

Charakterisierung des Humanen Papillomavirus E6 Protein

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie der naturwissenschaftlichen Sektion
der Universität Konstanz

vorgelegt von

Elvira Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 18 Dezember 2009

Referent: Prof. Dr. Martin Scheffner

Referent: Prof. Dr. Christof Hauck

Konstanz 2009

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt all denen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. M. Scheffner, für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung während meiner Doktorarbeit und seine Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. C. Hauck für die freundliche Übernahme des Zweitgutachens sowie seine wertvollen Ratschläge zum Projekt.

Dem Team des Bioimagingcenters Konstanz, Frau Dr. Elisa Ferrando-May und ihren Mitarbeitern, für ihre uneremüdliche Hilfsbereitschaft bei Fragen der konfokalen Mikroskopie.

Nicole Richter für ihre nie endende Hilfsbereitschaft bei meinen Projekten, ihren Optimismus und ihre Unterstützung auf ganzer Linie .

Dr. Stefan Kreft für konstruktive Kritik und sein stets offenes Ohr bei Problemen.

Alejandro Rojas Fernandez für seine geduldige Einführung in die Welt der Mikroskopie.

Meine BA Studenten Alexander Timper, Stefanie Ries und Anna Isabella Kesberg für ihre Mithilfe an den Projekten.

Den „Ehemaligen“ Dr. Ulrike Kogel, Dr. Petric Kuballa und Dr. Iyappan Saravanakumar für ihre Unterstützung, Ratschläge und Hilfe an allen Fronten.

Toto und Vijai !

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schönen Zeiten im Labor.

Meinen ehemaligen Kollegen Dr. Mark-Steffen Hipp, Dr. Gunter Schmidtke und Ulrike Beck für ihre Hilfe auch über meine Diplomarbeit hinaus.

Allen meinen Freunden und Ersatzfamilien in der ganzen Welt für ihre Motivation, Unterstützung, den richtigen Worten zur richtigen Zeit und vor allem ihre Freundschaft.

Meiner Familie für ihre Liebe und ihren Glauben an mich und meinem Bruder Eduard Weber besonders für die technische Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Und vor allem und ganz besonders : Dr. Petra Krause!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Humane Papillomaviren.....	1
1.2	Papillomaviren und Krebs	3
1.3	Impfung gegen HPV	5
1.4	Onkogene HPV Proteine	5
1.4.1	HPVE6	5
1.4.2	HPVE7	7
1.5	PDZ (PSD-95,Dlg, ZO-1) Domänen Proteine.....	8
1.6	Low risk HPVs	10
1.7	Ubiquitin	12
1.7.1	Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3s).....	14
1.7.2	RING (Really Interesting New Gene) Finger Proteine	14
1.7.3	U-Box E3s.....	15
1.7.4	HECT-Domänen Proteine (Homolog zum E6AP- Carboxyl-Terminus) 15	
1.8	E6AP (E6 associated protein).....	16
1.9	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Primerliste	19
2.1.2	Verwendete Konstrukte	20
	• pGEX2TK Konstrukte	20
2.1.3	Klonierte DNA Konstrukte	21
2.1.4	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	22
2.2	Methoden	26
2.2.1	Escherichia coli (<i>E.coli</i>).....	26
2.2.2	Eukaryotische Zellen.....	26
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	26
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.2.6	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	27
2.2.7	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen.27	
2.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	27
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.10	Präparation CaCl ₂ kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.11	Präparation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	28

2.2.12	Transformation in CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.2.13	Transformation in elektrokompente <i>E. coli</i> -Zellen (Elektroporation).....	28
2.2.14	DNA-Sequenzierung.....	28
2.2.15	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	28
2.2.16	Herstellung von baculo E6AP	29
2.2.17	<i>In vitro</i> Translation	29
2.2.18	Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	29
2.2.19	Codonoptimierung der HPV11E6DNA zur Verbesserung der Proteinexpression	30
2.2.20	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.21	Coomassie Blau Färbung von Proteinen.....	31
2.2.22	Fluorographie	31
2.2.23	Western-Blot und Immunodetektion.....	31
2.2.24	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
2.2.25	GST Pulldown zur Identifizierung neuer Interaktionspartner	32
2.2.26	Tandem Affinity Purification	32
2.2.27	GST-Pulldown	33
2.2.28	<i>In vitro</i> Ubiquitinierungsversuche.....	33
2.2.29	Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen	34
2.2.30	Proteinabbaubestimmung mittels DHFR-Ubiquitininfusionskonstrukte.....	35
2.2.31	His-Ubiquitinierungsassays <i>in cellulo</i>	35
2.2.32	Immunfluoreszenz	36
2.2.33	Hefearbeit.....	36
2.2.33.1	Isolation von DNA aus Hefezellen	36
2.2.33.2	Proteinexpressionstest in Hefen	37
2.2.33.3	Hefe Transformation nach LiAc Methode.....	37
2.2.33.4	Herstellung kompetenter Hefezellen (für 100ml Kultur).....	38
2.2.33.5	Transformation kompetenter Hefezellen	38
2.2.33.6	Yeast Two Hybrid Screen.....	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Suche nach neuen Interaktionspartnern für das „low risk“ HPV11E6 Protein.....	40
3.1.1	Suche nach neuen Interaktionspartnern für HPV11E6 durch einen Yeast Two Hybrid (YTH) Screen.	40
3.1.1.1	Keratin14 (1-200), HAX-1 und Threonyl-tRNA Synthetase (547-710) binden <i>in vitro</i> an HPV11E6.....	45
3.1.2	HAX-1 (Haematopoetic cell-specific protein 1 – Associated Protein X-1).....	47

3.1.2.1 Die <i>in vitro</i> Bindung von HAX-1 an rekombinantes E6 ist E6AP unabhängig.....	47
3.1.2.2 <i>In cellulo</i> exprimiertes HAX-1 bindet an bakteriell exprimierte HPVE6 Proteine	48
3.1.2.3 HPV hat keinen Einfluss auf das endogene HAX-1 Proteinexpressionslevel.....	49
3.1.2.4 HAX-1 wird <i>in vitro</i> in Anwesenheit von E6AP durch high risk E6, aber nicht durch low risk E6 ubiquitiniert.....	51
3.1.2.5 HPVE6 und E6AP haben keinen Einfluss auf die Stabilität von überexprimiertem HAX-1 und umgekehrt.....	54
3.1.2.6 Eine Überexpression von HAX-1 führt zu einer Akkumulation von HPV11E6 an Mitochondrien.....	57
3.1.2.7 HPV11E6 führt zur Ausbildung runder Strukturen, die von Mitotrackern angefärbt werden.	61
3.1.3 Suche nach neuen Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6 mittels Tandem Affinity Purification (TAP).	63
3.1.4 Suche nach neuen Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6 mittels GST-Pulldown.....	65
3.2 Neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von HPV high- und low risk E6 Proteinen und E6AP.....	67
3.2.1 Die Stabilität von HPV 16E6 ist abhängig von der Bindung an E6AP. .67	
3.2.2 HPV11E6 bindet an E6AP und seine Stabilität ist abhängig von dieser Bindung.....	69
3.3 Identifizierung zweier neuer PDZ Proteine als Interaktionspartner für das onkogene HPV16E6.	71
3.3.1 Die E3 Ligasen LNX und SLIM binden an die PDZ-Bindedomäne der high risk HPVE6 Onkoproteine.....	72
3.3.1.1 Die PDZ1 Domäne von LNX ist notwendig, aber nicht ausreichend für die PDZ Bindedomänen abhängige Bindung an das onkogene HPVE6 Protein. 74	
3.3.2 Sind LNX und SLIM E3 Ligasen für das onkogene HPV16E6?	76
3.3.2.1 Das onkogene HPV16 E6 wird <i>in vitro</i> nicht durch LNX oder SLIM ubiquitiniert.	76
3.3.2.2 SLIM und LNX haben keinen Einfluss auf die Stabilität des onkogenen HPV16E6 in menschlichen Zellen.	77
3.3.3 Sind LNX und SLIM neue Substrate für den HPV16E6/E6AP Komplex?78	
3.3.3.1 SLIM	79

3.3.3.1.1	Das PDZ Protein SLIM wird von 16E6 und E6AP <i>in vitro</i> ubiquitiniert.....	79
3.3.3.1.2	HPV16E6 hat <i>in cellulo</i> keinen negativen Einfluss auf die Stabilität von SLIM.	80
3.3.3.1.3	Lokalisation von SLIM und HPV16E6 Proteinen in der Überexpression.....	81
3.3.3.1.4	Die Überexpression von SLIM und HPV11E6 führt zum Abbau von HPV11E6.	83
3.3.3.2	LNX.....	84
3.3.3.2.1	Generierung einer inaktiven LNX Mutante, die an die PDZ Bindedomäne von onkogenem HPV16E6 bindet	84
3.3.3.2.2	LNX Wildtyp sowie LNXC48A werden <i>in vitro</i> durch 16E6 und E6AP ubiquitiniert.....	85
3.3.3.2.3	HPV16E6 kann <i>in vitro</i> die Ubiquitinierung von Numb durch LNX verhindern.	87
3.3.3.2.4	Die Überexpression von onkogenem HPV16E6 führt zu einer Verschiebung von LNX aus dem Zytoplasma in den Zellkern.....	88
4	Diskussion.....	90
4.1	Suche nach neuen Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6	90
4.1.1	YTH.....	90
4.1.2	HAX-1	91
4.1.3	Die Expression von HPV11E6 führt zu der Anfärbung runderer Aggregate durch MitoTracker®.	95
4.1.4	TAP und GST Pulldown	97
4.2	Erkenntnisse über die Stabilität von E6 in menschlichen Zellen.....	98
4.3	Neue Interaktionspartner für HPV16E6.....	100
4.4	Sind LNX und SLIM E3 Ligasen für HPV16E6?	102
4.4.1	SLIM als Substrat von HPV16E6/E6AP.....	103
4.4.2	LNXC48A als Substrat von HPV16E6/E6AP	105
5	Literaturverzeichnis	109
6	Zusammenfassung.....	122
7	Summary.....	123

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomaviren

Humane Papillomaviren (HPVs) sind weltweit verbreitete DNA-Viren. Man geht davon aus, dass nahezu alle Menschen im Laufe ihres Lebens mit HPV in Kontakt kommen. Sie verursachen beim Menschen meist gutartige, lokal begrenzte Epithelwucherungen (Warzen) der Haut und Schleimhaut, die zur spontanen Regression neigen. Bis heute sind ungefähr 118 verschiedene HPV-Typen identifiziert worden. Als neuer Typ wird ein Virus definiert, wenn seine Gensequenzen für die viralen Proteine E6, E7 und L1 weniger als 90% mit den Gensequenzen der bereits bekannten Typen übereinstimmen (Chan et al., 1995; zur Hausen & de Villiers, 1994). Alle bisher identifizierten Typen sind epitheliotrop: Sie infizieren nur Epithelzellen der Haut oder der anogenitalen oder oropharyngealen Mucosa (zur Hausen, 2000). Die ungefähr 40 Typen, die mit Läsionen des Anogenitaltraktes assoziiert sind (Longworth & Laimins, 2004) werden auf Grund des bösartigen oder gutartigen Charakters dieser Läsionen in Hoch-Risiko- (high risk) und Niedrig-Risiko-Typen (low risk) unterteilt (zur Hausen, 2000). Die high risk Typen wie HPV-16, -18 und -31 verursachen eine bösartige Entwicklung von Läsionen, die zu Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) führen können (Motoyama et al., 2004), während die low risk Typen wie HPV-6 und -11 gutartige Warzen und Läsionen verursachen, die nicht bösartig entarten.

Papillomaviren sind unbehüllte Viren von ikosaedrischer Form mit einem ungefähren Durchmesser von 55nm. Sie gelten als streng gewebespezifisch und vermehren sich nur in differenzierten Zellen des menschlichen Plattenepithels. Der Lebenszyklus des HPV ist eng an das Differenzierungsprogramm der infizierten Wirtszellen gekoppelt. Er kann unterteilt werden in produktive und nichtproduktive Phasen. Während einer anhaltenden Infektion repliziert das virale Genom in den Basalzellen als ein Episom und man findet zwischen 20-100 Episome pro infizierter Zelle. Erst wenn die Zelle sich differenzieren wird neue Virionen gebildet. Bis heute ist nicht geklärt, auf welche Art genau das Differenzierungsprogramm der Wirtszelle den Lebenszyklus der Viren aktiviert. Infektionen mit HPV finden vermutlich durch Mikrowunden des Epithels statt, welche die Zellen der Basalmembran für einen viralen Eintritt zugänglich machen. Weiterhin wurde Integrin alpha 6 als Rezeptor identifiziert (Evander et al., 1997), der HPV in die Epithelzellen aufnimmt. Die Zellen der Basalmembran enthalten Stammzellen, die sich kontinuierlich teilen und so Zellen für

die Suprabasalschichten zur Verfügung stellen. Nach einer Infektion mit HPV kommt es zur Replikation des viralen Genoms. Bei der Teilung der Wirtszelle wird die HPV-DNA an beide Tochterzellen weitergegeben, welche in Richtung Stratum granulosum migrieren und sich differenzieren. In nicht infizierten Zellen kommt es hier oft zum Ausstieg aus dem Zellzyklus und dem Verlust des Zellkerns in den suprabasalen Zellen. Im Gegensatz dazu verlassen infizierte Zellen die Basalschicht, und ihr Zellzyklus bleibt durch die Wirkung des viralen E7 Proteins aktiv. Dadurch kommt es zum charakteristischen Verbleiben der Zellkerne in allen Schichten infizierter Epithelien (Ganguly & Parihar, 2009). Nicht alle Infektionen mit HPV führen zu einem Krankheitsverlauf. In vielen Fällen ist ein intaktes Immunsystem in der Lage, das Virus zu kontrollieren, während unter immunsuppressiven Bedingungen eine Aktivierung von HPV möglich ist (Broker et al., 2001; Welters et al., 2003).

Das HPV Genom ist zirkulär kovalent geschlossen, doppelsträngig und von zirka 8 kb Länge (Hebner & Laimins, 2006; Narisawa-Saito & Kiyono, 2007). Es ist mit zellulären Histonen assoziiert, bildet eine Chromatin-ähnliche Struktur und wird vom Zellkern der infizierten Zellen als extrachromosomale DNA repliziert (Howley, 1996). Das HPV-Genom besitzt acht Open Reading Frames, welche für die im Replikationszyklus früh exprimierten (Early) und spät exprimierten (Late) Gene kodieren: E1 bis E7 bzw E8 sowie L1 und L2 (Abb.1.1). Während die früh exprimierten Proteine in die Replikation und Transkription des HPV-Genoms involviert sind sowie regulatorische Funktionen ausüben, tragen die Gene L1 und L2 die Informationen für die spät im Infektionszyklus synthetisierten Kapsidproteine. Die Transkription der frühen sowie der späten Gene wird durch die LCR (non-coding long control region) kontrolliert.

Die viralen Proteine werden durch polycistronische mRNAs translatiert, die überlappende Leseraster haben. Nach Eintritt in die Wirtszelle werden zuerst die E1 und E2 Gene exprimiert, die für die Replikation der viralen DNA benötigt werden (Motoyama et al., 2004). Hierfür bilden E1 und E2 einen Komplex, der an den viralen Origin für die Replikation, der sich in der sogenannten URR (upstream regulatory region) befindet (Abb. 1.1) bindet und eine Wirtspolymerase für die Replikation rekrutiert. Hierbei übt E1 eine Helikaseaktivität aus, indem es die DNA vor dem Replikationskomplex entwindet.

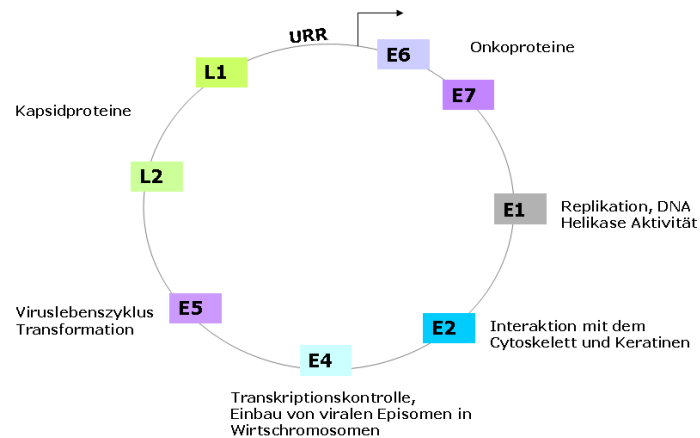


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des zirkulären HPV Genoms. E1- E7 stehen für die früh exprimierten Proteine, L1 und L2 sind die spät exprimierten Kapsidproteine.

E2 fungiert weiterhin als Transkriptionsregulator der frühen Gene des viralen Promoters, der in der URR lokalisiert ist: Solange die Level von E2 niedrig sind, bindet es an den Promotor und induziert die Transkription, während es bei hohen Leveln die Transkription der frühen Gene inklusive E6 und E7 hemmt, in dem es die Bindung von Wirtsfaktoren an den viralen Promotor blockiert (zur Hausen & de Villiers, 1994). HPV E4 wird erst in späteren Phasen des viralen Lebenszyklus exprimiert, wenn sich die Viruspartikel bereits zusammenschließen. Die Proteine L1 und L2 werden spät im Infektionszyklus exprimiert und formen spontan das ikosaedrische Viruskapsid bestehend aus 72 Kapsomeren (Jo et al 2005). Daraufhin kommt es zur Zusammensetzung des Virions, und fertige Viren werden von der obersten Schicht des Epithels entlassen (Hummel et al., 1992).

1.2 Papillomaviren und Krebs

Bereits 1972 wurden Experimente durchgeführt, die einen Zusammenhang zwischen Papillomavirusinfektionen und Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) nachweisen sollten (zur Hausen 1999). Diese resultierten in der Hypothese, dass sich Gebärmutterhalskrebs aus den Virusinfektionen entwickeln kann, die für die Ausbildung von Condylomata acuminata (Feigwarzen) verantwortlich sind. Heute ist die Tatsache generell anerkannt, dass die Infektion mit spezifischen Typen von HPV zu Gebärmutterhalskrebs führen kann. Dies sind generell die high risk HPV Typen, wobei HPV-16 und HPV-18 die höchste Prävalenz zeigen. Das Zervixkarzinom ist

weltweit die zweithäufigste Krebsursache bei Frauen. In den USA zum Beispiel werden 10000 neue Fälle und 5000 Todesfälle jährlich gezählt, wovon mehr als als 99% HPV positiv sind (Longworth & Laimins, 2004).

Nach der Entdeckung von HPV-16 und HPV-18 in Biopsien von Zervixkarzinompatientinnen wurden diese und weitere HPV Typen auch in anderen Anogenitalkrebsarten gefunden. Momentan geht man davon aus, dass ungefähr 50% der Vulvakarzinome HPV-positiv sind, wobei hauptsächlich HPV-16 nachgewiesen wurde (Madsen et al. 2008). Ähnlich verhält es sich mit den Peniskarzinomen, von denen 30-50% HPV DNA tragen (Bezerra et al. 2001; Rubin et al. 2001; Lont et al. 2006). Die globale Häufigkeit von analen und perianalen Karzinomen ist jedoch niedrig und liegt zwischen 0.1 bis 2.8 Fällen pro 100000 (WHOCT 2000).

Weitere Studien befassten sich auch mit dem Zusammenhang zwischen HPV Infektionen und Krebsarten des Mund- und Rachenraumes (oropharyngeale Karzinome), wobei Korrelationen bei 25% bis zu 60% aller Fälle gefunden wurden. In einer Studie von Frisch und Briggs konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Anogenital-Krebs ein 4,3-fach erhöhtes Risiko aufwiesen, Krebs im Mund und Rachenraum zu entwickeln. Zusammengenommen geht man davon aus, dass vermutlich ein Viertel bis ein Drittel aller Karzinome im Mund- und Rachenraum durch Infektionen mit anogenitalen high risk HPVs hervorgerufen werden (zusammengefasst in (zur Hausen 2009)). Auch ein Zusammenhang zwischen Hautkrebs und HPV Infektionen wurde in den letzten Jahren häufiger untersucht. Im Zusammenhang mit der seltenen Autoimmunerkrankung Epidermodysplasia verruciformis zeigen sich flache papillomatöse Läsionen, die sich nach längerer Zeit in Plattenepithelkarzinome umwandeln können. Dabei konnten die typischen Papillomavirenpartikel elektronenmikroskopisch nur in den papillomatösen Läsionen, nicht aber in den bösartig entarteten Geweben nachgewiesen werden (Yabe et al., 1969; Ruitter et al, 1970).

Schließlich sollte erwähnt werden, dass, auch wenn die low risk HPV Typen meistens lediglich zu gutartigen Warzen und Läsionen führen, sie sowohl in Peniskarzinomen (Dianzani et al., 1998), laryngealen und bronchialen Karzinomen (Reidy et al., 2004) als auch in oesophagealen Plattenepithel Karzinomen nachgewiesen werden konnten (Chen et al., 1994; Cooper et al., 1995; Dreilich et al., 2006; Matsha et al., 2002). Ob low risk HPVs tatsächlich eine kausale Rolle bei der Entstehung dieser Karzinome spielen, bleibt aber zumindest umstritten.

1.3 Impfung gegen HPV

Momentan sind zwei verschiedene Impfstoffe für HPV auf dem Markt: Cervarix® von GlaxoSmithKline Biologicals und Silgard®, auch Gardasil® genannt, von Sanofi Pasteur/Merck Sharp & Dohme. Es handelt sich um bi- bzw. quadrivalente Impfstoffe. Der bivalente Impfstoff Cervarix ist gegen die beiden HPV Typen 16 und 18 gerichtet ist, während der quadrivalente Impfstoff Gardasil® gegen die vier verschiedenen HPV Typen 6, 11, 16 und 18 gerichtet (Stanley, 2007).

Beide Impfstoffe enthalten VLPs (virus like particles = Virus ähnliche Partikel) der jeweiligen HPV Typen. Hierfür wird das L1 Gen des jeweiligen HPV Typs rekombinant in Hefe oder Bakuloviren exprimiert. Das dabei gebildete Protein formt sich spontan zu VLPs, die sowohl morphologisch als auch immunologisch identisch zum echten Virus sind. Die so hergestellten VLPs enthalten jedoch keine DNA und sind somit nicht infektiös. Über die Dauer des Impfschutzes kann zurzeit nur spekuliert werden. Die Ergebnisse von Phase III Versuchen zeigen aber, dass er länger als 5 Jahre anhält (Stanley, 2007).

1.4 Onkogene HPV Proteine

Für die Ausbildung von bösartigen Gewebewucherungen sind die onkogenen Proteine E6 und E7 der Papillomaviren verantwortlich. Es sollte aber festgehalten werden, dass, auch wenn funktionell unterschiedlich, sowohl die high risk als auch die low risk Viren in der Lage sind, in differenzierten Wirtskeratinozyten die virale DNA zu replizieren und Virionen zu produzieren. Dies lässt gemeinsame Mechanismen vermuten, die den Zellzyklus der Wirtszelle beeinflussen.

Das E6 Protein der high risk HPVs, nicht aber das der low risk HPVs, weist onkogenes Potential auf. Die Expression von E6 allein führt zu einer Transformation von NIH 3T3 Zellen und zu einer Immortalisierung von menschlichen Brustepithelzellen, wohingegen in humanen Keratinozyten zusätzlich zum E6 Protein auch noch die Expression des E7 Proteins benötigt wird (Kiyono et al., 1998; Liu, 1999).

1.4.1 HPVE6

Das E6 Protein von HPV Typ 16 (16E6) besteht aus 151 Aminosäuren und besitzt somit eine Molekularmasse von ungefähr 18 kDa. Es ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle zu finden. Das E6 Protein enthält zwei Zinkbindedomänen mit dem Motiv Cys-X-X-Cys, welche im Wesentlichen für seine

Funktionalität verantwortlich sind (Mantovani & Banks, 2001). Die auffälligste Unterscheidung der onkogenen E6 zu den low risk E6 Proteinen ist jedoch die C-terminale PDZ (**PSD-95**, **Dlg**, **ZO-1**) Bindedomäne, mit welcher high risk E6 Proteine an PDZ-Domänen binden können.

Die am besten charakterisierte Funktion des E6 Proteins ist der induzierte Abbau des zellulären p53 Proteins (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990). p53 ist das am meisten untersuchte Tumorsuppressorprotein, welches, vereinfacht dargestellt, die Expression von verschiedenen Genen reguliert, deren Produkte an der Zellzykluskontrolle, Apoptose oder Seneszenz beteiligt sind. Ein Beispiel hierfür ist p21 (Ko & Prives, 1996), welches Zellen bei DNA Schädigung in der G1/S-Phase arretiert. Die wachstumsinhibitorischen Funktionen von p53 werden durch das onkogene HPV E6 Protein unterbunden, indem es zusammen mit E6AP, einer zellulären E3 Ligase, einen ternären Komplex mit p53 bildet (Huibregtse et al., 1991). Dies führt zu dessen Ubiquitinierung und anschließendem proteasomalen Abbau (Hubbert et al., 1992; Huibregtse et al., 1993). Auch auf indirektem Wege kann E6 die Funktion von p53 inhibieren, indem es mit p300/CBP, einem Koaktivator von p53, assoziiert und so die transkriptionelle Aktivität von p53 reprimiert (Zimmermann et al., 1999).

Obwohl der Reduktion des zellulären p53 Levels durch E6 eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird, konnte gezeigt werden, dass auch E6 Mutanten, die p53 nicht zum Abbau führen, wie Wildtyp E6 die Fähigkeit haben, Brustepithelzellen zu immortalisieren (Kiyono et al., 1998; Liu et al., 1999). Dies weist darauf hin, dass die Interaktion von E6 mit weiteren Proteinen essentiell für die Immortalisierung von Zellen ist.

Hierfür könnten sogenannte PDZ Proteine in Frage kommen, da lediglich die high risk E6, nicht aber die low risk E6 Proteine, eine PDZ-Bindedomäne aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von PDZ Proteinen wie zum Beispiel hDLG, hSCRIB oder MUPP-1 an die PDZ-Bindedomäne am C-Terminus der high risk E6 Proteine zum Abbau dieser PDZ-Proteine führt (Kiyono et al., 1997; Lee et al., 1997; Lee et al., 2000; Nakagawa und Huibregtse, 2000). Proteine mit einer PDZ Domäne werden häufig in der Nähe von Zell-Zellkontakten, wie zum Beispiel tight junctions in Epithelzellen, gefunden, und man nimmt an, dass sie an der Signaltransduktion beteiligt sind (Gomperts, 1996; Craven und Bredt 1998). Es wird daher vermutet, dass es durch den E6 induzierten Abbau von PDZ Proteinen zu einem Verlust von Zell-Zell Kontakten bei HPV infizierten Zellen kommt und die Zellen somit die Möglichkeit haben, aus der epithelialen Schicht auszubrechen und in die angrenzenden Gewebe einzudringen. Die Beteiligung von PDZ Proteinen an der

E6-vermittelten Immortalisierung von Zellen wurde *in vivo* demonstriert, wobei Mäuse, die das E6 Protein ohne seine PDZ Bindedomäne als Transgen exprimierten, zwar die Fähigkeit behielten, p53 zu inaktivieren, jedoch keine epidermalen Hyperplasien ausbilden konnten, welche in transgenen Mäusen, die das Wildtyp E6 tragen, gefunden wurden (Nguyen et al., 2002).

Eine weitere Funktion von E6, die zur Immortalisierung von Zellen beiträgt, ist die Aktivierung der Expression der katalytischen Telomeraseuntereinheit hTERT (Gewin und Galloway, 2001; Klingelhutz et al., 1996; Oh et al., 2001; Veldman et al., 2001). Telomeraseaktivität ist normalerweise auf embryonale Zellen beschränkt, jedoch findet man in den meisten Krebszellen eine Reaktivierung der hTERT Expression, was zur Rekonstitution der Telomeraseaktivität führt (Liu, 1999). Es scheint als könnte E6 diese Transkription durch die Bindung an Myc und seinen Kofaktor Max aktivieren (Veldman et al., 2001).

1.4.2 HPVE7

Neben dem E6 Protein verfügen die humanen Papillomaviren der high risk Typen über ein weiteres onkogenes Protein: das E7.

Die E7 Proteine sowohl der high risk als auch der low risk Viren werden hauptsächlich im Zellkern gefunden. Sie sind ungefähr 100 Aminosäuren lang. Die zentrale Funktion der E7 Proteine scheint ihre Bindung an Proteine der Retinoblastoma (Rb) Familie zu sein (Dyson et al., 1989). Vertreter für diese Familie sind zum Beispiel Rb selbst, p107 und p130 (Berezutskaya et al., 1997; Classon und Dyson 2001). Die Rb Proteine haben eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Zellzyklus, da sie den Übergang von der G0/G1 Phase in die S-Phase inhibieren und somit die Zellteilung kontrollieren. Die Bindung des hyperphosphorylierten Rb an Transkriptionsfaktoren verhindert die Transkription einer Vielzahl von Genen, welche für die DNA Synthese benötigt werden, und der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus kann nicht erfolgen (Dyson, 1998; Bracken et al., 2004).

Rb-Familienmitglieder sind die Hauptregulatoren des Austritts aus dem Zellzyklus, der während der Epitheldifferenzierung erfolgt. Die Bindung von E7 an Rb (Munger et al., 1989; Dyson, 1998) führt zu einer Ubiquitinierung und dem Abbau der Rb Proteine (Boyer et al., 1996; Berezutskaya et al., 1997; Wang et al., 2001). Die Reduktion des Rb-Levels bewirkt, dass sich auch differenzierte suprabasale Zellen weiter produktiv replizieren (Chellappan et al., 1992) und dem Virus die Möglichkeit zur Replikation bieten.

Zusätzlich zu den Rb Proteinen hat man weitere Interaktionspartner für E7 gefunden, dazu gehören zum Beispiel die Cycline A und E, die Cyclin abhängigen Kinase Inhibitoren p21 und p27 sowie Histon-Deacetylasen (HDAC) (Tommasino et al., 1993; Zerfass-Thome et al., 1996; Funk et al., 1997; Jones et al., 1997; Ruesch und Laimins 1998).

Eine weitere intrinsische Eigenschaft der E7 Proteine scheint die Induktion genomischer Instabilität zu sein, indem es Amplifizierungen der Zentriolen induziert, was zur Aneuploidie führt und zur Tumorgenese beiträgt.

Für die low risk E7 Proteine wurde beschrieben, dass sie wie die high risk E7 Proteine mit den Mitgliedern der Retinoblastom Familie assoziieren; allerdings scheint die Interaktion schwächer zu sein und führt nicht zum Abbau der Rb Proteine (Gage et al., 1990; Jones und Munger 1996).

1.5 PDZ (PSD-95, Dlg, ZO-1) Domänen Proteine

PDZ Domänen wurden bisher fast ausschließlich in zytoplasmatischen Proteinen gefunden, wobei die bis jetzt einzig bekannte Ausnahme Interleukin16, ein lösliches Cytokin, ist (Muhlhahn et al., 1998). PDZ Domänen bestehen aus 80 bis 90 Aminosäuren. Diese bilden sechs β Strands (β A bis β F) und zwei α Helices (α A und α B), welche eine sehr kompakte globuläre Struktur bilden. PDZ Domänen werden in zwei Hauptklassen unterteilt (Songyang et al, 1997). Die Klasse I, wie zum Beispiel bei PSD-95 zu finden, bevorzugt ein S oder TXV für die Bindung an den C-Terminus eines anderen Proteins. Die Klasse II dagegen interagiert bevorzugt mit einem C-terminalen Ψ X Ψ Motiv, wobei Ψ für einen hydrophoben Rest steht (Songyang et al., 1997).

Die PDZ Domäne wurde als Sequenzwiederholung in den Proteinen PSD-95 (postsynaptic density-95), Dlg (discs large) und ZO-1 (zonula occludens-1) entdeckt (Cho et al., 1992; Bryant et al., 1993; Kennedy, 1995). Genomvergleiche ergaben, dass es sich um eine evolutionär hochkonservierte Domäne handelt. Dabei fällt auf, dass sowohl im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* als auch in *Schizosaccharomyces pombe* nur zwei bzw. drei Proteine mit PDZ Domänen gefunden wurden, wobei zum Vergleich *Caenorhabditis elegans* 92 verschiedene Proteine mit PDZ Domänen besitzt (Nourry et al., 2003).

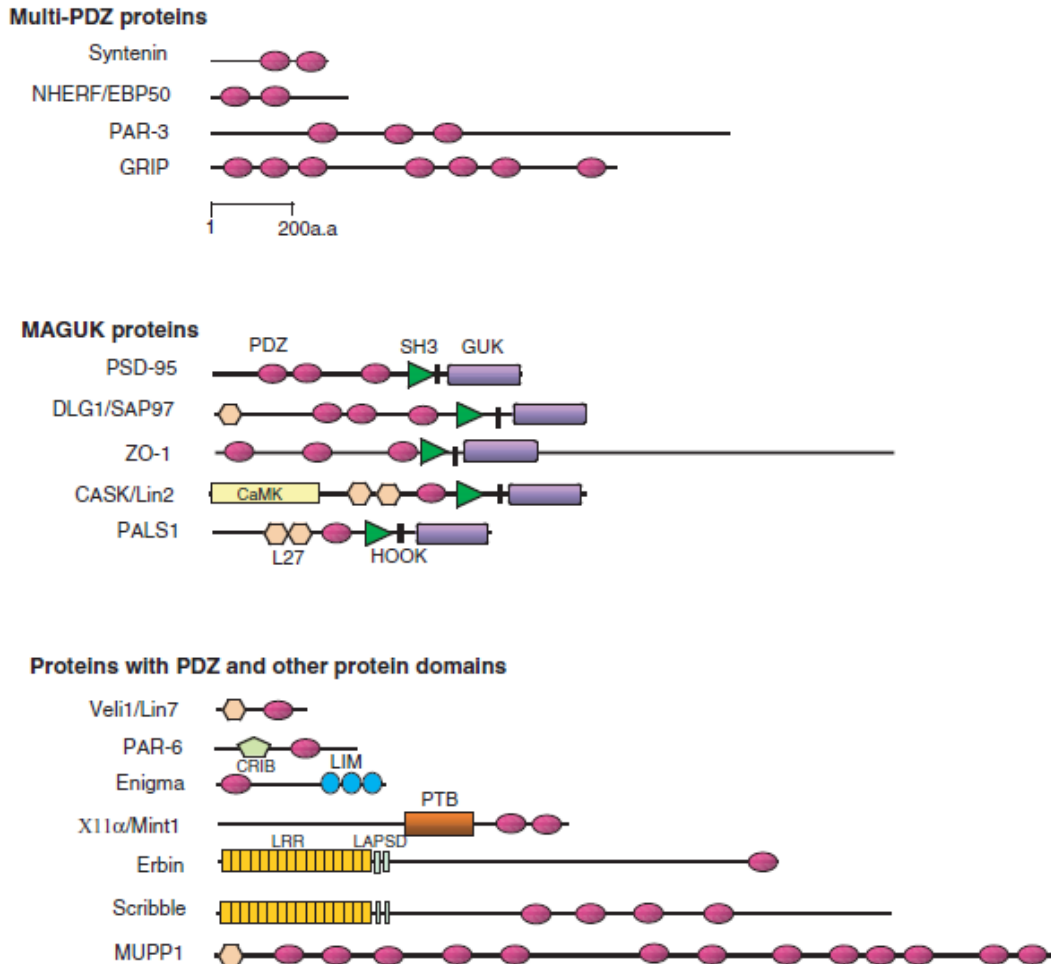


Abb. 1.2: Beispiele für PDZ Domänen Proteine und ihre Einteilung in drei verschiedene Familien. PDZ Domänen sind in pink dargestellt. SH3, Src homologe 3 Domäne; GUK, Guanylate-kinase-ähnliche Domäne; CaMK, Calmodulin Kinase Domäne; L27, Domäne die in den Rezeptortargetproteinen Cask oder Lin-2 und Veli oder Lin-7 vorhanden ist; LIM, ZinkbindeDomäne die in Lin-11, Isl-1, Mec-3 vorhanden ist; PTB, Phosphotyrosin Bindedomäne; LRR, Leucinreiche Repetitionen; LAPSD, LAP spezifische Domäne; CRIB, Cdc42/Rac interaktive Bindedomäne (entnommen aus (Nourry et al., 2003)). Mehr Informationen auf der Webseite: <http://www.mshri.on.ca/pawson/domains.html>.

Man kann PDZ Proteine in drei verschiedene Familien einordnen (Abb.1.2). Die erste Familie besteht aus Proteinen, die nur eine PDZ Domäne enthalten. Die zweite Familie sind die sogenannten MAGUKs (membrane-associated guanylate kinases). Zu ihnen gehören PSD-95, Dlg und ZO-1. Sie haben zusätzlich zu einer oder drei PDZ Domänen noch eine SH3 Domäne und eine Guanylat Kinase Domäne (GuK). Die dritte Familie besteht aus Proteinen, die zusätzlich zur PDZ Domäne noch andere Protein Domänen wie zum Beispiel LIM, PH, WW, DEP, L27 oder LRR Domänen besitzen. Ein Beispiel hierfür ist MUPP1 mit mehreren PDZ Domänen und einer einzelnen L27 Domäne am aminoterminalen Ende oder die LAP (LRR und

PDZ) Protein Familie, deren Mitglieder 16 LRR und eine bis vier PDZ Domänen tragen (zusammengefasst in: (Nourry et al., 2003)).

PDZ Domänen bieten eine vielfältige Möglichkeit, die Aktivitäten von Tyrosinkinase Rezeptoren und ihren Liganden zu spezifizieren, Signale von Oberflächenmolekülen ins Zellinnere zu leiten und die Zellpolarität aufrechtzuerhalten. Die Funktion der PDZ Domänen Proteine besteht allerdings nicht nur wie anfangs angenommen im Zusammenhalten von Proteinen in funktionellen Einheiten und der Aggregation von Rezeptoren an die Plasmamembran, sie bringen auch supramolekulare Komplexe in spezifischen subzellulären Kompartimenten zusammen.

1.6 Low risk HPVs

Low risk HPV Typen wie zum Beispiel HPV11 werden nur äußerst selten mit Gebärmutterhalskrebs assoziiert, trotzdem sind auch sie medizinisch von Bedeutung, da sie die Ausbildung von gutartigen Tumoren des respiratorischen oder des Anogenitratraktes hervorrufen können (Chan et al., 1995; Sinal und Woods, 2005). Im letzteren Fall handelt es sich um Genitalwarzen, auch Condylomata acuminata – Feigwarzen genannt. Genitalwarzen sind eine der häufigsten Geschlechtskrankheiten und betreffen 1-2 % der jungen Erwachsenen (zusammengefasst in Doorbar 2006).

Weiterhin gibt es verschiedene low risk HPV Typen, die mit Erkrankungen der Atemwege verknüpft sind. Die Rezidivierende Respiratorische Papillomatose (RRP) ist eine chronische Erkrankung der oberen Atemwege, die durch die low risk Typen 11 und 6 verursacht wird (Mounts et al, 1982; Gissmann et al., 1983). Diese gutartigen Läsionen findet man an den Stimmbändern, an der Epiglottis (Kehledeckel), aber manchmal auch an Oropharynx (Mundrachenraum), Nasopharynx (Nasendrachenraum), Subglottis (der untere Abschnitt des Kehlkopfes), Trachea (Luftröhre) und sogar am Lungenparenchym (Steinberg, 1990). Mit 4 bis 6 Fällen auf 100000 HPV infizierten Menschen ist diese Krankheit jedoch eher selten (Armstrong et al, 2000). Eine Reihe von früheren Untersuchungen beschäftigte sich damit, ob die Rezidivierende Respiratorische Papillomatose, hervorgerufen durch das HPV Typ 11, auch zu bösartigen Zellveränderungen (Kehlkopfkarcinomen) führen kann (zusammengefasst in (zur Hausen, 1999)). Heute geht man jedoch davon aus, dass nicht mehr als 5% der Kehlkopfkarcinome HPV positiv sind.

Auch wenn low risk HPVs im Gegensatz zu den high risk Typen nicht in der Lage sind, Zellen *in vitro* zu immortalisieren, so konnten doch Thomas J.T *et al* zeigen,

dass auch das low risk HPV11 Genom stabil als episomale DNA in transfizierten Keratinozyten behalten wird (Thomas et al., 2001).

Während das E6 Protein der high risk HPV Typen ein Onkoprotein darstellt, zeigt das E6 Protein der low risk Typen unter Zellkulturbedingungen keine onkogenen Eigenschaften. Zwar konnte eine Bindung der low risk E6 an die zelluläre E3 Ligase E6AP beobachtet werden (Brimer et al., 2007; Kuballa et al., 2007), jedoch ist dieser Komplex nicht in der Lage, p53 zum Abbau zu führen, woraus sich unter anderem die fehlenden Onkogenität der low risk E6 Proteine erklären könnte.

Der größte strukturelle Unterschied zwischen den high und low risk E6 Proteinen ist wie zuvor erwähnt das Fehlen der PDZ Bindedomäne am C-Terminus der low risk E6 Proteine. Dadurch fallen Proteine, die über ihre PDZ Domäne an die high risk E6 Proteine binden, als mögliche Interaktionspartner für die low risk E6 Proteine aus. Da das Vorhandensein der PDZ Bindedomäne für die Immortalisierung von Zellen durch high risk E6 notwendig ist, wäre das Fehlen dieser ein weiterer möglicher Grund, weshalb low risk E6 Proteine keine onkogenen Eigenschaften aufweisen.

Bis heute sind nur wenige Interaktionspartner der low risk E6 Proteine bekannt, wobei beinahe alle bisher gefundenen auch an die high risk E6 Proteine binden. So führt zum Beispiel die Bindung der low risk sowie der high risk E6 Proteine an das proapoptotische Mitglied der Bcl-2 Familie Bak zu dessen Abbau und zur Inhibierung der Bak-induzierten Apoptose (Banks et al., 1999). Weiterhin wurden der Zellzyklusregulator und Transkriptionsfaktor TRIP-Br1 (transcriptional regulator interacting with the PHD-bromodomain, "1"), G Protein pathway supressor 2 (GPS2), minichromosome maintenance complex component 7 (MCM7) und p73 als gemeinsame Interaktionspartner der high risk und low risk Typen identifiziert (Gupta, 2003, Kukimoto et al., 1998; Thomas und Banks, 1999; Degenhardt und Silverstein, 2001 Park et al., 2001). Für diese gemeinsamen Interaktionspartner gilt jedoch, dass sie alle besser an die E6 Proteine der high als der low risk HPVs binden und dass die physiologische Relevanz dieser Interaktion unklar bleibt.

Einen für das low risk HPV Typ 6 spezifischen Interaktionspartner für E6 fanden Degenhardt und Silverstein 2001 durch einen Yeast two hybrid Screen. Sie konnten zeigen, dass Zyxin, welches in Anwesenheit des low risk HPV6 E6 im Zellkern akkumuliert und als Transkriptionsfaktor fungiert, weder mit anderen low risk E6 noch mit high risk E6 interagiert (Degenhardt und Silverstein 2001).

1.7 Ubiquitin

Ubiquitin ist ein kleines 8,6 kDa Protein, das in Eukaryonten evolutionär hochkonserviert ist. Es besteht aus 76 Aminosäuren und kann über seinen C-Terminus, dem Glycin 76, an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes von Akzeptorproteinen oder anderen Ubiquitinmolekülen über Knüpfung einer Isopeptidbindung kovalent gebunden werden. Dieser posttranslationale Modifikationsprozess wird Ubiquitinierung genannt. Die Ubiquitinierung ist ein mehrstufiger katalytischer Prozess (Hershko et al., 1979), für den mindestens drei Enzyme benötigt werden:

E1 Enzyme (das menschliche Genom kodiert für zwei E1, UBA1 oder UBA6) sind Ubiquitin-aktivierende Enzyme, welche einen Thiolester mit der Carboxylgruppe von G76 bilden und dabei den C-Terminus von Ubiquitin für einen nukleophilen Angriff vorbereiten.

E2 (UBC; das menschliche Genom kodiert für ca. 40 E2s) sind konjugierende Enzyme, welche im zweiten Schritt das aktivierte Ubiquitinmolekül vom E1 in einer Transthoesterreaktion übernehmen.

E3 sind sogenannte Ligasen (das menschliche Genom kodiert vermutlich für mehrere Hundert E3s), welche das aktivierte Ubiquitin vom E2 auf den Lysinrest des Substrates oder ein weiteres Ubiquitin unter Bildung einer Isopeptidbindung übertragen (Übersicht: Laney und Hochstrasser, 1999; Pickart, 2001; Passmore und Barford 2004; Pickart und Eddins 2004).

Dieser „3-Schritt“ Mechanismus unterliegt nahezu allen bekannten Ubiquitinierungsreaktionen, unabhängig vom anschließenden Schicksal des Substrates.

Die Konjugation von Ubiquitin an andere Proteine reguliert eine Vielzahl von zellulären Funktionen. Am besten untersucht ist die durch Ubiquitinierung vermittelte selektive Zuführung von Proteinen zum proteasomalen Abbau (zusammengefasst in (Pickart, 2001)). Abbau ist jedoch nicht das einzige Schicksal für ubiquitinierte Proteine. Die Ubiquitinierung reguliert unter anderem ribosomale Funktionen (Spence et al., 2000), postreplikative DNA-Reparatur (Spence et al., 1995; Hofmann und Pickart 1999), Einleitung der Entzündungsantwort (Deng et al., 2000), Translation, Endozytose (Hicke, 2001), Proteintransport, Knospung von Viren und die Regulation einiger Transkriptionsfaktoren (Fischer, 2003).

