
Aus dem Institut für Medizinische Virologie
und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. G. Jahn
Sektion Experimentelle Virologie
Leiter: Professor Dr. T. Iftner

**Identifikation von zellspezifischen Faktoren,
die mit der spezifischen DNA-Bindung von HPV6 E2
wechselwirken**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Susanne Arbogast
aus Sulz am Neckar
2004

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. T. Iftner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. C. Garbe

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material	8
2.1 Eukaryonte Zellen	8
2.2 Bakterien	8
2.3 Hefen	8
2.4 Nukleinsäuren	9
2.4.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide.....	9
2.4.2 Doppelsträngige Oligonukleotide.....	9
2.4.3 Rekombinante Plasmide.....	10
2.4.4 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide.....	13
2.5 Größenmarker für Elektrophoresen	13
2.6 Enzyme	13
2.7 Fertige Reagenziensysteme (Kits)	14
2.8 Reagenzien	14
2.9 Medien	14
2.9.1 Medien für die Zellkultur.....	14
2.9.2 Medien für die Bakterienkultur.....	15
2.9.3 Medien für die Hefekultur.....	15
III. Methoden	17
3.1 Zellkultur	17
3.1.1 Kultivierung von eukaryonten Zellen.....	17
3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	17

3.2 Bakterienkultur	18
3.2.1 Kulturen für Plasmidisolierung.....	18
3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	18
3.2.3 Transformation von Bakterien.....	19
3.3 Hefekultur	19
3.3.1 Anzucht von Hefezellen.....	19
3.3.2 Transformation von Hefezellen.....	19
3.3.3 Homologe Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	20
3.3.4 ONPG-Test zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität.....	20
3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen.....	21
3.4 DNA-Methoden	22
3.4.1 Standardmethoden.....	22
3.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	22
3.4.3 DNA-Sequenzierung.....	22
3.4.4 Fragmentelution aus Agarosegelen.....	23
3.4.5 Radioaktive Markierung von DNA.....	23
3.5 RNA-Methoden	24
3.5.1 Isolation von gesamtzellulärer RNA aus eukaryonten Zellen.....	24
3.5.2 Poly(A) ⁺ -mRNA-Isolation aus gesamtzellulärer RNA.....	25
3.6 Erstellen einer cDNA-Bank	25
IV. Ergebnisse	27
4.1 Herstellung einer cDNA-Bank aus HT3-Zellen	27
4.2 Prinzip des „Yeast One-Hybrid“-Systems	32
4.2.1 Herstellung eines Oligonukleotids zur Integration der E2-Bindestellen in das Genom von <i>S. cerevisiae</i>	34
4.2.2 Integration der E2-Zielsequenz in Reportervektoren.....	35
4.2.3 Integration des Reportervektors mit integrierter E2-Zielsequenz in <i>S. cerevisiae</i>	35

4.2.4	Überprüfung der Basalaktivität des Reportergens <i>HIS3</i> in <i>S. cerevisiae</i>	36
4.2.5	Suche nach zellspezifischen Proteinen der Zelllinie HT3, die mit den E2-Bindestellen 3 und 4 von HPV6 interagieren.....	37
4.2.6	Überprüfung der gefundenen Interaktionen im ONPG-Test.....	38
4.2.7	Isolierung der Plasmid-DNA aus den ausgewählten Hefeklonen...	40
4.2.8	Identifizierung der cDNA-Fragmente.....	40
4.2.9	Parallele Bearbeitung weiterer Klone unabhängig von ihrer β -Galactosidase-Aktivität.....	41
V.	Diskussion	50
VI.	Zusammenfassung	59
VII.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	61
VIII.	Literaturverzeichnis	64

