

Untersuchung der TNF-a** vermittelten IFN-**b**
Signaltransduktion in malignen und nicht-malignen HPV
positiven Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Anastasia Bachmann, geb. in Sontheim

Mainz, Juli 2001

Dekan:

1. Berichterstatter
2. Berichterstatter

Tag der mündlichen Prüfung 18.10.2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorveröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

18 th International Papillomavirus Conference, HPV 2000, Barcelona:

Poster und Vortrag:

Bachmann A., Zawatzky R., zur Hausen H., Rösl F.,: Dysregulation of the interferon- β pathway in malignant and non-malignant HPV-18 positive cells: functional reconstitution in non-tumorigenic somatic cell hybrids

19 th International Papillomavirus Conference, HPV 2001, Florianopolis

Abstract eingereicht für Poster und Vortrag:

Anastasia Bachmann, Rainer Zawatzky, Ubaldo Soto, Jan van Riggelen, Harald zur Hausen and Frank Rösl (2001): Disturbance of TNF- α -mediated interferon- β signalling in cervical carcinoma cells.

Publikation:

Anastasia Bachmann, Rainer Zawatzky, Ubaldo Soto, Jan van Riggelen, Brigitte Hanke, Harald zur Hausen and Frank Rösl (2001): Disturbance of TNF- α -mediated interferon- β signalling in cervical carcinoma cells.

Eingereicht „Journal of Virology“

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	I
1. EINLEITUNG	1
1.1 Humane Papillomviren (HPV)	1
1.2 Genomische Organisation und Replikation der Papillomviren	2
1.3 Mehrstufenkonzept der Karzinogenese	3
1.4 Die Onkogene E6 und E7	4
1.5 Interferone	5
1.5.1 Biologische Funktionen der Interferone	6
1.6 Signaltransduktion der Interferone	7
1.6.1 Signaltransduktion durch Typ I Interferone	8
1.6.2 Signaltransduktion durch Typ II Interferone	9
1.6.3 Die Familie der "Interferon Regulatory Factors" (IRF)	10
1.7 Virale Strategien gegen zelluläres Interferon	11
1.8 Interferone und HPV	14
1.9 Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL	15
2.1 Chemikalien und Reagenzien	15
2.2 Reagenzien für die Zellkultur	16
2.3 Enzyme	16
2.4 Größenstandards	17
2.5 Antikörper	17
2.6 Primer	18
2.7 Oligonukleotide für Elektromobilitäts-Shifts	18
2.8 cDNA	19
2.9 „Kits“	19
2.10 Lösungen	19
2.11 Medien und Lösungen für die Zell- und Bakterienkultur	23
2.12 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	24
2.13 Geräte	25
2.14 Zelllinien	25
2.15 Bakterien	26
3. METHODEN	27
3.1 Präparation von DNA-Sonden	27
3.1.1 Transformation kompetenter Bakterien	27
3.1.2 Herstellung von Glycerinkulturen	27
3.1.3 Vorkulturen	27
3.2 Zellkulturtechniken	27
3.2.1 Auftauen von Zellen	27
3.2.2 Stammhaltung von Zellen	28
3.2.3 Aussaat von Zellen für Versuche	28
3.2.4 Einfrieren von Zellen	28
3.3 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	29
3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA	29
3.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	29
3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Maxi-prep-Kit	29

3.3.1.3	Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	30
3.3.1.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
3.3.2	Isolierung von RNA	30
3.3.2.1	Kern-Zytoplasmentrennung	30
3.3.2.2	RNA-Isolierung mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen	31
3.3.3	Vermessen von Nukleinsäuren	31
3.3.4	Gelelektrophorese und Transfer von Nukleinsäuren	31
3.3.4.1	Gelelektrophorese und Transfer von DNA (Southern blot)	32
3.3.4.2	Gelelektrophorese und Transfer von RNA (Northern blot)	33
3.3.5	Hybridisierung (Southern, 1975)	33
3.3.5.1	Radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde	33
3.3.5.2	Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde	34
3.3.5.3	Hybridisierung der Filter	34
3.3.5.4	Autoradiographie	35
3.3.6	Reverse Transkription von RNA	35
3.3.6.1	DNase-Verdau von RNA	35
3.3.6.2	Reverse Transkription der RNA	36
3.3.7	PCR	37
3.3.7.1	PCR-Reaktion	37
3.4	Analyse von Proteinen	38
3.4.1	Proteinisolierung	38
3.4.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine	39
3.4.3	Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese	39
3.4.3.1	Präparation des Gels	40
3.4.3.2	Vorbereiten der Proben und Elektrophorese	40
3.4.4	Western Blot	41
3.4.5	Ponceau-Rotfärbung	41
3.4.6	Blockierung der Membran	42
3.4.7	Nachweis durch spezifische Antikörper	42
3.4.8	Strippen und Lagerung der Membranen	42
3.5	Elektromobilitäts-Shift-Analysen (EMSA)	42
3.5.1	Annealing des Oligonukleotides	43
3.5.2	Markierung und Aufreinigung des Oligonukleotids	43
3.5.3	EMSA-Reaktion und Gelelektrophorese	43
3.6	Methoden zur Analyse von Interferon	44
3.6.1	Permissivitätsanalyse der Zellen	44
3.6.2	Analyse der Virusprotektion	45
3.6.2.1	Standardvirusprotektionanalyse mit EMCV oder VSV	45
3.6.2.2	Dokumentation und Berechnung der Virusprotection	47
3.6.2.3	Neutralisationsanalyse	48
3.6.2.4	Protektionsanalysen mit Signaltransduktionsinhibitoren	48
3.6.3	Bestimmung von Interferonen im Medium	48
3.7	Tumorigenitätsanalyse in Nacktmäusen	49
4.	ERGEBNISSE	50
4.1	Induktion von Interferon β (IFN- β) durch TNF- α in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV16/18 positiven Zellen	50
4.1.1	Sensitivität im Stanbridge-Systems gegenüber Typ I und Typ II IFN	50
4.1.2	Induktion von endogenem IFN- β in anderen HPV16\18 positiven Zervixkarzinomzelllinien und in daraus abgeleiteten Hybriden	55

4.1.3 Die exogene Supplementation von Typ I und Typ II Interferonen induziert eine virale Protektion in HPV16/18 positiven Zellen und in daraus abgeleiteten Hybriden	58
4.2 Der IFN- β Promotor	61
4.2.1 Die Induktion von NF κ B durch TNF- α ist in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen gleich reguliert	62
4.2.2 Analyse des ATF-2/c-jun Heterodimers in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen	62
4.2.3 Die Blockierung der p38 MAPKinase resultiert im Verlust der Protektion durch TNF- α	65
4.2.4 Analyse der Induzierbarkeit der IRF-Proteinfamilie in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen	68
4.2.5 Untersuchung der IRF-1 und p48 Expression in tumorigenen und nicht-tumorigenen somatischen Zellhybriden	73
4.3 Isolierung und Charakterisierung der biologischen Eigenschaften von EMCV-Revertanten	77
4.3.1 Isolierung der HeLa-EMCV Revertanten	77
4.3.2 Permissivität der isolierten Revertanten für das EMC-Virus	78
4.3.3 Analyse der EMCV-Persistenz in den Revertanten	79
4.3.4 Expressionanalyse von IRF-1, -2 und p48 in den HeLa-EMCV-Zellen	80
4.4.5 Nachweis der HPV18 Expression	83
4.4.6 Tumorigenitätsanalysen in der Nacktmaus	84
5. DISKUSSION	86
5.1 IFN- β Expression und immunologische „escape“ Mechanismen: allgemeine Aspekte	86
5.2 Induktion des viralen Schutzes durch exogen supplementiertes Interferon	87
5.3 Induktion von endogenem IFN- β	88
5.4 Signaltransduktion durch TNF- α und Induktion der IFN- β Transkription	91
5.4.1 Die Transkriptionsfaktoren NF κ B und ATF-2/c-jun	91
5.4.2 Mitogenaktivierte Proteinkinasen	92
5.4.3 Die IRF-Proteinfamilie	92
5.4.3.1 IRF-3 und IRF-7	92
5.4.3.2 IRF-1 und p48	93
5.4.3.3 IRF-2	95
5.5 Molekulare Eigenschaften der HeLa-EMCV Klone	96
6. ZUSAMMENFASSUNG	98
7. LITERATUR	99

ANHANG:

Danksagung

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2'5' A	2'5' Oligoadenylate
Abb.1.1	Abbildung (Kapitel 1. Abbildung 1)
Ad	Adenovirus
AP1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATF-2	Activating Transcription Factor 2
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
c-jun	Cellular Jun (aus Avian Sarcoma Virus 17, ju-na na =17, jap.)
c-fos	Cellular Fos (aus Finkel Biskis Jenkins Osteosacroma Virus)
Ci	Curie
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CPE	C ytopathic E ffects
dATP	Desoxy-Adenosin-triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidin-triphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleotid-triphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylen-glycol-tetraacetat
eIF2	E ukaryontischer I nitiationsfaktor 2
ELISA	Enzyme linked immunoabsorbent assay
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
ERK	Extracellular signal responsive kinase
FKS	Fötale Kälberserum
Fra-1	Fos related antigen 1
GAF	Interferon Gamma Activated Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Interferon G amma A ctivates S ite
h	Stunde
HIV	Human Immundeficiency Virus
HPV	Humaner Papillomvirus
HSV	Herpes Simplex Virus
ICSBP	Interferon Consensus Sequence Binding Protein
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon Alpha Receptor (Untereinheit)
IRF	Interferon Regulatory Factor
IFNGR	Interferon Gamma Receptor (Untereinheit)

ISG	Interferon Stimulated Gen
ISGF-3	Interferon Stimulated Factor 3
ISRE	Interferon- α stimulierte Response-Elemente
Jak1	Januskinase 1
JNK	N-terminale Jun-Kinase
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
M	Mol
mA	Mili-Ampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
min	Minute
ml	Mili-Liter
m.o.i.	Multiplicity Of Infection
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA
NF κ B	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet-P40
NRD	Negative Regulatory Domain
NRF	NF κ B Repressing Factor
OAS	Oligoandenylat Synthetase
OD	Optische Dichte
OLB	Oligo Labeling Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-Benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid
PKR	Protein Kinase R
PRD	Positive Regulatory Domain
PVDF	Polyvinylidonfluorid
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Stat	Signal Transducer and Activator of Transkription
TEMED	Tetramethylendiamin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	Transfer RNA
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan monolaurat
Tyk2	Thyrosinkinase 2
Upm	Umdrehungen pro Minute
URR	Upstream Regulatory Region
V	Volt
vIRF	viral Interferon Regulatory Factor
VSV	Vesikular Stomatitis Virus
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Humane Papillomviren (HPV)

Die Entdeckung, daß Bakterien die Auslöser verschiedener Erkrankungen, wie z. B. Milzbrand, Diphtherie, Typhus und Tuberkulose sind, hat zu der Annahme geführt, daß auch bei Erkrankungen, wie Rheuma und Krebs Infektionen die Basis bilden (zur Hausen, 1996).

Die Korrelation eines humanen Tumors mit einer Virusinfektion gelang jedoch erst 1964, als Epstein unter dem Elektronenmikroskop virale Partikel in isolierten Lymphoblasten aus einem B-Zell-Lymphom identifizierte. Neben dem Epstein-Barr Virus wurden in den vergangenen Jahren weitere Viren wie das humane T-Lymphotrope Retrovirus (HLTV), das Hepatitis B Virus (HBV) sowie das humane Papilloma Virus (HPV) als Verursacher humaner Tumore identifiziert. Das Zervixkarzinom ist eine der häufigsten Krebserkrankungen von Frauen weltweit. Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß 95% der Zervixkarzinome mit HPV assoziiert sind (Gissmann *et al.*, 1984; Syrjänen *et al.*, 1987; van den Brule *et al.*, 1990; Bosch *et al.*, 1995). Bisher wurden mehr als 100 Viren identifiziert, die zu dieser Gruppe gehören (de Villiers, 1994; zur Hausen, 2000). Die unterschiedlichen HPV-Typen infizieren teilungsfähige Basalzellen der Haut (kutane HPV-Typen) und der Schleimhaut (HPV-Typen der Mukosa), wobei der produktive Zyklus der Viren in den oberen Epithelschichten stattfindet (Stoler *et al.*, 1989; Schneider und Koutsky, 1992). Die kutanen HPV-Typen (HPV1, HPV2, HPV4 und HPV7) verursachen häufig gutartige Proliferationen und führen zur Warzenbildung (Favre *et al.*, 1975; Jablonska *et al.*, 1987; Inaba *et al.*, 1993). Eine seltene Erkrankung, die durch HPV5 und HPV8 verursacht wird, ist die *Epidermodysplasia verruciformis*, die mit multipler Warzenbildung verbunden ist. Sie tritt in immunsupprimierten Patienten oder bei genetischer Prädisposition auf. An sonnenexponierten Stellen kommt es häufig zu einer Entartung der Warzen (Orth *et al.*, 1978, 1986; Jablonska und Majewski, 1994). Die HPV-Typen der Mukosa lassen sich in eine Gruppe, die den Anogenitalbereich infizieren, sowie in Viren, die sich auf die Schleimhäute anderer Organe spezialisiert haben, z. B. Mundhöhle (de Villiers *et al.*, 1985; Löning *et al.*, 1985), Ösophagus (Syrjänen, 1982), Larynx (Kahn *et al.*, 1986; Scheuerlen *et al.*, 1986), untergliedern. Die meisten genitalen HPV-Typen wurden im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom identifiziert, dazu gehören unter anderem HPV16 (Dürst *et al.*, 1983) HPV18 (Boshart *et al.*, 1984), HPV31 (Goldsborough *et al.*, 1989), HPV33 (Cole und Streeck, 1986), HPV35 (Lörincz *et al.*, 1987), HPV39 (Beaudenon *et al.*, 1987), HPV45 (Ngelangel *et al.*, 1998), HPV52 (Shimoda *et al.*, 1989) sowie HPV56 (Lörincz *et al.*, 1989). Auch HPV6 und HPV11 gehören in diese Gruppen, jedoch werden sie selten im Zusammenhang mit Tumoren gefunden (Laimins, 1996).

1.2 Genomische Organisation und Replikation der Papillomviren

Die humanen Papillomviren gehören zur Familie der Papovaviridae. Sie verfügen über ein doppelsträngiges, zirkulär geschlossenes DNA-Genom, welches mit zellulären Histonen assoziiert vorliegt (Favre *et al.*, 1977; Pfister und zur Hausen, 1978; Rösl *et al.*, 1983). Das

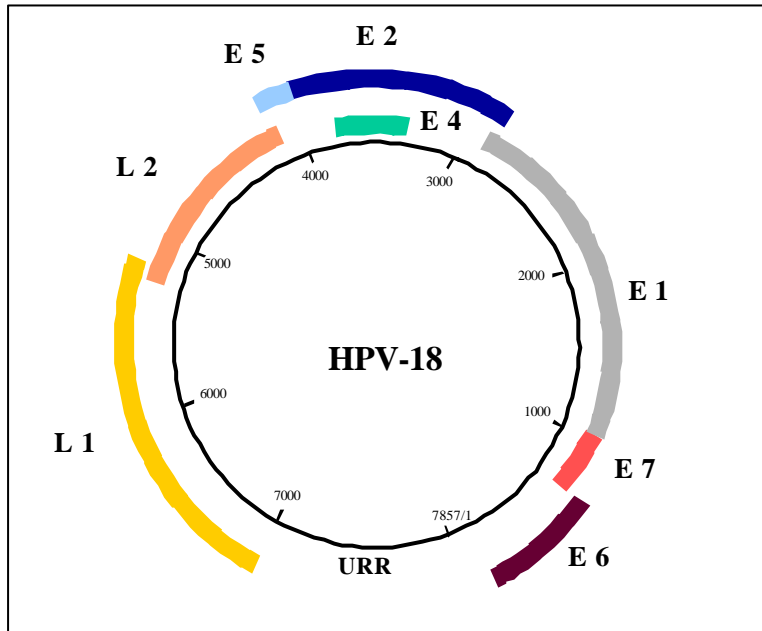


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des HPV-Genoms
E1-E7 = offene Leseraster der „frühen“ Gene, L1, L2 = Offene Leseraster der „späten“ Gene, URR = „upstream regulatory region“. Die Nukleotide wurden von 1-7857 durchnummeriert

ikosaedrische Kapsid verfügt über einen Durchmesser von 55 nm und besteht aus 72 Kapsomeren, die aus den viralen Strukturproteinen L1 und L2 aufgebaut werden. Das Kapsid ist nicht von einer Membran umgeben (Klug und Finch, 1965). Die Genomorganisation ist bei allen Papillomviren ähnlich und wird in Abb. 1.1 beispielhaft für HPV-18 dargestellt. Nur einer der beiden DNA-Stränge ist kodierend, so daß die Transkription in einer Richtung erfolgt (Chen *et al.*, 1982; Danos *et al.*, 1982).

Funktionell läßt sich das Genom in 3 Bereiche gliedern:

1. URR („Upstream Regulatory Region“)

Diese Region enthält die regulatorischen Elemente für die Transkription, die Replikation, sowie den Ursprung der Replikation (Waldeck *et al.*, 1984; Swith *et al.*, 1987; Romanczuk *et al.*, 1990; Chiang *et al.*, 1992; Del Vecchio *et al.*, 1992).

2. Die frühen Gene (E1 bis E7), deren Produkte für den viralen Lebenszyklus notwendig sind (zur Hausen, 1996 zur Übersicht)

3. Die späten Gene (L1 und L2), die das virale Kapsid bilden (Klug und Finch, 1965)

Der produktive Lebenszyklus der Papillomviren ist an die zelluläre Differenzierung gekoppelt (Abb. 1.2). Der Rezeptor, über den das Virus in die Basalzellen der Epidermis eintritt, ist noch nicht bekannt, häufig findet die Infektion auf Grund von Läsionen statt. Das primäre Ziel sind die Stammzellen im *Stratum basale*, wo es zur Expression der frühen Gene kommt. Mit dem Fortschreiten der Differenzierung im *Stratum spinosum* kommt es zur Expression der späten Gene. Die Freisetzung von viralen Partikeln erfolgt im *Stratum granulosum* und im *Stratum*

corneum (Stoler *et al.*, 1989; Dürst, 1991). Durch die Limitierung der Viruspartikelproduktion auf stärker differenzierte Bereiche wird die Lyse, zur Freisetzung der viralen Partikel im *Stratum basale*, verhindert und das Virus kann jahrelang episomal in den infizierten Basalzellen persistieren. In dieser Form ist es in prämaligen Läsionen zu finden (Dürst *et al.*, 1985). Die Integration ins Genom erfolgt zufällig und ist in frühen Läsionen als prognostisch ungünstiger Faktor anzusehen (Park *et al.*, 1995; von Knebel Doeberitz *et al.*, 1992). Die Linearisierung des zirkulären Genoms erfolgt durch eine Deletion im Bereich zwischen E1 und E2, wobei das Leseraster für E6 und E7 inklusive der URR erhalten bleibt (Schwarz *et al.*, 1985; Wilczynski *et al.*, 1988). Die Zerstörung des E2-Leserasters hat den Verlust der negativ-regulatorischen Kontrolle des Proteins auf die E6- und E7-Expression (Cripe *et al.*, 1987) zur Folge. Eine weitere Konsequenz der Integration ist die Entstehung von chimären RNA-Transkripten. Diese entstehen aus der Fusion des integrierten E6/E7 Leseraster mit nachgeschalteten zellulären Sequenzen am Integrationsort (Schwarz *et al.*, 1985). Diese Fusions-RNA aus viralen und zellulären Bestandteilen verfügt über eine längere Halbwertszeit, die auf der Deletion von destabilisierenden RNA-Elementen im 3' Bereich der viralen RNA basiert. Die erhöhte Stabilität zieht eine höhere Expression der viralen Onkogenen E6 und E7 nach sich (Jeon und Lambert, 1995).

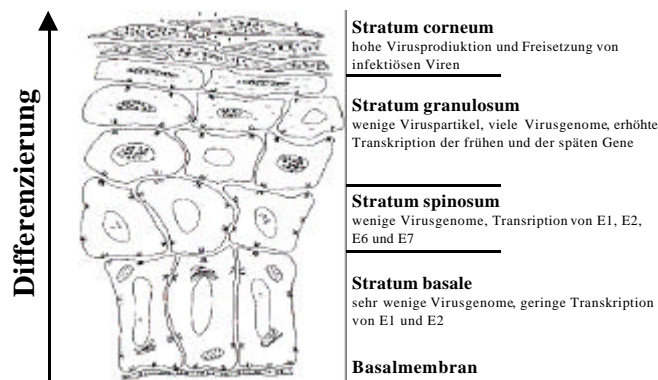


Abb. 1.2 Die Abhängigkeit der Genexpression der Papillomviren vom Differenzierungsgrad der Epidermis

Dargestellt ist ein Querschnitt der Epidermis, der Differenzierungsgrad nimmt entlang des Pfeiles zu. Auf der Seite ist die Bezeichnung der verschiedenen Hautschichten, sowie die Expression der viralen Proteine angegeben (aus Modrow und Falke, 1997, S. 383, leicht verändert).

1.3 Mehrstufenkonzept der Karzinogenese

Zahlreiche epidemiologische und molekularbiologische Daten belegen, daß eine Primärinfektion mit HPV für die Entstehung eines Tumors nicht ausreichend ist. Gleichzeitig wurde jedoch mehrfach gezeigt, daß die Expression der Onkogene E6 und E7 für eine Immortalisierung primärer Keratinozyten essentiell ist, wobei jedoch keine Transformation zum malignen Phänotyp erfolgt (Schlegel *et al.*, 1988; Woodworth *et al.*, 1989; Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989). Allerdings ist die Expression von E6 und E7 für die Aufrechterhaltung des

immortalisierten und des malignen Phänotyps notwendig (Watanabe *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1995; Venturini *et al.*, 1999). Auf Grund dieser Daten wurde das Mehrstufenkonzept der Karzinogenese für das Zervixkarzinom postuliert (zur Hausen, 1991; zur Hausen und Rösl, 1994). Dieses besagt, daß in der Zelle Regulationsmechanismen existieren, die trotz einer viralen Infektion in der Lage sind, zelluläre Prozesse wie die Differenzierung und die Mitose zu kontrollieren. Belege hierfür sind Zellhybride aus tumorigenen HPV-positiven Zellen und humanen Fibroblasten, die keinen tumorigenen Phänotyp mehr aufweisen (Stanbridge *et al.*, 1982; O'Hara *et al.*, 1987) und Mikrozelltransferexperimente mit dem Chromosom 11, die den tumorigenen Phänotyp supprimieren (Saxon *et al.*, 1986; Koi *et al.*, 1989).

1.4 Die Onkogene E6 und E7

Die Einteilung der humanen Papillomviren in „high risk“ und „low risk“ basiert auf dem transformierenden Potential ihrer Onkogene E6 und E7 (zur Hausen, 1986). Die „high risk“ Typen werden in nahezu 100 % der Zervixkarzinome nachgewiesen. Die „low risk“ Typen, HPV6 und HPV11, hingegen sind nur in gutartigen Hyperproliferationen nachweisbar (de Villiers *et al.*, 1981; Gissmann *et al.*, 1982, 1983). Die onkogenen Fähigkeiten der „high risk“ E6 und E7 Proteine beruhen auf deren Interaktion mit p53 (Werness *et al.*, 1990) und pRb (Dyson *et al.*, 1989).

p53 wird auf Grund von DNA-Beschädigungen induziert (Maltzman *et al.*, 1984; Fritsche *et al.*, 1993) und führt zu einem Block des Zellzyklusses in der G1-Phase, um notwendige Reparaturen zu ermöglichen. Sind die vorliegenden Schäden irreparabel, so erfolgt die Induktion der Apoptose (Lowe *et al.*, 1993). E6 von „high risk“ Typen bildet mit der Ubiquitin Protein-Ligase E6AP einen Komplex, der mit p53 interagiert und dessen Ubiquitinierung und damit seine Degradation induziert (Scheffner *et al.*, 1990; Werness *et al.*, 1990; Huigbregtse *et al.*, 1990). E6 von „low risk“ Typen ist nur zur Interaktion mit p53 fähig (Scheffner *et al.*, 1990, 1993).

E7 interagiert mit den Retinoblastomproteinen pRb und p107 (Dyson *et al.*, 1989), die an den Transkriptionsfaktor E2F binden und dadurch die Expression von proliferationsfördernden Genen kontrollieren (Goodrich *et al.*, 1993; La Thangue, 1994 zur Übersicht). Die Interaktion von E7 mit pRb führt zur Freisetzung von E2F, wodurch dieses die Transkription von Zielgenen induzieren kann (Bagchi *et al.*, 1990; Bandara *et al.*, 1991). Die Bindung der „low risk“ HPV-Typen erfolgt mit einer 10-fach geringeren Affinität (Heck *et al.*, 1992).

Neben diesen viralen Kontrollmechanismen, die es den humanen Papillomviren ermöglichen, einen Einfluß auf die Zellproliferation zu nehmen, spielen auch Interaktionen des Immunsystems mit infizierten Zellen bei der klinischen Manifestation einer viralen Infektion eine zentrale Rolle. So zeigen tumorigene HPV-positive Zellen eine verringerte Expression der MHC-Klasse I

Proteine (Bartholomew *et al.*, 1997), sowie eine Reduktion in der Zytokin-/Chemokin-Expression (Woodworth *et al.*, 1993; Kleine-Lowinski *et al.*, 1999). Einige Zytokine, wie TNF- α (Malejczyk *et al.*, 1992; Rösl *et al.*, 1994), IFN- α (Nawa *et al.*, 1990) und IFN- β (Kim *et al.*, 2000) verfügen über einen negativen Einfluß auf die HPV-Transkription, wobei diese Effekte auf prämaligne Zellen beschränkt sind (Sugarman *et al.*, 1985; Shepard *et al.*, 1988; Majewski *et al.*, 1996). Für die Interaktion der infizierten Zelle mit dem Immunsystem ist auch die Expression des „Monocyte Chemoattractant Protein 1“ (MCP-1) von Bedeutung. Seine Expression stimuliert die Einwanderung von Monozyten und die Freisetzung verschiedener Zytokine, z. B. TNF- α , die wiederum ihre Effekte auf die MCP-1 exprimierenden HPV-positiven Zellen ausüben (Jiang *et al.*, 1992; Colotta *et al.*, 1992). Dieser „Feedback“-Mechanismus zwischen den MCP-1 exprimierenden Zellen und den Monozyten führt zu einer Amplifikation der Immunreaktion, in deren Verlauf es zur Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems kommt (Bosch *et al.*, 1990). Interessanterweise zeigen alle bisher analysierten Zervixkarzinom-Zelllinien keine nachweisbare MCP-1 Expression. Diese läßt sich jedoch in nicht-tumorigenen Hybriden rekonstituieren (Rösl *et al.*, 1994) und die Überexpression von MCP-1 in tumorigenen Hamsterzellen reprimiert deren Wachstum in Nacktmäusen durch die verstärkte Einwanderung von Monozyten (Rollins und Sunday, 1991). Diese Daten deuten darauf hin, daß der Verlust der MCP-1 Expression einen Selektionsvorteil darstellt, der es den HPV-positiven Zellen ermöglicht, sich einer lokalen, durch Zytokine vermittelten Wachstumskontrolle und der Immunabwehr zu entziehen (Rösl *et al.*, 1994).

1.5 Interferone

Neben Chemokinen, wie MCP1 sind auch Interferone (IFN) in die Abwehr von viralen Infektionen eingebunden.

Die Interferone wurden 1957 auf Grund ihrer antiviralen Fähigkeiten isoliert (Isaacs und Lindenmann, 1957). Sie stellen eine Reihe multifunktionaler Peptide dar, die in 2 Subtypen gegliedert werden. Die Gruppe der Typ I Interferone, die eine Sequenzhomologie von nahezu 50 % aufweist, beinhaltet Interferone α und β , wohingegen Interferon γ dem Typ II angehört. Für das Interferon α sind bisher 20 verschiedene Subtypen charakterisiert, während für das Interferon β bisher nur ein Gen beschrieben ist. Gemein ist den Typ I Interferonen das Fehlen jeglicher Introns, sowie die Lokalisation auf dem kurzen Arm des Chromosom 9. Im Gegensatz dazu verfügt Interferon γ über 3 Introns und befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 12 (Samuel, 1991). Ein weiteres Differenzierungsmerkmal liegt in der Verwendung der Rezeptoren für die Signaltransduktion. Typ I Interferone binden an denselben Rezeptor, Interferon γ an einen separaten Rezeptor (Merlin *et al.*, 1985). Beide Rezeptortypen werden auf

fast allen Zellen, mit Ausnahme der Erythrozyten, exprimiert.

1.5.1 Biologische Funktionen der Interferone

Interferone besitzen antiproliferative Fähigkeiten durch die Beeinflussung der am Zellzyklus beteiligten Proteine, wie zum Beispiel c-myc (Raveh *et al.*, 1996), pRB (Arany *et al.*, 1994), Zyklin E und D1 (Zhang und Kumar, 1994) und E2F (Stark *et al.*, 1998). Neben dieser Zellzyklus-regulatorischen Funktion, auf die nicht alle Zellen mit derselben Sensitivität reagieren (Stark *et al.*, 1998), sind Interferone mit dem Immunsystem verknüpft. Als erstes kommt es unmittelbar nach einer Infektion zu einer unspezifischen, nicht-adaptiven Immunreaktion, an der sich Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK), das Komplementsystem und verschiedene Zytokine, wie z. B. Typ I Interferone und TNF- α beteiligen (Biron, 1998). Sie führen zur Erkennung und Eliminierung des Erregers. Im Gegensatz dazu entwickelt sich die spezifische adaptive Immunantwort erst nach Etablierung einer Infektion. An dieser Immunreaktion sind Interferon γ sowie Antikörper-produzierende B-Zellen, T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen beteiligt. Sie dient der gezielten Erkennung bestimmter Erregertypen, wobei sich ein Teil der stimulierten Lymphozyten in sogenannte Gedächtniszellen („memory cells“) umwandelt, die denselben Erreger nach Jahren wiedererkennen können. Durch die Verknüpfung der unspezifischen, nicht-adaptiven Immunreaktion mit der spezifischen gelingt es dem Immunsystem, fast jeden Erreger zu neutralisieren (Kadowaki *et al.*, 2000).

Auf zellulärer Ebene entfalten die IFN ihre antivirale Aktivität durch die Proteinkinase R (PKR), das 2'-5' Oligoadenylatsystem und die Mx-Proteinfamilie (Abb. 1.3). Die Familie der Mx-Proteine blockiert unabhängig von anderen IFN-induzierten Proteinen die Virusreplikation auf der Ebene der Transkription (Hefti *et al.*, 1999). Für die antivirale Funktion ist die GTP-bindende Domäne sowie die Fähigkeit, Homooligomere auszubilden (Melen *et al.*, 1992; Richter *et al.*, 1995) essentiell (Pitossi *et al.*, 1993; Ponten *et al.*, 1997; Flohr *et al.*, 1999). Im humanen System sind 2 cytoplasmatische Mx-Proteine identifiziert, MxA und MxB (Aebi *et al.*, 1989; Staehli *et al.*, 1993). MxA wird durch eine Virusinfektion rasch induziert (Roers *et al.*, 1994) und seine Überexpression führt zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen RNA-Viren (Schneider-Schaulies *et al.*, 1994; Frese *et al.*, 1995; Kanerva *et al.*, 1996). Für MxB konnte diese Eigenschaft nicht nachgewiesen werden (Pavlovic *et al.*, 1990).

Im Fall der PKR und des 2'-5' Oligoadenylatsystems basiert die antivirale Aktivität auf der Blockade der Proteinsynthese. Die PKR ist eine Serin-/ Threonin-Kinase, die in ruhenden Zellen in einem monomeren inaktiven Zustand vorliegt (Thomis und Samuel, 1993). Die Bindung von dsRNA induziert eine Konformationsänderung (Tan *et al.*, 1998), der sich eine

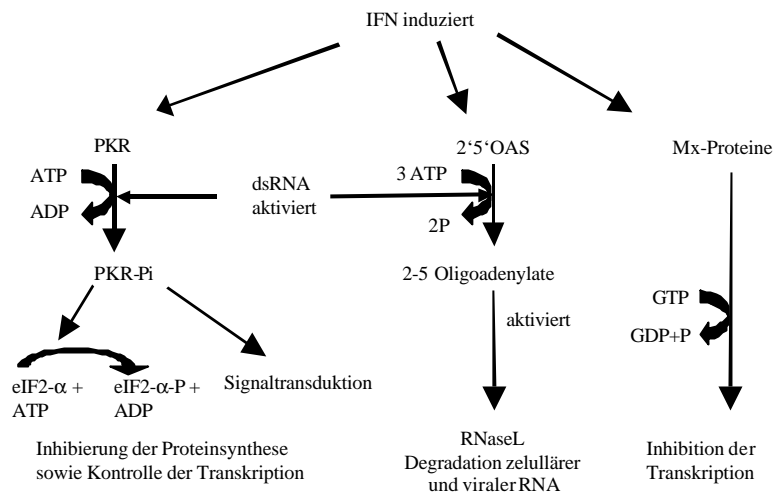


Abb. 1.3 Antivirale Effekte der Interferone

Die antiviralen Fähigkeiten der Interferone werden durch aktivierte Proteine ausgeübt. Einige der bekannten Enzyme, sowie deren zelluläre Ziele und die Effekte sind schematisch dargestellt (leicht verändert nach Stark *et al.*, 1998).

Autophosphorylierung anschließt (Hovanessian und Galabru, 1987). Im aktivierten Zustand bindet und phosphoryliert die PKR die α -Untereinheit des Initiationsfaktors eIF2 (Samuel, 1993) und verhindert dadurch den Austausch von GDP gegen GTP, wodurch die Proteinsynthese gestoppt wird (Samuel, 1993).

Das 2'-5' Oligoadenylatsystem besteht aus zwei Komponenten, der 2'-5' Oligoadenylatsynthetase (OAS) und der RNaseL (Abb. 1.3). Die transkriptionelle Induktion der OAS erfolgt durch Interferone von Typ I und II, die Aktivierung jedoch über dsRNA. Die enzymatische Aktivität der OAS führt zur Synthese von 2'-5' Oligoadenylaten (2'-5'A) mit einer Nukleotidlänge von 2-10 bp (Kerr und Brown, 1978), deren Funktion in der Aktivierung der latent im Zytoplasma vorliegenden RNaseL liegt, die letztendlich virale und zelluläre RNA degradiert (Zhou *et al.*, 1993).

1.6 Signaltransduktion der Interferone

Die Expression der Typ I Interferone kann in fast allen Zellen durch virale Infektion, Antigene usw. induziert werden. Dieser Schritt stellt die erste und wichtigste antiviral wirkende Verteidigung eines infizierten Organismus dar, die keiner Protein *de novo* Synthese bedarf (Friedman und Stark, 1985; zur Übersicht Guidotti und Chisari, 2000). Mausfibroblasten in denen beide IFN- β Allele deletiert wurden, sind nicht in der Lage, IFN- α zu induzieren, so daß sich die Induktion von IFN- β , sowie dessen Bindung an den Rezeptor, als Bedingung für die Induktion von IFN- α darstellt (Erlandson *et al.*, 1998). Die Synthese von Interferon γ ist, im Gegensatz dazu ausschließlich auf T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen limitiert (Kalvakolanu *et al.*, 1996). Die Bindung der Interferone an die Rezeptoren und die

anschließende Signaltransduktion stellen die „delay-response“ dar und führen zur Aktivierung der „Interferon stimulated genes“ (ISG), für deren Expression eine Protein *de novo* Synthese notwendig ist (Sen und Ransohoff 1993). Bei einigen ISG hat sich gezeigt, daß sie synergistisch durch Typ I und Typ II Interferone (Levy *et al.*, 1990; Loh *et al.*, 1992) sowie durch Interferone in Kombination mit anderen Zytokinen, z. B. TNF- α (Yarden *et al.*, 1986; Mestan *et al.*, 1988; Hughes *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 1989), induziert werden können.

Die Transkription der ISG wird durch im Enhancer vorliegende „Response-Elemente“ reguliert, die in 2 Gruppen untergliedert werden (Abb. 1.4). Die IFN- α stimulierten „Response-Elemente“ (ISRE), deren Konsensussequenz sich aus der Abfolge AGTTTCNNTTC zusammensetzt (Levy *et al.*, 1988), bilden die erste Gruppe. An sie binden die Mitglieder der Familie „Interferon Regulatory Factor“ (IRF). Im Gegensatz dazu zeichnet sich die zweite Gruppe durch die palindromische Wiederholung der Sequenz TTC aus, wobei das Triplet jeweils durch 3 Nukleotide voneinander getrennt ist, z. B. TTCCNNGAA, und als IFN- γ aktivierte Sequenz (GAS) bezeichnet wird (Darnell *et al.*, 1994). An die GAS-Elemente binden Dimere aus der Proteinfamilie der „Signaltransducers and activators of transcription“ (Stat), die sich aus Stat1, Stat3, Stat4, Stat5, und Stat6 zusammensetzen können. Diese Proteinfamilie kann neben den Interferonen noch durch zahlreiche andere Zytokine induziert werden (Levy, 1998).

1.6.1 Signaltransduktion durch Typ I Interferone

Der Rezeptor für IFN- α/β besteht aus zwei transmembranen Untereinheiten, die als IFNAR1 (Uze *et al.*, 1990) und als IFNAR2 (Domanski *et al.*, 1995) bezeichnet werden (siehe Abb. 1.4). Auf der zytoplasmatischen Seite des IFNAR1 liegt eine Bindungsstelle für die Janus-Kinase Tyk2 (Colamonici *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1996) sowie für den Transkriptionsfaktor Stat2. Stat1 und die Kinase Jak1 binden an die IFNAR2 Untereinheit des Rezeptors (Domanski *et al.*, 1997).

Die Bindung von IFN- α/β an den Rezeptor induziert dessen Dimerisierung sowie die Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Kinasen, wobei Jak1 die Tyrosinkinase Tyk2 aktiviert (Gauzzi *et al.*, 1996; Briscoe *et al.*, 1996). Diese phosphorylieren die gebundenen Transkriptionsfaktoren Stat1 und Stat2, die nun in der Lage sind zu dimerisieren. Beide bilden mit p48 einen Transkriptionskomplex, der als „Interferon Stimulated Gene Factor 3“ (ISGF3) bezeichnet wird, und aktivieren Promotoren, die über ein ISRE-Element verfügen. p48 (ISGF-3 γ) gehört zur Familie der IRF und ist im ISGF3 Komplex die DNA-bindende Komponente und somit für die Spezifizierung auf das ISRE-Element verantwortlich (Fu *et al.*, 1990; Veals *et al.*, 1992). Die ausgebildeten Stat-Homodimere induzieren die Transkription von Genen mit GAS-Elementen (Darnell *et al.*, 1994).

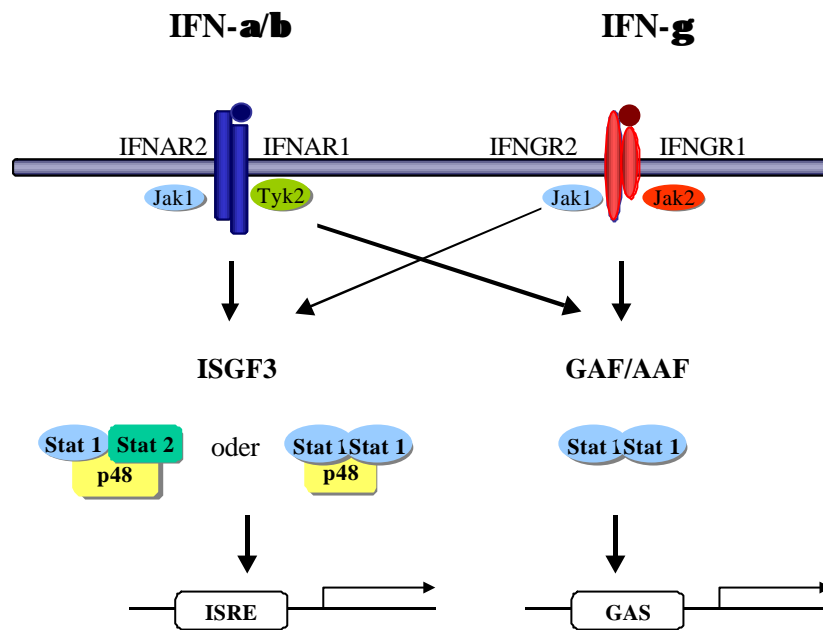


Abb. 1.4 Signaltransduktion der Typ I und Typ II Interferone

Die Bindung der Interferone an den Rezeptor induziert die Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Kinasen, die ihrerseits die Phosphorylierung der Stat-Proteine vermitteln. Die Tyrosin-Phosphorylierung der Stat-Proteine bewirkt deren Dissoziation vom Rezeptor und die Ausbildung von Homodimeren oder Heterotrimeren. Die Folge ist die Translokation in den Zellkern und die Induktion Interferon-spezifischer Gene.

1.6.2 Signaltransduktion durch Typ II Interferon

Wie die Rezeptoren für die IFN Typ I Signaltransduktion, besteht auch der IFN- γ Rezeptor aus zwei transmembranen Untereinheiten, IFNGR1 und IFNGR2 (Abb. 1.4). Die Weiterleitung des Signals in das Zytoplasma der Zelle erfolgt durch die Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Kinasen, wobei Jak1 an die Untereinheit IFNGR2 und Jak 2 an die Untereinheit IFNGR1 (Igarashi *et al.*, 1994) gebunden ist. Die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren den Rezeptor und ermöglichen dadurch die Bindung von Stat1 (Greenlund *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 1995).

Die gebundenen Stat1 Moleküle werden phosphoryliert und dissoziieren vom Rezeptor (Greenlund *et al.*, 1995). Sie sind nun in der Lage, Homodi- oder Heterotrimeren auszubilden. Die Homodimere werden als „Interferon- γ Activated Factor“ (GAF) bezeichnet und induzieren die Expression GAS-haltiger Gene. Durch die Bindung von p48 an das Homodimer entsteht das Heterotrimer, welches den Komplex dann an ISRE-haltige Promotoren dirigiert (Blyssen *et al.*, 1996).

1.6.3 Die Familie der “Interferon Regulatory Factors“ (IRF)

In den letzten Jahren wurde deutlich, daß neben den bisher beschriebenen Janus-Kinasen und den Stat-Proteinen auch der Familie der „Interferon Regulatory Factors“ eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion der Interferone zukommt. Die IRF Proteine stellen eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, zu der mittlerweile 9 Proteine, unter anderem IRF-1 bis IRF-7, p48 (ISGF3 γ), sowie ICSBP, gehören. Gemeinsames Merkmal dieser Familie ist eine Wiederholung von 5 Tryptophanen in einem Abstand von 10 bis 15 Aminosäuren im N-Terminus des Proteins (Veals *et al.*, 1992). Dieser hochkonservierte Bereich erstreckt sich über ca. 120 Aminosäuren und beinhaltet die DNA-bindende Domäne (Fujita *et al.*, 1989).

IRF-1 und IRF-2 binden an cis-agierende DNA-Elemente des IFN- β Promotors (Fujita *et al.*, 1988; Miyamoto *et al.*, 1988; Harada *et al.*, 1989), wobei IRF-1 als Induktor (Fujita *et al.*, 1989; Harada *et al.*, 1989) und IRF-2 als Repressor agiert (Harada *et al.*, 1989). p48, welches bereits unter 1.6.1 im Zusammenhang mit der IFN-Signaltransduktion dargestellt wurde, ist in der Lage, die Funktion von IRF-1 im IFN- β Promotor zu übernehmen (Kawakami *et al.*, 1995). Darüber hinaus verfügt IRF-1 über tumorsuppressive Eigenschaften, während IRF-2 ein tumorigenes Potential besitzt (Harada *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1994). Beide Faktoren zeigen eine Induzierbarkeit durch virale Infektionen, dsRNA, IFN sowie durch zahlreiche andere Stimuli (Harada *et al.*, 1989; Fujita *et al.*, 1989). Die Induktion von IRF-2 folgt der Induktion von IRF-1, da im Promotor eine entsprechende Erkennungssequenz vorliegt (Harada *et al.*, 1994). Neben Sp1- und NF κ B-Bindungsstellen, die auch im IRF-2 Promotor vorliegen, ist ein GAS-Element (Sims *et al.*, 1993; Harada *et al.*, 1994) vorhanden. Neben dem Einfluß auf die Expression des cdk2 („cyclin dependent kinase“) inhibitors p21, dem G1-Arrest des Zellzyklus (Tanaka *et al.*, 1996; Um *et al.*, 2000) ist IRF-1 auch an apoptotischen Prozessen beteiligt (Tamura *et al.*, 1995; Iwase *et al.*, 1999).

Die Familienmitglieder IRF-3, IRF-5 und IRF-6 wurden auf Grund von Datenbankabgleichen identifiziert. Die Funktion von IRF-5 und IRF-6 ist noch nicht bekannt. IRF-3 hingegen ist an der Aktivierung von IFN α/β sowie einiger ISG als Folge einer viralen Infektion beteiligt (Juang *et al.*, 1998; Schäfer *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.*, 1998; Noah *et al.*, 1999). Durch IFN selbst ist eine Induktion von IRF-3 nicht möglich (Au *et al.*, 1995), jedoch induzieren Lipopolysaccharide oder eine virale Infektion eine Serin-/Threoninphosphorylierung des zytoplasmatischen Proteins, der sich eine Translokation in den Zellkern anschließt (Yoneyama *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; Navarro und David, 1998). Die Phosphorylierung führt IRF-3 anschließend dem Abbau durch Proteasome zu (Lin *et al.*, 1998; Ronco *et al.*, 1998). Die Überexpression von IRF-3 führt zur Apoptose, wohingegen eine dominant-negative Form antiapoptotisch wirkt (Heylbroek *et al.*, 2000).

IRF-7 stellt ein weiteres Mitglied dieser Familie dar, welches durch seine Bindung an den Promotor des Kern-Antigens des Epstein Barr Viruses identifiziert wurde (Zhang und Pagano, 1997). Die Überexpression in murinen und humanen Zellen führt zu einer Induktion von IFN- α (Yeow *et al.*, 1998, 2000), zudem ist es bei der späten Induktion von IFN- α beteiligt (Marie *et al.*, 1998; Au *et al.*, 1998). Zusammen mit IRF-3 kann es einen Komplex bilden und an den IFN- β Promotor binden, um dessen Transkription zu induzieren (Wathelet *et al.*, 1998). Ein möglicher Mechanismus für die Inaktivierung von IRF-7 basiert auf der Hypermethylierung des Promotors (Lu *et al.*, 2000).

Die Expression der bisher beschriebenen Familienmitglieder ist in fast allen Zellen nachweisbar, mit Ausnahme von IRF-1 und IRF-2 in embryonalen Zellen (Harada *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu sind IRF-4 und ICSBP nur in Zellen lymphoiden Ursprungs detektierbar.

IRF-4 (LSIRF/PIP) wurde in murinen Milzzellen kloniert (Matsuyama *et al.*, 1995) und gleichzeitig als lymphoid spezifischer Faktor charakterisiert (Eisenbeis *et al.*, 1995). Es fungiert in B-Lymphozyten als Repressor der ISRE-Elemente (Yamagata *et al.*, 1996) oder durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, z. B. PU.1, als Aktivator (Eklund *et al.*, 1998). In T-Lymphozyten ist eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren für die Induktion von Zielgenen nicht notwendig (Driggers *et al.*, 1990).

ICSBP („Interferon Consensus Sequence Binding Protein“) wurde als Protein isoliert, welches an ISRE-Elemente im MHC-Klasse I Promotor bindet (Driggers *et al.*, 1990) und als Repressor und Antagonist von IRF-1 fungiert (Nelson *et al.*, 1993; Weisz *et al.*, 1994). Die Expression ist nur durch Typ I IFN induzierbar (Driggers *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1996). Alleine verfügt ICSBP über eine schwache DNA-Bindungsaffinität, die jedoch durch Bildung von heterodimeren Komplexen mit anderen Familienmitgliedern (IRF-1 oder IRF-2) verstärkt wird. (Sharf *et al.*, 1995; Bovolenta *et al.*, 1994).