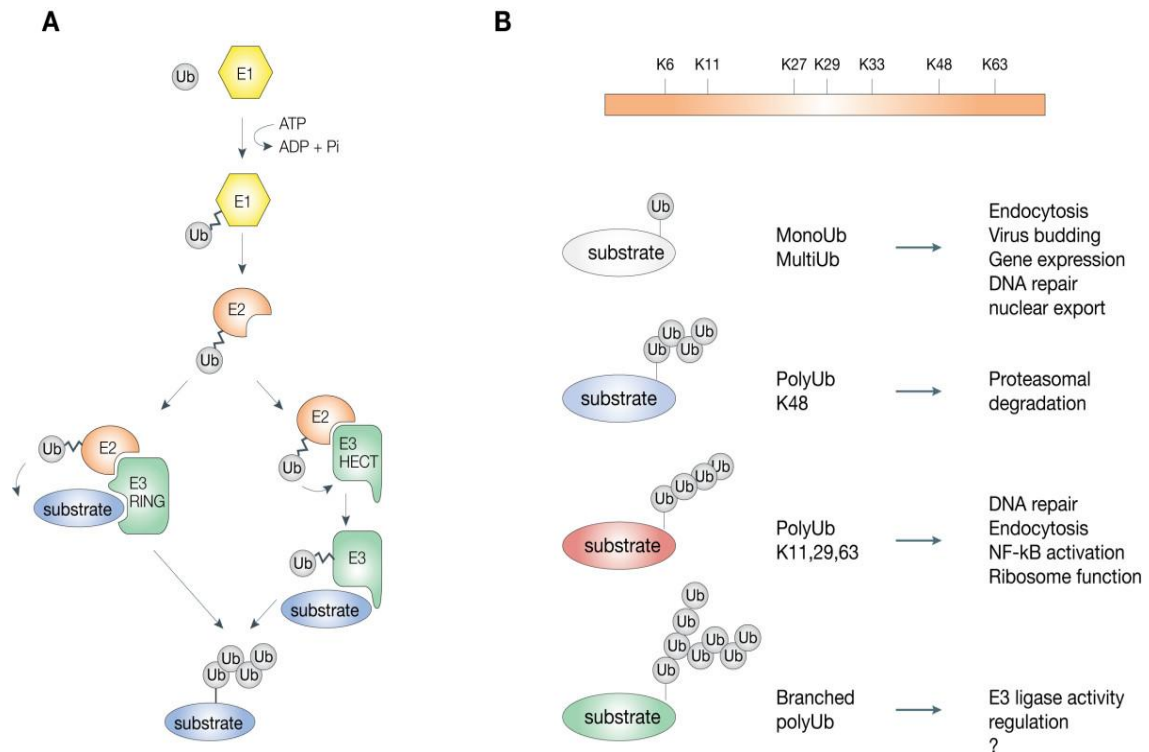


Abb. 1.3: Der Ubiquitin Signalweg. A) Schematische Darstellung der Ubiquitinierung. Für den Prozess werden drei Enzymtypen benötigt: Das Ubiquitin-aktivierende- (E1) sowie das Ubiquitin-konjugierende (E2) Enzym und die Ubiquitin-Protein Ligase (E3). Es sind die beiden Hauptklassen der E3 Enzyme dargestellt. B) Schematischer Überblick über die verschiedenen Formen der Ubiquitin Modifikationen und ihrer funktionellen Bedeutung (entnommen aus: Woelk et al., 2007).

Die Spezifität dieser Vielfalt an Funktionen wird zum Teil durch die Art der Ubiquitinketten sowie über die Verknüpfung der Ubiquitinketten an bestimmte Lysine des Ubiquitins bestimmt. Man unterscheidet hier zwischen Mono-, Multi- und Polyubiquitinierung.

Im Falle der Monoubiquitinierung wird ein einzelnes Ubiquitin an das Zielprotein gehängt. Dies ist zum Beispiel bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren (zusammengefasst in: (Muratani und Tansey, 2003)) und als Signal zur Methylierung der Histone H2A, H2B, H1 und H3 während der Meiose der Fall (Robzyk et al., 2000; Briggs et al., 2002).

Bei der Multiubiquitinierung werden mehrere einzelne Ubiquitine an ein Akzeptorprotein jedoch an unterschiedliche Lysinreste gebunden, während bei der Polyubiquitinierung das angehängte Ubiquitin selbst ubiquitiniert und so eine Ubiquitinkette am Akzeptorprotein gebildet wird.

Weiterhin unterscheidet man zwischen Lysin48 (K48), -63 (K63), -6 (K6), -11(K11) und -29 (K29) verknüpften Ketten. K48 verknüpfte Ketten stellen das Hauptabbausignal für Proteine durch das Proteasom dar. Dafür werden Ketten von

mindestens vier Ubiquitinen benötigt (Finley et al., 1994; Spence et al., 1995; Thrower et al., 2000). K63 verknüpfte Ketten hingegen scheinen nicht vom Proteasom für den Abbau erkannt zu werden, haben aber zum Beispiel eine Funktion bei der Stressantwort (Arnason und Ellison 1994), DNA Reparatur (Spence et al., 1995; Hofmann und Pickart, 1999) oder der Endozytose von Plasmamembranproteinen (Hicke und Riezman, 1996; Galan und Hagenauer-Tsapis, 1997). K29 verknüpfte Ubiquitine werden ähnlich den Lysin48 verknüpften Ubiquitinketten als Abbausignal erkannt. Dies konnte für die K6 und K11 Ketten bis jetzt nur *in vitro* gezeigt werden (Hicke und Riezman, 1996; Glickman und Ciechanover, 2002).

1.7.1 Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3s)

Wie zuvor erwähnt sind E3 Ligasen die größte Gruppe der Ubiquitinierungsenzyme. Sie sind der Übertragung des aktivierten Ubiquitins vom E2 auf einen Lysinrest des Substratproteins oder ein anderes Ubiquitin beteiligt. E3 Ligasen spielen aber vor allem eine wichtige Rolle bei der Substraterkennung und vermitteln so die Spezifität der Ubiquitinierung (Pickart, 2001; Passmore und Barford, 2004; Robinson und Ardley, 2004).

Man unterteilt die bekannten E3 Ligasen in drei Gruppen: Really Interesting New Gene (RING) Domänen Proteine, HECT Proteine und U-Box-Proteine.

1.7.2 RING (Really Interesting New Gene) Finger Proteine

RING Domänen E3 Ligasen bilden die größte Gruppe der E3 Ligasen, wobei die RING Domäne die Bindedomäne für E2s darstellt und so für die Funktionalität der E3 Ligasen wichtig ist. Hierbei handelt es sich um ein 40-60 Aminosäuren umfassendes spezialisiertes Zinkfinger-Motiv (Pickart, 2001). RING- Finger Proteine sind selbst nicht enzymatisch aktiv sondern fungieren als eine Art Adapter. Sie vermitteln die Bindung von Ubiquitin an das Substrat, indem sie Substrat und E2-Enzym räumlich aneinander annähern (Borden, 2000). Desweiteren können sie ihre eigene Ubiquitinierung (Autoubiquitinierung) vermitteln und somit ihre Halbwertszeit regulieren.

Die RING-Finger E3s werden in zwei Gruppen unterteilt. Mitglieder der monomeren RING-Finger Ligasen weisen die RING Domäne und Substraterkennungsdomänen auf einer Polypeptidkette auf. Sie können als Monomere aber auch als homomere oder heteromere Komplexe aktiv sein. Bei der zweiten Gruppe, den multimeren RING-Finger-Ligasen, handelt es sich um Multienzymkomplexe mit mehreren

Proteinen, die verschiedene Funktionen ausüben. Ein RING Finger Protein vermittelt hier die Bindung an das E2 während ein anderes Protein des Komplexes für die Substraterkennung zuständig ist. Beispiel für solche Komplexe sind die SCF-Komplexe (SKP1/Cullin/Fbox), welche unter anderem an der Ubiquitinierung von Cyclinen beteiligt sind (Deshaies, 1999).

1.7.3 U-Box E3s

Die U-Box Domäne ist ungefähr 70 Aminosäuren lang und hat strukturell große Ähnlichkeit zu der RING Domäne (Hatakeyama et al., 2001). Sie ist von der Hefe bis zum Menschen hochkonserviert (Hatakeyama und Nakayama, 2003). Beispiele für Proteine dieser Gruppe sind CHIP (Jiang et al., 2001), Ufd2 (Koegl et al., 1999) und CC4 (Hatakeyama et al., 2001).

1.7.4 HECT-Domänen Proteine (Homolog zum E6AP- Carboxyl-Terminus)

Das E6 assoziierte Protein E6AP ist zusammen mit dem viralen E6 Protein der high risk HPVs für die Bindung und Ubiquitinierung von p53 verantwortlich. Datenbankanalysen zeigten, dass der C-Terminus von E6AP zu 35-40% identisch zu ungefähr 30 anderen Proteinen im humanen Genom ist, für die zum Teil auch bereits Ligase Aktivität gezeigt werden konnte. Diese 350 Aminosäuren lange, C-terminale, konservierte Sequenz wurde HECT (Homolog zum E6AP- Carboxyl Terminus) Domäne genannt. Sie enthält den katalytisch aktiven Cysteinrest, welcher das zu übertragende Ubiquitin bindet (Huibregtse et al., 1995; Scheffner et al., 1995). Im Menschen sind mittlerweile ungefähr 50 verschiedene HECT E3s bekannt. Im Gegensatz zu den RING Domänen Proteine sind HECT Proteine katalytisch aktiv. Sie besitzen ähnlich den E1 und E2 Enzymen des Ubiquitinsystems einen aktiven Cysteinrest in ihrer HECT Domäne, welcher ein Thioesterintermediat während der Ubiquitinierung bildet (Huibregtse et al., 1995; Scheffner et al., 1995). Sie übernehmen so das aktivierte Ubiquitin von E2 und übertragen das gebundene Ubiquitin anschließend auf das Substrat oder ein weiteres Ubiquitin. Während der C-Terminus hochkonserviert ist, weist der N-Terminus der HECT-E3 Ligasen eine hohe Diversität auf, was darauf hinweist, dass über ihn die spezifische Erkennung und Bindung der Substrate erfolgt (Schwarz et al., 1998).

1.8 E6AP (E6 associated protein)

E6AP ist das Gründungsmitglied der HECT Familie und wurde ursprünglich als ein zellulärer Interaktionspartner des viralen E6 Proteins der high risk Papillomaviren entdeckt. Zusammen mit den high risk E6 Proteinen bringt es als E3-Ligase des Ubiquitinsystemes p53 zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau. Dieser Abbau von p53 findet jedoch nur in Anwesenheit von E6 statt. Die Bindestelle von E6 für E6AP befindet sich im Bereich der Aminosäuren 378-401 des E6AP, während für die Ubiquitinierung von p53 der gesamte Bereich von Aminosäure 266 bis 852 notwendig ist.

p53 ist nicht das einzige Zielprotein von E6 und E6AP. Zusätzlich gefundene Substrate für den E6/E6AP Komplex sind E6TP1 (high-risk human papilloma viruses E6 oncoproteins targeted protein 1) und NFX1-91, der hTERT Repressor, sowie verschiedene PDZ-Domänen enthaltende Proteine wie zum Beispiel hDlg und Scribble (Gao et al., 2001; Gardiol et al., 1999; Gewin & Galloway, 2001; Nakagawa & Huibregtse, 2000).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass E6AP nicht nur als E3 Ligase von E6 benutzt wird, sondern auch ein Zielprotein für E6 darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass E6 auch E6AP selber zur Autoubiquitinierung stimuliert und dadurch zum Abbau führt.

Unabhängig von seiner Funktion als virales Interaktionsprotein ist über die Funktion von E6AP im menschlichen Körper bisher nicht viel bekannt. E6AP scheint in allen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert zu werden, wird jedoch in Untereinheiten des Gehirns, speziell dem Hippocampus und den Purkinje Zellen, nur vom maternalen Allel exprimiert. Mutationen wie zum Beispiel große chromosomale Deletionen aber auch Punktmutationen im maternalen Allel des *UBE3A* Genes, welches für das Protein E6AP kodiert, führen zu einer schweren neurologischen Erkrankung, dem sogenannten Angelman Syndrom (AS). Patienten mit AS sind mental zurück geblieben, leiden unter Balance und Bewegungsschwierigkeiten und weiteren charakteristischen Verhaltensauffälligkeiten. Das *UBE3A* Gen kodiert für drei Isoformen von E6AP, die durch differentielles Splicing zustande kommen (Yamamoto et al., 1997). Sie unterscheiden sich in ihrem N-Terminus, aber es ist bisher noch nicht bekannt, ob sie auch unterschiedliche Funktionen in der Zelle haben.

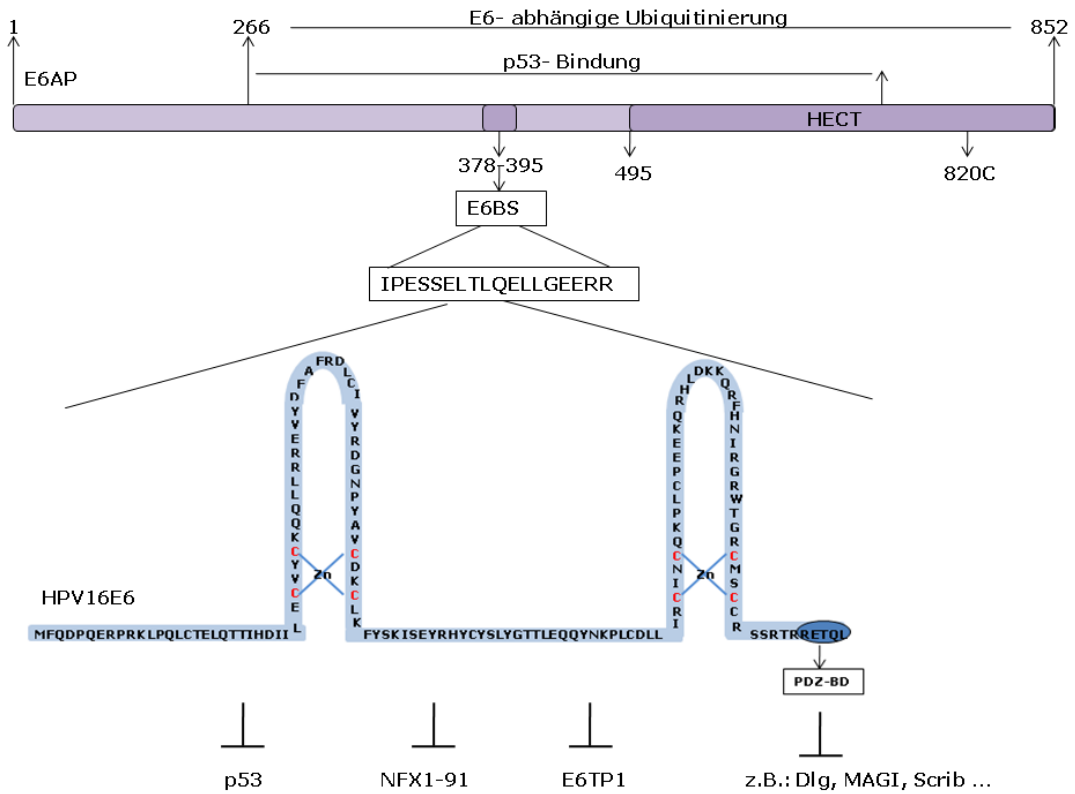


Abb. 1.4. Strukturelle und funktionelle Domänen von E6AP und E6. Schematische Darstellung von E6AP (auch als UBE3A bekannt). Eingezeichnet sind die E6 Bindestelle (E6 BS), die katalytische HECT Domäne, der für die Ligasefunktion wichtige Cysteinrest an Position 820. Am E6 sind die beiden Zinkbindedomänen und das C-terminale PDZ-Binde-Epitop gekennzeichnet. Weiterhin sieht man einige Zielproteine, die durch den E6/E6AP-Komplex inaktiviert werden.

1.9 Zielsetzung

Während über die Wirkungsweise der high risk HPV Typen in Wirtszellen bereits einiges bekannt ist, fehlen immer noch genauere Einblicke in die Wirkungsweisen der low risk HPV Typen. In dieser Arbeit konzentrieren wir uns auf das E6 Protein der HPV.

Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) Durch unterschiedliche Methoden sollten zelluläre Interaktionspartner für das HPV11E6 Protein identifiziert werden und diese Wechselwirkungen im Anschluss näher charakterisiert werden.
- 2) Der Einfluss von E6AP, einer mit E6 assoziierten HECT E3 Ligase, auf die HPV E6 Proteine sollte näher untersucht werden.
- 3) Die Wechselwirkung von HPV16E6 mit zwei neu identifizierten Interaktionspartnern sollte durch verschiedene biochemische Methoden untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primerliste

Oligo-Nr.	Sequenz	Schnittstelle	Protein
EW1	GGCCCATGGAGATGGAAAGTAAAGATGCC	5'Nco I	HPV11E6
EW2	GGCGGATCCTTAGGGTAACAAGTCTTCCAT	3'BamHI	HPV11E6
EW3	GGCGGATCCGATGGAAAGTAAAGATGCC	5'BamHI	HPV11E6
EW4	GGCGGTACCGGGTAACAAGTCTTCCAT	3'KpnI	HPV11E6
EW5	GGCGAATCCATGGCTTCGGGGCAAGGC	5'EcoRI	Bak
EW6	GGCGGATCCTTATGATTTGAAGAATCTTCG	3'BamHI	Bak
EW7	GGCGGATCCATGGCTTCGGGGCAAGGC	5'BamHI	Bak
EW8	GGCCTCGAGTTATGATTTGAAGAATCTTCG	3'XhoI	Bak
EW9	GGCCTCGAGTTACAGCTGGGT	3'Xho	HPV16E6
EW10	GGCCTCGAGTTAGGGTAACAA	3'Xho	HPV11E6
EW11	GGCGAATCCATGGAAAGTGCA	5'EcoRI	HPV6E6
EW12	GGCGGATCCTTAGGGTAACAT	3'BamHI	HPV6E6
EW13	CCACCACCATCACCATCAGC		6xHis
EW14	GAAGATCTTTACTTGTACAGC	3'BglI	EGFP
EW15	GGAATTCCATATGTGGAGCCA	5'Nde	Strep
EW16	GAAGATCTATGGCGTACCCAT	5'BglII	Ha
EW17	CGTCTAGATTACTCGGCATCC	3'XbaI	Keratin14 Fragment
EW18	CGGGATCCATGACCACCTGCA	5'BamHI	Keratin14 Fragment
EW19	CGGGATCCATGCAGATCGAAG	5'BamHI	Keratin16 Fragment
EW20	CGTCTAGACTAGGAGCTCTGG	3'XbaI	Keratin16 Fragment
EW21	GCGAATTCATGCAGATTAAG	5'BamHI	Threonyl- tRNAsynthetase
EW22	GCTCTAGACTAAAATTCTTCTT	3'XbaI	Threonyl- tRNAsynthetase
EW23	CGGGATCCATGAACCAGCCAG	5'BamHI	LNx
EW24	CGTCTAGACTATAAAAAAGTG	3'XbaI	LNx
EW25	CGTCTAGATTACTGTTCCACGC	3'XbaI	LNxPDZ13
EW26	CGTCTAGATTAACCTGGCGG	3'XbaI	LNxPDZ23
EW27	CGTCTAGATTATTTGACTTCCA	3'XbaI	LNxPDZ33
EW28	CGTCTAGATTAAGGCCAAGAA	3'XbaI	LNxPDZ33
EW29	CGGGATCCCAGGGCAGGGAA	5'BamHI	LNxPDZ15
EW30	CGGGATCCCATGTGATTCTCA	5'BamHI	LNxPDZ25
EW31	CGGGATCCGTGGTAAATATCC	5'BamHI	LNxPDZ35
EW32	CGGGATCCGATATTGTATTAC	5'BamHI	LNxPDZ45
EW33	CAGCAAAGCCTGCAAGGCGATGTGGCAGAT GAG		LNxmutC/A rev
EW34	CAGAGGCTTGATGAGGTCATCATCCACTTC		LNx-RINGrev
EW35	GACCTCATCAAGCCTCTGGTTCTGCAG		LNx-RINGforw
EW36	CTCATCTGCCACATCGCCTTGCAAGGCTTTG CTG		LNxmutC/Aforw
EW37	CCAGAGGAAGTGGATAAACTCCTCAAC		LNxforw_inner
EW38	CTTGTTGAGGAGTTTATCCACTTCCTC		LNxrev_inner
EW39	CGTCTAGATTACACTTCAGACACAGAAATC	3'XbaI	STAT1

EW40	CGGGATCCATGTCTCAGTGGTACGAACTTC	5'EcoRI	STAT1
EW41	CGTCTAGATTACTTGAACGCCTCCGGGATG	3'xbaI	NOTCH-ICN
EW42	CGGGATCCATGCGGCGGCAGCATGGCCAG	5'EcoRI	NOTCH-ICN
EW43	GGAATTCATGAACAAATTACG	5'EcoRI	Numb1
EW44	GCTCTAGATTAAGTTCAATTT	3'xbaI	Numb1

2.1.2 Verwendete Konstrukte

- pGEX2TK Konstrukte

HPV11E6 M.Scheffner
 HPV16E6 M.Scheffner
 HPV18E6 M.Scheffner
 HPV11C16 M.Scheffner
 HPV16C11 M.Scheffner

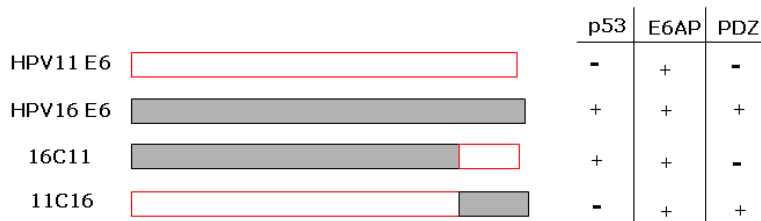


Abb. 2.1 Schematische Übersicht der verwendeten Chimärkonstrukte.

- Hefevektoren

pDBLeu
 pGADT
 pGBKT7

- pcDNA Konstrukte

HA E6AP M.Scheffner
 HA E6AP Δ BS M.Scheffner
 HA E6AP C820 A M.Scheffner
 Flag E6AP M.Scheffner
 Flag E6AP Δ BS M.Scheffner
 Flag E6AP C820 A M.Scheffner
 HAhDIg M.Scheffner

- sonstige Konstrukte

simut HAE6AP M.Scheffner
 simut HAE6AP Δ BS M.Scheffner
 simut HA E6AP C820 A M.Scheffner
 simut Flag E6AP M.Scheffner
 simut Flag E6AP Δ BS M.Scheffner
 simut Flag E6AP C820 A M.Scheffner
 pRc/CMV p53 M.Scheffner
 His Ubiquitin M.Scheffner

- DHFR-HA-Ub-HA Konstrukte

DHFR11E6 M.Scheffner
 DHFR16E6 M.Scheffner

2.1.3 Klonierte DNA Konstrukte

PlasmidNr.	pGEX2TK Konstrukte	Anmerkungen
	GST-SLIM	BamHI/XbaI
	GSTLNX	BamHI/XbaI
	GST LNX C48A	BamHI/XbaI
	GST LNX PDZ1	BamHI/XbaI
	GST LNX PDZ2	BamHI/XbaI
	GST LNX PDZ3	BamHI/XbaI
	GST LNX PDZ4	BamHI/XbaI
	GST11E6opt	BamHI/xbaI

PlasmidNr.	pcDNA HA 3.1 Konstrukte	Anmerkungen
	HA-HAX-1 pcDNA3.1	BamHI/xbaI
	HA- Keratin14 Fragment	BamHI/xbaI
	HA- Keratin16 Fragment	BamHI/xbaI
	HA-threonyl tRNA synthetase Fragment	BamHI/xbaI
	HA- 11E6 opt	BamHI/xbaI
	HA-SLIM	
	HA-Numb	EcoRI/xbaI

PlasmidNr.	pcDNA Flag 3.1 Konstrukte	Anmerkungen
	Flag-HAX-1 pcDNA3.1	BamHI/xbaI
	Flag-Keratin14 Fragment pcDNA3.1	BamHI/xbaI
	Flag-Keratin16 Fragment pcDNA3.1	BamHI/xbaI
	Flag SLIM pcDNA3.1	BamHI/xbaI
	Flag--threonyl tRNA synthetase Fragment pcDNA3.1	BamHI/xbaI
	Flag LNX pcDNA3.1	BamHI/xbaI

	Flag LNX mut	BamHI/xbal
	Flag LNX Δ 1-4	BamHI/xbal
	Flag LNX Δ 2-4	BamHI/xbal
	Flag LNX Δ 3,4	BamHI/xbal
	Flag LNX Δ 4	BamHI/xbal
	Flag LNX PDZ1-4	BamHI/xbal
	Flag LNX PDZ2-4	BamHI/xbal
	Flag LNX PDZ3,4	BamHI/xbal
	Flag LNX PDZ4	BamHI/xbal
PlasmidNr	Sonstige Konstrukte	Anmerkungen
.	DHFR StrepStrepHis11E6	pcDNA3.1
	StrepHisGFP	pcDNA3.1
	His11E6	pcDNA3.1
	11E6pGBKT7	Hefe
	16E6pGBKT7	Hefe
	16E6pPc97	Hefe
	11E6pDBLeu	Hefe
	DHFR LNX	pcDNA3.1
	DHFR SLIM	pcDNA3.1
	DHFR HAX-1	pcDNA3.1
	GFPLNXPZ1	BamHI/xbal
	GFPLNXPZ2	BamHI/xbal
	GFPLNXPZ3	BamHI/xbal
	GFPLNXPZ4	BamHI/xbal

2.1.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

- **Coomassie Blau-Färbelösung:**
2 g/l Coomassie Brilliant Blau R250 in Entfärberlösung
- **Cycloheximid:**
100 mg/ml in Methanol (Stock); 50 μ g/ml (Endkonzentration)
- **DNA-Probenpuffer für Agarosegele:**
60 % Saccharose (w/v); 0,25 M EDTA; Bromphenolblau
- **Entfärberlösung:**
40 % Methanol; 10 % Essigsäure
- **Fixierlösung:**
40 % Methanol; 10 % Essigsäure
- **Guanidin-Hydrochlorid-Lysepuffer:**
6 M Guanidin-HCl; 100 mM Na₂HPO₄, pH 8,0; 10 mM Imidazol; 10 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM PefaBloc; 1 μ g/ml Aprotinin + Leupeptin
- **Hypotoner Puffer:**
10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4; 20 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP; pH 7,4
- **Kernextraktionspuffer:**
4 g/l Saccharose; 40 mM HEPES-NaOH, pH 7,4; 1 mM MgCl₂; 1 mM ATP; pH 7,6

- **10x Lämmli-Laufpuffer für SDS-Gele:**
250 mM Tris/HCl, pH 8,4; 2 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
- **ONPG:**
4 mg/ml Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid in 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0
- **Puffer Z:**
100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 50 mM β -Mercaptoethanol
- **Sammelgelpuffer für SDS-Gele:**
0,5 M Tris/ pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
- **SDS-Probenpuffer nach Laemmli (2x):**
20 % Glycerin; 4 % SDS; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 200 mM DTT; 0,001 % Bromphenolblau
- **T₂₅ N₅₀:**
50 mM NaCl; 25 mM Tris/HCl, pH 7,6
- **50x TAE (Elektrodenpuffer für Agarosegele):**
2 M Tris; 950 mM Essigsäure; 50 mM EDTA
- **TNE-T (für Western Blot):**
10 mM Tris/HCl; 2,5 mM EDTA; 50 mM NaCl; pH 7,5; 0,1 % Tween 20
- **TNN-Lysepuffer:**
1 % NP40 (IGEPAL); 0,1 M Tris/HCL, pH 8,0; 0,1 M NaCl; 1 mM DTT;
1 μ g/ml Aprotinin + Leupeptin, 1 mM PefaBloc
- **Transferpuffer (für Western Blot):**
12,5 mM Tris; 100 mM Glycin; pH 8,3
- **Trenngelpuffer für SDS-Gele:**
1,5 M Tris pH 8,8; 0,4 % SDS

Hefearbeit:

- **Breakingbuffer:**
2 % Triton X-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM TrisHCl , pH 8; 1 mM EDTA
- **Lysepuffer**
197 μ l TNN; 1 mM DTT; 1 μ g/ μ l A/L; 1 mM Pefabloc; 1 mM Soy; 2 μ l PA)
- **YPAD Medium (1L):**
10 g Hefe Extract; 20 g Bacto Peptone; mit H₂O auffüllen auf 920 ml, autoklavieren und anschliessend 50 ml sterile 40%-ige Glucose und 2 ml steriles 100 mM Adenin dazugeben
- **SC Selektionsmedium (500mL):**

2,5 g Hefe N₂ Base; 7,5 g Ammoniumsulfat; 2 g Aminosäuremix (siehe unten); mit H₂O auffüllen auf 475 ml, autoklavieren und abschliessend 25 ml sterile 40 %ige Glucose dazugeben.

Hefe Transformationslösungen:

- **Lösung A:**
1 M Sorbitol; 10 mM Bicine; pH auf 8,35 einstellen, autoklavieren und anschliessend 3 % Ethylenglykol und 5 % DMSO dazugeben
- **Lösung B:**
40 % Polyethyleneglycol-1000; 200 mM Bicine; auf einen pH von 8,35 einstellen, anschliessend autoklavieren
- **Lösung C:**
150 mM NaCl; 10 mM Bicine; auf pH 8,35 einstellen und anschliessend autoklavieren

Hefetransformationslösungen nach Lithiumacetat Methode:

- **Lösung 1:**
1 Volumen 10xTE (100 mM Tris/10 mM EDTA ph 7.5); 1 Volumen 10 x LiAc (1M LiAc pH 7.5); 8 Volumen H₂O
- **Lösung 2:**
Volumen 10 x TE; 1 Volumen 10 x LiAc; 8 Volumen 50% PEG

Aminosäuren Zugabe für das Selektionsmedium:

Medium (ml)	30	50	100	250	500	1000
Uracil,H,L,W,K (ml)	0.24	0.4	0.8	2	4	8
Adenin (ml)	0.6	1	2	5	10	20

Aminosäurenkonzentration:

Name	Konzentration
Histidin (H)	100 mM
Leucin (L)	100 mM
Adenin (A)	100 mM

Tryptophan (W)	40 mM
Lysin (K)	40 mM
Uracil	20mM

Aminosäurenmix:

Name	Menge (Gramm)	Gesamt Menge (Gramm)
Alanin	1	1
Arginin	4	5
Asparagin	4	9
Aspartatsäure	4	13
Cystein	4	17
Glutamin	4	21
Glutamat	4	25
Glycin	4	29
Myo-Inositol	4	33
Isoleucin	4	37
Methionin	4	41
Para-amino Benzolsäure	0.4	41.4
Phenylalanin	4	45.4
Prolin	4	49.5
Serin	4	53.4
Threonin	4	57.4
Tyrosin	4	61.4
Valin	4	65.4

2.2 Methoden

2.2.1 *Escherichia coli* (*E.coli*)

Die Anzucht von *E. coli* Bakterien erfolgte in Übernachtkulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz bei 37°C und ausreichender Belüftung in einem Schüttler.

Zur Lagerung von Dauerkulturen (Glycerolstock) wurden 700 µl einer Übernachtkultur mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Eukaryotische Zellen

Säugerzellen wurden auf Polystyrol-Gewebekulturschalen (Greiner) in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer 5 %igen Kohlendioxid-Atmosphäre kultiviert. Alle Zelllinien wurden nach Standardmethoden passagiert. Zur Gefrierlagerung wurden Zellen von einer 90 % konfluenten Platte mittels Trypsin gelöst und bei 500-1000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (20 % FCS, 70 % Medium, 10 % DMSO) resuspendiert. Nach Portionierung auf zwei Kryoröhrchen wurden die Zellen für 2-3 h bei -20°C, anschliessend über Nacht bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurekonzentrationen wurden in einem Spektralphotometer (Bio-Rad Spektrophotometer 3000) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) in Quarzküvetten bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht ca. 50 µg doppelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren dient der Quotient OD_{260}/OD_{280} , der zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

DNA-Minipräparationen wurden aus 1,5 ml Bakterienübernachtkultur nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Jones und Schofield, 1990) durchgeführt. Zur Gewinnung größerer Mengen wurde das Plasmid-Midi-Präparations-Kit (NucleoBond PC100) der Firma Macherey-Nagel verwendet, wobei die Durchführung nach Herstellerangaben erfolgte.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

DNA wurde mittels PCR (polymerase chain reaction) amplifiziert. Für PCR-Fragmente, die anschließend kloniert werden sollten, wurde die TripelMasterTaq-Polymerase der Firma Eppendorf verwendet. Die Reaktionen erfolgten mit 100 ng Template nach Angaben des Herstellers.

Mutagenese-PCRs wurden nach dem Protokoll Quick Change der Firma Stratagene durchgeführt. Nach erfolgter PCR wurde zur Entfernung der „template“-DNA der Ansatz für 1 h bei 37°C mit 1 µl DpnI versetzt. Danach wurde ein Aliquot in kompetente *E. coli* transformiert.

2.2.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

2- 5 µg DNA wurden nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs oder Invitrogen) im Wasserbad mit den jeweiligen Restriktionsenzymen und den entsprechenden Pufferbedingungen inkubiert.

2.2.7 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in einem 0,8- 2 %-igen TAE-Agarosegel mit einem Zusatz von 1 µg/ml Ethidiumbromid. Dazu wurden die zu analysierenden DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Als DNA-Größenstandard wurde *HindIII* restringierte λ-DNA eingesetzt (DNA Größenmarker von Fermentas)

2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit Nucleospin der Firma Macherey und Nagel nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten unter Verwendung von Reaktionspuffer und T4-DNA-Ligase der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers in 20 µl Ansätzen.

2.2.10 Präparation CaCl₂ kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine 10 ml Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes wurde in eine 200 ml Hauptkultur überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 auf einem Schüttler bei 37°C

inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (4000 g, 15 min, 4°C) und das Pellet in 20 ml eiskalten TSS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 500 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.11 Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurde eine 10 ml über Nacht Kultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und 24 h später in 1 l LB-Medium überimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6- 0,7 wurden die Zellen geerntet (4000 g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem, sterilem H₂O und in 20 ml steriler 10 %iger Glycerinlösung gewaschen. Danach wurde das Pellet in 2,5 ml 10 % Glycerinlösung resuspendiert, in vorgekühlte Reaktionsgefäße (je 200 µl) aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.12 Transformation in CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen

100 µl CaCl₂-kompetente *E. coli* Zellen wurden mit 4 µl Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 1 min bei 42°C. Auf Eis erfolgte eine Zugabe von 500 µl SOC-Medium. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert, auf LB-Selektivagarplatten ausplattiert und ca. 14 h bei 37°C kultiviert.

2.2.13 Transformation in elektrokompetente *E. coli*-Zellen (Elektroporation)

Elektrokompetente Zellen (50 µl) wurden mit 2 µl Ligationsansatz versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm, BioRad) überführt. Der Stromimpuls erfolgte durch die Entladung einer Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37°C inkubiert und auf LB- Selektivagarplatten ausplattiert.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten durch die Firma GATC in Konstanz.

2.2.15 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression von GST-Fusionsproteinen (pGEX-Konstrukte) erfolgte in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) oder BL21-RIL. Es wurde eine über Nacht Kultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und für 16 h bei 37°C im

Schüttler inkubiert. Daraus wurde eine Hauptkultur auf eine OD_{600} 0,1 verdünnt, welche bei einer OD_{600} von 0,6 mit 0,4 mM IPTG induziert und für weitere 3-4 h inkubiert wurde. Im Folgenden wurden die Bakterien geerntet (4000 g, 10 min, 4°C), in PBS/1 % TritonX100 (im Fall von GST-LNX unter Zugabe von Proteaseinhibitoren) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung (Sonifier W-250 Branson, 3 x 20 Pulse) unter Eiskühlung aufgebrochen.

Nichtaufgebrochene Zellen und unlösliche Proteine wurden bei 15.000 g im SS34-Rotor zentrifugiert.

2.2.16 Herstellung von baculo E6AP

E6AP wurde im Baculovirussystem in High Five Insektenzellen exprimiert. Hierfür wurden Zellen mit Virusstocklösung (Titer ca 10^8 Partikel/ml) infiziert und für 48 h bei 27°C inkubiert. Nach einer Zellyse in TNN und einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand über Anionenaustausch- oder Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das so gewonnene E6AP wird im Folgenden als Baculo E6AP bezeichnet.

2.2.17 *In vitro* Translation

Die Proteinsynthese *in vitro* wurde in RRL (Kaninchen-Retikulozytenlysat) oder in WG (Weizenkeimlysat) mit dem TNT-*in vitro* Translationskit der Firma Promega in Gegenwart von [35 S]-Methionin für 1,5 h bei 30°C gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.18 Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden wie oben beschrieben exprimiert und lysiert. Der 15.000 g Überstand wurde entsprechend der Ausgangskultur mit Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Bioscience), welche in PBS/1 % TritonX-100 vorequibriert wurden, inkubiert. Die Inkubation erfolgte meist 1 h bei Raumtemperatur, in seltenen Fällen (GST-LNX) auch über Nacht bei 4°C im Rotationsschüttler. Anschließend wurde die Sepharose bei 500-1000 g präzipitiert und 4 Mal mit je 10 ml PBS/1 % TritonX-100 gewaschen. Die gewaschene Sepharose wurde entweder direkt für GST-Kopräzipitationsassays eingesetzt oder das GST-Fusionsprotein wurde von der Sepharose eluiert. Zur Elution wurde die Sepharose zunächst in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 umgepuffert und dann mit einem 10 mM Glutathion-Puffer (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; reduziertes Glutathion von der Firma Sigma) für 10 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Es wurde 4 Mal mit 100 μ l eluiert und die Hauptfraktionen vereinigt.

2.2.19 Codonoptimierung der HPV11E6DNA zur Verbesserung der Proteinexpression

Score = 292 bits (152), Expect = 7e-76
 Identities = 316/398 (79%), Gaps = 0/398 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 42  CAGTTGTGCAAACACGTTTAACTTTTCTTTGCACTCTGCARATTCAGTGCGTGTTTTGC
101
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 99  CAGCTGTGCAAACCTTTAACTGAGCCTGCATACCTGCAGATTCAGTGCGTGTTTTGC
158

Query 102 AGGAATGCACCTGACCACCGCAGAGATATATGCATATGCCATAAGAACCTTAAGGTTGTG
161
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 159 CGTAAACGCGCTGACCACCGCGAAATTTATGCGTATGCGTACAAAAACCTGAAGGTTGGT
218

Query 162 TGGCGAGACAACTTTCCTTTGCGAGCGTGTGCCGTGTGCTTAGAACTGCAGGGAAAATT
221
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 219 TGGCGTGATAACTTTCCTTTGCGGCGTGTGCCGTGTGCTTAGAACTGCAGGGAAAATT
278

Query 222 AACCAATATAGCACTTTAATTATGCTGCATATGCACCTACAGTGAAGAAGAAACCAAT
281
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 279 AACCAATATAGCACTTTAATTATGCTGCATATGCACCTACAGTGAAGAAGAAACCAAC
338

Query 282 GAAGATATTTTAAAAGTGTTAATTCGTTGTTACCTGTGTCACAAGCCGTTGTGTGAAATA
341
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 339 GAAGATATCCTGAAAAGTGTGAATTCGTTGTTACCTGTGTCACAAGCCGTTGTGTGAAATA
398

Query 342 GAAAAACTAAACACATATTGGGAAAAGGCAACGCTTCATAAACTTAAATAACCAAGTGAAG
401
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 399 GAAAAACTGAAACACATTTCTGGGAAAAGGCAACGCTTTTATTAAACTGAAACAACCAAGTGAAG
458

Query 402 GTCGTTGCTTACACTGCTGGACAACATGCATGGAAGA 439
      || ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 459 GTCGTTGCTTCAATTGCTGGACAACATGCATGGAAGA 496
    