I. Einleitung

Papillomviren sind kleine, nicht-umhüllte DNA-Viren, die zusammen mit Polyomaviren und SV40 zur Familie der Papovaviren gehören. Die ikosaedrischen Partikel mit einem Durchmesser von 55 nm enthalten eine zirkulär geschlossene, doppelsträngige DNA von ca. 8 kBp (Pfister und Fuchs, 1994). Das Genom aller bekannter Papillomviren ist ähnlich organisiert und gliedert sich in eine kodierende und eine nicht-kodierende Region (*Abb. 1*). Der kodierende Bereich enthält die Leserahmen der frühen ("early", E) Gene, deren Proteine regulatorische Funktionen bei der Transformation der Wirtszelle (E6, E7), der viralen DNA-Replikation (E1, E2) und der Transkriptionskontrolle (E2) ausüben (Kubbutat und Vousden, 1996; Laimins, 1996). Ebenfalls zum kodierenden Bereich gehören die späten ("late", L) Gene, die für die Expression der beiden Kapsidproteine L1 und L2 verantwortlich sind (Laimins, 1996). In der etwa 1kBp großen nicht-kodierenden Region (NCR), die zwischen den Leserahmen E6 und L1 liegt, sind *cis*-aktive Elemente für die Replikation und Transkription lokalisiert (Fuchs und Pfister, 1994). Charakteristisch für alle Papillomviren ist die Anordnung der zum Teil überlappenden offenen Leserahmen auf nur einem DNA-Strang.

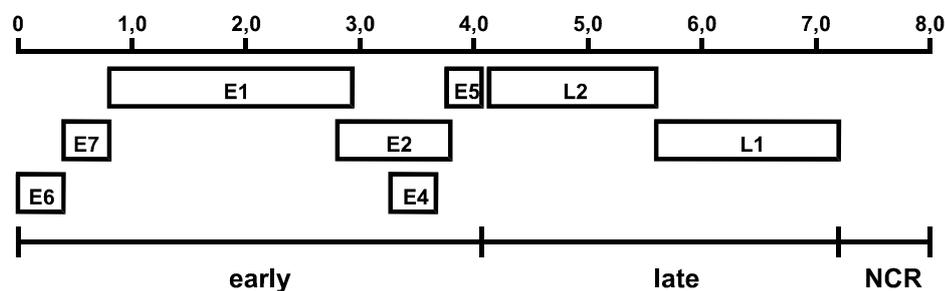


Abb. 1: Aufbau des Papillomvirus-Genoms. Die Grafik zeigt das Genom in linearer Darstellung mit den offenen Leserahmen der frühen ("early", E) und der späten ("late", L) Gene sowie der nicht-kodierenden Region (NCR). Der Maßstab gibt die Größenverhältnisse in kBp an.

Einleitung

Humane Papillomviren (HPV) infizieren spezifisch Epithelien der Haut und der Schleimhaut und können benigne Tumoren wie plantare oder vulgäre Warzen, Genitalwarzen oder Larynxpapillome induzieren. Bisher konnten über 97 verschiedene HPV-Typen auf der Basis von Sequenzunterschieden definiert werden, deren Gewebetropismus für die verhornende Haut oder die Schleimhaut zur Klassifizierung in kutane und genitale Vertreter führte (de Villiers, 1994). Während in undifferenzierten, basalen Zellschichten nur frühe Gene exprimiert werden, ist die Expression der Strukturgene L1 und L2, die Replikation der viralen DNA sowie die Partikelbildung auf differenzierte Zellschichten des Epithels beschränkt (Laimins, 1996). Die virusinduzierten, benignen Tumoren regredieren in der Regel spontan (Stanley, 1994; Stubenrauch und Iftner, 1999), doch kann eine langjährige Persistenz und die partielle Expression der viralen DNA zur malignen Entartung der Primärläsion führen (Walboomers *et al.*, 1994).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Karzinogenese zeigt sich insbesondere bei den genitalen HPV-Typen, die Neoplasien des Anogenitaltraktes hervorrufen. In 99,7% aller Zervixkarzinome kann HPV-DNA nachgewiesen werden (Walboomers *et al.*, 1999), darunter als häufigste Vertreter die Typen HPV16 und 18 (70%), wohingegen die Typen 6 und 11 vorwiegend mit gutartigen Schleimhautveränderungen wie Kondylomen und Larynxpapillomen assoziiert sind und nur in etwa 1% der invasiven Karzinome des Anogenitaltraktes vorkommen (Walboomers *et al.*, 1994; Wilczynski *et al.*, 1993). Dieses unterschiedliche karzinogene Potential führte zur Unterteilung der HPV-Typen in eine Gruppe mit hohem Risiko ("high-risk"-HPV, z.B. HPV16, 18) und eine Gruppe mit niedrigem Risiko ("low-risk"-HPV, z.B. HPV6, 11) für die maligne Entartung der Primärläsion (Munoz *et al.*, 2003).