1.7 Virale Strategien gegen zelluläres Interferon

Um Interferonen entgegenzuwirken, wurden von den Viren zahlreiche Mechanismen entwickelt. In Tabelle 1-1 sind einige Viren, die in der Lage sind, die Fähigkeiten der IFN zu blocken, sowie die verantwortlichen viralen Proteine zusammengefaßt.

Einige Viren haben Strategien entwickelt, die entweder direkt in die Signaltransduktion der IFN durch die Interaktion mit IRF-1, IRF-3, IRF-7 und p48 eingreifen oder zur Inhibition der IFN-Induktion führen. Am besten charakterisiert sind bisher die viral kodierten IRF's des humanen Herpesvirus. vIRF-1 ist dem zellulär kodierten IRF-1 homolog, jedoch neutralisiert das virale Pendant die transaktivierenden Fähigkeiten von IRF-1 und IRF-3 (Zimring *et al.*, 1998, Buryšek *et al.*, 1999). Die Inaktivierung der PKR erfolgt durch vIRF-2 (Buryšek und Pitha 2001), wobei

es auch an NF κ B-Erkennungssequenzen binden und dadurch die viral induzierte Transkription der Typ I IFN verhindert (Buryšek *et al.*, 1999). Die Überexpression von vIRF-3, welches Homologien zu IRF-4 zeigt, blockiert die Interferon- α Synthese, basierend auf dem inhibierenden Einfluß des vIRF-3 auf IRF-3 und IRF-7 (Lubyova und Pitha 2000).

Tabelle 1.1 Virale Proteine sind in der Lage die antiviralen Fähigkeiten der Interferone zu blockieren.

Virus	virales Protein	zelluläres Ziel
humanes Herpesvirus	vIRF-1	IRF-1, IRF-3
	vIRF-2	PKR, NF κ B
	vIRF-3	IRF-3, IRF-7
	2'5' Adenylate	RNaseL
HPV	E6 E7	IRF-3 p48, IRF-1, Tyk2
Adenovirus	E1A	Stat1, p48
	kurze RNA-Fragmente	PKR
Pockenviren	vIFN-Rezeptoren	IFN-Rezeptoren
Polyoma Virus	T-Antigen	Jak1
Paramyxosimianvirus		Stat1
Parainfluenzavirus		Stat2
Cytomegalovirus		Stat1
EBV	kurze RNA-Fragmente	PKR
HIV	kurze RNA-Fragmente	PKR
Hepatitis C	NS5A	PKR
Influenza A	NS1	ds RNA
Vaccina Virus	E3L	OAS, dsRNA
	K3L	PKR

Neben dem Herpesvirus zielt auch das humane Papillomvirus mit seinen Onkogenen E6 und E7 auf die zellulären IRF-Proteine ab (Abb. 1.5). E6 von HPV16 bindet IRF-3 und blockiert dadurch dessen Translokation in den Zellkern (Ronco *et al.*, 1998). p48 und IRF-1 sind das Ziel von E7 (Barnard *et al.*, 1999; Perea *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000). Die Bindung von E7 an p48 verhindert dessen Integration in den Transkriptionskomplex ISGF3, wodurch die Expression von ISG inhibiert wird (Barnard und McMillan 1999). IRF-1 wird von E7 über die Rekrutierung einer Histondeacetylase, die eine Änderung der Chromatinstruktur induziert, inaktiviert (Park *et al.*, 2000) oder die postranskriptionelle Aktivierung wird geblockt (Perea *et al.*, 2000). Das Adenovirus schaltet die IFN-Signaltransduktion durch die Interaktion des E1A mit Stat-1 und p48 ab (Leonard und Sen, 1996).

Eine andere Strategie verfolgen die Pockenviren, die durch virale IFN-Rezeptoren die Bindung von IFN an zelluläre Rezeptoren verhindern oder inhibitorisch auf diese wirken (Mossman *et al.*, 1995; Alcamì und Smith, 1995).

Neben den Rezeptoren fungieren auch die Rezeptor-assoziierten Kinasen und die Stat-Proteine als Ziele viraler Proteine (Abb. 1.5). Eine Interaktion mit den Rezeptor-assoziierten Kinasen ist

für E7 des HPV (Li *et al.*, 1999) und das große T-Antigen des Polyomavirus (Weihua *et al.*, 1998) gezeigt. Im Gegensatz dazu binden virale Proteine des humanen Cytomegalievirus (Miller *et al.*, 1999) und das E1A des Adenovirus (Leonard und Sen, 1996) an Stat-Proteine.

Eine weitere Fähigkeit des Adenovirus liegt in der Induktion der Synthese von kurzen RNA-Fragmenten, die an das katalytische Zentrum der PKR binden. Die Folge ist, daß die PKR die Proteinsynthese nicht blockieren kann (Mathews *et al.*, 1993). Dieselbe Strategie verfolgen auch EBV (Sharp *et al.*, 1993) und HIV (Gunnery *et al.*, 1990). Das Influenzavirus (Tan und Katze, 1998) und das Vaccinia Virus (Sharp *et al.*, 1998) verhindern die Akkumulation von dsRNA in der Zelle und entziehen dadurch der PKR und anderen antiviral agierenden Proteinen den notwendigen Aktivator. Die Inhibierung der PKR und des OAS-Systems kann jedoch auch durch eine Interaktion mit viralen Proteinen erfolgen, so wie es für das Vaccinia Virus (Rivas *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 1998) und das Influenzavirus (Tan und Katze, 1998) gezeigt wurde.

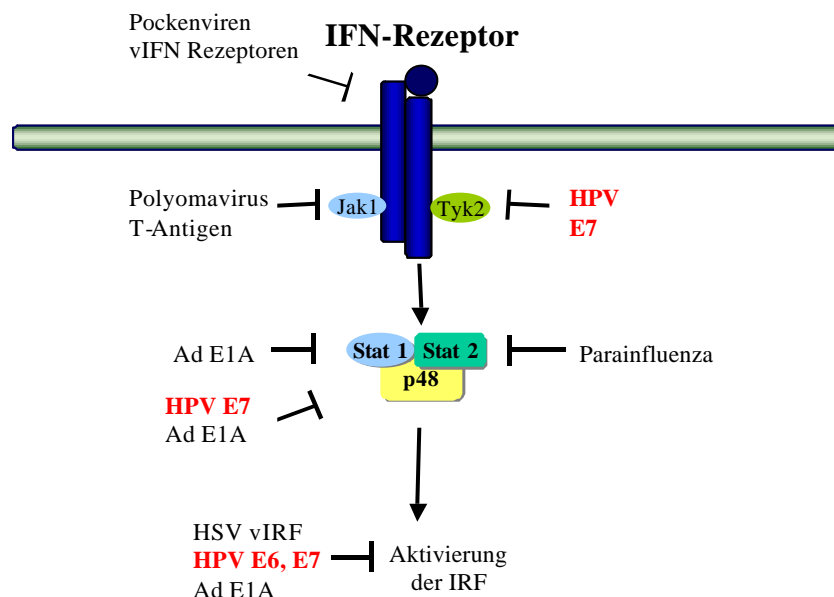


Abb. 1.5 Virale Proteine interferieren mit der Interferon-Signaltransduktion

Die Bindung des Interferons an den Rezeptor führt zu dessen Autophosphorylierung, der Aktivierung der Stat-Proteine, sowie nachgeschalteter Interferon-sensitiver Gene. Virale Proteine sind auf verschiedenen Ebenen in der Lage die Signaltransduktion zu blockieren, unter anderem durch die Interaktion mit den Rezeptor-assoziierten Kinasen, durch die Bindung an Bestandteile des ISGF-3 Komplexes oder durch die Inhibition der IRF-Proteine. Des Weiteren existieren zahlreiche Strategien zu Inaktivierung der PKR und der OAS, die jedoch hier nicht dargestellt sind.

Nicht nur ganze Signaltransduktionswege, sondern auch einzelne Proteine können durch virale Proteine gezielt inaktiviert werden. So wird die RNaseL entweder durch die Synthese von zu kurzen 2'-5' Adenylatderivaten (HSV) (Cayley *et al.*, 1984) oder über die Aktivierung eines spezifischen Inhibitors (HIV) (Matrinand *et al.*, 1999) ausgeschaltet.

1.8 Interferone und HPV

Die Fähigkeit der humanen Papillomviren die Signaltransduktion der Interferone durch die Interaktion der Onkogene E6 und E7 mit verschiedenen IRF-Proteinen zu blockieren, erklärt dennoch nicht zu genüge den Effekt, den die Interferone in zahlreichen klinischen Studien in der Therapie zur Folge hatten. Unabhängig von der Applikationsform zeigt sich, daß IFN- γ eine größere Wirkung entfaltet als die Typ I IFN, von denen wiederum IFN- β eine höhere Wirksamkeit hat als IFN- α (Kim *et al.*, 2000; Koronmilas *et al.*, 2001). Bei einer Minderheit der Patienten zeigte sich jedoch keine positive Wirkung der Interferone (Krusic *et al.*, 1981; Byrne *et al.*, 1986). In einer solchen Gruppe wurde eine höhere Expression des E7-Proteins nachgewiesen als in Patienten bei denen die Therapie erfolgreich war (Arany *et al.*, 1995). In zahlreichen *in vitro* Studien mit verschiedenen Zervixkarzinom-Zelllinien hat sich jedoch gezeigt, daß Interferone nicht generell in der Lage sind, die Expression der viralen Onkogene zu reprimieren (Nawa *et al.*, 1990; Agarwal *et al.*, 1994), so daß eine Korrelation zwischen dem Erfolg einer IFN-Therapie und der Suppression der viralen Onkogene nicht zulässig ist.

Neben dem Zervixkarzinom werden auch Erkrankungen wie Haarzell-Leukämie (Kardamakis, 1991), chronische Hepatitis B, -C, Chronische Myelocytäre Leukämie, Multiple Sklerose, Melanome, Lymphome (Borden *et al.*, 2000) und Condylomata accuminata (Tyring, 1988) mit Interferonen therapiert.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Trotz der zahlreichen viralen Mechanismen, die zur Inaktivierung der Interferone führen, können diese Daten keine zufriedenstellende Erklärung für die kurativen Effekte der Typ I Interferone und des TNF- α auf prämaligene HPV positive Keratinozyten und prämaligene Läsionen liefern. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Einblicke in die Induktion des IFN- β in humanen Zervixkarzinomzelllinien und in davon abgeleiteten somatischen Zellhybriden mit unterschiedlichem Malignitätsgrad gewonnen werden.

In einem ersten Schritt sollte die Fähigkeit der tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV16 und HPV18 positiven Zellen, auf exogen supplementiertes Interferon mit der Induktion eines antiviralen Schutzes zu reagieren, analysiert werden. Die Untersuchungen sollten die Induktion von endogenem IFN- β durch TNF- α ausgeweitet werden. Ein weiteres Ziel war in diesem Zusammenhang die Funktion der verschiedenen IRF Proteine in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV16 und HPV18 positiven Zellen zu untersuchen, da diese als Ziele der viralen Onkogene beschrieben sind.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1), 30 % Lösung	Sigma, Deisenhofen
Agarose für die Elektrophorese	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumacetat, p.a	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat für die Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen
Biogel P30, fein	BioRad, München
Borsäure, für die Elektrophorese	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin	Sigma, Deisenhofen
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
Chloroform, p.a	Merck, Darmstadt
Dextranblau	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
E-64	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL-Reagenz	Amersham-Pharmacia, Freiburg
EDTA für die Molekularbiologie	Roche Diagnostics, Mannheim
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure, p.a. (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid-Lösung, 1 %	Fluka, Deisenhofen
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Formaldehydlösung, p.a. 37 %	Merck, Darmstadt
Formamid, p.a.	Fluka, Deisenhofen
Glutardialdehyd, 37 %	Merck, Darmstadt
Glycerin p.a., 87 %	Merck, Darmstadt
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Harnstoff, für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
HEPES, für die Molekularbiologie	Gerbu, Gaiberg
Hexanukleotide	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat, reinst	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, p.a.	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid-Plätzchen, p.a.	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Methanol, technisch	BASF, Ludwigshafen
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	Gerbu, Gaiberg
Natriumacetat, p.a. wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen, p.a.	Roth, Karlsruhe

Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet-P40, 10 %	Roche Diagnostics, Mannheim
DL-Norleucin	Sigma, Deisenhofen
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Pefabloc SC	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol in TE-Puffer (pH 7,5)	Roth, Karlsruhe
Phenol, kristallin	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon 25	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
RNASin	Hybaid, Heidelberg
Salzsäure, 32 % p.a.	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tri(hydroxymethyl)aminoethan	Sigma, Deisenhofen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
t-RNA	Sigma, Deisenhofen
Tumor-Nekrose-Faktor α	Strathmann Biotech, Hannover
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Xylenblau	Sigma, Deisenhofen

2.2 Reagenzien für die Zellkultur

Ampizillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Agar für die Molekularbiologie	Gibco, Eggenstein
Bacto-Trypton für die Molekularbiologie	Difco, Detroit
Dulbecco's modified Eagle's Medium	Gibco, Eggenstein
Dimethylsulfoxid, p.a.	Merck, Darmstadt
Encephalomyocarditisvirus	R. Zawatsky, Heidelberg
EMCV-Antikörper	R. Zawatsky, Heidelberg
Fötale Kälberserum	Gibco, Eggenstein
Hefeextrakt, für die Molekularbiologie	Difco, Detroit
Interferone α , β und γ	R. Zawatsky, Heidelberg
Neutralisierende Antikörper gegen IFN- α und IFN- β	R. Zawatsky, Heidelberg
Penicillin 10.000 U/ml/Streptomycin 10.000 U/ml	Gibco, Eggenstein
SB 203580 (MAPKinase p38 Inhibitor)	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco, Eggenstein
Vesikular Stomatitis Virus	R. Zawatsky, Heidelberg

2.3 Enzyme

DNase (1U/ μ l)	New England Biolabs, Schwalbach
Klenow-Fragment (5000 U/ml)	New England Biolabs, Schwalbach
Restriktionsenzyme	Amersham-Pharmacia, Freiburg
RNase A (90 U/mg)	Serva, Heidelberg
RNase Inhibitor (40.000U/ml)	Hybaid, Heidelberg
Superscript II TM (RNAse H (-) (200 U/ μ l))	Gibco, Eggenstein
T4 Polynukleotidkinase (10.000 U/ml)	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-Polymerase (5U/ μ l)	Sigma, Deisenhofen

2.4 Größenstandards

a) DNA-Größenstandards

100 bp Leiter

New England Biolabs, Schwalbach

λ /Hind III-Marker

New England Biolabs, Schwalbach

Gene Ruler™ DNA-Leiter-Mix

MBI Fermentas

b) Proteinstandard

Proteine an blauen Farbstoff gekoppelt

Gibco, Eggenstein

(197,6 kDa; 97,1 kDa; 67,3 kDa; 43,9 kDa; 28,4 kDa; 19,1 kDa; 4,7 kDa)

2.5 Antikörper

1. Antikörper gegen	Hersteller	Epitop	Verwendung
Aktin	Aktin (Klon 4) ICN-Biotechnology, Eschwege Nr. 691001; Lot ; 61830 Maus monoklonal IgG	erkennt ein hochkonserviertes Epitop, welches in allen Aktinen der menschlichen Skelettmuskulatur gefunden wird	Western 1:10000
IRF-1	Santa Cruz, Heidelberg sc-497-x; Lot: H318 Kaninchen, polyklonal IgG	Peptidantikörper gegen C-terminales Ende von humanem IRF-1, keine Kreuzreaktivität mit IRF-2 oder ISGF-3 γ	Western 1:5000
IRF-2	Santa Cruz, Heidelberg sc-498-x, Lot: H248 Kaninchen, polyclonal IgG	Peptidantikörper gegen C-terminales Ende von IRF-2 aus Mensch, Maus und Ratte, keine Kreuzreaktivität mit IRF-1 oder ISGF-3 γ ,	Western 1:2500
IRF-3	Santa Cruz, Heidelberg sc-9082-x, Lot: L089 Kaninchen, Polyklonal IgG	erkennt gesamt IRF-3 aus Mensch, Maus und Ratte (Aminosäuren 1-427)	Western 1:5000
IRF-7	Santa Cruz, Heidelberg sc-9083-x, Lot: A120 Kaninchen, polyklonal IgG	N-terminales Ende von IRF-7 aus Mensch, Maus und Ratte Aminosäuren 1-246	Western 1:5000
ISGF-3 γ	Transduction Laboratories I29320, Lot: 1 Maus monoklonal IgG1	C-terminales Ende von ISGF-3 γ aus Mensch und Hund Aminosäuren 126-351	Western 1:500
M ₂ PK	Pyruvatkinase Typ M2 ScheBo Tech, Wettenberg (Nr.S-1; Lot: 03) Maus monoklonal IgG	spezifisch für humane und Ratten Pyruvatkinase Typ M, keine Kreuzreaktivität mit Pyruvatkinase Typ L	Western 1:1000
ATF-2	Santa Cruz, Heidelberg sc-8398, Lot A198	spezifisch für Thr -71 phosphoryliertes ATF-2	EMSA
c-jun	Santa Cruz, Heidelberg sc-822, Lot: G018 Kaninchen polyklonal	N-terminales Ende des murinen c-jun Aminosäuren 56-69, erkennt die phosphorylierte und die unphosphorylierte Form	EMSA

2. Antikörper gegen	Hersteller	gekoppelt mit	Verwendung
Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg sc-2004, Lot: G308	Meerrettichperoxidase	Western 2. Antikörper 1:5000
Maus	Promega, Mannheim Nr. W4021, Lot: 80096	Meerrettichperoxidase	Western 2. Antikörper 1:5000
IgG 1	Santa Cruz, Heidelberg sc-2060, Lot: A279	Meerrettichperoxidase	Western 2. Antikörper 1:2500

2.6 Primer

Die verwendeten Primer wurden, wenn nicht anders vermerkt, von Herrn W. Weinig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Service-Einheit Nukleotidsynthese) synthetisiert. Nach der Synthese wurden die Dimethoxytritylgruppen am 5'OH-Ende abgespalten und durch HPLC gereinigt. Folgende Primer wurden verwendet

oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 mg/ml)

Gibco, Eggenstein

EMCV

sense 5'- CAA GTC TTC CAA CCA GCA TA- 3'
reverse 5'- ACC GAA GGC AGT CCA GTG TA- 3'

GAPDH

sense 5'- TGG ATA TTG TTG CCA TCA ATG ACC- 3'
reverse 5'- GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT G- 3'

Interferon beta

sense 5'- GAT TCA TCT AGC ACT GGC TTG- 3'
reverse 5'- CTT CAG GTA ATG CAG AAT CC- 3'

IRF-3

sense 5'- GGT TGC GTT TAG CAG AGG AC- 3'
reverse 5'- AGG AGA TGG TCT GCT GGA AG- 3'

IRF-7

sense 5'- TGC AAG GTG TAC TGG GAG- 3'
reverse 5'- TCA AGC TTC TGC TCC AGC TCC ATA AG- 3'

2.7 Oligonukleotide für Elektromobilitäts-Shifts

NFκB consensus

5'-agttgaggggactttcccaggc-3'

Gen der Kappa-light-chain aus
Antikörper-produzierenden
B-Lymphozyten

PRDII

5'-gggaaattccgggaaattcc-3'

aus dem IFN-β Promotor

PRDIV

5'-aatgtaaatgacataggaactga-3'

aus dem IFN-β Promotor

2.8 cDNA

Plasmid	Vektor	Insert	Herkunft
pHF β A1		β -Aktin	Gunning <i>et al.</i> , 1983, erhalten von Dr. L. Kedes, Palo Alto USA
pHu-IRF-1	pCDM8	IRF-1	Taniguchi, Japan
pHu-IRF-2	pCDM8	IRF-2	Taniguchi, Japan
pSK-ISGF-3 γ	pBluescript SK	p48	Andre Oumard, Braunschweig
IMAGp998E14325	pBluescript SK	IRF-3	RZPD, Heidelberg
IMAGp998G10312	pBluescript SK	IRF-7	RZPD, Heidelberg
I	pBR322	HPV-18	Boshardt <i>et al.</i> , DKFZ Heidelberg

2.9 „Kits“

Qiaquick Gel Extraktion Kit
RNeasy-Kit

Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden

2.10 Lösungen

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, in bidest. Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert.

Antikörper-Puffer I	5 % Magermilchpulver 0,05 % Tween in TBST
Antikörper-Waschpuffer	0,05 % Tween in TBST
Bakterien-Puffer	10 mM EDTA (pH 8,0) 50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl (pH 8,0) nicht autoklavieren, Lagerung bei 4°C
Bakterien-Lyse-Puffer	0,2 M NaOH 1 % SDS
Bindepuffer für Bandshift-Analyse (5x)	50 % Glycerin 60 mM Hepes pH 7,9 20 mM Tris pH 8,0 300 mM Kaliumchlorid 5 mM EDTA 100 μ g/ml BSA

Biogel-Suspension	1 x TE-Puffer 5 mM Natriumchlorid 0,2 % SDS 50 % Biogel
Calciumchlorid/Glycerinlösung	85 % Glycerin 100 mM Calciumchlorid
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) für DNA	24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamylalkohol
Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) für RNA	9 Teile Chloroform 1 Teil Isoamylalkohol
250 x Denhardt's	5 % BSA 5 % Ficoll 400 5 % Polyvinylpyrrolidon 25
DEPC- Wasser	0,1 % Diethylpyrocarbonat in bidest Wasser autoklavieren
10 x DNA-Ladepuffer	200 mM EDTA (pH 8,0) 50 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenblau
10 x DNase-Puffer	400 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM Magnesiumsulfat 10 mM Calciumchlorid
E-64	2,5 mg/ml Stocklösung in 50 % Ethanol/50 % bidest Wasser
Essigsäure/Kaliumacetat-Puffer	5M KCl 3 M Acetat
Hybridisierungspuffer	50 % Formamid 10 Units/ml tRNA 5 x SSC 0,1 % Denhardt's-Puffer 50 mM Natriumphosphatpuffer 1 % SDS
Hybridisierungs-Waschpuffer	2 x SSC 0,1 % SDS
Laemmli-Puffer (10 x)	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS

Natriumphosphat-Puffer (für Hybridisierungspuffer)	3 Teile 1 M Natriumdihydrogenphosphat 2 Teile 1 M di-Natriumhydrogenphosphat autoklavieren
OLB-Puffer	20 mM Nukleotide (dATP, dGTP, dTTP) 40 mM 2-Mercaptoethanol 400 mM Tris pH 8,0 200 mM Magnesiumchlorid 30 µg/ml Hexanukleotide 400 mM HEPES pH 6,6 Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen
PBS	123 mM Natriumchlorid 17,6 mM di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH mit HCL auf 7,2 bzw. auf 7,8 einstellen autoklavieren
10 x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01 % Gelatine Lagerung bei -20°C
Pefabloc SC	23,8 mg/ml Stocklösung Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen Stabilität: mindestens 2 Monate
Phenol für RNA	250 g Phenol in 400 ml bidest. Wasser lösen Lagerung 4°C
Poly (dI-dC)	1 mg/ml (10 U = 500 µg) in TNE-Puffer lösen 5 min bei 45 °C annealen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen Lagerung bei - 20°C
Ponceau-Rot-Lösung	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Puffer A	10 mM Hepes pH 7,9 10 mM Kaliumchlorid 0,1 mM EDTA pH 8,0 0,1 mM EGTA pH 7,9 Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen

Puffer B	10 mM Tris pH 7,5 7 M Harnstoff 1 % SDS 0,3 M Natriumacetat pH 4,8 20 mM EDTA pH 8,0 Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen
Puffer C	20 mM HEPES pH 7,5 400 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA pH 8,0 1 Mm EGTA pH 7,9 Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen
5 x RNA-Ladepuffer	50 % Formamid 2,2 M Formaldehyd 1 x MOPS-Puffer 1 % Ficoll 0,02 % Bromphenolblau in DEPC-Wasser lösen und bei -20°C lagern
RNase A	10 mg/ml RNase A 10 mM Tris pH 7,5 15 mM Natriumchlorid 20 min. bei 80°C , bei -20°C lagern
5 x RT-Puffer	200 mM Tris-HCl pH 8,3 375 mM Kaliumchlorid 15 mM Magnesiumchlorid Lagerung bei -20°C
20 x SSC	3 M Natriumchlorid 0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0 mit Salzsäure einstellen
50 x TAE –Laufpuffer	2 M Tris 0,25 M Natriumacetat 0,05 M EDTA pH 8,0 pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
10 x TBE	0,9 M Tris-Base 0,9 M Borsäure 0,02 M EDTA pH 8,0
10 x TBS	100 mM Tris-HCl pH 7,5 1 M Natriumchlorid
1 x TBST	10 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM Natriumchlorid 0,1 % Tween 20

100 x TE-Puffer	1 M Tris 0,1 M EDTA pH 8,0 mit HCl pH 7,75 einstellen, autoklavieren
TNE	10 mM Tris 1 mM EDTA 100 mM Natriumchlorid auf pH 7,4 einstellen
TNE-SDS	10 mM Tris 1 mM EDTA 100 mM Natriumchlorid 0,2 % SDS
2 x TNE-SDS-Blaumarker	20 mM Tris pH 8,0 20 mM EDTA pH 8,0 200 mM Natriumchlorid 0,4 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 0,5 % Dextranblau
Transfer-Puffer I	300 mM Tris pH 8,0 20 % technisches Methanol
Transfer-Puffer II	25 mM Tris pH 8,0 20 % technisches Methanol
Transfer-Puffer III	25 mM Tris pH 8,0 20 % technisches Methanol 4 mM D,L-Norleucin
TNF- α	100 U/ μ l (Stocklösung) 10 μ g (10^6 Units) in 200 μ l bidest Wasser lösen und mit DMEM (inklusive 10 % FKS) auf 10 ml auffüllen, bei -70°C in kleinen Portionen lagern
5 x Western-Ladepuffer	10 % SDS 300 mM Tris pH 6,8 12,5 % 2-Mercaptoethanol 5 mM EDTA pH 8,0 50 % Glycerin zum Lösen auf 37°C erwärmen und in kleinen Portionen bei -20°C lagern

2.11 Medien und Lösungen für die Zell- und Bakterienkultur

Ampizillin	50 mg/ml sterilfiltrieren und bei -20°C in kleinen Portionen lagern
------------	---

DMEM	Fertigmedium von Sigma
Einfríermedium	10 % DMSO 30 % FKS 60 % DMEM ohne Zusätze sterilfiltrieren durch 0,22 µm Filter, bei -20°C lagern
LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10 g Natriumchlorid 10 g Bacto-Trypton 5g Hefeextrakt mit Natronlauge pH 7,2 einstellen und mit bidest Wasser auf 1 Liter einstellen autoklavieren
LB-Platten	2 % Bacto-Agar für Bakterien zum LB-Medium hinzufügen, autoklavieren und Platten gießen
PBS (Phosphate-buffered-saline)	123 mM Natriumchlorid 17,6 mM di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH mit HCL auf 7,2 einstellen und autoklavieren
Tetrazyklin	15 mg/ml Tetrazyklin-Hydrochlorid in 50 % Ethanol/bidest. Wasser lösen, sterilfiltrieren Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen
Trypanblau-Lösung	0,25 % Trypanblau in PBS lösen und sterilfiltrieren
Trypsin/EDTA	Fertiglösung von Gibco/Eggenstein 0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l Na ₂ EDTA x 4 H ₂ O in Hank's Puffer

2.12 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Autoradiographie-Kassetten (Kodak)	Siemens, Stuttgart
Einmalplastikküvetten	Greiner, Nürtingen
Einmalspritzen (steril)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Faltenfilter	Schleicher und Schüll, Dassel
Frischhaltefolie	Melitta/Migge, Heidelberg
Glaspipetten	Renner, Darmstadt
Glaswolle, silikonisiert	Serva, Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Nylonmembranen (modifiziert)	NEN Life Science, Köln
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
Polystyrolröhrchen	Greiner, Nürtingen

Röntgenfilme (Kodak)	Siemens, Stuttgart (X-Omat oder Biomax)
Sofortbildfilme (Polaroid)	Siemens, Stuttgart
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Verstärkerfolien für Röntgenfilme (Kodak)	Siemens, Stuttgart (X-Omat oder Biomax)
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifuge	Dupont NEN, Bad Homburg

2.13 Geräte

Analysenwaage 2004 MP	Sartorius, Göttingen
β -Counter QC 2000	Bioscan, Washington D.C. (USA)
Bakterienschüttler G25	Infors, Bottmingen (Schweiz)
Begasungsbrutschrank, B5061 EC/CO ₂	Heraeus, Hanau
Geigerzähler LB 1210 B	Berthold, Wildbad
Gelelektrophoresekammern	Renner, Darmstadt
Spannungsgerät EPS 600	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Heizblock/Schüttler	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop CK2	Olympus
Pipetten (automatisch) P10,20,200,1000	Gilson-Abimed
pH-Meter Calimatic 765	Knick
Polaroid-Kamera MP4	Polaroid
Spektrophotometer Ultraspec 3000	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Sterile Werkbank BioGard Hood	Baker Company, Sanford (USA)
Transilluminator	Vetter, Wiesloch
Vertikalelektrophoresekammer	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Vortexer	Heidolph, Rust
Waage 1216 MP	Julabo, Seelbach
Western-Blotkammer Semi-Phor	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Wippschüttler DuoMax 2030	Heidolph, Rust
Neubauer-Zählkammer	Bender&Hobein, Bruchsal
Zentrifuge Minifuge	Heraus, Hanau

2.14 Zelllinien

HeLa	<i>Gewebe</i>	Adenocarcinom, Zervix
	<i>Morphologie</i>	Epithel
	<i>Alter</i>	31 Jahre
	<i>Ethnische Zugehörigkeit</i>	Afrikanerin
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>HPV-Status</i>	Typ 18 (circa 50 Kopien pro Zelle)
	<i>Referenz</i>	Boshart <i>et al.</i> , 1984, Schwarz <i>et al.</i> , 1985
SW756	<i>Gewebe</i>	Zervix
	<i>Morphologie</i>	Epithel
	<i>Alter</i>	46 Jahre
	<i>Ethnische Zugehörigkeit</i>	Kaukasierin
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent

	<i>HPV-Status</i>	Typ 18 (circa 15 bis 20 Kopien pro Zelle)
	<i>Referenz</i>	Freedman <i>et al.</i> , 1982
SiHa	<i>Gewebe</i>	Zervix
	<i>Morphologie</i>	Epithel
	<i>Alter</i>	55 Jahre
	<i>Ethnische Zugehörigkeit</i>	Japanerin
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>HPV-Status</i>	Typ 16 (1 bis 2 Kopien Pro Zelle)
	<i>Referenz</i>	Baker <i>et al.</i> , 1987
CaSki	<i>Gewebe</i>	epidermoides Karzinom, Zervix
	<i>Morphologie</i>	Epithel
	<i>Alter</i>	40 Jahre
	<i>Ethnische Zugehörigkeit</i>	Kaukasierin
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>HPV-Status</i>	Typ 16 (bis zu 600 Kopien pro Zelle)
	<i>Referenz</i>	Baker <i>et al.</i> , 1987

444 und CGL3: nicht-tumorigene und tumorigene Hybride, die aus der Fusion von HeLa mit humanen Fibroblasten entstanden sind. Die Zellen wurden freundlicherweise von Eric Stanbridge, Irvine, CA, USA zur Verfügung gestellt

1/9 : 444-Zellen, transfiziert mit einem HPV18 E6/E7 Konstrukt unter der Kontrolle eines β -Aktinpromotors

CaSki x HeLa, SiHa x HeLa und SW756 x HeLa: somatische Zellhybride aus den jeweiligen Zelllinien und HeLa

A549:	<i>Gewebe</i>	Lungenkarzinom
	<i>Morphologie</i>	Epithel
	<i>Alter</i>	58 Jahre
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>HPV-Status</i>	negativ
	<i>Referenz</i>	WHO, 1983

2.15 Bakterien

E. coli-Kompetente Bakterien HB 101

Invitrogen, Groningen, Niederlande

3. METHODEN

3.1 Präparation von DNA-Sonden

3.1.1 Transformation kompetenter Bakterien

Ein Aliquot der tiefgefrorenen Bakteriensuspension wird auf Eis aufgetaut und in ein vorgekühltes 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 20-100 ng Plasmid-DNA (Negativkontrolle ohne DNA) wird die Mischung für 30 Minuten auf Eis und anschließend für 45 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Durch diesen Hitzeschock wird die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien sichergestellt. Die Expression der plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz wird induziert, indem 900 µl LB-Medium zu Ansatz pipettiert wird und dieser für 1 Stunde bei 37 °C schüttelt. Die Bakterien werden 5 min bei 200 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert und das Pellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Der Transformationsansatz wird in Volumina von 5 µl, 50 µl und 145 µl auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert

3.1.2 Herstellung von Glycerinkulturen

Mit einem sterilen Zahnstocher wird eine Einzelkolonie von den LB-Platten gepickt und für die Beimpfung von 10 ml LB-Medium verwendet. Nach einer 8-stündigen Inkubation auf 37°C werden 800 µl der Bakteriensuspension entnommen und mit 200 µl 87 %-iger Glycerinlösung in einem Kryoröhrchen gemischt und bei -70 °C eingefroren.

3.1.3 Vorkulturen

Von der noch gefrorenen Glycerinkultur wird mittels eines sterilen Zahnstochers eine minimale Menge entnommen und in 10 ml antibiotikahaltiges LB-Medium gegeben. Diesem schließt sich eine Inkubation bei 37°C für 8 h an. 500 µl der Vorkultur werden anschließend zum Animpfen von 500 ml antibiotikahaltigem LB-Medium zur Großaufbereitung der Plasmide verwendet.

3.2 Zellkulturtechniken

3.2.1 Auftauen von Zellen

Die Zellsuspension wird bei 37°C rasch aufgetaut. Zur Entfernung von im Einfriermedium enthaltenen DMSO werden die Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und das Volumen wird mit Zellkulturmedium (10 % FCS, 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin) auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Nach der Resuspendierung in frischem Medium werden die Zellen in Kulturflaschen überführt und bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel.

3.2.2 Stammhaltung von Zellen

Von den adhären wachsenden Zellen wird das Medium abgezogen und die Zellen werden mit einem entsprechenden Volumen 1 x PBS (5-10 ml) gewaschen. Anschließend wird Trypsin (1-2 ml) zugefügt und gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Nach 2-3 minütiger Inkubation auf 37 °C, 5 % CO₂ wird die Trypsinierung der Zellen durch Zugabe von 10 % FKS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen werden entsprechend der Dichte zweimal die Woche 1:20 bis 1:40 gesplittet. Die in der Zellkulturflasche verbliebenen Zellen werden durch die Zugabe von Zellkulturmedium (5-25 ml) resuspendiert und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.3 Aussaat von Zellen für Versuche

Subkonfluente Zellen werden mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst und in Medium resuspendiert. Die Zellzahl pro Milliliter wird mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die Differenzierung zwischen lebenden und evtl. toten Zellen bedient man sich des Farbstoffes Trypanblau, der nur abgestorbenen Zellen anfärbt. Um eine möglichst repräsentative Zellzahl/ml berechnen zu können, werden 4 Großquadrate ausgezählt. Aus diesen wird der Mittelwert gebildet, welcher anschließend unter der Berücksichtigung der 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit der Färbelösung auf einen Milliliter berechnet wird. Je nach Versuchsplanung werden die Zellen in verschiedenen Zellkulturgefäßen ausgesät, wobei die Zelldichte in allen Versuchen, soweit nichts anderes angegeben ist, $4,5 \times 10^4$ Zellen/cm² beträgt. Während der Versuchsdurchführung werden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen ohne einen Mediumwechsel behandelt.

3.2.4 Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden, wie zuvor unter Punkt 3.2.2 beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen (3.2.3) werden jeweils 1×10^6 Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 1200 rpm, 4 °C für 5 min pelletiert. Das Medium wird abgezogen, das Pellet wird in 1,5 ml DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in ein 2 ml Kryoröhrchen pipettiert. Die Suspension wird für 1 Stunde auf Eis gestellt, bevor die Kryoröhrchen mit reichlich Zellstoff umwickelt, auf – 70°C gestellt werden. Am nächsten Tag werden die tiefgefrorenen Zellen in dem Flüssigstickstofftank überführt.

3.3 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmide erfolgt zur ersten Analyse der Konstrukte nach der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979; Ish-Horowitz und Burke, 1981). Die Großaufbereitung der Plasmide wird mit dem Qiagen-Maxi-Prep Kit durchgeführt.

3.3.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse basiert auf dem Prinzip, daß genomische DNA in einem pH-Bereich von 12,0 bis 12,5 denaturiert.

2 ml einer Übernachtskultur werden durch Zentrifugation bei 1500 x g für 3 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wird in 100 µl Bakterien-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgt durch die Zugabe von 200 µl Bakterien-Lyse-Puffer und einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Das im Puffer enthaltenen Natriumdodecylsulfat ist ein starkes Detergenz und bricht die Zellwände auf, bindet und denaturiert zelluläre Proteine. Der Abschluß der Lyse zeigt sich durch ein Aufklaren, der zuvor trüben Lösung an. Die Zugabe von vorgekühltem Essigsäure/Kaliumacetat-Puffers (150 µl) verschiebt den pH-Wert in den neutralen Bereich, wodurch die chromosomale DNA des Bakteriums sowie die Proteine unlöslich werden und präzipitieren. Die zirkuläre Plasmid-DNA wird unter diesen Bedingungen vollständig renaturiert und bleibt in Lösung. Das Gemisch wird für 5 min auf Eis inkubiert und die bakteriellen Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit abgetrennt. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen Isopropanol bei -20 °C für 30 min gefällt und 30 min bei maximaler Geschwindigkeit (4 °C) abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 %-iger Ethanol-Lösung gewaschen und in 1 x TE-Puffer gelöst. Die enthaltene RNA wird mit 20 µg/ml RNase A 1 h bei Raumtemperatur verdaut.

3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Maxi-prep-Kit

Die Plasmidpräparation erfolgt nach den Arbeitsprotokollen der Firma Qiagen.

Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse, wobei die Plasmid-DNA nicht durch eine Präzipitation mit Ethanol extrahiert, sondern an eine Anionenaustauschersäule gebunden wird. Die restlichen Zellbestandteile werden durch Waschen der Säule, unter Bedingungen, bei denen die Plasmide gebunden bleiben, entfernt. Anschließend wird die DNA durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert.

3.3.1.3 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Für Hybridisierungen mit spezifischen Gensonden werden die Inserts durch Inkubation mit Restriktionsenzymen aus den entsprechenden Vektoren herausgeschnitten. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller.

Die gewünschte Menge an Plasmid wird mit dem entsprechenden Volumen an Puffer und mit 2 U/ μ g Plasmid des einzusetzenden Restriktionsenzymen versetzt und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend werden die Fragmente mittels Gelelektrophorese (3.3.4.1) aufgetrennt und das Insert wird wie unter 3.3.1.4 beschrieben aus dem Gel extrahiert.

3.3.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird mit dem Qiaquick-Kit der Firma Qiagen, nach den vorgegebenen Arbeitsprotokollen, durchgeführt.

Die Basis dieser Gelextraktion bildet eine Säule mit DNA-Bindungsaffinität unter einem schwach sauren pH-Wert, bei dem die Agarose denaturiert vorliegt. Die gebundene DNA wird durch das Waschen mit verschiedenen Puffern gereinigt und anschließend mit einem Niedrigsalzpuffer pH 8,5 von der Säule eluiert.

3.3.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA erfolgt entweder mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen oder sie wird mittels der Kern-Zytoplasmentrennung nach Schreiber *et al.*, 1989 isoliert.

3.3.2.1 Kern-Zytoplasmentrennung

Bei dieser Isolierungsmethode wird der Zellkern vom Zytoplasma abgetrennt. Die Zellen schwellen auf Grund der Zugabe eines hypotonischen Puffers an und die Zellmembran wird mit einem milden Detergenz (NP-40) zerstört. Durch Zentrifugation wird der Zellkern von den zytoplasmatischen Bestandteilen abgetrennt.

Die Zellen (1×10^7 /14,4 cm Schale) werden zweimal auf Eis mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 2,4 ml vorgekühltem hypotonischen Puffer A von den Zellkulturschalen geschabt. Die Inkubationszeit von 15 min beginnt ab der Zugabe des Puffers auf die Schalen, so daß auf eine genaue Einhaltung dieser Zeit zu achten ist. Die gelösten Zellen werden in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, gut resuspendiert und bis zu Ablauf der Inkubationszeit auf Eis gestellt. Zu den angeschwollenen Zellen wird nun unter leichtem Schütteln 150 μ l 10 % NP-40 gegeben, welches die Membran der Zellen zerstört. Dieser Vorgang ist an einem Aufklaren der Lösung zu beobachten. Die Trennung der zytoplasmatischen von der kernhaltigen Fraktion erfolgt durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 1 min. Aus dem Pellet können nun die Kernproteine, wie unter 3.4.1 beschrieben isoliert werden. Die zytoplasmatische Fraktion kann als Proteinextrakt verwendet werden oder sie dient der Extraktion der RNA. Zur Gewinnung der

RNA wird das Zytoplasma mit 1 x Volumen an Puffer B versetzt und gut geschüttelt. Die denaturierten Proteine werden durch eine Phenolextraktion entfernt. Nach der Phasentrennung wird die RNA durch Präzipitation mit 1 Volumenanteil Isopropanol oder 2,5 Volumenanteilen Ethanol absolut gefällt. Anschließend wird die RNA durch Waschen mit 70 % Ethanol gereinigt und in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2.2 RNA-Isolierung mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen

Die Isolierung der RNA mit dem RNeasy Kit von Qiagen wird gemäß den Arbeitsprotokollen der Firma durchgeführt.

Die Basis für diesen Kit bildet die RNA-Isolierung aus Zellen nach Chomczynski und Sacchi, 1987, jedoch wird für die Aufreinigung keine Phenolisierung mit anschließender Präzipitation durchgeführt, sondern die RNA wird an Säulen gebunden und durch Waschen mit verschiedenen Puffern gereinigt.

3.3.3 Vermessen von Nukleinsäuren

Bei der photometrischen Konzentrationbestimmung wird die Absorption der in Lösung befindlichen Stoffe bei unterschiedlicher Wellenlänge gemessen. Proteine und aromatische Verbindungen verfügen über ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, wohingegen Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm ihr Maximum aufweisen. Durch die Messung der Absorptionswerte bei diesen Wellenlängen kann die Konzentration und die Reinheit der in Lösung befindlichen Nukleinsäuren bestimmt werden. Die Reinheit wird über die Quotientenbildung der Meßwerte $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt, Werte zwischen 1,8 und 2,0 stehen für einen hohen Reinheitsgrad.

Die Konzentrationen der Nukleinsäuren wird aus dem gemessenen Wert bei der Wellenlänge von 260 nm berechnet. 1 OD_{260} entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA oder einer RNA Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Die Nukleinsäuren werden 1:500 in Wasser, TE (DNA) oder in DEPC- H_2O (RNA) verdünnt und anschließend vermessen. Als Referenz dient die Lösung, in der die Nukleinsäure verdünnt wurde.

3.3.4 Gelelektrophorese und Transfer von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese stellt eine einfache Standardmethode dar, mit deren Hilfe es möglich ist, ein Gemisch von Nukleinsäuren reproduzierbar aufzutrennen. Die Wanderung der Nukleinsäuren wird durch die Anlage eines elektrischen Feldes ermöglicht. In einer neutralen Umgebung werden die negativen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren nicht abgeschirmt und aus diesem Grund findet eine Wanderung zum Pluspol statt. Der Auftrennungsgrad des Agarosegels wird durch die eingesetzte Konzentration bestimmt.

3.3.4.1 Gelelektrophorese und Transfer von DNA (Southern blot)

Die Auftrennung von DNA erfolgt unter nativen Bedingungen.

Die Agarose wird in der gewünschten Konzentration in 1 x TAE eingewogen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die gelöste Agarose wird abgekühlt und in die vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wird in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, die mit 1 x TAE gefüllt ist. Die aufzutragenden Proben werden mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Durch das im Ladepuffer enthaltene Glycerin wird ein Absinken der Proben in den Geltaschen sichergestellt. Die Elektrophorese wird bei 2 V/cm bis 8 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt, bis der Farbmarker die gewünschte Position im Gel erreicht hat. Da weder im Gel noch im Ladepuffer Ethidiumbromid enthalten ist, werden die Gele in einem 20 mg/ml Ethidiumbromid-haltigen Bad für 10 – 20 min nachgefärbt und unter UV-Licht dokumentiert. Für den Transfer der Nukleinsäuren auf eine Membran, wird das Gel für 45 min in einem denaturierenden Puffer inkubiert. Durch diesen Denaturierungsschritt wird der Transfer der DNA sichergestellt. Die Grundlage für den Blot (siehe Abb. 3.1) bildet ein Stapel sehr

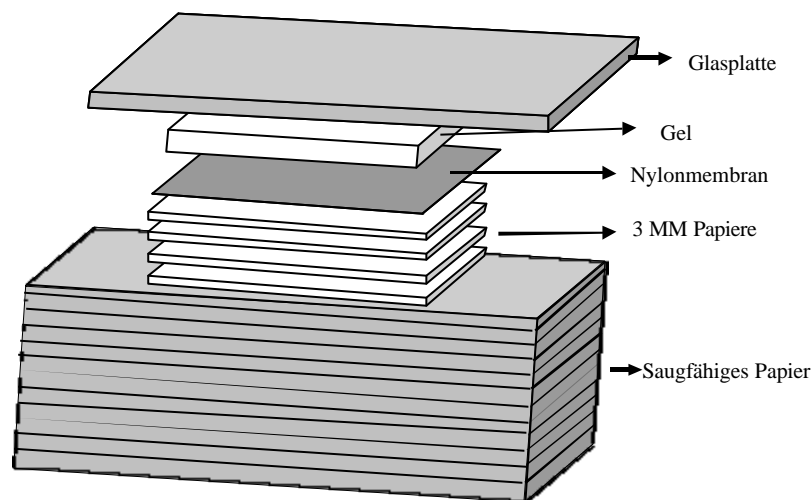


Abb.3.1 Schematische Darstellung des Aufbaues eines Northern- bzw. eines Southern Blots

saugfähigen Papiers auf den 4, dem Format des Gels entsprechende 3 MM Papiere aufgelegt werden. Die unteren beiden 3 MM Papiere werden trocken aufgelegt, wohingegen die oberen beiden gesättigt mit Denaturierungspuffer aufgelegt werden. Zwischen Gel und 3 MM Papier wird die für 15 min in Denaturierungspuffer äquilibrierte Membran gelegt. Wichtig ist der luftblasenfreie Aufbau des Blots, um einen gleichzeitigen und gleichmäßigen Transfer aller DNA-Fragmente zu gewährleisten. Der Transfer erfolgt über Nacht. Um ein Austrocknen zu verhindern, wird der ganze Blot in Frischhaltefolie eingewickelt und mit einer Glasplatte, auf der

sich ein kleines Gewicht befindet, beschwert. Am nächsten Tag wird die Membran für 15 min in einer Neutralisierungslösung inkubiert und anschließend auf 3 MM Papier getrocknet

3.3.4.2 Gelelektrophorese und Transfer von RNA (Northern blot)

Die Gelelektrophorese der RNA erfolgt unter nichtdenaturierenden Bedingungen in 1 x MOPS-Puffer in 1% Agarosegelen, die 20 ug/ml Ethidiumbromid enthalten. Um einen Verdau der RNA durch Kontaminationen des Wassers oder der Gelkammer durch RNasen zu vermeiden, wird auf der einen Seite nur mit DEPC behandeltem Wasser gearbeitet und auf der anderen Seite die Gelapparatur mitsamt des Gelschlittens und der Kämme mit NaOH vorbehandelt. Die Proben werden mit einem Volumen von 1 x RNA-Ladepuffer versetzt und bei 65 °C für 5 min aufgeköcht. Dies bewirkt, daß durch das im Ladepuffer enthaltene Gemisch an Formamid und Formaldehyd mögliche Sekundärstrukturen der RNA aufgebrochen werden. Nach einem Abkühlen der Proben für 2 min auf Eis werden sie in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese wird bei 3 bis 4 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Nach Beendigung der Auftrennung wird das Gel fotografiert, wobei die 28 S und die 18 S Bande der RNA im Gel durch Einkerbungen gekennzeichnet werden. Diesem schließt sich eine Inkubation des Gels für 15 min in 20 x SSC an. Der Aufbau für den Transfer entspricht dem des Southern blots, jedoch wird anstelle des Denaturierungspuffers 20 x SSC verwendet. Nach Abschluß des Transfers wird die Membran für 5 min in 2 x SSC inkubiert und auf 3 MM Papier getrocknet.