```

Abb. 2.2 Codonoptimierung von HPV11E6 für die Expression in humanen Zellen. Durchgeführt von der Firma GENEART (Regensburg, D). Ersetzte Nukleotide sind grau markiert.

Proteinexpression wird oft durch selten vorhandene tRNA Pools limitiert. Um Proteinexpressionen zu erhöhen, können diese selten benutzten Codons durch für die gleiche Aminosäure codierende aber in Zellen häufiger gefundenene Codons ersetzt werden. Die Codonoptimierung für HPV11E6 sowohl für die bakterielle Expression in *E. coli* als auch für eine Expression in menschlichen Zellen wurde von der Firma GENEART (Regensburg, D) durchgeführt. Die erhaltenen cDNAs wurden anschliessend in den Vektor pGEX2TK für die Expression in Bakterien und in pcDNAHA für die Expression in humanen Zellen kloniert.

2.2.20 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970). Je nach molarer Masse der aufzutrennenden Proteine wurde die Prozentigkeit des Trenngels (von 5 % bis 15 %) variiert. Die Prozentigkeit des Sammelgels lag stets bei 5 %. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in SDS-Probenpuffer nach Laemmli für 5-10 min bei 100°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte in Laemmli-Laufpuffer bei konstanten 50 mA, wobei die Spannung auf 250 V begrenzt wurde. Die Zusammensetzung aller hier genannten Puffer ist unter 2.1.3 angegeben. Die aufgetrennten Proteine konnten im Folgenden durch Coomassiefärbung oder Fluorographie sichtbar gemacht oder auf PVDF-Membran „geblottet“ werden.

2.2.21 Coomassie Blau Färbung von Proteinen

Die Färbung erfolgte mit Coomassie-Brilliant Blue-Lösung (Serva, Heidelberg) für 1-2 h oder mit einer kolloidalen Coomassiefärbelösung (Firma Roth, Karlsruhe) über Nacht nach Herstellerangaben. Die Entfärbung des mit Coomassie-Brilliant Blue gefärbten Gels erfolgte in Entfärberlösung (2.1.3).

2.2.22 Fluorographie

Nach Auftrennung von [³⁵S]-markierten Proteinproben in der SDS-PAGE, wurde das Gel für 15 min in Fixierlösung und anschließend für 15 min in Amplify-Lösung (Amersham, Biosciences) inkubiert. Die Gele wurden bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet. Die Fluorographie erfolgte durch Exposition von Phosphorimagerplatten (FUJI) für 2-24 h und Auslesung durch Verwendung des Phosphorimagers (FUJI BAS 2500) und der AIDA-Software 4.06 (Ray-Test).

2.2.23 Western-Blot und Immunodetektion

Der Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) erfolgte unter Verwendung einer Blotkammer (Firma Biorad Laboratories GmbH, München). Die Blotdauer betrug 90 Minuten bei 60 Volt in Transferpuffer. Anschließend wurde die Membran für 1 h in 5 %-iger Magermilch in TNE-T inkubiert. Die danach folgende Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in TNE-T für 1 h bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Membran mit TNE-T erfolgte die Inkubation mit einem Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelt) ebenfalls für 1 h. Nach weiterem Waschen mit TNE-T wurde nach Herstellerangaben (Amersham

Bioscience) eine ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence) durchgeführt. Das Sichtbarmachen der Banden erfolgte durch Verwendung des Imagersystems FUJI LAS 3000.

2.2.24 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen wurden mit Hilfe des BioRad Protein-Assays nach Herstellerangaben bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektralphotometer (SmartSpec 3000) durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde BSA verwendet.

2.2.25 GST Pulldown zur Identifizierung neuer Interaktionspartner

2 l Bakterienkultur wurden für die GST11E6 Expression und 400 ml für die GST Expression in BL21 RIL hochgezogen (2.2.15). Die Proteine wurden wie unter 2.2.18 beschrieben an 225 µl Glutathionsepharose gebunden und aufgereinigt. In Abbildung 3.23A sind 5 µl davon mit Probenpuffer aufgekocht auf einem Coomassie gefärbten SDS Gel zu sehen. Da von dem GST Protein mindestens doppelt soviel Protein vorhanden war wie von dem GST 11E6 wurde zu der GST Probe nochmal 220 µl unbeladene Glutathionsepharose dazugegeben um eine Angleichung zu erhalten.

H1299 Zellen von 27 Schalen mit einem Durchmesser von 15 cm, die zu 90 % konfluent waren, wurden mittels Spatel von den Schalen gelöst und in 15ml Lysepuffer (siehe 2.1.3) im Kühlraum bei 4°C für drei Stunden lysiert. Das Zelllysat wurde bei 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit 220 µl Glutathionsepharose für einen „Preclear“ drei Stunden im Kühlraum auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 600 rpm wurde das vorgereinigte Zelllysat von der Sepharose getrennt und im Anschluß auf zwei Portionen aufgeteilt, wovon die eine mit 220 µl GST beladener Sepharose und die zweite Portion mit 220 µl GST11E6 beladener Sepharose über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert.

2.2.26 Tandem Affinity Purification

Ausgangsvektor war ein in der Arbeitsgruppe bereits vorhandener pcDNA Vektor mit Strep-Tag. Mit Hilfe von Primern (siehe 2.1.1) wurde hinter diesen ein 6-facher His Tag kloniert, so dass die exprimierten Proteine C-Terminal Strep-6xHis getagt sind. Für den Versuch wurden die Konstrukte Strep-6xHis-EGFP (im Folgenden SHGFP genannt) und Strep-Strep-6xHis-11E6 (im Folgenden SSH11E6 genannt) mittels DOTAP nach Angaben des Herstellers in H1299 Zellen (5 x 15 cm Platten)

transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und über eine StrepTactin Säule nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Vom Durchfluss (Flow through) wurden 0,1%, von dem ersten Waschschrift 0,4%, von den folgenden Waschschriften und allen Elutionsfraktionen jeweils 4% auf ein SDS Gel geladen und aufgetrennt. Die Eluate, in denen SHGFP und SSH11E6 vorhanden war wurden mit NiNTAMatrix inkubiert, diese präzipitiert, 4 mal mit TNN gewaschen über ein SDS PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

2.2.27 GST-Pulldown

GST-Kopräzipitationsassays wurden zum Nachweis von Proteininteraktionen *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurden GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose aufgereinigt. Um vergleichbare Mengen von GST-Proteinen an der Sepharose zu haben, wurde meist das Kulturvolumen variiert. Der Angleich erfolgte durch ein „Coomassie-Gel“.

Zu 5-10 µl der mit GST-Fusionsprotein gekoppelten Sepharose wurden mit 10 µl [³⁵S]-markiertes *in vitro* Translatat des putativen Bindungspartners hinzugeben. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 200 µl. Der Bindepuffer setzte sich aus einer 4+1 Mischung von T₂₅N₅₀ und TNN-Lysepuffer mit 1 mM DTT sowie bakteriellem Lysat zusammen. Die Ansätze wurden im Rotationsschüttler für 3-4 h bei 4°C inkubiert, im Folgenden die Sepharose durch Zentrifugation abgesetzt und 4 mal mit je 1 ml TNN-Puffer mit 1 mM DTT gewaschen. Die gewaschenen Präzipitate wurden in 2x Laemmli-Probenpuffer bei 100°C für 5-10 min gekocht. Als Inputkontrolle wurden 2 µl des jeweiligen *in vitro* Translatates mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE erfolgte der Nachweis des radioaktiv markierten Bindungspartners über Fluorographie.

2.2.28 *In vitro* Ubiquitinierungsversuche

Für *in vitro* Ubiquitinierungsversuche wurden jeweils 1-2 µl vom *in vitro* Translatat des Ubiquitinierungssubstrats in Gegenwart von 8 µg Ubiquitin, 50 ng aus Insektenzellen exprimiertem E1, 200 ng bakteriell exprimiertem Ubc8 bzw. UbcH5 und UbcH7 und gegebenenfalls mit 1 µg in Insektenzellen exprimiertem E6AP inkubiert. Zusätzlich enthielten die Ansätze 5 mM DTT, 2 mM Mg-ATP und 2 mM MgCl₂ und wurden mit T₂₅N₅₀ auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für 2 h. Danach wurden die Proben in Laemmli-Probenpuffer aufgekocht elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.20) und mittels Fluorographie (2.2.22) sichtbar gemacht.

Für *in vitro* Ubiquitinierungsassays mit anschließender Coomassie-Färbung wurde der Ansatz verdreifacht (Gesamtvolumen 120 µl). Als Ubiquitinierungssubstrat wurden ausreichende Mengen (ca. 10 µg) eines GST-Fusionsproteins eingesetzt.

In vitro Ubiquitinierungsassays mit RING-Finger-Ligasen wurden analog durchgeführt, abweichend wurden jeweils 20 µg Ubiquitin, nur bakteriell exprimiertes Ubch5 als E2 (200 ng) und 1 mM DTT in einem Volumen von 40 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C.

2.2.29 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Für transiente Transfektionen wurden H1299-Zellen in 6 cm Gewebekulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 90-95 % nach Herstellerangaben mittels Lipofectamine (Invitrogen) oder Turbofect (Fermentas) transfiziert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden 5-10 % der Gesamt-DNA-Menge eines für β-Galaktosidase kodierenden Expressionsplasmid transfiziert.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Spatel abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4000 g geerntet und das Zellpellet in 150-200 µl TNN-Puffer mit Proteaseinhibitoren (Pefabloc, Aprotinin, Leupeptin) für 30 min auf Eis lysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 16 000 g für 30 min bei 4°C. Der dabei gewonnene Überstand wurde entweder für eine Koimmunpräzipitation eingesetzt oder direkt mit Laemmli-Probenpuffer versetzt.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und zum Angleichen der einzelnen Proben untereinander wurden 5-10 µl des Lysats in Doppelbestimmungen eingesetzt, um die β-Galaktosidase-Aktivität zu bestimmen. Auf Eis wurden zu dem Lysat in einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte jeweils 120 µl Puffer Z (2.1.3) und 5 µl ONPG zugegeben, gemischt und lichtgeschützt bei 37°C bis zu einer sichtbaren Gelbfärbung (15-30 min) inkubiert. Die Absorption wurde in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Als Nullwert diente das Lysat untransfizierter Zellen.

Das DHFR-Ubiquitin-Fusionssystem wurde zur Bestimmung eines potentiellen Proteinabbaus verwendet. Hierfür wird die cDNA des Proteins von Interesse (Protein xy, Abb.2.3) hinter ein DHFR-HA-Ubiquitin-HA- kodierendes Konstrukt kloniert. Bei der Transfektion in humanen Zellen wird ein Fusionsprotein exprimiert, welches am Ubiquitin gespalten wird, so dass gleiche Mengen DHFR-HA und HA-ProteinXY in den Zellen vorhanden sind.

2.2.30 Proteinabbaubestimmung mittels DHFR-Ubiquitininfusionskonstrukte

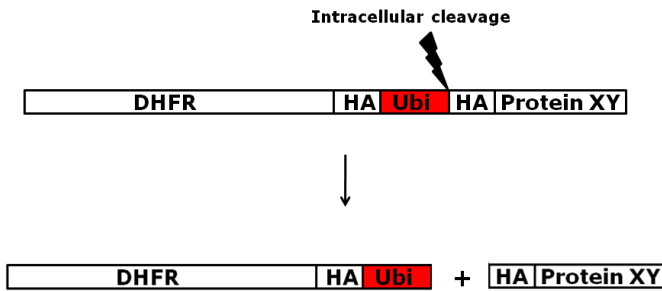


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des DHFR-Ubiquitin-Fusionssystems: DHFR, Dihydro Folat Reduktase; HA; Häm Agglutinin

Bei DHFR handelt es sich um ein stabiles Protein, so dass ein Mengenvergleich von DHFR-HA zu HA-ProteinXY eine Aussage darüber erlaubt, ob das Protein von Interesse in Zellen abgebaut wird. In dieser Arbeit wurden folgende Proteine in diesem DHFR System verwendet: SLIM, LNX, HAX-1, HPV16E6, HPV11E6 und HPV11C16.

2.2.31 His-Ubiquitinierungsassays *in cellulo*

Zur Transfektion für *in cellulo* His-Ubiquitinierungsassays wurden pro Ansatz zwei 6 cm H1299 Zellkulturschalen verwendet. Pro Schale wurden jeweils 5 µg eines für His-Ubiquitin kodierenden Expressionsplasmids mittels Lipofectamine, sowie 3-4 µg des für das Ubiquitinierungssubstrat kodierenden Proteins und 500 ng eines β-Galaktosidasekonstruktes transfiziert. Sollte der Einfluss eines weiteren Proteins untersucht werden, wurden noch zusätzlich dessen Expressionskonstrukt oder zur Kontrolle der entsprechende Leervektor transfiziert. Es wurde jeweils 1 µg DNA mit 2,5 µl Lipofectamine verwendet. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und gewaschen. Das Pellet von Zellen zweier 6 cm Platten wurde in 400 µl PBS resuspendiert und 40 µl davon in ein neues Reaktionsgefäß überführt und präzipitiert. Die Lyse erfolgte in 40 µl TNN-Puffer (2.1.3). Die Transfektionseffizienz wurde über die β-Galaktosidaseaktivität bestimmt und nach dieser entsprechend die Volumina der restlichen in PBS resuspendierten Zellen angeglichen. Die so angeglichenen Zellmengen wurden pelletiert und in 500 µl Guanidin-Hydrochlorid-Lysepuffer (2.1.3) für 30 min auf Eis lysiert, 30 µl Protein A-Sepharose (in GuHCl-Puffer gewaschen) pro Ansatz hinzugegeben („Preclear“) und es erfolgte eine Inkubation für 1 h auf einem Rotationsschüttler bei 4°C. Die Sepharose und die restlichen Zelltrümmer wurden anschließend abzentrifugiert (15 000 g, 5 min, 4°C, Eppendorf-Mini-Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß

überführt, mit 50 µl Nickel-NTA-Agarose (in GuHCl-Puffer gewaschen; Qiagen) versetzt und über Nacht bei 4°C im Rotationsschüttler inkubiert. Die Ansätze wurden abzentrifugiert (16.000 g, 5 min) und das Präzipitat zweimal mit je 1 ml GuHCl-Puffer gewaschen. Für weitere Waschschrte wurde der GuHCl-Puffer im Verhältnis 1:5 mit 50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20 mM Imidazol verdünnt. Es wurde wiederum zweimal mit je 1 ml gewaschen. Die letzten 2 Waschschrte erfolgten mit unverdünnten 50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 20 mM Imidazol-Puffer. Abschließend wurden die Präzipitate mit zweifach Laemmli-Probenpuffer mit 200 mM Imidazol versetzt und 10 min bei 100°C aufgeköcht. Die Proben wurden elektrophoretisch in der SDS-PAGE (2.2.20) aufgetrennt und im Westernblot (2.2.23) analysiert.

2.2.32 Immunfluoreszenz

H1299 Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, mittels Lipofectamin nach Angaben des Herstellers transfiziert und nach 24 Stunden Kultivierung mit Aceton fixiert, mit Methanol permeabilisiert und laut den Vorgaben von Chen und Mitarbeitern für eine indirekte Immunfluoreszenz behandelt (Chen et al. 2002). Für eine Detektion von Flag und HA getagten Proteinen wurden monoklonale Maus anti-Flag oder HA Antikörper verwendet. Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Red mit dem vom Hersteller angegeben Protokoll gefärbt (Invitrogen). Der Farbstoff liegt zunächst in einer reduzierten, nicht fluoreszierenden Form vor und wird in Mitochondrien angereichert und durch Oxidation in die fluoreszierende Form umgesetzt. Als Zweitantikörper wurden Alexa Fluor Antikörper von Invitrogen verwendet. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPIReagenz (DAPI = 4', 6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid, Mobitec).

2.2.33 Hefearbeit

2.2.33.1 Isolation von DNA aus Hefezellen

1,5 ml Übernacktkultur wurden in 200 µl Breakingbuffer mit 200 µl Glasperlen und 200 µl Phenol : Chloroform durch vortexen (5-10 Minuten) aufgebrochen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 14 000 rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 ml 100% EtOH dazugegeben. Es folgte eine Fällung für 20-30 Minuten bei -20°C und eine erneute Zentrifugation bei 14 000 rpm für 5 Minuten. Anschließend wurde zu der gefällten DNA 400 µl H₂O mit zugesetzter RNase A (10 µg/µl) dazugegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C für 5 Minuten

wurde erneut 1 ml 100%EtOH mit 10µl 3M NH₄ Acetat dazugegeben und die DNA bei -20 °C gefällt.

Nach einem abschließenden Zentrifugationschritt, wurde die DNA noch einmal mit 70% EtOH gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl TE Puffer (pH 8) resuspendiert.

2.2.33.2 Proteinexpressionstest in Hefen

Eine Übernachtskultur Hefe wurde in 10 ml YPAD Medium auf eine OD von 0.2 verdünnt und für 5-6 Stunden bei 30°C wachsen gelassen. Anschließend wurden die ODs der einzelnen Proben gemessen und diese aneinander angeglichen. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 3500 rpm wurden die Pellets in 200 µl Lysepuffer resuspendiert, 2/3 Volumen Glasperlen dazugegeben und die Proben im Kühlraum für 10 Minuten gevortext. Anschliessend wurde in das Eppendorfgefäß mit einer Kanüle ein Loch in den Boden gebohrt, dieses auf ein zweites Eppendorfgefäß gestellt und vorsichtig für einige Sekunden zentrifugiert. Der Überstand der sich im unteren Eppendorfgefäß befindet wurde für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abschließend mit Laemmli Ladepuffer versetzt und auf einem SDS Gel analysiert.

2.2.33.3 Hefe Transformation nach LiAc Methode

Die LiAc Transformation wurde nach Agatep et al 1998 durchgeführt (siehe auch <http://tto.trends.com>).

10 ml YAPD wurden mit einer Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0.2 angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 1 wachsen gelassen. Anschliessend wurden die Zellen bei 3600 rpm 5 Minuten zentrifugiert und mit 10 ml H₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml H₂O gewaschen, erneut zentrifugiert und mit 1 ml der Lösung 1 gewaschen. Nach einer abschließenden Zentrifugation wurde das Pellet in 50 µl Lösung 1 resuspendiert. Es wurden Plasmid, 4 µl Einzelstrang DNA (2 mg/ml) (Heringsperma-DNA vor Benutzung 5 Minuten bei 98°C aufgeköcht, anschließend sofort auf Eis gelagert) und 399 µl Lösung 2 dazugegeben und die Zellen bei 30°C für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 10 Minuten. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml H₂O gewaschen, in 100 µl TE Puffer resuspendiert und auf Agarplatten ausplattiert.

2.2.33.4 Herstellung kompetenter Hefezellen (für 100ml Kultur)

100ml YPAD Medium wurde mit einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0.2 angeimpft, bei 30°C bis zu einer OD_{600} von 0,8 wachsen gelassen und anschließend bei 3500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Lösung A resuspendiert und in 200 µl Aliquots bei -80°C weggefroren.

2.2.33.5 Transformation kompetenter Hefezellen

2 µl DNA wurden zu 200 µl kompetenten Hefezellen gegeben. Diese wurden für 5 Minuten bei 30 °C geschüttelt. Im Folgenden wurden 1,5 ml Lösung B dazugegeben und vorsichtig gekippt. Nach einer einstündigen Inkubation in einem 30°C warmen Wasserbad, wurden die Zellen 5 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert, das Pellet in Lösung C gewaschen, wieder herunterzentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet in dem verbleibenden Restvolumen resuspendiert und zum Schluss ausplattiert.

2.2.33.6 Yeast Two Hybrid Screen

Der Screen wurde über die gängige und oben bereits beschriebene LiAcMethode nach Agatep et al (Agatep, 1998) durchgeführt. Für den Screen wurde der Hefestamm AH109-Met (D.Wolf Lab Stuttgart) und eine Keratinozytenbibliothek der Firma Clontech verwendet (Human Keratinocyte MATCHMAKER cDNA Library).

Um eine ausreichende Transformationseffizienz zu erreichen wurde hierfür ein 10 x scale durchgeführt. Für eine genauere Beschreibung auf <http://umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/2HS.html> nachzulesen.

Die Transformationseffizienz wurde nach Auszählung der Testplatten wie folgt berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Cfu} \times \text{Resuspensionsvolumen}}{\text{Ausplattiertes Volumen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{eingesetzte Menge an Vektor}}$$

Es musste sichergestellt werden, dass die benutzten cDNA Bibliotheken wie empfohlen mindestens dreimal abgedeckt waren. Die humane Keratinozyten MATCHMAKER cDNA Bibliothek umfasst 5×10^6 Klone. In diesem Screen wurde eine Transformationseffizienz von 3×10^6 erreicht, was einer Zahl der möglichen Klone bei 10 µg eingesetzter cDNA von 3×10^7 entspricht und die Bibliothek so sogar mehr als dreimal abdeckt. Für die T-Zell Bibliothek wurden vom Hersteller 2×10^6 unabhängige Klone angegeben. Die Transformationseffizienz dieses Screens betrug

$6,5 \times 10^5$. Bei einer eingesetzten DNA Menge von $10 \mu\text{g}$ entspricht das einer Anzahl von $6,5 \times 10^6$ Klonen. Auch hier wurde die Bibliothek also mindestens dreimal abgedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Suche nach neuen Interaktionspartnern für das „low risk“ HPV11E6 Protein

Derzeit sind nur wenige Interaktionspartner für das humane Papillomavirus Typ 11 E6 Protein beschrieben. Um weitere Einblicke in die Wirkungsweise der Papillomaviren im Allgemeinen und Eigenschaften der E6 Proteine im Besonderen zu erhalten, wurde unter Verwendung verschiedener Methoden nach neuen Interaktionspartnern für das E6 Protein des low risk HPV Typ 11 gesucht.

3.1.1 Suche nach neuen Interaktionspartnern für HPV11E6 durch einen Yeast Two Hybrid (YTH) Screen.

Eine etablierte Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen und Identifizierung neuer Interaktionspartner ist das von 1989 von Fields und Song entwickelte Yeast Two Hybrid System (YTH). Es handelt sich dabei um einen genetischen Test zum Nachweis von Protein-Proteininteraktionen und basiert auf der Rekonstitution eines aktiven Transkriptionsfaktors als Folge der Interaktion zweier Proteine. Transkriptionsfaktoren bestehen in der Regel aus zwei unabhängigen Domänen, einer DNA Bindedomäne, die an spezifische DNA Bereiche bindet, sowie einer Aktivierungsdomäne, die die Bindung und Aktivierung an die RNA-Polymerase vermittelt (Hope und Struhl, 1986, Keegan, 1986). In einem Yeast Two Hybrid werden die beiden Domänen getrennt voneinander an das sogenannte Köderprotein „bait“ und das Beuteprotein „prey“ fusioniert und in Hefezellen koexprimiert. Bei einer Interaktion von bait und prey bzw. der entsprechenden Hybridproteine kommt es zu einer räumlichen Annäherung der Binde- und der Aktivierungsdomäne, was in der funktionellen Rekonstitution des Transkriptionsfaktors resultiert und somit zur Expression der nachgeschalteten Reportergene führt. Die Expression des Reporters ist Zeichen für die Interaktion der beiden Proteine. Bis heute wurde eine Vielzahl dieser YTH Systeme entwickelt. In dieser Arbeit wurde ein auf dem GAL4 Transkriptionsfaktor basierendes System verwendet. Die Reporter rekonstituieren die Biosynthesewege der Aminosäuren Histidin, Adenin und Uracil. Mit Hilfe von Selektionsplatten denen Histidin (-His), Histidin und Adenin (-His, -Ade) oder Histidin, Adenin und Uracil (-His, -Ade, -Ura) fehlen, können Klone selektioniert werden, die miteinander interagierende Beute- und Köderproteine enthalten. Als Köderprotein wurde das E6 Protein des humanen Papillomavirus vom Typ 11 (HPV11E6)

verwendet. Die für das HPV11E6 kodierende Sequenz wurde in die beiden YTH Vektoren pGBKT7 und pDBLeu jeweils hinter die GAL4 DNA Bindedomäne kodierende Sequenz kloniert, so dass jeweils ein GAL4-HPV11E6 (11E6BD) Fusionsprotein kodiert ist. Der Vektor pGBKT7 enthält das TRP1 Gen als Selektionsmarker, während der zweite Vektor pDBLeu das LEU2 Gen als Selektionsmarker enthält (zusammengefasst in Tabelle 3.1). Als Beuteproteine wurden Proteine einer menschliche Keratinozyten MATCHMAKER cDNA Bibliothek der Firma Clontech sowie einer menschlichen T-Zell Bibliothek verwendet. Die cDNAs der Beuteproteine befinden sich in den Yeast Two Hybrid Vektoren pGAD10 und pPC86. Sie sind auf eine Weise kloniert, dass sie ein Fusionsprotein bestehend aus GAL4 Aktivierungsdomäne und dem jeweiligen Beuteprotein kodieren, wobei sich die GAL4AD am N-Terminus des Fusionsproteins befindet. PGAD10 enthält das LEU2 Gen während pPC86 das TRP1 Gen aufweist (Tab. 3.1).

Vektor	Binde- /Aktivierungsdomäne	Selektionsmarkergen	Enthaltendes Protein
pGBKT7	BD	<i>TRP1</i>	HPV11E6
pDBLeu	BD	<i>LEU2</i>	HPV11E6
pPC86	AD	<i>TRP1</i>	T-Zell Bibliothek
pGAD10	AD	<i>LEU2</i>	Keratinozyten Bibliothek

Tab. 3.1: Eigenschaften der für den YTH verwendeten Konstrukte.

Für die Versuche wurde der Hefestamm AH109-Met (Labor von Dr.Dieter Wolf, Stuttgart) verwendet. Dieser ist Methionin (Met) prototroph, also von sich aus in der Lage, auf Selektionsplatten ohne Methionin (-Met) zu wachsen.

Um einen Hefeklon zu erhalten, der 11E6BD stabil exprimiert, wurde die cDNA von 11E6pGBKT7, 11E6pDBLeu sowie die Leervektoren pGBKT7 und pDBLeu nach der LiAc Methode in Hefezellen transformiert und auf –Met,-Leu oder –Met,-Trp Selektionsplatten ausgestrichen. Nach zwei Tagen wurden je zwei der gewachsenen Einzelklone erneut ausgestrichen und ein Proteinexpressionstest durchgeführt (Abb.3.1). Im Westernblot ist zu erkennen, dass bis auf den zweiten 11E6pGBKT7 Klon alle ein 11E6BD Protein exprimieren. Für die weiteren Versuche wurde jeweils der erste Klon ausgewählt.

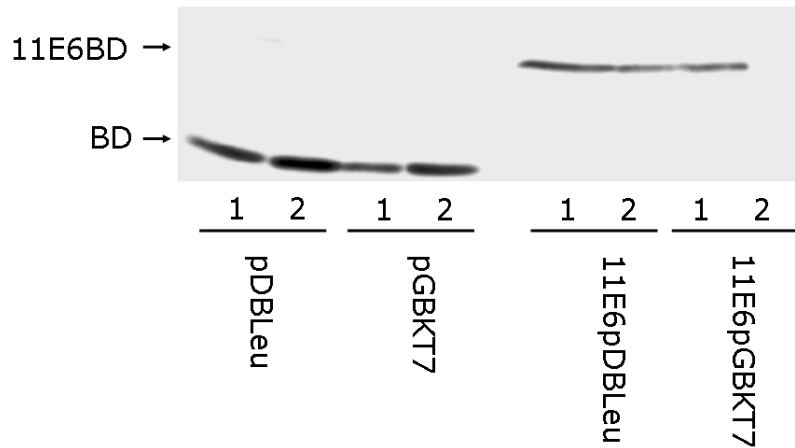


Abb.3.1: Proteinexpressionstest von 11E6BD in Hefezellen. Mit 11E6pGBKT7, 11E6pDBLeu und den Leervektoren pGBKT7 sowie pDBLeu transformiertes Hefezelllysate von jeweils zwei unterschiedlichen Klonen (1 und 2) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Anti-Gal4BD Antikörper gefärbt, der die Bindedomäne (BD) des Gal4 Transkriptionsfaktors detektiert.

Ein potentielles Problem bei der Durchführung von YTH Screens stellt die Autotransaktivierung durch ein Hybridprotein in Abwesenheit des zweiten dar. Für den Fall, dass bereits eines der 11E6BD Konstrukte die Reporterexpression aktivieren kann, wurde es in Kombination mit den jeweiligen die Aktivierungsdomäne tragenden Leervektoren in Hefezellen koexprimiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen (Abb. 3.2).

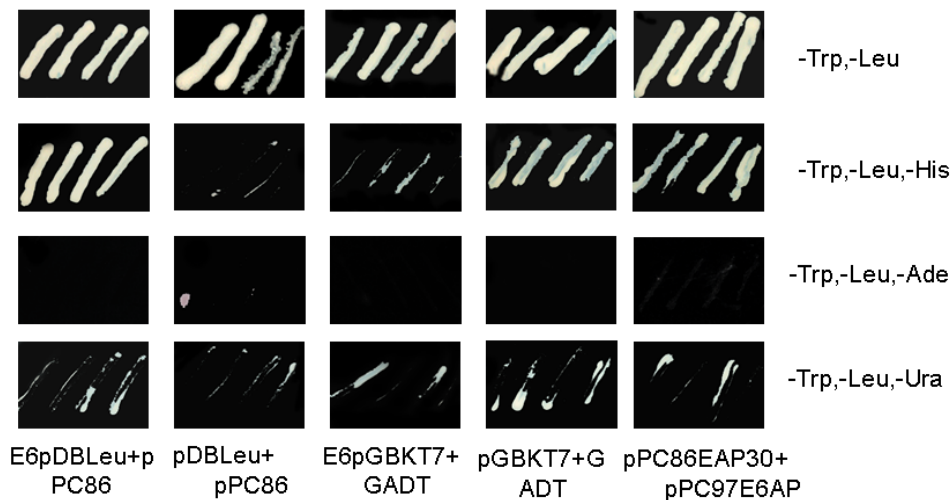


Abb. 3.2: Test auf Autotransaktivierung. Die Konstrukte E6pDBLeu sowie E6pGBKT7 wurden mit den Leervektoren pPC86 und pGADT in Hefezellen kotransformiert, auf Selektionsplatten ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. Trp=Tryptophan Leu=Leucin His=Histidin Ade=Adenin Ura=Uracil

Die Kombination von pGAD10 und pGBKT7 sowie von pDBLeu und pPC86 befähigte Hefezellen zum Wachstum auf –Leu-Trp Selektionsplatten. Auf den –His-

Trp-Leu (Histidinmangelplatten) sollte nur die Positivkontrolle pPC86EAP30 zusammen mit pPC97E6AP wachsen. Sie kodieren für E6AP und dessen bei uns im Labor durch einen YTH gefundenen Interaktionspartner E6AP30. Wie in Abbildung 3.2 erkennbar ist, gibt es auch bei der Kotransformation von E6pDBLeu mit dem Leervektor pPC86 ein Wachstum auf der Histidinmangelplatte. Dies lässt darauf schließen, dass es zu einer Autotransaktivierung der Reportergene durch das E6 Protein kommt. Interessanterweise war auch bei den beiden Leervektoren pGBKT7 und pGADT Wachstum zu beobachten. Wurde stattdessen E6pGBKT7 verwendet, war diese Autotransaktivierung nicht zu beobachten.

Um die Autotransaktivierung zwischen dem E6pDBLeu Konstrukt und der Aktivierungsdomäne auf pPC86 zu verhindern wurde zu den -Trp,-Leu,-His Selektionsplatten steigende Mengen 3- Aminotriazol (3AT) hinzugefügt (Abb.3.3). Es handelt sich hierbei um einen kompetitiven Inhibitor des *HIS3* Gen Produktes. Die kotransformierten Hefezellen aus Abbildung 3.2 wurden von der -Trp,-Leu Selektionsplatte auf die 3AT haltigen -Trp,-Leu,-His Selektionsplatten ausgestrichen und 10 Tage bei 30°C inkubiert. Dies ist der Zeitrahmen in welchem während des YTH Screens Klone zu erwarten sind. Wie in Abbildung 3.3 zu erkennen ist, waren bereits 5mM 3AT ausreichend um eine Autotransaktivierung zu vermeiden. Um eine Autotransaktivierung vollständig zu verhindern, wurden im Folgenden Screen -Trp,-Leu,-His Platten mit 10mM 3-Aminotriazol verwendet.

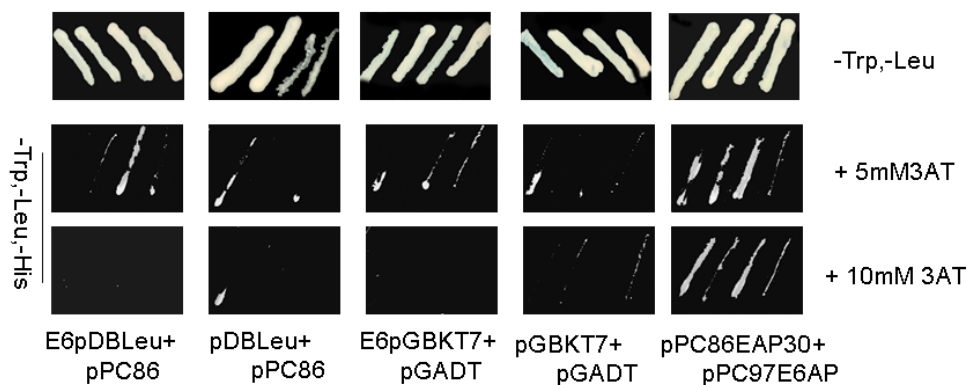


Abb. 3.3: Inhibierung der Autotransaktivierung durch Wachstum auf 3-Aminotriazol (3AT) haltigen -Trp,-Leu,-His Selektionsplatten. Die Konstrukte E6pDBLeu und E6pGBKT7 wurden mit Expressionsvektoren für die Gal4 Aktivierungsdomäne in Hefezellen transformiert, zur Verhinderung einer Autotransaktivierung auf 5mM bzw. 10mM 3AT haltigen -Trp,-Leu,-His Selektionsplatten ausgestrichen und 10 Tage bei 30°C inkubiert

Die eigentlichen Screens wurden wie unter 2.2.33.6 beschrieben durchgeführt. Die aus den gewachsenen Kolonien erhaltenen cDNAs wurden aus den Hefezellen isoliert, in Bakterienzellen retransformiert, aus ihnen aufgereinigt und zur Sequenzanalyse an die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) geschickt.

FCGSGAYGHStop	
CLNCNDNTDGIHCEKCKNGFYRHRERDRCLPCNCNSKGSLSARCDNSGRCSCKPGVTGARCDRCLPGFH MetLTDAGCTQDQRLLDSKCDCDPAGIVGStop	
QIEGLKEELAYLRKNHEEE MetLALRQQTGGDVNVE MetDAAPGVDLRILNE MetRDQYEQTAEKNRRDAET WFLSKTEELNKEVASNSLQSSRSSEVTELRRLVQGLEIELQSQLS MetKASLENSLEETKGRYC MetQLS QI QGLIGSVEEQLAQLRCE MetEQQSQEYQILLDVKTRLEQEIATYRRLLEGEDAHLSSQASGQSYSSREVF SSSSSSSR	Keratin 16 (240-453)
FTQPTARSLTSLLLCT MetTTCRQFTSSSS MetKGS CGIGGGIGGGSSRISSVLAGGSCRAPSTYGGGLSVSS SRFSSGGAYGLGGYGGGFSSSSSSFSGGFGGGYGGGLGAGLGGGFGGGFAGGDGLLVGSEKVT MetQN LNDRLAS YLDKVRAL EEANADLEVKIRDWYQRQRP AEIKDYSPYFKTIEDLRNKILTATVDNANVLLQIDNA RLAAD	Keratin 14 (1-198)
KGSLARCDNSGRCSCKPGVTGARCDRCLPGFH MetLTDAGCTQDQRLLDSKCDCDPAGIAGPCDAGRCV CKPAVTGERCDRCRSGYYNLDGGNPEGCTQCFCYGHSA SCRSSAEYSVHKITSTFHQDVDGWKAVQRNG SPAKLQWSQRHQDVFS SAQRLLDPVYFVAPAKFLGNQVSYGQSLSFYDRVDRGGRHPSAHDVILEGAGL RITAPL Met	Laminin gamma 2 (89-301)
TQPTARSLTSLLLCT MetTTCRQFTSSSS MetKGS CGIGGGIGGGSSRISSVLAGGSCRAPSTYGGGLSVSS RFSSGGAYGLGGYGGGFSSSSSSFSGGFGGGYGGGLGAGLGGGFGGGFAGGDGLLVGSEKVT MetQN NDRLAS YLDKVRAL EEANADLEVKIRDWYQRQRP AEIKDYSPYFKTIEDLRNKILTATVDNANVLLQIDNAR LAADDF	Keratin14 (1-200)
SIPSGAVSFLSLIGVPQG MetRIGStop	
LAR MetVSIStop	
RKKG V G Stop	
WWSTT MetCSGVLSFNAITYLNLITLHDK Stop	
LS MetLLHLSVPQFP Stop	
FLHFINADHHIYVSKHGGQR Stop	
FFFVVKRYIYIYIQNStop	
FTQPTARSLTSLLLCT MetTTCRQFTSSSS MetKGS CGIGGGIGGGSSRISSVLAGGSCRAPSTYGGGLSVSS SRFSSGGAYGLGGYGGGFSSSSSSFSGGFGGGYGGGLGAGLGGGFGGGFAGGDGLLVGSEKVT MetQN	Keratin14 (1-95)
QIEGLKEELAYLRKNHEEE MetLALRQQTGGDVNVE MetDAAPGVDLRILNE MetRDQYEQTAEKNRRDAET WFLSKTEELNKEVASNSLQSSRSSEVTELRRLVQGLEIELQSQLS MetKASLENSLEETKGRYC MetQLS QI QGLIGSVEEQLAQLRCE MetEQQSQEYQILLDVKTRLEQEIATYRRLLEGEDAXLSSQ	Keratin16 (240-431)
FFFFFFFFES Stop	
TQPTARSLTSLLLCT MetTTCRQFTSSSS MetKGS CGIGGGIGGGSSRISSVLAGGSCRAPSTYGGGLSVSS RFSSGGAYGLGGYGGGFSSSSSSFSGGFGGGYGGGLGAGLGGGFGGGFAGGDGLLVGSEKVT MetQN	Keratin 14 (1-91)
QIKDAIGRYHQCATIQLDFQLPIRFNLTYVSHDGDKKRPVIVHRAILGVSVER MetIAILTENYGGKWPFWLS PRQV MetVVPVGP TCDEYAKVVRQQFHD AKF MetADIDLDPGCTLNKKIRNAQLAQYNFILVYVGEKEKISGTV NIRTRDNKVHGERTIS ETIERLQQLKEFRSKQAEXXX Stop	Threonyl tRNA Synthetase (547-710)
KVQSKSIKKLCS Stop	
MetSLFDLFRGFFGFPGRSHRDPFFGG MetTRDEDDDEEEEEGGSWGRGNPRFHSPQHPPEEFGGFSF SPGGGIRFHDNFGFDDLVRDFNSIFSD MetGAWTLPSHPPELPGPESETPGERLREGQTLRDS MetLKY PDS HQPRIFGGVLES DARSESPQAPDWGSQRPFHRFDDVWP MetDPHPRTRENDLDSQVSEQELGPV	HAX-1 Isoform a (1-199)

Tab. 3.2: Proteinsequenzen von 20 durch den YTH Screen der Keratinozyten Bibliothek gefundenen cDNA Klone. Die Zahlen in Klammern hinter den Proteinnamen zeigen die exprimierten Aminosäuren an.

Für den Screen der T-Zell Bibliothek wurden in einem ersten Schritt 12 Einzelklone von über 300 analysiert. Die erhaltenen Sequenzen zeigten, dass es sich bei allen 12 um „out of frame“ Klone handelte. Sie kodierten für maximal 18 Aminosäuren bevor sie ein Stopcodon bildeten. Der Klon mit den 18 Aminosäuren wurde in einem Datenbankvergleich als CD74 ähnlich gefunden. Bei CD74 handelt es sich um die mit MHC Klasse II assoziierte invariante Kette. Man findet MHC II Moleküle auf allen professionell antigenpräsentierenden Zellen. CD74 ist involviert in die Antigenpräsentation und den intrazellulären Transport der MHC Klasse II Moleküle. Auf Grund der zahlreichen „out of frame“ Klone wurden keine weiteren in dem T-Zell Bibliotheken Screen gefundenen Klone untersucht. Stattdessen wurden die cDNAs von 20 beim Screen der Keratinozyten Bibliothek gewachsenen Klone sequenziert. In Tabelle 3.2 sind die erhaltenen Sequenzen zusammengefasst. Bei 10 Klonen

