibroblasts requires bypass of G2 arrest and can be accomplished by expression of TBX2. *Mol Cell Biol* **28**, 7263-7273.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., *et al.* (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**, 12-19.
- Waldman, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* **55**, 5187-5190.
- Wanschers, B., van de Vorstenbosch, R., Wijers, M., Wieringa, B., King, S.M. and Fransen, J. (2008). Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**, 183-196.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Williams, J.C., Xie, H. and Hendrickson, W.A. (2005). Crystal structure of dynein light chain TcTex-1. *J Biol Chem* **280**, 21981-21986.
- Wilson, R., Fehrmann, F. and Laimins, L.A. (2005). Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **79**, 6732-6740.
- Wilson, V. and Conlon, F.L. (2002). The T-box family. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3008.
- Wu, D., Qiao, Y., Kristensen, G.B., Li, S., Troen, G., Holm, R., *et al.* (2004). Prognostic significance of dysadherin expression in cervical squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* **10**, 212-218.
- Yarosh, W., Barrientos, T., Esmailpour, T., Lin, L., Carpenter, P.M., Osann, K., *et al.* (2008). TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res* **68**, 693-699.
- Yeh, T.Y., Chuang, J.Z. and Sung, C.H. (2005). Dynein light chain rp3 acts as a nuclear matrix-associated transcriptional modulator in a dynein-independent pathway. *J Cell Sci* **118**, 3431-3443.
- You, J., Croyle, J.L., Nishimura, A., Ozato, K. and Howley, P.M. (2004). Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* **117**, 349-360.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J.W. and Jansen-Durr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**, 2323-2330.
- Zhang, M., Wang, R., Wang, Y., Diao, F., Lu, F., Gao, D., *et al.* (2009). The CXXC finger 5 protein is required for DNA damage-induced p53 activation. *Sci China C Life Sci* **52**, 528-538.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP1	Aktivator Protein 1 (<i>Activator Protein 1</i>)
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BPV	Bovines Papillomvirus
BSA	Bovines Serum Albumin
CD63/151	Ko-Rezeptoren (<i>cluster of differentiation</i>)
CDKs	Zyklin-abhängige Kinasen (<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i>)
CIP	Kälberdarmphosphatase (<i>Calf Intestinal Phosphatase</i>)
CMV	Cytomegalovirus
CRPV	Kaninchen Papillomvirus (<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
DBD	DNA-Bindedomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
DYNC1H1	schwere Kette des Dyneinkomplexes (<i>Cytoplasmatic Dynein 1 Heavy Chain</i>)
DYNC1I1	mittelschwere Kette (<i>Cytoplasmatic Dynein 1 Intermediate Chain</i>)
DYNC1LI	leichte mittelschwere Kette (<i>Cytoplasmatic Dynein 1 Light Intermediate Chain</i>)
DYNLL1	leichte Kette LC8 (<i>Cytoplasmatic Dynein Light Chain LC8</i>)
DYNLRB	leichte Kette Roadblock (<i>Cytoplasmatic Dynein Light Chain Roadblock</i>)
DYNLT1	leichte Kette Tctex-1 (<i>Cytoplasmatic Dynein Tctex-1 Light Chain</i>)
DYNLT3	leichte Kette rp3 (<i>Cytoplasmatic Dynein rp3 Light Chain</i>)
E	früh (<i>early</i>) exprimiertes Protein
E2F	Eukaryotischer Transkriptionsfaktor (<i>Eukaryotic Transcription Factor</i>)
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf serum</i>)
g	relative Erdbeschleunigung = 9,80665 m x s ⁻¹
G2-Phase	Pausen-Phase (<i>Gap</i>)
β-Gal	β-Galaktosidase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
His	Histidin

HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HPV	Humanes Papillomvirus
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HSV	Herpes Simplex Virus
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
IRF	Interferon-regulierender Faktor (Interferon Regulatory Factor)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	spät (<i>late</i>) exprimiertes Protein
LCR	Kontrollregion (<i>Long Control Region</i>)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LiAc	Lithium-Acetat
Leu	Leucin
M	Molarität (mol / l)
ME	Mercaptoethanol
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex I (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minute(n)
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
NaF	Natriumfluorid
ND10	Nukleäre Domänen 10 (<i>Nuclear Domain 10</i>)
NFI	Zellkern Faktor (<i>Nuclear Factor I</i>)
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
NP40	Nonidet-40
N-Terminus	Aminoterminus
Oct-1	Transkriptionsfaktor mit POU-Domäne (<i>Pou Domain Transcription Factor 1</i>)
OD	Optische Dichte
Omb	<i>Drosophila melanogaster</i> -Gen (<i>Optomotor Blind</i>)
Ori	Replikationsursprung (<i>Origin of Replication</i>)
ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
p14/21/53	Protein 14/21/53
p97	früher HPV16-Promotor, Start bei Base 97
p670	später HPV16-Promotor, Start bei Base 670
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PML	Protein der promyelotischen Leukämie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressor Protein
pUL9/34/35	Herpes-Simplex-Virus Protein UL9/34/35 (<i>Unique-Long</i>)
PsV	Pseudoviren/Pseudovirionen
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	Replikationsprotein A (<i>Replication Protein A</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rotations / Rounds per Minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
sek	Sekunde(n)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthesephase
SP-1	Spezifitätsprotein (<i>Specificity Protein</i>)
SV40	Affen- (Simian) Virus 40
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	T-box Binde-Element
TBP	Tata-Box-Bindeprotein (<i>Tatabox Binding Protein</i>)
TBX	T-Box Protein
TE	Tris-EDTA
TEF-1/-2	Transkriptionsverstärkender Faktor (<i>Transcriptional Enhancer Factor</i>)
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
VLP	Virusähnliches Partikel (<i>Virus-Like Particles</i>)
v / v	Volume per Volume
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w / v	Gewichtseinheit pro Volumen
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein (<i>Yellow Fluorescence Protein</i>)
YY1	Yin und Yang 1 Protein
Zeo	Zeocin

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Marc Andre Schneider, gemäß § 11, Absatz 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990, dass ich die heute als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben habe. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe.

Mainz, den2011

.....

(Marc Schneider)