3.3.5. Hybridisierung (Southern, 1975)

Die Hybridisierung ermöglicht es, mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde, die sich in einer Hybridisierungslösung befindet, eine auf einer Membran immobilisierte Nukleinsäurespezies nachzuweisen. Dies findet auf Grund der Ausbildung von doppelsträngigen Nukleinsäuren durch spezifische Basenpaarung statt. Mittels der Autoradiographie werden die Banden sichtbar. Auf Grund der Sensitivität dieses Nachweises können auch Nukleinsäuren detektiert werden, deren Konzentration für eine Visualisierung auf einem Agarosegel nicht ausreichend ist.

3.3.5.1 Radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde

Die radioaktive Markierung der einzusetzenden Sonde erfolgt nach der "random oligolabeling"-Methode (Feinberg and Vogelstein, 1982). Die DNA wird durch Erhitzen in den einzelsträngigen Zustand überführt, wodurch vorliegende Hexanukleotide statistisch verteilt binden können. Diese dienen dem Klenow-Enzym als Primer für die Synthese des DNA-Stranges. Der Einbau der Nukleosidtriphosphate erfolgt nach der vorliegenden Matrize. Eines der zugefügten Nukleosidtriphosphate (α -³²P-dCTP) liegt nur im radioaktiv markierten Zustand vor und ermöglicht auf Grund des Einbaus an den entsprechenden Positionen die radioaktive Markierung

der Sonde. Das Klenow-Enzym verfügt über keine 5'→3' Exonucleaseaktivität, so daß keine Degradierung der eingesetzten Hexamere und der markierten DNA stattfindet.

10 bis 100 ng der zu markierenden Sonde werden mit bidest Wasser auf 40 µl aufgefüllt und für 2 min aufgeköcht und auf Eis gestellt. Der Mischung werden 1 µl 1% BSA, 5 µl Oligo-Labeling-Puffer (OLB), 1 U Klenow-Enzym und 2,5 µl α -³²P-dCTP zugefügt. Nach einem vorsichtigen Mischen des Ansatzes folgt eine Inkubation von 1,5–2 Stunden bei Raumtemperatur oder eine 15 minütige Inkubation bei 37°C. Durch die Zugabe von 50 µl 2 x TNE-Puffer wird die Reaktion gestoppt.

3.3.5.2 Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde

Nach Beendigung der Reaktion werden die nicht eingebauten Nukleosidtriphosphate über eine Biogelsäule abgetrennt. Dieser Schritt basiert auf dem Ausschlußprinzip der Säule, d.h. DNA-Fragmente, die größer als 30 bp sind, durchlaufen die Säule, wohingegen Fragmente, die kleiner sind, in der Säule zurückgehalten werden. Dieser Schritt wird durch die im TNE-SDS-Blaumarker enthaltenen Farbstoffe sichtbar. Die markierte DNA läuft zusammen mit dem hochmolekularen Dextranblau aus der Säule heraus, wohingegen das niedermolekulare Bromphenolblau mit den kleineren Fragmenten in der Säule verbleibt und somit die Trennung optisch sichtbar wird.

In eine 1 ml Plastikspritze wird Glaswolle gestopft (0,1 ml) und 1 ml der aufgeschüttelten Biogelsuspension zugegeben. Die Säule wird für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Äquilibration der Säule mit 1 x TNE-SDS wird der bereits mit 2 x TNE versetzte Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

3.3.5.3 Hybridisierung der Filter

Die Filter mit den fixierten Nukleinsäuren werden vor Zugabe der radioaktiv markierten Sonde für 2 Stunden mit Hybridisierungspuffer (0,1 ml/cm²) bei 42°C präinkubiert. Während dieser Zeit deckt die im Puffer enthaltene tRNA unspezifische Bindungsstellen ab. Das im Puffer vorliegende Formamid ermöglicht das Herabsetzen der Hybridisierungstemperatur auf 42°C.

Die aufgereinigte radioaktiv markierte Sonde (3.3.5.2) wird für 5 min aufgeköcht und auf Eis abgekühlt. Der Vorhybridisierungspuffer wird verworfen, die Sonde zu frischem Hybridisierungspuffer pipettiert und auf die Filter gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 42°C. Zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA werden die Filter am nächsten Tag 2-3 mal mit Hybridisierungs-Waschpuffer bei 68°C gewaschen und anschließend auf 3 MM Papier getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt.

3.3.5.4 Autoradiographie

Die Autoradiographie dient der Visualisierung der gebundenen Sonden an die Nukleinsäuren. Die Strahlenemission der radioaktiv markierten Sonde induziert eine Veränderung des Ladungszustandes der im Film eingelagerten photosensitiven positiv geladenen Silberionen, dies führt zu einer Präzipitation. Die Wirkung der Strahlung kann durch den Einsatz einer Spezialfolie, die auf der gegenüberliegenden Seite des Films angebracht wird, amplifiziert werden, wenn die Exposition bei niedrigen Temperaturen erfolgt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Filter werden mit einem Röntgenfilm und einer Verstärkerfolie zwischen 1 Tag und 1 Woche bei -70°C exponiert. Neben den normalen Röntgenfilmen werden auch BioMax-Röntgenfilme verwendet, mit den entsprechenden Verstärkerfolien, die im Vergleich mit den normalen System eine fünffache Verstärkung des Signals ermöglichen.

3.3.6 Reverse Transkription von RNA

Diese Technik ermöglicht es durch den Einsatz der Reversen Transkriptase die vorliegende RNA in verschiedene einzelsträngige cDNAs, die dem RNA-Expressionsmuster der Zelle zum gegebenen Zeitpunkt entsprechen, umzuschreiben. Die exprimierten RNAs werden anschließend über eine Amplifikation der cDNA mittels einer PCR-Reaktion im Gel sichtbar. Die Reverse Transkription (RT) wird für den Nachweis von RNA eingesetzt, für die eine Detektion über die Autoradiographie, auf Grund der geringen Menge nicht möglich ist.

Für diese Methode wurde ausschließlich RNA verwendet, die nach Punkt 3.3.2.2 mit dem RNeasy-Kit der Firma Qiagen aufgereinigt wurde, um die Beeinflussung der eingesetzten Enzyme durch verbliebene Chemikalienreste möglichst gering zu halten.

3.3.6.1 DNase-Verdau von RNA

Die Primer, die in der anschließenden PCR-Reaktion, zur Visualisierung der revers transkribierten RNA eingesetzt werden, können auch an die genomische DNA binden und somit zu einer Verfälschung des Expressionsbildes einer spezifischen mRNA führen. Dies ist besonders wichtig, wenn die Expression von Gene, die keine Introns enthalten, z.B. Interferone, detektiert werden soll.

30 μg mRNA werden mit 5 Units DNase, 10 Units RNasin in 100 μl 1 x DNase-Puffer versetzt und für 30 min auf 37°C inkubiert. Durch die Verwendung des RNase-Inhibitors RNasin wird sichergestellt, daß die im Reaktionsansatz enthaltene RNA durch RNasen nicht verdaut werden kann. Durch die Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA pH 8,0 wird die Reaktion abgestoppt, da zweiwertige Kationen, die von der DNase benötigt werden, in Chelatkomplexen gebunden werden. Die vollständige Inaktivierung der DNase erfolgt nicht wie von Hersteller empfohlen, durch eine 10 minütige Inkubation bei 70°C , da dies zu eine Degradierung der RNA unter den

vorliegenden Pufferbedingungen führt, sondern über eine Phenol-Extraktion. Die aufgereinigte RNA wird anschließend mit 1 µg Glykogen, 1/10 Volumenanteil Natriumacetat pH 4,8 und 2 Volumenanteilen Ethanol absolut versetzt und für 1 Stunde oder über Nacht auf -20°C inkubiert. Anschließend wird die RNA durch Zentrifugation bei 4°C und 14 000 rpm pelletiert und 2 mal mit 75 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 30 µl DEPC-Wasser aufgenommen, wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben, vermessen und bei -20°C gelagert.

3.3.6.2 Reverse Transkription der RNA

Die Basis für diese Reaktion liefert die Reverse Transkriptase, die über eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität verfügt und somit in der Lage ist, ein Gemisch von RNAs in cDNA umzuschreiben. In den nachfolgenden Experimenten wird Superscript II (RNase H (-)) eingesetzt, die über keinerlei RNase H Aktivität verfügt.

Für die Initiation der cDNA-Synthese ist ein Oligonucleotid-Primer notwendig, der an die RNA bindet und eine Extension der cDNA in 5'-Richtung ermöglicht. In der Regel werden oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer für die RT eingesetzt um die Umschreibung aller mRNAs zu ermöglichen, jedoch kann durch die Wahl von spezifischen Primern die Umschreibung bestimmter RNA-Spezies selektiv gefördert werden.

In einem Volumen von 11,5 µl werden zunächst 500 ng oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer und 1-3 µg Gesamt-RNA gemischt und für 10 min bei 70°C erhitzt. Die Reaktion wird sofort auf Eis gestellt, um die Renaturierung der RNA zu verhindern, gleichzeitig soll im nachfolgenden Schritt eine Anlagerung der Primer an die Poly-A Abschnitte der mRNA ermöglicht werden. Um eine Beeinflussung der Reaktion auf Grund von falschen Volumina zu unterbinden, werden die Reaktionsansätze vor dem nächsten Schritt kurz abzentrifugiert. Nun folgt die Zugabe des 5 x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP und 0,5 µl RNasin. Der RNase-Inhibitor wird erst an dieser Stelle zugegeben, da er für seine volle Aktivität die Anwesenheit von DTT benötigt. Die Versuchsansätze werden für 2 min auf 42°C gestellt, bevor die Reaktion durch die Zugabe der Reversen Transkriptase gestartet wird und eine Inkubationszeit von 1 h bei 42°C folgt. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 min wird die Reverse Transkriptase denaturiert und die Reaktionsansätze können nach dem Abzentrifugieren des Kondenswassers direkt für eine spezifische Amplifikation des zu analysierenden Genproduktes eingesetzt werden.

3.3.7 PCR

Die Polymerasekettenreaktion, auch als PCR bezeichnet, ermöglicht es, von einer spezifischen DNA-Sequenz ohne jegliche Klonierungsschritte, eine beliebige Anzahl von Kopien zu erstellen. Diese Methode nutzt die Fähigkeit der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese des komplementären DNA-Stranges zu verwenden. Als Ansatzpunkte benötigt die DNA-Polymerase freie 3'-Hydroxylgruppen, an die das nachfolgende Nukleosidtriphosphat gekoppelt werden kann. Diese 3'-Hydroxylgruppe wird durch Primer, die in der Lage sind, sich an komplementäre DNA-Abschnitte anzulagern, zur Verfügung gestellt. Werden die Primer für die PCR so gewählt, daß sie auf gegenüberliegenden DNA-Strängen liegen, so erfolgt die spezifische Amplifikation dieses Abschnittes durch die zyklische Abfolge von Denaturierung, Anlagerung der Primer und die Extension durch die DNA-Polymerase.

Die Limitierung der einzusetzenden DNA liegt theoretisch bei einem einzelnen Molekül, so daß bereits kleinste Mengen für die Reaktion ausreichend sind (Arnheim und Erlich, 1992). Für den Ablauf der Synthese ist die Denaturierung der DNA durch Erhitzen notwendig, um anschließend den Primern die Anlagerung an homologe Abschnitte zu ermöglichen. Durch den Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Lawyer, *et al.*, 1987) wird eine erneute Enzymzugabe nach jedem Denaturierungsschritt überflüssig.

Für die Spezifität der Amplifikation sind die Primer, die „annealing“-Temperatur, sowie die vorherrschenden Salzbedingungen von Bedeutung (Arnheim und Ehrlich, 1992). Die Primer sollten so gewählt werden, daß sie spezifisch an die zu amplifizierende DNA binden. Ist eine Bindung an anderen DNA-Abschnitten möglich, so verringert sich die Spezifität der Amplifikation und die PCR ist nicht mehr selektiv. Die „annealing“-Temperatur soll so stringent wie möglich gewählt werden, d.h. sie sollte möglichst nur 2-3°C unterhalb des Schmelzpunkt der Primer liegen. Unter diesen Bedingungen ist die Anlagerung nur an komplementäre DNA-Abschnitte möglich und unspezifische Bindungen werden verhindert. Die Bereitstellung der notwendigen Salze, inklusive von Magnesiumchlorid, erfolgt durch die Verwendung des mitgelieferten 10 x PCR-Puffers von Sigma.

3.3.7.1 PCR-Reaktion

Für die Reaktion werden dünnwandige PCR-Gefäße verwendet, die eine schnelle Weiterleitung der Temperatur in die Lösung ermöglichen.

Die Reaktion wird in einem Volumen von 50 µl 1 x PCR-Puffer auf Eis zusammenpipettiert. Neben 1.5 mM Magnesiumchlorid, werden auch 1 U Taq-Polymerase, 10 pmol der beiden Primer und 1 µl der RT-Reaktion zugefügt. Die Amplifikation wird in einem Thermocycler der Firma MJ Research mit einem integrierten Heizdeckel durchgeführt, dieser ermöglicht eine

konstante Temperatur im gesamten Reaktionsgefäß, so daß die Verwendung von Mineralöl als Verdunstungsschutz hinfällig ist.

Für die Amplifikation der einzelnen Genprodukte werden die im nachfolgenden aufgelisteten PCR-Programme verwendet. In einem ersten Schritt wird bei jeder PCR eine Denaturierung des Templates durch Erhitzen auf 94°C für 4 min durchgeführt. Die anschließende Erhitzung auf 94°C dient der Denaturierung des Reaktionansatzes während der Amplifikation. Im nächsten Schritt findet jeweils die Anlagerung der Primer bei der spezifischen Temperatur statt, dem sich sofort die Elongation bei 72°C abschließt. Nach dem Ablauf der Zyklen werden alle verbliebenen einzelsträngigen DNA-Abschnitte durch eine Inkubation von 10 min auf 74°C in den doppelsträngigen Zustand überführt und die Reaktion wird auf 4°C heruntergekühlt. Zur Analyse der PCR-Produkte werden jeweils 20 µl der Reaktion in einem 2-3 % Agarosegel mit 1 x TAE-Puffer aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert.

EMCV-PCR

Anzahl der Zyklen 35
94°C 30 Sekunden
55°C 45 Sekunden
72°C 30 Sekunden

IRF-3 PCR

Anzahl der Zyklen 35
94°C 30 Sekunden
57°C 45 Sekunden
72°C 30 Sekunden

IRF-7 PCR

Anzahl der Zyklen 35
94°C 30 Sekunden
54°C 45 Sekunden
72°C 30 Sekunden

IFN- β PCR

Anzahl der Zyklen 40
94°C 30 Sekunden
55°C 45 Sekunden
72°C 30 Sekunden

GAPDH-PCR

Anzahl der Zyklen 38
94°C 30 Sekunden
65°C 45 Sekunden
72°C 30 Sekunden

3.4 Analyse von Proteinen

3.4.1 Proteinisolierung

Die Isolierung der Kern- und zytoplasmatischen Proteine wird mit Hilfe der Kern-Zytoplasma-Trennung nach Schreiber *et al.*, 1989 durchgeführt. Zum Schutz der Proteine vor diversen Proteasen und Phosphatasen, werden die Puffer (A und C) mit entsprechenden Inhibitoren versetzt.

0,5 mg/ml Pefabloc SC (Serinproteaseinhibitor)

5 µg/ml E-64 (Cysteinproteaseinhibitor)

200 mM Natriumorthovanadat (Phosphataseinhibitor)

1 mM Natriumfluorid (Phosphataseinhibitor)

Die Zellen ($7,4 \times 10^6$ / 14,5 cm Schale) werden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 4,8 ml Puffer A, wie unter Punkt 3.3.2.2 beschrieben von den Schalen gelöst. Aus dem zytoplasmatischen Überstand kann die RNA extrahiert werden (3.3.2.1) oder der Proteinextrakt wird aliquotiert und bei -70°C weggefroren. Die pelletierten Zellkerne werden in 400 μl Puffer C aufgenommen und für 15 min auf Eis gestellt, wobei die Proben alle 2 Minuten kurz ge-„vortext“ werden. Durch die anschließende Zentrifugation bei 14 000 rpm für 6 min bei 4°C werden die Kernproteine von der genomischen DNA abgetrennt, die in diesem Puffer unlöslich ist und pelletiert. Der Überstand wird in kleinen Portionen bei -70°C eingefroren.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine wird mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 nach Bradford, 1979 durchgeführt. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an Proteine, wodurch Farbkomplexe entstehen, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Diese Form der Proteinbestimmung eignet sich für Mengen zwischen 1 μg und 10 μg . Durch die Verwendung eines Proteins mit bekannter Konzentration (BSA) für die Erstellung einer Eichgerade kann die Konzentration einer Proteinmischung mit unbekannter Konzentration, bestimmt werden.

1-12 μg BSA werden mit autoklaviertem Wasser auf 800 μl aufgefüllt und mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 2 min wird die Absorption bei 595 nm vermessen und eine Eichgerade erstellt.

3.4.3 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli, 1970, stellt die häufigste Methode dar, die für die Auftrennung von Proteinen verwendet wird. Diese Technik verwendet Puffer mit verschiedenen pH-Werten und unterschiedlicher Zusammensetzung zur Erzeugung eines diskontinuierlichen pH und eines Spannungsgradienten im Gel. Zunächst passieren die Proben ein Sammelgel mit großen Poren, die Glycinionen im Laufpuffer ermöglichen den Proteinen eine schnellere Elektrophorese und somit die Sammlung der Proben unabhängig vom Ladungsvolumen an der Grenze zum Trenngel. Nach dem Sammelgel treten die Proben in das Trenngel ein, welches über eine kleinere Porengröße und über einen höheren pH-Wert als das Sammelgel verfügt. Die zuvor mit SDS und Mercaptoethanol denaturierten Proben werden nun der Größe nach aufgetrennt.

Die Denaturierung der Proteine durch SDS und Mercaptoethanol ist notwendig, da diese ansonsten entsprechend ihres isoelektrischen Punktes und nicht entsprechend ihrer Größe im Gel laufen würden. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an und kompensiert positive Ladungen, so daß die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Das

Mercaptoethanol reduziert in Proteinen auftretende Disulfidbindungen. Durch die Verwendung von Proteinstandards, die aus Proteinen definierter Größe bestehen, kann die Größe der analysierten Proteine bestimmt werden, denn wie bei den Nukleinsäuren findet eine logarithmische Auftrennung statt.

3.4.3.1 Präparation des Gels

Die für den Aufbau des Gelsystems notwendigen Materialien, wie Glasplatten, Abstandhalter und Kämmen werden vor dem Zusammenbau mit Ethanol gereinigt. Je nach anfallendem Probenvolumen werden Abstandhalter mit 1,5 mm oder 1 mm eingesetzt. Die Polyacrylamidprozentigkeit in den Gelen wird nach der gewünschten Auftrennung bestimmt und kann von 7%-15% reichen. Die Polymerisationsgeschwindigkeit der Gele wird durch den Zusatz von 10 % Ammoniumpersulfat als Starter und TEMED, welches als Katalysator fungiert, erhöht. Die Polymerisation von Polyacrylamidgelen erfolgt unter Sauerstoff langsamer, so daß das Trenngel für die zügige Polymerisation nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet wird. Nach einer Stunde ist die Polymerisation abgeschlossen. Das Isopropanol wird abgegossen und durch Spülen mit Wasser vollständig entfernt. Das Sammelgel, dessen Länge vom Volumen der aufzutragenden Proben abhängig ist, wird auf das Trenngel gegossen und der Kamm luftblasenfrei im Sammelgel fixiert. Die Länge des Sammelgels sollte etwas doppelt so lang sein, wie die Proben anschließend in den Taschen stehen. Nach der Polymerisation wird der Kamm entfernt.

Trenngel

0,22 M Tris/HCl pH 8,8
0,1 % SDS
7-15 % Acrylamid/BisAcrylamid 29:1
0,5 % Ammoniumpersulfat
0,07 % TEMED

Sammelgel

0,22 M Tris/HCl pH 6,8
0,1 % SDS
4 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1
0,5 % Ammoniumpersulfat
0,16 % TEMED

3.4.3.2 Vorbereiten der Proben und Elektrophorese

Für die Auftrennung im Polyacrylamidgel, werden je nach Art des Extraktes und des zu analysierenden Proteins zwischen 20 und 50 µg pro Spur geladen. Die Proben werden mit dem Extraktionspuffer auf ein einheitliches Volumen gebracht und mit 5 x Westernladepuffer versetzt, wobei die Endkonzentration 1 x beträgt. Die Proben werden für 5 min aufgekocht, anschließend auf Eis abgekühlt und geladen. Das Absinken der Proben in den Taschen wird durch das im Ladepuffer enthaltene Glycerin sichergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt bei Raumtemperatur mit 1 x Lämmli-puffer über Nacht bei 35 Volt oder innerhalb von 4-5 Stunden bei maximal 40 mA pro Gel.

3.4.4 Western Blot

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden durch den Transfer auf eine Membran übertragen und auf dieser immobilisiert, wobei das Trennmuster und die Immunreaktivität der Proteine erhalten bleibt. Die Detektion der Proteine erfolgt mittels einer indirekten Nachweismethode (Schneppenheim *et al.*, 1991). Ein gebundener Antikörper wird mittels eines zweiten Antikörpers, an den die Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, nachgewiesen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen mit Wasserstoffperoxid die Oxidation von Liminol zu einem Dioxetan, welches instabil ist und bei dessen Zerfall Licht entsteht, daß mittels Autoradiographie nachgewiesen wird. Die Chemolumineszenz wird in Gegenwart von Verstärkern wie Phenol noch erhöht („Enhanced Chemilumineszenz = ECL“).

Für den Transfer der Proteine auf die Membran wird der „Semi-dry“ Transfer (Kyhse-Andersen, 1984; Bjerrum und Schafer-Nielson, 1986) eingesetzt. Wird eine PVDF-Membran eingesetzt, so wird diese zu Aktivierung für 1 min in technisches Methanol gelegt und anschließend mit Wasser gespült und in Transfer-Puffer II für 15 min äquilibriert. Wird eine Nitrocellulosemembran verwendet, so wird diese sofort in Transfer-Puffer II gelegt. Das Gel wird nach der Elektrophorese für 15 min im Transfer-Puffer III inkubiert. Der Aufbau der Blots erfolgt nun nach folgendem Schema von der Kathode in Richtung Anode. Auf die Kathode werden 9 3MM Papiere in Transfer-Puffer III gelegt, auf die das äquilibrierte Gel und die Membran aufgelegt werden. Auf die Membran folgen nun 3 Papiere befeuchtet mit Transfer-Puffer II und 6 Papiere mit Transfer-Puffer I. Beim Aufbau des Blot werden eventuell vorliegende Luftblasen durch das Abrollen von Glaspipetten auf den aufgelegten Papieren entfernt. Der Transfer erfolgt bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membran für 1-1,5 Stunden, je nach Dicke des Gels.

3.4.5. Ponceau-Rotfärbung

Zur Überprüfung des Transfers werden die Proteine auf der Membran reversibel mit Ponceau-Rot-Lösung für 1 min angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wird durch 5 minütiges Waschen in bidest. Wasser entfernt. Durch die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure wird neben der Anfärbung der Proteine auch gleichzeitig deren Bindung an die Membran stabilisiert. Anschließend wird die Membran noch solange mit TBST oder PBS gewaschen, bis die Färbung der Proteine verschwunden ist.

3.4.6 Blockierung der Membran

Unspezifische Bindungstellen auf der Membran werden durch Inkubation in 5 % Milch (TBST) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht unter Schütteln, abgedeckt.

3.4.7 Nachweis durch spezifische Antikörper

Die Membran wird über Nacht bei 4°C im Blockierungspuffer, der den Antikörper in der entsprechenden Verdünnung enthält, auf einem Drehschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die überschüssige Antikörperlösung verworfen und die Membran 4 x für 5 min mit Antikörperwaschpuffer gewaschen. Diesem Schritt schließt sich die Inkubation mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur im Blockierungspuffer auf einem Überkopfschüttler für 1 Stunde an. Der Nachweis der Antikörperkomplexe erfolgt mit dem "ECL"-System der Firma Amersham. Die Reagenzien 1 und 2 werden im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und auf die gewaschenen Membranen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min werden die Membranen in Auroradiographiekassetten verpackt und bei Raumtemperatur zwischen 1 Sekunde und 30 min exponiert.

3.4.8. Strippen und Lagerung der Membranen

Nach der Detektion der Chemolumineszens werden die Membranen für 5 min mit 1 x TBS gewaschen. Soll die Membran für die spezifische Detektion eines weiteren Proteins verwendet werden, so müssen zunächst durch „Strippen“ die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden. Die Membran wird für 5 min in bidest Wasser und anschließend in 0,2 M Natronlauge für 5 min inkubiert. Dieser Schritt dient der Entfernung der Antikörper. Zur Renaturierung der Proteine wird die Membran in Anschluß an diesen Schritt für 5 min in bidest Wasser und für 5 min in 1 x TBS inkubiert. Bevor die Membran nun mit einem anderen Erst-Antikörper inkubiert wird muß die Membran nach Punkt 3.4.6 geblockt werden.

3.5. Elektromobilitäts-Shift-Analysen (EMSA)

Elektromobilitäts-Shift-Analysen ermöglichen die Untersuchung des Bindungsverhaltens von Transkriptionsfaktoren an die entsprechende Konsensussequenz.

Die zu analysierenden Proteine werden mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid inkubiert, durch die Zugabe von Poly(dI-dC) werden unspezifische Bindungen verhindert. Die Auftrennung der ungebundenen Oligonukleotide und der entstandenen Komplexe erfolgt in einem nativen Polyacrylamidgel.

Die Isolierung der Proteine für die Elektromobilitäts-Shift-Analysen in dieser Arbeit wurden von mir nach Punkt 3.4.1 durchgeführt. Die weiteren Methoden zur Durchführung der EMSAs wurden in Kooperation mit Dr. Ubaldo Soto, Heidelberg durchgeführt.

3.5.1 Annealing des Oligonukleotides

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in sense- und antisense-Orientierung. Damit das Bindungsverhalten der Transkriptionsfaktoren an doppelsträngige DNA analysiert werden kann, müssen die Einzelstränge miteinander annealt werden. Dazu werden gleiche Mengen der komplementären Stränge in 20 µl STE-Puffer resuspendiert und in einem PCR-Gerät für 10 min auf 85 °C erhitzt. Die Abkühlung erfolgt mit 1°C pro min. und ermöglicht die Anlagerung der komplementären Stränge aneinander. Die Lagerung erfolgt auf -20°C.

3.5.2 Markierung und Aufreinigung des Oligonukleotids

Die radioaktive Markierung des Oligonukleotides erfolgt mit ³²P-gamma ATP nach dem aufgeführten Schema für 30 min bei 37°C.

2 µl Oligonukleotid (annealt)
2 µl H₂O
1 µl 10 x Markierungspuffer
1 µl T4-Kinase
4 µl ³²P-gamma-ATP

Durch die Zugabe von 5 µl DNA-Ladepuffer wird die Reaktion abgestoppt. Die Abtrennung evtl. verbliebener einzelsträngiger Oligonukleotide erfolgt in einen nativen 15% Polyacrylamidgel bei 200 Volt für 1,5 Stunden in 1 x TBE-Puffer bei Raumtemperatur. Mittels Autoradiographie werden die Banden sichtbar und die höher laufende doppelsträngige DNA-Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution erfolgt über Nacht in 1x TNE-Puffer bei 4°C.

3.5.3 EMSA-Reaktion und Gelelektrophorese

Die EMSA-Reaktion wird mit Kernextrakten durchgeführt, da sich die transkriptionell aktiven Formen der Proteine im Zellkern befinden.

Pro Reaktionsansatz werden x µg Kernextrakt eingesetzt. Die Spezifität der Reaktion ist abhängig vom gewählten Oligonukleotid und der Zugabe des unspezifischen Kompetitors Poly (dI-dC). Für jeden Ansatz ergibt sich folgende Zusammensetzung im Gesamtvolumen von 20 µl

X µg Kernextrakt
+ 2 µg Poly(dI-dC)
+ 5 x Bindungs-Puffer für Bandshift
+ 10 000 cpm des markierten Oligonukleotides

Die Ansätze werden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Soll eine genauere Spezifizierung der an die markierte Oligonukleotidsequenz gebundenen Proteine erfolgen, so werden Supershift-Analysen durchgeführt. Nach der 30 min Inkubation der Reaktionsansätze werden diese mit 1 µl des spezifischen Antikörpers versetzt und nochmals bei 4 °C für 1 Stunde inkubiert.

Die Auftrennung der Reaktionsansätze erfolgt in 0.3 x TBE-Puffer bei 4°C für 30 min bei 280 Volt und 1 Stunde bei 350 Volt. Anschließend wird das Gel auf Whatman-Papier für 1 Stunde bei 80 °C getrocknet. Mittels Autoradiographie werden die retardierten Protein-Oligonukleotid-Komplexe nachgewiesen, wobei die Größe des Komplexes für die Laufstrecke im Gel verantwortlich ist. Größere Komplexe legen in derselben Zeit eine kürzere Laufstrecke zurück als kleinere.

3.6 Methoden zur Analyse von Interferon

Die Grundlage für die Methoden zur Analyse von endogenem und exogenem Interferon bildet die Tatsache, daß Interferone in der Lage sind mit viraler Replikation in eukaryontischen Zellen zu interferieren (Isaacs und Lindenmann, 1957). Interferone induzieren in vielen eukaryontischen Zellen einen antiviralen Status, diese Zellen werden auch als interferonsensitive Zellen bezeichnet. Das Vorhandensein eines antiviralen Zustandes läßt sich durch eine Infektion mit Interferon-sensitiven Viren überprüfen, solche Viren sind beispielsweise das Encephalomyocarditis Virus (EMCV) oder das Vesicularstomatitis Virus (VSV). Diese replizieren in der Gegenwart von Interferonen oder einem Interferon-induzierten antiviralen Status in den Zellen nicht mehr und können keine Lyse der Zellen induzieren. Das Auftreten einer virus-induzierten Lyse läßt sich mikroskopisch mit dem Auftreten von cytopathischen Effekten (CPE) beobachten.

3.6.1. Permissivitätsanalyse der Zellen

Die Permissivitätsanalyse dient der Feststellung, für welche Zell-Linien in den anschließenden Protektionsanalysen EMCV und für welche VSV verwendet werden kann. Die Zellen werden hierzu in unterschiedlichen Zelldichten in 96-Lochplatten ausgesät und mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert. Für jede Zell-Linie ergeben sich die individuelle Lysezeitpunkte bei unterschiedlichen Virusverdünnungen nach verschiedenen Inkubationszeiten, so daß jede Platte mindestens im Duplikat angelegt, um eine längere Inkubationszeit und eine kürzere Inkubationszeit beobachten zu können

Für jede zu analysierende Zell-Linie werden zwei 96-Lochplatten mit folgenden Zelldichten ausgesät:

0,5 x 10⁵ Zellen/ml

1,5 x 10⁵ Zellen/ml

1 x 10⁵ Zellen/ml

2 x 10⁵ Zellen/ml

Die Permissivitätsanalyse soll möglichst nach den Bedingungen der nachfolgenden Protektionsanalyse durchgeführt werden, so daß die Zellen nicht am ersten Tag, sondern am zweiten Tag nach der Aussaat mit dem Virus infiziert werden. Die Infektion erfolgt in DMEM-Medium mit 10 % FKS, welches auf 37°C vorgewärmt wurde. Die Viren werden in den folgenden Verdünnungen ausgetestet:

EMCV

1:1000 (m.o.i. 0,8)

1:2000 (m.o.i. 0,4)

1:4000 (m.o.i. 0,2)

1:8000 (m.o.i. 0,1)

VSV

1:1000 (m.o.i. 0,8)

1:2500 (m.o.i. 0,4)

1:5000 (m.o.i. 0,2)

1:10000 (m.o.i. 0,1)

Der Beobachtungszeitraum beträgt 16 bis 36 Stunden. In diesem Zeitrahmen werden die Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten mikroskopisch begutachtet. Bevorzugt werden Lysezeitpunkte mit hohen Virusverdünnungen, da sie eine Reproduzierbarkeit des Ergebnisses garantieren.

3.6.2. Analyse der Virusprotektion

Die Untersuchungen der Virusprotektion dient der Feststellung der Interferonsensitivität und der Fähigkeit der verwendeten Zell-Linien auf Grund einer Inkubation mit TNF- α endogenes Interferon- β zu induzieren.

3.6.2.1 Standardvirusprotektionanalyse mit EMCV oder VSV

Die Interferonsensitivität oder die Fähigkeit, endogenes IFN mit EMCV oder VSV, je nach der Permissivität der Zelllinie, laut Tabelle 3.1 durchgeführt.

Da es sich hier um eine rein biologische Analyse handelt, wird für jede Konzentration eines eingesetzten Zytokins mindestens ein Dreifachwert auf einer Platte bestimmt, und der Versuch wird im Triplikat durchgeführt.

Die Zellen werden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Loch in einer 96-Lochplatte im Volumen von 100 μ l ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 100 μ l des zu analysierenden Zytokins versetzt. Um die gewünschte Konzentration des Zytokins in der ersten Reihe zu haben, wird es in der doppelten Konzentration angesetzt, da auf Grund der Zugabe des Zytokins bereits eine 1:2 Verdünnung in der ersten Reihe zustande kommt. Die anschließende Verdünnung des Zytokins erfolgt indem jeweils 100 μ l aus der oberen Reihe in die darunterliegende pipettiert und mit dem darin vorliegenden Medium gemischt werden und erneut 100 μ l aus dieser Reihe in die darunterliegende gegeben werden usw. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 Stunden erfolgt die

Tabelle 3.1 Permissivität der einzelnen Zelllinien, sowie die eingesetzten spezifischen „Multiplicities of infection“ (m.o.i.)

EMCV	spezifische m.o.i.	VSV	spezifische moi
444	0,1	CaSki x HeLa	0,1
1/9	0,1	SiHa	0,1
HeLa	0,1		
CGL3	0,1		
SW756	0,1		
SiHa x HeLa	0,1		
A549	0,1		
SW756 x HeLa	0,1		
CaSki	0,2		

Infektion mit dem Virus. Für diesen Schritt muß das Medium auf 37°C vorgewärmt sein, da es in kälterem Medium zu einer Reduktion der viralen Aktivität kommt. Bei den Zell-Linien 444, 1/9, HeLa und CGL3 wird das Virus stets 1:8000 verdünnt, dies entspricht einem Infektionsfaktor („multiplicity of infection“ oder m.o.i) von 0,1, d.h. daß in etwa jede zehnte Zelle von einem

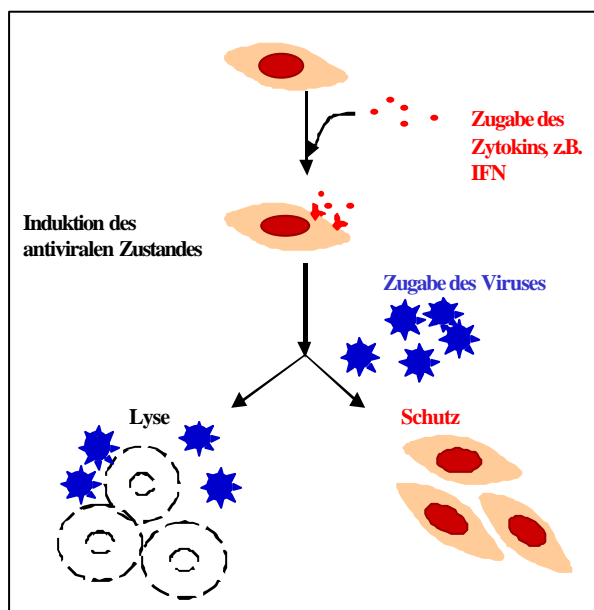


Abb. 3.2 Schematische Darstellung einer Standardvirustitration.

Virus infiziert wird und durch die Replikation und die virusinduzierte Lyse werden die restlichen Zellen infiziert. Das Virus wird in das Medium pipettiert und gut gemischt. Die Medienüberstände werden von den 96 Lochplatten abgekippt und die entsprechenden Reihen werden mit 100 µl Medium, welches den Virus enthält, versetzt. Um einen guten Vergleich zwischen lysierten Zellen und nicht-lysierten Zellen zu haben ist es wichtig, den Zeitpunkt der vollständigen viralen Lyse abzuwarten. Aus diesem Grund gibt es auf jeder Platte eine

Viruskontrolle. Da jedoch auch Zytokine einen Einfluß auf das Wachstum von Zellen haben

können, welches dann fälschlicherweise auf virusinduzierte Lyse zurückgeführt werden könnte, gibt es auf jeder Platte eine Kontrolle zum Zellwachstums und eine Kontrolle zur Beobachtung von Zytokineffekten. Die Platten werden solange mit dem Virus inkubiert, bis die virale Lyse vollständig ist. Bei einer Infektion mit EMCV sind hierfür 16-24 Stunden notwendig, bei einer Infektion mit VSV bis zu 36 Stunden.

3.6.2.2 Dokumentation und Berechnung der Virusprotection

Nach der Beendigung der viralen Lyse wird das Medium abgekippt und die Zellen werden mit 4 % Glutardialdehyd für 2 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Färbung der Zellen erfolgt nach dem vorsichtigen Waschen in bidest Wasser mit 2 % Kristallviolett in PBS für 2 min. Die Platten werden nun gut gewaschen und anschließend bei 37°C für 1 Stunde oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Dokumentation des Ergebnisses werden die Platten zunächst mit einem untergelegten Papier bei Blende 32 mit der Belichtungszeit von 1/16 Sekunde auf Polaroidbilder fotografiert. Für die Berechnung der Virusprotektion wird der Farbstoff in 33 % Essigsäure (100 µl/Loch) resuspendiert und die Platten in einem ELISA-Reader bei 595 nm vermessen. Die Viruskontrolle wird dabei als Nullwert angegeben und von den Werten der restlichen Löcher subtrahiert.

Die Berechnung der viralen Protektion basiert auf der internationalen Definition von Interferon, die besagt, daß 1 Unit Interferon in der Lage ist, 50 % der Zellen vor viraler Lyse zu schützen, bei einer Protektion unterhalb von 50 % wird nicht mehr von einem Schutz gesprochen.

Die Basis für den Vergleich zwischen geschützten und nicht-geschützten Zellen liefert die Zellkontrolle. Aus den Werten, die im ELISA-Reader gemessen wurden, wird jeweils der Mittelwert gebildet, wobei der Mittelwert der Zellkontrolle 100 % und somit vollständigem Schutz entspricht. Die Mittelwerte der unterschiedlichen Zytokinverdünnungen werden mit dem Mittelwert der Zellkontrolle in Relation gesetzt und der prozentuale Anteil einer jeden Verdünnungsstufe an der Zellkontrolle berechnet.

$$\% \text{ der Protektion} = \frac{\text{Mittelwert der Zytokinverdünnung} \times 100}{\text{Mittelwert der Zellkontrolle}}$$

3.6.2.3 Neutralisationsanalyse

Die Spezifizierung von induzierten Interferonen erfolgt über eine Neutralisationsanalyse. Auch hier wird die Eigenschaft der Interferone mit viraler Replikation zu interferieren genutzt. Durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers wird verhindert, daß das sezernierte Interferon

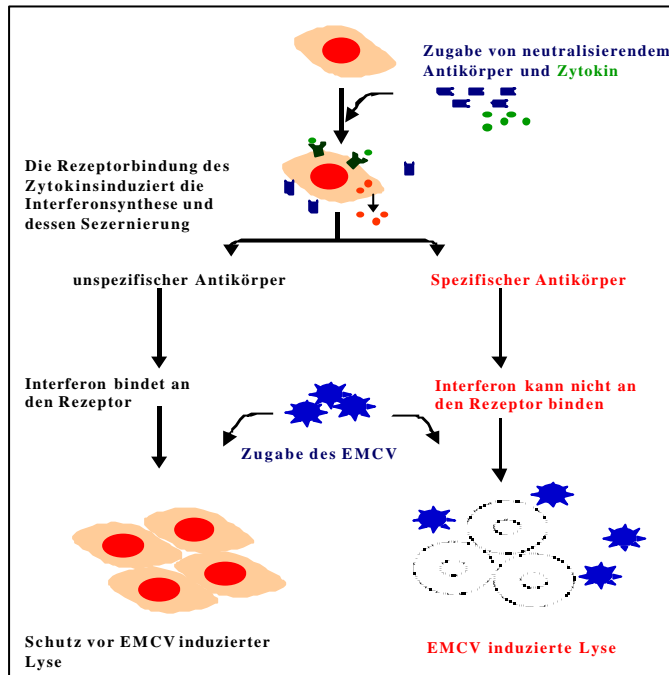


Abb. 3.3. Schematisierte Darstellung der Vorgehensweise bei einem Neutralisationsassay

mit seinem Rezeptor interagieren und den antiviralen Zustand in der Zelle induzieren kann. Entspricht der eingesetzte Antikörper dem induzierten Interferon, so kommt es zu einer Lyse der Zellen, ist er jedoch unspezifisch, so werden die Zellen weiterhin geschützt (Abb. 3.3).

Die Zellen werden wie unter 3.6.2.1 beschrieben in 96 Lochplatten ausgesät. Eine Stunde vor der Zugabe des Zytokins, werden die Zellen mit neutralisierendem Antikörper versetzt. Die Zytokine werden nun in einer 10-fach höheren Konzentration angesetzt, da die Verdünnung des zuvor zugegebenen neutralisierenden Antikörpers so gering wie möglich sein soll. Die Inkubation

erfolgt für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zugabe des Virus, sowie die Visualisierung erfolgen, wie zuvor unter 3.6.2.1 und 3.6.2.2 beschrieben.

3.6.2.4 Protektionsanalysen mit Signaltransduktionsinhibitoren

Zur Analyse der an der Induktion der Protektion beteiligten Signaltransduktionswege wird mit verschiedenen Inhibitoren gearbeitet. Die Basis dieser Analyse bildet die Standardvirustitration wie sie unter Punkt 3.6.2.1 beschrieben ist. Vor der Zugabe der Zytokine werden die Zellen laut Angaben der Hersteller mit den Inhibitoren behandelt.

3.6.3 Bestimmung von Interferonen im Medium

Die Bestimmung von Interferonen im Medium dient dem Nachweis von endogenem, in den Zellen synthetisiertem und ins Medium abgegebenem Interferon, dessen Synthese durch einen anderen Stimulus, zum Beispiel TNF- α , induziert wurde.

Interferone üben ihre biologische Aktivität bereits in so geringen Mengen die durch einen direkten Nachweis nicht detektiert werden können. Aus diesem Grund wird eine indirekte

Methode angewandt. Als Indikatorzell-Linie werden die A549 Zellen verwendet, die in der Literatur als Interferon-sensitive Zell-Linie beschrieben sind (World Health Organization, 1983). 100 µl der A549, die auf die Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml eingestellt wurden, werden in 96 Lochplatten ausgesät. Das zu analysierende Medium wird am nächsten Tag auf die A549 gegeben, wobei in der ersten Reihe der 96-Lochplatte, die Zugabe des Mediums unverdünnt erfolgt und in den nachfolgenden Reihen eine Verdünnung von 1:2 von oben nach unten stattfindet. Liegt nun Interferon im Medium vor, so können die A549 mit der Induktion eines antiviralen Zustands reagieren, der sich durch eine Infektion der Zellen am nächsten Tag mit EMCV (1:8000) nachweisen läßt. Eine Unit Interferon ist durch die Protektion von 50 % der Zellen vor viraler Lyse definiert. Anhand dieser Definition wird die Menge des im zu testenden Medium vorliegenden Interferon bestimmt.

3.7 Tumorigenitätsanalyse in Nacktmäusen

Für die Injektion in die Nacktmaus werden nach Punkt 3.2.3 1×10^7 Zellen ausgezählt. Diese werden 3 mal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS gut resuspendiert. Für jede zu testende Zelllinie werden 4 Mäuse eingesetzt, von denen jede pro Flanke eine Injektion von 0,1 ml erhält, dies entspricht 1×10^6 Zellen/Injektion. Das Wachstum der Zellen wird im Rhythmus von 2 bis 3 Tagen durch die Vermessung der Knötchen dokumentiert. Das jeweilige Volumen des Tumors wird mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

$$\text{Tumorvol (in mm}^3\text{)} = (0,4 \times a) \times b^2$$

wobei a der Längsseite und b der Breitseite des Tumors entspricht (Soto *et al.*, 2000). Aus den so ermittelten Daten wird der Mittelwert berechnet und dieser graphisch dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Induktion von Interferon β (IFN- β) durch TNF- α in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV16/18 positiven Zellen

4.1.1 Sensitivität im Stanbridge-Systems gegenüber Typ I und Typ II IFN

Als Modellsystem wurden HPV18 positive HeLa-Zellen und davon abgeleitete somatische Zellhybride verwendet (Stanbridge, 1982). Der tumorigene Phänotyp von HeLa-Zellen wird durch die Fusion mit primären humanen Fibroblasten reprimiert. Die aus dieser Fusion resultierenden nicht-tumorigenen somatischen Zellhybride werden als 444-Zellen bezeichnet. Durch Langzeit *in vitro* Kultivierung dieser Zellen entstehen seltene tumorigene Segreganten, die als CGL3-Zellen bezeichnet werden (Abb. 4.1). Dieses System ermöglicht die Untersuchung von Zytokin-Signaltransduktionswegen in Zellen mit derselben HPV18 Transkriptionskassette (Rösl *et al.*, 1989), wobei jedoch die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 in einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund stattfindet.

Um zu überprüfen ob die viralen Onkogene E6 und E7 die Interferon-Signaltransduktion in ihrer

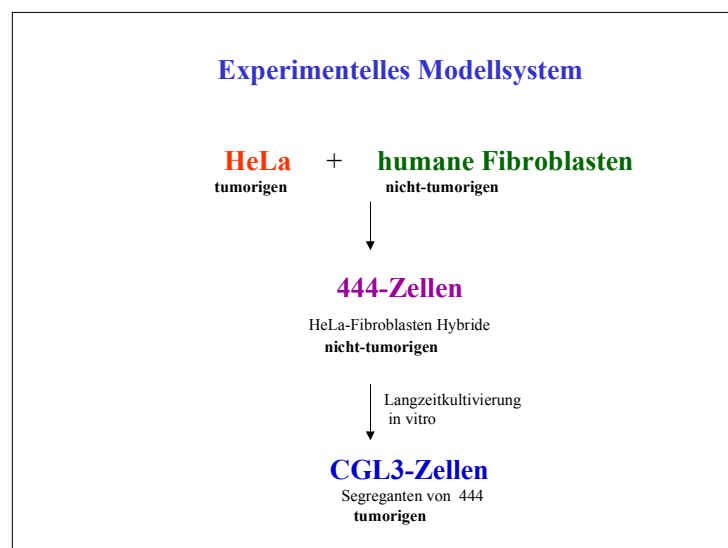


Abb. 4.1 Darstellung des Stanbridge-Systems.