Wie durch zahlreiche Studien an Zellkulturen und transgenen Tieren gezeigt werden konnte, spielen die Produkte der frühen Gene E6 und E7 eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese (Laimins, 1996). Erste Hinweise für die Bedeutung dieser Genprodukte ergaben sich aus dem Nachweis einer kontinuierlichen Expression der Genregion E6/E7 in allen HPV-positiven Zervixkarzinomen sowie in davon abgeleiteten Zelllinien (zur Hausen, 1994). Bei genitalen

Einleitung

Papillomviren lässt sich die transformierende Aktivität der Proteine E6 und E7 teilweise durch deren Interaktion mit den Tumorsuppressorproteinen p53 und pRB erklären (Huibregtse und Scheffner, 1994; Thomas *et al.*, 1998; Vousden, 1995). Dadurch werden wichtige Funktionen dieser an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligten Proteine inhibiert. Es besteht eine enge Korrelation zwischen dem onkogenen Potential der E6- und E7-Proteine verschiedener genitaler Papillomviren und deren Fähigkeit, an p53 bzw. pRB zu binden. Bei kutanen Papillomviren konnte ein solcher Zusammenhang noch nicht festgestellt werden (Elbel *et al.*, 1997; Huibregtse und Scheffner, 1994; Schmitt *et al.*, 1994; Vousden, 1995).

Weiterhin unterscheiden sich die hoch- und niedrig-karzinogenen Typen der genitalen Papillomviren in der Art der Expression von E6 und E7. Bei den Viren der Hochrisikogruppe werden beide Onkogene von einem einzigen Promotor aus transkribiert, der vor dem E6-Leserahmen liegt (Hummel *et al.*, 1992; Smotkin und Wettstein, 1986; Thierry *et al.*, 1987). Neben dem Primärtranskript, das E6 als ersten translatierbaren Leserahmen enthält, werden durch differentielles Spleißen drei weitere Transkripte erzeugt, die für zwei verkürzte E6-Proteine und E7 kodieren können (Smotkin und Wettstein, 1986; Smotkin *et al.*, 1989). Im Gegensatz hierzu existiert bei den niedrig-karzinogenen HPV-Typen 6 und 11 ein weiterer Promotor innerhalb des E6-Leserahmens, der eine separate Synthese von E7-Transkripten ermöglicht (Smotkin *et al.*, 1989).

Die Aktivität der Promotoren wird durch cis-aktive Sequenzen in der NCR reguliert. Im zentralen Bereich der NCR liegt der keratinozytenspezifische Enhancer, der bei allen genitalen Papillomviren ähnlich aufgebaut ist. Die Bindung verschiedener zellulärer Faktoren steuert die Regulation der viralen Transkription sowohl positiv als auch negativ. Die Keratinozytenspezifität wird einerseits durch die Kombination von ubiquitären, andererseits aber auch durch epithelspezifische Faktoren bestimmt (Desaintes und Demeret, 1996).

Neben zellulären Faktoren wird die transkriptionelle Aktivität der HPV-Promotoren auch durch das virale Regulatorprotein E2 beeinflusst. Es bindet als Dimer an die Erkennungssequenz 5'-ACCN₆GGT-3', die im Genom aller Papillomviren in multipler Anzahl vorkommt. Das Protein gliedert sich in zwei

Einleitung

Domänen, von denen die carboxyterminale Domäne für die Dimerisierung und DNA-Bindung notwendig ist, während der Aminoterminus die transkriptionelle Aktivierung vermittelt (McBride, 1991).