handelte es sich wiederum um „out of frame“ Klone. Zwei Klone exprimierten Fragmente von Laminin gamma 2, zwei von Keratin 16, drei von Keratin 14, einer von der Threonyl tRNA Synthetase und einer von HAX-1. Bereits vor einigen Jahren wurde in unserem Labor von Dr. Birgit Keck HAX-1 als ein möglicher Interaktionspartner von E6AP in einem Yeast Two Hybrid Screen gefunden (unveröffentlichte Daten). In anschließenden Versuchen mit HAX-1 und E6AP konnte diese Bindung damals jedoch nicht weiter bestätigt werden.

Um eine unspezifische Bindung der potentiellen Interaktionspartner mit der Gal4BD auszuschließen, wurden ihre cDNAs in Hefen zusammen mit dem pGBKT7 Leervektor, also der Bindedomäne alleine transformiert (Abb 3.4). Drei Tage nach dem Ausstreichen auf den Selektionsplatten war kein Wachstum bei diesen Transformationen zu sehen, im Gegensatz zu den Kontrolltransformationen mit 11E6pGBKT7. Eine Bindung des Peptides an die Bindedomäne an Stelle des 11E6 Proteins und somit eine falsch positive Interaktion kann bei allen fünf Kandidaten ausgeschlossen werden.

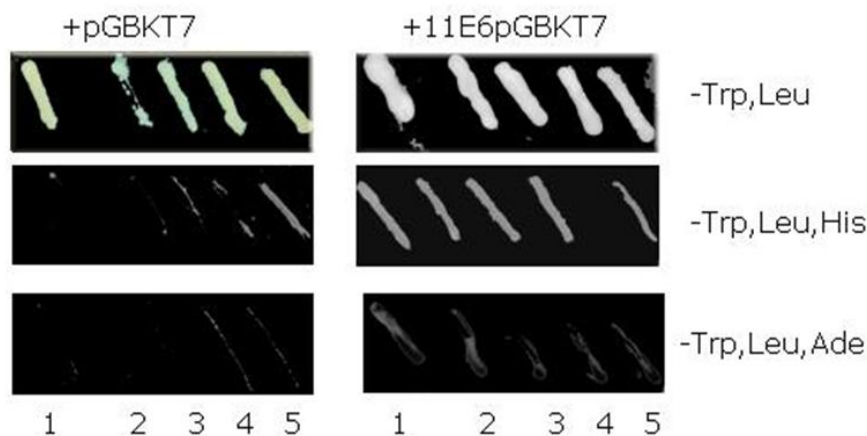


Abb. 3.4.: Test auf unspezifische Bindung der potentiellen Interaktionspartner an die Gal4-Bindedomäne. Die cDNAs der identifizierten potentiellen Interaktionspartner von 11E6 wurden mit dem Konstrukt 11E6pGBKT7 oder dem Leervektor pGBKT7 in Hefezellen transformiert, auf Selektionsplatten ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. Trp=Tryptophan Leu=Leucin His=Histidin Ade= Adenin Ura= Uracil 1= Laminin gamma 2 2= HAX-1 3= Threonyl tRNA Synthetase 4= Keratin16 5= Keratin14

3.1.1.1 Keratin14 (1-200), HAX-1 und Threonyl-tRNA Synthetase (547-710) binden *in vitro* an HPV11E6.

Die durch den YTH Screen gefundenen cDNAs, die für die Proteinfragmente von Keratin 14 (KER14_1-200), Keratin16 (Ker16_240-453) und TARS (TARS_547-710) kodieren, wurden mit Hilfe der passenden Primer in Flag-pcDNA sowie HA-pcDNA kloniert, um mit ihnen weitere Experimente *in vitro* bzw in menschlichen Zellkulturen

(*in cellulo*) durchführen zu können. Die cDNA, die für HAX-1 in voller Länge kodiert, war bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurde ebenfalls mittels der entsprechenden Primer sowohl in Flag-pcDNA als auch HA-pcDNA kloniert.

Mittels eines GST-Pulldowns sollte die Bindung der potentiellen Interaktionspartner an HPV11E6 *in vitro* bestätigt werden. KER14_1-200, KER16_240-453, HAX-1 und TARS_547-710 sowie Dlg wurden in Retikulozytenlysate *in vitro* translatiert und mit S³⁵Met markiert. Dlg ist ein PDZ Protein, welches an die PDZ Bindedomäne der high risk E6 Proteine bindet und daher als Kontrolle verwendet wurde. Die translatierten Proteine wurden mit bakteriell exprimierten und an Glutathionsepharosebeads gebundenen GSTE6 Proteinen inkubiert, gewaschen, über SDS PAGE aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht. In Abbildung 3.5B sind zur Kontrolle durch eine Coomassiefärbung die bakteriell exprimierten GST-E6 Proteine sichtbar gemacht. Deutlich zu sehen sind GST als Hintergrundkontrolle, GST16E6 und GST11C16, einem Fusionsprotein aus 11E6 und der C-terminalen PDZ Bindedomäne von 16 E6, sowie GST11E6, welches jedoch schwächer exprimiert wurde.

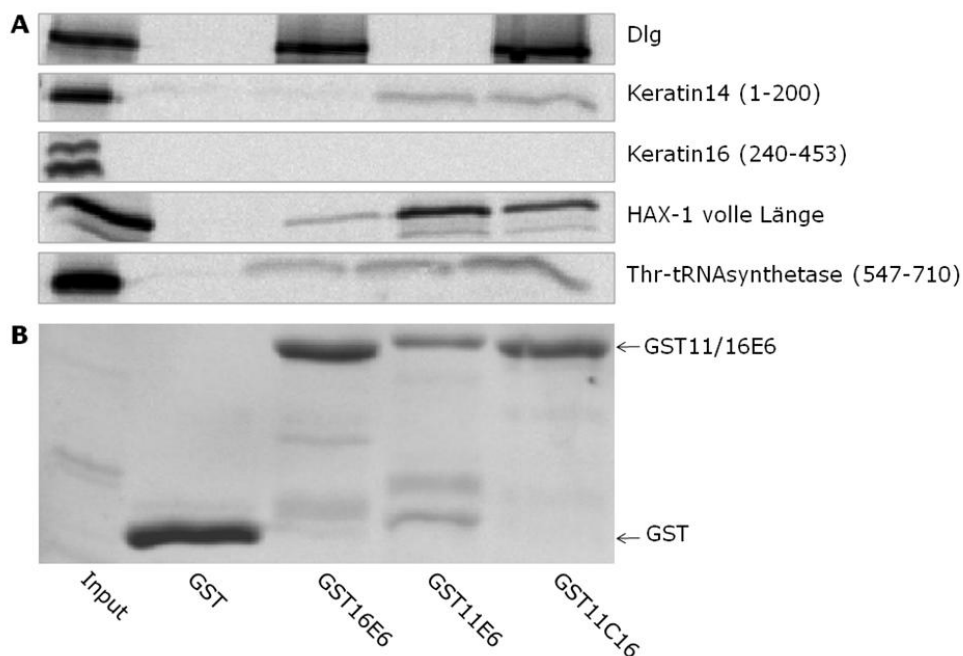


Abb. 3.5: GST Pulldown mit den im YTH gefundenen potentiellen Interaktionspartnern von HPV11 E6. A) Bakteriell exprimierte und an Glutathionsepharose gebundene E6 Proteine von high (GST16E6) und low risk (GST11E6) HPV Typen sowie Chimärproteine (GST11C16) wurden zusammen mit den *in vitro* translatierten potentiellen Interaktionspartnern inkubiert, über SDS PAGE aufgetrennt und durch Radiofluorographie sichtbar gemacht. **B)** Coomassie Färbung der SDS PAGE, um die bakteriell exprimierten GST-E6 Proteine sichtbar zu machen.

Durch den GST Pulldown wurde die Bindung von Ker14, TARS und HAX-1 an HPV11E6 *in vitro* bestätigt (Abb 3.5 A). Interessant dabei war, dass Ker14 selektiv

nur an 11E6 und sein Chimär 11C16 bindet. Es wäre somit neben Zyxin (Degenhardt & Silverstein, 2001) das einzige bisher identifizierte Protein, welches ausschliesslich an low risk, nicht aber an high risk E6 bindet. Hax-1 und TARS binden *in vitro* sowohl an 16E6, als auch an 11E6 und 11C16, wobei die Bindung von HAX an 11E6 wesentlich stärker erscheint als die Bindung an 16E6. Keine Bindung an eines der GSTE6 Proteine zeigte Ker16.

Zusammengefasst konnten in unserem Labor erstmalig Bindungen von Proteinen an das low risk GST11E6 Protein *in vitro* beobachtet werden.

3.1.2 HAX-1 (Haematopoietic cell-specific protein 1 – Associated Protein X-1)

HAX-1 ist ein 35 kDa großes Protein mit Domänen, die Sequenzähnlichkeiten zu den BH1 und BH2 Domänen des antiapoptotischen Proteins Bcl2 aufweisen. Diese Domänen werden von den Familienmitgliedern der Bcl2 Familie für die Interaktion mit proapoptotischen Molekülen genutzt. Ähnlich interagiert auch HAX-1 mit verschiedenen Apoptose regulierenden Faktoren wie zum Beispiel Vpr (Yedavalli et al., 2005), K15 (Sharp et al., 2002), Omi/HtrA2 (Cilenti et al., 2004) und Caspase 9 (Han et al., 2006). Auch wenn die Mechanismen noch nicht geklärt sind, so zeigt HAX-1 doch potentiell antiapoptotische Eigenschaften.

3.1.2.1 Die *in vitro* Bindung von HAX-1 an rekombinantes E6 ist E6AP unabhängig.

Da die *in vitro* Bindung von HAX-1 an das low risk HPV11E6 Protein im GST Pulldown (Abb. 3.5) bestätigt werden konnte, wurden weitere Experimente zur Charakterisierung dieser möglichen Interaktion durchgeführt. HAX-1 wurde wie zuvor erwähnt in unserer Arbeitsgruppe in einem Yeast Two Hybrid Screen bereits als potentieller Interaktionspartner von E6AP identifiziert (unveröffentlichte Daten). Es stellte sich somit die Frage, ob HAX-1 an einen Komplex aus HPVE6 und E6AP besser binden würde als an die Einzelkomponenten, so wie bereits für das Tumorsupressorprotein p53 gezeigt. Um den Einfluss von E6AP auf die Bindung von HAX-1 und HPVE6 zu untersuchen wurde in einem GST Pulldown zusätzlich baculo exprimiertes E6AP (2.2.16) zu den Versuchsansätzen hinzugefügt. Als Kontrollprotein wurde "Herc-Fragment" verwendet, welches durch direkte Bindung an E6AP indirekt an HPVE6 bindet (Dissertation U.Kogel 2006). HAX-1 und Herc-Fragment wurden sowohl im Retikulozytenlysat als auch im Weizenkeimlysat *in vitro*

translatiert und mit S35Methionin markiert. Die Translation im Weizenkeimlysat erfolgte, da bekannt ist, dass sich im Retikulozytenlysat, aber nicht im Weizenkeimlysat E6AP befindet. Bakteriell exprimiertes und an Glutathionsepharosebeads gebundenes E6 von sowohl high risk (16E6) als auch low risk (11E6) HPV wurde mit translatiertem HAX-1 in An- oder Abwesenheit von E6AP inkubiert, gewaschen, über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht. Während sich bei Herc-Fragment auch unter Berücksichtigung der Hintergrundbindung an HPVE6 in Abwesenheit von E6AP, eine Steigerung der Bindung an E6 nach Zugabe von E6AP beobachten lässt, ist dies für HAX-1 nicht der Fall (Abb 3.6). Die *in vitro* Bindung von HPVE6 Proteine an HAX-1 ist somit unabhängig von der Anwesenheit von E6AP.

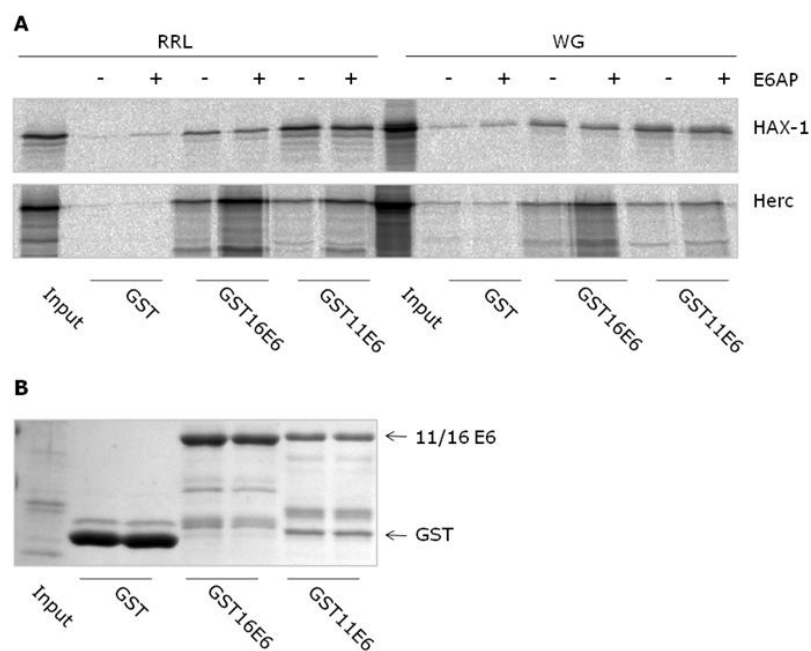


Abb. 3.6. Die Bindung von HAX-1 an E6 ist E6AP unabhängig. A) Radiofluorographie des GST Pulldowns mit *in vitro* translatiertem und S35 markiertem HAX-1 oder Herc-Fragment sowie bakteriell exprimierten GSTE6 Proteinen in An und Abwesenheit von baculo E6AP. RRL = Reticulozytenlysat WG = wheat germ **B)** Die Coomassiefärbung des Gels in A zeigt die bakteriell exprimierten GST Proteine.

3.1.2.2 *In cellulo* exprimiertes HAX-1 bindet an bakteriell exprimierte HPVE6 Proteine

Verschiedene virale Proteine wurden bereits als Interaktionspartner für HAX-1 beschrieben. Beispiele hierfür sind: EBNA-LP (Epstein Barr virus nuclear antigen leader protein) (Kawaguchi et al., 2000), EBNA-5 (Epstein Barr nuclear antigen 5)

(Dufva, 2001), K15 (Kapos's sarcoma associated herpesvirus Protein) (Sharp et al., 2002), Vpr (Virusprotein von HIV Typ I) sowie Rev (Protein von HIV) (Modem & Reddy, 2008). Zur Bestätigung, ob auch in Zellen eventuell modifiziertes HAX-1 an das E6 Protein des humanen Papillomavirus binden kann, wurden GST-Pulldown Versuche mit zellulär exprimiertem HAX-1 durchgeführt. Hierfür wurde ein Expressionsplasmid für HA-HAX-1 in HEK293T Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden 24 Stunden später lysiert und der Pulldown mit den bakteriell exprimierten und an Glutathionsepharose gebundenen GSTE6 Proteinen von high (16E6) und low risk (11E6) HPV sowie dem Chimärprotein GST11C16 (Abb 2.1) durchgeführt. Abbildung 3.7 zeigt eine Bindung des HA-HAX-1 an sowohl high als auch low risk HPVE6 sowie an das Chimärprotein, wobei die Bindung an GST16E6, wie auch schon in Abbildung 3.5, dabei schwächer erscheint als die an GST11E6 oder GST11C16. Daraus lässt sich schliessen, dass auch eventuelle in Zellen stattfindende posttranslationale Modifikationen oder an HAX-1 gebundene Proteine eine Bindung an HPV11E6 und in geringerem Maße auch an HPV16E6 zulassen. Zur endgültigen Bestätigung einer Interaktion *in cellulo* fehlt an dieser Stelle noch eine Immunpräzipitation mit in menschlichen Zellen koexprimiertem E6 und HAX-1.

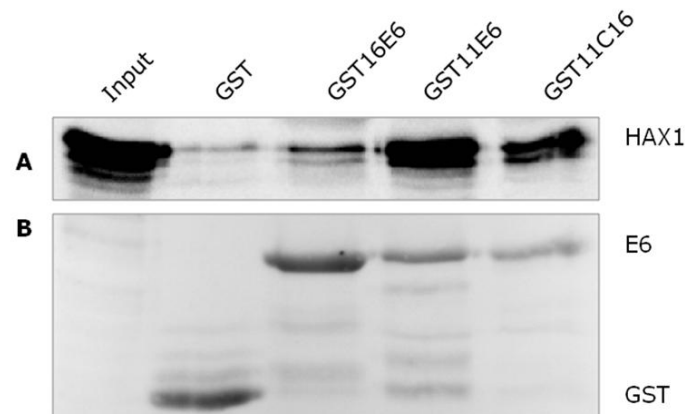


Abb. 3.7. GST Pulldown mit in cellulo exprimiertem HAX. A) HA-HAX-1 wurde in HEK Zellen überexprimiert und das Zelllysate mit bakteriell exprimierten und an Glutathionsepharosebeads gebundenen high (GST16E6) und low risk (GST11E6) HPVE6 Proteinen inkubiert. Die Beads wurden gewaschen, mit Probenpuffer aufgekocht, über SDS PAGE aufgetrennt und durch einen Westernblot und HA-Antikörperfärbung sichtbar gemacht. B) Coomassiefärbung der eingesetzten bakteriell exprimierten GST-E6 Proteine.

3.1.2.3 HPV hat keinen Einfluss auf das endogene HAX-1 Proteinexpressionslevel

In einer früheren Studie wurde die Überexpression von HAX-1 in Zellen von Patienten mit Psoriasis beschrieben (Mirmohammadsadegh et al., 2003). Hierbei handelt es sich um eine chronisch entzündliche Krankheit, die durch eine epidermale

Hyperplasie gekennzeichnet ist, hervorgerufen durch eine Störung der Differenzierung von basalen zu granulären Keratinozyten in der akanthotischen Epidermis. Da Psoriasis häufig im Zusammenhang mit HPV Infektionen beschrieben wird, stellte sich die Frage, ob das HAX-1 Proteinlevel in Zellen abhängig von einer HPV Infektion der Zellen variiert. HPV positive und negative Zellen wurden hierfür auf ihren Gehalt an endogenem HAX-1 getestet (Abb 3.8).

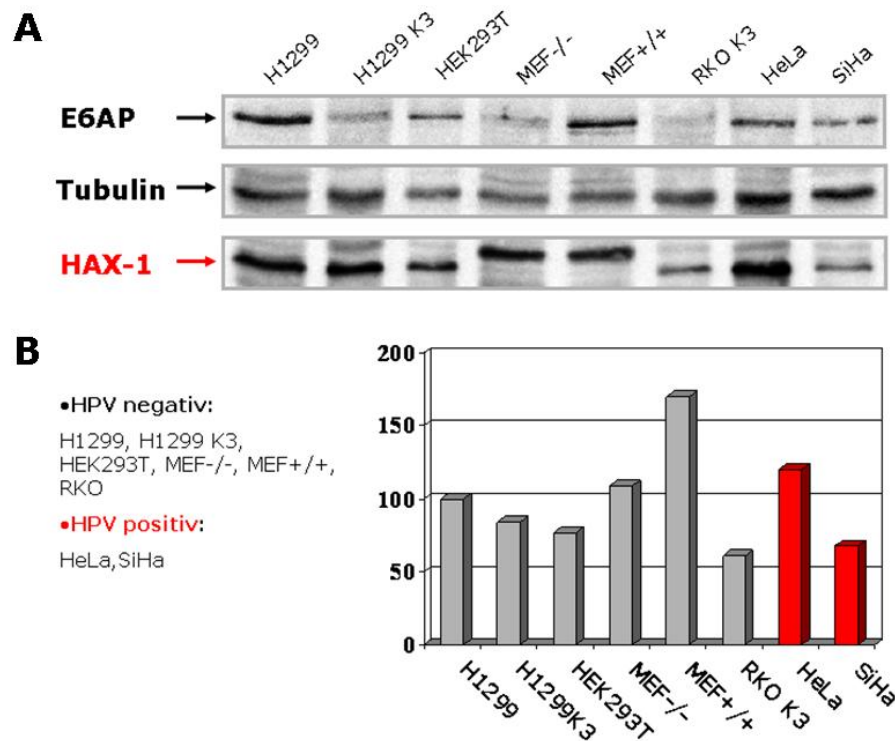


Abb. 3.8. HAX-1 Proteinlevel in HPV positiven und negativen Zellen. Zelllysate von verschiedenen Zelllinien wurden nach Bradford angeglichen und über SDS PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde A) ein Westernblot durchgeführt und endogenes E6AP, Tubulin und HAX-1 durch Antikörper detektiert. B) Die HAX-1 und Tubulin detektierenden Banden wurden mit Hilfe der Aida Software quantifiziert und an Tubulin angeglichen.

Als HPV negative Zelllinien wurden Lungenkarzinomzellen (H1299 par) und ihr dazugehöriger E6AP knockdown (H1299 K3), menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293T), Mausembryonale Fibroblasten (MEF), wobei -/- für eine negative Zelllinie für E6AP und +/+ für eine positive Zelllinie für E6AP steht, sowie menschliche Kolonkarzinom Zellen (RKO) getestet. Als HPV positive Zelllinien wurden menschliche Zervixkarzinomzellen, die entweder HPV18 positiv (HeLa) oder HPV16 positiv (SiHa) sind, verwendet. Das murine HAX-1 zeigt im SDS-Gel ein unterschiedliches Laufverhalten im Vergleich zum humanen HAX-1. Für die Quantifizierung des Westernblots wurden die Signale für HAX-1 mit denen für

Tubulin der jeweiligen Proben angeglichen und als relative Werte in Abbildung 3.8 unten dargestellt. HAX-1 wird in den E6AP positiven MEFs stärker exprimiert im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien. Ein signifikanter Unterschied zwischen den HPV positiven und den HPV negativen Zelllinien ist nicht zu beobachten.

3.1.2.4 HAX-1 wird *in vitro* in Anwesenheit von E6AP durch high risk E6, aber nicht durch low risk E6 ubiquitiniert.

Wie bereits beschrieben, sind viele der bekannten Interaktionspartner der high risk HPVE6 Proteine auch Substrate des E6/E6AP Komplexes und werden durch ihn ubiquitiniert und zum proteasomalen Abbau geführt. Prominentestes Beispiel hierfür ist p53, aber auch die PDZ Proteine MAGI, Dlg und Scrib. Für low risk E6 wurde eine solche Bindung und Abbau bis jetzt nur für das Protein Bak beschrieben (Thomas & Banks, 1999), ein Zusammenhang der in unserem Labor nicht bestätigt werden konnte.

HAX-1 ist das erste Protein für das in unserem Labor eine *in vitro* Bindung an das HPV11E6 gezeigt werden konnte. Daraus ergibt sich die Frage, ob sich HPV11E6, welches ebenfalls mit E6AP in der Zelle interagieren kann (Abbildung 3.26 und (Kuballa et al., 2007)), funktionell ähnlich verhält wie high risk HPVE6 und seine Interaktionspartner durch die E3 Ligase E6AP zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau führen kann. Zum Testen dieser Hypothese wurde ein *in vitro* Ubiquitinierungsversuch durchgeführt. Dafür wurde in Retikulozytenlysat (RRL) und Weizenkeimlysat (WG) *in vitro* translatiertes HAX-1 zusammen mit einem Mix aus E1 Enzym (UBA1), UbcH5b (E2), bakteriell exprimiertem GST11E6 oder GST16E6 sowie baculo E6AP (2.2.16) inkubiert.

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse dieser Ubiquitinierungsversuche dargestellt. Ubiquitinierung lässt sich an dem höher molekularen „Schmier“ über den translatierten Proteinen erkennen. Abbildung 3.9A zeigt die schwache Ubiquitinierung von in RRL translatiertem HAX-1 bereits in Anwesenheit von E6AP und eine Steigerung dieser Ubiquitinierung in zusätzlicher Anwesenheit von 16E6. Dies muss jedoch nicht zwangsläufig eine spezifische Ubiquitinierung von HAX-1 durch den HPV16E6/E6AP Komplex bedeuten, da eine Steigerung von unspezifischer Ligaseaktivität von E6AP durch HPV16E6 bereits bekannt ist. Klarer fällt die Ubiquitinierung von HAX-1 in Abbildung 3.9B ins Auge, die den

Ubiquitinierungsversuch mit in WG translatiertem HAX-1 und Dlg zeigt. Das stärkere Signal rührt von der größeren Menge an eingesetztem *in vitro* translatiertem Protein und somit der größeren Menge an ubiquitinierten HAX-1 Molekülen.

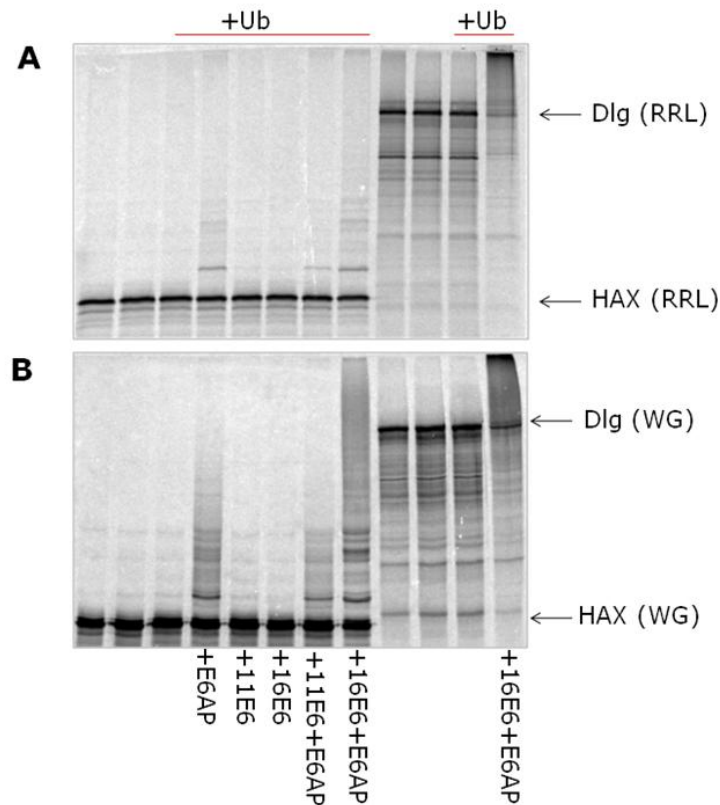


Abb. 3.9: *In vitro* Ubiquitinierungsversuch von HAX-1 mit E6 und E6AP. In RRL (A) und in WG (B) translatiertem HAX-1 wurde in Anwesenheit von low (HPV11E6) und high risk E6 (HPV16E6) sowie baculo E6AP (2.2.16) *in vitro* ubiquitiniert. Der Ubiquitinierungsversuch wurde wie unter 2.2.28 beschrieben durchgeführt, über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Radiofluorographie sichtbar gemacht. RRL= Retikulozytenlysat WG= Weizenkeimlysat (Weizenkeimlysat)

Keinen Effekt scheint hier jedoch das low risk HPV11E6 zu haben, obwohl es in den *in vitro* Bindungsversuchen wesentlich bessere Bindung als HPV16E6 an HAX-1 zeigte. Als Kontrolle wurde in RRL translatiertes Dlg, ein bekanntes Substrat für die Ubiquitinierung durch 16E6 und E6AP, verwendet. Wie zu erwarten zeigt Dlg eine klare Ubiquitinierung in dem charakteristischen „Schmier“ sowie der Verringerung des unmodifizierten Dlg in Anwesenheit von 16E6 und E6AP. Da bis jetzt noch keine Ubiquitinierung durch HPV11E6 *in vitro* gezeigt werden konnte, ist in Ermangelung einer Positivkontrolle ein Rückschluss auf die Funktionalität des eingesetzten 11E6 Proteins nicht möglich.

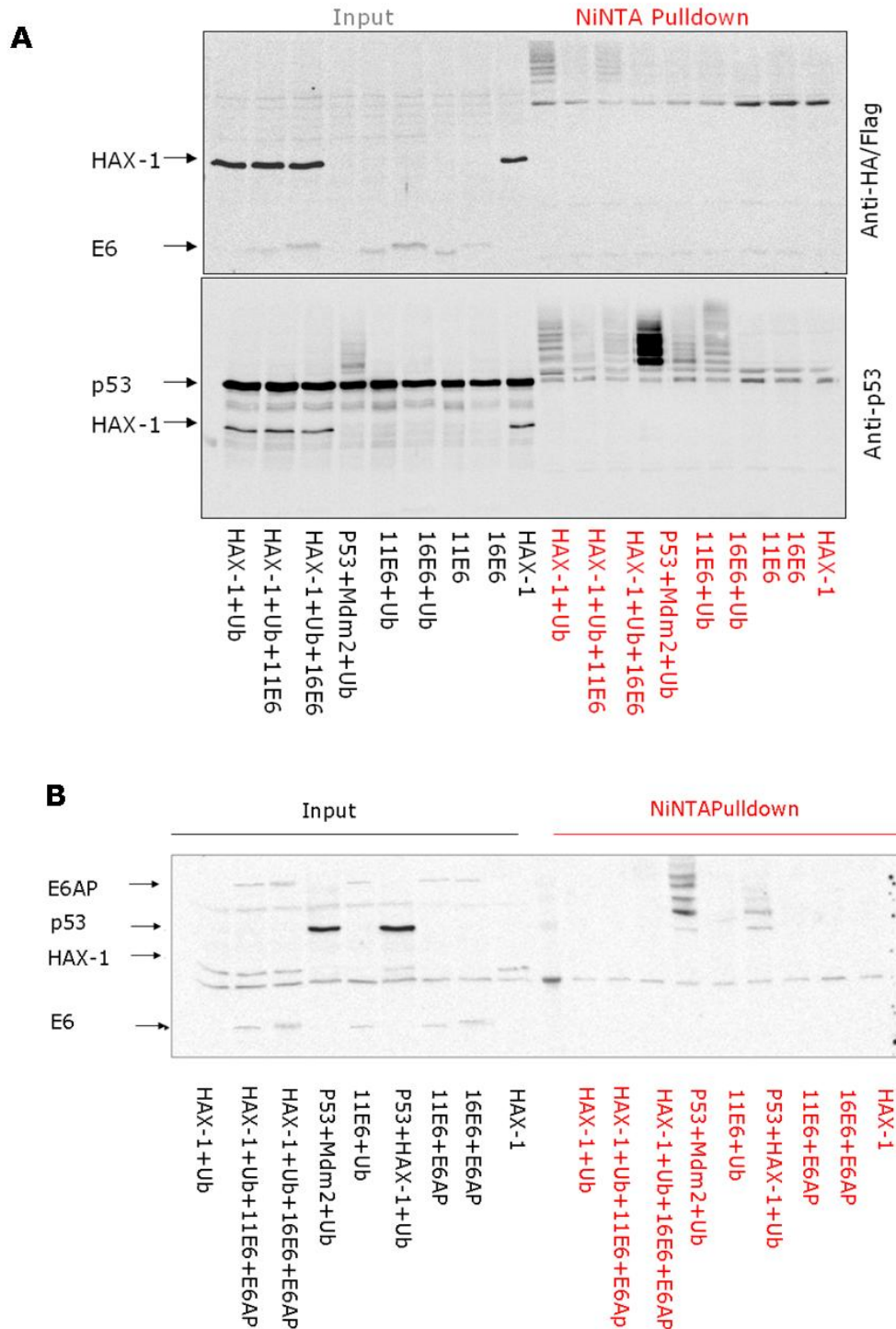


Abb. 3.10 HAX-1 wird *in cellulo* nicht durch E6 und E6AP ubiquitiniert. Wie unter 2.2.31 wurde His-Ubiquitin (Ub) zusammen mit Flag-HAX-1, HA-11E6, HA-16E6 sowie HA-E6AP in Zellen überexprimiert. Ein NiNTAPulldown reinigte die an His-Ub gebundenen Proteine auf. Sie wurden über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und anti HA, Flag und p53 Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Positivkontrolle ist die Kotransfektion von p53 mit seiner E3 Ligase Mdm2. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für die jeweils drei Mal durchgeführten Versuche A) HisUbPulldown in HEK293T Zellen (p53 positiv) B) HisUbPulldown in H1299 Zellen (p53 negativ).

Nach der *in vitro* Ubiquitinierung von HAX-1 durch HPV16E6 und E6AP wurde eine Ubiquitinierung in Zellen untersucht. Hierfür wurden H1299 Zellen sowie HEK293T Zellen mit Expressionsplasmiden für HA-HAX-1 und His-Ubiquitin (His-Ub) in An- und Abwesenheit von high und low risk HPVE6 transfiziert. Der His-Ub-Pulldown wurde wie unter 2.2.31 beschrieben durchgeführt. Dabei sollten alle an His-Ubiquitin gebundenen Proteine durch einen NiNTA Pulldown aufgereinigt werden. Die an His-Ubiquitin gebundenen Proteine sind in Abbildung 3.10 im Westernblot zu sehen. Als Positivkontrolle wurde die Kotransfektion von p53 mit seiner E3-Ligase Mdm2 benutzt. Hier ist in dem höher molekularen Schmier deutlich eine Bindung von p53 an His-Ubiquitin zu erkennen. Dies ist für HAX-1 in keiner der beiden Zelllinien in Anwesenheit von low oder high risk HPVE6 der Fall. Im Gegenteil erkennt man in Abbildung 3.10A (HEK293T Zellen) eine Ubiquitinierung von HAX-1 in Abwesenheit der E6 Proteine, die in Anwesenheit der HPVE6 Proteine nicht zu beobachten ist. Diese Ubiquitinierung konnte jedoch in H1299 Zellen (Abb 3.10B) nicht gezeigt werden.

Im Falle der Transfektion in HEK293T Zellen wurde kein Expressionsplasmid für E6AP zusätzlich transfiziert: da jedoch auch die Kotransfektion von E6AP in H1299 Zellen nicht zu einer Ubiquitinierung von HAX-1 führt, kann man eine zu geringe Menge an endogenem E6AP als Ursache hierfür ausschließen. Somit konnte *in cellulo* keine Ubiquitinierung von HAX-1 durch die HPVE6 Proteine nachgewiesen werden.

3.1.2.5 HPVE6 und E6AP haben keinen Einfluss auf die Stabilität von überexprimiertem HAX-1 und umgekehrt.

Bereits 1997 schlugen Suzuki und seine Kollegen HAX-1 als mögliches antiapoptotisches Protein vor, da sie zeigen konnten, dass Jurkat Zellen sich resistenter gegen Apoptosestimuli erwiesen, wenn HAX-1 überexprimiert wurde (Suzuki et al., 1997). Die Verhinderung der Apoptose ist eine gängige virale Verbreitungsstrategie. So verhindern high risk HPVE6 Proteine die Apoptose durch den Abbau des proapoptotischen Proteins p53. Eine weitere Strategie ist der Schutz von antiapoptotischen Proteinen in der Zelle vor einem möglichen Abbau. Um den Einfluss von low risk HPVE6 auf die Stabilität von HAX-1 zu untersuchen, wurde ein DHFRHAX-1 Expressionsplasmid (2.2.30) verwendet, welches mit steigenden Mengen eines HPV11E6 Expressionsplasmids in H1299 parentale (E6AP+/+) und H1299 K3 (E6AP-/-) Zellen transfiziert wurde (Abb. 3.11). HAX-1 wurde dafür in ein DHFR-HA-Ubiquitin-HA- kodierendes Konstrukt kloniert. Bei der Transfektion in

humanen Zellen wird ein Fusionsprotein exprimiert, welches am Ubiquitin gespalten wird, so dass gleiche Mengen DHFR-HA und HA-HAX-1 in den Zellen vorhanden sind. Bei DHFR handelt es sich um ein stabiles Protein, so dass ein Mengenvergleich von DHFR-HA zu HA-HAX-1 eine Aussage darüber erlaubt, ob HAX-1 in Zellen abgebaut wird. Die Quantifizierung mehrerer durchgeführter Versuche relativ zu DHFR ist in Abbildung 3.11B dargestellt. Zu erkennen ist, dass HPV11E6 weder in An- noch in Abwesenheit von E6AP einen signifikanten Effekt auf die Stabilität des HAX-1 Proteins hat.

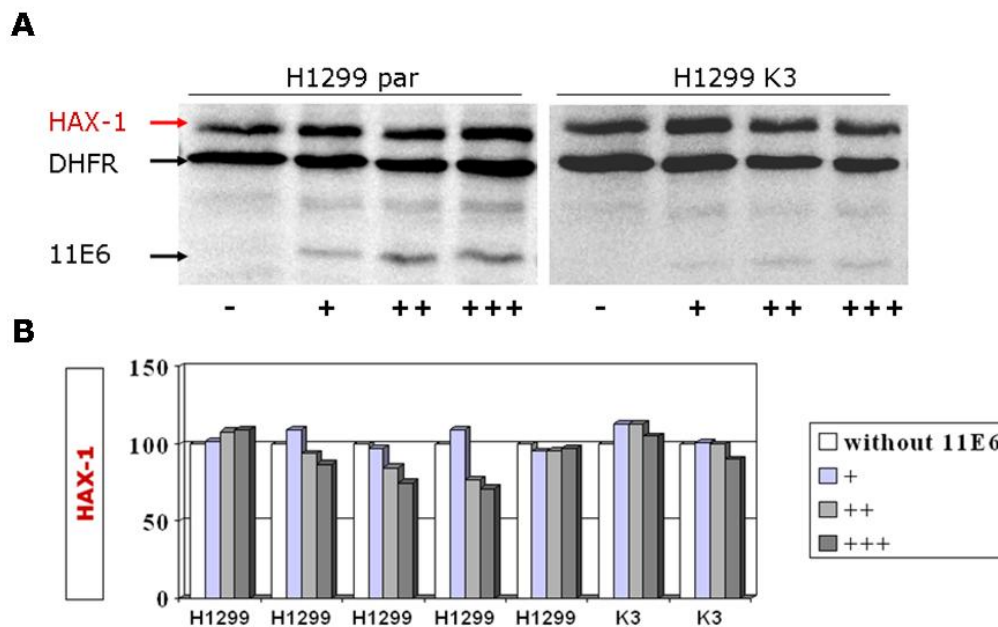


Abb. 3.11: HPV11E6 hat keinen Einfluss auf den Abbau von HAX-1 in Zellen. A) H1299 parentale (E6AP +/+) sowie H1299 K3 (E6AP -/-) Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHFR-HAX-1, und steigenden Mengen (+, ++, +++) eines Expressionsvektors für HPV11E6 transfiziert. Der Angleich der Transfektionseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase, welche von einem kotransfizierten β -Galaktosidase kodierenden Vektor exprimiert wurde. Die Zellysate wurden über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine im anschließenden Westernblot mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. B) zeigt die Quantifizierung mittels AIDA Software und Angleichung an das DHFR Signal von 5 unabhängigen Versuchen in H1299 parental Zellen und 2 unabhängig durchgeführten Versuchen in H1299 K3 Zellen.

Es ist bekannt, dass die E6 Proteine der humanen high risk Papillomaviren einen Komplex mit der E3 Ligase E6AP eingehen und so ihre Bindungspartner der Ubiquitinierung und dem proteasomalen Abbau zuführen. Ob dies auch der Fall für den neu entdeckten Bindungspartner HAX-1 ist, sollte mit Hilfe eines DHFRHAX-1 Expressionsplasmides (2.2.30) getestet werden. Da im oben beschriebenen Versuch kein E6AP zusätzlich transfiziert wurde, bestand die Möglichkeit, dass das endogene E6AP nicht für den Abbau des überexprimierten HAX-1 ausreicht. Deshalb wurden H1299 Zellen kotransfiziert mit Expressionsplasmiden für DHFR-HAX-1 sowie E6AP

und steigenden Mengen HPV11E6 oder HPV16E6. p53 wurde als Kontrollprotein verwendet, da es ein bereits bekanntes Substrat für den HPV16E6/E6AP Komplex ist. Wie in Abbildung 3.12 dargestellt ist, haben weder steigende Mengen des low risk HPV11E6 noch des onkogenen HPV16E6 in Kombination mit E6AP einen Effekt auf die Stabilität des HAX-1 Proteins in Zellen. Bei HAX-1 scheint es sich nicht um ein Substrat des E6/E6AP Komplexes zu handeln.

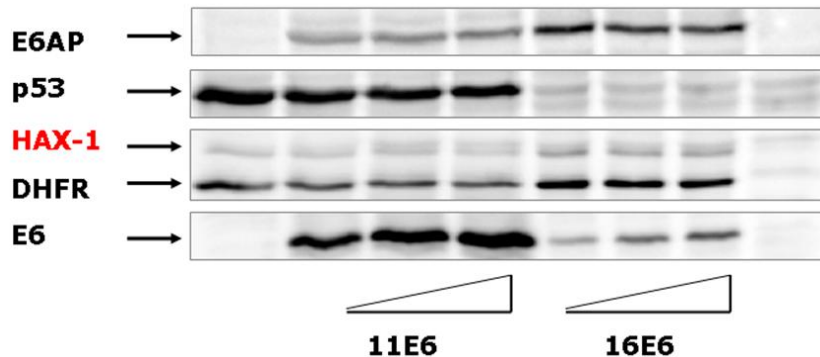


Abb. 3.12: High und low risk E6 Proteine haben keinen Einfluß auf die Stabilität von HAX-1 *in cellulo*. H1299 parentale sowie H1299 K3 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHFR-HAX-1, und steigenden Mengen (+, ++, +++) eines Expressionsvektors für HPV11E6 bzw HPV16E6 transfiziert. Der Angleich der Transfektionseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase, welche von einem kotransfizierten β -Galaktosidase kodierenden Vektor exprimiert wurde. Die Zelllysate wurden über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine im anschließenden Westernblot mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. Die Abbildung steht stellvertretend für 4 weitere unabhängig durchgeführte Versuche mit demselben Ergebnis.

Nachdem kein Effekt von HPV11E6 auf die Stabilität von HAX-1 in H1299 Zellen nachzuweisen war, wurde im Umkehrschluss der Effekt einer HAX-1 Überexpression auf die Stabilität von überexprimiertem HPV11E6 untersucht. Hierfür wurde ein DHFR11E6 Expressionsplasmid mit steigenden Mengen eines HAX-1 Expressionsplasmides in H1299 Zellen kotransfiziert (Abbildung 3.13). In Abbildung 3.13B ist die grafische Auswertung der Quantifizierung mittels der AIDA Software dargestellt, wobei das HPV11E6 Signal mit dem DHFR Signal verrechnet wurde. Sowohl das leichte Ansteigen des HPV11E6 Proteingehaltes in H1299 Zellen, sowie das leichte Abnehmen des HPV11E6 Proteingehaltes in H1299 K3 Zellen bei steigender HAX-1 Menge waren nicht signifikant genug, um einen Effekt von überexprimiertem HAX-1 auf das Proteinlevel von HPV11E6 postulieren zu können.

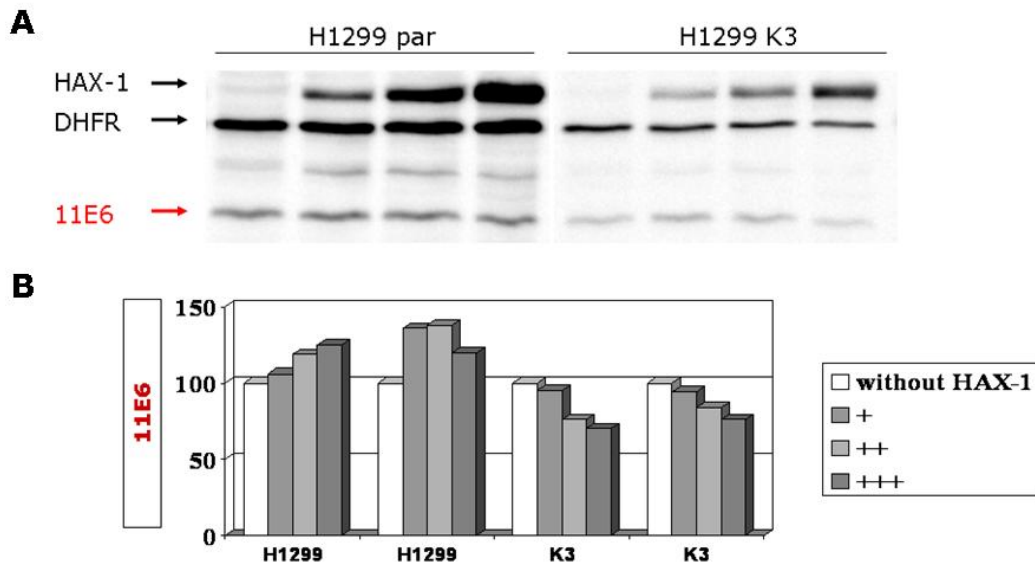


Abb. 3.13: HAX-1 hat keinen Einfluss auf den Abbau von HPV11E6 *in cellulo*. H1299 parentale sowie H1299 K3 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHFR-11E6 und steigenden Mengen eines Expressionsvektors für HAX-1 transfiziert. Der Angleich der Transfektionseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase, welche von einem kotransfizierten β -Galaktosidase kodierenden Vektor exprimiert wurde. Die Zelllysate wurden über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine im anschließenden Westernblot A) mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. B) Quantifizierung mittels AIDA Software und Angleichung an das DHFR Signal von 2 unabhängigen Versuchen in H1299 parentalen Zellen und 2 unabhängig durchgeführten Versuchen in H1299 K3 Zellen.

3.1.2.6 Eine Überexpression von HAX-1 führt zu einer Akkumulation von HPV11E6 an Mitochondrien.

Zur weiteren Analyse der Interaktion von HAX-1 und den HPV11E6 Proteinen wurden konfokale Immunfluoreszenzbilder der beiden koexprimierten Proteine gemacht. Hierfür wurden GFP-Expressionsplasmide der E6 Proteine verwendet. HAX-1 wurde durch die Antikörperfärbung seines Flag Tags sichtbar gemacht (rot). Abbildung 3.14 zeigt die Verteilung von HAX-1 in menschlichen Zellen in Abwesenheit von HPV11E6 Proteinen. Es formt eine charakteristische fädige Struktur (rot) in der Nähe des Zellkerns (blau), was die Beschreibungen von Suzuki et al. unterstützt, dass es sich um ein mitochondriales Protein handelt (Suzuki et al., 1997). Bestätigt wird diese Beobachtung in Abbildung 3.16, welche eine deutliche Kollokalisierung von HAX-1 mit den durch Mitotracker angefärbten Mitochondrien erkennen lässt.

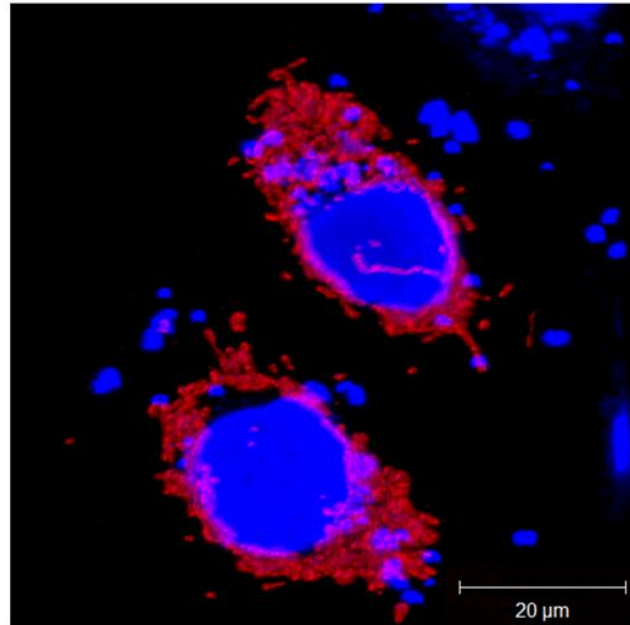


Abb. 3.14. HAX-1 lokalisiert in fädigen Strukturen um den Zellkern. H1299 Zellen wurden mit Flag-HAX-1 (rot) transfiziert und mit Flag-Antikörper nach 2.2.32 für die Immunfluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Die Zellkernfärbung erfolgte mittels DAPI. Konfokale Aufnahme im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC (Bio Imaging Center) Konstanz.

In Abbildung 3.15 ist die Koexpression von HAX-1 mit GFP, GFP11E6 und GFP16E6 dargestellt. Sowohl GFP11E6 als auch GFP16E6 sind großflächig in den Zellen verteilt und treffen zwar auf HAX-1, aber nur GFP11E6 zeigt eine verstärkte Akkumulation an den Stellen, an denen HAX-1 detektiert wird. Nach der Beschreibung von Yedavalli et al, dass die Überexpression des Proteins Vpr vom HI Virus zu einer Verschiebung von HAX-1 aus den Mitochondrien in das Cytoplasma führt, wurde die Kolokalisation von HAX-1 und Mitochondrien in An- und Abwesenheit der HPV16E6 Proteine untersucht (Yedavalli et al., 2005). In Abbildung 3.17 sieht man, wie oben bereits erwähnt, die Anfärbung der FlagHAX (grün) überexprimierenden Zellen mit Mitotracker (rot) der Firma Invitrogen. Die HPV16E6 Proteine wurden nicht angefärbt. Das Signal für HAX-1 überlagerte sich identisch mit dem Signal des Mitotrackers. Auch die Überexpression von HPV16E6 (nicht angefärbt) änderte dies nicht.

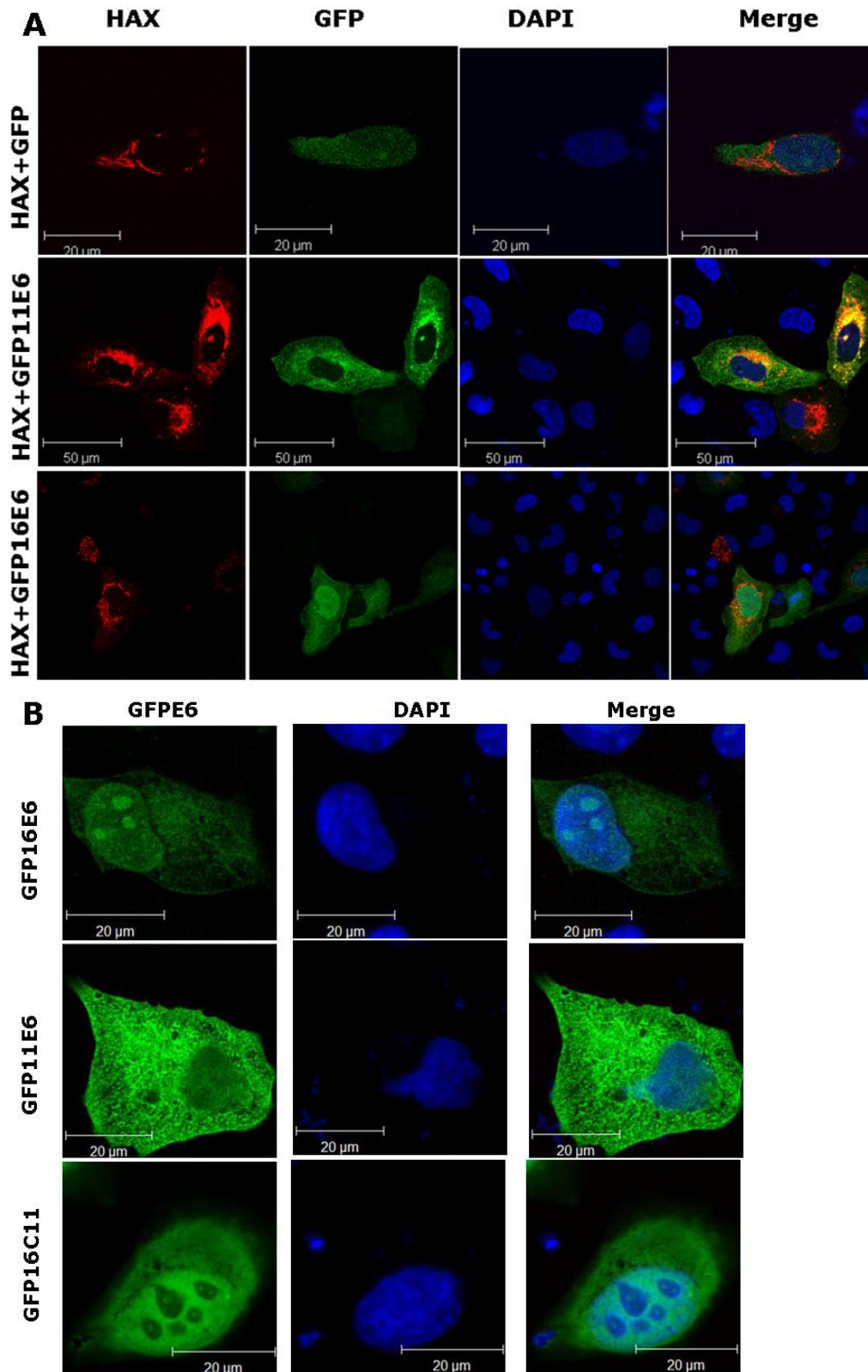


Abb. 3.15: GFP11E6 akkumuliert an gleichen Stellen wie HAX-1. A) Koexpression von HAX-1 (rot) mit GFP, GFP11E6 und GFP16E6 (grün). **B)** Expression von GFP11E6, GFP16E6 und GFP16C11 in H1299 Zellen. Zellkernfärbung (blau) erfolgte mittels DAPI. Die konfokale Aufnahme wurde im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC (Bioimagingcenter) Konstanz durchgeführt.

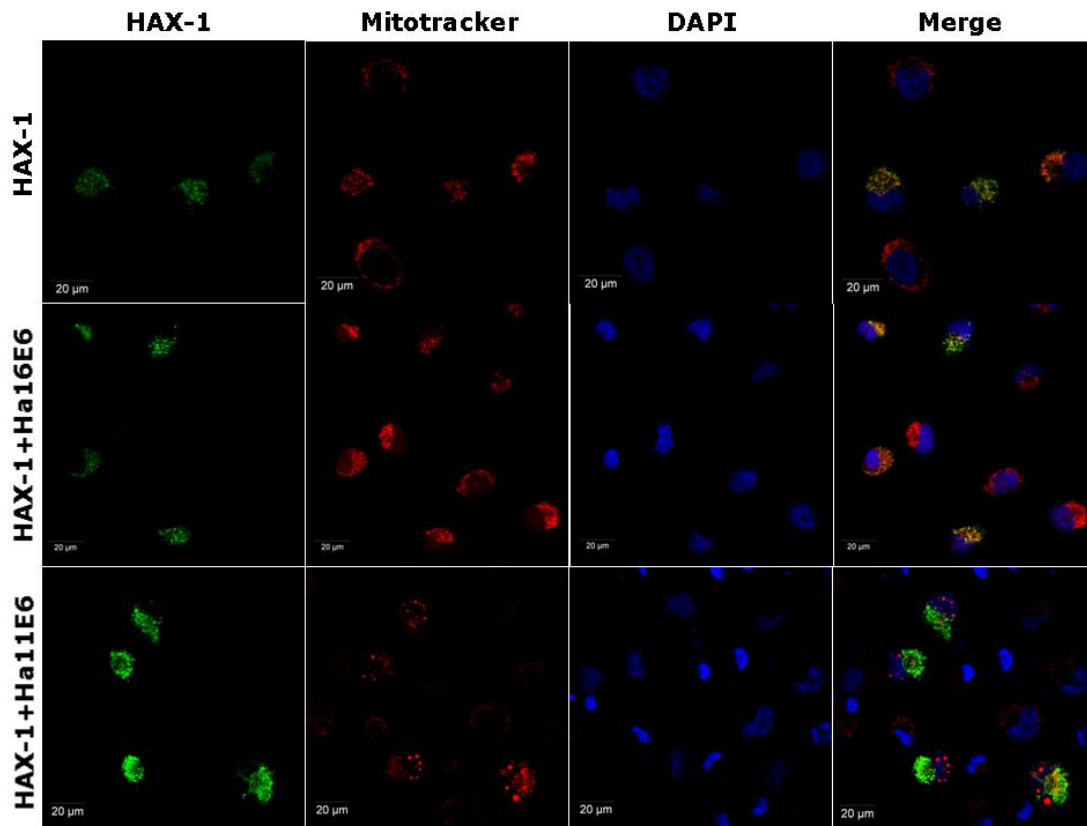
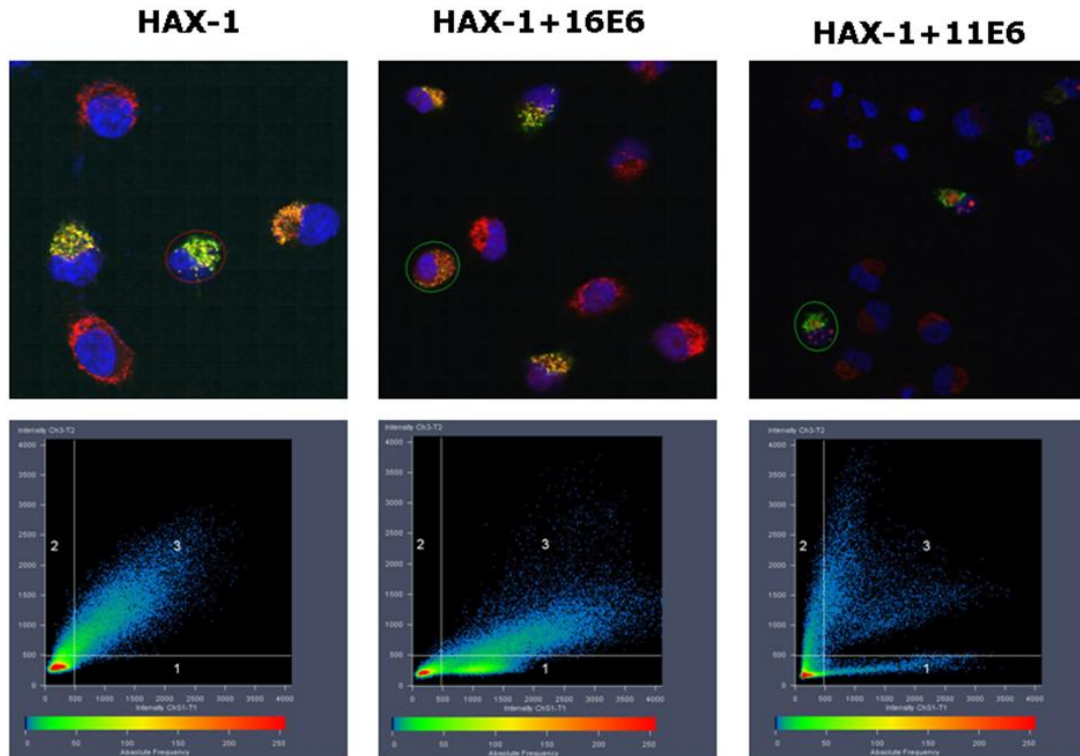


Abb. 3.16. Mitotrackerfärbung von zusätzlichen runden Strukturen in Anwesenheit von HPV11E6. H1299 Zellen wurden kotransfiziert mit Expressionsplasmiden für Flag-HAX-1 (grün) und HA11E6 oder HA16E6 (nicht angefärbt). Die Zellen wurden nach Herstellerangaben mit Mitotracker rot behandelt. Zellkernfärbung (blau) erfolgte mittels DAPI. Konfokale Aufnahme wurden im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC (Bio Imaging Center) Konstanz durchgeführt.

Die Kotransfektion von HAX-1 mit HPV11E6 führt jedoch dazu, dass der Mitotracker zusätzlich runde Zellbestandteile ausserhalb der sonst detektierten spaghettiartigen Strukturen anfärbt. Die Kolo-kalisation von HAX-1 und dem Mitotracker-Signal wurde mittels der ZEN Software von Zeiss grafisch dargestellt, wobei eine 100%ige Kolo-kalisation eine genaue Diagonale ergeben würde. Anhand der grafischen Auswertung sieht man deutlich, dass HAX-1 in Anwesenheit von HPV11E6 nur noch mit einem Teil der durch den Mitotracker angefärbten Strukturen kolo-kalisiert. Dass es sich um mitochondriale Strukturen handeln könnte, ist zwar unwahrscheinlich, da das mitochondriale Protein HAX-1 nicht in diesen Strukturen lokalisiert ist, dennoch wurden die Strukturen durch die Anwendung eines zweiten in diesem Falle grünen Mitotrackers der Firma Invitrogen im Folgenden genauer untersucht.



Platzhalter

Abb. 3.17. Kolokalisation von HAX-1 mit den durch Mitotracker rot angefärbten Strukturen. Die Merge Bilder der Abb 3.16 wurden mittels der Zen Software von Zeiss hinsichtlich von Kolokalisation des roten und des grünen Kanals überprüft. Wobei die Intensitäten gegeneinander in einem Graphen dargestellt sind. Bei einer 100% igen Überlagerung würde sich eine Diagonale durch den Graphen ergeben.

3.1.2.7 HPV11E6 führt zur Ausbildung runder Strukturen, die von Mitotrackern angefärbt werden.

Der grüne Mitotracker der Firma Invitrogen unterscheidet sich im Wesentlichen von dem roten in der Tatsache, dass er Mitochondrien auch unabhängig von deren Membranpotential anfärbt. In Abbildung 3.18 sieht man anhand von untransfizierten abwechselnd mit rotem oder grünem Mitotrackern gefärbten Zellen, dass beide die gleichen spaghettiartigen Strukturen neben dem Zellkern anfärben.

Überexprimiertes HAX-1 wird von grünem Mitotracker (Abb 3.19) in gleichem Maße angefärbt wie vom roten Mitotracker (vergleiche Abbildung 3.16). Auch der grüne Mitotracker färbt in der Kotransfektion mit HPV11E6 die unter 3.1.2.6 bereits beobachteten zusätzlich entstehenden runden Strukturen, die man zum Teil sogar im Zellkern beobachten kann, an.

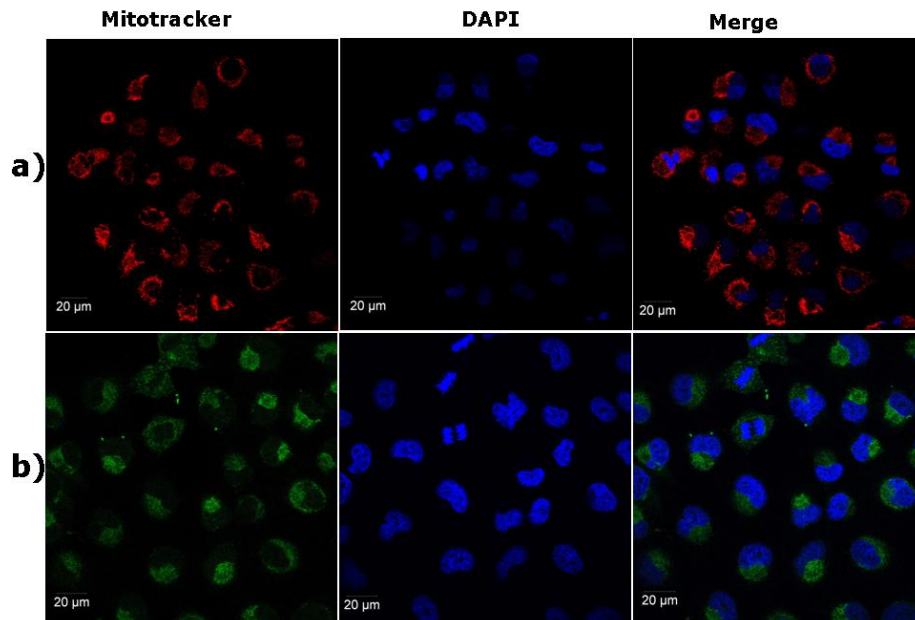


Abb. 3.18. Vergleich der durch Mitotracker rot oder Mitotracker grün angefärbten Strukturen. Untransfizierte Zellen wurden mit Mitotracker rot a) oder grün b) angefärbt. Zellkernfärbung (blau) erfolgte mittels DAPI. Konfokale Aufnahmen wurden im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC Konstanz durchgeführt.

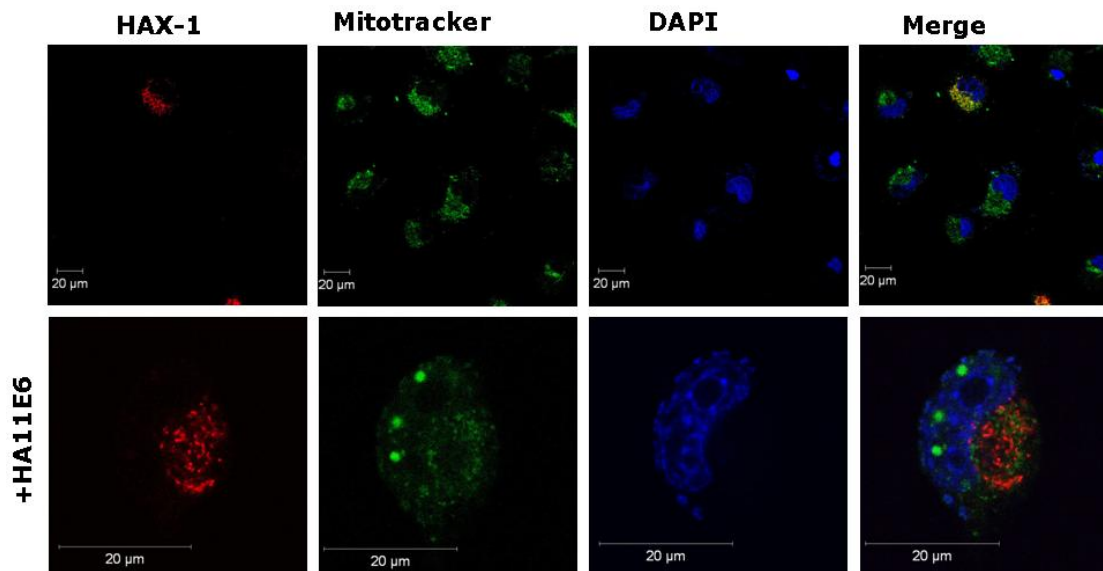


Abb. 3.19: Mitotracker grün färbt zusätzlich zu den Mitochondrien runde Strukturen in Anwesenheit von HPV11E6 an. In H1299 Zellen wurde Flag-HAX-1 (rot) und HA11E6 (nicht angefärbt) exprimiert. Die Zellen wurden für die Immunfluoreszenz vorbereitet (2.2.32) und mit Mitotracker grün angefärbt. Zellkernfärbung (blau) erfolgte mittels DAPI. Die konfokalen Aufnahmen wurden im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC Konstanz durchgeführt.

Ob diese Strukturen aus dem Zusammenspiel von HAX-1 und HPV11E6 heraus resultieren, wurde in einer Einzeltransfektion überprüft. Abbildung 3.20 zeigt HPV11E6 exprimierende Zellen die sowohl mit rotem als auch mit grünem Mitotracker angefärbt sind. Hier wird sehr deutlich, dass die Bildung dieser runden

Strukturen auf die Überexpression von HPV11E6 zurückzuführen ist und unabhängig von der HAX-1 Überexpression stattfindet. Ob es sich hier um die bereits von Guccione et al als Interaktionspartner für HPVE6 Proteine beschriebenen PML NBs handelt oder um andere Strukturen wie P-bodies (auch GW-bodies genannt), muss durch weitere Versuche mit spezifischen Antikörpern oder GFP-Fusionsproteinen spezifisch für diese Strukturen untersucht werden (siehe Diskussion).

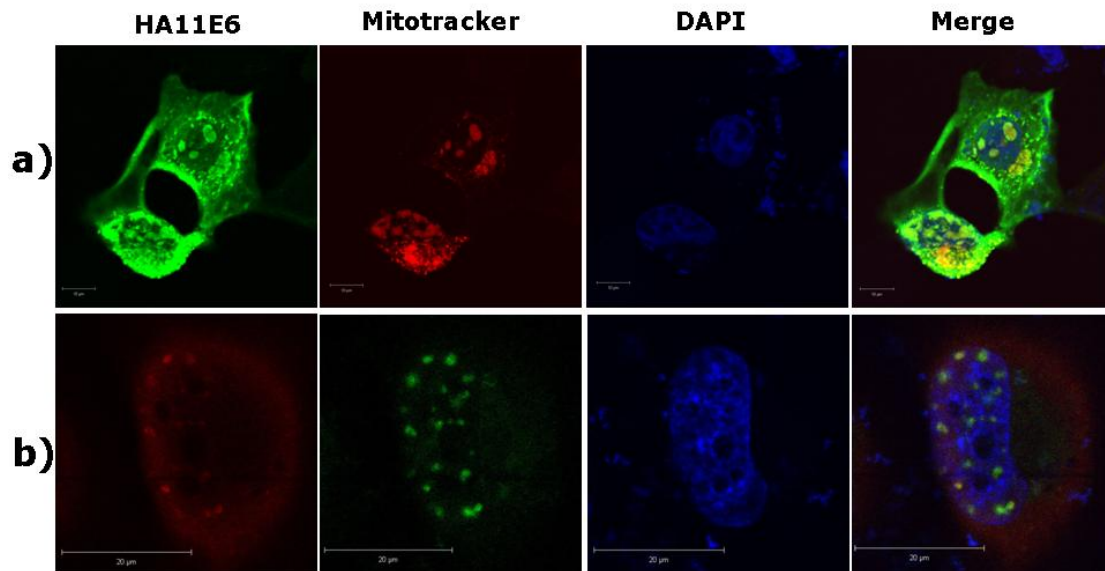


Abb. 3.20. HPV11E6 führt zur Ausbildung runder durch Mitotracker anfärbbare Strukturen. H1299 Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid für HA11E6 transfiziert und für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet (2.2.32). a) Anfärbung der Zellen mit Mitotracker rot. HA11E6 grün gefärbt. b) Anfärbung der Zellen mit Mitotracker grün. HA11E6 rot gefärbt.