Durch die Fusion nicht-tumorigener humaner Fibroblasten mit HeLa-Zellen entstehen nicht-tumorigene Hybride („444-Zellen“). CGL3-Zellen sind die tumorigenen Segreganten dieser Hybride.

natürlichen Wirtszellumgebung beeinflussen können (Ronco *et al.*, 1998; Barnard *et al.*, 1999; Barnard und Mc Millan, 1999; Perea *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000), wurde in einem ersten Versuch die Sensitivität der Zellen für exogen supplementiertes Interferon getestet. Die Zellen wurden in einer definierten Zelldichte in 96-Lochplatten ausgesät und für 24 Stunden mit unterschiedlichen Mengen an IFN- α , IFN- β oder IFN- γ behandelt. Dieser Schritt führt, wenn die

Signaltransduktion in den Zellen intakt ist, zur Induktion eines antiviralen Status, der durch die Infektion mit einem Interferon-sensitiven Virus (EMCV oder VSV) überprüft werden kann (WHO, 1983). Im Falle des Stanbridge-Systems erfolgte die Infektion mit dem EMC-Virus. Für den direkten Vergleich zwischen geschützten und lysierten Zellen wurde auf jeder Platte eine Viruskontrolle (vc) angelegt. Da gezeigt werden sollte, daß die beobachteten Lysen nicht auf den Wirkungen der Zytokine basierte, enthielt jede Platte eine Zytokinkontrolle (Tc). Die Abbildung 4.2 zeigt die Signaltransduktionsfähigkeit der 3 Zelllinien auf exogen supplementiertes IFN- α , IFN- β und IFN- γ .

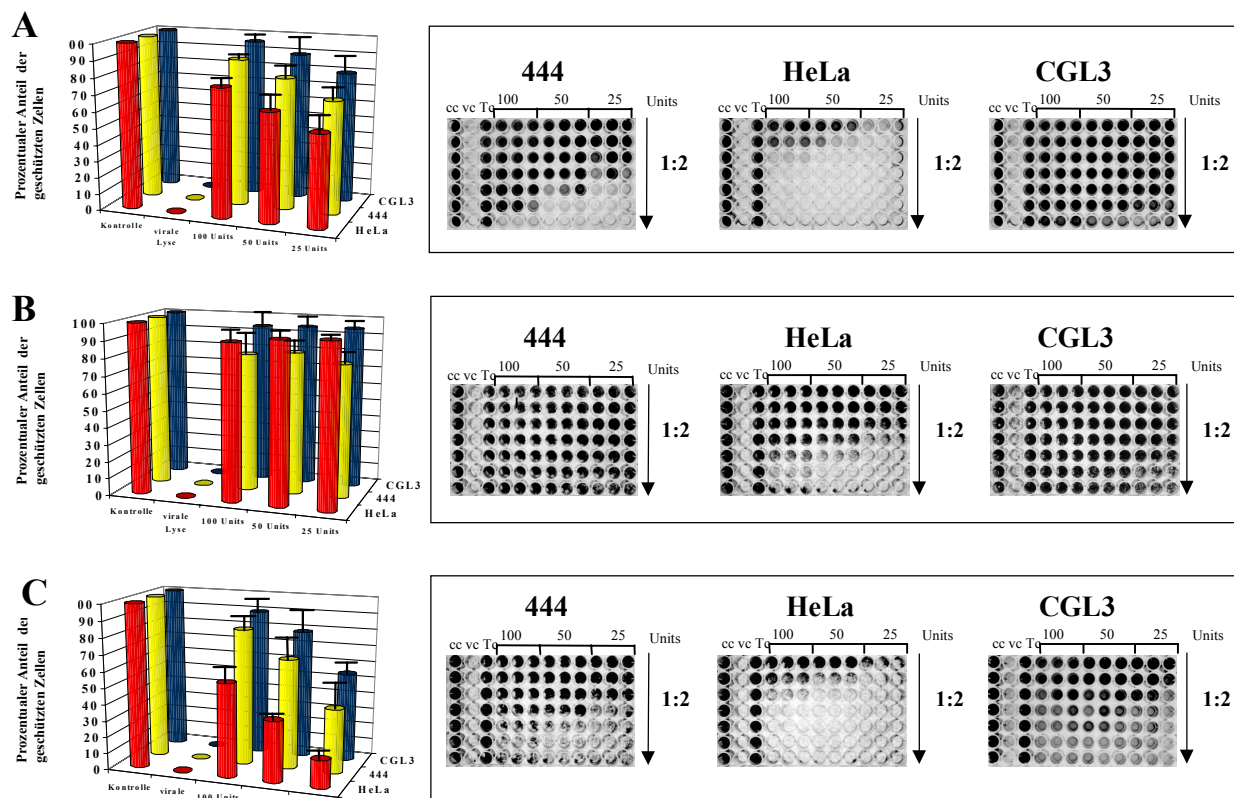


Abb. 4.2 Exogen supplementiertes Typ I und Typ II IFN führt zur Induktion eines antiviralen Status in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen.

Analyse der IFN-Signaltransduktion in 444-, HeLa- und CGL3-Zellen durch die Induktion des antiviralen Status. Für einen direkten Vergleich zwischen lysierten und geschützten Zellen befand sich auf jeder Platte die Viruskontrolle (vc), die Zytokinkontrolle (Tc), sowie eine Zellkontrolle zur Demonstration des zellulären Wachstums (cc). Der Wert der Zellkontrolle entsprach 100 % und die Werte der behandelten Zellen wurden in Relation dazu gesetzt. Die Verdünnung der Interferone fand in 1:2 Schritten von oben nach unten statt. Die graphische Auswertung basiert auf 3 unabhängigen Experimenten, die im Triplikate durchgeführt wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in der graphischen Darstellung nur die Werte 100 Units, 50 Units und 25 Units angegeben. Zur Veranschaulichung ist exemplarisch jeweils eine Platte einer Zelllinie, die mit dem entsprechenden Interferon behandelt und anschließend mit EMCV infiziert wurde, abgebildet.

A: IFN- α , B: IFN- β , C: IFN- γ

Der abnehmende Schutz bei gleichzeitig abnehmenden Interferon-Mengen zeigte, daß es sich hier um einen reversiblen Mechanismus handelte, der von der Anwesenheit der Interferone abhing. Lag, wie bei den Viruskontrollen (vc), kein Interferon vor, so induzierte das EMC-Virus

die Lyse der Zellen. In Gegenwart von Interferon (Typ I oder Typ II) war es hierzu nicht mehr in der Lage.

Beim Vergleich der Virustitrationen mit IFN- α , IFN- β und IFN- γ wird deutlich, daß HPV18 positive Zellen unabhängig vom tumorigenen Phänotyp und vom eingesetzten Interferon mit der Induktion eines antiviralen Status auf exogen supplementiertes Interferon reagieren konnten. HeLa-Zellen zeigten, wenn sie mit IFN- γ behandelt wurden, eine rapidere Abnahme der Protektion als die 444- und CGL3-Zellen.

Nachdem die tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen unter Beweis gestellt hatten, daß sie durch Interferone in die Lage versetzt wurden, die Replikation und die Lyse des EMC-Virus zu blockieren, sollte diese Methode auf die Analyse von endogenem IFN- β angewandt werden. In diesem Zusammenhang wurde die Induktion nicht durch eine virale Infektion oder durch dsRNA stimuliert, da auf diese Weise IFN- α und IFN- β gleichzeitig induziert werden (Goodbourn *et al.*, 2000; Taniguchi und Takaoka, 2001). Statt dessen wurde TNF- α gewählt, da es die selektive Induktion des IFN- β gewährleisten sollte (Mestan *et al.*, 1986; Jacobsen *et al.*, 1989). Zudem lagen in diesem zellulären System bereits erste Daten vor,

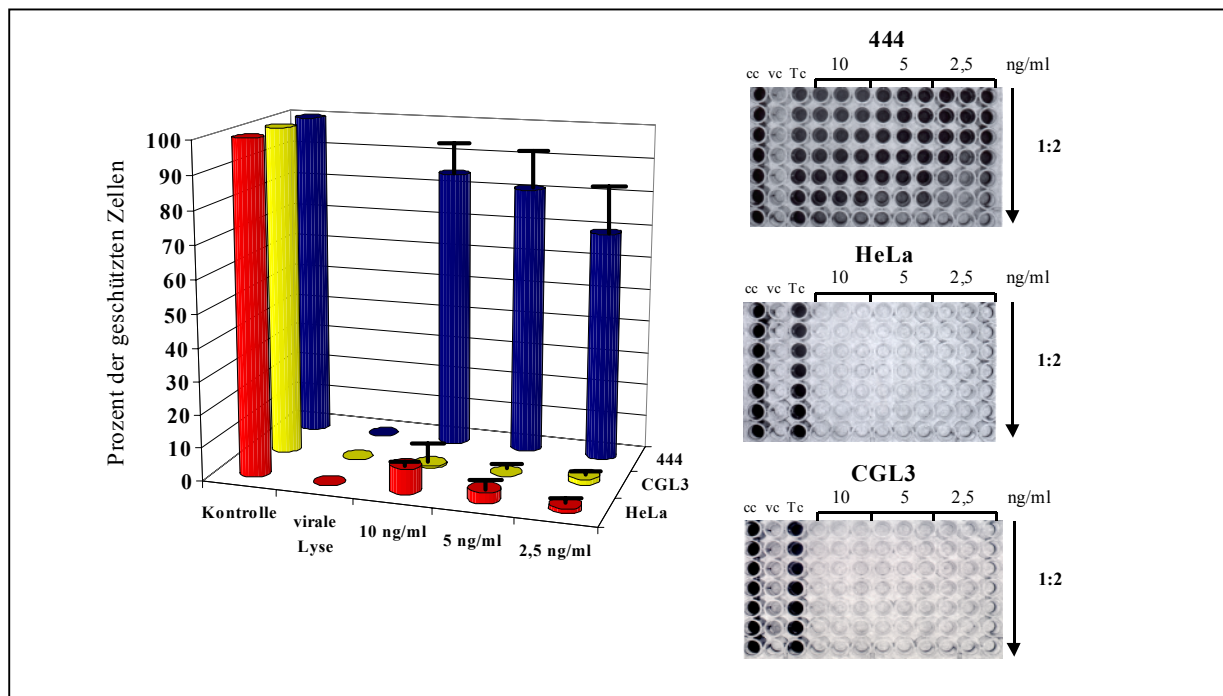


Abb. 4.3 TNF- α induziert nur in den nicht-tumorigenen 444-Zellen einen antiviralen Schutz gegenüber dem EMC-Virus.

In 444-Zellen führte die Inkubation mit TNF- α zu einem protektiven Effekt, wohingegen die tumorigenen HeLa- und CGL3-Zellen lysiert wurden. Auf der rechten Seite ist für jede Zelllinie eine repräsentative 96-Lochplatte abgebildet. Die graphische Auswertung basiert auf 3 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils im Triplikat durchgeführt wurden. Als Kontrollen wurden auf jeder Platte die Viruskontrolle (vc) zur Beobachtung der viralen Lyse, die Zytokinkontrolle (vc) zur Beobachtung von Zytokineinflüssen auf das Wachstum der Zellen und die Zellkontrolle (cc) zur Beobachtung des zellulären Wachstums mitgeführt. Die Verdünnung des TNF- α erfolgte in 1:2 Schritten von oben nach unten.

die eine unterschiedliche Signaltransduktion in den tumorigenen und den nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen durch TNF- α zeigten (Rösl *et al.*, 1994; Soto *et al.*, 1999, Finzer *et al.*, 1999). Das antivirale Assay mit TNF- α führte im Vergleich mit Typ I und Typ II Interferonen zu einem völlig anderen Bild. Nur nicht-tumorigene HeLa-Fibroblasten-Hybride konnten vor einer EMCV-induzierten Lyse geschützt werden (Abb. 4.3). Um die Beteiligung des IFN- α an diesem Prozeß wirklich ausschließen zu können, wurde eine Neutralisationsanalyse durchgeführt. Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen IFN- α oder IFN- β sollte die Bindung des Zytokins an seine Rezeptoren und damit die Induktion der Signaltransduktion, die normalerweise zu einem antiviralen Status in der Zelle führen würde, verhindern. Abbildung 4.4 A demonstriert eindeutig, daß der antivirale Status nicht auf TNF- α basierte, da trotz der Zugabe von neutralisierenden Antikörpern eine Lyse der Zellen stattfand. Auch eine Beteiligung von IFN- α war auszuschließen, da die Zugabe der entsprechenden Antikörper keine Reduktion des Schutzes zur Folge hatte. Ein anderes Bild ergab sich bei der Betrachtung der Reihen, die mit neutralisierendem IFN- β Antikörper präinkubiert worden waren. Hier kam es zu einer deutlichen

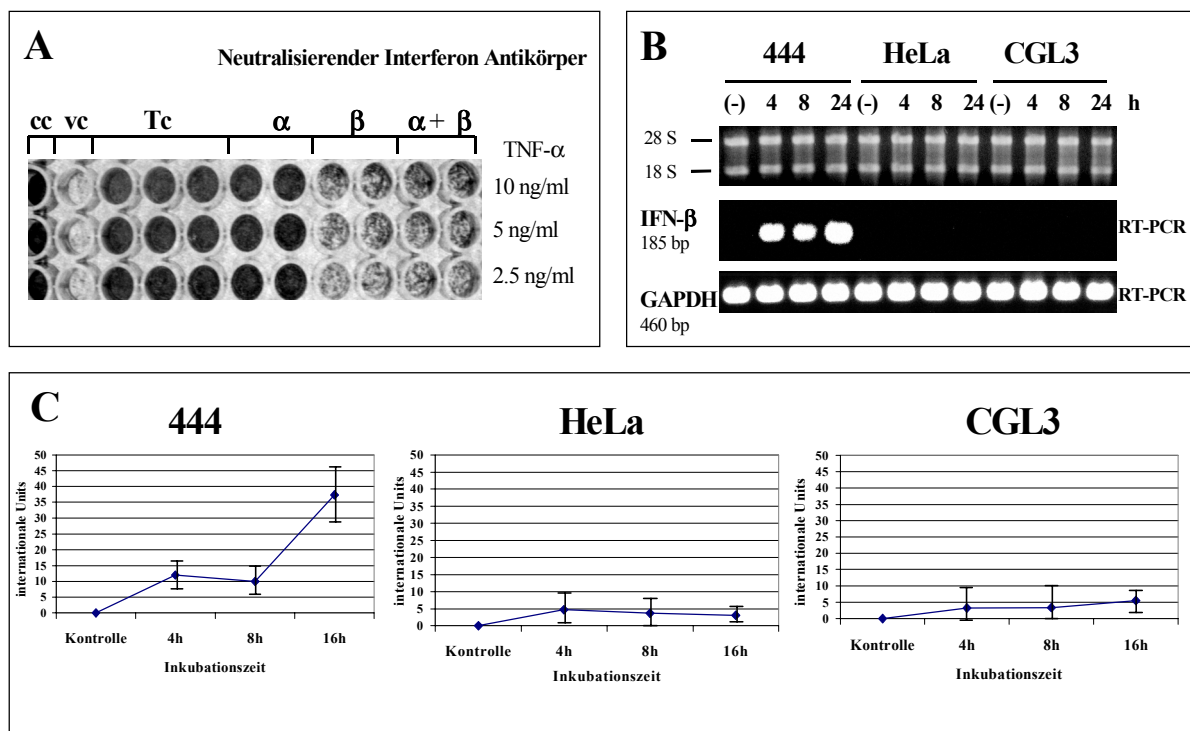


Abb. 4.4 Nachweis der Spezifität und der biologischen Aktivität von induziertem IFN- β .

A: Die Zellen wurden vor der Zugabe des TNF- α für 1 Stunde mit den entsprechenden neutralisierenden Antikörpern vorinkubiert. Das induzierte IFN ist durch die Abnahme des Schutzes zu erkennen.

B: Für die RT-PCR wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNF- α entsprechend den Angaben inkubiert. Aus dem Gemisch der revers transkribierten cDNA-Fragmente wurden anschließend IFN- β und GAPDH mittels PCR spezifisch amplifiziert.

C: Die biologische Aktivität des endogenen IFN- β wurde auf A549-Zellen nachgewiesen. Überstände von TNF- α (10 ng/ml) behandelter Zellen wurden abgezogen und auf die Indikatorzellen gegeben. Die Menge der gebildeten Units wurde durch den Vergleich mit einer IFN- β Kontrolle ermittelt. Die graphische Darstellung basiert auf 3 unabhängig voneinander durchgeführten Analysen.

Abnahme der Protektion, so daß eindeutig IFN- β als antiviral agierendes und durch TNF- α induziertes Interferon identifiziert wurde.

Als Auslöser der fehlenden Protektion in den tumorigenen Zellen kam entweder eine fehlende Induktion der Transkription des IFN- β Gens oder eine fehlende Translation der korrespondierenden mRNA in Frage. Die RT-PCR (siehe Abbildung 4.4 B) führte vor Augen, daß in tumorigenen Zellen eine Induktion der IFN- β Transkription durch TNF- α nicht stattfand, auch nicht nach 16 Stunden, wohingegen in 444-Zellen dies bereits nach 4 Stunden der Fall war. An Hand der Protektions- (Abb. 4.3) und des Neutralisationsassays (Abb. 4.4 A) ist keine Aussage auf die gebildeten Mengen an IFN- β möglich. Da diese jedoch in bezug auf die physiologischen Mengen der Interferone von Interesse sind, wurden Überstände von den Schalen, die mit 10 ng/ml TNF- α inkubiert worden waren, abgezogen und auf humanen A549-Zellen, im direkten Vergleich mit einer IFN- β Behandlung der Zellen, getestet. In A549-Zellen führte die Inkubation mit TNF- α nicht zu Induktion eines viralen Schutzes (R. Zawatzky, persönliche Mitteilung). Nicht-tumorigene 444-Zellen wiesen nach 4 Stunden eine Menge von ca. 12 Units an IFN- β auf (siehe Abb. 4.4 C). Nach 16 Stunden war eine deutliche Zunahme auf über 30 Units zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu war im Überstand der tumorigenen HeLa- und CGL3-Zellen fast keine antivirale Aktivität nachzuweisen.

Die Inkubation von 4 Stunden mit TNF- α hatte die zur Aktivierung der IFN- β Transkription zur Folge. Nun erhob sich die Frage nach der Zeitspanne, die für die Induktion des antiviralen Status notwendig war. Aus diesem Grund wurde ein antivirales Assay mit 444-Zellen durchgeführt, bei dem die Zellen unterschiedlich lange mit TNF- α , vor der Zugabe des EMC-Virus, inkubiert wurden. Der Vergleich mit der Transkription des Gens erbrachte den Nachweis, daß nach 4 Stunden die Protektion der Zellen noch nicht induziert war (Abb. 4.5), obwohl zu diesem Zeitpunkt die IFN- β mRNA bereits vorlag. Nach 8 Stunden konnte bei hohen TNF- α Konzentrationen ein Schutz der Zellen nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, daß mit der Verlängerung der Inkubationszeit auch die Ausprägung der Protektion zunahm, wie aus der Platte mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden ersichtlich wird.

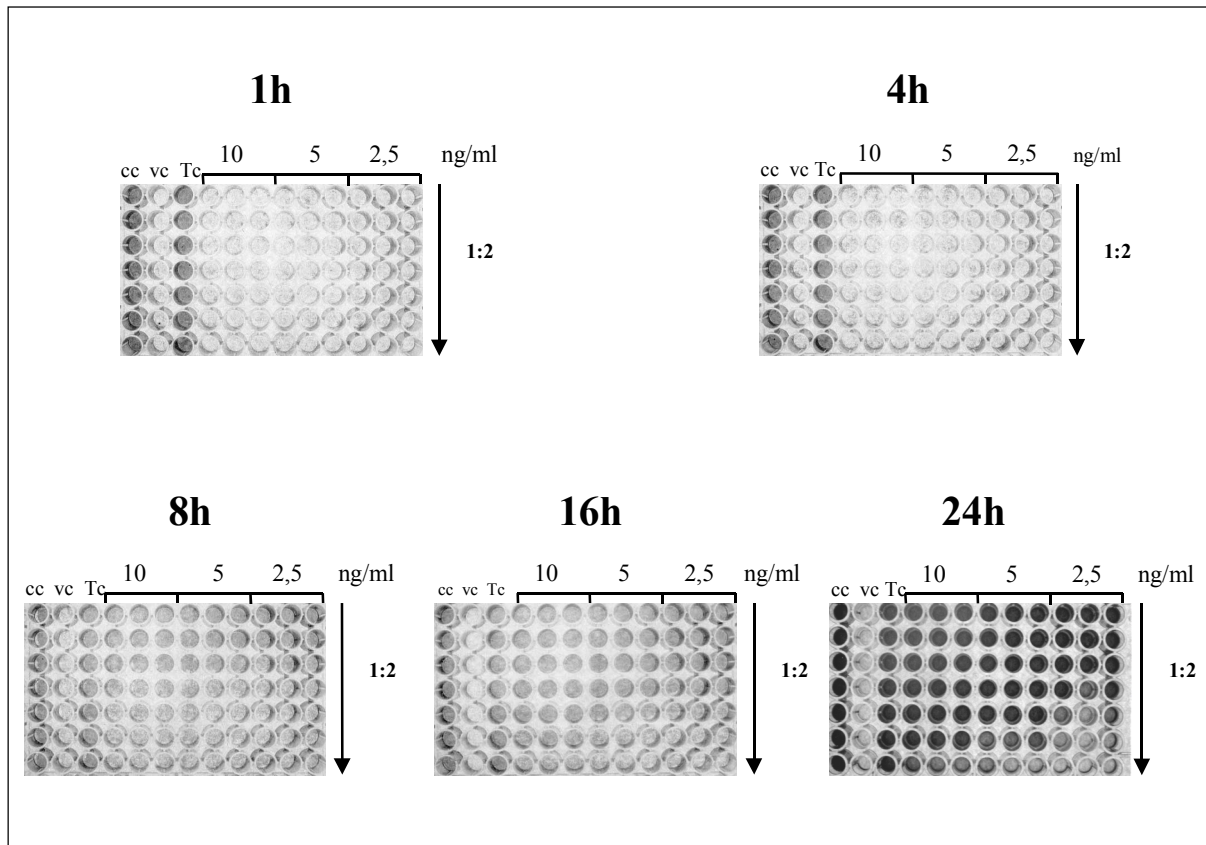


Abb. 4.5 Kinetik der Protektion durch TNF- α .

Die Zellen wurden entsprechend der angegebenen Zeitpunkte mit TNF- α inkubiert und anschließend mit EMCV (m.o.i. 0,1) infiziert. Nach Abschluß der Lyse wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Der Ablauf der Lyse wurde durch eine Kontrolle, die nicht mit TNF- α behandelt worden war (vc) beobachtet. Um auszuschließen, daß die beobachteten Effekte auf den Wirkungen des TNF- α basieren, wurde die Inkubation der Zellen mit TNF- α durch eine Zytokinkontrolle (Tc) überwacht. Das Wachstum der Zellen wird durch die Zellkontrolle (cc) dokumentiert.

4.1.2 Induktion von endogenem IFN- β in anderen HPV16\18 positiven Zervixkarzinomzelllinien und in daraus abgeleiteten Hybriden

Ein weiterer interessanter Punkt bezog sich auf die mögliche allgemeine Gültigkeit des beobachteten Phänomens. Es sollte gezeigt werden, ob die selektive Induktion des IFN- β Gens durch TNF- α in nicht-tumorigenen HeLa-Fibroblasten Hybriden spezifisch für das verwendete System war, oder ob sich dies in anderen somatischen Zellhybriden auch mit dem Phänotyp der Tumorigenität korrelieren lassen würde. Zur Klärung dieses Punktes wurden verschiedene Zervixkarzinomzelllinien (siehe Abb. 4.6) und daraus abgeleitete somatische Zellhybride herangezogen.

Die Aussaat der Zellen und die Behandlung mit TNF- α erfolgte wie unter Punkt 3.5.2.1 beschrieben. Die Lyse der Zellen wurde je nach Sensitivität, entweder mit EMCV oder Vesikular Stomatitis Virus (VSV) laut Tabelle 3.1 durchgeführt. Für den direkten Vergleich zwischen den

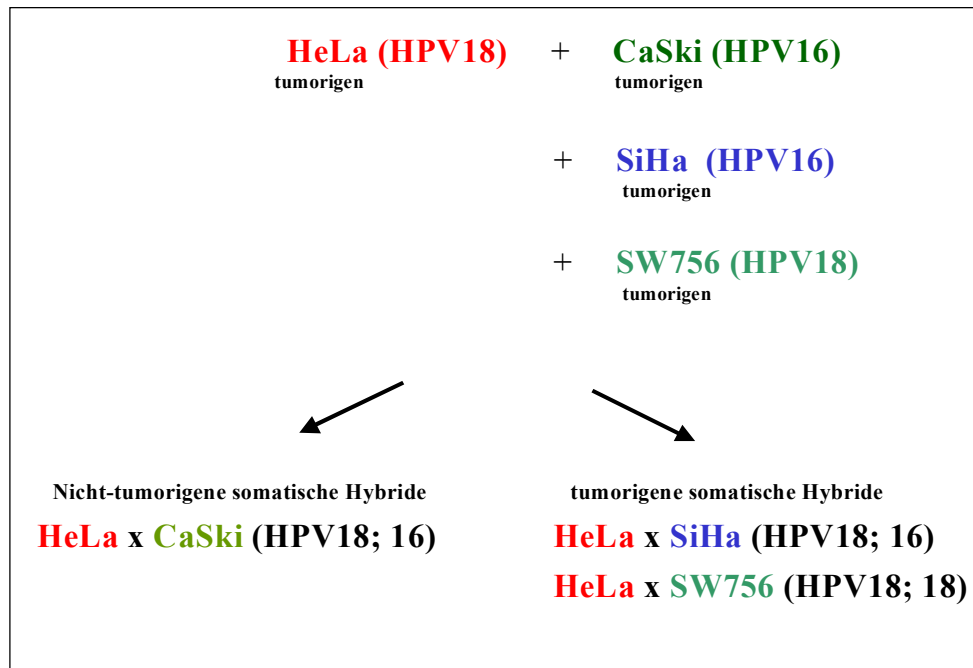


Abb. 4.6 Darstellung und Gruppierung der somatischen Zellhybride.

Gezeigt werden die verschiedenen Zervixkarzinomzelllinien, die daraus resultierenden somatischen Hybride, sowie tumorigener Phänotyp in der Nacktmaus. Die Gruppierung der Zellen erfolgte nach Soto *et al.*, 2000. Der jeweilige in der Zelle vorliegende HPV-Typ ist in Klammern dargestellt.

Hybrid-Zellen und den Ursprungszellen wurde jedes Hybrid mit den entsprechenden Ursprungszellen graphisch zusammengefaßt dargestellt. Aus Abbildung 4.7 geht hervor, daß in nicht-tumorigenen CaSki x HeLa Hybriden die TNF- α Inkubation, im Gegensatz zu den Ausgangszellen (CaSki und HeLa), zur Induktion eines antiviralen Status führte (Abb. 4.7 C). In den tumorigenen somatischen Zellhybriden SW756 x HeLa und SiHa x HeLa (Abb. 4.7 B) wurde diese Protektion nicht sichtbar, ebenso wie in SW756-Zellen (Abb. 4.7 A). Die Protektion der SiHa-Zellen lag durchschnittlich bei 54 % der ausgesäten Zellen und somit knapp in dem Bereich, innerhalb dessen noch von einem Schutz gesprochen werden kann.

Die Verifizierung dieser Daten sollte durch eine IFN- β RT-PCR (3.3.6) erfolgen (Abb. 4.8). Tumorigene Ursprungszellen wie CaSki (HPV16), SW756 (HPV18) und HeLa (HPV18) zeigten keinerlei Induktion von endogenem IFN- β durch die Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α , so daß die mangelnde Protektion der tumorigenen somatischen Zellhybride (SW756 x HeLa und SiHa x HeLa) und den Ursprungszellen auf der fehlenden Induktion der Transkription des IFN- β Gens basierte. An der Grenze zwischen antiviralem Schutz und viral induzierter Lyse standen die tumorigenen SiHa-Zellen, die durch TNF- α einen antiviralen Status aufbauten (Abb. 4.7 B). Auf Grund dieses Ergebnisses wurde auf IFN- β geschlossen, für das jedoch in RT-PCR nur eine ganz schwache Expression nachgewiesen wurde (Abb. 4.8). Im Gegensatz dazu war bei CaSki x HeLa-Hybriden (HPV16 x HPV18) das induzierte IFN- β für den antiviralen Status verantwortlich.

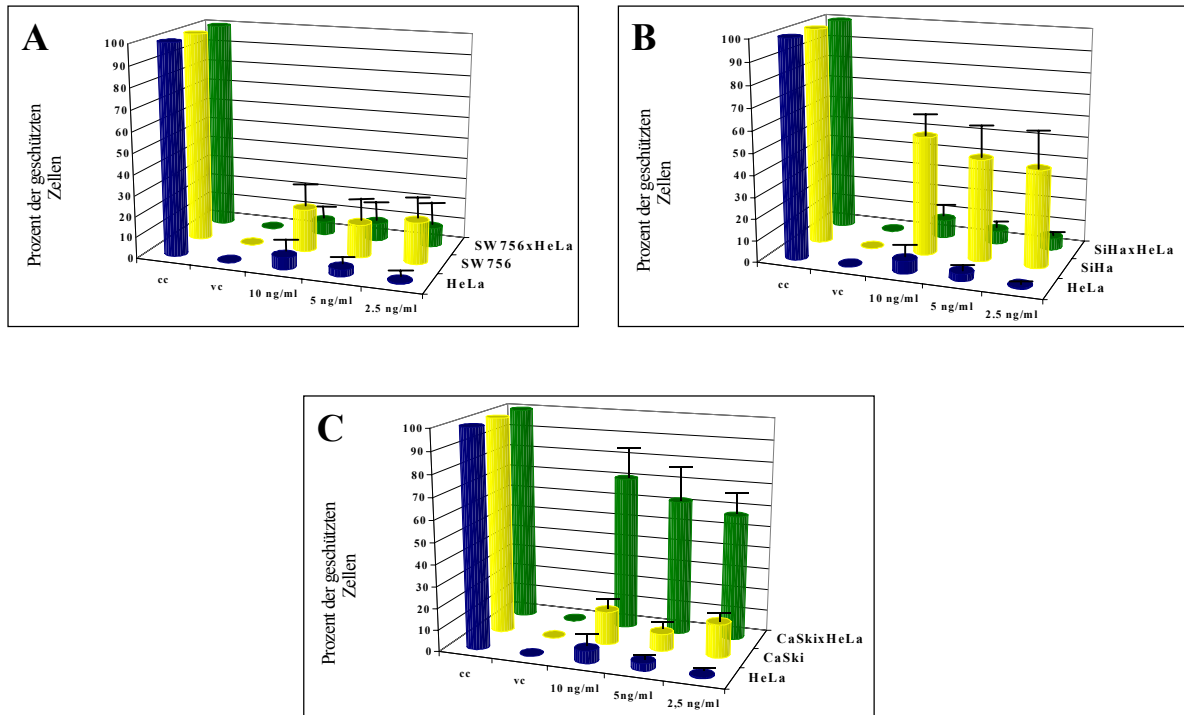


Abb. 4.7 Korrelation zwischen Tumorigenität der Hybride und der Induktion der IFN- β Synthese durch TNF- α .

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Hybride und die Ausgangszellen wurden einer Virustitration mit TNF- α (10 ng/ml) nach Punkt 3.6.2.1 unterzogen, wobei hier entweder VSV oder EMCV als lysierendes IFN-sensitives Virus eingesetzt wurde. Der Vergleich der Graphen zeigt eine Komplementation der Signaltransduktion zwischen HPV16 und HPV18 im Falle der CaSki x HeLa Hybride (C), wohingegen dies in SW756 x HeLa Hybriden, d.h. zwischen HPV18 und HPV18 (A) und im SiHa x HeLa Hybrid, zwischen HPV18 und HPV16 (B) nicht stattfindet. Zur Beobachtung des Verlaufs der Virustitration wurden auf jeder Platte die Kontrollen zur Viruslyse (vc), sowie die Kontrolle zur Beobachtung des zellulären Wachstums (cc) angelegt. Die vorliegenden Daten stellen das Ergebnis aus 3 verschiedenen Versuchen dar, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Auf die photographische Darstellung der einzelnen Platten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Diese Daten zeigen eine Komplementierung der Signaltransduktionswege in nicht-tumorigenen CaSki x HeLa Hybriden, die zur Induktion der IFN- β Transkription führen und in den tumorigenen HPV16 und HPV18 positiven Ursprungszellen defekt sind. Diese Art der Komplementation zeigte sich nicht zwischen verschiedenen tumorigenen HPV18 positiven Zellen (Abb. 4.7).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch in den somatischen Zellhybriden eine Korrelation zwischen dem nicht-tumorigenen Phänotyp und der Induzierbarkeit von endogenem IFN- β durch TNF- α (Abb. 4.7 und Abb. 4.8).

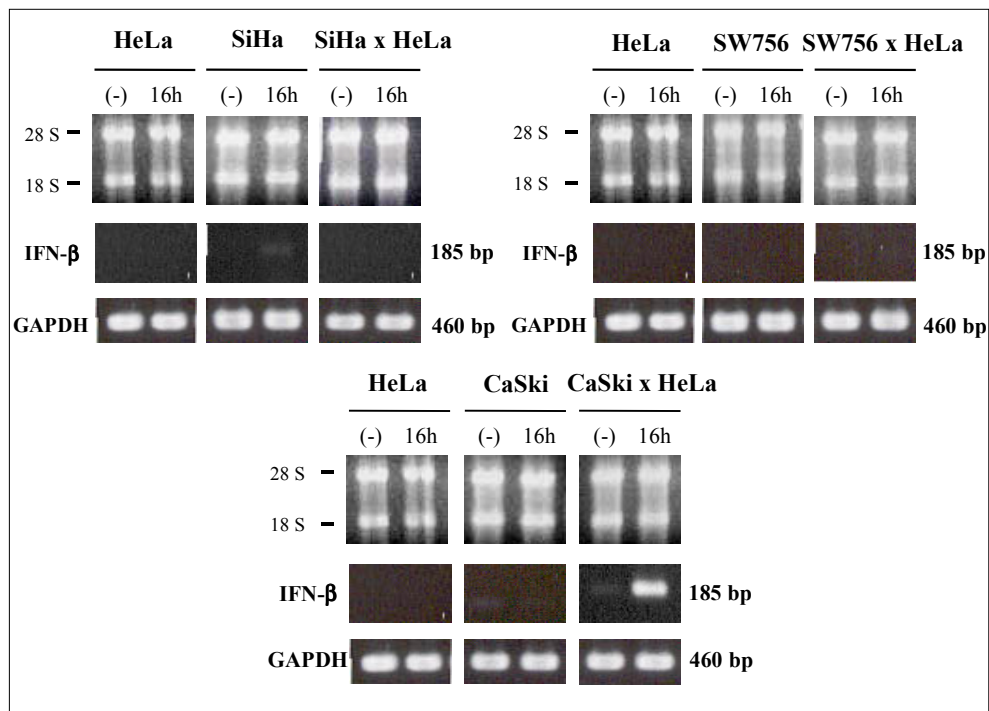


Abb. 4.8 Rekonstitution der IFN- β Expression in somatischen Zellhybriden.

Die Zellen wurden für die Induktion des IFN- β für 16 Stunden mit 10 ng/ml TNF- α inkubiert. 2 μ g der RNA wurde für die RT-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden mit 2 μ l der RT-Reaktion durchgeführt. Jeweils 10 μ l wurden in einem 3 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die ribosomalen Banden 28 S und 18 S sind hervorgehoben und zeigen die intakte RNA nach dem erfolgten DNase-Verdau. Die Größen der jeweiligen PCR-Amplifikate sind rechts aufgeführt. Als interne Kontrolle wurde eine GAPDH-PCR durchgeführt.

4.1.3 Die exogene Supplementation von Typ I und Typ II Interferonen induziert eine virale Protektion in HPV16/18 positiven Zellen und in daraus abgeleiteten Hybriden

Die selektive Induzierbarkeit von endogenem IFN- β und die Protektion vor einer viralen Lyse durch TNF- α in nicht-tumorigenen somatischen Zellhybriden zog die Frage der Sensitivität der tumorigenen somatischen Zellhybride für exogen supplementiertes IFN nach sich, da die fehlende Protektion in diesen Zellen auch auf einer Inaktivierung der notwendigen Signaltransduktion durch die viralen Onkogene E6 und E7 basieren könnte (Ronco *et al.*, 1998; Barnard *et al.*, 1999; Barnard und Mc Millan, 1999; Perea *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000).

Die Virustitrationen mit exogen zugegebenem IFN- β (Abb. 4.9) führte vor Augen, daß alle Zellen unabhängig vom tumorigenen Phänotyp in der Lage waren die Signaltransduktion, die für die Induktion des antiviralen Status wichtig war, durch exogen supplementiertes IFN- β zu aktivieren. Die Abbildung 4.10 demonstriert, daß alle Zellen d.h. die somatischen Zellhybride, sowie die Ausgangszellen über eine hohe Sensitivität für IFN- β verfügten, sogar bei Zugabe von 25 Units zeigten die Zellen eine Protektion, die im Bereich von 90% bis 100% lag. Dieser Schutz

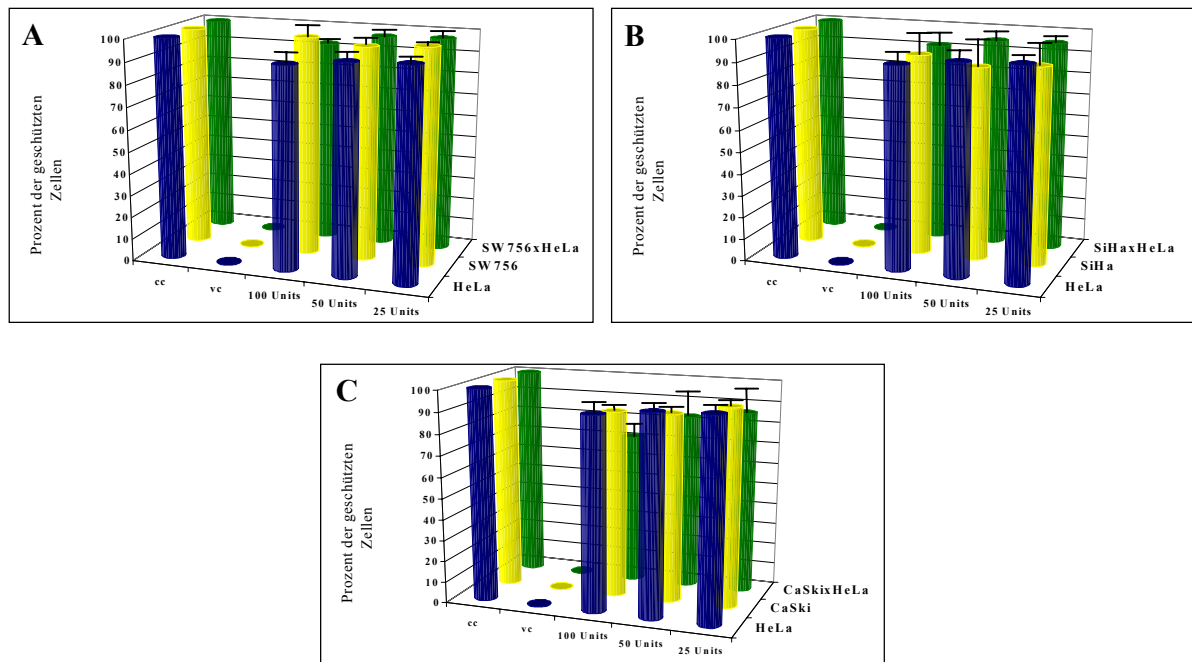


Abb. 4.9 Exogen supplementiertes IFN- β induziert unabhängig vom tumorigenen Phänotyp einen antiviralen Status in HPV16/18 positiven Zellen und in daraus abgeleiteten somatischen Hybriden.

Die Hybride und die Ausgangszellen wurden einer Virustitration mit IFN- β nach Punkt 3.6.2.1 unterzogen. Die Hybride sind jeweils für den direkten Vergleich mit den Ursprungszellen mit diesen in einem Graphen zusammengefaßt dargestellt. Zur Beobachtung des Verlaufs der Virustitration wurden auf jeder Platte die Kontrollen zur Viruslyse (vc), sowie die Kontrolle zur Beobachtung des zellulären Wachstums (cc) angelegt. Die vorliegenden Daten stellen das Ergebnis aus 3 verschiedenen Versuchen dar, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden. Auf die photographische Darstellung der einzelnen Platten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

A: SW756xHeLa-Zellen, **B:** SiHa x HeLa-Zellen, **C:** CaSki x HeLa-Zellen

war somit unabhängig vom tumorigenen Phänotyp der getesteten Zelllinie. Dasselbe Bild ergab sich bei einer Verwendung von IFN- α oder IFN- γ (Abb. 4.10).

Da bisher nur in nicht-tumorigenen Zellen eine Induktion von IFN- β durch TNF- α vorlag, sollte die Ursache dieser unterschiedlichen Expression durch die Untersuchung der am IFN- β Promotor bindenden Proteine geklärt werden und eventuell unterschiedlich regulierte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

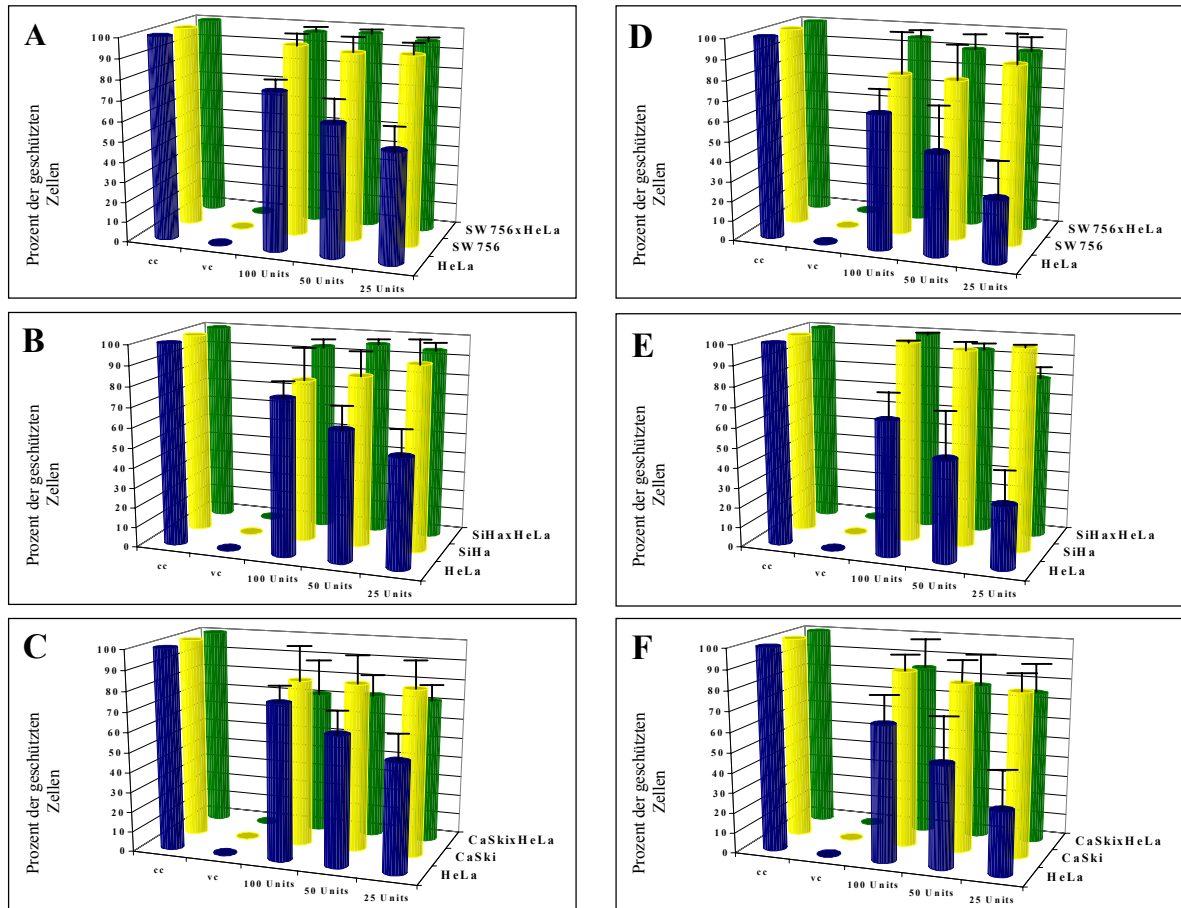


Abb. 4.10 IFN- α und IFN- γ induzieren in den somatischen Zellhybriden und den Ursprungszellen, unabhängig vom tumorigenen Phänotyp einen antiviralen Status.

Die somatischen Zellhybride, sowie die jeweiligen Ursprungszellen wurden in 96-Lochplatten nach Punkt 3.6.2.1 ausgesät und mit den entsprechenden Mengen IFN- α oder IFN- γ inkubiert. Die Analyse des antiviralen Status erfolgte durch eine Virusinfektion laut Tabelle 3.1. Für den direkten Vergleich der Hybride mit den Ursprungszellen, werden diese in einem Graphen zusammengefaßt. Zur Kontrolle der viral induzierten Lyse wurde auf jeder Platte eine Viruskontrolle angelegt, die im Graphen mit vc bezeichnet wird. Die Beobachtung der Zytokinauswirkungen erfolgte durch eine entsprechende Zytokinkontrolle (graphisch nicht dargestellt). Die einzelnen Platten der Virustitration sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die Ergebnisse der graphischen Darstellung basieren auf 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Abbildungen A, B und C stellen das Ergebnis der Virustitration mit IFN- α und die Abbildungen D bis F das mit IFN- γ dar.

A/D SW756 x HeLa, B/E SiHa x HeLa, C/F CaSki x HeLa

4.2 Der IFN- β Promotor

Die Expression des humanen IFN- β Gens wird über die Transkription reguliert, deren Induktion einem fein abgestimmten Mechanismus, basierend auf negativ und positiv regulatorischen Domänen, unterliegt. Die negativ regulatorischen Domänen (NRD) befinden sich am 5' und am 3' Ende des Promotors und sind für die Repression des Gens in unstimulierten Zellen verantwortlich (Goodbourn *et al.*, 1985, 1986; Goodbourn und Maniatis, 1988). Sie überlappen teilweise mit der Sequenz der positiv regulatorischen Domänen (PRD) und unterdrücken dadurch deren Einfluß auf die Transkription (Kawakami *et al.*, 1995; Maniatis *et al.*, 1998; Goodbourn *et al.*, 2000). Die Induktion der Transkription erfolgt durch die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 4.11) an die verschiedenen PRD-Elemente. Charakteristische Erkennungssequenzen für Proteine der IRF-Familie enthalten die positiv regulatorischen

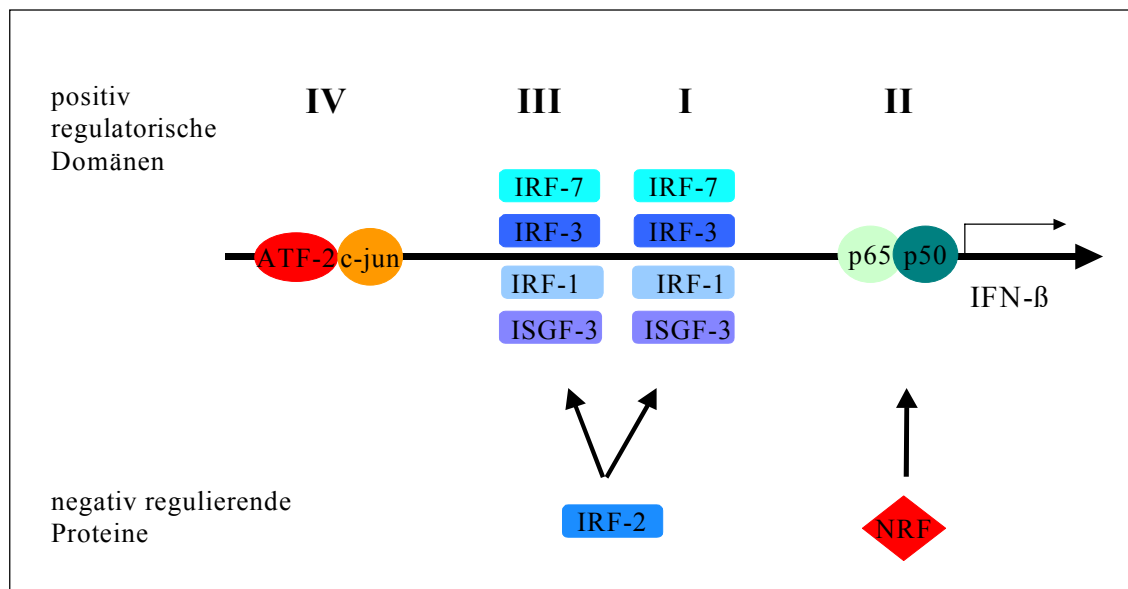


Abb. 4.11 Schematische Darstellung der positiv regulatorischen Domänen des IFN- β Promotors.