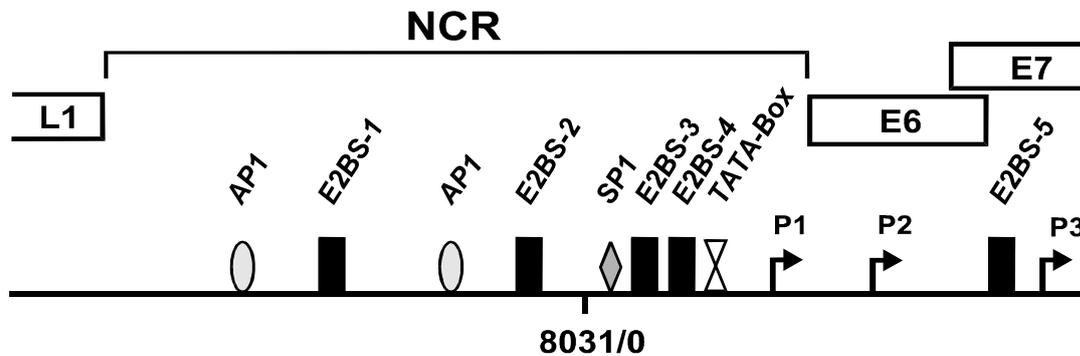


Abb. 2: Position der Bindestellen viraler und zellulärer Proteine in der HPV6-NCR. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der HPV6-Sequenz mit der NCR und den Leserahmen für L1, E6 und E7. Die Lage der frühen Promotoren P1, P2 und P3 ist mit Pfeilen angegeben. Symbole kennzeichnen die relativen Positionen der Bindestellen für E2 (E2BS; Rechteck), SP1 (Raute), AP1 (Ellipse) und die TATA-Box des Promotors P1 (Doppeldreieck). Nukleotidangaben beziehen sich auf Hofmann *et al.* (1995).

Genitale HPV-Typen enthalten vier E2-Bindestellen (E2BS) innerhalb der NCR, die in ihrer relativen Position unter den verschiedenen Typen hochkonserviert sind. Die E2BS-3 und -4 liegen in direkter Nachbarschaft zu einer SP1-Bindestelle und der TATA-Box des frühen Promotors vor dem E6-Gen (Abb. 2). Bei den genitalen "high risk"-HPV-Typen konnte gezeigt werden, dass die Bindung von E2 an eine oder beide promotorproximalen E2-Bindestellen die Transkription an diesem Promotor unterdrückt. Die Ursache für die Repression wird in der sterischen Behinderung zwischen dem TATA-bindenden Protein (TBP), SP1 und E2 gesehen, die nicht gleichzeitig an ihre eng benachbarten Erkennungssequenzen binden können. Daher wird durch die Bindung von E2 die Bildung des Präinitiationskomplexes der Transkription beeinträchtigt (Demeret *et al.*, 1994; Tan *et al.*, 1994). Dieser *in vitro*-Befund korreliert mit der sehr geringen Expression von E6 und E7 in benignen Schleimhautläsionen, die episomale DNA von "high risk"-HPV-Typen enthalten (Böhm *et al.*, 1993).

Einleitung

Im Gegensatz dazu wird eine Hochregulation der Onkogen-Transkription in zahlreichen Karzinomen beobachtet, bei denen das virale Genom in die Wirtszell-DNA integriert vorliegt. Die Öffnung des viralen Genoms findet meist in der E1/E2-Region statt und führt zu einer Zerstörung des E2-Gens, so dass es durch die Integration zu einem Verlust der E2-vermittelten negativen Kontrolle kommt (zur Hausen, 1994). Dieser Verlust der negativen Regulation führt zu einer erhöhten Expression der E6- und E7-Transkripte, was als wichtiger Progressionsfaktor für die Karzinogenese angesehen wird (zur Hausen, 1994). Auch Veränderungen innerhalb der regulatorisch bedeutsamen nicht-kodierenden Region werden gelegentlich in HPV-Isolaten aus Karzinomen beobachtet und stehen im Verdacht, die Tumorprogression maßgeblich zu begünstigen. In einigen Studien wurde auch eine kausale Rolle individueller Subtypen des niedrig-karzinogenen HPV6 bei der Tumorentstehung diskutiert. Es wurde vermutet, dass Sequenzrearrangements innerhalb der NCR die Aktivität der Onkogen-Promotoren positiv beeinflussen und damit zu einer erhöhten E6/E7-Expression führen könnten (Boshart und zur Hausen, 1986; Rando *et al.*, 1986). Da aber in weiterführenden Studien gezeigt werden konnte, dass Sequenzvariationen der NCR verschiedener Subtypen von HPV6 nicht zu einer gesteigerten Expression der Onkogene E6 und E7 führen (Grassmann *et al.*, 1996), scheinen eher zelluläre Veränderungen als Sekundärereignisse für die maligne Progression der HPV-positiven Läsionen verantwortlich zu sein (Rübben *et al.*, 1992). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Onkogene E6 und E7 durch die beiden frühen Promotoren von HPV6 unabhängig voneinander und in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich reguliert werden (Grassmann *et al.*, 1996). Von verschiedenen untersuchten Zelllinien zeigte RTS3b, eine humane, HPV-negative Zelllinie, die aus einem Hautkarzinom eines immunsupprimierten Nierentransplantat-Empfängers etabliert wurde (Purdie *et al.*, 1993), als einzige ein E6/E7-Expressionsmuster, das dem von natürlich infizierten benignen Kondylomen ähnelt. In Anwesenheit des E2-Proteins wird eine zwei- bis fünffache Aktivierung des E7-Promotors (P2) beobachtet, während der E6-Promotor (P1) gleichzeitig auf 50% seiner Ausgangsaktivität reprimiert wird. Die Aktivierbarkeit von P2 ist hauptsächlich