3.1.3 Suche nach neuen Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6 mittels Tandem Affinity Purification (TAP).

Durch eine Tandem Affinitätsaufreinigung sollte zusätzlich zum YTH Screen nach weiteren Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6 Protein *in cellulo* gesucht werden. Hierfür wurden Vektoren konstruiert, die eine Expression des E6 Proteins mit zwei verschiedenen Tags in menschlichen Zellen ermöglichte.

Über diese doppelte Aufreinigungsmöglichkeit, einmal über den Strep-Tag und einmal über die His-Tags, sollen möglichst viele unspezifisch bindende Proteine beseitigt werden, so dass die spezifischen und stärker bindenden Interaktionspartner identifiziert und massenspektrometrisch bestimmt werden können.

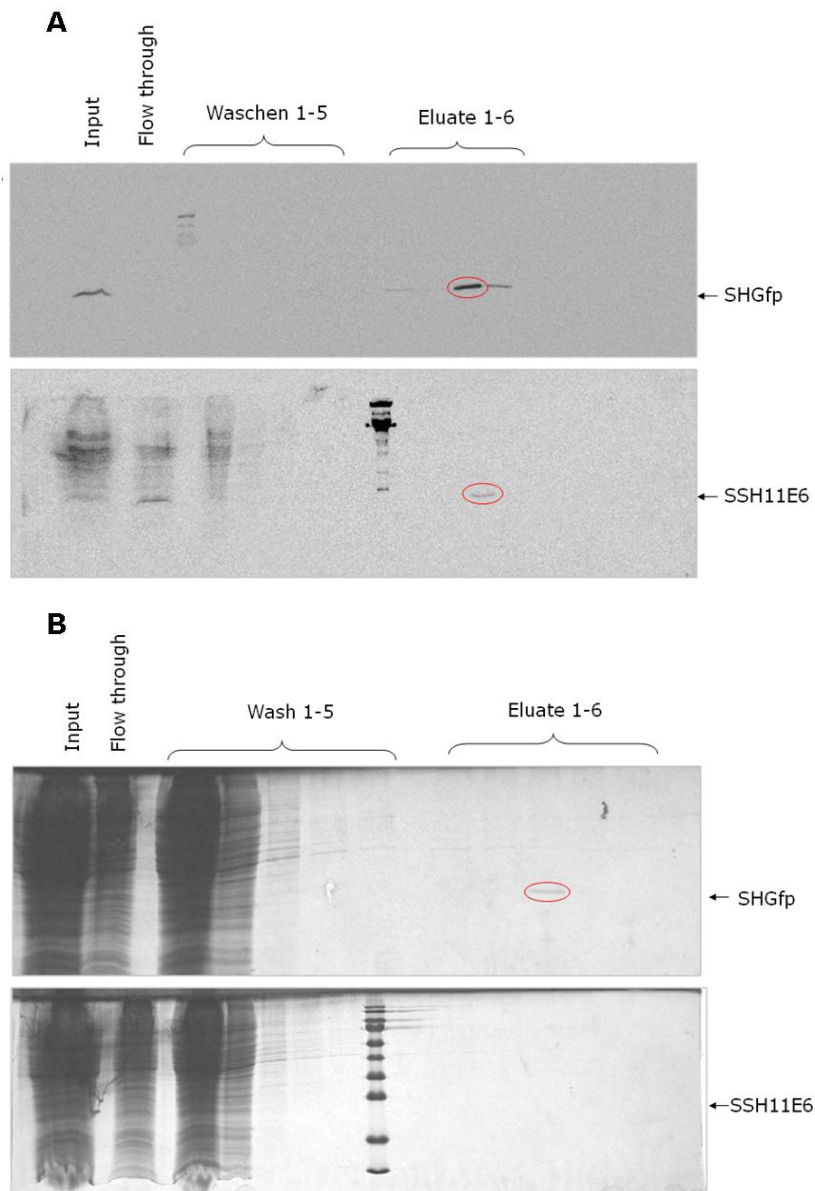


Abb. 3.21: Tandem Affinity Purification. Aufreinigung mittels Streptactin Säule. H1299 Zellen wurden mit Strep-6xHis getagten GFP (SHGFP) oder Strep-Strep-6xHis getagten HPV11E6 (SSH11E6) transfiziert, lysiert und nach Herstellerangaben über eine Strep Tactin Säule aufgereinigt (siehe 2.2.26). Input, Flow through sowie Fraktionen der 5 Waschschrte und der 6 Elutionsschritte wurden über SDS PAGE aufgetrennt. A) In einem Westernblot wurde mittels Strep Antikörperfärbung die Strep getagten Proteine sichtbar gemacht. B) Coomassiefärbung des SDS Gels zeigt SH-GFP in Elution 3.

Für den Versuch wurden die Konstrukte Strep-6xHis-EGFP (im Folgenden SHGFP genannt) und Strep-Strep-6xHis-11E6 (im Folgenden SSH11E6 genannt) in humanen Zellen transfiziert. Die Zellen wurden anschließend über eine Strep-Tactin Säule aufgereinigt. Vom Durchfluß (Flow through) wurden 0,1%, von dem ersten Waschschrte 0,4%, von den folgenden Waschschrten und allen Elutionsfraktionen jeweils 4% auf ein SDS Gel geladen und aufgetrennt.

Durch einen Westernblot und eine Strep-Antikörperfärbung konnten SHGFP in Eluat 3 und 4 und SSH11E6 nur in Eluat 3 nachgewiesen werden (Abb 3.21). SHGFP war im Gegensatz zu SSH11E6 außerdem in so ausreichenden Mengen vorhanden, dass es auch durch eine Coomassiefärbung detektiert werden konnte (Abb 3.21B). Die Eluate drei und vier von SSH11E6 und SHGfp wurden im zweiten Aufreinigungsschritt für einen NiNTA Pulldown verwendet.

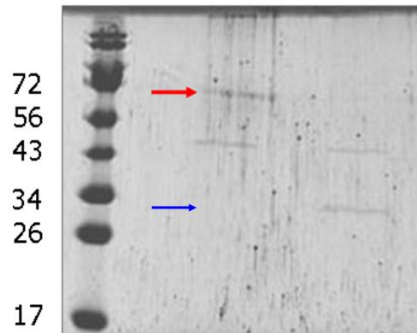


Abb. 3.22: Tandem Affinity Purification. NiNTA Pulldown. Die Eluate 3 und 4 der Strepaufreinigung wurden vereinigt und mit NiNTA inkubiert, gewaschen, über SDS PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. blauer Pfeil = SSHGFP roter Pfeil = unidentifizierte Bande

In Abbildung 3.22 sieht man den Vergleich von aufgereinigtem SSH11E6 zu aufgereinigtem SHGfp. Trotz der NiNTA Fällung war zu wenig SSH11E6 vorhanden, um es durch eine Coomassiefärbung sichtbar zu machen. Dies war nicht der Fall für SHGfp.

Beiden Proben gemeinsam ist eine Bande bei 43kDa, die als Hintergrundbande nicht weiter untersucht wurde. Bis auf eine Bande bei ca. 70 kDa wurden jedoch keine Proteine entdeckt, die in ausreichender Menge an SSH11E6 gebunden haben, dass man sie durch eine Coomassiefärbung detektieren könnte. Zusammenfassend war die Menge des eingesetzten Materials vermutlich zu gering um detektierbare Mengen an Interaktionspartner zu identifizieren. Für die Zukunft ist ein Upscale mit einer stabil exprimierenden HPV11E6 Zelllinie geplant, die in unserer Arbeitsgruppe zurzeit in Vorbereitung ist.

3.1.4 Suche nach neuen Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6 mittels GST-Pulldown.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung neuer Interaktionspartner ist ein Pulldown mit bakteriell exprimierten Proteinen als Affinitätsmatrix und Zellysat. Auf der Suche nach bisher noch unbekanntem Interaktionspartnern des low risk HPV11E6 Proteins wurde das Fusionsprotein GST11E6 in Bakterien exprimiert, an Glutathionsepharose

gebunden und aufgereinigt. Kontrollprotein für den Pulldown war GST um unspezifische Bindungen an den GST-Tag des GST11E6 Proteins auszuschließen. Das Zelllysate humaner Zellen (HEK293T) wurde für einen „Purify“ mit Glutathionsepharose vorinkubiert. Hier sollten die Proteine, welche bereits unspezifisch an die Sepharose binden, aus dem Zelllysate entfernt werden. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine mit dem vorgereinigtem Zelllysate inkubiert. Die Sepharosebeads wurden gewaschen, über SDS PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassiefärbung sichtbar gemacht (Abb. 3.23).

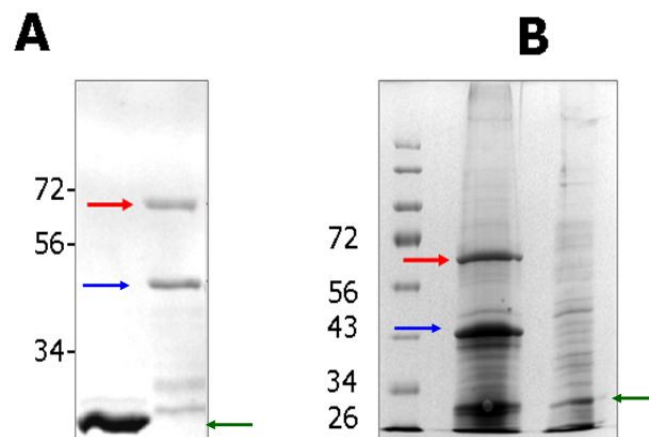


Abb. 3.23. GST Pulldown zur Identifizierung neuer HPV11E6 Interaktionspartner. A) GST (grüner Pfeil) und GST11E6 (blauer Pfeil) wurden in Bakterien exprimiert und über Bindung an GST-Sepharosebeads aufgereinigt, über SDS PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. B) Die unter A) aufgereinigten und an beads gebundenen GST Proteine wurden mit Zelllysate von 15 x 15 cm Platten HEK293T Zellen inkubiert, gewaschen, über SDS PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt.

Der Vergleich beider Pulldown-Proben zeigt keinen Unterschied im Bandenmuster des GST Pulldowns zu dem des GST11E6 Pulldowns. Es konnten also keine Proteine des Zelllysates detektiert werden, die spezifisch an das HPV11 E6 binden.

Auffällig jedoch ist eine bereits bei dem aufgereinigten bakteriellen GST11E6 auftauchende Bande zwischen dem 56 kDa und dem 72 kDa Marker (Abb. 3.23 A und B durch einen roten Pfeil markiert). Diese ist nach dem Pulldown ebenfalls die einzige Bande, die sich von dem Bandenmuster des GST Pulldowns unterscheidet. Weiterhin läuft sie auf der gleichen Höhe wie die Bande, die bereits in dem NiNTA Pulldown (Abb. 3.22) des TAP Versuches beobachtet wurde.

Die Bande wurde aus dem GST Pulldown Gel (Abbildung 3.23) ausgeschnitten und zur Analyse durch Massenspektroskopie an Dr. Andreas Marquardt in unserer Gruppe gegeben. Die Ergebnisse daraus zeigten wie bereits erwartet, dass es sich hierbei um ein Chaperonin in diesem Falle GroEL handelt. Dieses wird bei der Neusynthese von ca. einem Drittel aller mittelgroßen (30–60 kDa) Bakterienproteine

benötigt, wobei die ungefalteten Aminosäureketten unspezifisch an GroEL binden. Sie werden im Inneren des Chaperoninkomplexes eingeschlossen, können dort ihre physiologische Struktur annehmen und werden als gefaltetes Substratprotein wieder freigesetzt. Da es sich bei der identifizierten Bande um ein ausschließlich bakterielles Protein handelt, muss es sich bei der auf gleicher Höhe erscheinende Bande des NiNTA Pulldowns (Abb 3.22) um ein anderes Protein handeln. Ob es sich dabei um das in Mitochondrien vorkommende Chaperonin Hsp60 handelt, muss erst noch massenspektrometrisch verifiziert werden.

3.2 Neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von HPV high- und low risk E6 Proteinen und E6AP.

Wie beschrieben (s. Einleitung 1.8) handelt es sich bei E6AP um eine zelluläre E3 Ligase, welche mit dem viralen E6 Protein der humanen Papillomaviren interagiert und in einem Komplex Interaktionspartner von E6 ubiquitiniert und zum proteasomalen Abbau führt. Weiterhin scheinen jedoch auch E6 und E6AP Effekte aufeinander auszuüben. So konnte gezeigt werden, dass high risk E6 Proteine die E3 Ligase Aktivität von E6AP steigern und somit auch seine Autoubiquitinierung fördern.

3.2.1 Die Stabilität von HPV 16E6 ist abhängig von der Bindung an E6AP.

Untersuchungen an der Zelllinie H1299 K3, einer Lungenkarzinom KnockdownZelllinie für E6AP (Kuballa et al, 2007), führten zur der Hypothese, dass die E3 Ligase E6AP ebenfalls einen Einfluss auf den Gehalt von überexprimiertem HPV16E6 in Zellen hat. Dies sollte im Folgenden durch weitere Experimente untermauert werden. Wie in Abbildung 3.24 dargestellt ist, führt eine Kotransfektion von steigenden Mengen eines E6AP-Expressionskonstruktes dazu, dass die Menge von überexprimiertem high risk E6 in den Zellen um ungefähr 50% ansteigt.

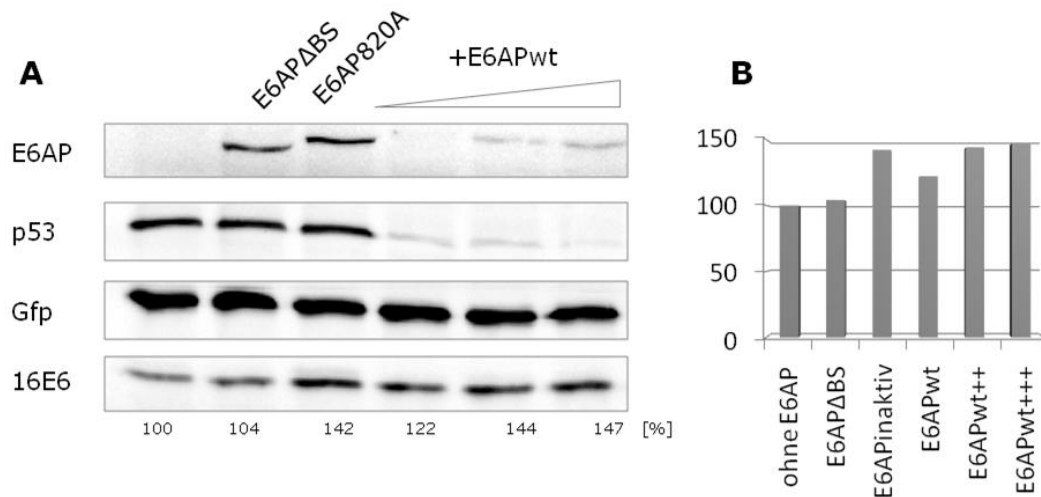


Abb. 3.24 A) H12299 K3 Zellen (E6AP Knockdown-Zelllinie) wurden mit Expressionsvektoren für 16E6, p53, EGFP, E6AP wildtyp (wt), E6AP Δ BS (E6AP Mutante die nicht an E6 Proteine binden kann) sowie E6AP820A (inaktive E6AP Mutante) transfiziert, lysiert, die Transfektionseffizienz über GFP-Fluoreszenz aneinander angeglichen, über SDS PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot die Proteine durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Mittels der AIDA Software wurden die detektierten Banden von E6 und GFP quantifiziert und miteinander verrechnet. E6 in Abwesenheit von E6AP wurde als 100% festgelegt und die anderen Werte daran angeglichen. Eine schematische Auswertung ist in dem Balkendiagramm in **B)** zu sehen. E6APwt steht für E6AP Wildtyp und die steigende Anzahl an „+“ zeigt die steigende transfizierte Menge an E6AP Expressionskonstrukt an.

Die verwendeten E6AP Mutanten E6AP Δ BS, eine Mutante die E6 nicht binden kann, und E6AP820A, eine Mutante, deren Ligasefunktion inhibiert ist, geben Hinweise darauf, dass für die Steigerung des E6 Proteinlevels in Zellen die Bindung an E6AP jedoch nicht die Funktion von E6AP benötigt wird. Ob es sich bei dieser Beobachtung um einen potentiellen zellulären Abbau von E6 handelt und die Bindung von E6AP E6 vor diesem Abbau schützt, kann aus diesem Versuch jedoch nicht geschlossen werden

Um dies näher zu untersuchen wurde ein DHFR16E6 Expressionsplasmid (2.2.30) in E6AP Knockdownzellen allein oder zusammen mit E6AP Wildtyp, E6AP Δ BS oder E6AP820A transfiziert. Als Kontrollproteine wurden außerdem p53 und Dlg kotransfiziert, die beide Substrate des HPV16E6/E6AP Komplexes sind. Sichtbar ist der Abbau beider Kontrollproteine in Anwesenheit von E6AP Wildtyp zusammen mit HPV16E6. Weiterhin erkennt man eine deutliche Stabilisierung von HPV16E6 nicht nur mit Wildtyp E6AP, sondern auch mit seiner inaktiven Mutante (Abb. 3.25).

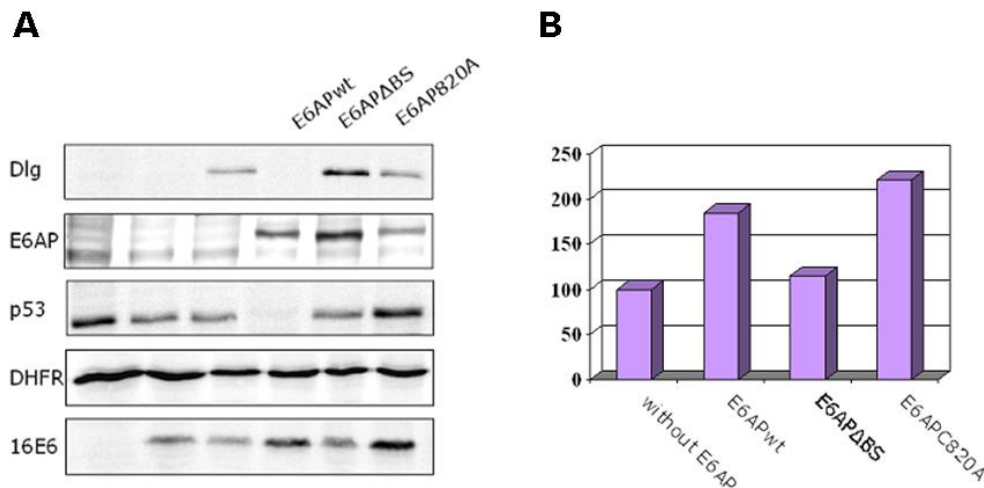


Abb. 3.25: Die Stabilität von 16E6 ist abhängig von seiner Bindung an E6AP. A) H1299 K3 Zellen (E6AP Knockdown-Zelllinie) wurden mit Expressionsvektoren für DHFR16E6, Dlg, p53, EGFP, E6AP wildtyp (wt), E6APΔBS (E6AP Mutante, die nicht an E6 Proteine binden kann) sowie E6AP820A (inaktive E6AP Mutante) transfiziert, lysiert, über SDS PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot die Proteine durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Der Angleich der Transfektionseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase, welche von einem kotransfizierten β -Galaktosidase kodierenden Vektor exprimiert wurde. Mittels der AIDA Software wurden die detektierten Banden von HA16E6 und DHFR-HA quantifiziert und miteinander verrechnet. E6 in Abwesenheit von E6AP wurde als 100% festgelegt und die anderen Werte daran angeglichen. Eine schematische Auswertung ist in dem Balkendiagramm in **B)** zu sehen. E6APwt steht für E6AP Wildtyp und die steigende Anzahl an „+“ zeigt die steigende transfizierte Menge an E6AP Expressionskonstrukt an. Diese Abbildung steht exemplarisch für drei mit dem gleichen Ergebnis durchgeführten Versuche.

Die Quantifizierung mittels der AIDA Software des E6 Westernblotsignals ist in Abbildung 3.25B dargestellt, wobei alle Signale relativ zum jeweiligen DHFR-Gehalt berechnet wurden. Bereits die Bindung von E6AP reicht aus, um HPV16E6 vor einem zellulären Abbau zu schützen. Daraus lässt sich schließen, dass es in humanen Zellen eine E3-Ligase gibt, die high risk E6 Proteine erkennt, ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zuführen kann, und diese Ligase nicht mit E6AP identisch ist.

3.2.2 HPV11E6 bindet an E6AP und seine Stabilität ist abhängig von dieser Bindung.

Entgegen der bisherigen Meinung, dass nur die high risk E6 Proteine an E6AP binden können, konnte in einem GSTPulldown mit H1299 Zellysat eine Bindung von endogenem E6AP an das rekombinant in *E.coli* exprimierte GST11E6 Protein beobachtet werden (Abb. 3.26A). Zur Bestätigung dieses Befundes wurde ein 6xHis11E6 Konstrukt in H1299 Zellen allein, mit einem E6AP Wildtyp oder einem E6APΔBS Konstrukt kotransfiziert und anschließend ein NiNTA Pulldown

durchgeführt. Abbildung 3.26B zeigt, dass E6AP Wildtyp, nicht aber die Mutante an His11E6 binden konnte und in dem Pulldown aufgereinigt wurde. Bestätigt wurden diese Ergebnisse weiterhin durch eine Veröffentlichung von Brimer et al 2007, der ebenfalls eine Bindung von low risk HPV11 an E6AP beobachten konnte (Brimer et al., 2007).

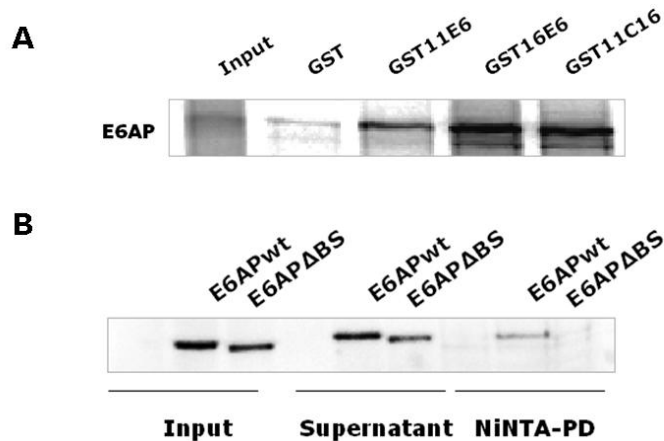


Abb. 3.26: HPV 11E6 bindet *in vitro* und *in cellulo* an E6AP. A) E6AP wurde *in vitro* translatiert, radioaktiv markiert und anschliessend mit rekombinanten an Glutathionsepharose gebundenen GST-E6 Fusionsproteinen inkubiert. Die Beads wurden gewaschen, in Probenpuffer aufgekocht, über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Radiofluorographie sichtbar gemacht. **B)** H1299 Zellen wurden mit einem Expressionskonstrukt für His-11E6, mit HA-E6AP wt (Wildtyp), sowie HA-E6AP Δ BS (E6AP Mutante, die nicht an E6 Proteine binden kann) transfiziert. Anschliessend wurde mit den Zelllysaten ein NiNTA Pulldown durchgeführt, die Proben in Probenpuffer aufgekocht, über SDS PAGE aufgetrennt und im Westernblot E6AP durch HA-Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

Nach der Beobachtung, dass low risk E6 ebenfalls an E6AP binden kann, stellte sich die Frage, ob E6AP ebenfalls einen stabilisierenden Einfluss auf das low risk HPV E6 Protein in Zellen hat. Dafür wurde ein DHFR11E6 Expressionskonstrukt (2.2.30) in E6AP Knockdown H1299 K3 Zellen allein oder zusammen mit E6AP Wildtyp, der E3-Ligasen inaktiven Mutante oder einer Mutante, die nicht an E6 binden kann, transfiziert (Abb 3.27).

Die im Westernblot detektierten Signale von HA11E6 sowie DHFR-HA wurden gegeneinander verrechnet und grafisch in Abbildung 3.27B dargestellt. Eine klare Stabilisierung von HPV11E6 war sowohl im Falle von Wildtyp E6AP, als auch im Falle der inaktiven Mutante zu erkennen. E6AP kann somit nicht nur high risk E6 Proteine vor ihrem Abbau in menschlichen Zellen schützen sondern auch das low risk HPV11E6 Protein.

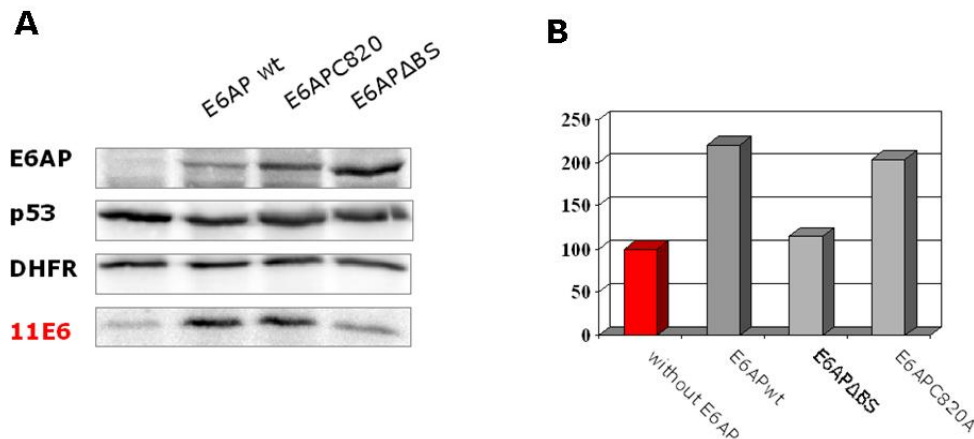


Abb. 3.27: Die Stabilität von HPV11E6 ist abhängig von seiner Bindung an E6AP. A) H12299 K3 Zellen (E6AP $-/-$) wurden mit Expressionsvektoren für DHFR11E6, p53, E6AP wildtyp (wt), E6AP Δ BS (E6AP Mutante, die nicht an E6 Proteine binden kann) sowie E6AP820A (inaktive E6AP Mutante) transfiziert, lysiert, über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine in einem Westernblot durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Der Angleich der Transfektionseffizienz erfolgte über die Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase, welche von einem kotransfizierten β -Galaktosidase kodierenden Vektor exprimiert wurde. Mittels der AIDA Software wurden die detektierten Banden von HA--E6 und DHFR-HA quantifiziert und miteinander verrechnet. E6 in Abwesenheit von E6AP wurde als 100% festgelegt und die anderen Werte daran angeglichen. Eine schematische Auswertung von einem von vier Versuchen mit gleichen Ergebnissen ist in dem Balkendiagramm in **B)** zu sehen. E6APwt steht für E6AP Wildtyp und die steigende Anzahl an „+“ zeigt die steigende transfizierte Menge an E6AP Expressionskonstrukt an.

3.3 Identifizierung zweier neuer PDZ Proteine als Interaktionspartner für das onkogene HPV16E6.

Die high risk E6 Proteine unterscheiden sich unter anderem von den low risk E6 Proteinen in ihrer C-terminalen PDZ Bindedomäne, die den low risk E6 Proteinen fehlt. Verbunden damit ist die Fähigkeit der high risk Proteine, PDZ-Domänen haltige Proteine zu binden und der E3-Ligase E6AP zuzuführen, die diese ubiquitiniert und zum proteasomalen Abbau bringt. Bekannte Substrate für diesen Komplex sind zum Beispiel Dlg, Scribble und MAGI. Bei allen drei Proteinen handelt es sich um Proteine mit einer oder mehreren PDZ Domänen. In diesem Kapitel wird die Identifizierung zweier neuer PDZ Domänen haltiger Proteine als Bindepartner von HPV high risk E6 beschrieben. Aus der oben beschriebenen Beobachtung, dass es in Zellen einen Faktor gibt, der das virale Protein E6 zum Abbau führen kann, sofern es nicht an E6AP gebunden ist, ergab sich die Frage nach einer möglichen E3 Ligase, die an E6 bindet. Bei den Proteinen LNX und SLIM handelt es sich dabei um besonders interessante Kandidaten als Interaktionspartner für die high risk E6 Proteine. Da es sich bei ihnen um beschriebene E3 Ligasen handelt, könnten sie nicht nur potentielle

Substrate für den 16E6/E6AP Komplex, sondern auch potentielle E3 Ligasen für HPV16E6 sein.

3.3.1 Die E3 Ligasen LNX und SLIM binden an die PDZ-Bindedomäne der high risk HPVE6 Onkoproteine.

LNX ist ein 728 Aminosäuren großes Protein, welches als RING E3 Ligase für das zelluläre Protein Numb beschrieben worden ist (Nie et al., 2002). Es besitzt außer einer RING Domäne und einem PTB-Domänen Bindemotiv (phosphotyrosine binding domain) weiterhin noch drei PDZ Domänen, die es zu einem potentiellen Bindepartner für die high risk E6 Proteine macht.

Bei SLIM handelt es sich um ein 349 Aminosäuren großes Protein, auch bekannt unter den Namen PDLIM2; FLJ34715 oder MYSTIQUE. Es wurde als Interaktionspartner von STAT-1 und STAT-4 entdeckt. Seinen Namen verdankt es seiner C-terminalen LIM Domäne. Diese besitzt konservierte Cystein- und Histidin-Reste, welche Zinkionen binden können und über diese Bindung zwei Zinkfinger bilden können, ähnlich denen der RING-Finger Proteine. (Capili et al., 2001). Durch seine Bindung an die STAT Proteine und die dadurch induzierte Ubiquitinierung und deren proteasomalen Abbau wird SLIM sowohl als E3 Ligase, als auch als negativer Regulator des STAT Signalweges beschrieben (Tanaka T et al, 2005).

Durch einen GST-Pulldown (Abb. 3.28) sollte die Bindung dieser beiden PDZ Proteine an HPVE6 Proteine untersucht werden. Hierfür wurden LNX und SLIM *in vitro* translatiert, radioaktiv markiert und mit rekombinanten GSTE6 Proteinen zusammen inkubiert. Wie in Abbildung 3.28 dargestellt ist, bindet LNX an die high risk E6 Proteine von HPV16 und HPV18 sowie an das Chimär 11C18, welches aus dem N-Terminus des low risk E6 von HPV11 sowie dem PDZ Domänen enthaltenden C-Terminus des high risk E6 von HPV16 besteht (Abb. 2.1). Das bedeutet, dass LNX *in vitro* an den C-Terminus der high risk E6 Proteine bindet.

SLIM zeigt ebenfalls eine Bindung an 16E6 und 11C18, jedoch konnte keine Bindung an 18E6 beobachtet werden. Auf Grund der Bindung an 11C18 kann man jedoch davon ausgehen, dass SLIM *in vitro* an die PDZ Bindedomäne der high risk E6 Proteine bindet.

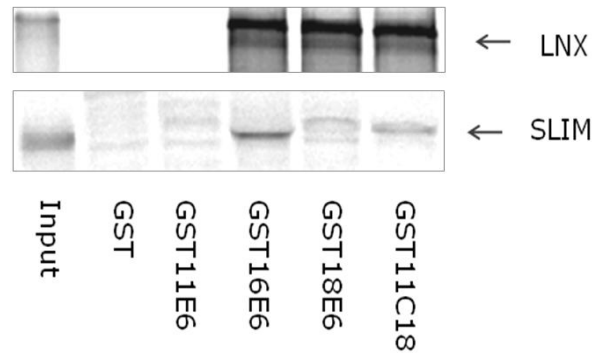


Abb. 3.28 LNX und SLIM binden *in vitro* an high risk E6. GST-Pulldown von SLIM und LNX und verschiedenen GSTE6 Proteinen. LNX und SLIM wurden radioaktiv markiert *in vitro* translatiert und mit bakteriell exprimierten und an Glutathionsepharose gebundenen GSTE6 Proteinen inkubiert, gewaschen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Radiofluorographie sichtbar gemacht.

Zur Bestätigung der *in vitro* Bindung von LNX an die PDZ Bindedomäne der high risk HPVE6 wurde GFPLNX in H1299 Zellen überexprimiert und seine Bindung an rekombinante GSTE6 Proteine in einem GST Pulldown überprüft. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Interaktion von LNX und E6 auch in Zellen nach potentieller posttranslationaler Modifikation möglich ist. Wie mit *in vitro* translatierten Proteinen bereits gezeigt (Abb. 3.28), bindet LNX auch *in cellulo* an high risk E6 Proteine, nicht aber an das low risk HPV11E6 (Abb. 3.29). Die Bindung an das Chimär GST11C18 (Abb. 2.1) unterstützt die Annahme, dass diese Interaktion abhängig von der PDZ-Bindedomäne der high risk Proteine ist. Auch in menschlichen Zellen exprimiertes LNX kann also an die PDZ Bindedomäne der high risk HPVE6 Proteine binden.



Abb. 3.29: *In cellulo* Pulldown von GFP-LNX. GFP-LNX wurde in H1299 Zellen transfiziert. Das daraus gewonnene Zelllysate wurde mit bakteriell exprimierten und an Glutathionsepharose gebundene GST-E6 Proteinen inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und GFP-Antikörperfärbung sichtbar gemacht. (Abbildung aus BA-Arbeit von Alexander Timper 2006)

3.3.1.1 Die PDZ1 Domäne von LNX ist notwendig, aber nicht ausreichend für die PDZ Bindedomänen abhängige Bindung an das onkogene HPV E6 Protein.

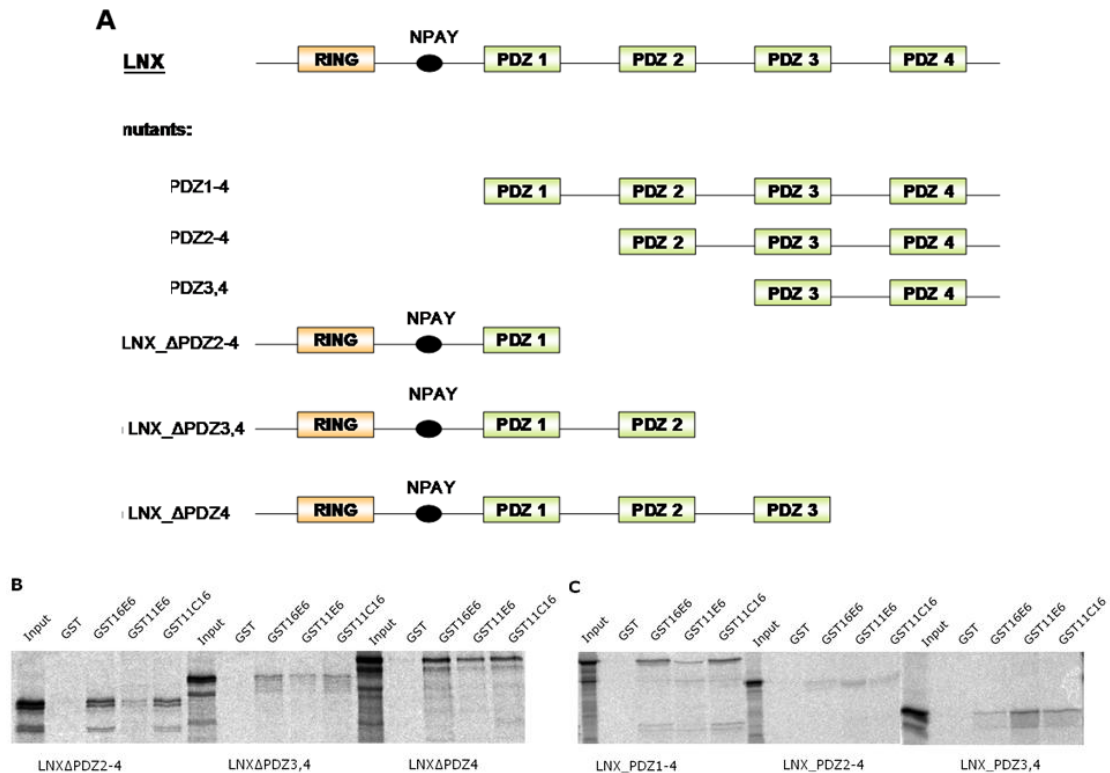


Abb. 3.30. Die PDZ1 Domäne ist wichtig für die Bindung von LNX an high risk E6. A) schematische Übersicht über die konstruierten LNX Mutanten (verändert übernommen aus BA Arbeit Stefanie Ries) **B)** Radiofluorographie des GST Pulldown mit radioaktiv markierten *in vitro* translatierten LNX Mutanten und bakteriell exprimierten GSTE6 Proteinen. Hintergrundkontrolle ist die Bindung an GST11E6, welches keine PDZ Bindedomäne aufweist und kein Bindepartner von LNX ist (Abb. 3.28)

Zur Bestimmung der genauen Bindestelle von HPV16 E6 an LNX wurden die in Abbildung 3.30A dargestellten Mutanten mittels PCR generiert und in einen pcDNA Vektor mit Flag-Tag kloniert. Im Folgenden wurden die Mutanten radioaktiv markiert (*in vitro* translatiert) und mit den bakteriell exprimierten E6 Proteinen inkubiert. Wie in Abbildung 3.30 B und C zu sehen ist, kann bei den LNX Mutanten PDZ1-4 und LNX Δ PDZ2-4, LNX Δ PDZ-3,4 und LNX Δ PDZ4 ebenfalls eine Bindung an die PDZ-Bindedomäne der high risk E6 Proteine beobachtet werden. Keine Bindung zeigten jedoch die Mutanten PDZ2-4, PDZ3,4 sowie PDZ4. Die Bindung an GST11E6 wird als Hintergrundbindung angenommen, da es auf Grund seiner fehlenden PDZ Bindedomäne nicht in der Lage ist, an LNX zu binden (Abb.3.28).

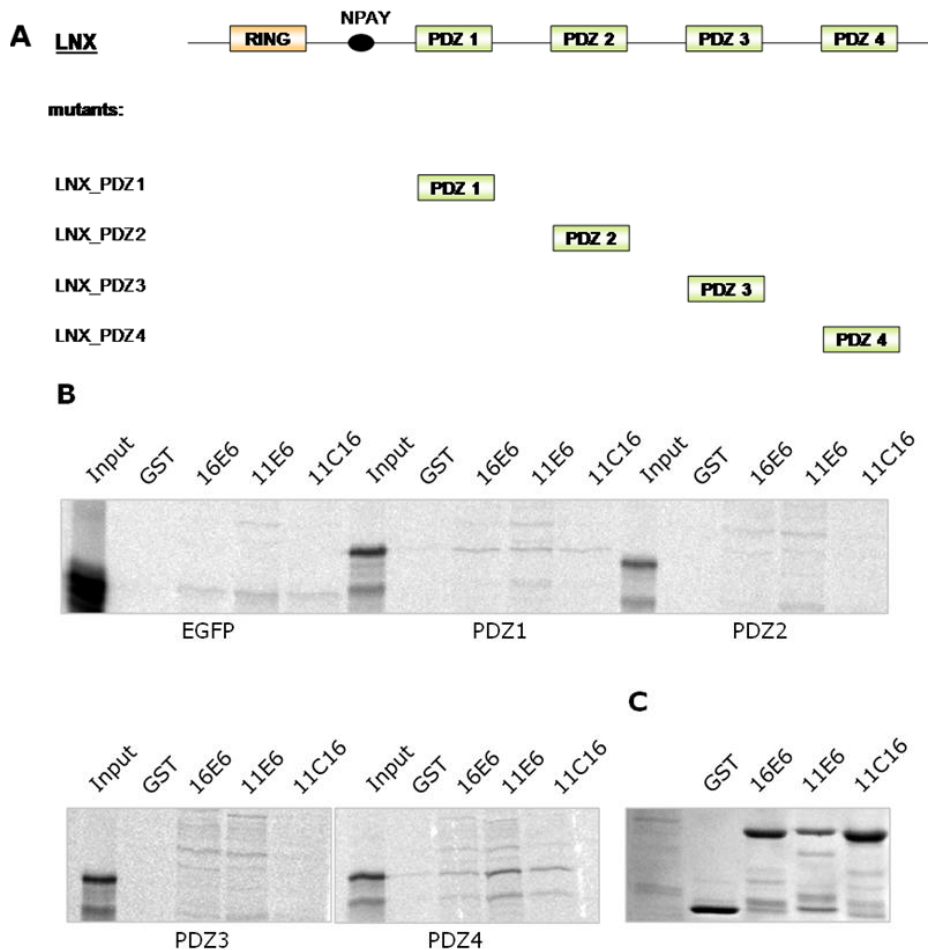


Abb. 3.31. Keine der PDZ Domänen alleine bindet an GST16E6. **A)** Schematischer Überblick über die konstruierten LNX Mutanten (verändert übernommen aus BA-Arbeit Stefanie Ries). **B)** Radiofluorographie des GST Pull-down mit radioaktiv markierten *in vitro* translatierten LNX Mutanten und bakteriell exprimierten GSTE6 Proteinen. Hintergrundkontrolle ist die Bindung an GST11E6 welches keine PDZ Bindedomäne aufweist und kein Bindepartner von LNX ist (Abb. 3.28). **C)** Coomassiefärbung der GSTProteine

Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass die Bindung von LNX an die PDZ-Bindedomäne der high risk E6 Proteine über seine PDZ 1 Domäne erfolgt.

Zur Bestätigung, ob die erste PDZ Domäne notwendig oder auch hinreichend für diese Bindung ist, wurden die einzelnen PDZ Domänen mittels PCR ebenfalls in einen pcDNA Vektor kloniert, diesmal jedoch mit einem GFP-Tag. Die Wahl des GFP-Tag beruht auf der Tatsache, dass die PDZ Domänen klein und nur schwer zu visualisieren sind. Durch den relativ großen und Methionin haltigen GFP-Tag kann diese Schwierigkeit umgangen werden. Mit den *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten einzelnen PDZ Domänen wurde ein GST-Pulldown mit bakteriell exprimierten GSTE6 Proteinen durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle wurde der EGFP Leervektor eingesetzt, um eine unspezifische Bindung des GFP-Tags an E6 auszuschließen. Wie in Abbildung 3.31 zu sehen ist, konnte bei keiner der einzelnen

PDZ-Domänen eine Bindung an die E6 Proteine beobachtet werden. Die PDZ 1 Domäne von LNX ist daher notwendig, aber nicht ausreichend für eine Bindung an die PDZ Bindedomäne der high risk E6 Proteine.

3.3.2 Sind LNX und SLIM E3 Ligasen für das onkogene HPV16E6?

Da ein Abbau des HPV16E6 in menschlichen Zellen in Abwesenheit von E6AP beobachtet werden konnte (Abb. 3.25), stellte sich die Frage nach einer möglichen E3-Ligase für die viralen E6 Proteine. Sowohl LNX als auch SLIM sind beschriebene E3 Ligasen und auf Grund ihrer PDZ Domänen in der Lage an die PDZ Bindedomäne der high risk E6 Proteine zu binden (Abb.3.28). (Capili et al., 2001; Tanaka et al., 2005). SLIM wurde als ein Protein beschrieben, welches an aktiviertes STAT1 und STAT 4 (STAT= signal transducer and activator of transcription) binden und als E3 Ligase deren Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom induzieren kann.

3.3.2.1 Das onkogene HPV16 E6 wird *in vitro* nicht durch LNX oder SLIM ubiquitiniert.

Durch einen *in vitro* Ubiquitinierungsversuch (Abb. 3.32) sollte geklärt werden, ob LNX oder SLIM E3 Ligasen für HPV16E6 sind. LNX und SLIM wurden dafür rekombinant als GST-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt, und mit dem *in vitro* translatierten HPV16E6 zusammen mit E1 und E2 Enzymen inkubiert. HPV16E6 wurde dafür zusätzlich zur *in vitro* Translation in RRL auch in WG translatiert. Dies sollte E6AP freie Reaktionsbedingungen sichern, da im RRL bekannterweise E6AP vorhanden ist. Funktionalitätskontrolle für die E3-Ligaseaktivität von LNX war ein Ubiquitinierungsversuch mit *in vitro* translatiertem Numb, welches bereits als Substrat von LNX beschrieben wurde (Nie et al., 2004).

Wie erwartet war LNX in der Lage, Numb zu ubiquitinieren (Abb. 3.32C). Eine Ubiquitinierung von 16E6 war jedoch weder mit dem in RRL (Abb. 3.32A) noch mit dem in WG (Abb 3.32B) translatierten Protein zu beobachten. Auch für SLIM konnte keine Ubiquitinierung von HPV16E6 beobachtet werden, jedoch war auch keine Positivkontrolle für die Funktionalität von SLIM vorhanden (Daten nicht gezeigt).

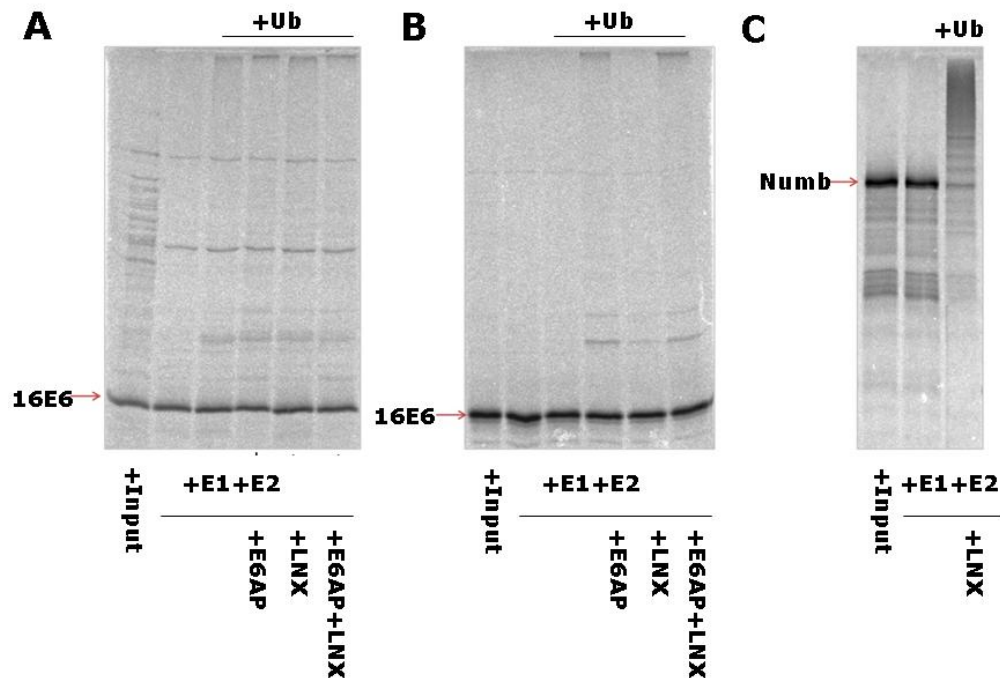


Abb. 3.32: *In vitro* Ubiquitinierungsversuche mit HPV16 und LNX. *In vitro* translatiertes und radioaktiv markiertes HPV16E6 (A+B) bzw. Numb (C) wurden wie unter 2.2.24 in einem Ubiquitinierungsversuch mit bakteriell exprimiertem GST-LNX in An- und Abwesenheit von baculo E6AP eingesetzt. A) in RRL translatiertes HPV16E6 B) in WG translatiertes HPV16E6 C) in RRL translatiertes Numb

3.3.2.2 SLIM und LNX haben keinen Einfluss auf die Stabilität des onkogenen HPV16E6 in menschlichen Zellen.

Obwohl LNX und SLIM im *in vitro* Ubiquitinierungsversuch HPV16E6 nicht als E3-Ligase ubiquitinieren konnten, ist nicht ausgeschlossen, dass sie einen negativen Effekt auf die Stabilität von HPV16E6 in Zellen haben könnten, jedoch Kofaktoren benötigen, die in dem unter isolierten Bedingungen durchgeführten *in vitro* Versuch nicht vorhanden waren. Ob LNX und SLIM einen negativen Effekt auf die Stabilität von HPV16E6 ausüben, wurde in Transfektionsversuchen mit dem DHFR16E6 Konstrukt (2.2.30) in H1299 parentalen oder E6AP knockdown Zellen (H1299 K3) getestet.

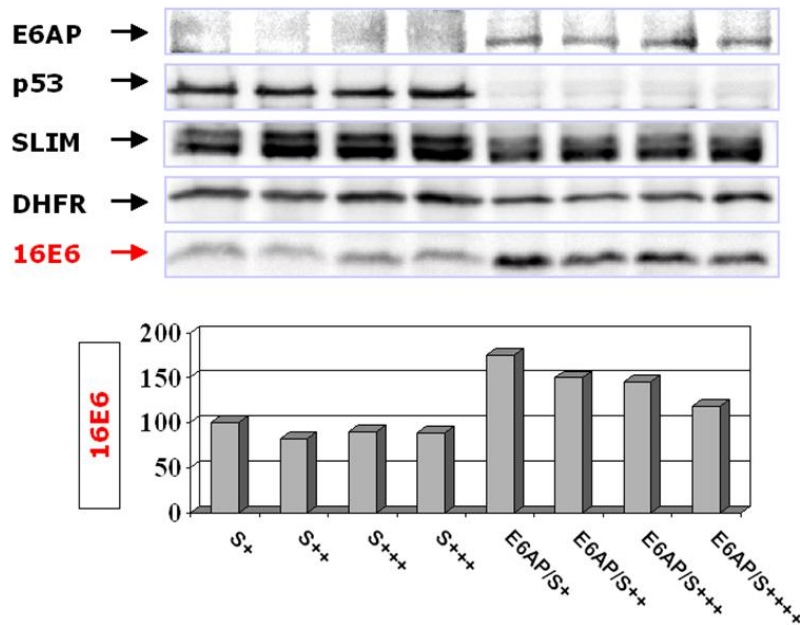


Abb. 3.33: Die Stabilität von HPV16E6 wird *in cellulo* nicht durch SLIM beeinflusst. H12299 K3 Zellen (E6AP Knockdown-Zelllinie) wurden mit Expressionsvektoren für DHFR16E6, SLIM, p53 und E6AP wildtyp (wt) transfiziert, lysiert, die Transfektionseffizienz über Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase aneinander angeglichen, über SDS PAGE aufgetrennt und in einem Westernblot die Proteine durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Mittels der AIDA Software wurden die detektierten Banden von E6 und DHFR quantifiziert und miteinander verrechnet. E6 in Abwesenheit von E6AP und SLIM wurde als 100% festgelegt und die anderen Werte daran angeglichen. Eine schematische Auswertung ist in dem Balkendiagramm zu sehen. „+“ zeigt die steigende transfizierte Menge an SLIM Expressionskonstrukt an. Dieses Experiment steht exemplarisch für 4 mit demselben Ergebnis durchgeführte Versuche.

Hierfür wurde das Expressionsplasmid für DHFR16E6 zusammen mit steigenden Mengen LNX oder SLIM in An- oder Abwesenheit von E6AP in die oben genannten Zellen kotransfiziert. Die Signale von HA16E6 und DHFR-HA wurden anschließend mittels der AIDA Software quantifiziert, miteinander verrechnet und in der Abbildung 3.33B grafisch dargestellt. Sowohl in Anwesenheit von LNX als auch von SLIM veränderte sich die Menge an HPV16E6 Protein nicht in den Zellen. Einen allerdings positiven Effekt auf die Stabilität hatte E6AP wie bereits unter 3.2.1 beschrieben. Nach den *in vitro* und den *in cellulo* Versuchen erscheint eine potentielle E3 Ligasefunktion von LNX und SLIM auf HPV16E6 eher ausgeschlossen.

3.3.3 Sind LNX und SLIM neue Substrate für den HPV16E6/E6AP Komplex?

Wie bereits beschrieben, sind einige PDZ-Proteine bekannt, die an die PDZ Bindedomäne von high risk E6 Proteinen binden. Diese Bindung bringt sie in räumliche Nähe zu E6AP, welches die PDZ Proteine, wie zum Beispiel MAGI, Dlg und MUPP, ubiquitiniert und sie dem Abbau durch das Proteasom zuführt. Bei den

neu identifizierten Bindepartnern von high risk HPVE6 handelt es sich ebenfalls um PDZ Proteine, die somit mögliche Substrate für den E6/E6AP Komplex darstellen.

3.3.3.1 SLIM

3.3.3.1.1 Das PDZ Protein SLIM wird von 16E6 und E6AP *in vitro* ubiquitiniert.

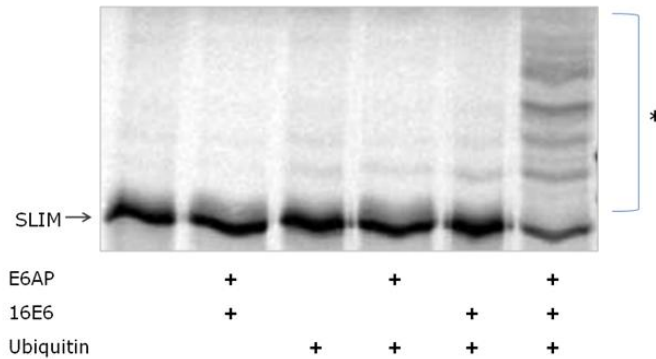


Abb. 3.34: *In vitro* Ubiquitinierung von SLIM durch 16E6 und E6AP. SLIM wurde *in vitro* translatiert, radioaktiv markiert und in An- und Abwesenheit von bakteriell exprimierten 16E6 und Baculo E6AP zusammen mit E1, E2 und Ubiquitin inkubiert, über SDS PAGE aufgetrennt und durch Radiofluorographie sichtbar gemacht. * markiert die ubiquitinierten Proteine

In einem *in vitro* Ubiquitinierungsassay wurden unter isolierten Bedingungen *in vitro* translatiertes SLIM zusammen mit Ubiquitin, E1 und E2 sowie baculo E6AP und rekombinantem aufgereinigtem GST16E6 inkubiert.

Die Abbildung 3.34 zeigt die spezifische Ubiquitinierung von SLIM durch die E3 Ligase E6AP in Anwesenheit von high risk E6. Zu erkennen ist die Ubiquitinierung an dem höher molekularen Schmier, der mit Ubiquitin modifiziertes SLIM darstellt. Weiterhin ist erkennbar, dass die unmodifizierte Form von SLIM reduziert ist. Unter *in vitro* Bedingungen kann SLIM also als Substrat des E6/E6AP Komplexes dienen. Ob dies auch in der Zelle der Fall ist, wurde im Weiteren unter Zellkulturbedingungen getestet. Zur Bestätigung der *in vitro* Ubiquitinierung von SLIM *in cellulo* wurde ein HisUbPulldown durchgeführt (2.2.31). Hierfür wurden H1299 Zellen kotransfiziert mit Expressionsplasmiden für SLIM, 16E6, E6AP und HisUbiquitin (HisUb). Anschließend wurde ein NiNTA Pulldown durchgeführt zur Aufreinigung aller an das His-Ubiquitin gebundenen Proteine. Als Positivkontrolle für den Versuch wurde eine Kotransfektion von p53, seiner E3 Ligase Mdm2 und HisUb durchgeführt. Nach dem NiNTA Pulldown ist im Westernblot mit anti p53 Antikörper die Bindung von HisUbiquitin an p53 zu erkennen (Abb. 3.35).

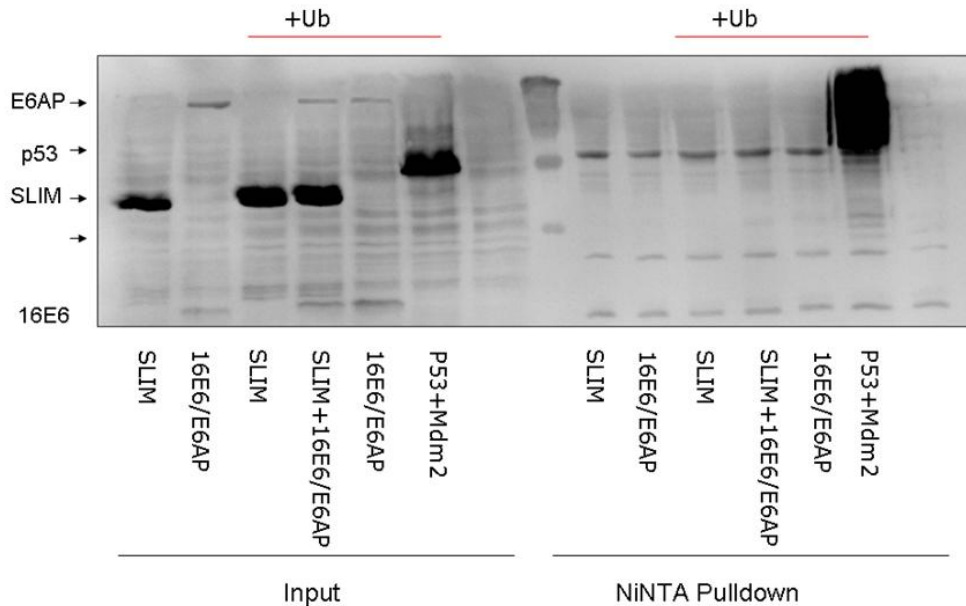


Abb. 3.35: SLIM wird *in cellulo* nicht durch E6 und E6AP ubiquitiniert.. Wie unter 2.2.27 wurde His-Ubiquitin (Ub) zusammen mit Flag- SLIM-1, HA-16E6 sowie HA-E6AP in Zellen überexprimiert. Ein NiNTAPull-down reinigte die an His-Ub gebundenen Proteine auf. Sie wurden über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und anti HA-, Flag und p53 Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Positivkontrolle ist die Kotransfektion von p53 mit seiner E3 Ligase Mdm2. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für den mit gleichem Ergebnis dreifach ausgeführten Versuch.