Der IFN- β Promotor besteht aus 4 positiv regulatorischen Domänen (PRD I-IV) und 2 negativ regulatorischen Domänen, die im 5' Bereich mit der PRD IV und im 3' Bereich mit der PRD II überlappen. Die Induktion der Transkription erfolgt durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren ATF-2/c-jun, einem Mitglied der IRF-Familie, sowie durch die Bindung von NF κ B. Die synergistische Interaktion der gebundenen Proteine induziert die Transkription. Die Bindung der negativ regulierenden Proteine IRF-2 und NRF („NF κ B repressing factor“) in unstimulierten Zellen an die dargestellten Positionen reprimiert die Expression.

Domänen I und III. Eine Bindung an diese Sequenzen wurde für IRF-1 (Miyamoto *et al.*, 1988; Harada *et al.*, 1989; Reis *et al.*, 1992), IRF-3 (Schafer *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998; Noah *et al.*, 1999), IRF-7 (Sato *et al.*, 2000) und für ISGF-3 (Kawakami *et al.*, 1995) gezeigt. Die Bindung von IRF-2 an diese Region wirkt reprimierend. PRD II enthält die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF κ B, der sich aus den Proteinen p50, p65 (Rel A), c-Rel und Rel B zusammensetzen kann (Chen *et al.*, 1999). Im Kontext des IFN- β Promotors wurde in der PRD

II bisher das Dimer des Nuklearen Faktors Kappa B (NF κ B) in der Zusammensetzung p50 und p65 gefunden. Die Erkennungssequenz für NF κ B überlappt im 3' Bereich mit NRD I, an die in unstimulierten Zellen ein NF κ B reprimierender Faktor (NRF) bindet und dadurch spezifisch die Bindung von NF κ B verhindert (Nourbakhsh und Hauser, 1993, 1999). Im 5' Bereich des Promotors liegt PRD IV, an die ein Dimer aus ATF-2 und c-jun bindet. Beide Proteine sind Untereinheiten des Aktivator-Protein 1 (AP1) (Rajaram und Kerppola 1997).

Die bisherigen Kenntnisse in Bezug auf die Regulation der IFN- β Transkription, deren Induktion und den verantwortlichen molekularen Mechanismen basieren entweder auf einer viralen Infektion oder auf in vitro Analysen. Um einen Einblick in die Mechanismen zu erhalten, die bei einer Induktion durch TNF- α wirksam werden, sollten in den nachfolgenden Versuchen, Proteine mit Bindungsstellen und positiv regulatorischem Einfluß auf den IFN- β Promotor analysiert werden.

4.2.1 Die Induktion von NF κ B durch TNF- α ist in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen gleich reguliert

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist an zahlreichen Immunreaktionen beteiligt und wird durch verschiedene Zytokine, virale und bakterielle Infektionen induziert (Übersichtsartikel Liou und Baltimore, 1993). In unstimulierten Zellen ist das p50/p65 Dimer durch die Bindung der inhibitorischen Untereinheit I κ B- α im Zytoplasma lokalisiert (Beg und Baldwin, 1993). Phosphorylierung und Degradierung der I κ B- α Untereinheit führen zu einer Translokation des Dimers in den Zellkern (Baeuerle, 1991).

Im Zusammenhang mit der Induktion des IFN- β sollte nun die Aktivierung des NF κ B durch TNF- α in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen untersucht werden. Die Bandshift Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Ubaldo Soto durchgeführt. Diese Analysen beruhen auf der Zugabe von doppelsträngigen, ³²P-markierten Oligonukleotiden zu Kernextrakten von behandelten Zellen. Die Bindung der Proteine an die doppelsträngige DNA führt zu einer Retardierung des Oligonukleotides während der Elektrophorese, dies wird als „Shift“ bezeichnet. Durch die Zugabe von Antikörpern, die spezifisch eines der Proteine aus dem gebundenen Komplex erkennen, kommt es zu einer weiteren Retardierung und man spricht von einem „Supershift“.

Die Analyse der PRD II Region im direkten Vergleich mit einer NF κ B-Konsensussequenz nach einer TNF- α Inkubation ergab folgendes Bild (Abb. 4.12):

In den unbehandelten Kontrollen zeigte sich keine Bindung an das radioaktiv markierte Oligonukleotid, wohingegen 30 min nach erfolgter Zytokinzugabe in allen 3 Zelllinien eine

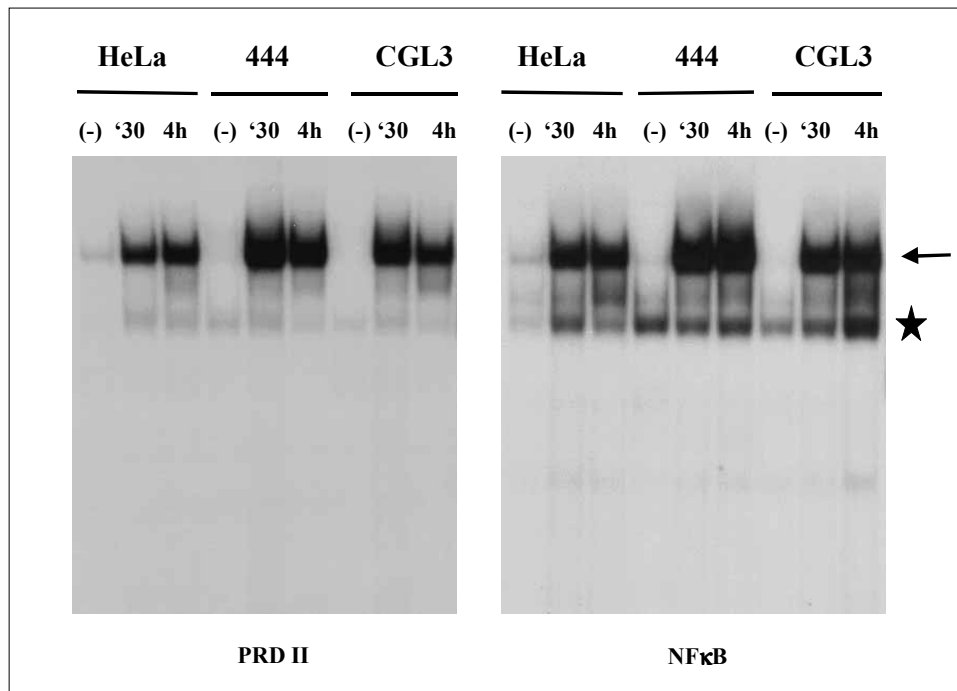


Abb. 4.12 NFκB ist durch TNF-α in den tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen nicht unterschiedlich reguliert.

Die Zellen wurden mit 10 ng/ml TNF-α entsprechend den angegebenen Zeitpunkten inkubiert. Jeweils 2 µg Kernextrakt wurden für die Bandshift-Analysen mit dem NFκB Konsensusoligonukleotid und dem PRD II Oligonukleotid eingesetzt.

Der Stern kennzeichnet einen unspezifischen Komplex, wohingegen der Pfeil die spezifische Bande markiert. Die Bandshifts wurden in Kooperation mit Dr. Ubaldo Soto durchgeführt.

verstärkte Bindung des NFκB an das markierte Oligonukleotid zu beobachten war. Dieser Zustand lag nach 4 Stunden mit derselben Intensität vor. Die Bindung des NFκB an das PRD II Oligonukleotid unterschied sich nicht von der Bindung an das Konsensus-Oligonukleotid. Anhand des vorliegenden Ergebnisses konnte NFκB als entscheidender Transkriptionsfaktor für die unterschiedliche Expression von IFN-β durch TNF-α in den HPV18 positiven Zellen ausgeschlossen werden.

4.2.2 Analyse des ATF-2/c-jun Heterodimers in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen

Die Funktionsanalyse der PRD II hatte gezeigt, daß eine unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB für die Induktion des endogenen IFN-β Gens in nicht-tumorigenen Zellen durch TNF-α nicht verantwortlich war. Für weitere Experimente wurden als nächstes die Proteine der PRD IV ausgewählt. An diese Region bindet das ATF-2/c-jun Heterodimer (siehe

Abb. 4.11) welches bei der viralen Induktion des endogenen IFN- β ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (Du *et al.*, 1993). Die Proteine ATF-2 und c-jun sind Mitglieder der AP1-Proteinfamilie (Rajaram und Kerppola 1997), deren Aktivität auf der Ebene der Transkription oder post-translational reguliert wird (Leppa und Bohmann, 1999 zur Übersicht).

Abbildung 4.13 zeigt das Verhalten dieser beiden Transkriptionsfaktoren in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen. Auf Grund der zahlreichen Banden, wurden die entsprechenden Proteine durch die Zugabe von Antikörpern spezifiziert. Die "Supershifts" sind jeweils durch den oberen Pfeil hervorgehoben und der untere Pfeil kennzeichnet die spezifische Bande des gebundenen Proteinkomplexes. ATF-2 zeigte in der unbehandelten Kontrolle bereits eine leichte Bindung an die PRD IV Sequenz, die sich durch TNF- α deutlich verstärkte. Dasselbe Bild spiegelte sich bei der Analyse von c-jun wider. Beide Proteine wiesen auch noch nach 4 Stunden eine verstärkte Bindung an die PRD IV auf, jedoch ohne Abweichungen zwischen nicht-tumorigenen und tumorigenen Zellen. Auf Grund dieses Ergebnisses konnte dem ATF-2/c-jun Dimer keine entscheidende Funktion, die die unterschiedliche Induktion der Transkription von IFN- β erklärt hätte, zugeschrieben werden.

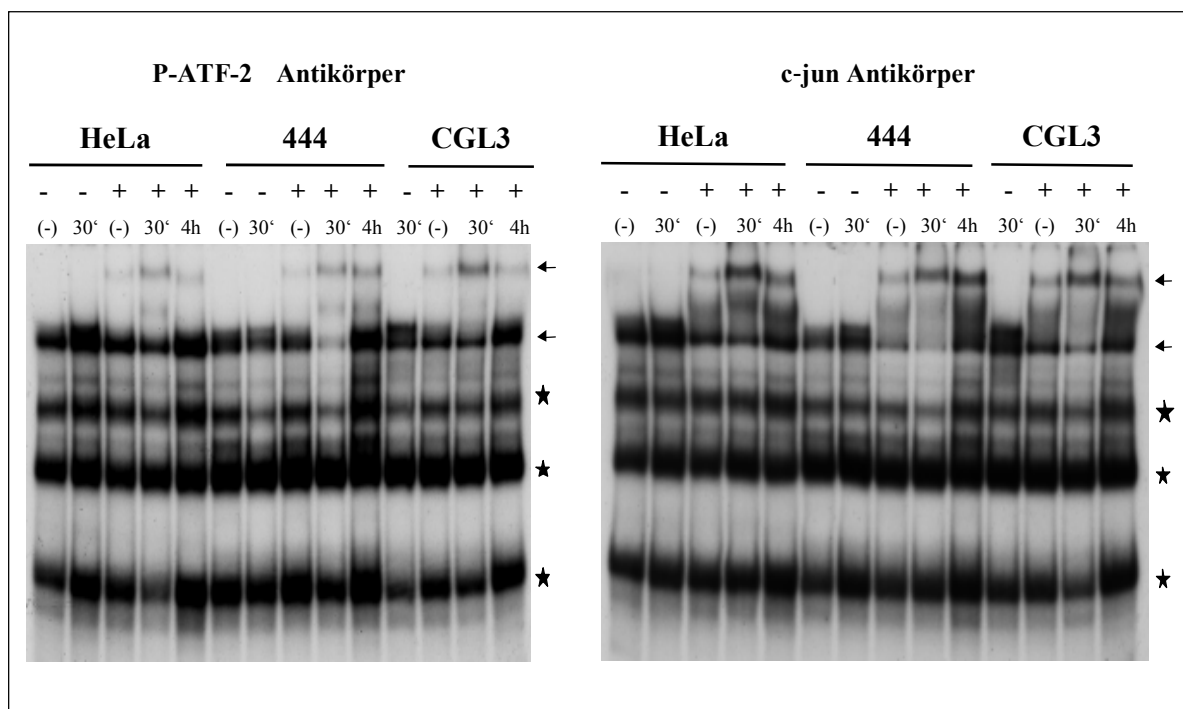


Abb. 4.13 ATF-2 und c-jun zeigen keine unterschiedliche Affinität zu PRDIV in den tumorigenen und den nicht-tumorigenen HPV 18 positiven Zellen.

Die Zellen wurden entsprechend den Zeitangaben mit 10 ng/ml TNF- α inkubiert. Für das Bandshift-Experiment, das von Dr. Ubaldo Soto durchgeführt wurde, wurden jeweils 4 μ g des Kernextraktes eingesetzt. Durch die Verwendung von Antikörpern wurden ATF-2 und c-jun im gebundenen Proteinkomplex spezifisch nachgewiesen. Die Sterne kennzeichnen die unspezifischen Banden. Der Supershift ist durch den oberen Pfeil markiert und der untere Pfeil deutet auf den gebundenen Proteinkomplex.

4.2.3 Die Blockierung der p38 MAPKinase resultiert im Verlust der Protektion durch TNF- α

Phosphorylierungsvorgänge spielen bei der Zytokin-vermittelten Signaltransduktion eine entscheidende Rolle (Karin *et al.*, 1997). Dies wird durch die MAPKinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) oder entsprechende Phosphatasen vermittelt (Whitmarsh und Davis, 1996 zur Übersicht). Die Gruppe der MAPKinasen setzt sich aus 3 Familien zusammen, der JNK („c-jun N-terminal kinases“), den ERK („extracellular signal regulated kinases“) und der p38 MAPKinase. Für die Regulation des ATF-2/c-jun Komplexes spielen die JNK, die für die Phosphorylierung von c-jun und ATF-2 verantwortlich sind (Karin, 1995), sowie die p38 MAPKinase, die ATF-2 phosphoryliert (Waas *et al.*, 2001), eine entscheidende Rolle (siehe Abb. 4.14). Neben der Phosphorylierung von ATF-2 durch exogene Stimuli wurde für die p38 MAPKinase auch eine Funktion bei der Induktion des antiviralen Status durch IFN- α nachgewiesen (Goh *et al.*, 1999; Uddin *et al.*, 2000). Diese Informationen gaben Grund zu der

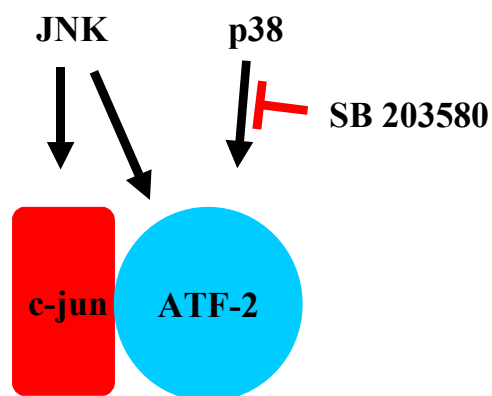


Abb. 4.14 Funktionsweise des p38 Inhibitors SB203580.

Annahme, daß die Verwendung des spezifischen p38 Inhibitors SB 203580, zur Lyse der Zellen führen würde, wenn die Aktivität der p38 Kinase für die Induktion des antiviralen Status oder der Induktion der Transkription des endogenen IFN- β wichtig ist. Dieser Inhibitor hemmt selektiv die Aktivität der p38 MAPKinase ohne Beeinträchtigung der anderen MAPKinasen (Enselen *et al.*, 1998).

In der Tat ergab sich folgender Befund:

Die Vorinkubation von 444-Zellen mit SB203580, hatte nur im Fall der TNF- α Zugabe die Reduktion des antiviralen Schutzes zur Folge (Abb. 4.15 A). Hingegen wurde die Signaltransduktion, die durch die exogene Supplementierung von Interferonen aktiviert wird nicht beeinflusst (Abb. 4.15 B bis D). Um sicher zu sein, daß diese Selektivität der TNF- α Blockade nicht die virale Lyse als solche beeinträchtigte, wurde auf jeder Platte eine entsprechende Viruskontrolle angelegt, die das Lyseverhalten der Zellen in Anwesenheit des Inhibitors zeigte. Diese Viruskontrolle offenbarte jedoch nur eine zeitliche Verzögerung der Zellyse.

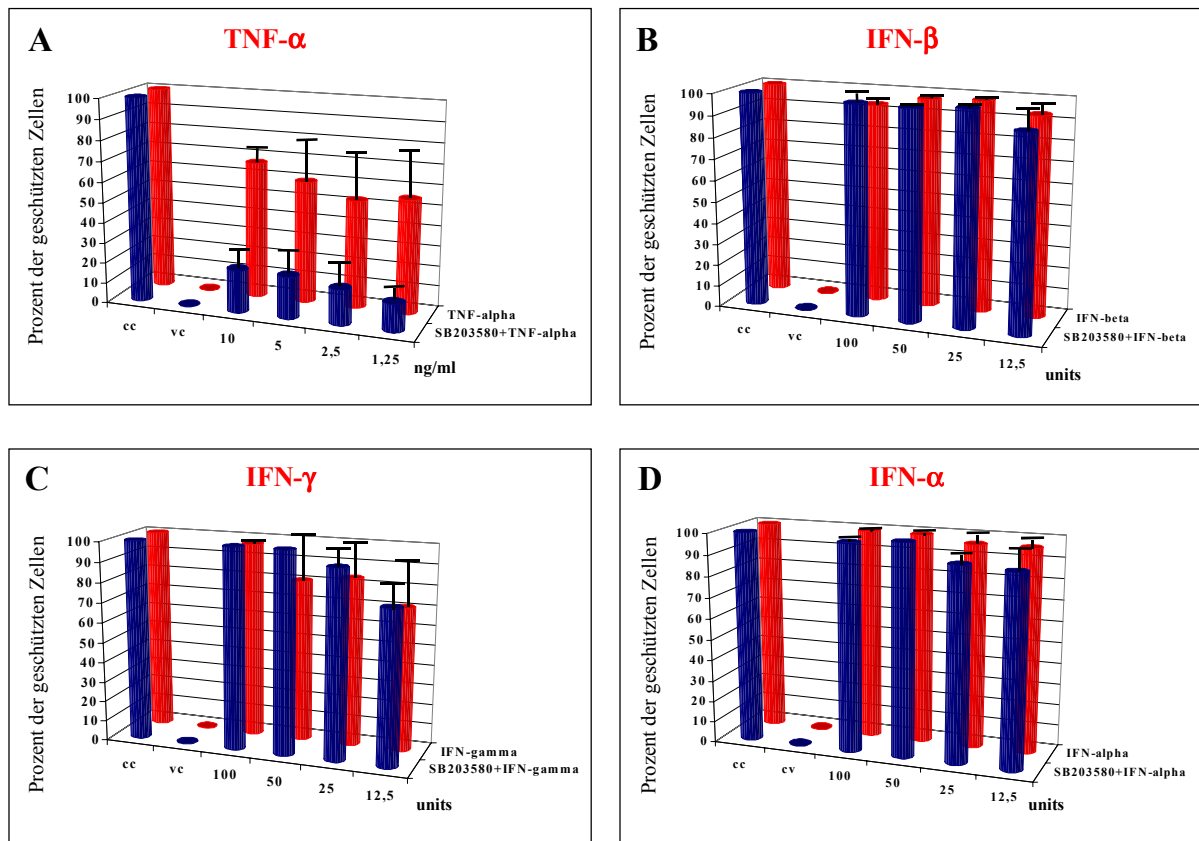


Abb. 4.15 Die Aktivität der p38 MAPKinase ist für die Induktion des endogenen IFN- β essentiell.

Die 444-Zellen wurden in den 96-Lochplatten ausgesät und mit 20 μ M des SB203580 Inhibitors für 30 Minuten, vor der Zugabe des Zytokins inkubiert. Der induzierte antivirale Status wurde anschließend durch die Zugabe von EMCV analysiert (m.o.i. 0,1). Um die Auswirkungen des Inhibitors auf die Signaltransduktion der Zytokine vergleichen zu können, werden die entsprechenden Inkubationen in einem Graphen zusammen gefaßt dargestellt. Zur Kontrolle der viral induzierten Lyse wurde auf jeder Platte eine Viruskontrolle angelegt, die im Graphen mit vc bezeichnet wird und hier die Kontrolle der Viruslyse nach Zugabe des Inhibitors darstellt. Die Beobachtung der Zytokinauswirkungen erfolgte durch eine entsprechende Zytokinkontrolle (graphisch nicht dargestellt). Die einzelnen Platten der Virustitration sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die Ergebnisse der graphischen Darstellung basieren auf 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

A: TNF- α , **B:** IFN- β , **C:** IFN- α , **D:** IFN- γ

Offensichtlich spielte die Aktivität der p38 MAPKinase in nicht-tumorigenen Zellen für die Signaltransduktion der Interferone keine Rolle. Nun galt es zu klären ob die gleiche Beobachtung auch in tumorigenen Zellen erfolgen würde. HeLa- und CGL3-Zellen wurden auf dieselbe Weise wie 444-Zellen einer Analyse mit dem SB203580 Inhibitor unterzogen. Jedoch ergab sich auch hier kein Einfluß der p38 MAPKinase auf die Induktion des antiviralen Status (Abb. 4.16).

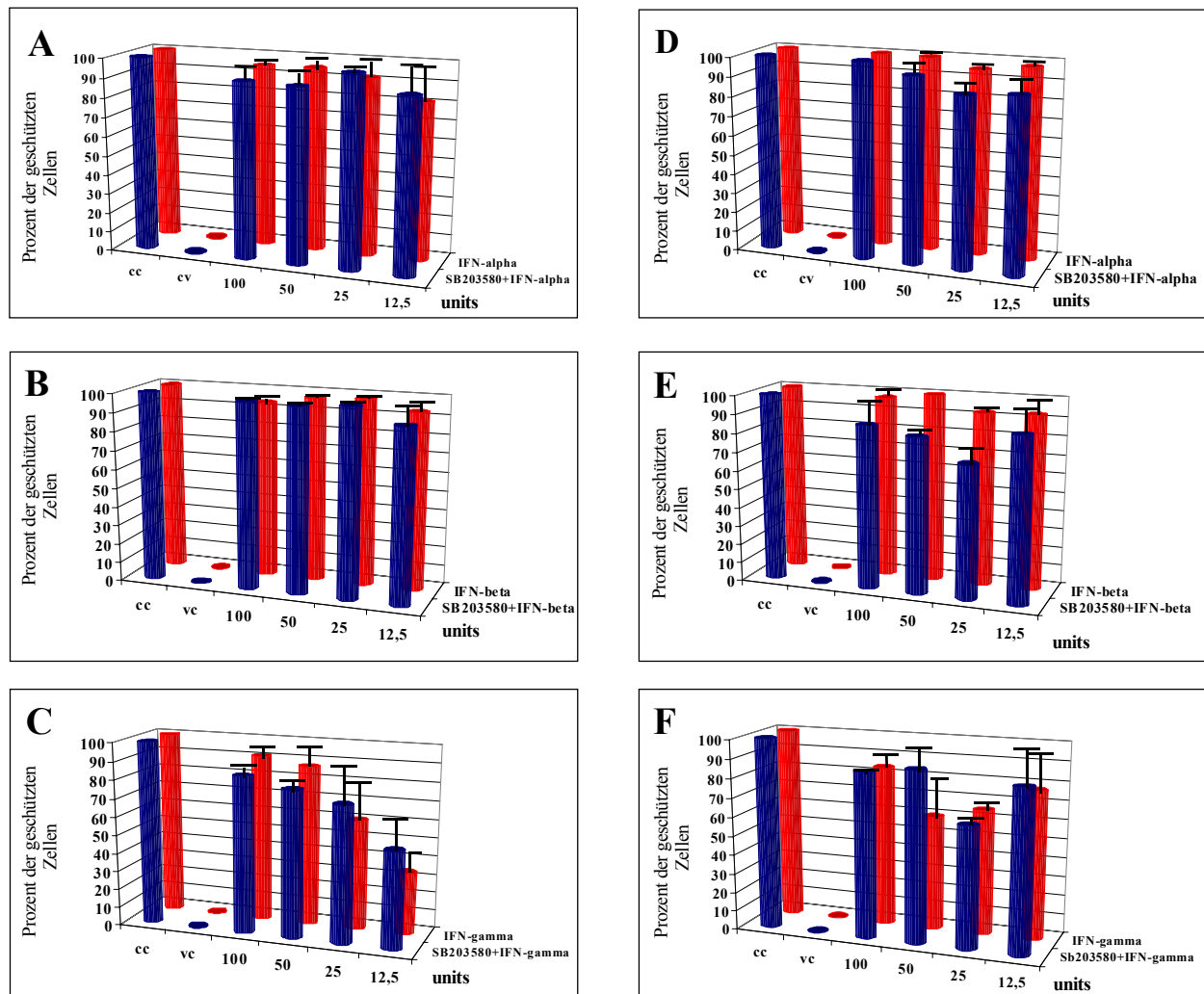


Abb. 4.16 Die Aktivität der p38 MAPKinase ist in tumorigenen Zellen nicht für eine Induktion des antiviralen Status notwendig.

Die Zellen wurden mit 20 μ M des SB203580 Inhibitors für 30 Minuten, vor der Zugabe der Interferone inkubiert. Der induzierte antivirale Status wurde anschließend durch die Zugabe von EMCV analysiert (m.o.i., 0,1). Um die Auswirkungen des Inhibitors auf die Signaltransduktion der Interferone vergleichen zu können, werden die entsprechenden Inkubationen in einem Graphen zusammen gefaßt dargestellt. Zur Kontrolle der viral induzierten Lyse wurde auf jeder Platte eine Viruskontrolle angelegt, die im Graphen mit vc bezeichnet wird und hier die Kontrolle der Viruslyse nach Zugabe des Inhibitors darstellt. Die Beobachtung der Zytokinauswirkungen erfolgte durch eine entsprechende Zytokinkontrolle (graphisch nicht dargestellt). Die einzelnen Platten der Virustitration sind hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die Ergebnisse der graphischen Darstellung basieren auf 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Linke Spalte HeLa-Zellen, **A:** IFN- α -, **B:** IFN- β -, **C:** IFN- γ .

Rechte Spalte CGL3-Zellen, **D:** IFN- α -, **E:** IFN- β -, **F:** IFN- γ .

Diese Daten zeigen, daß für die Induktion des antiviralen Status in den Zellen d.h. für die „delay-response“ der Interferone, die Aktivität der p38 MAPKinase nicht notwendig ist.

4.2.4 Analyse der Induzierbarkeit der IRF-Proteinfamilie in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen

Außer den bisher analysierten Transkriptionsfaktoren NF κ B und ATF-2/c-jun, die in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen keine unterschiedliche Regulation durch die TNF- α Inkubation offenbart hatten, kommt den Proteinen der IRF-Familie eine wichtige Funktion zu. Eine erste Untersuchungen befaßten sich mit IRF-3 und IRF-7, da beide einen Einfluß auf virusinduzierte IFN-Synthese ausüben (Wathelet *et al.*, 1998). Die Expression wurde in den tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen des Stanbridge-Systems (Abb. 4.1) durchgeführt. Die Zellen wurden über die in Abbildung 4.17 angegebenen Zeiträumen mit TNF- α inkubiert und die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR analysiert.

IRF-3 (Abb. 4.17 B) zeigte bereits ohne jeglichen Stimulus in den 3 Zelllinien eine Basalexpression, die sich auch nach einer 16-stündigen Inkubation mit TNF- α nicht verstärkte. Im Gegensatz dazu war die Basalexpression von IRF-7 (Abb. 4.17 A) in den Kontrollen nur schwach ausgeprägt. Nach einer Behandlungszeit von 1 Stunde stieg die Transkription an und erhöhte sich bis zu 16 Stunden kontinuierlich. Die transkriptionell aktive Form von IRF-3 ist im Zellkern zu finden, so daß eine Western-Analyse mit Kernextrakten aus 444-, HeLa- und CGL3-

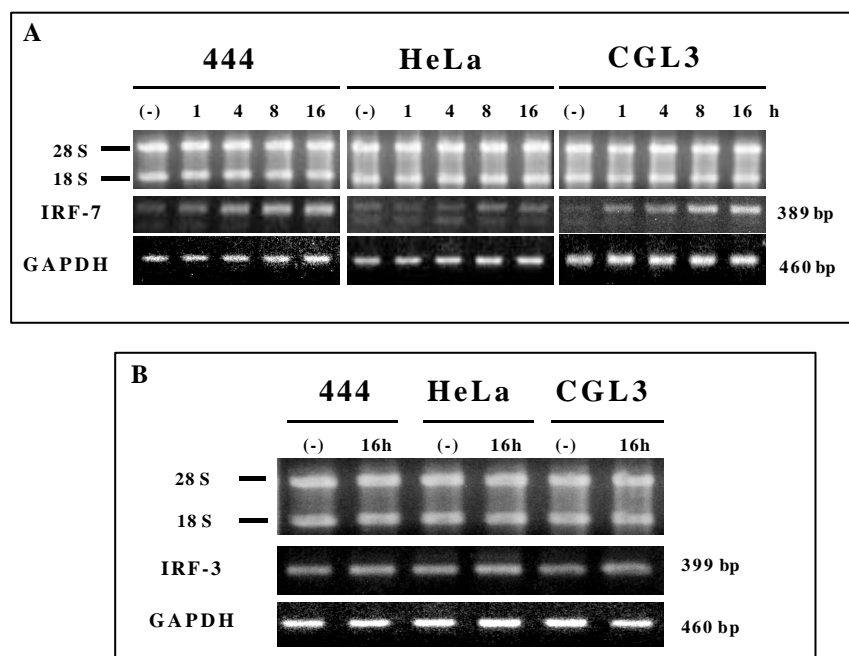


Abb. 4.17 TNF- α führt in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen zu keinen Unterschieden in der Transkription von IRF-3 und IRF-7.

Die RNA wurde nach einer Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α mittels RNeasy-Kit der isoliert. Die ribosomalen Banden 28 S und 18 S zeigen eine intakte RNA nach dem DNase-Verdau. Die reverse Transkription und die PCR erfolgte laut 3.3.6 und nach 3.3.7. Die GAPDH-PCR diente als interne Kontrolle der RT-Reaktion. Die Größe des jeweils amplifizierten PCR-Fragments ist auf der rechten Seite angegeben.

A: IRF-7 Expression nach TNF- α ; **B:** IRF-3 Expression nach TNF- α Inkubation

Zellen durchgeführt wurde. Im unstimulierten Zustand lagen für IRF-3 zwei Banden im Zellkern vor,

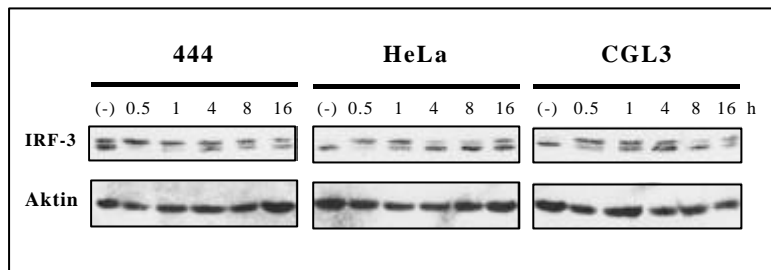


Abb. 4.18 Western Blot-Analyse der IRF-3 Expression in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen.

20 μg des Kernextraktes der mit 10 ng/ml TNF- α behandelten Zellen wurden auf einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Filter wurde mit einem polyklonalen IRF-3 spezifischen Antikörper inkubiert. Als Ladungs- und Transferkontrolle wurden derselbe Filter mit einem monoklonalen Aktin-Antikörper nachinkubiert.

vor, doch bereits nach 30 min. fand eine Akkumulation der oberen Bande statt (Abb. 4.18). Nach 4 Stunden lagen wieder beide Banden vor. Der Vergleich der Zelllinien miteinander brachte jedoch auch in diesem Fall keine unterschiedliche Regulation der IRF-3 Expression zwischen tumorigenen und nicht-

tumorigenen HPV18 positiven Zellen zu Tage. Das interessante an diesem Ergebnis war, daß eine Translokation für IRF-3 in den Zellkern bisher nur nach einer viralen Infektion beschrieben war (Yoneyama *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998), hier lag das Protein bereits im unstimulierten Zustand im Zellkern vor. IRF-7 wurde im Gegensatz zu IRF-3 nur im Zytoplasma nachgewiesen, da die virale Infektion als Stimulus für die Phosphorylierung und die Translokation in den Zellkern fehlte. Trotz der transkriptionellen Induktion des IRF-7, die in der RT-PCR zu sehen war (Abb. 4.17 A), wiederholte sich diese Akkumulation auf Proteinebene nicht (Abb. 4.19). Der Vergleich der IRF-7 Mengen zeigte auch hier zwischen tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen keinerlei Unterschiede auf. Somit kamen diese beiden Proteine nicht als verantwortliche Induktoren für die differentielle

Expression des endogenen IFN- β durch TNF- α in Frage. Weitere Proteine aus dieser Familie, die in dieser Region (PRD I und PRD III) binden können, sind IRF-1 und p48 (siehe Abb. 4.11), so daß der nächste Schritt in einer Versuchsreihe bestand, die sich mit deren Expression in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen befaßte. In

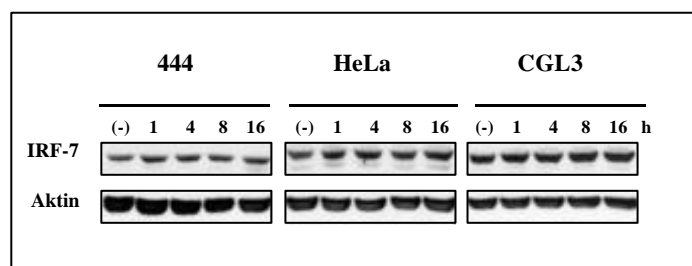


Abb. 4.19 Western Blot Analyse der IRF-7 Expression in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen.

50 μg der von TNF- α (10 ng/ml) behandelten Zellen wurden in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der IRF-7 Expression erfolgte mit einem polyklonalen IRF-7 spezifischen Antikörper. Zur Kontrolle der Ladung und des Transfers wurde derselbe Filter mit einem monoklonalen Aktin-Antikörper nachinkubiert.

Abbildung 4.20 A ist die Induktion der Transkription von IRF-1 dargestellt, Abbildung 4.20 C hingegen zeigt p48. In beiden Fällen ist deutlich zu sehen, daß eine starke Induktion der

Transkription nur in TNF- α behandelten nicht-tumorigenen 444-Zellen stattfand. Das Maximum der IRF-1 Expression war nach 30 Minuten erreicht und hielt sich bis zu 2 Stunden auf diesem Niveau (Abb. 4.20 A). In tumorigenen HeLa- und CGL3-Zellen war nur eine sehr schwache IRF-1 Induktion zu sehen. Im Gegensatz zu IRF-1 beschränkte sich die Induktion der p48 Transkription vollständig auf nicht-tumorigene 444-Zellen (Abb. 4.20 C).

Die selektive Induktion von IRF-1 und p48 in 444-Zellen verlangte nach der Analyse dieser Transkriptionsfaktoren auf Proteinebene. Für IRF-1 (Abb. 4.20 B) und p48 (Abb. 4.20 D) zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung mit den Daten, die sich aus dem Northern Blot ergeben hatten (Abb. 4.20 A und C). Für die fehlenden Induktion von IRF-1 und p48 durch TNF- α in tumorigenen Zellen gab es zu diesem Zeitpunkt zwei mögliche Ursachen, entweder waren die entsprechenden Gene in tumorigenen Zellen auf diese Weise nicht induzierbar oder ihre Expression wurde durch die viralen Onkogene negativ beeinflusst.

Durch die Behandlung mit Typ I und Typ II Interferonen sollte gezeigt werden, ob eine Induktion dieser Transkriptionsfaktoren durch Interferone möglich ist. IRF-1 offenbarte auf mRNA Ebene eine Induktion der Transkription durch Typ I Interferone (Abb 4.21 A und B)

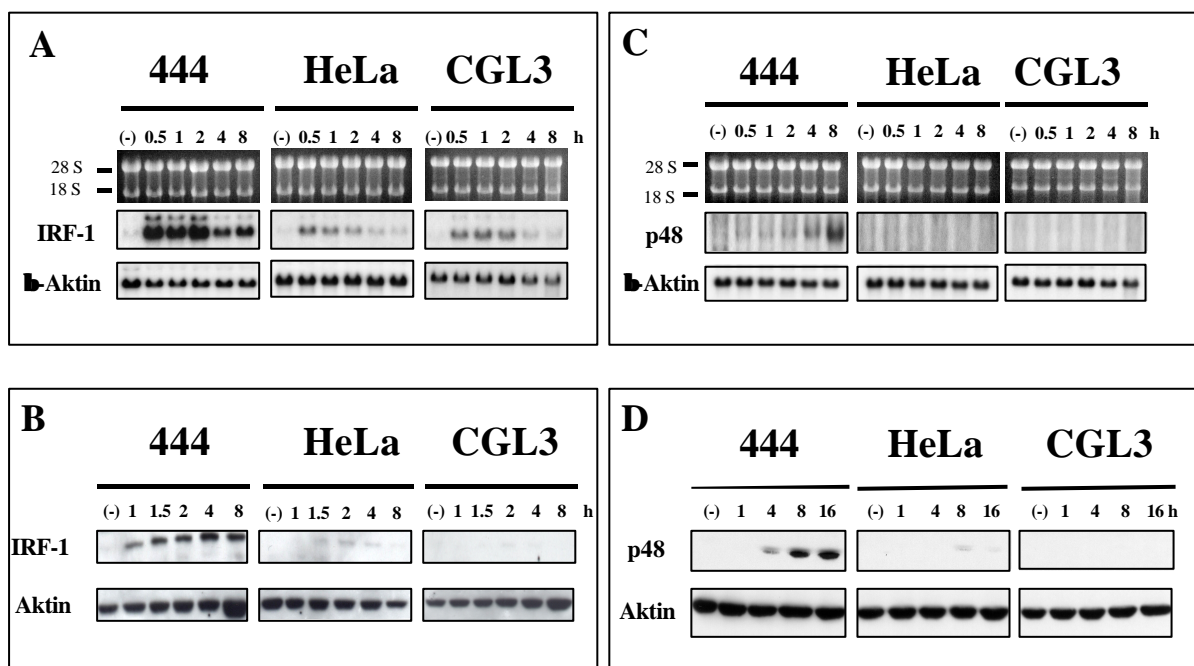


Abb. 4.20 Analyse der Induzierbarkeit von IRF-1 und p48 in den tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen durch TNF- α .

A + C: Analyse der Expressionsraten von IRF-1 und p48 nach der Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α . Jeweils 5 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für den Nachweis der Expression wurden die Filter jeweils mit der cDNA des entsprechenden Gens hybridisiert. Die β -Aktin Sonde wurde für die Detektion gleicher RNA-Mengen eingesetzt.

B + D: 50 μ g der Kernextrakte wurden auf einem 8%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die jeweiligen Proteine wurden durch die Verwendung eines polyklonalen IRF-1 Antikörpers und eines monoklonalen p48 Antikörpers auf den Filtern nachgewiesen. Gleiche Proteinladungsmengen wurden durch einen monoklonalen Aktin-Antikörper detektiert.

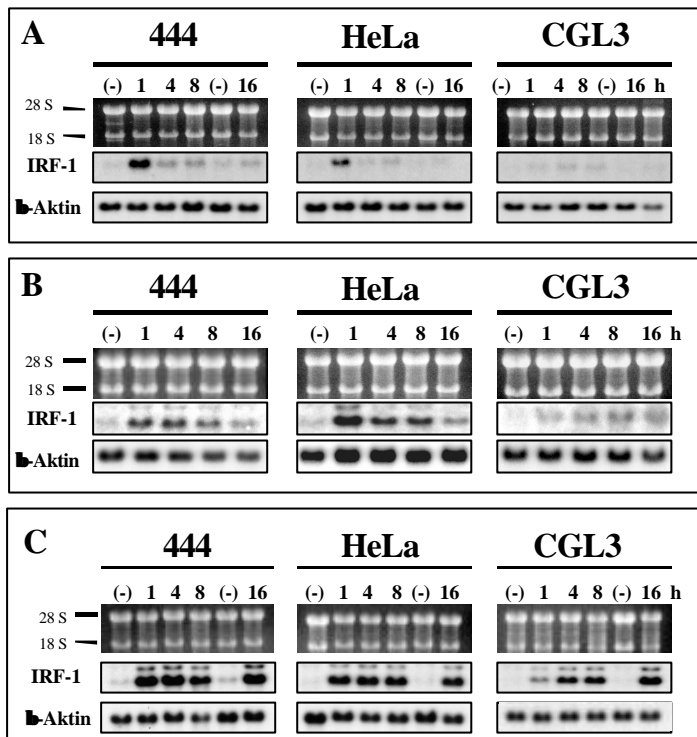


Abb. 4.21 IRF-1 ist unabhängig vom tumorigenen Phänotyp der Zelle in HPV18 positiven Zellen durch TypI und TypII Interferone induzierbar.

Jeweils 5 μ g der Gesamt-RNA wurden auf einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die IRF-1 Expression wurde mit Hilfe einer spezifischen Sonde nachgewiesen. Die Expression des β -Aktin dient der Überprüfung der eingesetzten RNA-Mengen. (-) steht für die unbehandelte Kontrolle.

A: IFN- α ; **B:** IFN- β ; **C:** IFN- γ

sowie durch IFN- γ (Abb. 4.21 C) unabhängig vom tumorigenen Phänotyp der Zellen. Das Maximum der Transkription war nach einer Stunde, unabhängig vom Interferon-Typ, erreicht. Unterschiede wurden für die Dauer der maximalen Transkription deutlich. Im Falle des IFN- α wurde die maximale Transkriptionsrate nach Ablauf von einer Stunde bereits wieder verlassen (Abb. 4.21A). Im Gegensatz dazu zeigte die IRF-1 Transkription bei einer Behandlung mit IFN- β und IFN- γ eine länger andauernde Expression an. Bei IFN- β begann die Transkription nach 4 Stunden abzuklingen, jedoch wurde das

Grundniveau erst nach 16 Stunden erreicht (Abb. 4.21 B). Die Inkubation mit IFN- γ führte auch noch nach 16 Stunden zu einer maximalen Transkription (Abb. 4.21 C). Im Gegensatz zur unterschiedlichen IRF-1 Transkription zeichnete sich für p48 ein einheitliches Bild ab (Abb. 4.22). Jeweils nach 4 Stunden war eine Induktion der Transkription des p48 zu sehen (vergleiche Abb. 4.22 A, mit B und C). Die transkriptionelle Induzierbarkeit unterschied sich dabei minimal zwischen tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen (vergleiche 444 mit HeLa und CGL3). 444-Zellen verfügten über eine leicht höhere Transkriptionsrate als tumorigene HeLa- und CGL3-Zellen. Dennoch fand auch in tumorigenen Zellen eine eindeutige Induktion der Transkription statt. Die Induzierbarkeit der Transkription von p48 und IRF-1 durch Typ I und Typ II Interferone sprach somit gegen eine Inaktivierung dieser Gene durch virale Onkogene. Vielmehr zeigen diese Daten, daß beide Gene durch exogene Interferonzugabe unabhängig vom tumorigenen Phänotyp, induziert werden können.

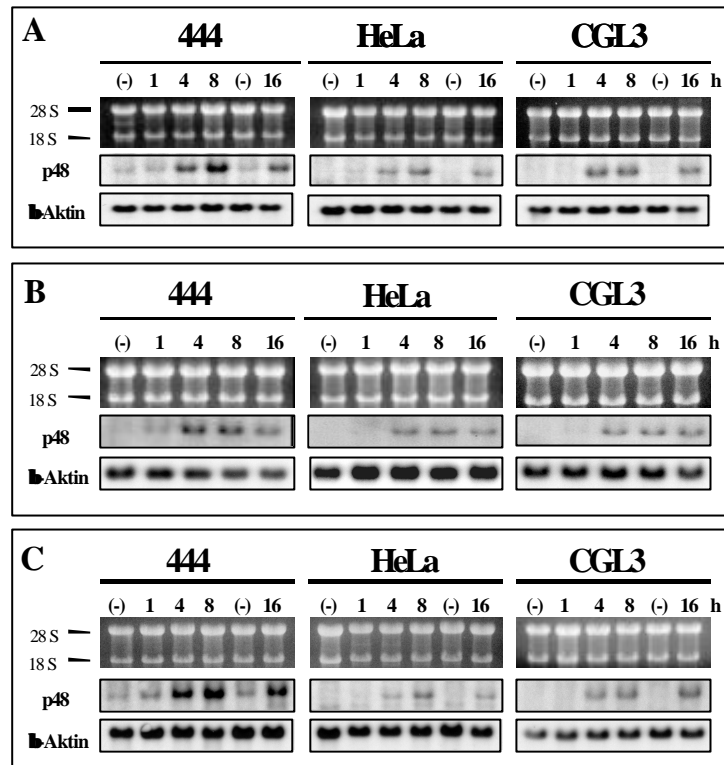


Abb.4.22 Typ I und Typ II Interferone induzieren die Transkription von p48 in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen.

Jeweils 5 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Durch die Verwendung Gen-spezifischer Sonden wurde die Expression von p48 und β -Aktin nachgewiesen. Die unbehandelte Kontrolle ist mit (-) gekennzeichnet. Die Zellen wurden entsprechend der Zeitangaben mit den verschiedenen Interferonen behandelt.

A: IFN- α Zugabe, **B:** IFN- β Zugabe, **C:** IFN- γ Zugabe

Ein anderer Mechanismus für die Repression von IFN- β könnte die Überexpression von IRF-2 in tumorigenen Zellen sein. Die Expressionsanalyse von IRF-2 ergab ein anderes Bild auf mRNA- und Proteinebene (Abb. 4.23). Hier wurde deutlich, daß in tumorigenen HeLa- und CGL3-Zellen keine IRF-2 Überexpression vorlag. Statt dessen war lediglich eine konstitutive Expression, die nur in 444- und HeLa-Zellen auf RNA-Ebene nach 8 Stunden leicht anstieg (Abb. 4.23 A) zu sehen. Abbildung 4.23 B zeigt klar, daß die Daten der Northern Analyse (Abb 4.23 A) den Ergebnissen der Proteinanalyse entsprachen (Abb. 4.23 B): der Induktion der Transkription folgte ein Anstieg der IRF-2 Proteinmenge im Zellkern. Diese Daten lassen den Schluß zu, daß IRF-2, welches im IFN- β Promotor an die IRF-Erkennungssequenz (siehe Abb. 4.11) binden und dessen Expression reprimieren könnte, keine entscheidende Funktion bei der unterschiedlichen IFN- β Expression übernimmt, da es in tumorigenen Zellen nicht verstärkt exprimiert wird.