Einleitung

von der promotordistalen E2-Bindestelle (E2BS-1) abhängig, während die promotorproximalen Bindestellen E2BS-3 und -4 die Repression des E6-Promotors vermitteln. Im Gegensatz zu RTS3b-Zellen wird in der Zelllinie HT3, einer humanen, HPV-negativen Zelllinie, die aus einem Zervixkarzinom etabliert wurde, eine Aktivierung des E6-Promotors auf das Dreifache der Ausgangsaktivität im Kontext aller E2-Bindestellen beobachtet, wobei andererseits keine E7-Transkripte nachweisbar sind (Rapp *et al.*, 1997).

Tab. 1: Separate Regulation der beiden frühen Promotoren von HPV6 durch E2: Vergleich des Aktivierungsverhaltens der Zelllinien RTS3b und HT3 in An- bzw. Abwesenheit von E2. Fett gedruckte Daten geben die Hauptaktivität der jeweiligen Promotoren an. Die Relativwerte der E2-vermittelten Aktivierung beziehen sich auf die Basalaktivität ohne E2, die gleich 1 gesetzt wurde.

	<u>RTS3b</u>	<u>HT3</u>
- E2	E6-Promotor: aktiv E7-Promotor: aktiv	E6-Promotor: aktiv E7-Promotor: -
+ E2	E6-Promotor: ↓ (x 0,5) E7-Promotor: ↑ (x 2-5)	E6-Promotor: ↑ (x 3) E7-Promotor: -

Die beiden Zelllinien RTS3b und HT3 unterscheiden sich in der Promotornutzung der beiden frühen Promotoren und der E2-vermittelten Regulation der Transkription. Als Ursache hierfür werden zelltypspezifische Einflüsse vermutet, die mit der E2-vermittelten Regulation interferieren. Eine mögliche Erklärung für die Aktivierung des E6-Promotors unter E2-Einfluss ist, dass in HT3-Zellen die Bindung von E2 an die beiden promotorproximalen E2-Bindestellen, die maßgeblich für eine Repression verantwortlich sind, verhindert wird. Dies könnte durch Konkurrenz mit hochaffin bindenden, zellulären Faktoren erfolgen, die an die E2-Bindestellen oder deren unmittelbare Umgebung binden.

Möglicherweise fanden in der Zelllinie HT3 Veränderungen im zellulären Milieu statt, welche die Umkehrung der E2-vermittelten Repression über die E2BS-3/4 zur Aktivierung ermöglichen. Somit könnten die Veränderungen in dieser

Einleitung

Zelllinie potentiellen Vorgängen bei der malignen Progression von HPV6-positiven Läsionen entsprechen.

In der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe des „Yeast One-Hybrid“-Systems (Wang und Reed, 1993) solche zellulären Faktoren identifiziert und so die Grundlage für einen weiterführenden Vergleich mit entsprechenden Faktoren der Zelllinie RTS3b geschaffen werden. Hierfür wurde eine cDNA-Bank der Zelllinie HT3 hergestellt, die anschließend im „Yeast One-Hybrid“-System auf das Vorliegen von Proteinen, die mit den E2-Bindestellen interagieren können, getestet wurde.