Es war jedoch nicht möglich, SLIM im Pull-down zu detektieren. Die Ubiquitinierung von SLIM durch HPV16E6 und E6AP konnte unter den gewählten Bedingungen *in cellulo* nicht nachgewiesen werden (Abb.3.35). Es muss jedoch angemerkt werden, dass es unter His-Ubiquitin Versuchsbedingungen jedoch auch nicht möglich ist, eine Ubiquitinierung von p53 durch HPV16E6 nachzuweisen.

3.3.3.1.2 HPV16E6 hat *in cellulo* keinen negativen Einfluss auf die Stabilität von SLIM.

Da durch den HisUbPull-down eine Ubiquitinierung von SLIM durch den 16E6/E6AP Komplex nicht nachweisbar war (Abb. 3.35), sollte mit Hilfe eines Expressionsplasmides für DHFRSLIM (2.2.30) untersucht werden, ob HPV16E6 zusammen mit E6AP einen negativen Einfluss auf die Proteinlevel von SLIM *in cellulo* hat. In H1299 parental (Daten nicht gezeigt) und K3 Zellen (Abb. 3.36) wurde DHFRSLIM, HPV16E6 und E6AP zusammen kotransfiziert.

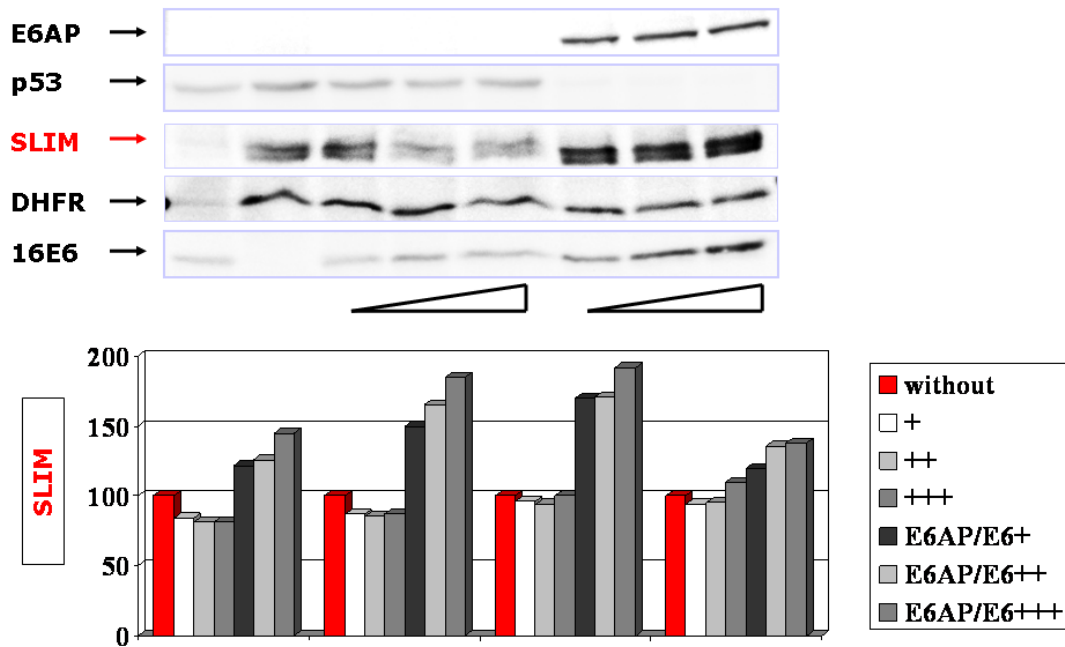


Abb. 3.36: 16E6 hat keinen Einfluss auf die Stabilität von SLIM *in cellulo*. H12299 wurden mit Expressionsvektoren für DHFRSLIM, steigenden Mengen HPV16E6 (markiert durch schwarze Keile), p53 und E6AP wildtyp (wt) transfiziert, lysiert, die Transfektionseffizienz über Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase aneinander angeglichen, über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine in einem Westernblot durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Mittels der AIDA Software wurden die detektierten Banden von E6 und DHFR quantifiziert und miteinander verrechnet. SLIM in Abwesenheit HPV16E6 und E6AP wurde als 100% festgelegt und die anderen Werte daran angeglichen. Eine schematische Auswertung für 4 Versuchsreihen ist in dem Balkendiagramm unten zu sehen. „+“ zeigt die steigende transfizierte Menge an HPV16E6 Expressionskonstrukt an.

In Abbildung 3.36 sieht man beispielhaft einen Westernblot des Versuches in H12299K3 Zellen. Die Signale von HASLIM und DHFR-HA wurden mittels AIDA Software quantifiziert und gegeneinander verrechnet. In Abbildung 3.36 sind die Ergebnisse der vier Wiederholungen dieses Versuches in K3 Zellen graphisch ausgewertet. Einen negativen Einfluss von 16E6 und E6AP kann man nicht beobachten, wenn überhaupt, scheint E6AP eher einen stabilisierenden Einfluss auf SLIM zu haben.

3.3.3.1.3 Lokalisation von SLIM und HPVE6 Proteinen in der Überexpression.

Zur weiteren Analyse der Interaktion von SLIM mit den HPV high risk E6 Proteinen sollte ihre Lokalisation in Zellen durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Hierfür wurden H12299 Zellen kotransfiziert mit Expressionsplasmiden für SLIM, GFP, und verschiedenen GFPE6 Fusionsproteinen. Nach Anfärbung der Zellen mittels Antikörper konnte SLIM in den Zellen in rot detektiert werden. Eine zusätzliche DAPI Färbung markierte die Zellkerne in blau.

Die Verteilung der GFPE6 Proteine in Abwesenheit von SLIM ist in Abbildung 3.37 zu sehen.

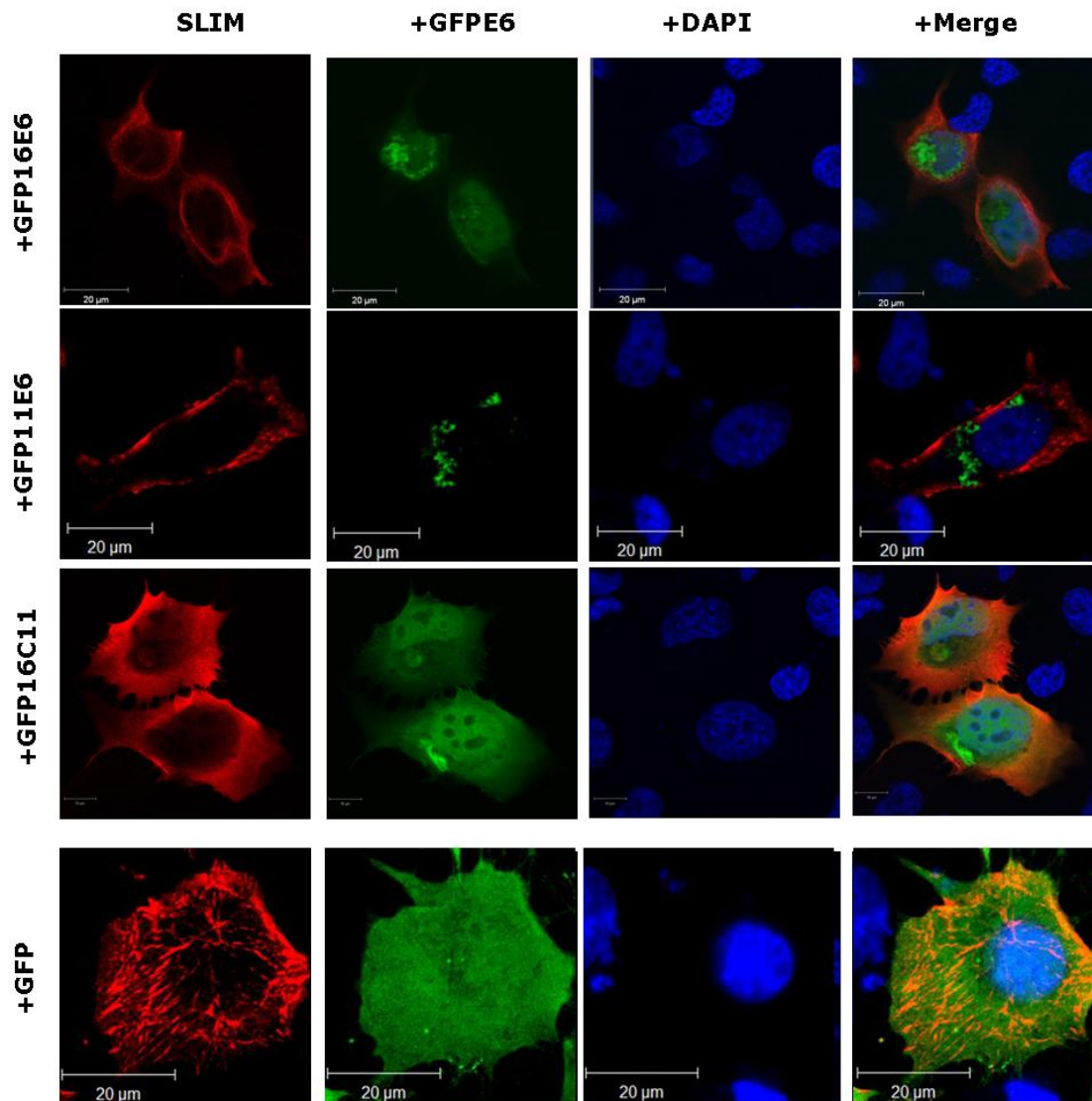


Abb. 3.37. Die Koexpression von SLIM führt zu einer Akkumulation von HPV11E6 in punktförmigen Strukturen. H1299 wurden mit Expressionsplasmiden für Flag-SLIM (rot), GFP, GFP11E6, GFP16E6 oder GFP16C11 kotransfiziert und mit Flag Antikörperfärbung auf die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet (2.2.32). Zellkernfärbung (blau) erfolgte mittels DAPI. Die konfokalen Aufnahmen wurden im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC Konstanz durchgeführt.

Bei SLIM handelt es sich um ein hauptsächlich cytoplasmatisches Protein. Es spannt ein faserartiges Netz an der Zellmembran der Zellen (Abb. 3.37). In diesen Kotransfektionsversuchen mit SLIM wurde keine Kolokalisation von SLIM und den GFPE6 Proteinen deutlich, auch wurde kein Effekt der GFPE6 Proteine auf die Stabilität oder die Verteilung von SLIM in der Zelle sichtbar. Die verschiedenen GFPE6 Proteine sind unter normalen Bedingungen wie das GFP Protein selbst ubiquitär in der Zelle verbreitet (Abb.3.37) Die Koexpression mit FlagSLIM führt jedoch bei GFP16E6 und GFP11C16 zu einer Akkumulation in einer abgegrenzten

Struktur in der Nähe des Zellkerns. GFP11E6, welches als nichtbindendes Kontrollprotein dienen sollte, zeigt überraschenderweise eine Herunterregulierung im cytoplasmatischen Bereich sowie Aggregation in punktförmigen Strukturen

3.3.3.1.4 Die Überexpression von SLIM und HPV11E6 führt zum Abbau von HPV11E6.

Die Kotransfektionsversuche mit SLIM für die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie führte zu einem unerwarteten Nebenergebnis. Die Koexpression von SLIM führt dazu, dass weniger bis kein GFP11E6 im Cytoplasma verteilt ist, vielmehr ist 11E6 hauptsächlich in punktförmigen, bisher noch nicht näher identifizierten Strukturen vorzufinden.

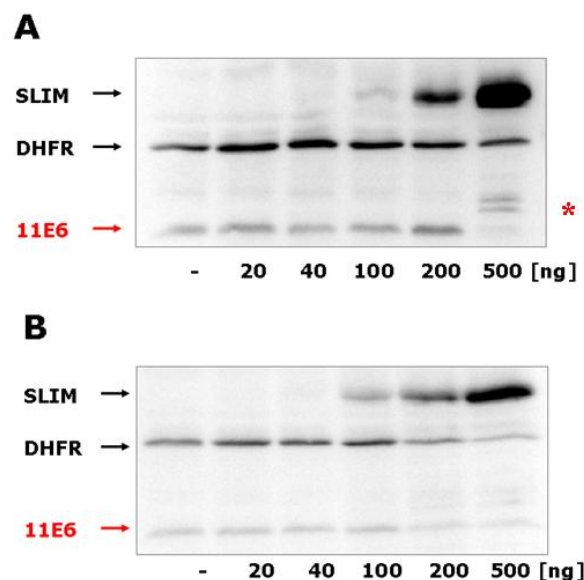


Abb. 3.38: SLIM hat einen negativen Einfluss auf die Stabilität von 11E6. **A)** H12299 parentale (E6AP +/+) und **B)** H1299 K3 (E6AP -/-) Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHFR11E6 und steigenden Mengen FlagSLIM transfiziert, lysiert, die Transfektionseffizienz über Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase aneinander angeglichen, über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine in einem Westernblot durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein Versuch aus einer Reihe von vier unabhängig durchgeführten Versuchen mit gleichem Ergebnis. * markiert eine Doppelbande, die nach der Färbung mit dem Anti-Flag Antikörper sichtbar wird.

Nach der Beobachtung aus den konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie Versuchen, dass SLIM einen Effekt auf HPV11E6 in Zellen ausübt (Abb. 3.37), wurde dies mit Hilfe des DHFR11E6 Expressionsplasmides (2.2.30) mehr im Detail untersucht. Hierfür wurde DHFR11E6 mit steigenden Mengen SLIM in H1299 parentalen und H1299 K3 Zellen kotransfiziert. Die Titration zeigt ein deutliches Verschwinden des HPV11E6 Signales im Vergleich zum DHFR Signal bei 500 ng transfizierten FlagSLIM Expressionsplasmid in den parentalen Zellen (Abb. 3.38). Im Falle der H1299 K3 Zellen wurde das Signal zum Ende der Titration zwar auch

schwächer, das Verhältnis zum DHFR Signal veränderte sich dadurch jedoch nicht, da dieses ebenfalls schwächer wurde. Auffällig war weiterhin eine Doppelbande zwischen HA11E6 und FlagSLIM im letzten Titrationsschritt. Diese konnte nur durch den Flag, nicht aber durch den HA Antikörper sichtbar gemacht werden, was dafür spricht, dass es sich um eventuelle FlagSLIM Abbauprodukte handelt und nicht um modifizierte Formen von HA11E6. Es konnte also das Ergebnis der Immunfluoreszenz bestätigt werden, dass eine Überexpression von SLIM den Abbau von HPV11E6 fördert.

3.3.3.2 LNX

3.3.3.2.1 Generierung einer inaktiven LNX Mutante, die an die PDZ Bindedomäne von onkogenem HPV E6 bindet .

Zur Untersuchung des Einflusses von HPV16E6 und E6AP auf LNX wurde versucht die E3 Ligasefunktion des Proteins zu unterbinden, um zu vermeiden, dass es sich als RING Ligase autoubiquitiniert. Hierfür wurde in einer Mutagenese-PCR das Cystein an Position 48, welches für die Funktion als essentiell beschrieben wurde, durch ein Alanin substituiert. Getestet wurde die Fähigkeit von LNXC48A zur Autoubiquitinierung in einem *in vitro* Ubiquitinierungsversuch. Hierfür wurde es als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und anschliessend mit E1 und E2 Enzymen sowie Ubiquitin inkubiert. Kontrollproteine waren Wildtyp LNX und E6AP, beides E3 Ligasen mit der Fähigkeit, sich selbst zu ubiquitinieren.

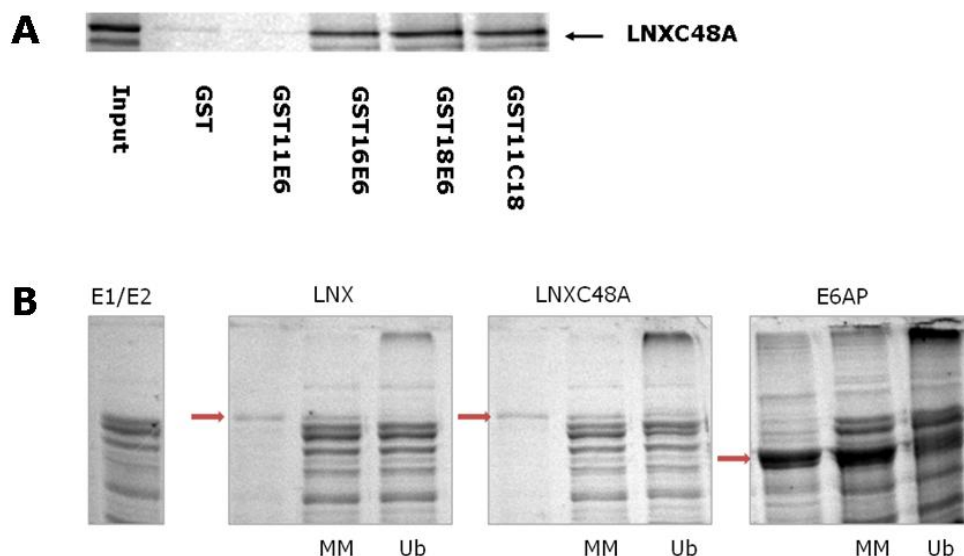


Abb. 3.39: Die inaktive Mutante LNXC48A bindet *in vitro* an high risk HPV E6. A) GST Pull-down der LNXC48A Mutante. LNXC48A wurden radioaktiv markiert *in vitro* translatiert, mit bakteriell exprimierten GST E6 Proteinen inkubiert, die beads gewaschen, über SDS PAGE aufgetrennt und durch Radiofluorographie sichtbar gemacht. **B)** Coomassiefärbung eines wie unter 2.2.24 beschriebenen Ubiquitinierungsversuches von rekombinant exprimiertem LNX Wildtyp, LNXC48A und baculo E6AP.

Abbildung 3.39B zeigt, dass auch LNXC48A ubiquitiniert wird, jedoch im geringeren Maße als Wildtyp LNX da auch nach der Inkubation mit dem Ubiquitinierungsmix die unmodifizierte Form noch vorhanden ist (im Gegensatz zu LNX Wildtyp und E6AP, die sich vollständig autoubiquitiniert haben). LNXC48A wurde weiterhin in RRL *in vitro* translatiert und in einem GST Pulldown (Abb. 3.39A) mit rekombinanten GST-E6 Proteinen eingesetzt. In Abbildung 3.39A sieht man die Bindung der LNX Mutante an die high risk E6 Proteine von HPV16 und 18 sowie an das Chimärprotein 11C18 dargestellt. Dies bestätigt, dass LNXC48A ebenfalls an die C-terminale PDZ Bindedomäne von high risk E6 Proteinen bindet.

3.3.3.2.2 LNX Wildtyp sowie LNXC48A werden *in vitro* durch 16E6 und E6AP ubiquitiniert.

Ob es sich bei dem PDZ-Protein LNX um ein mögliches Substrat des E6/E6AP Komplexes handelt, wurde zuerst *in vitro* untersucht. *In vitro* translatiertes LNX wurde mit aufgereinigtem rekombinantem GST16E6, baculo E6AP sowie einem Ubiquitinierungsmix, der unter anderem die E1 und E2 Enzyme sowie Ubiquitin enthält, inkubiert. Als Kontrollprotein wurde das für E6/E6AP bekannte Substrat Dlg verwendet.

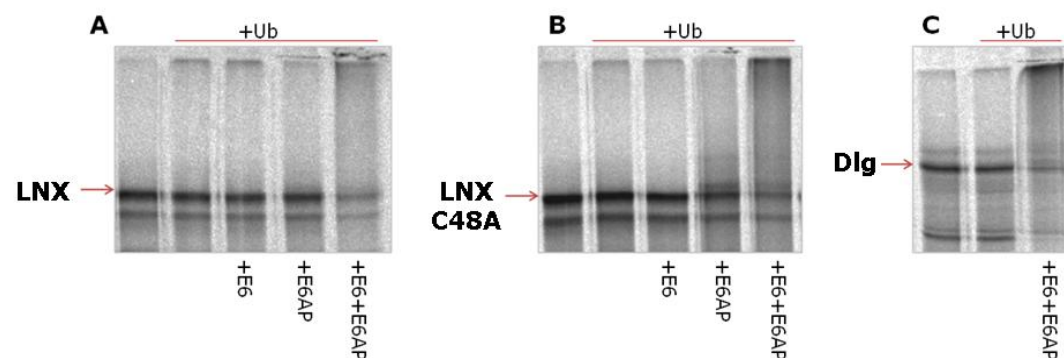


Abb. 3.40.: *In vitro* Ubiquitinierung von LNX und LNXC48A durch 16E6 und E6AP. LNX (A), LNXC48A (B) und Dlg (C) wurden im Retikulozytenlysatsat *in vitro* translatiert, radioaktiv markiert und in An- und Abwesenheit von bakteriell exprimierten 16E6 und baculo E6AP (2.2.16) zusammen mit E1, E2 und Ubiquitin inkubiert (2.2.24), über SDS PAGE aufgetrennt und durch Radiofluorographie sichtbar gemacht. * markiert die ubiquitinierten Proteine.

Eine schwache Ubiquitinierung sowohl von LNX als auch seiner inaktiven Mutante ist bereits bei einer Inkubation mit E6AP allein erkennbar (Abb. 3.40A und B), welches in *in vitro* Versuchen bekannterweise viele Proteine unspezifisch ubiquitiniert. Man sieht jedoch eine deutliche Steigerung der Ubiquitinierung in Anwesenheit von HPV16E6, so dass die Vermutung, dass es sich bei LNX um ein Substrat von E6/E6AP handeln könnte, vorerst bestätigt werden kann. Ob dies jedoch auch in

zellulärer Umgebung der Fall ist, wurde im Weiteren in *in cellulo* Versuchen überprüft.

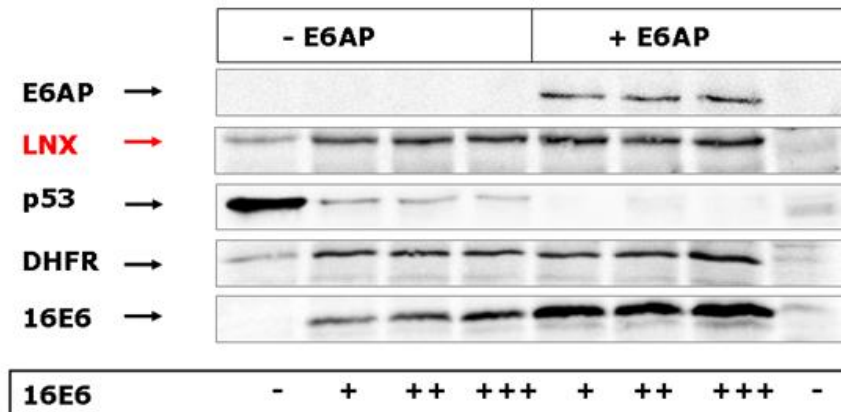


Abb. 3.41: 16E6 und E6AP haben keinen Einfluß auf die Stabilität von LNK *in cellulo*. H1299 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für DHFRSLIM, steigenden Mengen HPV16E6, p53 und E6AP transfiziert, lysiert, die Transfektionseffizienz über Bestimmung der Enzymaktivität von β -Galaktosidase aneinander angeglichen, über SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine in einem Westernblot durch Antikörperfärbung sichtbar gemacht. „+“ zeigt die steigende transfizierte Menge an HPV16E6 Expressionskonstrukt an. Die Abbildung steht exemplarisch für drei mit gleichem Ergebnis durchgeführte Versuche.

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus den vorangegangenen *in vitro* Versuchen sollte der Einfluss des E6/E6AP Komplexes auf die Stabilität des LNK Proteins in Zellen mit Hilfe eines DHFRLNK Expressionsplasmides (2.2.30) untersucht werden. Ähnlich der vorangegangenen Versuche mit DHFRSLIM, wurde DHFRLNK zusammen mit oder ohne E6AP und steigenden Mengen HPV16E6 in H1299 Zellen überexprimiert (Abb.3.41). Zur Funktionalitätskontrolle von HPV16E6 und E6AP wurde p53 eingesetzt. Vergleicht man das Verhältnis von DHFR-HA mit dem HA-LNK Signal, ist zu beobachten, dass dieses in allen Versuchsansätzen unverändert bleibt. Es war also auf diesem Wege nicht möglich einen Effekt des E6/E6AP Komplexes auf LNK nachzuweisen.

3.3.3.2.3 HPV16E6 kann *in vitro* die Ubiquitinierung von Numb durch LNX verhindern.

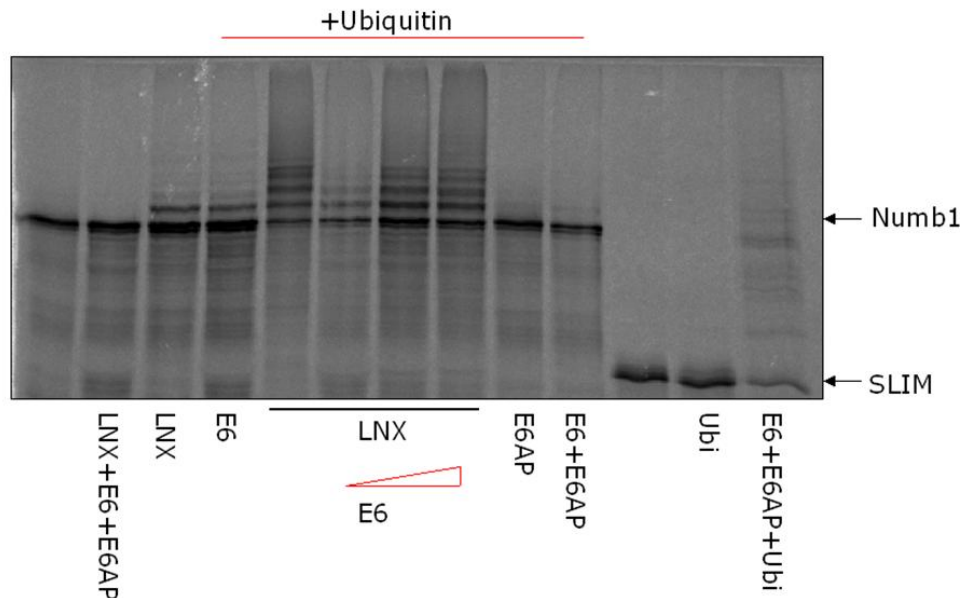


Abb. 3.42: Inhibierung der LNX vermittelten *in vitro* Ubiquitinierung von Numb durch 16E6 und E6AP. Numb wurde im Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert, radioaktiv markiert und zusammen mit GST-LNX als E3 in einem *in vitro* Ubiquitinierungsversuch (2.2.24) eingesetzt, über SDS PAGE aufgetrennt und durch Radiofluorographie sichtbar gemacht. Der rote Keil weist auf eine Titration von GST16E6 mit jeweils gleichbleibender Menge baculo E6AP (2.2.16) hin. Zum Ausgleich der Menge an eingesetzten GST-Protein wurden abnehmende Mengen GST11E6 eingesetzt.

Dass es sich bei LNX um die E3 Ligase des Notch Antagonisten Numb handelt, wurde in einer Studie von Nie et al gezeigt. Interessant an dieser Stelle ist es daher, zu untersuchen, ob E6/E6AP nicht nur einen Einfluß auf LNX, sondern auch auf seine Signalwege ausübt. Dafür sollte überprüft werden, ob 16E6 im Komplex mit E6AP die Ubiquitinierung von Numb durch LNX verhindern kann.

In einem *in vitro* Ubiquitinierungsversuch wurde *in vitro* translatiertes Numb mit rekombinant exprimiertem LNX zusammen inkubiert. Die Ubiquitinierung von Numb wird in dem höher molekularen Schmier, aber auch in der Abnahme der unmodifizierten Form von Numb deutlich (Abb.3.42). Anschliessend wurden steigende Mengen rekombinant exprimiertes HPV16E6 und E6AP dazu titriert. Ausgeglichen wurde die Titration mit abnehmenden Mengen rekombinantem GST11E6, so dass zu jedem Ansatz die gleiche Menge Protein dazugegeben wurde. Eine Stabilisierung der unmodifizierten Form von Numb durch HPV16E6 deutet darauf hin, dass Bindung des high risk E6 Proteins an LNX einen stabilisierenden

Effekt auf Numb *in vitro* hat. Zur *in cellulo* Bestätigung wurden bereits Vorversuche gemacht. In einem HisUb Pulldown konnte eine Ubiquitinierung von Numb durch eine Überexpression von LNX gezeigt werden (Abb. 3.43).

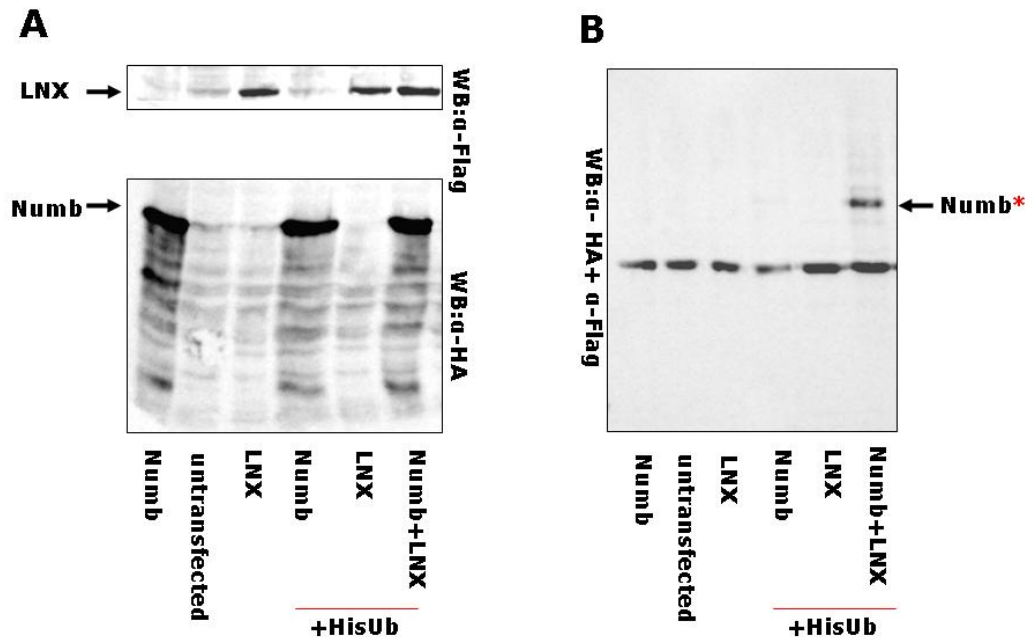


Abb. 3.43. LNX kann Numb in einem His-Ubiquitin Pulldown ubiquitinieren. Wie unter 2.2.27 beschrieben wurde His-Ubiquitin (Ub) zusammen mit Flag-LNX und Numb in H1299 Zellen überexprimiert. Ein NiNTAPulldown reinigte die an His-Ub gebundenen Proteine auf. Sie wurden über SDS PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und anti HA, Flag und p53 Antikörperfärbung sichtbar gemacht. A) zeigt die Inputlevel der überexprimierten Proteine. B) zeigt das durch den NiNTA Pulldown isolierte, an HisUbiquitin gebundene Numb.

Wie sich eine Koexpression von HPV16E6 auf diesen Zusammenhang auswirkt, muss jedoch erst noch untersucht werden.

3.3.3.2.4 Die Überexpression von onkogenem HPV16E6 führt zu einer Verschiebung von LNX aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

Nach den Ergebnissen der *in vitro* Versuche, aus denen ersichtlich wird, dass LNX an die PDZ Bindedomäne der high risk HPVE6 Proteine binden und durch die E3 Ligase E6AP ubiquitiniert werden kann, wurden durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie die Einflüsse von LNX und HPV16E6 aufeinander und eine eventuelle Kolo-kalisation untersucht. Hierfür wurden H1299 Zellen kotransfiziert mit einem GFP oder einem GFP16E6 Expressionsplasmid sowie FlagLNX, welches mittels Flag-Antikörperfärbung sichtbar gemacht wurde (Abb. 3.44, rot). Das überexprimierte FlagLNX befindet sich in Abwesenheit von 16E6 im Cytoplasma und scheint wie erwartet hauptsächlich membranständig zu sein (Abb 3.44). LNX trifft dort auf seinen Interaktionspartner Numb, welches an den Oberflächenrezeptor Notch bindet. Eine Koexpression des GFP Proteins verändert diese Verteilung nicht.

Bei einer Koexpression mit GFP16E6 jedoch verschiebt sich ein Teil des Proteins in den Zellkern. Auch kann man eine verstärkte Akkumulation von GFP16E6 an der Zellmembran beobachten. Eine Koexpression von HPV16E6 und LNX führt also zu einer Kolokalisation der beiden Proteine in menschlichen Zellen, sowie zur Verschiebung von LNX in den Zellkern. Interessant wäre es, das Lokalisationsverhalten von LNX in Anwesenheit von Leptomycin B (LMB), einem spezifischen Kernexportinhibitor, zu sehen. LMB inhibiert XPO1, welches für den Export aus dem Zellkern von Proteinen mit einer NES (nuclear export sequence) zuständig ist. Dies könnte uns zeigen, ob LNX eine solche NES enthält. Die Versuche hierzu sind jedoch noch nicht abgeschlossen.

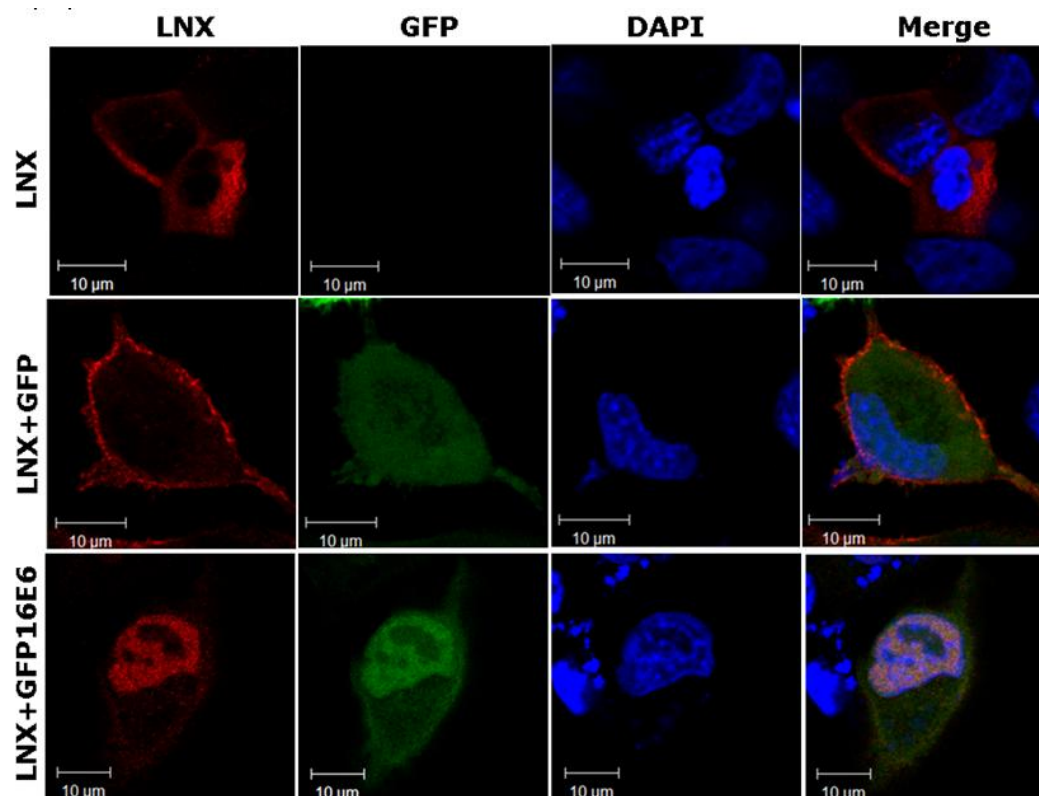


Abb. 3.44. Eine Koexpression von LNX und HPV16E6 führt zu einer Verschiebung von LNX in den Zellkern. Flag-LNX (rot) wurde in H1299 Zellen mit GFP oder GFP16E6 kotransformiert. Die Zellen wurden mit Flag Antikörperfärbung auf die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet (2.2.32). Zellkernfärbung (blau) erfolgte mittels DAPI. Konfokale Aufnahme wurden im Zeiss LSM 510 Meta Mikroskop des BIC (Bioimagingcenter) Konstanz durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Suche nach neuen Interaktionspartnern für das low risk HPV11E6

4.1.1 YTH

Eine gängige Methode zur Detektion neuer Protein-Protein Interaktionen ist der YTH Screen. Mögliche Schwierigkeiten beim Screen durch Autotransaktivierung wurden getestet (Abb. 3.2) und durch Verwendung von 3AT haltigen -Trp,-Leu,-His Selektionsplatten verhindert (Abb. 3.3). Als zweite Schwierigkeit erwies sich die Häufigkeit, der vor allem beim Screen der T-Zell Bibliothek gefundenen „out of frame“ Klone, die bereits nach wenigen Aminosäuren ein Stopcodon kodieren. Es wurde daher darauf verzichtet, weitere Klone der T-Zell Bibliothek zu untersuchen. In diesem Falle war jedoch die Interessantere die Keratinozyten cDNA Bibliothek, da Keratinozyten der Infektionsort für HPV sind. Der Screen der Keratinozyten cDNA Bibliothek lieferte fünf Proteine als potentielle Interaktionspartner für HPV11E6: Laminin, Keratin 14, Keratin 16, Threonyl tRNA Synthetase (TARS) sowie HAX-1 (Tab.3.2). Dass es sich in allen fünf Fällen nicht um unspezifische Interaktionen mit der Gal4BD des verwendeten YTH Vektors handelt, wurde durch Rücktransformationen der jeweils isolierten Klon cDNAs mit dem für die Gal4BD kodierenden Leervektor ausgeschlossen (Abb. 3.4).

Laminine bilden durch ihre drei identischen Ketten (Alpha, Beta und Gamma) eine kreuzförmige Struktur und sind eine Familie von extrazellulären Glykoproteinen, die in einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie zum Beispiel Zelladhäsion, Differenzierung und Migration eine wichtige Rolle spielen. Da es sich bei HPV11E6 jedoch um ein intrazelluläres Protein handelt, ist die Wahrscheinlichkeit, dass beide Proteine miteinander in Kontakt kommen, sehr gering, und es wurde auf weitere Untersuchungen mit Laminin verzichtet.

Eine zweite Bestätigung für die mögliche Interaktion zwischen HPV11E6 und Keratin 14, -16, HAX-1 sowie TARS ergab der durchgeführte GST-Pulldown mit den rekombinanten GSTE6 Proteinen (Abb. 3.4). Hier konnte die Bindung von Keratin 16 bzw. des getesteten Fragments Keratin 16 (240-453) an die HPVE6 nicht weiter bestätigt werden. Interessanterweise jedoch fanden wir mit dem Keratin 14 (1-200) Fragment eine für low risk HPV11E6 spezifische Bindung. Da das Fragment ebenfalls an das Chimärprotein GST11C16 nicht aber GST16E6 bindet, kann als Bindestelle an HPV11E6 der C-Terminus ausgeschlossen werden. Bei Keratin 14 handelt es sich um ein Mitglied der Keratin Familie, der vielfältigsten Gruppe der

Intermediärfilamente. Es ist ein Typ I Keratin. Zwei Keratin 14 gehen in der Regel mit zwei Typ II Molekülen (Keratin 5) ein Heterotetramer ein. Zusammen bilden sie das Zytoskelett der Epithelzellen. Mutationen im Gen für Keratin 14 werden mit Epidermolysis bullosa simplex, einer genetisch bedingten Hautkrankheit assoziiert, bei der die mechanischen Verbindungen zwischen den unterschiedlichen Hautschichten unzureichend ausgebildet sind, umgangssprachlich auch als Schmetterlingshaut bezeichnet (Chan et al., 1994).

Durch ihre vielfältigen Funktionen in den Epidermiszellen könnten die Keratine ein interessantes Ziel für die Proteine des humanen Papillomavirus sein, welcher sich ausschließlich in den sich differenzierenden Zellen der epidermalen Basalschicht vermehrt. Einen ersten Zusammenhang zwischen Keratin 14 und HPV beschrieben Barcelos et al., indem sie zeigten, dass die Änderung des Differenzierungsstatus der Epidermis durch eine HPV Infektion zu einer verstärkten Expression von Keratin 14 führt (Barcelos & Sotto, 2009).

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von HPV11E6 mit Keratin 14 nicht weiter untersucht. Die Beobachtung, dass Keratin 14 spezifisch an HPV11E6 bindet, bietet jedoch einen interessanten Ausgangspunkt für zukünftige Studien.

Die Bindung von TARS an HPV11E6 konnte im GST-Pulldown ebenfalls bestätigt werden und zusätzlich an das high risk GST16E6 sowie das Chimär GST11C16 beobachtet werden (Abb. 3.5). Bei TARS, auch als Threonyl tRNA Ligase bezeichnet, handelt es sich um eine Aminoacyl-tRNA Synthetase. Sie katalysieren die Aminoacetylierung der tRNA durch die passende Aminosäure, im Falle von TARS also dem Threonin. Bei TARS handelt es sich um ein zytoplasmatisches Protein von welchem vermutet wird, dass es evolutionär gesehen mit zu den ältesten Proteinen gehört (Cruzen & Arfin, 1991). Über mit TARS assoziierte Krankheitsbilder ist bis jetzt noch nichts bekannt.

Besonderes Augenmerk wurde im Laufe dieser Arbeit auf den potentiellen Interaktionspartner HAX-1 gelegt. Im GST Pulldown konnte die bereits im YTH beobachtete Bindung an HPV11E6 bestätigt werden. Weiterhin zeigte sich eine Bindung sowohl an HPV16E6 als auch an das Chimärprotein HPV11C16.

4.1.2 HAX-1

HAX-1, ein antiapoptotisches 35kDa großes Protein, erhielt seinen Namen durch seine Bindung an HCLS-1 (hematopoietic cell specific Lyn substrate-1), einem Substrat der Src Familie der Tyrosin Kinasen. HAX-1 besitzt eine PEST Domäne (AA104-107) sowie eine transmembrane Domäne (AA 261-273) (Sharp et al., 2002).

Mutationen im HAX-1 Gen resultieren in einer autosomal rezessiven schweren kongenitalen Neutropenie, einem angeborenen Mangel an neutrophilen Granulozyten, auch als Kostmann-Syndrom bekannt (Fadeel & Grzybowska, 2009).

HAX-1 zeigt Sequenzähnlichkeiten zum anti-apoptotischen Protein Bcl2 und zwar in seinen BH1 und BH2 Domänen. Diese Domänen werden von den antiapoptotischen Familienmitgliedern der Bcl2 Familie für eine Interaktion mit proapoptotischen Molekülen genutzt. Ähnlich diesem Muster interagiert auch Hax-1 mit verschiedenen Apoptose regulierenden Faktoren wie zum Beispiel Vpr, Omi/HtrA2 und Caspase 9 (Cilenti et al., 2004; Sharp et al., 2002; Shaw & Kirshenbaum, 2006; Yedavalli et al., 2005).

Neben seinen zellulären Bindepartnern wurden bereits einige virale Proteine als Interaktionspartner von HAX-1 beschrieben, unter anderem die Epstein Barr Virus Proteine EBNA-LP und EBNA-5, das K15 Protein des Kaposi sarcoms, sowie Vpr und Rev des HIVirus (Forsman et al., 2008; Kawaguchi et al., 2000; Sharp et al., 2002; Yedavalli et al., 2005).

Vergleichende Analysen der Bindepartner von HAX-1 ergaben die Entdeckung eines wiederkehrendes Motivs, welches HIM (HAX-1 interacting Motiv) benannt wurde (Sharp et al., 2002). Obwohl HPV11E6 dieses Motiv nicht enthält, konnte HAX-1 als Interaktionspartner für HPV11E6 im YTH identifiziert werden. Die Bindung wurde unter isolierten *in vitro* Bedingungen, unter welchen eine indirekte Bindung über Kofaktoren ausgeschlossen werden kann, bestätigt (Abb 3.5). Um den Einfluss eventueller posttranslationaler Modifikationen an HAX-1 und deren potentielle Effekte auf die Bindung mit HPV11E6 zu berücksichtigen, wurde die Interaktion ebenfalls mit *in cellulo* exprimiertem HAX-1 getestet und bestätigt (Abb. 3.7). Um die Aussage über eine Interaktion von HAX-1 mit HPVE6 Proteinen in Zellen vollständig abzusichern, sollte zusätzlich noch eine IP mit *in cellulo* exprimiertem HAX-1 und HPVE6 durchgeführt werden. Neben HPV11E6 konnte auch die Bindung von HAX-1 an das high risk HPV16E6 gezeigt werden (Abb. 3.5, Abb.3.6 und Abb.3.7), wobei diese jedoch in allen drei Versuchen schwächer zu sein scheint als die Bindung an HPV11E6.

HAX-1 ist ubiquitär exprimiert und konnte in allen getesteten adulten Geweben nachgewiesen werden (Suzuki et al., 1997). Darüberhinaus wurde eine erhöhte HAX-1 Expression in verschiedenen getesteten Tumorzellen, wie z.B.: Leber-, Lunge-, Brust- und in Epitheltumorzellen (Ramsay et al., 2007) sowie in Psoriasis Läsionen gefunden (Mirmohammadsadegh et al., 2003). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der verstärkten Expression von HAX-1 in Tumorzellen und Infektionen mit HPV zu untersuchen, wurden die endogenen HAX-1 Proteinlevel in HPV positiven

oder negativen Zelllinien analysiert (Abb 3.8). Im Vergleich mit HPV negativen Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied der HAX-1 Expressionslevel gemessen werden (Abb. 3.8). Es ist anzumerken, dass nur zwei high risk HPV positive Zelllinien getestet wurden, wobei HeLa Zellen HPV18 und SiHA Zellen HPV16 positiv sind. Da die Bindung von HAX-1 an das low risk HPV11E6 jedoch stärker zu scheitert als an HPV16E6, könnte die Untersuchung von low risk HPV infizierten Zellen in Bezug auf ihre HAX-1 Expression interessant sein,

Der für die high risk E6 bekannte Mechanismus seine Interaktionspartner der E3 Ligase E6AP und damit durch Ubiquitinierung dem proteasomalen Abbau zuzuführen, konnte für HAX-1 *in vitro* bestätigt werden (Abb. 3.9). Der *in cellulo* durchgeführte HisUbPulldown zeigte jedoch keine Bindung von HAX-1 an HisUbiquitin in Anwesenheit von 16E6 und E6AP (Abb. 3.10). An dieser Stelle gehört jedoch auch erwähnt, dass in einem solchen HisUbiquitinversuch auch keine Ubiquitinierung von p53, einem bekannten Substrat von 16E6 und E6AP (Scheffner et al., 1990), nachgewiesen werden konnte. Ungeachtet dessen konnte jedoch auch kein Einfluss von high und low risk E6/E6AP auf die Stabilität von HAX-1 mittels eines DHFRHAX-1 Konstruktes nachgewiesen werden. Die Versuche zeigten, dass HPV11E6 weder in H1299 parental noch in H1299 E6AP *-/-* Zellen Einfluss auf die Stabilität von HAX-1 hat (Abb. 3.11). Da der Abbau von PDZ Proteinen wie zum Beispiel Dlg nur bei einer Überexpression von Dlg, 16E6 und E6AP gezeigt werden konnte, wurde in einem weiteren Versuch E6AP zusätzlich in H1299 parentale Zellen transfiziert. Des Weiteren wurde hier auch der Einfluss des high risk HPV16E6 auf die Stabilität von HAX-1 getestet (Abb. 3.12). Auch unter diesen experimentellen Bedingungen konnte weder ein positiver, noch ein negativer Effekt von HPV16 oder 11E6 auf HAX-1 gezeigt werden. HAX-1 scheint daher kein Substrat für den proteasomalen Abbau durch den E6/E6AP Komplex darzustellen. Diese Beobachtung entspricht unserer Vermutung, dass ein Abbau von HAX-1 für das Virus nicht von Vorteil wäre, da es sich bei HAX-1 um ein antiapoptotisches Protein handelt und der E6/E6AP Komplex, zum Beispiel durch den Abbau des proapoptotischen Proteins p53, versucht eine Apoptose zu verhindern. Weiterhin spricht die Beobachtung, dass HAX-1 in Tumorzellen hochreguliert ist, gegen einen Abbau durch E6/E6AP. Dass HAX-1 umgekehrt seinerseits keinen Effekt auf die HPV E6 Stabilität hat, wurde außerdem mit einem DHFR11E6 Konstrukt sowohl in H1299 parentalen als auch H1299 E6AP *-/-* Zellen getestet (Abb. 3.13).

Ein für HAX-1 beschriebener Wirkungsmechanismus ist die Translokation einiger seiner Bindepartner. Beispiel hierfür ist das HIV Protein Rev. Rev befindet sich unter normalen Umständen im Zellkern und ermöglicht dort den Kernexport von viraler

mRNA. In HAX-1 koexprimierenden Zellen jedoch ist Rev vom Kern ins Cytoplasma verschoben und lokalisiert dort mit HAX-1 (Modem & Reddy, 2008). Weiterhin wurde beobachtet, dass wenn die HAX-1 Expression in Fibroblasten unterdrückt wird, das HAX-1 Bindeprotein preIL-1 α nicht wie sonst in den Zellkern verschoben wird (Yin et al., 2001). Für HS-1, dem ersten für HAX-1 identifizierten Interaktionspartner, wurde bei einer Koexpression von HAX-1 eine Umverteilung von einer diffusen Verteilung im Zytoplasma zu einer Akkumulation an der Mitochondrienmembran beobachtet (Suzuki et al., 1997). Diesen Effekt konnten wir in konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopaufnahmen bei einer Koexpression von FlagHAX-1 und GFP11E6 ebenfalls beobachten (Abb. 3.15). Die GFPE6 Proteine sind ebenfalls diffus im Zytoplasma verteilt, wobei sich das high risk E6 Protein durch eine stärkere Akkumulation im Zellkern von den low risk E6 Proteinen unterscheidet. Dieser Unterschied ist unabhängig von der PDZ Bindedomäne des high risk E6 Proteins, da das Chimärprotein GFP16C11 ebenfalls eine Akkumulation im Zellkern zeigt. GFP11E6 lokalisiert dagegen im Zytoplasma und nicht, oder nur schwach, im Zellkern. Auch weist seine Verteilung eine Strukturierung auf, die die Vermutung einer Interaktion mit den Komponenten des Zytoskeletts unterstützt. Die Koexpression von GFPE6 und HAX-1 zeigt keinen Effekt auf die Verteilung des high risk GFP16E6. GFP11E6 scheint jedoch vermehrt an den Stellen der HAX-1 Lokalisation zu akkumulieren. Dass es sich bei diesen Stellen um Mitochondrien handelt wurde indirekt durch eine Kofärbung von FlagHAX-1 exprimierenden Zellen mit MitoTracker® CMX Ros (rot) gezeigt (Abb. 3.16). Da bei dieser Versuchsanordnung FlagHAX-1 durch die Antikörperfärbung grün angefärbt wurde, wurde statt der GFPE6 Expressionsplasmide HAE6 exprimierende Konstrukte verwendet, welche nicht weiter angefärbt wurden.

Da Mitochondrien in der antiviralen Abwehr eine Rolle spielen, sind sie auch oft Ziel von viralen Proteinen, die versuchen diese Abwehrmechanismen zu umgehen oder auszuschalten (Seth et al., 2006). Dafür gibt es verschiedene Strategien: Viren, die versuchen (i) Zellen in die Apoptose zu führen, (ii) die Apoptose zu verhindern oder (iii) die Mitochondrien innerhalb der Zelle so verschieben, dass sie zur Energiegewinnung in der Nähe von viralen Replikationsorten liegen, oder sie durch Abschirmung versuchen an der Ausschüttung von Apoptosemediatoren zu hindern (Kim et al., 2007; Nomura-Takigawa et al., 2006; Radovanovic et al., 1999; Rojo et al., 1998).

4.1.3 Die Expression von HPV11E6 führt zu der Anfärbung runderer Aggregate durch MitoTracker®.

In den Koexpressionsexperimenten mit HPV11E6 und HAX-1 entdeckten wir erstmalig durch den MitoTracker® angefärbte zusätzliche runde meist aber nicht ausschliesslich, im Zellkern befindliche Strukturen. Die Größe variiert dabei von sehr kleinen Punkten außerhalb des Zellkerns (Abb.3.20A) bis hin zu größeren runden Aggregaten im Zellkern (Abb. 3.19). Ob es sich dabei um mitochondriale Strukturen handelt, sollte durch eine Kontrollfärbung mit MitoTracker® Green FM überprüft werden. Mitotracker tragen einen schwachen thiolreaktiven Chloromethyl Rest. Sie diffundieren passiv durch die Plasmamembran und akkumulieren in aktiven Mitochondrien. Dort kann MitoTracker®CMX Ros durch einen Oxidationsschritt zum Fluoreszieren gebracht werden. Für den MitoTracker®Green FM gilt, dass er auch unabhängig vom Membranpotential Mitochondrien anfärben kann und auch ohne einen anschliessenden Oxidationsschritt grün fluoresziert. Die Färbung mit beiden MitoTracker® wurde in untransfizierten Zellen verglichen (Abb. 3.18). Vom Muster her scheinen sie die gleichen Strukturen anzufärben. Für eine gesicherte Aussage wäre an dieser Stelle jedoch ein Kostaining beider MitoTracker® nützlich. In HAX-1 transfizierten Zellen kolokalisierte HAX-1 ebenfalls mit MitoTracker®Green FM und er färbte in einer Kotransfektion mit HA11E6 ebenfalls die runden nicht identifizierten Strukturen an. Auch wenn durch beide MitoTracker® angefärbt, erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich dabei um mitochondriale Strukturen handelt, da das mitochondriale Protein HAX-1 nicht mit ihnen lokalisiert. Zur Untermauerung dieser Hypothese sollen im Weiteren noch andere mitochondriale Proteine auf ihre Kolokalisation mit diesen Strukturen getestet werden.