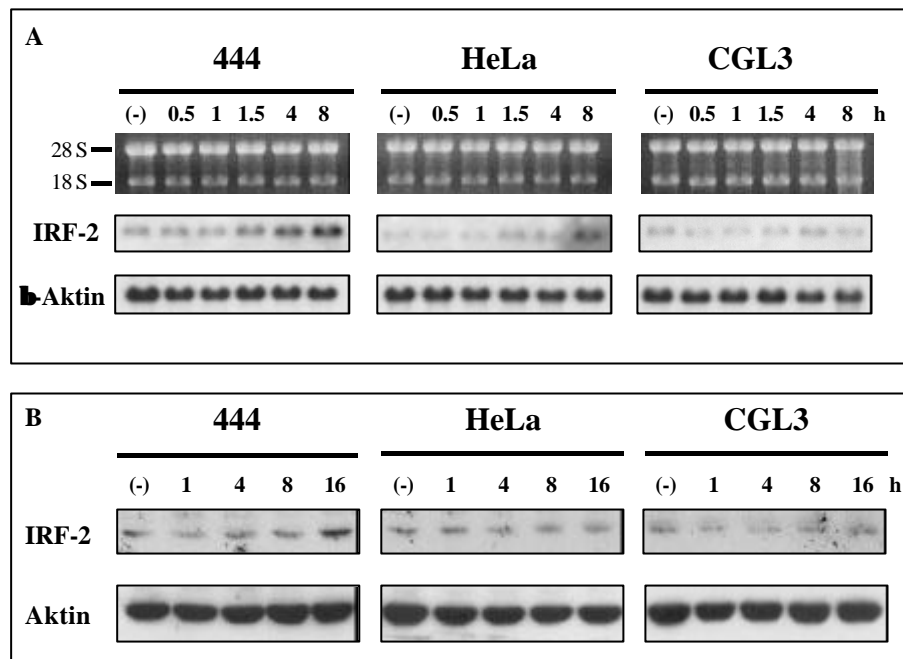


Abb. 4.23 IRF-2 zeigt in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen die gleiche Expression.

A: 5 µg der Gesamt-RNA von Zellen, die mit 10 ng/ml TNF-α behandelt worden waren, wurde auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Expression der einzelnen Gene wurde durch die Verwendung spezifischer Gensonden nachgewiesen. Die Homogenität der RNA wurde durch die Nachinkubation der Filter mit β-Aktin nachgewiesen.

B: Jeweils 50 µg der Kernextrakte wurden in einem 8 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die IRF-2 Proteinexpression wurde mit Hilfe eines polyklonalen IRF-2 Antikörpers nachgewiesen. Mit Hilfe eines monoklonalen Aktin-Antikörpers wurde die Verwendung gleicher Proteinmengen in den verschiedenen Proben detektiert.

4.2.5 Untersuchung der IRF-1 und p48 Expression in tumorigenen und nicht-tumorigenen somatischen Zellhybriden

Nachdem IRF-1 und p48 sich als die entscheidenden Faktoren bei der Induktion IFN-β Transkription und der Initialisierung des antiviralen Phänotyps herauskristallisiert hatten, sollte diese beiden Faktoren in den somatischen Zellhybriden aus den HPV16 und HPV18 positiven Zellen analysiert werden.

Der Vergleich der Ergebnisse der somatischen Zellhybride, SiHa x HeLa, CaSki x HeLa und SW756 x HeLa mit den Ergebnissen der Ursprungszelllinien, SiHa, CaSki, SW756 und HeLa, könnte Hinweise darauf liefern, ob in HPV16/18 positiven Zellen gleiche oder verschiedene Gene defekt sind (Abb. 4.24). Liegen die inaktivierten Gene der Fusionspartner auf verschiedenen chromosomalen Abschnitten, so kommt es in somatischen Zellhybriden zu einer Komplementation, die in der Reexpression eines Signaltransduktionsweges oder eines Gens resultiert. Diese Komplementationen können zur Entstehung von nicht-tumorigenen somatischen Zellhybriden aus 2 ursprünglich tumorigenen Zellen führen (Soto *et al.*, 2000). Liegen die

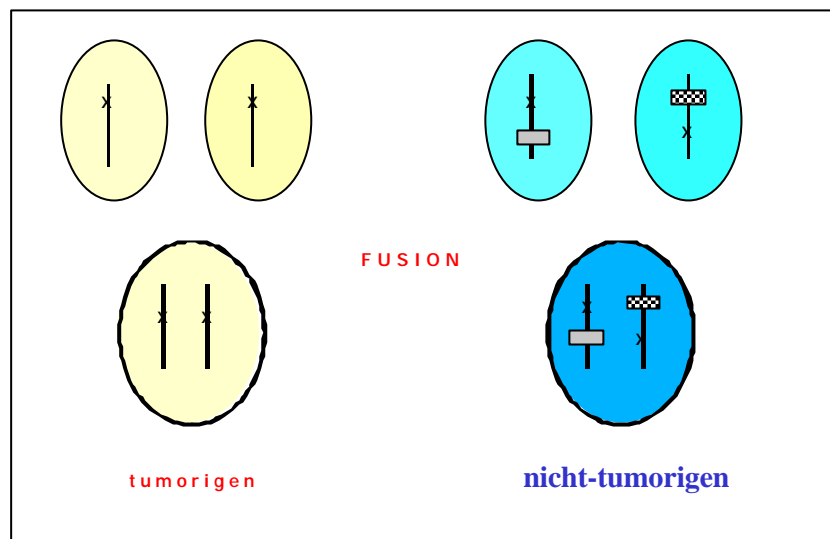


Abb. 4.24 Schematische Darstellung der Komplementation in den somatischen Zellhybriden.

betroffenen Gene im selbem chromosomalen Bereich, so findet diese Komplementation nicht statt.

Wenn IRF-1 und p48 wirklich so eine wichtige Rolle bei der Induktion von endogenem IFN- β spielen, würde auch in diesen Zellen ein Unterschied in der Expression, zu sehen sein. Diese unterschiedliche Expression würde sich dann wiederum mit dem Ergebnis der IFN- β RT-PCR in Korrelation setzen lassen.

In SiHa-Zellen (Abb. 4.25 B) und in CaSki x HeLa Hybriden (Abb. 4.25 C) war nach 1 Stunde eine Induktion von IRF-1 zu verzeichnen. CaSki-Zellen (Abb. 4.25 C), SW756 und SW756 x HeLa Hybride (Abb. 4.25 A) zeigten keine Induktion von IRF-1. Das Expressionsmuster von IRF-1 in den somatischen Zellhybriden kam dem in nicht-tumorigenen 444-Zellen (Abb. 4.20 A) gleich. Ohne exogenen Stimulus war eine Transkription nicht detektierbar, aber nach Zugabe von TNF- α befand sich die Expressionsrate nach einer Stunde im maximalen Bereich (vergleiche Abb. 4.25 B/C mit 4.20 A). Nach 8 Stunden war in 444-Zellen die Expression von IRF-1 noch deutlich erhöht, wohingegen sie sich in SiHa- und CaSki x HeLa-Zellen fast wieder auf dem Ausgangsniveau befand. In nicht-tumorigenen 444-Zellen zog die Expression von IRF-1 die Induktion von p48 nach sich (vergleiche Abb.4.20 B mit 4.20 D), dies war bei den somatischen Zellhybriden nicht zwingend die Folge (Abb. 4.26). Eine geringe Basaltranskription des p48 Gens zeichnete sich in CaSki-Zellen (Abb. 4.26 C) ab, wobei in den entsprechenden somatischen Zellhybriden aus CaSki und HeLa eine deutliche Verstärkung der Expression nach TNF- α Behandlung sichtbar war. SiHa-Zellen zeigten hingegen keinerlei p48 Induktion (Abb. 4.26 B), obwohl zuvor eine Induktion von IRF-1 zu sehen war. Bei SiHa x HeLa-Zellen deutete

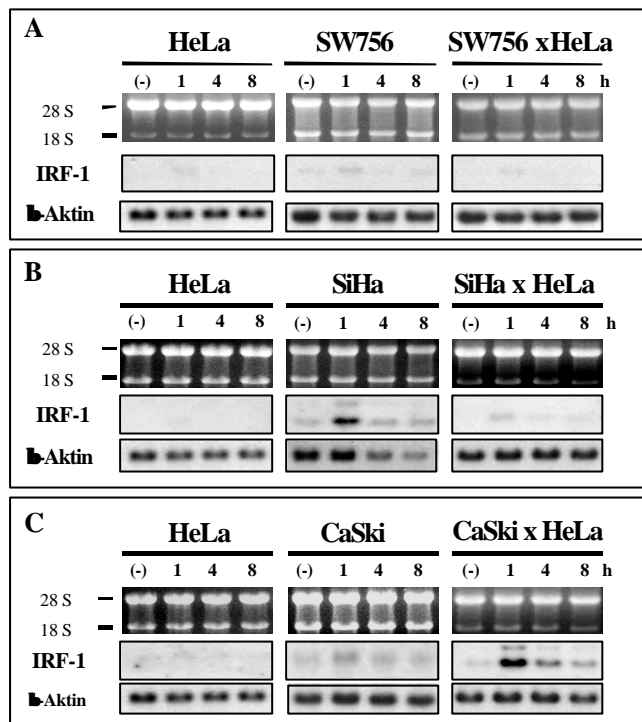


Abb. 4.25 TNF- α induziert IRF-1 in nicht-tumorigenen somatischen Zellhybriden.

Analyse der IRF-1 Induktion durch TNF α (10 ng/ml) in tumorigenen und nicht-tumorigenen somatischen Hybriden. Jeweils 5 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Expression wurde durch die Hybridisierung der Filter mit den spezifischen Sonden nachgewiesen. Die β -Aktin Sonde wurde zum Nachweis gleicher Mengen eingesetzt. Die jeweiligen Zellhybride sind mit den Ausgangszellen in einer Teilgrafik zusammengefaßt dargestellt.

A: SW756 x HeLa, **B:** SiHa x HeLa, **C:** CaSki x HeLa

sich eine leichte Induktion der Transkription des p48 Gens (Abb. 4.26 B) an. SW756- und SW756 x HeLa-Zellen induzierten unter den vorliegenden Bedingungen nicht die Transkription des p48 Gens (Abb. 4.26 A).

Aufgrund der Expressionsdaten von IRF-1 und p48 läßt sich eine Korrelation zwischen der Induktion von endogenen IFN- β durch TNF- α und der Expression dieser Transkriptionsfaktoren aufzeigen. Nur Zellen, die in der Lage waren, die Transkription von IFN- β durch TNF- α zu induzieren, zeigten auch eine Induktion der IRF-1 und der p48 Expression (siehe Abb. 4.20 A und B, Abb.

4.25 C und Abb.4.26 C). Eine weitere Korrelation besteht bezüglich der Tumorigenität. Nur 444-Zellen und CaSki x HeLa Hybride hatten im Nacktmaus-Modell kein Tumorwachstum induziert (Soto *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu waren alle tumorigenen Zellen nicht in der Lage durch die TNF- α Stimulation endogenes IFN- β zu exprimieren (Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Eine Ausnahme stellten SiHa-Zellen dar, die nur zu einer IRF-1 Aktivierung fähig waren, für die aber eine p48 Expression nicht nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer interessanter Zusammenhang besteht zwischen der Protektion der Zellen durch TNF- α vor einer viral induzierten Lyse und dem nicht-malignen Phänotyp von HPV16/18 positiven Zellen. Nur nicht-tumorigenen Zellen induzierten einen Schutz durch TNF- α . Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß alle Zellen unabhängig vom tumorigenen Phänotyp durch exogen supplementiertes IFN- β , IFN- α und IFN- γ geschützt werden können. Diese Daten deuten darauf hin, daß bei der malignen Transformation der TNF- α vermittelte

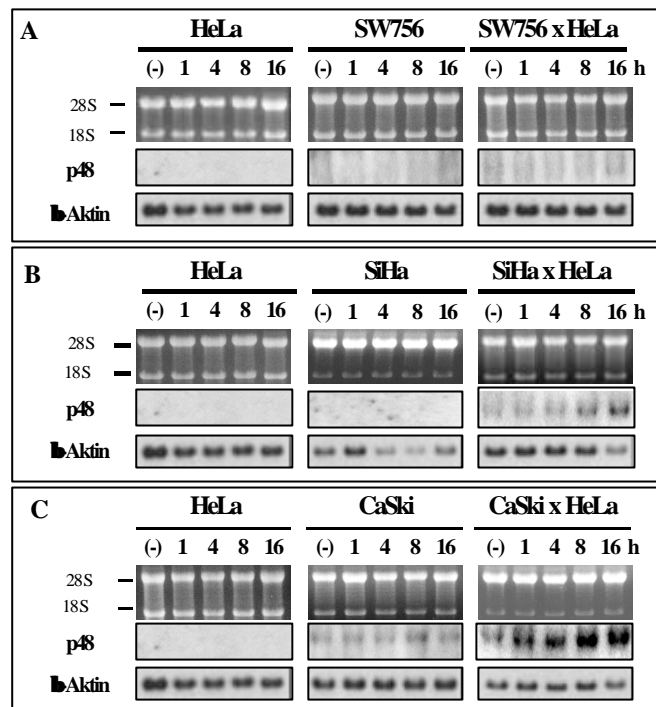


Abb. 4.26 p48 Induktion durch TNF- α in den somatischen Zellhybriden.

Die Zellen wurden jeweils mit 10 ng/ml TNF- α entsprechend der aufgeführten Zeitpunkte behandelt. 5 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression der Gene wurde durch die Verwendung von spezifischen Sonden belegt. Für den Nachweis gleicher RNA-Mengen wurden die Filter mit β -Aktin nachhybridisiert.

A: SW756 x HeLa, **B:** SiHa x HeLa, **C:** CaSki x HeLa

Signaltransduktionsweg, der zur Induktion von endogenem IFN- β führt, betroffen ist und nicht die Signaltransduktionskaskade der Interferone selbst.

Bei der Durchführung der Virustitrationen war aufgefallen, daß sich stets ein verschwindend geringer Anteil tumorigener HeLa-Zellen, die mit TNF- α behandelt worden waren, der viral induzierten Lyse widersetzte. Da zuvor gezeigt worden war, daß sich tumorigenen Zellen und insbesondere HeLa-Zellen durch TNF- α nicht vor einer viralen Lyse schützen lassen, stellte sich die Frage nach der Ursache für das Auftreten dieser Subpopulationen. Die Vorgehensweise zur Isolierung dieser Zellen und ihre biologischen Eigenschaften werden in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

4.3 Isolierung und Charakterisierung der biologischen Eigenschaften von EMCV-Revertanten

In den vorhergehenden Virustitrationen mit HeLa-Zellen war aufgefallen, daß die TNF- α Behandlung in einem verschwindend geringen Anteil der ausgesäten Zellen zu einer Resistenz gegenüber der viral induzierten Lyse führte. Für diese Resistenz gab es zwei mögliche Erklärungen: entweder waren diese Zellen für das Virus nicht permissiv oder sie waren in der Lage, einen antiviralen Status auf Grund der TNF- α Behandlung zu induzieren. Um diese Frage zu beantworten zu können, wurden die Zellen isoliert, expandiert und mit der Charakterisierung ihrer molekularen Eigenschaften begonnen.

4.3.1 Isolierung der HeLa-EMCV Revertanten

Für die Isolierung von Revertanten wurde die Virustitration auf eine 6-Lochplatte ausgeweitet, wobei die entsprechenden Zelldichte/cm² proportional zu den vorhergehenden Versuchen beibehalten wurde. Nach einer Inkubation der Zellen für 24 Stunden mit TNF- α wurden die Zellen mit EMC-Virus (m.o.i. 0,1) infiziert. Nachdem die Lyse in der Kontrolle ohne TNF- α vollständig war, wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt, welches mit neutralisierendem Antikörper gegen das EMC-Virus versetzt war. In den folgenden 4 Wochen wurden die Zellen alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium versorgt, welches neutralisierenden

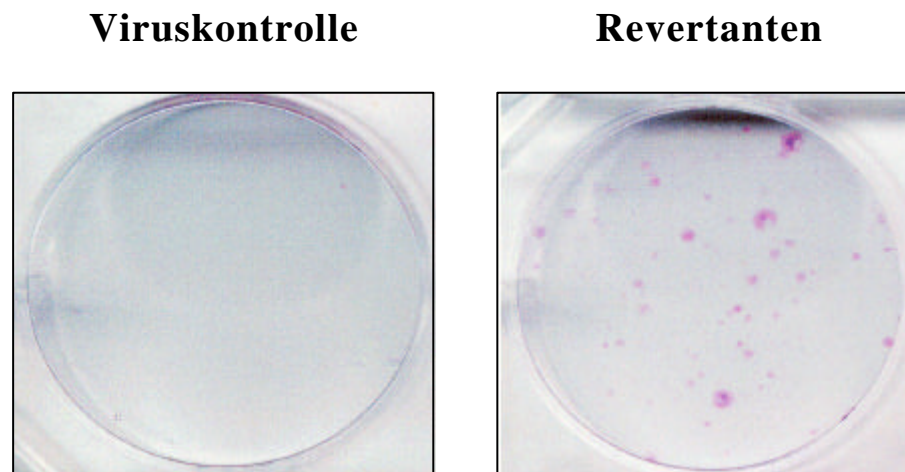


Abb. 4.27 HeLa-EMCV Revertanten nach einigen Wochen Inkubation mit neutralisierendem Antikörper.

Die Zellen waren in 6-Lochplatten ausgesät und mit 10 μ g/ml TNF- α behandelt worden. Am nächsten Tag wurden sie mit EMCV (m.o.i. 0,1) infiziert. Nachdem die Lyse abgeschlossen war, wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium, welches neutralisierenden EMCV-Antikörper enthielt, versetzt. Zur Darstellung der Subpopulationen wurden die Zellen nach 4 Wochen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt.

Links Viruskontrolle

Rechts EMCV-resistente Revertanten

EMCV-Antikörper enthielt. Innerhalb dieser Zeitspanne bildeten sich Subpopulationen aus. Abbildung 4.27 zeigt das Aussehen einer solchen Kultur nach dieser Zeit. Anhand der angefärbten Subpopulationen konnte eine Reversionsfrequenz der Zellen von etwa $3,5 \times 10^{-4}$ festgestellt werden. Zur Vereinzelung der Subpopulationen wurden die Zellen trypsiniert, entsprechend verdünnt und anschließend in 96-Lochplatten ausgesät. Die isolierten Zellen wurden anschließend expandiert und kontinuierlich in Kultur gehalten. Auf diese Weise war es möglich 15 Klone zu isolieren (Klon #1 bis #15).

4.3.2 Permissivität der isolierten Revertanten für das EMCV-Virus

Die beobachtete EMCV-Resistenz der Revertanten konnte entweder auf der Resistenz dieser Zellen gegenüber dem Virus oder auf der Fähigkeit endogenes IFN- β durch TNF- α zu induzieren, basieren.

Der Nachweis für die Permissivität dieser Zellen gegenüber dem Virus wurde erbracht, indem die Zellen in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Loch in 96-Lochplatten ausgesät und mit verschiedenen Virusverdünnungen infiziert wurden. Zu diesem Zeitpunkt, war nicht klar, welche Zeitspanne die Revertanten für die Lyse benötigen würden. Aus diesem Grund zwei Zeitpunkte,

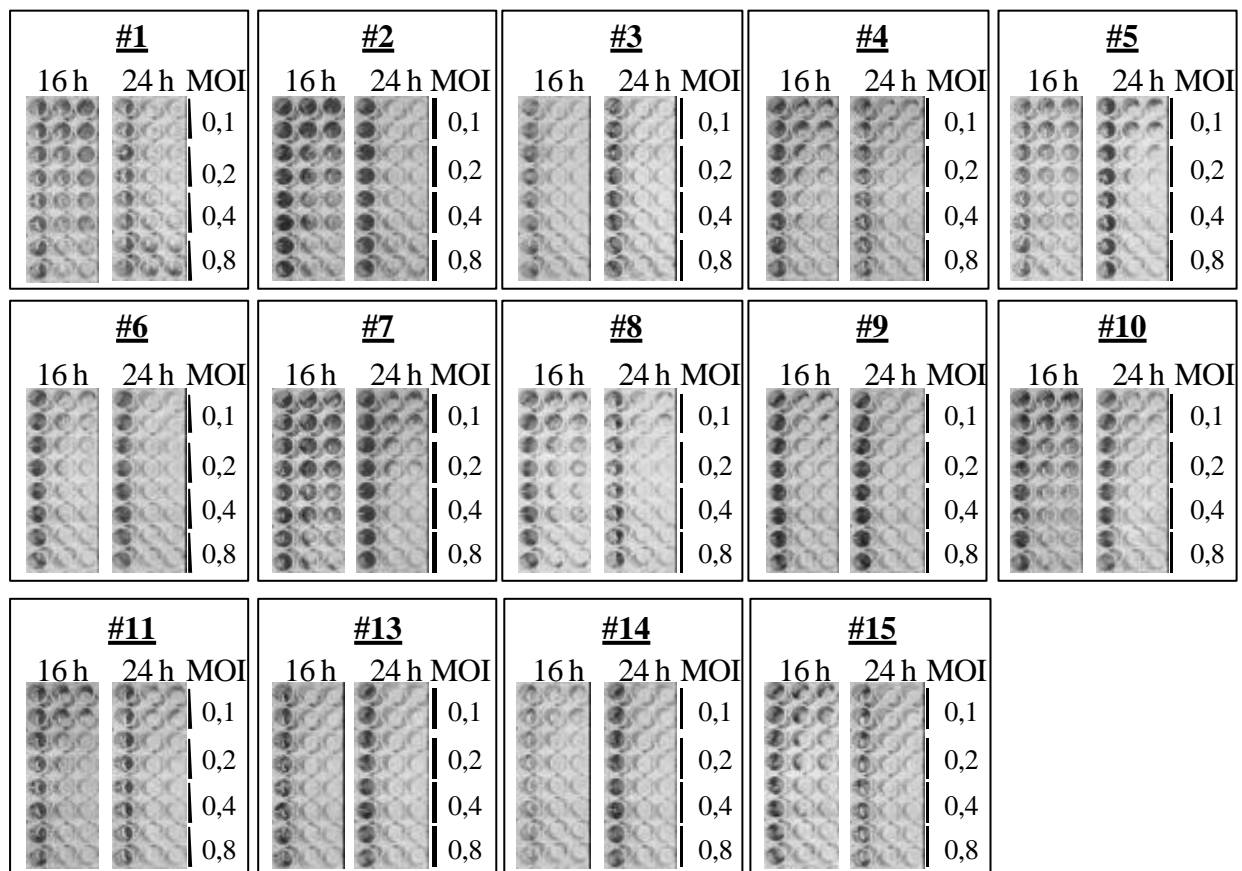


Abb. 4.28 Permissivität der isolierten HeLa-EMCV Revertanten für das EMCV-Virus.

Die Zellen wurden in 96-Lochplatten mit einer Zelldichte von 1×10^4 Zellen/Loch ausgesät und für 16 oder 24 Stunden mit EMCV in unterschiedlichen Verdünnungsstufen inkubiert. Jeweils 4 Löcher der Mikrotiterplatte wurden mit derselben Virusverdünnung inkubiert. Die erste Reihe einer jeden Platte stellt die Zellkontrolle dar und dient der Demonstration des Zellwachstums. Die einzelnen HeLa-EMCV-Revertantenklone wurden von 1 bis 15 durchnummeriert und diese Namensgebung wurde in den folgenden Experimenten beibehalten.

nach deren Ablauf die virale Lyse unterbrochen werden sollte bestimmt. Die Basis für die beiden Zeitpunkte (16 und 24 Stunden) lieferten die Erfahrungswerte aus den vorherigen Permissivitäts-Analysen. Für Wildtyp-HeLa-Zellen war bekannt, daß die Lyse nach 16 Stunden komplett war, wohingegen 444-Zellen bis zu 24 Stunden für denselben Vorgang benötigten. Es wird deutlich, daß alle Revertanten für das Virus permissiv waren, d.h. der Schutz dieser Zellen gegenüber dem EMC-Virus basierte nicht auf einer Resistenz dieser Zellen, sondern es kam nach einer Infektion zur Lyse der Zellen (Abb. 4.28). Die getrennte Betrachtung der Lysezeitpunkte und des Verhaltens der Zellen zu diesem Zeitpunkten, d.h. nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem Virus bei unterschiedlichen Verdünnungen offenbarte für die Revertanten ein unterschiedliches Lyseverhalten. Es gab eindeutig Zellen, die bereits nach 16 Stunden in der höchsten Virusverdünnung (m.o.i. 0,1) komplett lysiert waren, z. B. #3, #6, #9, #13 und #15. Andere hingegen zeigten dieses Ergebnis nach 16 Stunden erst bei einer größeren Virusmenge an (#1, #2, #4, #5, #7, #8, #10, #11 und #15).

4.3.3 Analyse der EMCV-Persistenz in den Revertanten

Diese Zellen waren mit Hilfe einer viralen Infektion isoliert worden, so war es vor der Durchführung weiterer Experimente wichtig zu wissen, ob in diesen Zellen noch replizierendes oder persistierendes Virus vorlag. Wenn dies der Fall sein sollte, so könnte dies Einfluß auf zelluläre Proteine nehmen und damit zukünftige Ergebnisse beeinflussen.

Das EMC-Virus gehört zur Familie der Picornaviridae und enthält als Genom einen positiven RNA-Strang. Nach einer Infektion von Zellen wird dieser positive RNA-Strang für die

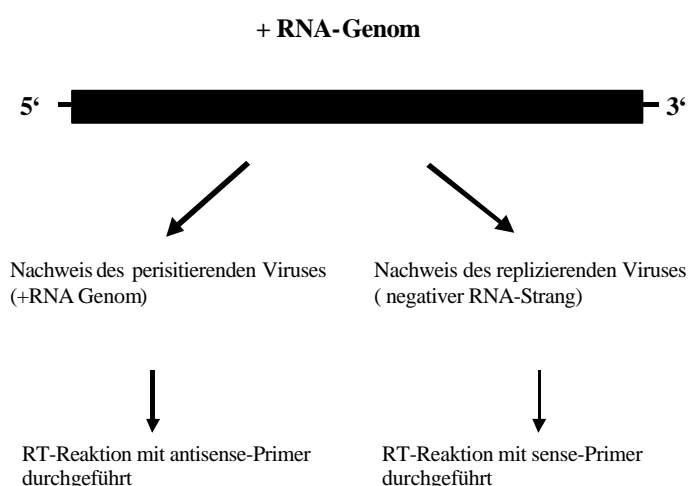


Abb. 4.29 Verwendung von EMCV spezifischen Primern für die Unterscheidung zwischen replikativen und persistierenden Viren.

nachweisbar) von replizierendem Virus (RNA mit positiver und negativer Orientierung liegt vor) zu unterscheiden. Die Verwendung von spezifischen Primern für die RT-Reaktion ermöglichte

Translation der viralen Proteine verwendet. Neue virale RNA entsteht, indem der positive RNA-Strang in einen Minusstrang umgeschrieben wird, der als Matrize für die Synthese weiterer RNA-Stränge dient (Rueckert, 1996). Durch die Verknüpfung unterschiedlicher Lebenszyklen des Virus mit RNA unterschiedlicher Orientierung ist es möglich persistierendes Virus (nur RNA mit positiver Orientierung ist

eine Differenzierung zwischen den beiden Formen des Virus. Für den Nachweis der persistierenden Form des Virus wurde in der RT-Reaktion der antisense Primer eingesetzt und für die replizierende Form der sense-Primer (Abb. 4.29). Die anschließende PCR wurde mit beiden Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Spezifität der Reaktion wurden parallel Wildtyp HeLa-Zellen mit EMCV infiziert und die RNA nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden isoliert. Zu diesem Zeitpunkt waren vereinzelte Lysen der HeLa-Zellen sichtbar, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß in diesen Kontrollen beide Formen des Virus nachweisbar sein würden. In einem parallelen Ansatz wurde eine RT-Reaktion mit Oligo dT-Primern durchgeführt um die Verwendung von äquivalenten RNA-Mengen für die RT-Reaktion demonstrieren zu können. Zunächst war für EMCV, außer in den entsprechenden HeLa-Kontrollen kein Signal detektierbar, so daß das Gel geblottet und eine Hybridisierung mit einer EMCV spezifischen Sonde durchgeführt wurde. In keinem der isolierten Klone war ein Signal für das EMC-Virus detektierbar war, weder für die replikative Form (s) noch für die persitierende Form des Virus (r), wohingegen in den infizierten HeLa-Zellen beide Formen nachgewiesen wurden (Abb. 4.30). Die Funktionalität der eingesetzten Primer für die RT-Reaktion zeigte sich am Signal der replikativen und der persistierenden Form in infizierten HeLa-Zellen.

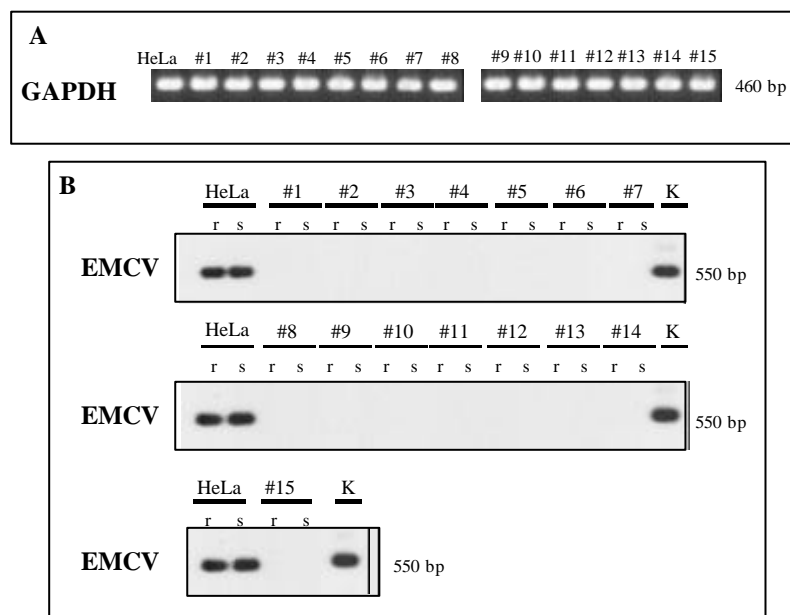


Abb. 4.30 Die isolierten Klone enthalten weder persitierendes noch replikatives EMC-Virus.

A GAPDH-PCR, sie diente dem Nachweis, daß gleiche Mengen RNA für die RT-Reaktion eingesetzt wurden.

B EMCV-PCR, wobei die RT-Reaktion jeweils spezifisch mit sense-Primer (s) oder antisense-Primer (r) für den Nachweis der replikativen oder der persistierenden Form des Virus eingesetzt wurde. Die HeLa-Zellen dienten als Positivkontrolle für die Spezifität der Reaktion und wurden aus diesem Grund für 8 Stunden mit EMC-Virus inkubiert und anschließend entsprechend den isolierten Klonen prozessiert. Als spezifische Hybridisierungskontrolle wurde ein EMCV-Amplifikat aufgetragen.

4.3.4 Expressionanalyse von IRF-1, -2 und p48 in den HeLa-EMCV-Zellen

In vorhergehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, daß die Transkription von IRF-1 und p48 nur in den nicht-tumorigenen Zellen durch TNF- α induzierbar war, wohingegen in tumorigenen Zellen diese Induktion nicht stattfand (Abb. 4.20, Abb. 4.25 und Abb. 4.26). Diese Gene sind auch in tumorigenen Zellen durch Interferone induzierbar (Abb. 4.21 und 4.22), so daß die Induktion der Transkription von diesen Genen durch TNF- α in tumorigenen Zellen gestört ist. Um nun herauszufinden, ob sich die HeLa-EMCV-Klone von HeLa-Wildtypzellen bezüglich der Expression der IRF-Familienmitglieder unterscheiden, sollte deren Expression untersucht werden. Für den direkten Vergleich mit der Expression in nicht-tumorigenen Zellen, wurden 444-Zellen gleichbehandelt. Die Kontrollen (HeLa- und 444-Zellen) wurden jeweils für die Inkubationszeit aufgetragen, die der maximalen Transkription des zu detektierenden Gens entsprach. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden hier nicht alle Zellen analysiert und dargestellt, so daß stellvertretend für alle Klone zufällig 4 aus 15 ausgewählt wurden. Der Vergleich der einzelnen Expressionsraten führte ein unterschiedliches Expressionsmuster vor Augen. Die IRF-1 Induktion in Klon #4 (Abb. 4.31 B) entsprach nicht-tumorigenen 444-Zellen, wohingegen #9 (Abb. 4.31 C) eine Induktion zeigte, die der Expression in den tumorigenen HeLa-Zellen gleichkam. Klon #2 (Abb. 4.31 A) und #10 (Abb. 4.31 D) zeigten durch die TNF- α Behandlung eine IRF-1 Expression die schwächer als in 444-Zellen war, aber die sich noch deutlich von der geringen Transkriptionsrate in tumorigenen HeLa-Zellen abhob. Aufgrund

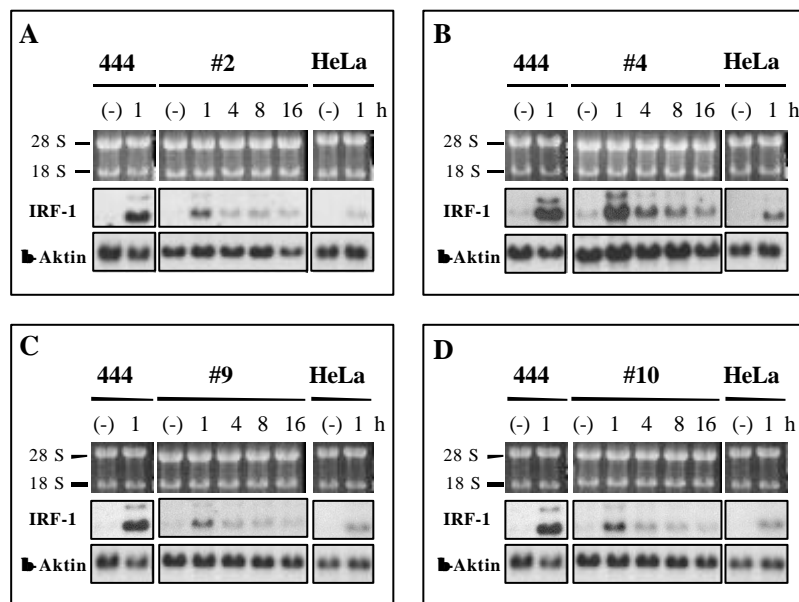


Abb. 4.31 Die HeLa-EMCV-Zellen zeigen eine unterschiedliche Induktion von IRF-1 durch TNF- α .

Die Zellen wurden mit 10 μ g/ml TNF- α entsprechenden den angegebenen Zeitintervallen inkubiert. Jeweils 5 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression wurde durch die Verwendung einer genspezifischen Sonde nachgewiesen. Die HeLa- und die 444-Zellen wurden zum Vergleich der Expression mit jeweils der Inkubationszeit, die der stärksten Expression entsprach, aufgetragen.

A Klon #2, B Klon #4, C Klon #9, D Klon #10

dieses äußerst interessanten Ergebnisses, welches eine Reexpression des IRF-1 durch TNF- α in den Revertanten zeigte, wurde als nächstes die p48 Expression in diesen Zellen analysiert. Nur Zellen, die zuvor eine Induktion der IRF-1 Expression gezeigt hatten (Abb. 4.31) wiesen eine Induktion der p48 Expression (Abb. 4.32) auf. Diese war jedoch teilweise ein wenig schwächer ausgeprägt als in nicht-tumorigenen 444-Zellen. Klon #9 (Abb. 4.32 C) zeigte keinerlei Induktion der p48 Expression. Auch die beiden Klone #2 (Abb. 4.32 A) und #10 (Abb.4.32), wichen voneinander bezüglich der p48 Expression ab. Klon #2 zeigte eine stärkere Induktion als #10.

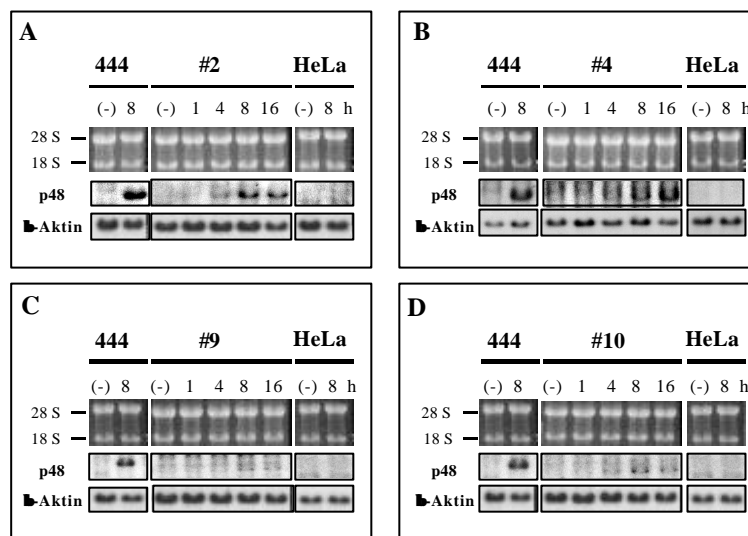


Abb. 4.32 Die Induktion der p48 Transkription durch TNF- α ist in den Revertanten unterschiedlich ausgeprägt.

Die Zellen wurden mit 10 μ g/ml TNF- α entsprechenden den angegebenen Zeitintervallen inkubiert. 5 μ g der Gesamt-RNA wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Expression wurde durch die Verwendung einer genspezifischen Sonde nachgewiesen. Die HeLa- und die 444-Zellen wurden zum Vergleich der Expression mit jeweils der Inkubationszeit, die der stärksten Expression entsprach, aufgetragen. Die Aktin-Hybridisierung dient dem Nachweis äquivalenter Mengen.

A Klon #2, B Klon #4, C Klon #9, D Klon #10

Die letzte Expressionsanalyse aus dieser Genfamilie sollte sich mit IRF-2 beschäftigen, da es im IFN- β Promotor an die IRF-Erkennungssequenz binden und repressorisch agieren kann. Klon #2, #4 und #10 demonstrierten eindeutig eine Induktion der IRF-2 Expression, wie in den 444-Zellen durch TNF- α , die auch derselben Kinetik folgte (vergleiche Abb. 4.33 A und B mit Abb. 4.23). Eine unveränderte Expression, jedoch mit einem höheren Basalniveau als in den 444- und HeLa-Zellen, zeigte sich für Klon #9 (Abb. 4.33 C).

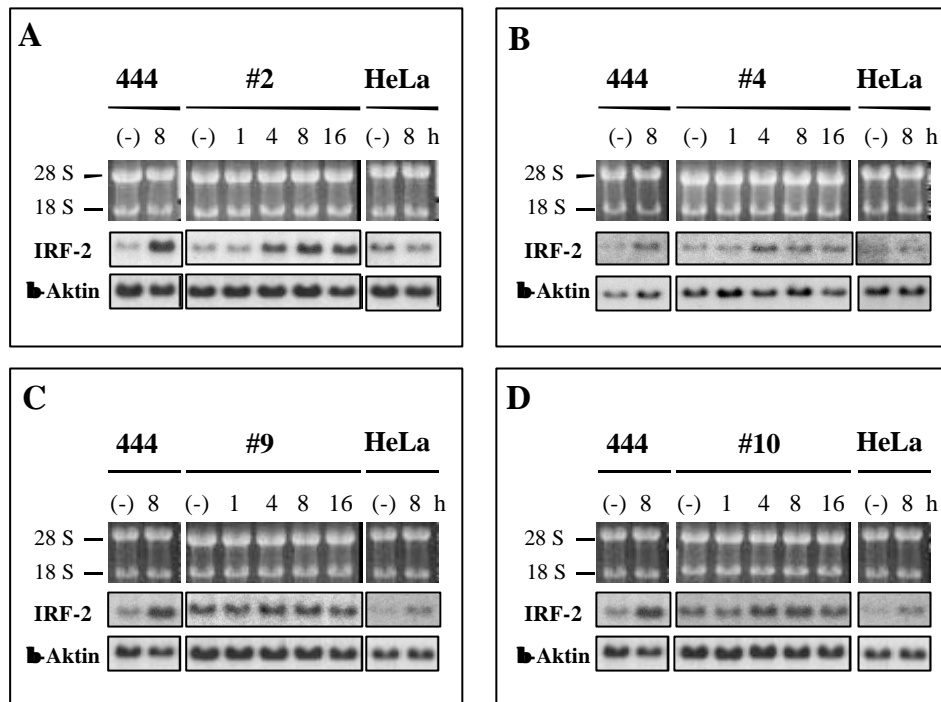


Abb. 4.33 Expression von IRF-2 in den HeLa-EMCV-Zellen.

Die Zellen wurden mit 10 µg/ml TNF-α behandelt und die RNA entsprechend den angegebenen Zeitpunkten isoliert. 5µg der Gesamt-RNA wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und mit spezifischen Gensonden hybridisiert. Die Aktinsonde wurde verwendet um gleiche RNA-Mengen in den verschiedenen Proben nachzuweisen.

A Klon #2, B Klon #4, C Klon #9, D Klon #10

Mit Hilfe der durchgeführten Experimente ließ sich zeigen, daß zwischen den isolierten Revertanten und den Wild-Typ HeLa-Zellen, deutliche Unterschiede bezüglich der Induktion der Transkription der IRF-Familienmitglieder bestanden. So war in einem Teil dieser Zellen eine deutlich stärkere Induktion der IRF-1 und p48 Expression (Abb. 4.31 und Abb. 4.32) sichtbar als in Wildtyp-HeLa-Zellen. Die Intensität erreichte sogar das Niveau der nicht-tumorigenen 444-Zellen.

4.4.5 Nachweis der HPV18 Expression

Die Ursprungszellen, aus denen die HeLa-Revertanten isoliert worden waren, exprimieren konstitutiv HPV18. Dies wurde auch für die Revertanten erwartet, da in HeLa-Wildtypzellen das Virus stabil ins Genom integriert vorliegt. In den vorhergehenden Versuchen hatten die Revertanten stets ein abweichendes Verhalten von den Wildtyp-Zellen gezeigt. Für einen Vergleich mit einer anderen Expressionsrate von HPV18, wurden in diesen Versuch 444-Zellen integriert, in denen TNF-α zur Repression der HPV-Expression führt (Rösl *et al.*, 1994). Dieser negative Einfluß auf die Transkription traf jedoch nicht für HeLa-EMCV-Zellen zu (Abb. 4.34). Die isolierten Klone zeigten eine konstitutive HPV18 Expression, die teilweise der Expression in

HeLa- und 444-Zellen gleichkam (#2, #9 und #10) oder die deutlich darüberlag, wie der Klon #4 demonstriert (Abb. 4.34 B).

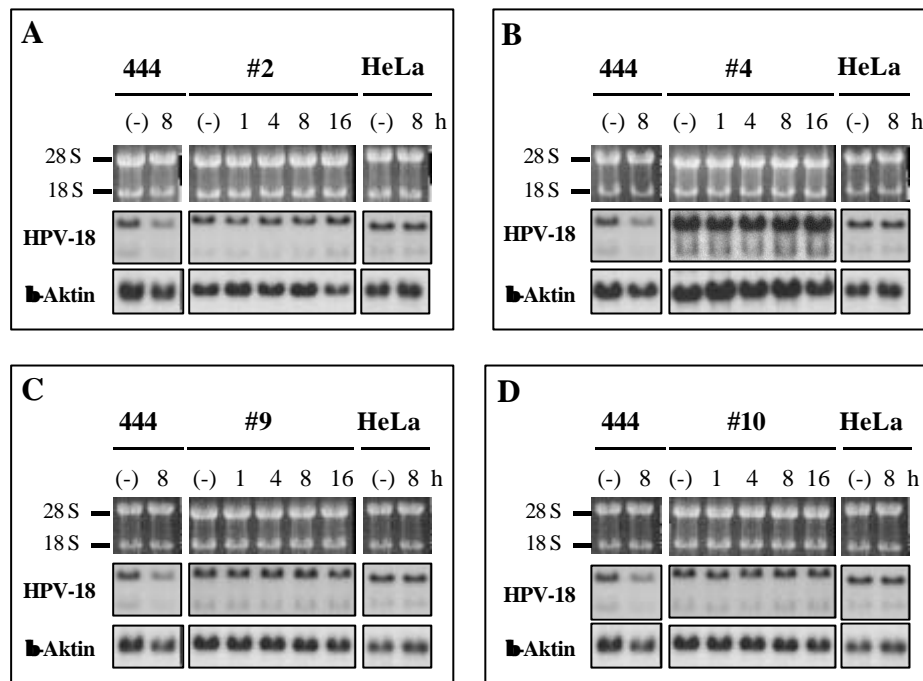


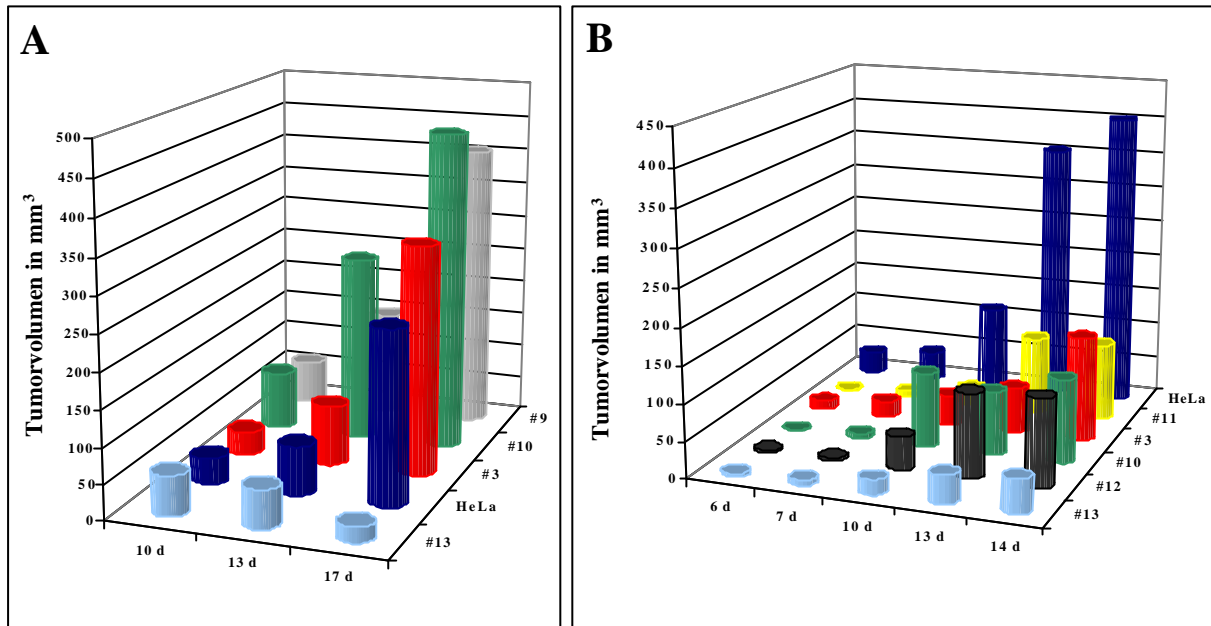
Abb. 4.34 Die Expression von HPV18 ist in den Revertanten nachweisbar.

5 µg der Gesamt-RNA wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Expression wurde durch die Verwendung von genspezifischen Sonden detektiert. Die Aktin-Sonde diente dem Nachweis gleicher RNA-Mengen in den unterschiedlichen Proben. A Klon #2, B Klon #4, C Klon #9, D Klon #10

Die vorgelegten Daten zeigen, daß in isolierten HeLa-EMCV-Zellen eine Expression von HPV-18 kontinuierlich stattfand und das die Expression nicht durch TNF- α reprimiert wurde, wie dies in nicht-tumorigenen 444-Zellen der Fall ist. Des weiteren wird deutlich, daß es sich bei den isolierten HeLa-EMCV-Zellen um HPV18 positive Zellen und nicht um unspezifische Kontaminationen der Wildtypkultur handelt.

4.4.6 Tumorigenitätsanalysen in der Nacktmaus

In den vorangegangenen Experimenten hatte ein Teil der Revertanten eine Induzierbarkeit von IRF-1 und p48 durch TNF- α gezeigt, die nicht-tumorigenen 444-Zellen entsprach (Abb. 4.31, Abb. 4.32 und Abb. 4.33). Nun galt es in einer Tumorigenitätsanalyse zu klären, ob die Reexpression dieser Transkriptionsfaktoren in den selektierten Klonen ein anderes Wachstumsverhalten zur Folge haben würde. Der Tumorigenitätstest wurde durch die Injektion von jeweils 1×10^6 Zellen/Flanke durchgeführt. Eine deutliche Wachstumsretardierung zeigte sich beim Vergleich der Wachstumskurven von HeLa-Wildtyp-Zellen mit den Klonen (Abb. 4.35). Am langsamsten wuchs Klon #13, der in Abb. 4.35 sogar einen Rückgang des Tumolvolumens anzeigt. Klon #9 (Abb. 4.35 A) und Klon #10 (Abb. 4.35 A und B) hingegen, demonstrierten ein schnelles Wachstum.