II. Material

2.1 Eukaryonte Zellen

HT3:

Humane, HPV-negative, epitheliale Zelllinie, die aus einem Zervixkarzinom etabliert wurde (ATCC HTB32)

2.2 Bakterien

Escherichia coli DH5 α : bezogen von der Firma Clontech (Heidelberg)
verwendet für Plasmidisolierungen

Escherichia coli ULTRAMAX™ DH5 α -FT™ Competent Cells:
bezogen von der Firma Life Technologies (Karlsruhe)
verwendet zur Konstruktion einer cDNA-Bank

2.3 Hefen

***Saccharomyces cerevisiae* YM4271:** *MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-901, tyr1-501, gal4- Δ 512, gal80- Δ 538, ade5::hisG*

YM4271 ist Bestandteil des MATCHMAKER „One-Hybrid“-Systems der Firma Clontech (Heidelberg).

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide

Alle synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von der Firma Life Technologies (Karlsruhe) bezogen, sofern sie nicht Bestandteile eines fertigen Reagenziensystems waren.

Die folgenden aufgelisteten einzelsträngigen Oligonukleotide wurden für die Sequenzierung der klonierten Konstrukte verwendet.

Tab. 2: Zusammenfassung der in der Arbeit verwendeten einzelsträngigen Nukleotide

Oligonukleotid-bezeichnung	Orientierung	Quelle	Position	Sequenz	Anmerkungen
GAL4AD Sequencing Primer	sense	pGAD10	757 – 773	5'-TAC-CAC-TAC-AAT-GGA-TG-3'	Clontech, Heidelberg
MATCHMAKER 5'AD LD-Insert Screening Amplimer	sense	pGAD10	788 – 818	5'-CTA-TTC-GAT-GAT-GAA-GAT-ACC-CCA-CCA-AAC-CC-3'	Clontech, Heidelberg
MATCHMAKER 3'AD LD-Insert Screening Amplimer	antisense	pGAD10	899 – 880	5'-GTG-AAC-TTG-CGG-GGT-TTT-TCA-GTA-TCT-ACG-AT-3'	Clontech, Heidelberg
pHisiSeq125	antisense	pHisi	147 – 125	5'-GCC-TTC-GTT-TAT-CTT-GCC-TGC-TC-3'	-
SeqpLacZi	antisense	pLacZi	171 – 150	5'-TGT-GTA-TTT-GTG-TTT-GCG-TGT-C-3'	-

2.4.2 Doppelsträngige Oligonukleotide

Als DNA-Zielsequenz für die Integration in das Genom von *S. cerevisiae* wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, das bereits in einer früheren Arbeit im „Yeast One-Hybrid“-System verwendet wurde. Es enthält die beiden

promotorproximalen E2-Bindestellen 3 und 4 von HPV 6a im Kontext der flankierenden Nukleotide aus der NCR.



Abb. 3: Sequenz des Oligonukleotids, das für die Integration der Zielsequenz in das Hefegenom verwendet wurde

Das 38 Bp große Oligonukleotid enthält neben den E2-Bindestellen 3 und 4 (umrahmt) zusätzlich die benachbarten Nukleotide aus der NCR von HPV6a.

Das Oligonukleotid lag als Dreifachkopie in den Vektor pHisi (MATCHMAKER „One-Hybrid“-System, Clontech) kloniert vor (Spaderna, 1998) und wurde durch Sequenzierung überprüft.

2.4.3 Rekombinante Plasmide

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

pGAD10 („Two-Hybrid cDNA Construction Kit“, Clontech, Heidelberg)

Größe: 6,65 kBp

pGAD10 ist ein Hefe-Expressionsvektor, der die Expression von Fusionsproteinen mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) erlaubt. Er enthält die c-terminalen 113 Aminosäuren (Pos. 768-881) des GAL4-Transkriptionsfaktors vor der MCS. Als Aminosäure-Selektionsmarker trägt der Vektor das Gen für Leucin (*LEU2*), weiterhin enthält pGAD10 ein Resistenzgen für Ampicillin.

Es handelt sich um einen sogenannten „Shuttle“-Vektor, der sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom replizieren kann, da er sowohl den *E. coli*-Replikationsursprung Col E 1 als auch den *S. cerevisiae*-Replikationsursprung 2 μ trägt (Bartel *et al.*, 1993).