Das Auftreten dieser Aggregate ist wie sich in Abb 3.20 zeigt unabhängig von der Koüberexpression von HAX-1. Nur HA11E6 exprimierende Zellen zeigten sowohl mit MitoTracker® CMXRos wie auch mit MitoTracker® FM Green eine Anfärbung der runden Strukturen. In Abbildung 3.20A zeigt sich die Ausbildung von kleineren Punkten ausserhalb des Zellkerns während Abbildung 3.20B die Ausbildung größerer runder Aggregate im Zellkern zeigt. Es fällt auf, dass die HA-Antikörperfärbung (HA11E6) diese Strukturen anfärbt und somit eine Kolokalisation von 11E6 mit diesen Strukturen zeigt. Diese Art der Aggregation ist bei den GFP11E6 Konstrukten (Abb. 3.15) nicht zu beobachten, hier zeigt sich eine diffuse Verteilung von HPV11E6 über das Zytoplasma. Eine Anfärbung von GFP11E6 exprimierenden Zellen mit MitoTracker®CMX Ros zeigte jedoch auch die Anfärbung der runden Strukturen (Daten nicht gezeigt). Der Unterschied in der Visualisierung von GFP11E6

und HA11E6 könnte sich aus den unterschiedlichen Expressionsleveln der beiden Konstrukte erklären. Bei dem verwendeten HA11E6-Konstrukt handelt es sich um eine kodonoptimierte Form von 11E6, die in menschlichen Zellen nachweisbar besser exprimiert wird (2.2.19). Die Frage, welches der Expressionslevel (GFP oder HA) dem physiologischen Status einer mit HPV transfizierten Zellen dabei näher kommt, also wie hoch die Expressionslevel des viralen Proteins in mit HPV infizierten Zellen tatsächlich ist, konnte bis jetzt noch nicht geklärt werden, da weder Antikörper gegen HPV11E6 noch Zellen, die natürlicherweise mit HPV11 infiziert sind zur Verfügung stehen.

Wenn es sich wie vermutet bei den beobachteten runden Strukturen nicht um mitochondriale Strukturen handelt, könnte eine mögliche Erklärung die Ausbildung von P-bodies nach der Infektion mit HPV sein oder aber die vermehrte Bildung von PML bodies. P (processing)-bodies, auch GW bodies genannt, erinnern von ihrer Form und Verteilung an die kleineren durch den MitoTracker® angefärbten Strukturen im Zellkörper. Bei ihnen handelt es sich um abgegrenzte Strukturen, die mRNAs sowie Enzyme für deren Abbau zusammen bringen. Beobachtet wurde, dass es nach Virusinfektionen zu einer vermehrten Bildung der P-bodies kommt, was zu der Vermutung führt, dass Viren die P-bodies benutzen um die Wirts mRNA verschiedener Proteine abzubauen. Überraschenderweise gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass es sich bei den Proteinen in den P-bodies oft um Proteine handelt die für den Replikationszyklus verschiedener Viren benötigt werden (Beckham & Parker, 2008). Bei den PML-NBs (nuclear bodies) handelt es sich um abgegrenzte Aggregate des PML Proteins. Sie können zwischen 0,2-1 µm groß sein und pro Zelle findet man zwischen 1- 30. Es sind bereits über 50 Proteine bekannt, die in ihnen lokalisieren, dazu gehören unter anderem auch p53 und pRb. Die Akkumulation von PML-NB kann als Antwort auf eine Vielzahl spezieller Zellstimuli reguliert werden. Verschiedene Viren versuchen die Protein Level von PML, seine Lokalisation und Aktivität zu beeinflussen (zusammengefasst in (Reineke & Kao, 2009)). Weiterhin scheinen PML-NBs eine plausible Erklärung für die runden Strukturen zu sein, da bereits verschiedene Zusammenhänge zwischen HPV und PML beschrieben wurden. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass sowohl high als auch low risk HPV E6 Proteine bereits als PML Interaktionspartner beschrieben wurden (Guccione et al., 2004). Gegen die Hypothese, dass es sich bei den beobachteten Aggregaten um P-bodies oder PML NBs handeln könnte, spricht, dass bisher noch nie eine unspezifische Färbung von P-bodies oder PML-NBs durch MitoTracker® beschrieben wurde. Eine endgültige Klärung können weitere Versuche mit Markerproteinen spezifisch für P-bodies oder PML bodies bringen.

4.1.4 TAP und GST Pulldown

Da der YTH Screen transiente und modifikationsabhängige Veränderungen, die in menschlichen Zellen stattfinden, nicht berücksichtigt, wurden zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner für HPV11E6 zusätzliche Bindungsstudien in humanen Zellen durchgeführt. Beim GST Pulldown handelt es sich um eine schnelle und preisgünstige Alternative zur Auffindung neuer Protein-Protein Interaktionen. Bereits die Aufreinigung des bakteriellen GST11E6 zeigte eine zusätzliche Bande von ungefähr 72 kDa (Abb. 3.23A). Diese blieb auch die Einzige im Vergleich mit GST für GST11E6 spezifische Bande im Pulldown mit HEK 293T Zelllysat. Bei dem ca 72 kDa großen Bindeprotein handelt es sich, wie massenspektrometrische Analysen ergaben, um das Chaperonin GroEL. Es ist ein bakterielles Protein, welches für die korrekte Faltung von neusynthetisierten Proteinen verantwortlich ist. GroEL entspricht dem Hsp60 in Mitochondrien humaner Zellen, bildet eine ringförmige Struktur und bindet an GroES. Die Bindung von GroEL an GST11E6 könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Überexpression von GST11E6 zu möglichen Fehlfaltungen des Proteins geführt hat.

Da beim GST-Pulldown bakteriell exprimiertes Zielprotein verwendet wird und die gereinigten Fraktionen oft starke Hintergrundbindungen aufweisen, wurde parallel zum GST-Pulldown eine TAP (Tandem Affinity Purification) durchgeführt. Hierbei werden über zwei aufeinanderfolgende Affinitätschromatographieschritte Proteinkomplexe, die sich an den überexprimierten SSH11E6 bilden aus Zellen isoliert, ähnlich der von Gloeckner et al. beschriebenen Methode (Gloeckner et al., 2009). Die speziell für diesen Zweck klonierten Expressionskonstrukte kodierten für Fusionsproteine mit Strep und 6xHis Tags. Dass das 11E6 mit einem doppelten StrepTag exprimiert wurde ergab sich aus klonierungsstrategischen Gründen hat jedoch für die Isolierung mittels TAP keine Bedeutung. Die Auswahl der zu verwendenden Zelllinie fiel auf H1299 Zellen, da es sich um eine gut transfizierbare Zelllinie handelt und dies den Erhalt von ausreichenden Mengen SSH11E6 garantieren sollte. Die Aufreinigungsschritte erfolgten nach den Angaben der Hersteller (Invitrogen und Qiagen) für die StrepTactin Säule sowie für den NiNTA Pulldown. Im Westernblot (Abb. 3.21) konnte die erfolgreiche Aufreinigung von SHGFP und SSH11E6 in der Eluatfraktion 3 und für SHGFP auch in der Eluatfraktion 4 durch eine Strep Antikörperfärbung nachgewiesen werden. SSH11E6 konnte nur schwach sowohl in der Inputfraktion als auch im Flow through detektiert werden. Dies spricht dafür, dass SSH11E6 trotz doppeltem Strep Tag nicht vollständig an die Strep Tactin Säule gebunden wurde. Auch das Signal in der Eluatfraktion 3 war wesentlich

schwächer als das von SHGFP. Dies bestätigt, dass SSH11E6 schlechter von den Zellen exprimiert wurde als SHGFP. Durch die schlechtere Expression und vielleicht auch die schlechtere Bindung an die StrepTactin Säule war der Gehalt von aufgereinigtem SSH11E6 Protein so niedrig, dass es im Gegensatz zum SHGFP durch eine Coomassiefärbung nicht nachgewiesen werden konnte (Abb.3.21). Dabei wurde in diesem Falle bereits eine kollektive Coomassiefärbung verwendet, die wesentlich sensitiver als die "Standard"-Coomassiefärbung ist. Die durch den anschließenden NiNTA Pulldown erhoffte Konzentrierung des exprimierten SSH11E6 sowie seiner Bindepartner reichte noch nicht für ihre Visualisierung durch Coomassiefärbung aus. Abbildung 3.22 zeigt drei sichtbare Banden. Bei der durch einen grünen Pfeil markierten Bande handelt es sich der Größe nach vermutlich um SHGFP. Die bei ca 43 kDa sichtbare Bande wird in den Aufreinigungen von SHGFP und SSH11E6 detektiert und ist vermutlich ein unspezifisch an die Strep His Tags gebundenes Protein. Die dritte Bande auf der Höhe des 72 kDa Markers ist jedoch nur bei der Aufreinigung von SSH11E6 zu sehen, was dafür spricht, dass es sich dabei um ein spezifisch an 11E6 bindendes Protein handelt. Da die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass es sich wie beim parallel durchgeführten GST Pulldown um ein Chaperon handelt und eine Wiederholung des Versuches unter optimierten Bedingungen geplant ist, wurde auf eine Analyse dieser Bande verzichtet.

Zur Optimierung des geringen Expressionslevels von SSH11E6 wurde eine kodonoptimierte Form von HPV11E6 hergestellt, welche zu einer erfolgreichen Aufreinigung von Interaktionspartnern durch TAP beitragen sollte. Desweiteren erfolgte die Expression von SSH11E6 durch transiente Transfektion mittels Lipofectamin, da es auf Grund der Toxizität von HPV11E6 nicht geglückt war eine HPV11E6 stabil exprimierende Zelllinie zu generieren. Zur Optimierung soll in Zukunft ein induzierbares System für 11E6 exprimierende stabile Zelllinien verwendet werden

4.2 Erkenntnisse über die Stabilität von E6 in menschlichen Zellen

Untersuchungen einer E6AP defizienten Zelllinie führten zu dem Ergebnis, dass 16E6 Level in ihnen geringer sind, als in vergleichbaren E6AP positiven Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Die Transfektion von E6AP in die knockdown Zelllinie konnte die Level von HPV16E6 wieder steigern (Abb. 3.24). Die Titration mit E6AP Wildtyp zeigt, dass steigende Mengen E6AP einen steigenden Einfluss auf die Menge von HPV16E6 haben. Dass es sich hierbei um einen stabilisierenden Effekt auf das

Protein, und nicht um translationale oder transkriptionelle Effekte handelt, wurde mit Hilfe des DHFR16E6 Konstruktes nachgewiesen (Abb 3.25) Zusätzlich wurden hier zwei Kontrollen für die Funktionalität des 16E6/E6AP Komplexes durchgeführt: Abbau des PDZ Proteins Dlg sowie p53. Dies zeigte, dass E6 nur im Komplex mit E6AP Wildtyp nicht aber seinen Mutanten in der Lage ist seine Substrate dem Abbau zuzuführen. Durch diese Kontrollen konnte sichergestellt werden, dass der Knockdown von E6AP vollständig war und nicht genug endogenes Rest-E6AP in den Zellen vorhanden war, um die Substrate auch ohne Kotransfektion abzubauen, sowie dass die Mutanten in ihrer Bindungs- oder E3 Ligasefunktion gehemmt waren. Die grafische Auswertung zeigt eine deutliche Stabilisierung von E6 in der Anwesenheit von E6AP Wildtyp sowie seiner inaktiven Mutanten nicht aber in einer Kotransfektion mit E6AP Δ BS (Abb.3.25). Tomaic et al. bestätigten Teile dieser Beobachtung in Versuchen die einen negativen Einfluss von E6APsiRNA auf die endogenen high risk E6 Proteinlevel in HeLA Zellen zeigen (Tomaic et al., 2009). Wir konnten durch unsere Versuche zusätzlich noch zeigen, dass erstens dabei die Bindung von E6 an E6AP nicht aber die E3-Funktion von E6AP essentiell ist, und zweitens dieser Zusammenhang nicht nur für die high risk E6 Proteine sondern auch für das low risk HPV11E6 Protein gilt (Abb 3.27).

E6AP wurde ursprünglich als ein für high risk HPVE6 spezifischer Interaktionspartner beschrieben, bevor es gelang FlagE6AP *in cellulo* durch eine Immunpräzipitation mit HA11E6 herauszuziehen (Brimer et al., 2007). Wir konnten durch einen NiNTA Pulldown an His11E6 gebundenes HAE6AP Wildtyp nachweisen (Abb. 3.25B). Diese Bindung konnte für die HAE6AP Δ BS Mutante nicht beobachtet werden, was zeigt, dass die Bindestelle der high und low risk E6 Proteine auf E6AP identisch oder zumindest überlappend ist. In einem *in vitro* Versuch wurde diese Bindung als direkte Bindung zwischen E6AP und 11E6 identifiziert (Abb. 3.26A). Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch Brimer et al, die die Bindung von 11E6 an E6AP sowohl in einem Yeast Two Hybrid als auch in menschlichen Zellen durch Immunpräzipitation nachweisen konnten (Brimer et al., 2007). Auf Grund der Tatsache, dass low risk E6 ebenfalls an E6AP binden kann, wurden die Stabilisierungsversuche in E6AP $-/-$ Zellen mit einem DHFR11E6 Konstrukt wiederholt. Wie in Abbildung 3.27 zu sehen ist, wird auch low risk E6 durch die Bindung an E6AP stabilisiert. Die p53 Kontrolle bei diesem Versuch bestätigt, dass es sich bei dem getesteten E6 um ein low risk E6 handelt. Es kann p53 nicht durch E6AP dem proteasomalen Abbau zuführen.

Onkogene HPVE6 Proteine nutzen den Ubiquitin-Proteasom Abbaumechanismus der Wirtszelle um zelluläre Proteine wie zum Beispiel den Tumorsupressor p53 zum Abbau zu bringen. Umgekehrt scheint die Wirtszelle high und low risk E6 diesem

Abbauweg zuzuführen. E6 Proteine können in Zellen ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut werden (Kehmeier et al., 2002; Stewart et al., 2004). Weiterhin wurde USP15 als Interaktionspartner für HPV16E6 entdeckt. Bei USP15 handelt es sich um eine Ubiquitinspezifische Peptidase. USPs sind mit beinahe 100 Mitgliedern im Menschen die größte Familie deubiquitinierender Enzyme. Durch ihre Fähigkeit Ubiquitin wieder von Zielproteinen zu entfernen sind sie an der Regulierung vieler zellulärer Prozesse beteiligt. Eine Überexpression von USP15 führt zu einer Stabilisierung von 16E6 in menschlichen Zellen, während ein knock down von USP15 zu seiner Destabilisierung führt (Vos et al., 2009). Aus diesen und unseren Beobachtungen ergibt sich damit folgendes hypothetisches Modell zur Stabilität der HPVE6 Proteine in menschlichen Zellen (Abb. 4.1): Die Wirtszelle verfügt über eine bisher noch nicht identifizierte E3 Ligase die E6 erkennt, ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zuführt. Das virale E6 Protein scheint jedoch durch mindestens zwei Strategien in der Lage zu sein, diesem proteasomalen Abbau zu entgehen: erstens entzieht es sich durch die Bindung von E6AP diesem Mechanismus, zum Beispiel durch eine Konkurrenz der Bindung zwischen E6AP und der E3 Ligase, und zweitens hilft die Interaktion mit USP15 bereits ubiquitiniertes E6 wieder zu deubiquitinieren

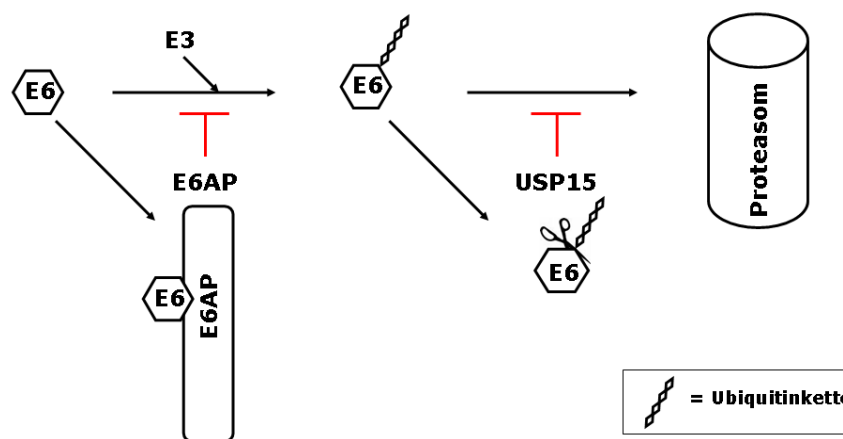


Abb. 4.1 Hypothetisches Modell für den Abbau von HPVE6 durch den Ubiquitin Proteasomweg und seine Vermeidungsstrategien.

4.3 Neue Interaktionspartner für HPV16E6

Einer der auffälligsten Unterschiede zwischen high und low risk E6 Proteinen ist das PDZ Bindemotiv der high risk E6, durch welches das onkogene E6 prinzipiell in der Lage ist eine Vielzahl von PDZ Proteinen wie Dlg, hScribble, MAGI-1,-2,-3 und MUPP1 zu binden. Diese Bindung führt zu einer Ubiquitinierung der PDZ Proteine

durch die E3 Ligase E6AP und einem anschließendem Abbau durch das Proteasom. Die Eigenschaft PDZ Proteine binden zu können und sie in ihrer Funktion zu inhibieren, scheint ein unter viralen Onkoproteinen verbreiteter Mechanismus zu sein. Beispiele hierfür sind E4-ORF1, ein Protein des Adenovirus vom Typ 9, welches ein PDZ Bindemotiv trägt, das für die Genese von Mammatumoren *in vivo* verantwortlich ist, oder Tax, ein Onkoprotein des HTLV-1 (human T-cell leukemia virustype 1), welches ebenfalls mit einem PDZ Bindemotiv ausgestattet ist (zusammengefasst in (Javier, 2008)) . Diese onkogenen Virusproteine interagieren mit PDZ Proteinen und hindern sie daran ihre ursprüngliche Funktion auszuüben. Dabei haben sie gemeinsame „Ziel-PDZ-Proteine“, wie zum Beispiel MAGI, Dlg und Scribble. Diese Zielproteine haben etwas gemeinsam: Sie sind involviert in die Zellbeweglichkeit, sowie die Erhaltung der Zellpolarität und der Zell-Zellverbindungen. Dies sind wichtige Eigenschaften für die Vermeidung von Tumorbildungen. Der Verlust der Zellpolarität und die Zerstörung von Zellverbindungen sind gemeinsame Eigenschaften von epithelialen Krebszellen. Das Virus manipuliert über diese Interaktionen die infizierten, sich differenzierenden Epithelzellen um sie in einen Zustand zu halten, in dem die virale Replikation gewährleistet bleibt.

In dieser Arbeit konnten SLIM und LNX, zwei PDZ Proteine, als potentielle Bindepartner von high risk E6 Proteinen identifiziert werden. Für SLIM wurde eine Interaktion mit dem Actin Zytoskelett nachgewiesen, wobei es an α -Actinin und Filamin A bindet (Torrado et al., 2004). Das Actin Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle bei der Migration, Form und Polarität einer Zelle. Auch Mystique, das Moushomolog zu SLIM, wurde bereits als ein Protein beschrieben, das an Zelladhäsion und Migration beteiligt ist (Loughran et al., 2005). Für LNX wurde ein solcher Zusammenhang bis jetzt noch nicht beschrieben. Interessant ist aber, dass LNX in 100% aller Gliomas, Tumore des zentralen Nervensystems, negativ reguliert ist. Außerdem legt die Interaktion von LNX mit dem bekannten Onkogen SKIP (Ski Interacting Protein) die Vermutung nahe, dass LNX eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielt. LNX und SLIM scheinen somit „klassische“ Substrate für den E6/E6AP Komplex zu sein.

Durch einen *in vitro* GST Pulldown konnte eine direkte Bindung von LNX an GST16E6, -18E6 sowie -11C18 gezeigt werden. Die Bindung an GST11C18 zeigt, dass die Bindung zwischen LNX und den high risk E6 Proteinen durch die PDZ Bindestelle der onkogenen E6 Proteine vermittelt wird. Der GST Pulldown für *in vitro* translatiertes SLIM zeigte eine schwächere Bindung von SLIM an GST16E6, -18E6 und -11C18. Aber auch hier wird die Bindung durch das PDZ Bindemotiv vermittelt

(Abb.3.28). Für LNX wurde weiterhin mit *in cellulo* exprimiertem LNX eine Bindung an den C-Terminus von high risk E6 Proteinen gezeigt. Für beide Proteine fehlt für eine endgültige Bestätigung einer Bindung *in cellulo* noch ein Immunpräzipitationsversuch mit transient transfizierten oder endogenen Proteinen.

Die PDZ Bindemotive der verschiedenen high risk E6 Proteine unterscheiden sich zum Teil in ihrer letzten Aminosäure voneinander. So ist die Aminosäuresequenz für das PDZ Bindemotiv bei HPV16E6 ETQL, bei HPV18E6 jedoch ETQV. Aus einem Vergleich der Bindungen an dieses PDZ Bindemotiv ergab sich, dass sich dadurch die Selektivität der Bindungen an spezielle Zielproteine ergibt. So bindet Scribble besser an 16E6 und Dlg besser an 18E6. Während SLIM nur über eine PDZ Bindedomäne verfügt, besitzen viele E6 Bindeproteine mehrere dieser Domänen, wobei jedoch die Interaktion mit E6 nur über eine der PDZ Domänen vermittelt wird. Bei Dlg ist es zum Beispiel PDZ2, bei den MAGI Proteinen 1, 2 und 3 die PDZ1 Domäne. In dieser Arbeit konnte durch Mutationsstudien an LNX gezeigt werden, dass die PDZ1 Domäne von LNX essentiell für die Bindung an HPV16E6 ist (Abb.3.30; die Mutanten LNX Δ PDZ4, LNX Δ PDZ3,4, LNX Δ PDZ2-4 waren alle in der Lage an das PDZ Bindemotiv des onkogenen E6 zu binden). Dabei fällt auf, dass die Bindung von LNX Δ PDZ3,4 sehr schwach ausfällt und LNX Δ PDZ4 eine starke Hintergrundbindung an das low risk HPV11E6 aufweist. Der Pulldown mit den PDZ Ketten 1-4, 2-4 und 3,4 zeigt, dass nur PDZ1-4 in der Lage ist an das PDZ Bindemotiv zu binden. Die Bindung von PDZ3,4 an GST11E6 wird dabei als Hintergrundbindung angesehen, da GST11E6 kein PDZ Bindemotiv aufweist und nicht an Wildtyp LNX bindet (Abb.3.30C) Aus dem GST Pulldown Experiment zeigt sich, dass die PDZ1 Domäne von LNX die entscheidende Domäne für die Bindung an das PDZ Bindemotiv von E6 ist. Die PDZ1 Domäne allein ist jedoch nicht in der Lage an den E6 C-terminus zu binden wie sich im GST Pulldown mit den isolierten PDZ Domänen fusioniert an GFP zeigt. (Abb.3.31), ob dies auch für das PDZ Bindemotiv von HPV18E6 gilt wurde nicht untersucht. Aus diesen Untersuchungen lässt sich schliessen, dass die Interaktion von LNX mit HPV16E6 über die PDZ1 Domäne von LNX vermittelt wird, diese jedoch allein für die Bindung nicht ausreichend ist.

4.4 Sind LNX und SLIM E3 Ligasen für HPV16E6?

Die Beobachtungen, dass E6 durch seine Bindung an E6AP in Zellen stabilisiert wird, brachte die Frage nach der zellulären E3 Ligase auf, die spezifisch das virale Protein erkennen, ubiquitinieren und dem proteasomalen Abbau zuführen kann (Abb. 4.1).

Die Identifizierung von SLIM und LNX als Interaktionspartner von HPV16E6 ist daher aus zwei Gründen interessant: zum einen stellen beide Proteine potentielle Substrate für den E6/E6AP Komplex dar und zum anderen wurden beide als E3 Ligasen beschrieben (Nie et al., 2002; Tanaka et al., 2005).

SLIM interagiert im Zellkern mit an Tyrosinresten phosphorylierten STAT Molekülen und inhibiert spezifisch die durch STAT1 und -4 vermittelte Genexpression. Die LIM Domäne von SLIM bildete eine Zink-Finger Struktur aus, die der von RING Fingern ähnlich ist. Mit ihrer Hilfe ist SLIM in der Lage die Ubiquitinierung und den Abbau von STAT1 und -4 zu vermitteln (Tanaka et al., 2005). Interessanterweise ist das virale Protein Tax als Interaktionspartner von SLIM beschrieben worden. Tax ist ein onkogenes virales Proteine des T-Zell Leukämie Virus Typ I (HTLV-I). Eine Überexpression von SLIM in Tax exprimierenden Zellen führt zu dessen Ubiquitinierung und anschließendem proteasomalen Abbau (Yan et al., 2009). In *in vitro* Ubiquitinierungsversuchen konnte jedoch keine Ubiquitinierung von HPV16E6 durch GSTLNx (Abb.3.32) oder GSTSLIM (Daten nicht gezeigt) gezeigt werden. Es muss allerdings an dieser Stelle erwähnt werden, dass es für die Funktionalität von SLIM bei den durchgeführten Versuchen keine Kontrolle gab. Als Kontrollprotein für die Funktionalität von LNX wurde *in vitro* translatiertes Numb verwendet, welches sich gut durch das zu dem Ubiquitinierungsmix hinzugefügte GSTLNx ubiquitinieren ließ (Abb. 3.32). Auch die *in cellulo* durchgeführten His-Ubiquitin Versuche in E6AP defizienten Zellen (Daten nicht gezeigt) zeigten keine Ubiquitinierung von HPV16E6 bei einer Überexpression von SLIM oder LNX. Die Versuche mit DHFR16E6 Expressionsplasmiden zeigten des Weiteren keinen Einfluss von überexprimiertem SLIM (Abb 3.33) oder LNX (Daten nicht gezeigt) auf E6 Levels. Da keine Effekte *in vitro* oder *in cellulo* von SLIM oder LNX auf die Proteinstabilität oder den Ubiquitinierungsstatus von E6 zu beobachten waren, kann man davon ausgehen dass es sich weder bei SLIM noch bei LNX um eine E3 Ligase für HPV16E6 handelt.

4.4.1 SLIM als Substrat von HPV16E6/E6AP

In dieser Arbeit konnte *in vitro* für SLIM eine Ubiquitinierung durch 16E6/E6AP (Abb. 3.34) gezeigt werden. Der durchgeführte *in cellulo* His-Ubiquitin Versuch zeigte jedoch keine Bindung von SLIM (Abb. 3.35) an His-Ubiquitin in Anwesenheit von 16E6 oder E6AP. Wie bereits erwähnt ist der His-Ubiquitin Versuch jedoch oft nicht geeignet um eine Ubiquitinierung von Zielproteinen durch den E6/E6AP Komplex nachzuweisen. Die Ursache warum wir auf diesem Weg auch keine Ubiquitinierung von p53, dem bekanntesten Zielprotein von E6/E6AP, zeigen können, bleibt unklar.

Daher scheinen DHFR-HA-Ub-HA-Fusionsproteine eine geeignetere Methode zu sein, um zumindest einen möglichen Abbau der Zielproteine durch die Anwesenheit von E6/E6AP zu untersuchen. Für bekannte Zielproteine wie zum Beispiel Dlg konnte mit Hilfe dieser Fusionskonstrukte der Abbau durch E6/E6AP nachgewiesen werden (Kuballa et al., 2007). Für den Versuch wurden steigende Mengen 16E6 in H1299 Zellen zu DHFRSLIM kotransfiziert, es konnte jedoch kein Abbau von DHFR SLIM durch 16E6 beobachtet werden (Abb. 3.36). Die Abnahme des p53 Expressionslevels beweist, dass E6 zusammen mit endogenem E6AP in der Lage war seine Zielproteine abzubauen. Um jedoch ausreichende Mengen E6AP im Versuchsansatz zu garantieren, wurden zusätzlich in drei weiteren Ansätzen steigende Mengen 16E6 zusammen mit E6AP sowie SLIM kotransfiziert. Auch hier zeigt der Verlust von p53, diesmal völlig, die Funktionalität und auch die ausreichende Menge an E6/E6AP zum Abbau seiner Zielproteine (Abb. 3.36 und Abb 3.41). Dennoch war ein Abbau von SLIM nicht zu beobachten, was durch das gleichbleibende Verhältnis zwischen DHFR-HA und HA-SLIM nachgewiesen wurde. Die Versuche wurden viermal mit gleichem Resultat durchgeführt (Abb.3.36). Es zeigte sich jedoch interessanterweise eine mögliche Stabilisierung von SLIM durch das zusätzlich exprimierte E6AP. Dieser Zusammenhang soll in zukünftigen Untersuchungen näher in der H1299 E6AP-defizienten Zelllinie untersucht werden. Da weder die His-Ubiquitin Versuche noch die Stabilitätsversuche mittels der DHFR Fusionsproteine weitere Einblicke in die Interaktion von SLIM und 16E6 lieferten, wurde die intrazelluläre Lokalisierung dieser Proteine mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür wurden H1299 Zellen mit FlagSLIM und diversen GFPE6 Proteinen kotransfiziert. Die Verteilung der GFPE6 Proteine in Abwesenheit von SLIM ist in Abbildung 3.15 dargestellt, wobei SLIM über seinen Flag-Tag mittels Flag Antikörper angefärbt wurde. Kontrolle war eine Kotransfektion von SLIM mit GFP. SLIM zeigt eine Verteilung über das Zytoplasma und spannt ein faserartiges Netz, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt, welche eine Interaktion von SLIM mit dem Zytoskelett beschreiben (Torrado et al., 2004). Die Koexpression von E6 Proteinen hat keinen Einfluß auf die Verteilung von SLIM im Zytoplasma, auch scheint die Anwesenheit von E6 keinen Einfluß auf die Menge des exprimierten SLIM zu haben (Abb 3.37). Umgekehrt beobachten wir jedoch, eine Akkumulierung von GFP16E6 sowie GFP16C11 in einer abgegrenzten Struktur neben dem Zellkern. Worum genau es sich bei dieser Struktur handelt ist noch nicht geklärt. Interessant ist jedoch, dass die Expression von SLIM einen deutlichen Effekt auf GFP11E6 ausübt. Nicht nur kommt es bei einer Koexpression von 11E6 und SLIM zu einer vollständigen Herunterregulierung des

zytoplasmatischen GFP11E6 sondern auch zur Aggregation des übriggebliebenen GFP11E6 in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma. Diese Strukturen unterscheiden sich in Form, Lokalisation und Anzahl von den durch Mitotrackern angefärbten Strukturen in Abbildung 3.19, so dass wir davon ausgehen, dass es sich hier nicht um die gleichen Strukturen handelt. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass es bei einer Überexpression von PDLIM2 alias SLIM zu einer Herunterregulierung und Aggregation des onkogenen viralen Proteins Tax in ähnlichen punktförmigen Strukturen kommt (Yan et al., 2009), wobei ein Kostaining mit dem Proteasom bestätigte, dass Tax durch die SLIM Expression zum proteasomalen Abbau geführt wird. Ob dies auch für HPV11E6 der Fall ist muß noch durch ein Proteasomstaining überprüft werden. Im Westernblot konnte jedoch bereits mit Hilfe des DHFR11E6 Konstruktes ein klarer negativer Effekt auf die Proteinstabilität von 11E6 in Anwesenheit von SLIM nachgewiesen werden (Abb.3.38). Hierfür wurde DHFR11E6 mit steigenden Mengen eines FLAGSLIM-Konstruktes in H1299 parentale und H1299 E6AP-/- (K3) Zellen exprimiert (Abbildung 3.38). In H1299 parental Zellen konnte ein deutlicher Abbau von HA11E6 in Anwesenheit von SLIM beobachtet werden, welcher abhängig von der Anwesenheit von E6AP war, da in E6AP-defizienten Zellen das Verhältnis von HA11E6 zu DHFR-HA konstant blieb. Außerdem taucht eine Doppelbande zwischen dem FlagSLIM und dem HA11E6 Signal auf. Da diese Doppelbande mit steigenden Mengen von Slim erst richtig deutlich wird und außerdem durch den Flag nicht aber den HA Antikörper angefärbt wird, könnte es sich um ein Abbauprodukt von SLIM handeln. Das Auftauchen dieser Doppelbande ist bei ähnlichen Versuchen mit DHFR16E6 (Abb. 3.33) nicht beobachtet worden. HPV11E6 wird also obwohl es *in vitro* nicht an SLIM bindet (Abb.3.28) und in Zellen scheinbar nicht kolokalisiert, trotzdem durch eine Überexpression von SLIM in seiner Stabilität negativ beeinflusst. Ob es sich hier, wie bei anderen viralen Interaktionspartnern von SLIM wie für Tax beschrieben, um eine Ubiquitinierung mit anschließendem proteasomalen Abbau handelt, muss durch Ubiquitinierungsversuche geklärt werden.

4.4.2 LNX als Substrat von HPV16E6/E6AP

LNX ist als E3 Ubiquitin Ligase in der Lage sich selbst zu autoubiquitinieren (Nie et al., 2002). Da diese Eigenschaft eventuell die Ergebnisse unserer Versuche beeinflussen kann und es erschweren würde, eine Ubiquitinierung durch E6/E6AP von der Autoubiquitinierung abzugrenzen, wurde eine inaktive LNX Mutante LNXC48A

konstruiert, in welcher ein Cysteinrest, der für die Integrität der Struktur der RING Domäne erforderlich ist (Nie et al., 2002) mutiert wurde. LNX und LNXC48A wurden als GST Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. In einem Ubiquitinierungsversuch wurde baculo E6AP als Kontrollprotein verwendet, welches als HECT E3 Ligase ebenfalls in der Lage ist sich selbst zu ubiquitinieren. So wie E6AP ist auch LNX in der Lage sich selbst zu autoubiquitinieren (Abb. 3.39), wobei der Vergleich zwischen LNX Wildtyp, E6AP und LNXC48A zeigte, dass LNXC48A sich nicht vollständig autoubiquitinieren konnte, da ein Teil des Proteins unmodifiziert blieb. Daraus schließen wir, dass die Mutante nicht vollständig inaktiv ist, sondern nur zum Teil in ihrer Funktion inhibiert ist. Ein GST Pulldown mit *in vitro* translatiertem LNXC48A bestätigte außerdem, dass die Mutante nicht in ihrer Bindungsfähigkeit zum PDZ Bindemotiv der high risk E6 Proteine eingeschränkt ist (Abb. 3.39A). Ein *in vitro* Ubiquitinierungsversuch mit LNX und LNXC48A bekräftigte die Hypothese, dass es sich bei LNX um ein Substrat des E6/E6AP Komplexes handeln könnte (Abb. 3.40). In allen drei Fällen wurde eine Ubiquitinierung durch das Hinzufügen von rekombinantem GST16E6 sowie baculo E6AP beobachtet. Da die Zugabe von 16E6 oder E6AP allein keinen Einfluss auf den Ubiquitinierungsstatus der *in vitro* translatierten Proteine hatte, schließen wir daraus, dass die *in vitro* Ubiquitinierung von LNX sowie seiner Mutante durch den Komplex aus 16E6 und E6AP vermittelt wird. Die durchgeführten *in cellulo* His-Ubiquitin Versuche zeigten jedoch auch im Falle von LNX (Daten nicht gezeigt) keine Bindung von LNX an His-Ubiquitin in Anwesenheit von 16E6 oder E6AP. Auch in diesem Falle entschieden wir uns für Stabilitätsversuche diesmal mit Hilfe des DHFR-HA-Ub-HA-LNX Konstruktes. Für DHFRLNX konnte jedoch wie auch bereits für DHFRSLIM kein Abbau durch 16E6/E6AP beobachtet werden (Abb. 3.41). Die Versuche mit DHFR-LNX wurden dreimal mit gleichem Resultat durchgeführt (Abb. 3.36). Daher war es interessant zu untersuchen, ob wir auf indirektem Wege einen Zusammenhang zwischen LNX und 16E6 beobachten könnten. Hierfür wurde Numb und dessen Ubiquitinierung durch LNX (Nie et al., 2002) in Anwesenheit von 16E6 erst *in vitro* untersucht. In einem Ubiquitinierungsversuch wurde Numb durch LNX ubiquitiniert (Abb. 3.42), und diese Ubiquitinierung konnte interessanterweise durch Zugabe von 16E6 und E6AP gehemmt werden. Auch in Anwesenheit der höchsten eingesetzten 16E6 Menge konnte zwar eine Teilubiquitinierung von Numb noch stattfinden, jedoch ist die Menge an unmodifiziertem Numb deutlich erhöht. Dieser Versuch soll zur Bestätigung *in cellulo* mittels His-Ubiquitin durchgeführt werden. In einem Vorversuch war es bereits möglich, die Ubiquitinierung von Numb durch LNX nachzuweisen (Abb. 3.43). Ob 16E6 und E6AP konzentrationsabhängig die Ubiquitinierung von