#Abb. 4.35 Tumorigenitätsanalyse der Revertanten in der Nacktmaus.

Für jeden Klon wurden 4 Mäuse eingesetzt, wobei in jede Flanke 1×10^6 injiziert wurden. Die Wildtyp-HeLa-Zellen wurden zum Vergleich der Wachstumskurven mit den Klonen mitgeführt. Die Darstellungen basieren auf den Mittelwerten der Messungen. A und B stellen zwei unabhängig voneinander durchgeführte Tumorigenitätstest dar.

5. DISKUSSION

5.1 IFN- β Expression und immunologische „escape“ Mechanismen: allgemeine Aspekte

Das Wachstum von Zellen wird über inter- und intrazelluläre Kontrollmechanismen reguliert. Hierbei spielen Zytokine wie TNF- α und Interferone eine wichtige Rolle. So reprimiert TNF- α nur in nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen die Expression des Virus und induziert gleichzeitig die Expression von MCP-1 („monocyte-chemotactic protein-1“) (Rösl *et al.*, 1994). In vivo ist dieses chemotaktische Zytokin für die Einwanderung von Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritischen Zellen und somit für die Abwehr und Erkennung prämaligener Zellen durch das Immunsystem verantwortlich. Eine weitere interessante Eigenschaft von TNF- α ist die Fähigkeit endogenes IFN- β zu induzieren. Dies ist einer der ersten und wichtigsten Reaktionen einer infizierten Zelle um sich gegen eine virale Infektion zur Wehr zu setzen. Neben antiviralen Eigenschaften verfügt IFN- β zusätzlich über antitumorale Fähigkeiten. So reprimiert IFN- β die Expression von Faktoren, wie zum Beispiel Matrix Metalloproteinasen (Gohji *et al.*, 1994), Interleukin 8 (Singh *et al.*, 1996) und dem Fibroblasten Wachstumsfaktor (Singh *et al.*, 1995), die für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren notwendig sind. Die Signaltransduktionswege von Zytokinen stellen somit ein wichtiges und äußerst effektives Ziel der viralen Onkogene dar, wenn das humane Papillomvirus der Wachstumskontrolle durch das Immunsystem entkommen will. Aus diesem Grund war es von Interesse, die Induktion des endogenen IFN- β Gens durch TNF- α näher zu analysieren. Als Modellsystem wurde zunächst die tumorogene HPV18 positive Zervixkarzinomzelllinie HeLa, nicht-tumorogene HeLa-Fibroblasten-Hybride (444-Zellen) und daraus resultierende tumorogene Segreganten (CGL3) verwendet (Stanbridge *et al.*, 1982). Gemeinsames Merkmal ist die stabile Integration von HPV18 ins Genom sowie die konstitutive Expression der Onkogene E6 und E7 (Schneider-Gädicke und Schwarz, 1986; Inagaki *et al.*, 1988) in Zellen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund.

Während all diese Zelllinien in der Lage waren auf exogen supplementiertes Interferon vom Typ I und Typ II mit der Induktion eines antiviralen Status zu reagieren (Abb. 4.2, Abb. 4.9 und Abb. 4.10) führte nur in nicht-tumorigenen 444-Zellen eine TNF- α Behandlung zur Induktion der IFN- β Transkription (Abb. 4.4 B).

5.2 Induktion des viralen Schutzes durch exogen supplementiertes Interferon

Humane Papillomviren sind potentielle DNA-Tumorigene, die eine Reihe von Strategien entwickelt haben, um den Kontrollmechanismen des Immunsystems zu entgehen. Eine der wichtigsten Strategien ist dabei die Beeinflussung der Kommunikation zwischen den infizierten Keratinozyten und den Zellen des Immunsystems. Einer dieser Kommunikationswege verläuft über Interferone. Alle getesteten Zelllinien (Abb. 4.2, Abb. 4.9 und Abb. 4.10) konnten mit exogen supplementiertem Interferon vom Typ I und Typ II vor einer viral induzierten Lyse geschützt werden, wodurch ein Einfluß der Onkogene E6/E7 auf die IFN-Signaltransduktion ausgeschlossen werden konnte. Dies ist jedoch in der Literatur beschrieben (siehe Abb. 5.1). So wurde für E6 von HPV18 in der humanen Fibrosarkomzelllinie HT1080 eine Interaktion mit Tyk2, eine Rezeptor-assoziierte Kinase vom Interferon Typ I Rezeptor (Li *et al.*, 1999), nachgewiesen. Durch die Überexpression von E7 in humanen, spontan immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) wurde eine Bindung an p48 gezeigt (Barnard und McMillan, 1999). In

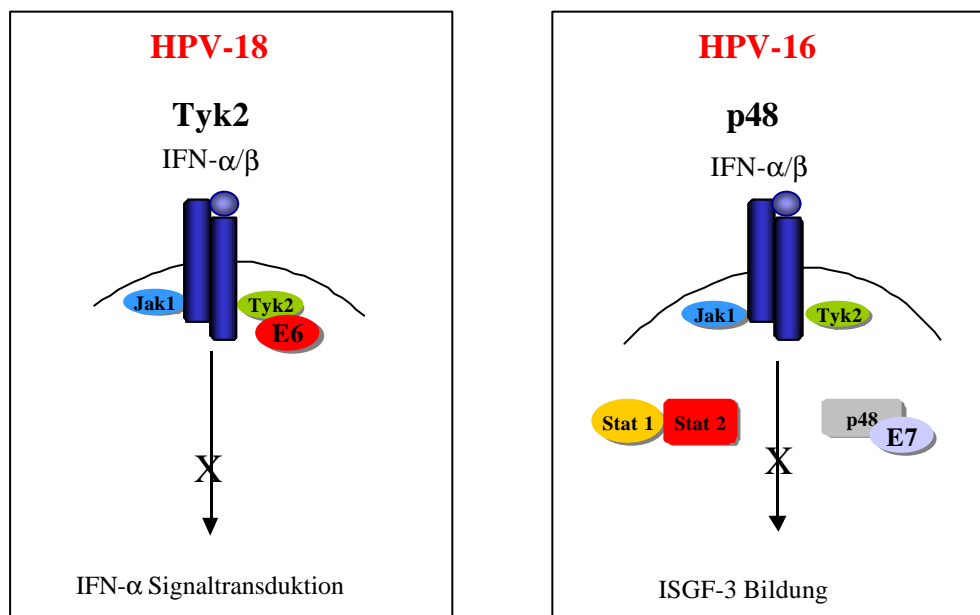


Abb. 5.1 Schematische Darstellung des Eingreifens der Onkogene E6 und E7 in die Typ I Interferonsignaltransduktion.

beiden Fällen kommt es zu einer Blockierung der IFN-induzierten Signaltransduktion. Diese Eingriffe von HPV in die Signaltransduktion finden an sehr früher Stelle statt, so daß davon auszugehen ist, daß sie zu einer Blockade des antiviralen Status führen würden. Dies wurde jedoch nicht beobachtet und somit warf sich die Frage nach der Ursache der unterschiedlichen Beobachtungen auf. Die in der Literatur publizierten Daten basieren im wesentlichen auf einer Überexpression von E7 in spontan immortalisierten Keratinozyten (HaCaT) (Barnard und McMillan, 1999) und von E6 in humanen Fibrosarcomzellen (Li *et al.*, 1999). Mögliche

Ursachen der Diskrepanz der Daten könnte die Tatsache sein, daß diese Zellen nicht natürlichen Zielzellen des humanen Papillomvirus entsprechen.

Minimale Unterschiede hinsichtlich der Protektion zeigten sich beim Vergleich der Typ I und Typ II Interferone. In der Regel zeigten die hier verwendeten Zellen eine höhere Protektion gegenüber Typ I IFN (Abb. 4.2, sowie 4.9 und 4.10), wobei IFN- β eine reproduzierbar höhere antivirale Aktivität entfaltetete, als IFN- α (vergleiche Abb. 4.2 A mit B). Letzteres entspricht im wesentlichen Daten klinischer Studien (Kim *et al.*, 2000; Koronmilas *et al.*, 2001).

5.3 Induktion von endogenem IFN- β

Virale Infektionen führen zur Induktion von IFN- α und IFN- β (Tanaka und Takaoka, 2001). Beide Interferone binden an denselben Rezeptor, wodurch eine Unterscheidung der induzierten Signaltransduktionswege nicht möglich ist. Die Verwendung von TNF- α hingegen erlaubt die selektive Induktion von endogenem IFN- β (Mestan *et al.*, 1986).

Im Gegensatz zur exogenen Zugabe von IFN, die alle Zellen vor viraler Lyse geschützt hatte (Abb. 4.2, Abb. 4.9 und Abb. 4.10), führte TNF- α nur in nicht-tumorigenen HeLa-Fibroblasten Hybriden zu einem Schutz der Zellen (Abb. 4.3). Diese Protektion war alleine auf die Induktion von endogenem IFN- β zurückzuführen (Abb. 4.4 B) und nicht auf IFN- α (Abb. 4.4 A). Auch eine direkte antivirale Aktivität von TNF- α konnte ausgeschlossen werden, da die Zellen im Neutralisationsassay trotz der Zugabe von IFN- α und IFN- β Antikörpern in die Lyse gingen. Humane A549-Zellen wurden für die Bestimmung der antiviralen Aktivität in den Überständen von TNF- α behandelten Zellen eingesetzt. TNF- α kann in diesen Zellen zu keiner Protektion führen (R.Zawatzky, persönliche Mitteilung) und dadurch ließ sich eine beobachtete antivirale Aktivität in den Überständen auf vorliegendes IFN zurückführen.

Die Transkriptionsanalyse des IFN- β Gens (Abb. 4.4 B) zeigte, daß der fehlende antivirale Schutz in tumorigenen Zellen auf einer fehlenden Induktion der Transkription basierte und nicht auf einer fehlenden Translation der korrespondierenden mRNA. Nach 4 Stunden lag die Transkription bereits im Maximum, jedoch war für die volle Induktion des antiviralen Schutzes diese Zeitspanne nicht ausreichend (Abb. 4.5).

Diese Daten belegen eine unterschiedliche Induzierbarkeit von endogenem IFN- β in tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen, die durch eine fehlende Induktion der Transkription verursacht wurde. Eine generell fehlende Induzierbarkeit eines antiviralen Schutzes durch Interferone kann ausgeschlossen werden, da die Zellen in vorhergehenden Analysen eine Induktion eines Schutzes durch exogen zugegebene Interferone gezeigt hatten (Abb. 4.2).

Die Gültigkeit dieser Beobachtung sollte durch die Verwendung von somatischen Zellhybriden aus SiHa- (HPV16), CaSki- (HPV16), SW756- (HPV18) und HeLa-Zellen (HPV18) unter Beweis gestellt werden (Abb. 4.6).

TNF- α entfaltete nur in CaSki x HeLa- (HPV 16; HPV18) und SiHa-Zellen (HPV16) eine Protektion, SiHa x HeLa (HPV16; HPV18), SW756 x HeLa (HPV18; HPV18), sowie CaSki (HPV16) und SW756 (HPV18) konnten keinen antiviralen Schutz aufbauen (Abb. 4.7). Diese Daten korrelieren mit der Induktion der IFN- β Transkription (Abb. 4.8), die sich nur in CaSki x HeLa Hybriden und SiHa-Zellen nachweisen ließ. Die Expression der IFN- β mRNA fiel in den SiHa-Zellen sehr schwach aus, aber diese geringe Menge war völlig ausreichend um 54 % der Zellen vor einer Viruslyse zu schützen.

Die Tumorigenität dieser Zellen und die Fähigkeit endogenes IFN- β durch TNF- α zu induzieren deuteten auf eine Korrelation hin. Nur nicht-tumorigene 444-Zellen und CaSki x HeLa Hybride zeigen diese Fähigkeit, wohingegen tumorigene HeLa-, CGL3-, SW756-, CaSki-Zellen und die SW756 x HeLa und SiHa x HeLa Hybride dazu nicht in der Lage waren. Eine Ausnahme bilden SiHa-Zellen, die mit 54 % der geschützten Zellen knapp innerhalb des Bereichs liegen, der es einem gerade so ermöglicht von einer Protektion zu sprechen. Laut WHO Angaben ist eine Unit Interferon als die Menge definiert, die in der Lage ist 50 % der ausgesäten Zellen vor einem Virus zu schützen.

Bei den somatischen Zellhybriden und den entsprechenden Ausgangszellen war nicht klar, ob sie sich durch exogen supplementiertes IFN würden schützen lassen, jedoch ergab die Analyse keine Abweichung von den zuvor im Stanbridge-System ermittelten Daten (Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Somit basierte auch in somatischen Zellhybriden die fehlende Protektion der Zellen durch TNF- α auf einer fehlenden Induktion von endogenem IFN- β und nicht auf einer mangelnden Induktion des antiviralen Status.

Diese Daten weisen auf eine Komplementation der Signaltransduktionwege in den somatischen Zellhybriden hin, die in tumorigenen HPV16 und HPV18 positiven Ursprungszellen defekt sind. Diese Komplementation zeigte sich nur in CaSki x HeLa Hybriden d.h. durch die Fusion einer HPV16 positiven Zelllinie mit einer HPV18 positiven Zelllinie. Sie fand nicht zwischen verschiedenen tumorigenen HPV18 positiven Zellen statt (Abb. 4.7 und 4.8). Dies spricht dafür, daß HPV16 und HPV18 an verschiedenen Stellen in den Signaltransduktionsweg, der zur Induktion des endogenen IFN- β durch TNF- α führt, eingreifen.

Ein wesentlicher Befund dieser Arbeit ist die Tatsache, daß in tumorigenen Zellen die IFN-Signaltransduktion, soweit sie die Induktion eines antiviralen Status betrifft, durch die Expression der viralen Onkogene, nicht beeinträchtigt ist. TNF- α ist ein wichtiges Zytokin mit immunmodulatorischen und wachstumshemmenden Fähigkeiten, die jedoch nur in nicht-

tumorigenen HPV positiven Keratinozyten funktionell sind (Rösl *et al.*, 1994; Majewski *et al.*, 1996). TNF- α reprimiert die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 und induziert die Expression von MCP-1 („monocyte-chemoattractant protein-1). Aus diesen Daten läßt sich folgendes Modell eines immunologischen „escape“ Mechanismus ableiten: MCP-1 bzw. Chemokine allgemein führen zur Einwanderung von mononukleären Zellen, dies ist ein erster Schritt bei viralen Infektionen (Rappolee *et al.*, 1992). Die aktivierten Makrophagen sezernieren TNF- α und Typ I Interferone. TNF- α führt in den infizierten Zellen zur Induktion von endogenem IFN- β und verstärkt dadurch die Zytokin-„response“ (Mestan *et al.*, 1986; Jacobsen *et al.*, 1989). Die Induktion von IFN- β stellt einen der ersten Schritte einer infizierten Zelle gegenüber Viren dar, der ohne Protein *de novo* Synthese auskommt (Goodbourn *et al.*, 2000; Guidotti und Chisari, 2000). Eine Induktion von IFN- α kann jedoch nur in Zellen stattfinden in denen das IFN- β Gen aktiviert werden kann (Erlandsson *et al.*, 1998), so daß die Bindung von IFN- β an seinen Rezeptor eine Grundvoraussetzung für die Induzierbarkeit der IFN- α Produktion darstellt. Dem zu Folge könnte der Verlust der TNF- α vermittelten MCP-1 und IFN- β Induzierbarkeit in tumorigenen Zellen, bei gleichzeitigem Verlust der negativ regulatorischen Effekte auf die E6 und E7 Expression, eine mögliche Erklärung für die beobachtete Abwesenheit von immunologischen Effektorzellen in dysplastischen Läsionen liefern (Tay *et al.*, 1987; Hughes *et al.*, 1988; Viac *et al.*, 1990; Spinello *et al.*, 1993; Riethdorf *et al.*, 1996). Somit könnte durch den Verlust der antiviralen „immediate-early response“ die Entstehung von Zervixkarzinomen gefördert werden.

Als Auslöser für die Wirkung von TNF- α auf nicht-tumorigene HPV positive Keratinozyten wird die Repression der viralen Onkogene E6 und E7 verantwortlich gemacht (Rösl *et al.*, 1994). Modifizierte nicht-tumorigene HeLa-Fibroblasten Hybride, die zusätzlich mit einer HPV18 E6/E7-Transkriptionskassette unter der Kontrolle eines β -Aktin-Promotors, stabil transfiziert waren, sollten zeigen ob die Repression der viralen Onkogene wirklich eine Rolle spielt. In diesen Transfektanten hat eine Zytokinbehandlung nur auf die endogene HPV18 Expression einen Einfluß. Das Konstrukt mit dem β -Aktin-Promotor wird nicht beeinflußt. Diese Zellen zeigten jedoch weder bei einer exogenen Supplementation von TNF- α , noch bei Interferonen eine andere Protektion, als 444-Zellen, so daß eine Korrelation zwischen der Repression der endogenen HPV Expression und der Wirkung der Zytokine nicht hergestellt werden konnte.

5.4 Signaltransduktion durch TNF- α und Induktion der IFN- β Transkription

Durch die Analyse der Proteine, die am IFN- β Promotor binden, sollten unterschiedlich regulierte Transkriptionsfaktoren, die für dieses Phänomen verantwortlich waren, identifiziert werden.

In unstimulierten Zellen ist keine IFN- β Expression nachweisbar. Die Induktion wird über positiv regulatorische Domänen (PRD) kontrolliert. Keine dieser Domänen ist alleine für eine effiziente Induktion der Transkription ausreichend, jedoch führt die synergistische Interaktion mehrerer PRDs zur Aktivierung des Gens (Kim und Maniatis, 1997). Die Sequenzen der verschiedenen PRDs werden durch die Transkriptionsfaktoren NF κ B, ATF-2/c-jun, sowie verschiedenen Mitgliedern der IFR-Proteinfamilie erkannt. Die Proteine binden kooperativ an die DNA-Sequenzen und bilden zusammen mit dem „high mobility group protein“ (HMGI (Y)), das für die Stabilität des ausgebildeten Komplexes verantwortlich ist, das sogenannte IFN- β „Enhanceosome“ (Thanos *et al.*, 1993; Maniatis *et al.*, 1998).

5.4.1 Die Transkriptionsfaktoren NF κ B und ATF-2/c-jun

NF κ B ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der seine Aktivität bei Abwehrmechanismen des Immunsystems und der Zellen entfaltet (Baeuerle und Henkel, 1994).

Eine Erkennungssequenz für NF κ B wurde in der PRD II des IFN- β Promotors identifiziert (Visvanathan und Goodbourn, 1989).

Die Behandlung der HPV18 positiven Zellen zeigte keine unterschiedliche Aktivierung und Bindung von NF κ B an die PRD II (Abb. 4.12). Somit konnte NF κ B als verantwortlicher Transkriptionsfaktor für die unterschiedliche Regulation der IFN- β Transkription ausgeschlossen werden.

Neben NF κ B spielt auch das Heterodimer ATF-2/c-jun für die Aktivierung eine wichtige Rolle. Die Bindung des Proteins an die PRD IV nur in nicht-tumorigenen Zellen, könnte somit zur Induktion des Gens führen und eine mögliche Erklärung liefern. Dies wurde jedoch nicht beobachtet, statt dessen zeigte das ATF-2/c-jun Dimer in tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen dieselbe Aktivierung durch TNF- α (Abb. 4.13). Die Verwendung von phosphorylierungsspezifischen Antikörpern für die „Supershifts“ änderten dieses Bild nicht. Somit konnte die unterschiedliche IFN- β Transkription nicht auf ATF-2/c-jun in den nicht-tumorigenen Zellen zurückgeführt werden.

5.4.2 Mitogenaktivierte Proteinkinasen

Die p38 MAPKinase ist für die Phosphorylierung von ATF-2 verantwortlich, zusätzlich sie auch an der Typ I IFN Signaltransduktion beteiligt (Goh *et al.*, 1999; Uddin *et al.*, 1999). Die Funktion der p38 MAPKinase bezüglich der Serinphosphorylierung von Stat1 bei der Signaltransduktion von IFN- α wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wird berichtet, sie sei für die Serinphosphorylierung essentiell (Goh *et al.*, 1999), auf der anderen Seite wird dies bestritten und statt dessen wird ihr eine wichtige Funktion bei der Aktivierung nachgeschalteter IFN- α stimulierter Gene zugeschrieben (Uddin *et al.*, 2000). Stat1 (siehe Abb. 1.4) bindet über Jak1 an den IFN-Rezeptor und wird direkt nach einer Ligandenbindung aktiviert (Domanski *et al.*, 1997). Über die Bildung von homodimeren oder heterodimeren Komplexen mit Stat2, jeweils in Kombination mit p48, ist es in der Lage die Transkription nachgeschalteter Gene zu aktivieren. Für Stat2 ist die Fähigkeit zur Homodimerisierung noch nicht nachgewiesen. Eine Beeinflussung von Stat1 durch die Inhibierung der p38 MAPKinase mit SB203580 würde sich somit in einer Veränderung der viralen Protektion durch exogen supplementiertes IFN äußern. Die Ergebnisse zeigen jedoch ein anderes Bild. In keiner Zelllinie konnte eine Abnahme des Schutzes durch den Einsatz von SB203580 nachgewiesen werden, wenn Interferone exogen supplementiert wurden (Abb. 4.15 B bis D und Abb. 4.16). Im Gegensatz dazu führte die Verwendung von SB203580 zu einer Aufhebung des Schutzes durch TNF- α (Abb. 4.15 A). Diese Daten lassen den Schluß zu, daß die p38 MAPKinase für die Induktion des antiviralen Statuses durch IFN keine Funktion hat, wohl aber bei der Induktion von endogenem IFN- β durch TNF- α .

5.4.3 Die IRF-Proteinfamilie

5.4.3.1 IRF-3 und IRF-7

Das als Aktivator agierende IRF-3 liegt in unstimulierten Zellen im Zytoplasma vor, die Translokation in den Zellkern erfolgt auf Grund einer viralen Infektion, die zu einer Serin-/Threonin-Phosphorylierung des Proteins führt (Yoneyama *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). Nach einer Komplexbildung mit CBP/p300 kommt es zur Aktivierung von IFN- α/β und einigen ISG (Juang *et al.*, 1998; Schaefer *et al.*, 1998; Yoneyama *et al.*, 1998; Noah *et al.*, 1999). Wie IRF-3 unterliegt auch IRF-7 einer viral induzierten Translokation in den Zellkern (Au *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998). Durch die Interaktion von HPV16 E6 wird die Translokation von IRF-3 in den Zellkern blockiert (Ronco *et al.*, 1999) und es kommt zu keiner Induktion von endogenem IFN. Diese Interaktion könnte auch Folgen für die beobachtete IFN- β Induktion haben, da IRF-3 für die richtige Orientierung des ATF-2/c-jun Komplexes im

Promotor verantwortlich ist (Falvo *et al.*, 2000). Für HPV18 wurde eine solche Interaktion nicht beobachtet (Abb. 4.18 B), da die Behandlung mit TNF- α in allen Zellen zu einer Akkumulation von IRF-3 im Zellkern führte. Auf transkriptioneller Ebene bestätigte sich für IRF-3 eine konstitutive Expression, die durch TNF- α nicht verstärkt wurde (Abb. 4.17 B). Interessanterweise zeigte IRF-3 im Kernextrakt bereits in den Kontrollen zwei Banden, wovon die obere möglicherweise die phosphorylierte und damit die transkriptionell aktive Form darstellt. Im Gegensatz dazu könnte die untere Bande eine repressorische Form des Proteins sein. TNF- α führte zu einem Verschwinden der unteren Bande, dies könnte ein Hinweis auf eine eventuelle Degradation sein. Die Phosphorylierung und die Translokation dieses Proteins ist bisher nur durch eine virale Infektion beschrieben (Yoneyama *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998). Ob es sich hier um eine Zytokin-induzierte Phosphorylierung handelt, könnte durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren nachgewiesen werden, da die phosphorylierte Form durch Proteasomen degradiert wird (Lin *et al.*, 1998; Ronco *et al.*, 1998).

Auch die Expressionsanalyse von IRF-7 lieferte keine Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation zwischen tumorigenen und nicht-tumorigenen HPV18 positiven Zellen (Abb. 4.17 A und Abb. 4.19). Die mRNA zeigte eine leichte Zunahme der Transkription durch TNF- α (Abb. 4.17 A), die sich aber nicht in einer Akkumulation des Proteins betätigten (Abb. 4.19). Eine Expression des Proteins konnte nur in zytoplasmatischen Extrakten nachgewiesen werden. Für die Translokation in den Zellkern fehlte die virale induzierte Phosphorylierung des Proteins (Au *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998).

Die Expressionsanalyse von IRF-3 und -7 hatten keine Hinweise auf eine unterschiedliche Expression dieser beiden Proteine geliefert, die eine mögliche Erklärung für die IFN- β Induktion in den nicht-tumorigenen Zellen hätten liefern können.

5.4.3.2 IRF-1 und p48

Für IRF-1 war bereits eine Funktion bei der Induktion der Transkription des IFN- β Gens durch Überexpression nachgewiesen worden (Fujita *et al.*, 1989; Harada *et al.*, 1990). Gleichzeitig hatte sich aber in IRF-1 „knock-out“ Mäusen gezeigt, daß es einen IRF-1 unabhängigen Weg zur Induktion der Interferone gibt und daß in diesem Fall die Funktionen des IRF-1 teilweise von p48 übernommen werden. Im humanen System lagen bisher noch keine Daten vor.

IRF-1 und p48 zeigten eine selektive Induktion durch TNF- α nur in nicht-tumorigenen 444-Zellen (Abb. 4.20). Die reduzierte oder fehlende Transkription in HeLa- und CGL3-Zellen spiegelte sich auch in der fehlenden Proteinexpression in Kernextrakten wider (Abb. 4.20 B und C). Die Induzierbarkeit dieser Transkriptionsfaktoren durch TNF- α zeigte eine Korrelation mit

der Induktion von endogenem IFN- β (Abb. 4.4 B). Die Expression von p48 deutete sich nach 4 Stunden an und war nach 8 Stunden vollständig aktiviert. Zu diesen beiden Zeitpunkten befand sich die IFN- β Transkription bereits in vollem Gange (Abb. 4.4 B) und in den Überständen von behandelten Zellen war eine antivirale Aktivität nachweisbar (Abb. 4.4 C). Diese Daten geben Grund zu der Annahme, daß die Induktion von p48 durch endogen induziertes IFN- β verursacht wurde, welches zu diesem Zeitpunkt bereits im Medium vorlag und somit an den Rezeptor binden und die IFN- β Signaltransduktion aktivieren könnte. IRF-1 hingegen lag bereits nach 1 Stunde im Zellkern vor (Abb. 4.20 B) und könnte dadurch maßgeblich an der Induktion von endogenem IFN- β in nicht-tumorigenen Zellen beteiligt sein. Ein weiteres Ergebnis, das IRF-1 eine entscheidende Funktion bei der Induktion von endogenem IFN- β zuweist, ist unter anderem die Tatsache, daß nach 30 min bereits NF κ B (Abb. 4.12) und ATF-2/c-jun (Abb. 4.13) an ihre entsprechenden Erkennungssequenzen im IFN- β Promotor gebunden vorlagen, zu einem Zeitpunkt zu dem auch IRF-1 (Abb. 4.20) induziert wurde. p48 hingegen wurde erst nach 4 Stunden induziert (Abb. 4. 20 C und D) d.h. zu einem Zeitpunkt an dem NF κ B und ATF-2/c-jun bereits eine verringerte Bindung zeigten. Eine entscheidende Rolle scheint der Position der IRF-Erkennungssequenz zuzukommen. Sie liegt zwischen der Bindestelle von NF κ B und ATF-2/c-jun. Durch die Bindung von IRF-1 könnte die synergistische Interaktion der PRDs untereinander, die für die Aktivierung der Transkription notwendig ist, zustande kommen. In diesem Zusammenhang scheint die Interaktion von NF κ B mit IRF-1 besonders wichtig zu sein, da gezeigt wurde daß diese beiden Faktoren zusammen in der Lage sind eine Beugung des Chromatins zu verursachen (Saura *et al.*, 1999), die eine Anlagerung der Transkriptionsmaschinerie ermöglichen würde. Zudem konnte an einem minimal IFN- β Promotor gezeigt werden, daß eine Interaktion von IRF-1 mit NF κ B für eine Induktion von endogenem IFN- β völlig ausreichend ist (Kirchhoff *et al.*, 1999). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, daß der Zusammenbau des „Enhanceosomes“ vollständig sein muss, die Anlagerung einzelner Proteine ist nicht ausreichend (Kim *et al.*, 1998). ATF-2/c-jun und NF κ B lagen zu denselben Zeitpunkten auch in tumorigenen Zellen vor, allerdings fehlte IRF-1. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals die wichtige Funktion von IRF-1 bei der Induktion von endogenem IFN- β durch TNF- α in nicht-tumorigenen HPV positiven Zellen.

Die fehlende Transkription von IRF-1 durch TNF- α in tumorigenen Zellen basiert offenkundig auf dem Unvermögen die IRF-1 Transkription durch dieses Zytokin zu aktivieren und nicht auf einem generellen Defekt der Induzierbarkeit dieses Transkriptionsfaktors. Die Behandlung mit Typ I und Typ II Interferonen hatte auch in tumorigenen Zellen die Induktion der Transkription zur Folge (Abb. 4.21) und zeigte somit, daß IRF-1 durch exogene Zugabe von IFN, unabhängig

vom tumorigenen Phänotyp, induziert werden kann. Dasselbe gilt für die Expression von p48 (Abb. 4.22).

Die Daten aus dem Stanbridge-System lieferten Anhaltspunkte auf eine Korrelation zwischen dem tumorigenen Phänotyp der HPV positiven Zellen, der Protektion, der Induktion von endogenem IFN- β und der Expression von IRF-1/p48. Diese Hinweise wurden in somatischen Zellhybriden, zwischen verschiedenen HPV-positiven Zervixkarzinomzelllinien bekräftigt. Nur Zellen, die zuvor eine Protektion durch TNF- α gezeigt hatten, SiHa- (Abb.4.7 B) und CaSki x HeLa-Zellen (Abb. 4.7 C) zeigten nun auch eine Induktion von IRF-1 (Abb. 4.25 B und C). Die Expression von p48 war nur in CaSki x HeLa (Abb. 4.26 C), CaSki (Abb. 4.26 C) und SiHa x HeLa (Abb. 4.26 B) nachzuweisen, wobei die letztgenannte Zelllinie eine sehr schwache Induktion anzeigte und in CaSki-Zellen ein erhöhtes Basalniveau der Transkription vorlag. Im Gegensatz dazu konnte in SiHa-Zellen eine p48 Expression nicht detektiert werden. Eine mögliche Ursache könnte in der geringen Menge des induzierten IFN in den SiHa-Zellen liegen, die für eine effiziente Aktivierung von p48 nicht ausreichend war oder die Grenze der Nachweismöglichkeit war in diesen Zellen erreicht.

Einer Inaktivierung von IRF-1 und p48 durch virale Onkogene ist beschrieben. E7 interagiert mit p48 und verhindert dadurch eine Integration in den Transkriptionskomplex ISGF3 und damit eine Translokation in den Zellkern und die Induktion der IFN-abhängige Signaltransduktion (Barnard *et al.*, 1999). Für eine solche Inhibierung von p48 gab es keine Hinweise, da das Protein eindeutig in Kernextrakten nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.20 D) und alle getesteten HPV positiven Zelllinien unabhängig vom tumorigenen Phänotyp in der Lage waren einen antiviralen Status durch IFN zu induzieren (Abb. 4.2, Abb. 4.9 und Abb. 4.10). Läge eine Inaktivierung von p48 vor, so hätte sich dies in Virusassays mit Interferonen gezeigt. E7 ist zudem in der Lage über die Rekrutierung einer Histondeacetylase die Expression von IRF-1 durch die Änderung der Chromatinstruktur negativ zu beeinflussen (Park *et al.*, 2000). Auch diese Beobachtung konnte nicht bestätigt werden, da eine Induktion der IRF-1 Transkription unabhängig vom tumorigenen Phänotyp durch Interferone, beobachtet wurde (Abb. 4.21).

5.4.3.3 IRF-2

Neben der Aktivierung durch verschiedene positive agierende Transkriptionsfaktoren, ist auch die Repression durch negativ regulatorische Faktoren bei der IFN- β Expression ein wichtiger Punkt. Im Fall der Aktivierung des endogenen IFN- β Promotors durch die Bindung von IRF-1 kommt seinem negativen Antagonisten IRF-2 möglicherweise eine entscheidende Funktion zu. Die Überexpression von IRF-1 führt zu einer Induktion von IFN- β und IFN-stimulierten Genen (Fujita *et al.*, 1989; Harada *et al.*, 1989), wohingegen IRF-2 reprimierend wirkt (Harada *et al.*,

1989). Die hauptsächliche Funktion von IRF-2 liegt in der antagonistischen Wirkung zu IRF-1. Die längere Halbwertszeit von IRF-2 (8h) führt es zu einer Akkumulation gegenüber IRF-1 (30 min). Dies hat vermutlich die Verdrängung von IRF-1 von der gemeinsamen Bindestelle und damit die Repression durch IRF-2 zur Folge (Wanatabe *et al.*, 1991). Auf Grund dieser Daten wurde angenommen, daß eine Überexpression von IRF-2 in tumorigenen Zellen für die Inaktivierung der IFN- β Induktion durch TNF- α verantwortlich sein könnte.

Die konstitutive IRF-2 Expression in allen Zellen sprach jedoch gegen einen solchen Mechanismus. Auch die TNF- α Inkubation führte in tumorigenen Zellen nicht zu einer erhöhten Expression (Abb. 4.23). In 444-Zellen kam es zu einer Induktion der IRF-2 Transkription und der Translation. Die Ursache hierfür liegt in der Zusammensetzung des IRF-2 Promotors. Neben Bindungsstellen für Sp1 und NF κ B liegt auch eine IRF-1 Erkennungssequenz vor (Harada *et al.*, 1994).

5.5 Molekulare Eigenschaften der HeLa-EMCV Klone

Die Isolierung der HeLa-EMCV Klone demonstriert, daß es mit dieser Selektionsmethode möglich ist aus einer Population tumorigener Zellen, selektiv diejenigen zu isolieren, die auf Grund der Zytokinbehandlung eine andere Genexpression zeigen als die meisten Zellen der Ausgangspopulation. Der Anteil dieser Zellen war gering ($3,5 \times 10^{-4}$) und ihre abweichende Expression wurde erst nach einer Isolierung und Expansion der Zellen deutlich. Eine weitere Besonderheit dieser Zellen war, daß sie in der Nacktmaus nur eine schwache Tumorigenität zeigten (Abb. 4.35). Dieses langsamere Wachstum basierte jedoch nicht auf einem persistierenden oder noch in den Zellen replizierendem Virus, da die Zellen eindeutig frei von endogenem Virus waren (Abb. 4.30). Auch eine fehlende HPV18 Expression war für das verlangsamte Wachstum der Zellen nicht verantwortlich, da eine konstitutive HPV18 Expression in den Klonen vorlag (Abb. 4.34). Diese Zellen stellen somit natürliche in der Gesamtpopulation von Zervixkarzinomzellen vorkommende seltene Revertanten dar.

Da diese Zellen über solch äußerst interessanten Eigenschaften verfügten stellte sich die Frage nach den molekularen Eigenschaften dieser Zellen. Entweder konnten sie isoliert werden, weil sie für das Virus nicht mehr permissiv waren oder sie waren in der Lage durch TNF- α einen Schutz aufzubauen und dieser Punkt sollte sich durch die Expressionsanalyse von IRF-1 und p48 beweisen lassen. Ein Teil der Klone demonstrierte tatsächlich eine Reexpression von IRF-1 (Abb. 4.31) und p48 (Abb. 4.32), wohingegen der Permissivitätstest zeigte, daß alle Zellen für das Virus permissiv waren (Abb. 4.28), wenn es auch Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen bezüglich der Lysezeitpunkte gab. Die Intensität der Transkription von IRF-1 und p48 orientierte sich dabei entweder an nicht-tumorigenen 444-Zellen (Abb. 4.31 B und Abb. 4.32 A

und B), war etwas schwächer ausgebildet als in 444-Zellen (Abb. 4.32 A) oder entsprach der Expression in tumorigenen HeLa-Zellen (Abb. 4.32 C und D, Abb. 4.32 C und D). Diese Analyse der IRF-2 Expression zeigte, daß nur die Zellen, die zuvor eine Induktion von IRF-1 gezeigt eine Zunahme der IRF-2 Expression anzeigten (Abb. 4.33 A und B).

Interessant ist die Korrelation von Wachstumsretardierung und Reexpression von IRF-1 in diesen Zellen, da IRF-1 über tumorsuppressive Eigenschaften verfügt. Zudem hatte die Analyse von IRF-1 und p48 in verschiedenen HPV16/18 positiven Zervixkarzinomzelllinien gezeigt, daß nur die nicht-tumorigenen Zellen durch TNF- α diese beiden Transkriptionsfaktoren induzieren konnten (Abb. 4.20, Abb. 4.25 und Abb. 4.26). Die Expression von IRF-1 in c-myb oder fosB transformierten Mausfibroblasten, führt zur Suppression des transformierten Phänotyps (Tanaka *et al.*, 1994). Zudem konnte c-Ha ras, welches sein onkogenes Potential nur in der Gegenwart eines zweiten Onkogens entfalten kann, in IRF-1 defizienten Zellen die Entstehung von Tumoren induzieren (Tanaka *et al.*, 1994). Neben dieser Eigenschaft hat es auch eine essentielle Funktion bei der Induktion der endogenen IFN- β Transkription durch TNF- α . Könnte in den Revertanten eine Reinduktion von IFN- β durch TNF- α gezeigt werden, bei gleichzeitiger Reexpression von IRF-1 und p48 wäre eindeutig belegt, daß die viralen Onkogene durch die Beeinflussung der TNF- α induzierten Signaltransduktion wichtige Kontrollmechanismen des Immunsystems negativ und damit die Tumorentstehung positiv beeinflussen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Bestimmte humane Papillomviren sind etiologisch an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß maligne HPV-positive Zellen ihre Fähigkeit zur Induktion von endogenem IFN- β nach TNF- α verloren haben. In nicht-malignen HPV-positiven Zellen hingegen war die IFN- β Transkription induzierbar. Durch Infektion mit Encephalomyocarditis Virus (EMCV) oder Vesicular Stomatitis Virus (VSV) wurde die Induzierbarkeit des endogenen IFN- β durch TNF- α in nicht-tumorigenen Zellen funktionell bestätigt. Interessanterweise zeigten alle malignen Zelllinien eine intakte IFN Signaltransduktion, die zum Schutz vor viraler Lyse führte, wenn Typ I oder Typ II Interferone exogen supplementiert wurden. Dies zeigt, daß in tumorigenen Zervixkarzinomzellen die Kommunikation zwischen TNF- α und IFN- β , aber nicht die Interferon-induzierte Signaltransduktion selbst gestört ist.

Die Transkriptionsfaktoren IRF-1 („interferon regulatory factor 1“) und p48 (ISGF3 γ) übten eine zentrale Funktion bei der Induktion von endogenem IFN- β und der anschließenden Signaltransduktion aus. Ihre Expression konnte nur in nicht-tumorigenen HPV positiven Zellen durch TNF- α induziert werden, wohingegen in tumorigenen Zellen dies nur eingeschränkt oder gar nicht möglich war. Beide Faktoren konnten in Zervixkarzinomzellen, die durch eine somatische Zellfusion zum nicht-tumorigenen Phänotyp komplementiert wurden, reinduziert werden. So komplementierte Zellen zeigten darüber hinaus auch eine vollständige Rekonstitution der Zytokin-vermittelten IFN- β Expression sowie der Fähigkeit einen antiviralen Status zu induzieren. Führt die Zellfusion nicht zur Tumorsuppression, wurden IRF-1, p48 und IFN- β durch TNF- α nicht induziert und eine antivirale Aktivität war nicht nachzuweisen.

Die funktionelle Deaktivierung der sogenannten „intermediate IFN-response“ scheint somit ein wichtiger Mechanismus innerhalb der HPV-induzierten Karzinogenese darzustellen, welcher es latent infizierten Zellen erleichtert der immunologischen Kontrolle zu entgehen.

7. LITERATUR

- Aebi, M., J. Fäh, N. Hurt, C. E. Samuel D. Thomis, L. Bazzigher, J. Pavlovic, O. Haller and P. Staehli** 1989. cDNA structures and regulation of two interferon-induced human Mx proteins. *Mol cell Biol* **9**: 5062-5072
- Agarwal C., J. R. Hembree, E. A. Rorke and R. L. Eckert** 1994. Interferon and retinoic acid suppress the growth of human papilloma virus type 16 immortalized cervical epithelial cells, but only interferon suppresses the level of the human papilloma virus transforming oncogenes. *Cancer Research* **54**: 2108-2112
- Alcami A. and G. L. Smith** 1995. Vaccinia, cowpox and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J Virol* **69**: 4633-4639
- Arany, I., P. Rady, and S. K. Tyring** 1994. Interferon treatment enhances the expression of underphosphorylated (biologically-active) retinoblastoma protein in human papilloma virus- infected cells through the inhibitory TGF beta 1/IFN beta cytokine pathway *Antiviral Res.* **23**:131-41.
- Arany, I., A. Goel, and S. K. Tyring** 1995. Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions *Anticancer Res.* **15**:2865-9.
- Arnheim N. and H. Erlich** 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem* **61**: 131-156
- Au, W. C., P. A. Moore, W. Lowther, Y. T. Juang, and P. M. Pitha** 1995. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:11657-61.
- Au, W. C., P. A. Moore, D. W. LaFleur, B. Tombal, and P. M. Pitha** 1998. Characterization of the interferon regulatory factor-7 and its potential role in the transcription activation of interferon A genes *J Biol Chem.* **273**:29210-7.
- Baeuerle P. A.** 1991. The inducible transcription factor NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* **1072**: 63-80
- Bagchi, S., P. Raychaudhuri and J. R. Nevins** 1990. Adenovirus E1A proteins can dissociate heterotrimeric complexes involving E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation *Cell* **62**: 659-669
- Baker C. C., W. C. Phelps, V. Lindgren, M. J. Braun, M. A. Gonda and P. M. Howley** 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* **61**: 1-12
- Bandara, L. R., J. P. Adamczewski, T. Hunt, and N. B. La Thangue** 1991. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor *Nature.* **352**:249-51.
- Barnard, P., and N. A. McMillan** 1999. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha *Virology.* **259**:305-13.
- Barnard, P., E. Payne, and N. A. McMillan** 2000. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha *Virology.* **277**:411-9.
- Bartholomew, J. S., S. Glenville, S. Sarkar, D. J. Burt, M. A. Stanley, F. Ruiz-Cabello, J. Chengang, F. Garrido, and P. L. Stern** 1997. Integration of high-risk human papillomavirus DNA is linked to the down-regulation of class I human leukocyte antigens by steroid hormones in cervical tumor cells *Cancer Res.* **57**:937-42.
- Beaudenon, S., F. Praetorius, D. Kremsdorf, M. Lutzner, N. Worsaae, G. Pehau-Arnaudet, and G. Orth** 1987. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia *J Invest Dermatol.* **88**:130-5.
- Beg A. A. and A. S. Baldwin** 1993. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* **7**: 2064-2070
- Biron, C. A.** 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN- alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections *Semin Immunol.* **10**:383-90.
- Biron, C. A., L. P. Cousens, M. C. Ruzek, H. C. Su, and T. P. Salazar-Mather** 1998. Early cytokine responses to viral infections and their roles in shaping endogenous cellular immunity *Adv Exp Med Biol.* **452**:143-9.
- Birnboim, H.C. and J. Doly** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* **7**: 1513-1523
- Bjerrum O. J. and C. Schafer-Nielson** 1986. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with horizontal apparatus. In: *Elektrophoresis* Dunn. M. J. (Hrsg.) VCH-Verlag Weinheim, S 315-327
- Blyssen A. R., J. E. Durbin, and D. E. Levy** 1996 ISGF3γ p48, a specificity switch for interferon activated transcription factors. *Cytokine Growth Factors Rev* **7**: 11-17
- Borden, E. C., D. Lindner, R. Dreicer, M. Hussein, and D. Peereboom** 2000. Second-generation interferons for cancer: clinical targets *Semin Cancer Biol.* **10**:125-44.
- Bosch, F. X. E. Schwarz, P. Boukamp, N. E. Fusenig, D. Bartsch and H. zur Hausen** 1990. Suppression *in vivo* of human papillomavirus type 18 E6-E7 gene expression in non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrid cells. *J Virol* **64**: 4743-4754
- Bosch, F. X., M. Durst, E. Schwarz, P. Boukamp, N. E. Fusenig, and H. zur Hausen** 1991. The early genes E6 and E7 of cancer associated human papilloma viruses as targets of tumor suppression? *Behring Inst Mitt*:108-21.

- Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A.M Jansen, J.Peto, M.H. Schiffmann, V. Moreno, R. Kurman and K.V. Shah** 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.*
- Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, A. Kleinheinz, W. Scheurlen, and H. zur Hausen** 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer *Embo J.* **3**:1151-7.
- Bovolenta, C., P. H. Driggers, M. S. Marks, J. A. Medin, A. D. Politis, S. N. Vogel, D. E. Levy, K. Sakaguchi, E. Appella, J. E. Coligan, and et al.** 1994. Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:5046-50.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Briscoe, J., D. Guschin, N. C. Rogers, D. Watling, M. Muller, F. Horn, P. Heinrich, G. R. Stark, and I. M. Kerr** 1996. JAKs, STATs and signal transduction in response to the interferons and other cytokines *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **351**:167-71.
- Burysek, L., and P. M. Pitha** 2001. Latently expressed human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor 2 inhibits double-stranded RNA-activated protein kinase *J Virol.* **75**:2345-52.
- Burysek, L., W. S. Yeow, B. Lubyova, M. Kellum, S. L. Schafer, Y. Q. Huang, and P. M. Pitha** 1999. Functional analysis of human herpesvirus 8-encoded viral interferon regulatory factor 1 and its association with cellular interferon regulatory factors and p300 *J Virol.* **73**:7334-42.
- Burysek, L., W. S. Yeow, and P. M. Pitha** 1999. Unique properties of a second human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor (vIRF-2) *J Hum Virol.* **2**:19-32.
- Byrne M. A., B. R. Moller, D. TaylorRobinson, J. R. Harris, C. Eickenden, A. D. Malcolm. M. C. Anderson and D. V. Coleman** 1986. The effect of interfeon on human papillomaviruses associated eith cervical intreprethelial neoplasias. *B. J Obstet Gynaecol* **93**: 1136-1144
- Cayley, P. J., J. A. Davies, K. G. McCullagh, and I. M. Kerr** 1984. Activation of the ppp(A2'p)nA system in interferon-treated, herpes simplex virus-infected cells and evidence for novel inhibitors of the ppp(A2'p)nA-dependent RNase *Eur J Biochem.* **143**:165-74.
- Chiang, C. M., T. R. Broker, and L. T. Chow** 1992. Properties of bovine papillomavirus E1 mutants *Virology.* **191**:964-7.
- Chiang, C. M., G. Dong, T. R. Broker, and L. T. Chow** 1992. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins *J Virol.* **66**:5224-31.
- Chiang, C. M., M. Ustav, A. Stenlund, T. F. Ho, T. R. Broker, and L. T. Chow** 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:5799-803.
- Chen, E.Y., P.M. Hpwley, A.D. Levinson and P.H. Seeburg** 1982. The primary structure and genetic organisation of the bovine papilloma virus type 1 genome. *Nature* **299**: 259-234
- Chen F. E., S. Kempiak, D. B. Huang, C. Phelps and G. Gosh** 1999. Construction, expression, purification and functional analysis of recombinant NFkappaB p50/p65 heterodimer. *Protein Eng* **12**: 423-428
- Colamonici, O., H. Yan, P. Domanski, R. Handa, D. Smalley, J. Mullersman, K. Krishnan and J. Krolewski** 1994. Direct binding and tyrosine phosphorylation of the α -subunit of the type I IFN receptor by the p135^{tyk2} tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* **14**: 8133-8142
- Cole, S. T., and R. E. Streeck** 1986. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 33, which is associated with cervical cancer *J Virol.* **58**:991-5.
- Colotta, F., A. Borre, J. M. Wang, M. Tattaneli, F. Maddalena, N. Polentarutti, G. Peri, and A. Mantovani** 1992. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes *J Immunol.* **148**:760-5.
- Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid, 3rd, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek** 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**:3745-53.
- Danos, O., M. Katinka, and M. Yaniv** 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae *Embo J.* **1**:231-6.
- Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr, and G. R. Stark** 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins *Science.* **264**:1415-21.
- Del Vecchio A.M., H. Romanczuk , H. Howley and C.C. Baker** 1992. Transient replication of human papillomavirus. *J. Virol.* **66**: 5949-5958
- de Villiers, E. M., L. Gissmann, and H. zur Hausen** 1981. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts *J Virol.* **40**:932-5.
- de Villiers, E. M., H. Weidauer, H. Otto and H. zur Hausen** 1985. Papilliomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int. J. Cancer* **36**: 575-578
- de Villiers, E. M.** 1994. Human patogenic papillomavirus types: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**: 1-12

- Domanski, P., H. Yan, M. M. Witte, J. Krolewski, and O. R. Colamonici** 1995. Homodimerization and intermolecular tyrosine phosphorylation of the Tyk-2 tyrosine kinase *FEBS Lett.* **374**:317-22.
- Domanski, P., E. Fish, O. W. Nadeau, M. Witte, L. C. Platanius, H. Yan, J. Krolewski, P. Pitha, and O. R. Colamonici** 1997. A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak- Stat pathway and induce an antiviral state *J Biol Chem.* **272**:26388-93.
- Driggers, P. H., D. L. Ennist, S. L. Gleason, W. H. Mak, M. S. Marks, B. Z. Levi, J. R. Flanagan, E. Appella, and K. Ozato** 1990. An interferon gamma-regulated protein that binds the interferon- inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:3743-7.
- Du W., D.Thanos and T. Maniatis** 1993. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* **74**: 887-98
- Durst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, and H. zur Hausen** 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**:3812-5.
- Durst, M., A. Kleinheinz, M. Hotz, and L. Gissman** 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours *J Gen Virol.* **66**:1515-22.
- Durst, M., F.X. Bosch, D. Glitz, A. Schneider and H. zur Hausen** 1991. Inverse relationship between HPV16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV positive human cell lines. *J. Virol.* **65**: 796-804
- Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow** 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product *Science.* **243**:934-7.
- Eisenbeis, C. F., H. Singh, and U. Storb** 1995. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator *Genes Dev.* **9**:1377-87.
- Eklund, E. A., A. Jalava, and R. Kakar** 1998. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence- binding protein cooperate to increase gp91(phox) expression *J Biol Chem.* **273**:13957-65.
- Erlandsson, L., R. Blumenthal, M. L. Eloranta, H. Engel, G. Alm, S. Weiss and T. Leanderson** 1998. Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curren Biology* **8**: 223-226
- Favre, M., G. Orth, O. Croissant, and M. Yaniv** 1975. Human papillomavirus DNA: physical map *Proc Natl Acad Sci U S A.* **72**:4810-4.
- Favre, M., G. Orth, O. Croissant, and M. Yaniv** 1977. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity *J Virol.* **21**:1210-4.
- Feinberg A. P. and B. Vogelstein** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biol* **132**: 6-13
- Finch, J. T., and A. Klug** 1965. The structure of viruses of the papilloma-polyoma type 3. Structure of rabbit papilloma virus, with an appendix on the topography of contrast in negative-staining for electron-microscopy *J Mol Biol.* **13**:1-12.
- Finzer, P., U. Soto, A. Patzelt, J.F. Coy, A. Poustka, H. zur Hausen and F. Rosl** 2000. Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition *Oncogene* **19**: 3235-3244
- Flohr, F., S. Schneider-Schaulies, O. Haller, and G. Kochs** 1999. The central interactive region of human MxA GTPase is involved in GTPase activation and interaction with viral target structures *FEBS Lett.* **463**:24-8.
- Frese, M., G. Kochs, U. Meier-Dieter, J. Siebler and O. Haller** 1995. Inhibition of bunyaviruses, pheboviruses and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol* **70**: 915-923
- Freedman RS, J. M. Bowen, A. Leibovitz , S. Pathak, M. J. Siciliano, H. S.Gallager and B. C. Giovanella** 1982. Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix: *In Vitro* **18**: 719-26
- Friedman R. S. and G. R. Stark** 1985 Alpha-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences *Nature* **314**: 637-639
- Fritsche, M., C. Haessler, and G. Brandner** 1993. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents *Oncogene.* **8**:307-18.
- Fu, X. Y., D. S. Kessler, S. A. Veals, D. E. Levy, and J. E. Darnell, Jr.** 1990. ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:8555-9.
- Fujita, T., L. F. Reis, N. Watanabe, Y. Kimura, T. Taniguchi, and J. Vilcek** 1989. Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:9936-40.
- Fujita, T., J. Sakakibara, Y. Sudo, M. Miyamoto, Y. Kimura, and T. Taniguchi** 1988. Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements *Embo J.* **7**:3397-405.

- Gauzzi, M. C., L. Velazquez, R. McKendry, K. E. Mogensen, M. Fellous, and S. Pellegrini** 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase *J Biol Chem*. **271**:20494-500.
- Gissmann, L., E. M. deVilliers, and H. zur Hausen** 1982. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA *Int J Cancer*. **29**:143-6.
- Gissmann, L., V. Diehl, H. J. Schultz-Coulon, and H. zur Hausen** 1982. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma *J Virol*. **44**:393-400.
- Gissmann, L., L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldovsky, H. G. Schnurch, and H. zur Hausen** 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**:560-3.
- Gissmann, L., M. Boshart, M. Durst, H. Ikenberg, D. Wagner, and H. zur Hausen** 1984. Presence of human papillomavirus in genital tumors *J Invest Dermatol*. **83**:26s-28s.
- Goh, K. C. S. J. Haque and B. R. Williams** 1999. p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *Embo J* **18**: 5601-5608
- Gohji K., I. J. Fiddler, R. Tsan, R. Radinsky, A. C. Eschenbach, T. Tsuruo and M. Nakjima** 1994. Human recombinant interferon-beta and -gamma decrease gelatinase production and invasion by human KG-2 renal carcinoma cells. *Int J Cancer* **58**: 289-295
- Goldsborough, M. D., D. DiSilvestre, G. F. Temple, and A. T. Lorincz** 1989. Nucleotide sequence of human papillomavirus type 31: a cervical neoplasia-associated virus *Virology*. **171**:306-11.
- Goodbourn S., K. Zinn and T. Maniatis** 1985. Human β -interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element. *Cell* **41**: 509-520
- Goodbourn S., H. Burstein and T. Maniatis** 1986. The human β -interferon gene enhancer is under negative control. *Cell* **45**: 601-610
- Goodbourn D. W. and T. Maniatis** 1988. Overlapping positive and negative regulators domains of the human β -interferon gene. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 1447-1451
- Goodbourn S., L. Dickcock and R. E. Randell** 2000 Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**: 2341-2364
- Goodrich, D. W., and W. H. Lee** 1993. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene *Biochim Biophys Acta*. **1155**:43-61.
- Greenlund, A. C., M. A. Farrer, B. L. Viviano and R. D. Schreiber** 1994. Ligand-induced IFN-gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* **13**: 1591-1600
- Greenlund, A. C., M. O. Morales, B. L. Viviano, H. Yan, J. Krolewski and R. D. Schreiber** 1995. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* **2**: 677-687
- Guidotti, L. G., and F. V. Chisari** 2000. Cytokine-mediated control of viral infections *Virology*. **273**:221-7.
- Gunnery, S., A. P. Rice, H. D. Robertson, and M. B. Mathews** 1990. Tat-responsive region RNA of human immunodeficiency virus 1 can prevent activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**:8687-91.
- Harada, H., T. Fujita, M. Miyamoto, Y. Kimura, M. Maruyama, A. Furia, T. Miyata, and T. Taniguchi** 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes *Cell*. **58**:729-39.
- Harada, H., K. Willison, J. Sakakibara, M. Miyamoto, T. Fujita, and T. Taniguchi** 1990. Absence of the type I IFN system in EC cells: transcriptional activator (IRF-1) and repressor (IRF-2) genes are developmentally regulated *Cell*. **63**:303-12.
- Harada, H., M. Kitagawa, N. Tanaka, H. Yamamoto, K. Harada, M. Ishihara, and T. Taniguchi** 1993. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2 *Science*. **259**:971-4.
- Harada, H., E. Takahashi, S. Itoh, K. Harada, T. A. Hori, and T. Taniguchi** 1994. Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system *Mol Cell Biol*. **14**:1500-9.
- Hawley-Nelson P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy and J. T. Schiller** 1989. HPV E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes *EMBO J*. **8**: 3905-3910
- Heck, D. V., C. L. Yee, P. M. Howley, and K. Munger** 1992. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**:4442-6.
- Hefti, H. P., M. Frese, H. Landis, C. Di Paolo, A. Aguzzi, O. Haller, and J. Pavlovic** 1999. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections *J Virol*. **73**:6984-91.
- Heim, M. H., I. M. Kerr, G. R. Stark, and J. E. Darnell, Jr.** 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway *Science*. **267**:1347-9.
- Heybroeck C., S. Balachandran, M. J. Sevant, C. DeLuca, G. M. Barber, R. Lin and J. Hiscott** 2000. The IRF-3 transcription factor mediates Sendai Virus-induced apoptosis *J Virol* **74** 3781-3792

- Hovanessian, A. G., and J. Galabru** 1987. The double-stranded RNA-dependent protein kinase is also activated by heparin *Eur J Biochem.* **167**:467-73.
- Hovanessian, A. G., A. G. Laurent, J. Chebath, J. Galabru, N. Robert, and J. Svab** 1987. Identification of 69-kd and 100-kd forms of 2-5A synthetase in interferon-treated human cells by specific monoclonal antibodies *Embo J.* **6**:1273-80.
- Howley, P. M., K. Munger, B. A. Werness, W. C. Phelps, and R. Schlegel** 1989. Molecular mechanisms of transformation by the human papillomaviruses *Princess Takamatsu Symp.* **20**:199-206.
- Hu, G., W. Liu, E. G. Hanania, S. Fuchs, T. Wang and A. B. Deissenroth** 1995. Suppression of tumorigenesis by transcription units expressing the antisense E6 and E7 messenger RNA (mRNA) für the transforming proteins of the human papilloma virus and the sense mRNA for the retinoblastoma gene in cervical carcinoma cells *Cancer Gene Ther* **2**: 19-32
- Hughes, T. K., T. A. Kaspar, and D. H. Coppenhaver** 1988. Synergy of antiviral actions of TNF and IFN-gamma: evidence for a major role of TNF-induced IFN-beta *Antiviral Res.* **10**:1-9.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley** 1993. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53 *Mol Cell Biol.* **13**:775-84.
- Igarashi, K., M. David, A. C. Larner and D. S. Finbloom** 1993. In vitro activation of a transcription factor by gamma interferon requires a membrane-associated tyrosine kinase and is mimicked by vanadate hybrids *Mol Cell Biol* **13**: 3984-3989
- Inagaki Y., Y. Tsunokawa, N. Takebe, H. Nawa, S. Nakanishi, M. Terada and T. Sugimura** 1988. Nucleotide sequences of cDNAs for human papillomavirus type 18 transcripts in HeLa cells. *J Virol* **62**: 1640-1646
- Isaacs A and JK. Lindenmann** 1957 Virus interference. 1.The interferon. *Proc R Soc Lond [Biol]* **147**: 258-267
- Ish-Horowicz D. and J. F. Burke** 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acid Res* **9**: 2989-2998
- Inaba, Y., K. Egawa, K. Yoshimura, and T. Ono** 1993. Demonstration of human papillomavirus type 1 DNA in a wart with bowenoid histologic changes *Am J Dermatopathol.* **15**:172-5.
- Iwase, S., Y. Furukawa, J. Kikuchi, S. Saito, M. Nakamura, R. Nakayama, J. Horiguchi-Yamada, and H. Yamada** 1999. Defective binding of IRFs to the initiator element of interleukin-1beta- converting enzyme (ICE) promoter in an interferon-resistant Daudi subline *FEBS Lett.* **450**:263-7.
- Jablonska, S., T. P. Chorzelski, M. Jarzabek-Chorzelska, and E. H. Beutner** 1975. Studies in immunodermatology. VII. Four-compartment system studies of IgG in stratum corneum and of stratum corneum antigen in biopsies of psoriasis and control dermatoses *Int Arch Allergy Appl Immunol.* **48**:324-40.
- Jablonska, S., S. Obalek, M. Favre, A. Golebiowska, O. Crossant, and G. Orth** 1987 The morphology of butcher's warts as related to papilomavirus types *Arch. Dermatol. Res* **279**: 66-72
- Jablonska, S., and S. Majewski** 1994. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects *Curr Top Microbiol Immunol.* **186**:157-75.
- Jacobsen H., J. Mestan, S. Mittnacht and C. W. Dieffenbach** 1989. Beta interferon subtype 1 induction by tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* **9**:3037-3042
- Jeon, S., and P. F. Lambert** 1995. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:1654-8.
- Jian Y., D. I. Beller, G. Frandl and D. T. Graves** 1992 Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol.* **184**: 2423-2428
- Juang, Y., W. Lowther, M. Kellum, W. C. Au, R. Lin, J. Hiscott, and P. M. Pitha** 1998. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3 *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:9837-42.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, J. Y. Lau, and Y. J. Liu** 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity *J Exp Med.* **192**:219-26.
- Kahn, T., E. Schwarz, and H. zur Hausen** 1986. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma *Int J Cancer.* **37**:61-5.
- Kanerva, M., K. Melen, A. Vaheri and I. Julkunen** 1996. Inhibition of üpüumala and tula hantaviruses in Vero cells by MxA protein. *Virology* **224**: 55-62
- Kalvakolanu, D. V., and E. C. Borden** 1996. An overview of the interferon system: signal transduction and mechanisms of action *Cancer Invest.* **14**:25-53.
78.
- Kardamakis, D.** 1991. Interferons in the treatment of malignancies *In Vivo.* **5**:589-97.
- Karin M.** 1995 The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**: 16483-6
- Karin M., Z. Liu and E. Zandi** 1997. Ap-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240-246
- Kawakami, T., M. Matsumoto, M. Sato, H. Harada, T. Taniguchi, and M. Kitagawa** 1995. Possible involvement of the transcription factor ISGF3 gamma in virus- induced expression of the IFN-beta gene *FEBS Lett.* **358**:225-9.
- Kerr, I. M., and R. E. Brown** 1978. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* **75**:256-60.

- Kim T. K. and T. Maniatis** 1997. The mechanism of transcriptional synergy of an in-vitro assembled interferon- β enhanceosome. *Molecular Cell* **1**: 119-129
- Kim T. K., T. H. Kim and T. Maniatis** 1998. Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA Polymerase I holoenzyme by an interferon-beta enhanceosome in vitro. *Proc Natl Sci USA* **95**: 12191-12196
- Kim, K. Y., L. Blatt and M. W. Taylor** 2000 The Effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes.
- Kirchhoff S., D. Wilhelm, P. Angel and H. Hauser** 1999. NFkappaB activation is required for interferon regulatory factor-1-mediated interferon beta induction. *Eur J Biochem* **261**: 546-554
- Kleine-Lowinski, K., R. Gillitzer, R. Kuhne-Heid, and F. Rosl** 1999. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas *Int J Cancer*. **82**:6-11. *J General Virol* **81**: 695-700
- Koi, M., H. Morita, H. Yamada, H. Satoh, J. C. Barrett, and M. Oshimura** 1989. Normal human chromosome 11 suppresses tumorigenicity of human cervical tumor cell line SiHa *Mol Carcinog*. **2**:12-21.
- Koronmila A. E., S. Li and G. Matlashewski** 2001. Control of interferon signalin in human papillomavirus infection. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 157-170
- Krusic, J., V. Kirhmajer, M. Knezevic, D. Ikić, Z. Maricic, B. Rode, D. Jusic, and E. Soos** 1981. Influence of human leukocyte interferon on squamous cell carcinoma of uterine cervix: clinical, histological, and histochemical observations. III. Communication *J Cancer Res Clin Oncol*. **101**:309-15.
- Khyse- andersen J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209
- Laimins L.A.** 1996 Human papillomaviruses target differentiating epithelium for virion production and malignant conversion. *Semin Virol* **7**:305-313
- La Thangue, N. B.** 1994 DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control *Curr Opin Cell Biol* **6**: 443-450
- Lawyer F. C., S. Stoffel, R. Saiki, K. Myambo, R. Drummond and D. H. Gelfand** 1989. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem* **264**: 6427-6437
- Leonard, G. T. and G. C. Sen** 1996. Effects of adenovirus E1A protein on interferon signaling *Virology* **224**: 25-33
- Leppa S. and D. Bohmann** 1999. Diverse functions of JNK signaling and c-jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* **18**: 6158-6162
- Levy, D. E., D. S. Kessler, R. Pine, N. Reich, and J. E. Darnell, Jr.** 1988. Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control *Genes Dev*. **2**:383-93.
- Levy, D., and J. E. Darnell, Jr.** 1990. Interferon-dependent transcriptional activation: signal transduction without second messenger involvement? *New Biol*. **2**:923-8.
- Levy, D. E.** 1998. Analysis of interferon-regulated proteins binding the interferon-alpha-stimulated response element *Methods*. **15**:167-74.
- Li S., S. Labrecque, M. C. Gauzzi, A. R. Cuddihy, A. H. T. Wong, S. Pellegrini, G. J. Matlashewski and A. E. Koronmilas.** 1999. The human papillomavirus (HPV) -18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- α . *Oncogene* **18**: 5727-5737
- Lin R., C. Heylbroeck, P. M. Pitha and J. Hiscott** 1998. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**: 2986-2996
- Liou H. C. and D. Baltimore** 1993. Regulation of the NF-kappa B/Rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin cell Biol* **5**: 477-487
- Loh, J. E., C. H. Chang, W. L. Fodor, and R. A. Flavell** 1992. Dissection of the interferon gamma-MHC class II signal transduction pathway reveals that type I and type II interferon systems share common signalling component(s) *Embo J*. **11**:1351-63.
- Loning H., H. Ikenberg, J. Becker, L. Gissmann, I. Hoepfer and H. zur Hausen** 1985 Analysis of oral papillomas, leukoplasias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA *J. Invest. Dermatol*. **84**: 417-420
- Lorincz, A. T., A. P. Quinn, W. D. Lancaster, and G. F. Temple** 1987. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix *Virology*. **159**:187-90.
- Lorincz, A. T., A. P. Quinn, M. D. Goldsborough, P. McAllister, and G. F. Temple** 1989. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers *J Gen Virol*. **70**:3099-104.
- Lowe, S. W., H. E. Ruley, T. Jacks, and D. E. Housman** 1993. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents *Cell*. **74**:957-67.
- Lu R., W. C. Au, W. S. Yeow, N. Hageman and P. M. Pitha** 2000. Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. *J Biol Chem* **275**: 31805--31812
- Lubyova, B., and P. M. Pitha** 2000. Characterization of a novel human herpesvirus 8-encoded protein, vIRF- 3, that shows homology to viral and cellular interferon regulatory factors *J Virol*. **74**:8194-201.

- Majewski, S., M. Marczak, A. Szmurlo, S. Jablonska, and W. Bollag** 1996. Interleukin-12 inhibits angiogenesis induced by human tumor cell lines in vivo *J Invest Dermatol.* **106**:1114-8.
- Malejczyk J., A. Malejczyk A. Urbanski, S. Kock, S. Jablonska, G. Orth and T. A. Luger** 1992 Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **149**: 2702
- Maltzman, W., and L. Czyzyk** 1984. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells *Mol Cell Biol.* **4**:1689-94.
- Maniatis, T., J. V. Falvo, T. H. Kim, T. K. Kim, C. H. Lin, B. S. Parekh, and M. G. Wathel** 1998. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **63**:609-20.
- Marie, I., J. E. Durbin, and D. E. Levy** 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7 *Embo J.* **17**:6660-9.
- Martinand, C., C. Montavpn, T. Salehzada, M. Silhol, B. Lebleu and C. Bisbal** 1999. RNaseL inhibitor induced during human immunodeficiency virus type I infection and down regulates the 2-5A/RNaseL pathway in human T cells. *J Virol* **73**: 290-296
- Mathews, M. B.** 1993. Viral evasion of cellular defence mechanisms: regulation of the protein kinase DAI by RNA effectors-. *Sem Virol* **4**: 247-257
- Matsuyama, T., T. Kimura, M. Kitagawa, K. Pfeffer, T. Kawakami, N. Watanabe, T. M. Kundig, R. Amakawa, K. Kishihara, A. Wakeham, and et al.** 1993. Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development *Cell.* **75**:83-97.
- Matsuyama, T., A. Grossman, H. W. Mittrucker, D. P. Siderovski, F. Kiefer, T. Kawakami, C. D. Richardson, T. Taniguchi, S. K. Yoshinaga, and T. W. Mak** 1995. Molecular cloning of LSIRF, a lymphoid-specific member of the interferon regulatory factor family that binds the interferon-stimulated response element (ISRE) *Nucleic Acids Res.* **23**:2127-36.
- Melen, K., T. Ronni, B. Broni, R. M. Krug, C. H. von Bonsdorff, and I. Julkunen** 1992. Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper *J Biol Chem.* **267**:25898-907.
- Merlin, G., E. Falcoff, and M. Aguet** 1985. 125I-labelled human interferons alpha, beta and gamma: comparative receptor-binding data *J Gen Virol.* **66**:1149-52.
- Mestan J., W. Digel, S. Mittnacht, H. Hillen, D. Blohm, A. Moeller, H. Jacobsen and H. Kirchner** 1986. Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro. *Nature* **323**: 816-819
- Mestan, J., M. Brockhaus, H. Kirchner, and H. Jacobsen** 1988. Antiviral activity of tumour necrosis factor. Synergism with interferons and induction of oligo-2',5'-adenylate synthetase *J Gen Virol.* **69**:3113-20.
- Miamoto, M., T. Fujita, Y. Kimura, M. Maruyama, H. Haradea, Y. Sudo, T. Miyata and T. Taniguchi** 1988. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, That specifically binds to IFN-b gene regulators elements. *Cell* **54**: 903-913
- Miller D. M., Y. Zhang, B. M. Rahill, W. J. Waldman and D. D. Sedmak** 1999. Human cytomegalievirus inhibits IFN- α stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN- α signal transduction. *J Immunol* **162**: 6107-6113
- Modrow S. and D. Falke** 1998. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akad. Verlag GmbH Heidelberg-Berlin, 1. Korrigierter Nachdruck
- Mossman, K., C. Upton, and G. McFadden** 1995. The myxoma virus-soluble interferon-gamma receptor homolog, M-T7, inhibits interferon-gamma in a species-specific manner *J Biol Chem.* **270**:3031-8.
- Munger, K., W. C. Phelps, V. Bubb, P. M. Howley, and R. Schlegel** 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes *J Virol.* **63**:4417-21.
- Navarro, L., and M. David** 1999. p38-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide *J Biol Chem.* **274**:35535-8.
- Nawa, A., Y. Nishiyama, N. Yamamoto, K. Maeno, S. Goto, and Y. Tomoda** 1990. Selective suppression of human papilloma virus type 18 mRNA level in HeLa cells by interferon *Biochem Biophys Res Commun.* **170**:793-9.
- Nelson, N., M S. Marks, P. H. Driggers and K. Ozato** 1993. Interferon consensus sequence binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* **13**: 588-599
- Nelson N., Y. Kanno, C. Hong, C. Contursi, T. Fujita, B. J. Fowlkes, E. O'Connell, H. J. Hu-Li W. E. Paul, D. Jankovic, A. F. Sher, J. E. Coligan, A. Thornton, E. Appella, Y. Yang and K. Ozato** 1996. Expression of IFN regulatory factor family proteins in lymphocytes. Induction or Stat-1 and IFN-consensus sequence binding protein expression by T cell activation. *J Immunol* **156**: 3711-3720
- Ngelangel, C., N. Munoz, F. X. Bosch, G. M. Limson, M. R. Festin, J. Deacon, M. V. Jacobs, M. Santamaria, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers** 1998. Causes of cervical cancer in the Philippines: a case-control study *J Natl Cancer Inst.* **90**:43-9.
- Noah, D. L., M. A. Blum, and B. Sherry** 1999. Interferon regulatory factor 3 is required for viral induction of beta interferon in primary cardiac myocyte cultures *J Virol.* **73**:10208-13.

- Nourbakhsh M., K. Hoffmann and H. Hauser** 1993. Interferon- β promotor contains a DNA element that acts as a position-independent silencer of the NF κ B site. *EMBO J* **12**: 451-459
- Nourbakhsh M. and H. Hauser** 1999. Constitutive silencing of IFN- β promotor is mediated by NRF (NF- κ B-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF κ B. *EMBO J* **18**: 6415-6425
- O'Hara, B. M., H. P. Klinger, T. Curran, Y. D. Zhang, and D. G. Blair** 1987. Levels of fos, ets2, and myb proto-oncogene RNAs correlate with segregation of chromosome 11 of normal cells and with suppression of tumorigenicity in human cell hybrids *Mol Cell Biol.* **7**:2941-6.
- Orth, G., S. Jablonska, F. Breitburd, M. Favre, and O. Croissant** 1978. The human papillomaviruses *Bull Cancer.* **65**:151-64.
- Orth, G.** 1986. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses *Ciba Found Symp.* **120**:157-74.
- Pavlovic, J., T. Zurcher, O. Haller, and P. Staeheli** 1990. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein *J Virol.* **64**:3370-5.
- Pavlovic, J., A. Schroder, A. Blank, F. Pitossi, and P. Staeheli** 1993. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state *Ciba Found Symp.* **176**:233-43.
- Perea, S. E., P. Massimi, and L. Banks** 2000. Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1 *Int J Mol Med.* **5**:661-6.
- Pfister, H., and H. zur Hausen** 1978. Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1 *Med Microbiol Immunol (Berl).* **166**:13-9.
- Pitha, P. M., W. C. Au, W. Lowther, Y. T. Juang, S. L. Schafer, L. Burysek, J. Hiscott, and P. A. Moore** 1998. Role of the interferon regulatory factors (IRFs) in virus-mediated signaling and regulation of cell growth *Biochimie.* **80**:651-8.
- Pitossi, F., A. Blank, A. Schroder, A. Schwarz, P. Hussi, M. Schwemmler, J. Pavlovic, and P. Staeheli** 1993. A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins *J Virol.* **67**:6726-32.
- Ponten A., C. Sick, M. Weeber, O. Haller and G. Kochs** 1997 Dominant-negative mutants of human MyA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol* **71**: 2591-2599
- Rajamaran N. and T. K. Kerpolla** 1997. DNA bending by Fos-Jun and the orientation of heterodimer binding depend on the sequence of the AP-1 site. *Embo J* **16**: 2917-2925
- Rappolee D. A. and Z. Werb** 1992. Macrophage-derived growth factors. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* **181**: 87-140
- Raveh T., A. G. Hovanessian, E. F. Meurs, N. Sonnenberg and A. Kimchi** 1996. Double-stranded RNA-dependent protein kinase mediates c-Myc suppression induced by type I interferons *J Biol Chem* **271**: 25479-25484
- Reis, L. F., T. Ho Lee, and J. Vilcek** 1989. Tumor necrosis factor acts synergistically with autocrine interferon-beta and increases interferon-beta mRNA levels in human fibroblasts *J Biol Chem.* **264**:16351-4.
- Richter, M. F., M. Schwemmler, C. Herrmann, A. Wittinghofer, and P. Staeheli** 1995. Interferon-induced MxA protein. GTP binding and GTP hydrolysis properties *J Biol Chem.* **270**:13512-7.
- Riethdorf, L., S. Riethdorf, F. Guetzlaff, F. Prall and T. Loning** 1996. Differential expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in human papillomavirus-16 infected squamous interepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the cervix uteri. *Am J Path* **149**: 1469-1476
- Rivas, C., J. Gil, Z. Melkova, M. Esteban, and M. Diaz-Guerra** 1998. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)- induced 2-5A synthetase enzyme *Virology.* **243**:406-14.
- Roers, A., H. K. Hochkeppel, M. A. Horisberger, A. Hovanessian, and O. Haller** 1994. MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon *J Infect Dis.* **169**:807-13.
- Rollins, B. J.** 1991. JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine *Cancer Cells.* **3**:517-24.
- Rollins, B. J., and M. E. Sunday** 1991. Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells *Mol Cell Biol.* **11**:3125-31.
- Romanczuk, H., F. Thierry, and P. M. Howley** 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters *J Virol.* **64**:2849-59.
- Ronco, L. V., A. Y. Karpova, M. Vidal, and P. M. Howley** 1998. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity *Genes Dev.* **12**:2061-72.
- Rosl, F., W. Waldeck, and G. Sauer** 1983. Isolation of episomal bovine papillomavirus chromatin and identification of a DNase I-hypersensitive region *J Virol.* **46**:567-74.
- Rosl, F., E. M. Westphal and H. zur Hausen** 1989. Chromatin structure and transcriptional regulation of human papillomavirus type 18 DNA in HeLa cells. *Mol Carcinogenesis* **2**: 72-80
- Rosl, F., A. Arab, B. Klevenz, and H. zur Hausen** 1993. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses *journal of general virology.* **74 (Pt 5)**:791-801.
- Rosl, F., M. Lengert, J. Albrecht, K. Kleine, R. Zawatzky, B. Schraven, and H. zur Hausen** 1994. Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids *journal of virology.* **68**:2142-50.

- Rueckert R. R.** 1996. Picornaviruses in „Fields“ Virology Edited By B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley 1995. 3rd Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Published in USA
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** 1989. Molecular cloning. A Laboratory manual
- Samuel, C. E.** 1991. Antiviral actions of interferon. Interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities *Virology*. **183**:1-11.
- Samuel, C. E.** 1993. The eIF-2 alpha protein kinases, regulators of translation in eukaryotes from yeasts to humans *J Biol Chem*. **268**:7603-6.
- Sato M., N. Tanaka, N. Hata, E. Oda T. Taniguchi** 1998. Involvement of the ORF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-gene. *FEBS Lett* **425**: 112-116
- Saura M., C. Zaragoza, C. Bao, A. McMillan and C. J. Lowenstein** 1999. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthetase transcription. *J Mol Biol* **289**: 459-471
- Saxon, P. J., E. S. Srivatsan, and E. J. Stanbridge** 1986. Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells *Embo J*. **5**:3461-6.
- Schäfer S. L. R. Lin, P. A. Moore, J. Hiscott and P. M. Pitha** 1998. Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3. *J Biol Chem* **273**: 2714-2720
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, and P. M. Howley** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53 *Cell*. **63**:1129-36.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra, and P. M. Howley** 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53 *Cell*. **75**:495-505.
- Schneppenheim R., U. Budde, N. Dahlmann and P. Rautenberg** 1991. Luminography-a new highly sensitive visualisation method for electrophoresis. *Electrophoresis* **12**: 367-372
- Schreiber E., P. Matthias, M- M. Müller und W. Schaffner** 1989. Rapid detection of octamer-binding proteins with „mini-extracts“ prepared from a small number of cells. *Nucl Acid Res* **17**: 6419
- Scheurlen, W., L. Gissmann, G. Gross, and H. zur Hausen** 1986. Molecular cloning of two new HPV types (HPV 37 and HPV 38) from a keratoacanthoma and a malignant melanoma *Int J Cancer*. **37**:505-10.
- Schlegel, R., W. C. Phelps, Y. L. Zhang, and M. Barbosa** 1988. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma *Embo J*. **7**:3181-7.
- Schneider-Gaedicke A. und E. Schwarz** 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *Embo J* **5**: 2285-2292
- Schneider, A., and L. A. Koutsky** 1992. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection *IARC Sci Publ*. **119**:25-52.
- Schneider-Schaulies, S., J. Schneider-Schaulies, A. Schuster, M. Bayer, J. Pavlovic, and V. ter Meulen** 1994. Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells *J Virol*. **68**:6910-7.
- Schwarz, E., U. K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, and H. zur Hausen** 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells *Nature*. **314**:111-4.
- Sen, G. C., and R. M. Ransohoff** 1993. Interferon-induced antiviral actions and their regulation *Adv Virus Res*. **42**:57-102.
- Sharf, R., A. Azriel, F. Lejbkowitz, S. S. Winograd, R. Ehrlich, and B. Z. Levi** 1995. Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors *J Biol Chem*. **270**:13063-9.
- Sharp, T. V. M. Schwemmle, I. Jeffrey, K. Laing, H. Mellor, C. G. Proud, K. Hilse and M. J. Clemens** 1993. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs Eber-1 and Eber-2 and adenovirus VAIK RNA. *Nuc Acid Res* **21**: 4483-4490
- Sharp, T., F. Moonan, A. Romashko, B. Joshi, G. N. Barber and R. Jagus** 1998. The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* **250**: 302-315
- Shepard, H. M., and G. D. Lewis** 1988. Resistance of tumor cells to tumor necrosis factor *J Clin Immunol*. **8**:333-41.
- Shimoda, K., A.T. Lorincz, G.F. Temple und W.D. Lancaster** 1989. Human papillomavirus type 52: an new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol*. **69**: 2925-2928
- Sims, S. H., Y. Cha, M. F. Romine, P. Q. Gao, K. Gottlieb, and A. B. Deisseroth** 1993. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter *Mol Cell Biol*. **13**:690-702.
- Singh, R. K., M. Gutman, C. D. Bucana, R. Sanches, N. Llansa and I. J. Fidler** 1995. Interferons alpha and beta downregulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4562-4566
- Singh, R. K., M. Gutman, N. Llansa and I. J. Fidler** 1996. Interferon- β prevents the up-regulation of interleukin-8 expression in human melanoma cells. *J Interferon Cytokine Res* **16**: 577-584

- Southern E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Soto, U., B. C. Das, M. Lengert, P. Finzer, H. zur Hausen, and F. Rosl** 1999. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex oncogene. **18**:3187-98.
- Spinello A., P. Tenti, R. UZappatore, F. De seta, E. Silini and S. Guachino** 1993. Langerhans' cell counts and cervical intraepithelial neoplasia in women with human immunodeficiency virus infection *Gyn Oncology* **48**: 210-213
- Stanbridge, E. J., C. J. Der, C. J. Doersen, R. Y. Nishimi, D. M. Peehl, B. E. Weissman, and J. E. Wilkinson** 1982. Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity *Science*. **215**:252-9.
- Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber** 1998. How cells respond to interferons *Annu Rev Biochem*. **67**:227-64.
- Stoler, A., M. Duvic, and E. Fuchs** 1989. Unusual patterns of keratin expression in the overlying epidermis of patients with dermatofibromas: biochemical alterations in the epidermis as a consequence of dermal tumors *J Invest Dermatol*. **93**:728-38.
- Sugarman, B. J., B. B. Aggarwal, P. E. Hass, I. S. Figari, M. A. Palladino, Jr., and H. M. Shepard** 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro *Science*. **230**:943-5.
- Swith F.V., K. Bhat, H.B. Younghusband and H. Hamada** 1987. Characterisation of a cell type specific enhancer found in the human papillomavirus type 18 genome. *EMBO J*: **6** 1339-1334
- Syrjanen, K.** 1982 Histological changes identical to those of condylomatous lesion found in esophageal squamous cell carcinomas *Arch Geschwulstforsch* **52**: 283-292
- Syrjanen, K., R. Mantyjarvi, M. Vayrynen, S. Syrjanen, S. Parkkinen, M. Yliskoski, S. Saarikoski, and O. Castren** 1987. Evolution of human papillomavirus infections in the uterine cervix during a long-term prospective follow-up *Appl Pathol*. **5**:121-35.
- Tamura, T., M. Ishihara, M. S. Lamphier, N. Tanaka, I. Oishi, S. Aizawa, T. Matsuyama, T. W. Mak, S. Taki, and T. Taniguchi** 1995. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes *Nature*. **376**:596-9.
- Tan, S. L., M. J. Gale, Jr., and M. G. Katze** 1998. Double-stranded RNA-independent dimerization of interferon-induced protein kinase PKR and inhibition of dimerization by the cellular P58IPK inhibitor *Mol Cell Biol*. **18**:2431-43.
- Tan, S. L. and G. Katze** 1998. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res* **18**: 757-766
- Tanaka, N., M. Ishihara and T. Taniguchi** 1994 Suppression of c-myc of fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1. *Cancer Lett* **83**: 191-196
- Tanaka, N., M. Ishihara, M. S. Lamhier, H. Nozawa, T. Matsuyama, T. W. Mak, S. Azizawa, T. Tokini, M. Oren and T. Taniguchi** 1996. Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* **382**: 816-818
- Tanaka and T. Taniguchi** 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α/β gene induction. *Immunity* **13**: 539-548
- Taniguchi T. and A. Takaoka** 2001. A weak signal for strong responses: interferon- α/β revisited. *Nature Reviews* **2**: 378-386
- Tay, S. K., D. Jenkins, P. Maddox, N. Hogg and A. Singer** 1987. Tissue macrophage response in human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasias. *Brit J Obstetrics and Gynaecology* **94**: 1094-1097
- Thanos D. and T. Maniatis** 1992. The high mobility group protein HMGI(Y) is required for NF κ B-dependent virus induction of the human IFN- β gene. *Cell* **71**: 777-789
- Tomis, D. C. and C. E. Samuel** 1993 Mechanism of interferon action. Evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* **67**: 7695-7700
- Tyring, S. K.** 1988. Treatment of condyloma acuminatum with interferon *Semin Oncol*. **15**:35-40.
- Uddin S., F. Lekmine, N. Sharma, B. Majchrzak, I. Mayer, P. R. Young, G. M. Bokoch, E. N. Fish and L. C. Platanius** 2000. The Rac/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem* **275**: 27634-27640
- Um S. J., E. J. Kim, E. S. Hwang, S. J. Kim, S. E. Nammkoong and J. S. Park** 2000. Antiproliferative effects of retinoic acid/interferon in cervical carcinoma cell lines: cooperative growth suppression of IRF-1 and p53. *Int J Cancer* **85**: 416-423
- Uze, G., G. Lutfalla, and I. Gresser** 1990. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA *Cell*. **60**:225-34.
- van den Brule, A.J., P.J. Snijders, R.L. Grodijn, O.P. Bleker, C.J. Meijer und J.M. Walboomers** 1990. General promoter-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas *Int. J. Cancer* **45** 644-649

- Veals, S. A., C. Schindler, D. Leonard, X. Y. Fu, R. Aebersold, J. E. Darnell, Jr., and D. E. Levy 1992. Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins *Mol Cell Biol.* **12**:3315-24.
- Venturini, F., J. Braspenning, M. Homann, L. Gissmann, and G. Sczakiel 1999. Kinetic selection of HPV 16 E6/E7-directed antisense nucleic acids: anti-proliferative effects on HPV 16-transformed cells *Nucleic Acids Res.* **27**:1585-92.
- Viac, J., I. Guerin-Reverchon, Y. Chardonnet and A. Bremond 1990. Langerhans cells and epithelial cells modifications in cervical intraepithelial neoplasias: correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiol* **180**: 328-338
- Visvanathan K. V. and S. Goodbourn 1989. Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter. *Embo J* **8**: 1129-1138
- von Knoebel Doeberitz M., C. Rittmuller, H. zur Hausen and M. Durst 1992. Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int. J. Cancer* **51**: 831-834
- Waldeck, W., F. Rosl, and H. Zentgraf 1984. Origin of replication in episomal bovine papilloma virus type 1 DNA isolated from transformed cells *Embo J.* **3**:2173-8.
- Waas W. F., H. H. Lo and K. N. Dalby 2001. The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 Mitogen-activated protein (MAP) kinase α . *J Biol Chem* **276**: 5676-5684
- Watanabe S., T. Kanda and K. Yoshike 1989. Human papillomavirus type 16 transformation of primary embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J. Virol.* **63**: 965-969
- Watanabe N., J. Sakakibara, A. G. Hovanessian, T. Taniguchi and T. Fujita 1991. Activation of IFN-beta by IRF.1 requires a posttranslational event in addition to IRF-1 synthesis. *Nucleic Acids Res* **19**: 4421-4428
- Wathelet, M. G., C. H. Lin, B. S. Parekh, L. V. Ronco, P. M. Howley, and T. Maniatis 1998. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo *Mol Cell.* **1**:507-18.
- Weihua, X., S. Ramanujam, D. J. Lindner, R. D. Kudaravalli, R. Freund, and D. V. Kalvakolanu 1998. The polyoma virus T antigen interferes with interferon-inducible gene expression *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:1085-90.
- Weisz, A., S. Kirchhoff, and B. Z. Levi 1994. IFN consensus sequence binding protein (ICSBP) is a conditional repressor of IFN inducible promoters *Int Immunol.* **6**:1125-31.
- Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53 *Science.* **248**:76-9.
- Wilczynski, S. P., L. Pearlman, and J. Walker 1988. Identification of HPV 16 early genes retained in cervical carcinomas *Virology.* **166**:624-7.
- Whitmarsh A. J. and R. J. Davis 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* **74**: 589-607
- Woodworth, C. D., J. Doniger, and J. A. DiPaolo 1989. immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma *J Virol.* **63**:159-64.
- Woodworth, C. D., and S. Simpson 1993. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines *Am J Pathol.* **142**:1544-55.
- Yamagata, T., J. Nishida, S. Tanaka, R. Sakai, K. Mitani, M. Yoshida, T. Taniguchi, Y. Yazaki, and H. Hirai 1996. A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes *Mol Cell Biol.* **16**:1283-94.
- Yan, H., K. Krishnan, A. C. Greenlund, S. Gupta, J.T. E. Lim, R. D. Schreiber C. W. Schindler and J. J. Krolewski 1996. Phosphorylated interferon- α receptor 1 subunit (IFN α R1) acts as a binding site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein *EMBO J* **15**: 6095-6106
- Yarden, A., and A. Kimchi 1986. Tumor necrosis factor reduces c-myc expression and cooperates with interferon-gamma in HeLa cells *Science.* **234**:1419-21.
- Yeow, W. S., C. M. Lawson, and M. W. Beilharz 1998. Antiviral activities of individual murine IFN-alpha subtypes in vivo: intramuscular injection of IFN expression constructs reduces cytomegalovirus replication *J Immunol.* **160**:2932-9.
- Yeow, W. S., W. C. Au, Y. T. Juang, C. D. Fields, C. L. Dent, D. R. Gewert, and P. M. Pitha 2000. Reconstitution of virus-mediated expression of interferon alpha genes in human fibroblast cells by ectopic interferon regulatory factor-7 *J Biol Chem.* **275**:6313-20.
- Yie J., K. Senger and D. Thanos 1999. Mechanism by which the IFN- β enhanceosome activates transcription *PNAS* **96**: 13108-13113
- Yoneyama, M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida, and T. Fujita 1998. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300 *Embo J.* **17**:1087-95.
- Zhang, K., and R. Kumar 1994. Interferon-alpha inhibits cyclin E- and cyclin D1-dependent CDK-2 kinase activity associated with RB protein and E2F in Daudi cells *Biochem Biophys Res Commun.* **200**:522-8.
- Zhang, L. and J. S. Pagano 1997 IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* **17**: 5748-5757

- Zhou A., B. A. Hassel and R. H. Silverman** 1993. Expression, cloning of the 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated modulator of interferon action. *Cell* **5**: 753-765
- Zimring, J. C., S. Goodbourn, and M. K. Offermann** 1998. Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription *J Virol.* **72**:701-7.
- zur Hausen, H., E. M. de Villiers, and L. Gissmann** 1981. Papillomavirus infections and human genital cancer *Gynecol Oncol.* **12**: 124-8.
- zur Hausen, H.** 1986. Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression *Lancet.* **2**:489-91.
- zur Hausen, H.** 1991. Viruses in human cancers *Science.* **254**: 1167-73.
- zur Hausen, H., and F. Rosl** 1994. Pathogenesis of cancer of the cervix cold spring harbor symposia on quantitative biology. **59**: 623-8.
- zur Hausen, H.** 1996. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers *biochimica et biophysica acta.* **1288**:F55-78.
- zur Hausen, H.** 1999. Viruses in human cancers *eur j cancer.* **35**:1878-85.
- zur Hausen, H.** 2000 Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis *J. Natl.Cancer Inst.* **92**: 690-698

DANKSAGUNG

Bei den folgenden Menschen möchte ich mich herzlich bedanken, da sie zur Erstellung und zum Erfolg der Dissertation beigetragen haben:

Prof. Dr. zur Hausen	für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu lernen, zu promovieren und zu arbeiten, sowie das stetige Interesse an meiner Arbeit
PD Dr. Frank Rösl	für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die menschlich und fachlich kompetente Betreuung
Prof. Zawatzky	für die zahlreichen Antworten und Hilfestellungen meiner ebenso zahlreichen Fragen
HD. Dr. Kurzik-Dumke	für die Übernahme des Referats und die Vertretung der Dissertation vor der Prüfungskommission, sowie für die freundliche Gesprächs-Atmosphäre
Dr. Sabine Baars, Dr. Ubaldo Soto und Dipl.Ing. Matthias Schick	für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft
Anita Weyland und Heribert Wurmbäck Bei allen Arbeitskollegen	als Retter und Helfer für die angenehme und kreative Arbeitsatmosphäre im Labor, die Kooperationsbereitschaft, Hilfe und Diskussion
Bei Freunden und Bekannten	für die Bereitschaft zuzuhören, auch wenn die Thematik fremd war
Bei meinem Eltern und Schwiegereltern	die mir durch ihre liebevolle Unterstützung diesen Weg erst ermöglicht haben
Bei meinem Mann	der mich durch seine Liebe stets ermutigt hat und dessen Verständnis und Rücksichtnahme wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

- **Name:** Anastasia Bachmann, geb. Pataki
- **Adresse** Breslauerstr4
65203 Wiesbaden
- **Telefonnummer** 0611/61456
- **E-mail** A.Bachmann@dkfz-heidelberg-de
- **Geboren** 22.10.1971 in Sontheim
- **Nationalität** Jugoslawisch
- **Familienstand** verheiratet

Schul Ausbildung

- 1978-1982 Grund- und Hauptschule Talheim
- 1982-1988 Hölderlin.-Realschule in Lauffen a/N
- 1988 Mittlere Reife
- 1988- 1991 Gustav-von Schmoller-Schule in Heilbronn
- 1991 Abitur

Angestelltenverhältnis

- 1991-1992 Angestellte der dt. Bundespost

Beruflicher Werdegang

- 1992-1994 Biologiestudium an der Technischen Hochschule
Darmstadt
- 1994 Diplomvorprüfung

- 1994-1997 Hauptstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität zu Mainz
- 1996 Praktikum am DKFZ in der Abteilung Poustka bei Dr. Korn
- 1997 Diplom-Hauptprüfung
Diplomarbeit am DKFZ in der Arbeitsgruppe Poustka
- seit April 1998 Doktorarbeit am DKFZ in Heidelberg bei Prof. Dr. zur Hausen.
Die Arbeit wurde in der Abteilung Tumovirus-immunologie unter der Anleitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. F. Rösl durchgeführt. Betreuung innerhalb des Fachbereichs Biologie durch Frau HD. Dr. Kurzik-Dumke

Mainz, den 17.07.2001

Anastasia Bachmann

Erklärung

Name: Anastasia Bachmann
Anschrift: Breslauerstr4
65203 Wiebaden
0611/61456

Hiermit erkläre ich gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990

Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Eile einer Abhandlung davon weder bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Ich hatte die folgende Abhandlung mit nachstehendem Ergebnis als Dissertation eingereicht:

Untersuchung der TNF- α vermittelten IFN- β Signaltransduktion in malignen und nicht-malignen HPV-positiven Zellen. am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Mainz, den

Unterschrift