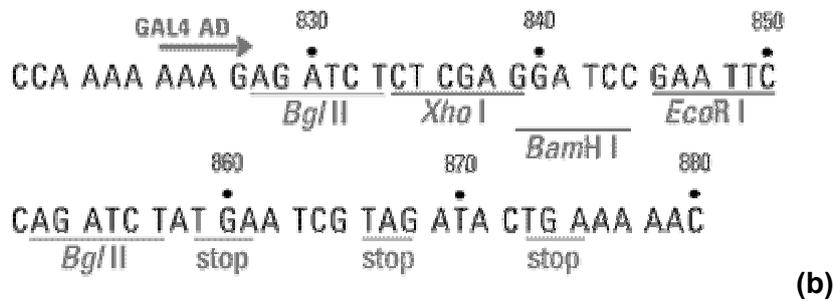
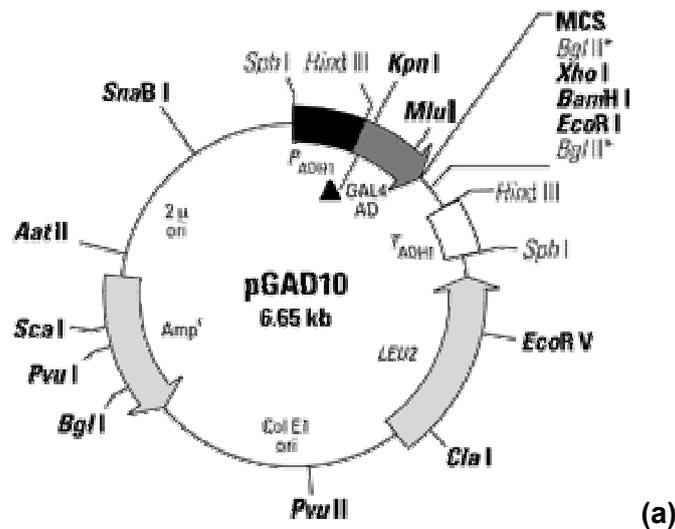


Abb. 4: Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (MCS) (b) des Vektors pGAD10 (Clontech, Heidelberg)

pHisi-1 (MATCHMAKER „One-Hybrid“-System, Clontech, Heidelberg)

Größe: 5,4 kBp

pHisi-1 ist ein Reporterkonstrukt für die Integration ins Genom von *S. cerevisiae* im „Yeast One-Hybrid“-System. pHisi-1 enthält das Hefe-*HIS3*-Gen in Abhängigkeit vom Minimalpromotor des *HIS3*-Locus (P_{minHIS}) hinter der MCS. DNA-Zielsequenzen können vor den Promotor in die MCS integriert werden.

pHisi-1 ist ein Konstrukt, das durch Insertion des *HIS3*-Reportergens von pHisi (ebenfalls MATCHMAKER „One-Hybrid“-System, Clontech) in die *EcoRI/BamHI*-Schnittstellen von pBR322 erhalten wurde. Es weist eine geringere Basalaktivität der Expression auf als pHisi.

Das *HIS3*-Gen dient weiterhin als Aminosäure-Selektionsmarker für die Integration in Hefen.

pHisi-1 enthält den bakteriellen Replikationsursprung Col E 1 sowie ein Resistenzgen für Ampicillin. Eine autonome Replikation in Hefen ist nicht möglich.

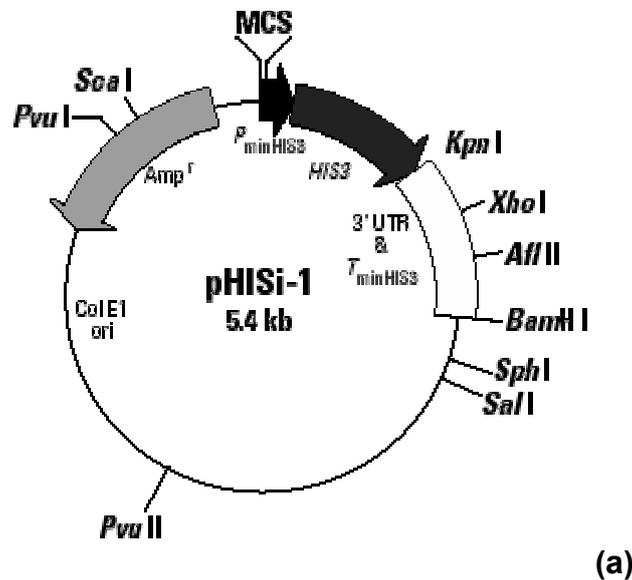


Abb. 5: Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (MCS) (b) des Vektors pHisi-1 (Clontech, Heidelberg)