Numb auch *in cellulo* verhindern können, muss noch weiter untersucht werden. Auch für LNX wurden konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht um seine Interaktion mit 16E6 in Zellen näher zu untersuchen. LNX ist hauptsächlich im Zytoplasma verteilt (Abb 3.44). Während die Kotransfektion von GFP diese Verteilung nicht beeinflusst, konnte bei einer Koexpression mit GFP16E6 nicht nur eine Kolokalisation von LNX und GFPE6 beobachtet werden, sondern auch eine Translokation von LNX in den Zellkern (Abb. 3.44). Eine solche Translokation von LNX wurde bereits im Zusammenhang mit seinem anderen viralen Interaktionsprotein Np9 (Protein vom Retrovirus K) beschrieben (Armbruster et al., 2004). In dieser Studie wurde LNX allerdings als Zellkernprotein unabhängig von der Koexpression des viralen Interaktionspartners beschrieben, wobei in Anwesenheit des viralen Proteins Np9 eine Verschiebung von LNX in die Zellkernkörperchen beobachtet wurde. Sie beschrieben für LNX eine mögliche NLS (nuclear localization signal) zwischen der RING Domäne und der ersten PDZ Domäne von LNX.

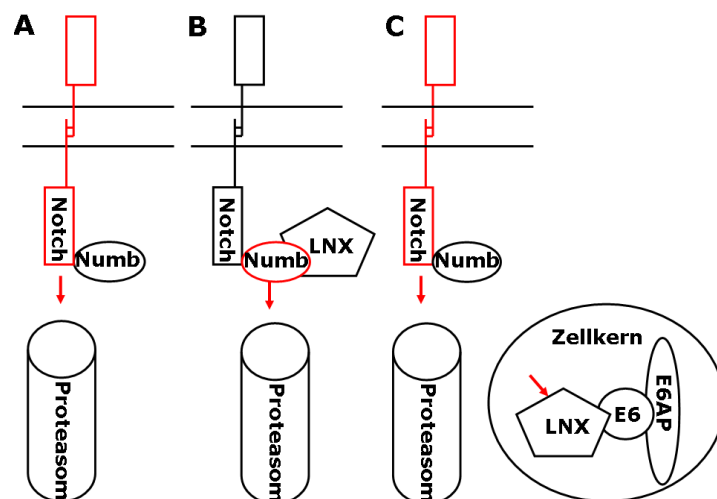


Abb. 4.2. Hypothetisches Modell für die LNX E6/E6AP Interaktion. A) zeigt den durch Numb vermittelten Abbau von Notch (McGill & McGlade, 2003). B) zeigt den durch LNX vermittelten Abbau von Numb (Nie et al., 2002). C) zeigt die von uns gezeigte Translokation von LNX durch E6 in den Zellkern und den dadurch indirekt vermittelten Abbau von Notch.

Ein von uns vorgeschlagenes hypothetisches Modell für die Interaktion von LNX und E6/E6AP ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Der transmembrane Oberflächenrezeptor Notch kann nach Aktivierung durch spezielle Liganden, gespalten werden, so dass seine intrazelluläre Domäne (ICD) in den Zellkern wandern kann und dort mit CSL, einem DNA Bindeprotein, interagiert um die Aktivierung verschiedenster Effektorgene zu bewirken. Eine Herunterregulierung von Notch führt zu Differenzierungsproblemen und abnormalem Zellwachstum. Außerdem wurde

beobachtet, dass eine Überexpression von Notch in HeLa Zellen, einer HPV positive Zelllinie, einen Zellzyklusstop herbeiführen sowie Apoptose induzieren kann (Yao et al., 2007). Bei Numb handelt es sich um einen bekannten Antagonisten von Notch. Es fördert die Ubiquitinierung von Notch sowie seinen proteasomalen Abbau (McGill & McGlade, 2003) (Abb. 4.2A). Nie et al entdeckten LNX als E3 Ligase für Numb und konnten außerdem zeigen, dass eine Überexpression von LNX die Proteinlevel von Notch stabilisieren kann (Nie et al., 2002) (Abb. 4.2B). Unsere Hypothese ist, dass bei einer Infektion mit HPV16, das E6 Protein zusammen mit E6AP LNX ubiquitinieren, in den Zellkern verschieben und so die E3 Ligase Funktion von LNX an Numb inhibieren kann. Numb bleibt somit weiter aktiv und es kommt zu einer Herunterregulierung der Notch Aktivität durch den durch Numb induzierten proteasomalen Abbau (Abb.4.2C.). Diese indirekte Stabilisierung des Notch Antagonisten Numb könnte eine Strategie der high risk HPV16 sein, der Apoptose zu entgehen und Zellwachstum zu fördern.

5 Literaturverzeichnis

- Armstrong, L. R., E. J. Preston, et al. (2000). "Incidence and prevalence of recurrent respiratory papillomatosis among children in Atlanta and Seattle." Clin Infect Dis **31**(1): 107-9.
- Arnason, T. and M. J. Ellison (1994). "Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain." Mol Cell Biol **14**(12): 7876-83.
- Barcelos, A. C. and M. N. Sotto (2009). "Comparative analysis of the expression of cytokeratins (1, 10, 14, 16, 4), involucrin, filaggrin and e-cadherin in plane warts and epidermodysplasia verruciformis plane wart-type lesions." J Cutan Pathol **36**(6): 647-54.
- Beckham, C. J. and R. Parker (2008). "P bodies, stress granules, and viral life cycles." Cell Host Microbe **3**(4): 206-12.
- Brimer, N., C. Lyons, et al. (2007). "Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein." Virology **358**(2): 303-10.
- Berezutskaya, E., B. Yu, et al. (1997). "Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein." Cell Growth Differ **8**(12): 1277-86.
- Bezerra, A. L., A. Lopes, et al. (2001). "Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy." Cancer **91**(12): 2315-21.
- Borden, K. L. (2000). "RING domains: master builders of molecular scaffolds?" J Mol Biol **295**(5): 1103-12.
- Boyer, S. N., D. E. Wazer, et al. (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." Cancer Res **56**(20): 4620-4.
- Bracken, A. P., M. Ciro, et al. (2004). "E2F target genes: unraveling the biology." Trends Biochem Sci **29**(8): 409-17.
- Briggs, S. D., T. Xiao, et al. (2002). "Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin." Nature **418**(6897): 498.
- Brimer, N., C. Lyons, et al. (2007). "Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein." Virology **358**(2): 303-10.
- Broker, T. R., G. Jin, et al. (2001). "Viral latency--the papillomavirus model." Dev Biol (Basel) **106**: 443-51; discussion 452-3, 465-75.

- Bryant, P. J., K. L. Watson, et al. (1993). "Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in *Drosophila*." Dev Suppl: 239-49.
- Capili, A. D., D. C. Schultz, et al. (2001). "Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains." Embo J **20**(1-2): 165-77.
- Chan, S. Y., H. Delius, et al. (1995). "Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy." J Virol **69**(5): 3074-83.
- Chan, Y., I. Anton-Lamprecht, et al. (1994). "A human keratin 14 "knockout": the absence of K14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein." Genes Dev **8**(21): 2574-87.
- Chellappan, S., V. B. Kraus, et al. (1992). "Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4549-53.
- Chen, B., H. Yin, et al. (1994). "Detection of human papillomavirus DNA in esophageal squamous cell carcinomas by the polymerase chain reaction using general consensus primers." Hum Pathol **25**(9): 920-3.
- Cho, K. O., C. A. Hunt, et al. (1992). "The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein." Neuron **9**(5): 929-42.
- Cilenti, L., M. M. Soundarapandian, et al. (2004). "Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death." J Biol Chem **279**(48): 50295-301.
- Classon, M. and N. Dyson (2001). "p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets." Exp Cell Res **264**(1): 135-47.
- Cooper, K., L. Taylor, et al. (1995). "Human papillomavirus DNA in oesophageal carcinomas in South Africa." J Pathol **175**(3): 273-7.
- Craven, S. E. and D. S. Bredt (1998). "PDZ proteins organize synaptic signaling pathways." Cell **93**(4): 495-8.
- Cruzen, M. E. and S. M. Arfin (1991). "Nucleotide and deduced amino acid sequence of human threonyl-tRNA synthetase reveals extensive homology to the *Escherichia coli* and yeast enzymes." J Biol Chem **266**(15): 9919-23.
- Degenhardt, Y. Y. and S. Silverstein (2001). "Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation." J Virol **75**(23): 11791-802.

- Degenhardt, Y. Y. and S. J. Silverstein (2001). "Gps2, a protein partner for human papillomavirus E6 proteins." J Virol **75**(1): 151-60.
- Degenhardt, Y. Y. and S. Silverstein (2001). "Interaction of zyxin, a focal adhesion protein, with the e6 protein from human papillomavirus type 6 results in its nuclear translocation." J Virol **75**(23): 11791-802.
- Deng, L., C. Wang, et al. (2000). "Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain." Cell **103**(2): 351-61.
- Deshaies, R. J. (1999). "SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 435-67.
- Dianzani, C., M. Bucci, et al. (1998). "Association of human papillomavirus type 11 with carcinoma of the penis." Urology **51**(6): 1046-8.
- Dreilich, M., M. Bergqvist, et al. (2006). "High-risk human papilloma virus (HPV) and survival in patients with esophageal carcinoma: a pilot study." BMC Cancer **6**: 94.
- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes Dev **12**(15): 2245-62.
- Dyson, N., P. M. Howley, et al. (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." Science **243**(4893): 934-7.
- Evander, M., I. H. Frazer, et al. (1997). "Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses." J Virol **71**(3): 2449-56.
- Fadeel, B. and E. Grzybowska (2009). "HAX-1: A multifunctional protein with emerging roles in human disease." Biochim Biophys Acta **1790**(10): 1139-48.
- Finley, D., S. Sadis, et al. (1994). "Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant." Mol Cell Biol **14**(8): 5501-9.
- Fischer, J. A. (2003). "Deubiquitinating enzymes: their roles in development, differentiation, and disease." Int Rev Cytol **229**: 43-72.
- Forsman, A., U. Ruetschi, et al. (2008). "Identification of intracellular proteins associated with the EBV-encoded nuclear antigen 5 using an efficient TAP procedure and FT-ICR mass spectrometry." J Proteome Res **7**(6): 2309-19.
- Funk, J. O., S. Waga, et al. (1997). "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." Genes Dev **11**(16): 2090-100.
- Gage, J. R., C. Meyers, et al. (1990). "The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties." J Virol **64**(2): 723-30.

- Galan, J. M. and R. Haguenaer-Tsapis (1997). "Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein." Embo J **16**(19): 5847-54.
- Ganguly, N. and S. P. Parihar (2009). "Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis." J Biosci **34**(1): 113-23.
- Gao, Q., L. Singh, et al. (2001). "Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells." J Virol **75**(9): 4459-66.
- Gardiol, D., C. Kuhne, et al. (1999). "Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation." Oncogene **18**(40): 5487-96.
- Gewin, L. and D. A. Galloway (2001). "E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc." J Virol **75**(15): 7198-201.
- Gissmann, L., L. Wolnik, et al. (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**(2): 560-3.
- Gomperts, S. N. (1996). "Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family." Cell **84**(5): 659-62.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Gloeckner, C. J., K. Boldt, et al. (2009). "Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag." Methods Mol Biol **564**: 359-72.
- Guccione, E., K. J. Lethbridge, et al. (2004). "HPV E6 proteins interact with specific PML isoforms and allow distinctions to be made between different POD structures." Oncogene **23**(27): 4662-72.
- Han, Y., Y. S. Chen, et al. (2006). "Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition." Circ Res **99**(4): 415-23.
- Hatakeyama, S. and K. I. Nakayama (2003). "U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 635-45.
- Hatakeyama, S., M. Yada, et al. (2001). "U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases." J Biol Chem **276**(35): 33111-20.
- Hebner, C. M. and L. A. Laimins (2006). "Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity." Rev Med Virol **16**(2): 83-97.

- Hershko, A., A. Ciechanover, et al. (1979). "Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(7): 3107-10.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 195-201.
- Hicke, L. and H. Riezman (1996). "Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis." Cell **84**(2): 277-87.
- Hofmann, R. M. and C. M. Pickart (1999). "Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair." Cell **96**(5): 645-53.
- Howley, P. M. (1996). "Papillomaviridae: the viruses and their replication." In B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, Fields virology, 3rd ed Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Hubbert, N. L., S. A. Sedman, et al. (1992). "Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes." J Virol **66**(10): 6237-41.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1995). "A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5249.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." Embo J **10**(13): 4129-35.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1993). "Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins." Mol Cell Biol **13**(8): 4918-27.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1995). "A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 2563-7.
- Hummel, M., J. B. Hudson, et al. (1992). "Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes." J Virol **66**(10): 6070-80
- Javier, R. T. (2008). "Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses." Oncogene **27**(55): 7031-46
- Jiang, J., C. A. Ballinger, et al. (2001). "CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation." J Biol Chem **276**(46): 42938-44.

- Jones, D. L., R. M. Alani, et al. (1997). "The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2." Genes Dev **11**(16): 2101-11.
- Jones, D. L. and K. Munger (1996). "Interactions of the human papillomavirus E7 protein with cell cycle regulators." Semin Cancer Biol **7**(6): 327-37.
- Kao, W. H., S. L. Beaudenon, et al. (2000). "Human papillomavirus type 16 E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase." J Virol **74**(14): 6408-17.
- Kawaguchi, Y., K. Nakajima, et al. (2000). "Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) with HS1-associated protein X-1: implication of cytoplasmic function of EBNA-LP." J Virol **74**(21): 10104-11.
- Kehmeier, E., H. Ruhl, et al. (2002). "Cellular steady-state levels of "high risk" but not "low risk" human papillomavirus (HPV) E6 proteins are increased by inhibition of proteasome-dependent degradation independent of their p53- and E6AP-binding capabilities." Virology **299**(1): 72-87.
- Kennedy, M. B. (1995). "Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains." Trends Biochem Sci **20**(9): 350.
- Kim, S., H. Y. Kim, et al. (2007). "Hepatitis B virus x protein induces perinuclear mitochondrial clustering in microtubule- and Dynein-dependent manners." J Virol **81**(4): 1714-26.
- Kiyono, T., S. A. Foster, et al. (1998). "Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells." Nature **396**(6706): 84-8.
- Kiyono, T., A. Hiraiwa, et al. (1997). "Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11612-6.
- Klingelutz, A. J., S. A. Foster, et al. (1996). "Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16." Nature **380**(6569): 79-82.
- Ko, L. J. and C. Prives (1996). "p53: puzzle and paradigm." Genes Dev **10**(9): 1054-72.
- Koegl, M., T. Hoppe, et al. (1999). "A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly." Cell **96**(5): 635-44.
- Kuballa, P., K. Matentzoglou, et al. (2007). "The role of the ubiquitin ligase E6-AP in human papillomavirus E6-mediated degradation of PDZ domain-containing proteins." J Biol Chem **282**(1): 65-71

- Kukimoto, I., S. Aihara, et al. (1998). "Human papillomavirus oncoprotein E6 binds to the C-terminal region of human minichromosome maintenance 7 protein." Biochem Biophys Res Commun **249**(1): 258-62.
- Laney, J. D. and M. Hochstrasser (1999). "Substrate targeting in the ubiquitin system." Cell **97**(4): 427-30.
- Lechner, M. S. and L. A. Laimins (1994). "Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins." J Virol **68**(7): 4262-73.
- Lee, S. S., B. Glaunsinger, et al. (2000). "Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins." J Virol **74**(20): 9680-93.
- Lee, S. S., R. S. Weiss, et al. (1997). "Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6670-5.
- Liu, J. P. (1999). "Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity." Faseb J **13**(15): 2091-104.
- Liu, Y., J. J. Chen, et al. (1999). "Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells." J Virol **73**(9): 7297-307.
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 362-72.
- Lont, A. P., B. K. Kroon, et al. (2006). "Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival." Int J Cancer **119**(5): 1078-81.
- Loughran, G., N. C. Healy, et al. (2005). "Mystique is a new insulin-like growth factor-I-regulated PDZ-LIM domain protein that promotes cell attachment and migration and suppresses Anchorage-independent growth." Mol Biol Cell **16**(4): 1811-22.
- Madsen, B. S., H. L. Jensen, et al. (2008). "Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark." Int J Cancer **122**(12): 2827-34.
- Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." Oncogene **20**(54): 7874-87.
- Marin, M. C., C. A. Jost, et al. (1998). "Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73." Mol Cell Biol **18**(11): 6316-24.
- Matsha, T., R. Erasmus, et al. (2002). "Human papillomavirus associated with oesophageal cancer." J Clin Pathol **55**(8): 587-90.

- McGill, M. A. and C. J. McGlade (2003). "Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain." J Biol Chem **278**(25): 23196-203.
- Mirmohammadsadegh, A., U. Tartler, et al. (2003). "HAX-1, identified by differential display reverse transcription polymerase chain reaction, is overexpressed in lesional psoriasis." J Invest Dermatol **120**(6): 1045-51.
- Mounts, P., K. V. Shah, et al. (1982). "Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(17): 5425-9.
- Modem, S. and T. R. Reddy (2008). "An anti-apoptotic protein, Hax-1, inhibits the HIV-1 rev function by altering its sub-cellular localization." J Cell Physiol **214**(1): 14-9.
- Motoyama, S., C. A. Ladines-Llave, et al. (2004). "The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis." Kobe J Med Sci **50**(1-2): 9-19
- Muhlhahn, P., M. Zweckstetter, et al. (1998). "Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site." Nat Struct Biol **5**(8): 682-6.
- Munger, K., B. A. Werness, et al. (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." Embo J **8**(13): 4099-105.
- Muratani, M. and W. P. Tansey (2003). "How the ubiquitin-proteasome system controls transcription." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 192-201.
- Nakagawa, S. and J. M. Huibregtse (2000). "Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase." Mol Cell Biol **20**(21): 8244-53.
- Narisawa-Saito, M. and T. Kiyono (2007). "Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins." Cancer Sci **98**(10): 1505-11.
- Nguyen, D. X., T. F. Westbrook, et al. (2002). "Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest." J Virol **76**(2): 619-32.
- Nomura-Takigawa, Y., M. Nagano-Fujii, et al. (2006). "Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis." J Gen Virol **87**(Pt 7): 1935-45.
- Nourry, C., S. G. Grant, et al. (2003). "PDZ domain proteins: plug and play!" Sci STKE **2003**(179): RE7.

- Nie, J., S. S. Li, et al. (2004). "A novel PTB-PDZ domain interaction mediates isoform-specific ubiquitylation of mammalian Numb." J Biol Chem **279**(20): 20807-15.
- Nie, J., M. A. McGill, et al. (2002). "LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation." Embo J **21**(1-2): 93-102.
- Oh, S. T., S. Kyo, et al. (2001). "Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites." J Virol **75**(12): 5559-66.
- Park, J. S., E. J. Kim, et al. (2001). "Functional inactivation of p73, a homolog of p53 tumor suppressor protein, by human papillomavirus E6 proteins." Int J Cancer **91**(6): 822-7.
- Passmore, L. A. and D. Barford (2004). "Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation." Biochem J **379**(Pt 3): 513-25.
- Patel, D., S. M. Huang, et al. (1999). "The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300." Embo J **18**(18): 5061-72.
- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-33.
- Pickart, C. M. and M. J. Eddins (2004). "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 55-72.
- Psyrrri, A. and D. DiMaio (2008). "Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer." Nat Clin Pract Oncol **5**(1): 24-31.
- Radovanovic, J., V. Todorovic, et al. (1999). "Comparative ultrastructural studies on mitochondrial pathology in the liver of AIDS patients: clusters of mitochondria, protuberances, "minimitochondria," vacuoles, and virus-like particles." Ultrastruct Pathol **23**(1): 19-24.
- Ramsay, A. G., M. D. Keppler, et al. (2007). "HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6." Cancer Res **67**(11): 5275-84.
- Reidy, P. M., H. H. Dedo, et al. (2004). "Integration of human papillomavirus type 11 in recurrent respiratory papilloma-associated cancer." Laryngoscope **114**(11): 1906-9.
- Reineke, E. L. and H. Y. Kao (2009). "Targeting promyelocytic leukemia protein: a means to regulating PML nuclear bodies." Int J Biol Sci **5**(4): 366-76.

- Robinson, P. A. and H. C. Ardley (2004). "Ubiquitin-protein ligases." J Cell Sci **117**(Pt 22): 5191-4.
- Robzyk, K., J. Recht, et al. (2000). "Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast." Science **287**(5452): 501-4.
- Ronco, L. V., A. Y. Karpova, et al. (1998). "Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity." Genes Dev **12**(13): 2061-72.
- Rojo, G., M. Chamorro, et al. (1998). "Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells." J Virol **72**(9): 7583-8.
- Rubin, M. A., B. Kleter, et al. (2001). "Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis." Am J Pathol **159**(4): 1211-8.
- Ruesch, M. N. and L. A. Laimins (1998). "Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium." Virology **250**(1): 19-29.
- Ruiter, M. and P. J. van Mullem (1970). "Behavior of virus in malignant degeneration of skin lesion in epidermodysplasia verruciformis." J Invest Dermatol **54**(4): 324-31.
- Scheffner, M., B. A. Werness, et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." Cell **63**(6): 1129-36.
- Scheffner, M., U. Nuber, et al. (1995). "Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade." Nature **373**(6509): 81-3.
- Schwarz, S. E., J. L. Rosa, et al. (1998). "Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7." J Biol Chem **273**(20): 12148-54.
- Seth, R. B., L. Sun, et al. (2006). "Antiviral innate immunity pathways." Cell Res **16**(2): 141-7.
- Sharp, T. V., H. W. Wang, et al. (2002). "K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function." J Virol **76**(2): 802-16.
- Shaw, J. and L. A. Kirshenbaum (2006). "HAX-1 represses postmitochondrial caspase-9 activation and cell death during hypoxia-reoxygenation." Circ Res **99**(4): 336-8.
- Sinal, S. H. and C. R. Woods (2005). "Human papillomavirus infections of the genital and respiratory tracts in young children." Semin Pediatr Infect Dis **16**(4): 306-

16. Seth, R. B., L. Sun, et al. (2006). "Antiviral innate immunity pathways." Cell Res **16**(2): 141-7.
- Songyang, Z., A. S. Fanning, et al. (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." Science **275**(5296): 73-7.
- Spence, J., S. Sadis, et al. (1995). "A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination." Mol Cell Biol **15**(3): 1265-73.
- Spence, J., R. R. Gali, et al. (2000). "Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain." Cell **102**(1): 67-76.
- Stanley, M. (2007). "Prevention strategies against the human papillomavirus: the effectiveness of vaccination." Gynecol Oncol **107**(2 Suppl 1): S19-23.
- Stanley, M. (2007). "Prophylactic HPV vaccines: prospects for eliminating ano-genital cancer." Br J Cancer **96**(9): 1320-3.
- Steinberg, B. M. (1990). "Human papillomaviruses and upper airway oncogenesis." Am J Otolaryngol **11**(6): 370-4.
- Stewart, D., S. Kazemi, et al. (2004). "Ubiquitination and proteasome degradation of the E6 proteins of human papillomavirus types 11 and 18." J Gen Virol **85**(Pt 6): 1419-26.
- Suzuki, Y., C. Demoliere, et al. (1997). "HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases." J Immunol **158**(6): 2736-44.
- Stewart, D., Kazemi, S., Li, S., Massimi, P., Banks, L., Koromilas, A.E. & Matlashewski, G. (2004). J Gen Virol, **85**, 1419-26.
- Tanaka, T., M. A. Soriano, et al. (2005). "SLIM is a nuclear ubiquitin E3 ligase that negatively regulates STAT signaling." Immunity **22**(6): 729-36.
- Thomas, J. T., S. T. Oh, et al. (2001). "Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes." J Virol **75**(16): 7564-71.
- Thomas, M. and L. Banks (1999). "Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types." J Gen Virol **80** (Pt 6): 1513-7.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." Embo J **19**(1): 94-102.
- Tommasino, M., J. P. Adamczewski, et al. (1993). "HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A." Oncogene **8**(1): 195-202.
- Tomaic, V., D. Pim, et al. (2009). "The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent." Virology **393**(1): 7-10.

- Torrado, M., V. V. Senatorov, et al. (2004). "Pdlim2, a novel PDZ-LIM domain protein, interacts with alpha-actinins and filamin A." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 3955-63.
- Vos, R. M., J. Altreuter, et al. (2009). "The ubiquitin-specific peptidase USP15 regulates human papillomavirus type 16 E6 protein stability." J Virol **83**(17): 8885-92.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, et al. (2001). "Hyperproliferation and defects in epithelial polarity upon conditional ablation of alpha-catenin in skin." Cell **104**(4): 605-17.
- Veldman, T., I. Horikawa, et al. (2001). "Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein." J Virol **75**(9): 4467-72.
- Wang, J., A. Sampath, et al. (2001). "Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells." Oncogene **20**(34): 4740-9.
- Welters, M. J., A. de Jong, et al. (2003). "Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter." Cancer Res **63**(3): 636-41.
- Werness, B. A., A. J. Levine, et al. (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53." Science **248**(4951): 76-9.
- zur Hausen, H. (2000). J Natl Cancer Inst, **92**, 690-8.
- zur Hausen, H. & de Villiers, E.M. (1994). Annu Rev Microbiol, **48**, 427-47
- Yabe, Y., T. Okamoto, et al. (1969). "Virus particles in epidermodysplasia verruciformis with carcinoma." Dermatologica **139**(2): 161-4.
- Yamamoto, Y., J. M. Huibregtse, et al. (1997). "The human E6-AP gene (UBE3A) encodes three potential protein isoforms generated by differential splicing." Genomics **41**(2): 263-6.
- Yan, P., J. Fu, et al. (2009). "PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation." Blood **113**(18): 4370-80.
- Yao, J., L. Duan, et al. (2007). "Notch1 induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer cells: involvement of nuclear factor kappa B inhibition." Int J Gynecol Cancer **17**(2): 502-10.
- Yedavalli, V. S., H. M. Shih, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1." J Virol **79**(21): 13735-46.

- Yin, H., H. Morioka, et al. (2001). "Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein." Cytokine **15**(3): 122-37.
- Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, et al. (1996). "Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Oncogene **13**(11): 2323-30.
- Zimmermann, H., R. Degenkolbe, et al. (1999). "The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300." J Virol **73**(8): 6209-19.
- zur Hausen, H. and E. M. de Villiers (1994). "Human papillomaviruses." Annu Rev Microbiol **48**: 427-47.
- zur Hausen, H. (1999). "Viruses in human cancers." Eur J Cancer **35**(8): 1174-81.
- zur Hausen, H. (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **92**(9): 690-8.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.
- zur Hausen, H. (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." Virology **384**(2): 260-5.

6 Zusammenfassung

Humane Papillomaviren sind eine große Gruppe doppelsträngiger DNA Viren die mucöse oder cutane Epithelzellen infizieren. Man unterteilt die mucösen je nach Art der von ihnen ausgebildeten Läsionen in high risk oder low risk Typen. Während die low risk Typen für die Ausbildung von gutartigen Genitalwarzen verantwortlich sind, können die durch high risk Typen hervorgerufenen Läsionen entarten und zum Gebärmutterhalskrebs führen. Gebärmutterhalskrebs ist die zweithäufigste Krebsursache unter Frauen weltweit. In 99% aller Zervixkarzinome wurde DNA der mucösen high risk Gruppe der HPV gefunden.

Während über die Wirkungsweise der high risk Typen in den Wirtszellen bereits einiges bekannt ist, fehlen immer noch genauere Einblicke in die Wirkungsweisen der low risk Typen.

In dieser Arbeit konnten durch einen Yeast Two Hybride Screen drei potentielle Interaktionspartner für HPV11E6 gefunden werden, wovon erstmalig eines *in vitro* spezifisch mit HPV11E6 nicht aber mit HPV16E6 interagiert. Durch konfokale Mikroskopie konnte eine Akkumulierung von HPV11E6 an eines von ihnen, dem antiapoptotischen Protein HAX-1 gezeigt werden. Weiterhin wurde eine bisher noch unidentifizierte Strukturbildung in Zellen durch HPV11E6 Expression beobachtet. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von SLIM zu einem Abbau von HPV11E6 *in cellulo* führt. SLIM und LNX zwei PDZ Domänen haltige Proteine wurden in dieser Arbeit als neue Interaktionspartner von HPV16E6 identifiziert und wir konnten *in vitro* zeigen, dass es sich um mögliche Substrate des E6/E6AP Komplexes handelt. Als gemeinsame Eigenschaft für HPV11E6 und -16E6 konnten wir zeigen, dass sie beide durch ihre Bindung an E6AP in Zellen stabilisiert werden, so dass wir die Existenz einer für die viralen E6 Proteine spezifischen E3 Ligase vermuten.

7 Summary

Human Papillomaviruses comprise a large group of double-stranded DNA viruses which infect mucosal or cutaneous epithelial cells. Depending on the type of induced lesions, mucosal HPV viruses are classified into high risk and low risk types. Low risk HPV types induce the formation of benign genital warts. In contrast high risk HPV types can induce tumor formation e.g. cervical cancer. Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide and mucosal high risk HPV DNA can be found in 99% of all cervical cancers. Much is known about high risk HPV types and their actions in cells, whereas the modes of action of low risk HPV have not been elucidated.

Using a yeast two hybrid screen, three new potential binding partners for low risk HPV11E6 were identified in this study, one of which is the first ever found specific interaction partner for HPV11E6 with no binding to HPV16E6 *in vitro*. Accumulation of HPV11E6 with the newly identified binding partner and anti-apoptotic protein HAX-1 was shown by confocal microscopy. Furthermore, we found that expression of HPV11E6 led to the formation of unidentified structures within cells, and the expression of SLIM facilitated degradation of HPV11E6 *in cellulo*.

In this study, the PDZ domain containing proteins SLIM and LNX were identified as new interaction partners of the high risk HPV16E6, which were also ubiquitinated by the E6/E6AP complex. As a common characteristic for both HPV11E6 and 16E6 we found that binding to E6AP promotes stabilization of E6 providing reason to suggest the existence of a cellular E3 ligase specific for viral E6 proteins.