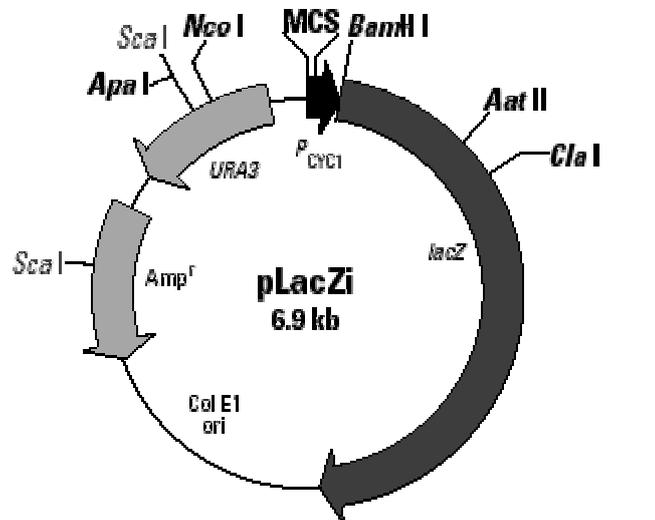
pLacZi (MATCHMAKER „One-Hybrid“-System, Clontech, Heidelberg)

Größe: 6,9 kBp

pLacZi ist ein Reporterkonstrukt für die Integration ins Genom von *S. cerevisiae* im „Yeast One-Hybrid“-System. Er enthält das bakterielle *lacZ*-Gen in Abhängigkeit vom Minimalpromotor des Hefe-Iso-1-Cytochrom C-Gens (P_{CYC1}) hinter der MCS. DNA-Zielsequenzen können vor den Promotor in die MCS integriert werden.

pLacZi enthält ein Resistenzgen für Ampicillin sowie das Hefe-*URA3*-Gen als Selektionsmarker für die Integration in Hefen. Der Vektor enthält den

bakteriellen Replikationsursprung Col E 1. Eine autonome Replikation in Hefen ist nicht möglich.



(a)



(b)

Abb. 6: Vektorkarte (a) und Multiple Cloning Site (MCS) (b) des Vektors pLacZi (Clontech, Heidelberg)

2.4.4 Sonstige Nukleinsäuren und Nukleotide

Lachssperma-DNA, sonifiziert (Clontech, Heidelberg)

2.5 Größenmarker für Elektrophoresen

1kb-Leiter (Life Technologies, Karlsruhe)

2.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen:

New England BioLabs, Frankfurt a. M.; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Life Technologies, Karlsruhe

2.7 Fertige Reagenziensysteme (Kits)

- PRISM™ DyeDeoxy Sequencing Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt
- QIAGEN Plasmid Prep Kit, Qiagen, Hilden
- QIAGEN Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden
- TaKaRa Ligation Kit Ver. 2
- mRNA Separator Kit, Clontech, Heidelberg

2.8 Reagenzien

Alle (bio-)chemischen Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

In der Regel wurden Chemikalien mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ verwendet.

2.9 Medien

2.9.1 Medien für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Fertigmedium von Life Technologies (Karlsruhe) mit Zusatz von 10% FKS (Fötale Kälberserum), 45 min inaktiviert bei 56°C, und 50 µg/ml Gentamicin (Life Technologies)

Einfriermedium für eukaryonte Zellen

Enthält 80% (v/v) Wachstumsmedium, 10% (v/v) DMSO und 10% (v/v) FKS

Trypsin/EDTA

Fertige Lösung von Life Technologies (Karlsruhe)

2.9.2 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) (bezogen auf 1 l)

Zur Herstellung von LB-Medium wurde eine Fertigmischung von Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

LB-Agar (bezogen auf 1 l)

Zur Herstellung von LB-Agar wurden dem LB-Medium 15 g Bacto-Agar (Life Technologies) zugesetzt.

SOC-Medium (bezogen auf 1 l)

20 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 0,25 M KCl, 2,0 M $MgCl_2$ und 0,02 M Glukose wurden in 1 l H_2O gelöst und pH 7,0 mit NaOH eingestellt.

2.9.3 Medien für die Hefekultur

YAPD- Vollmedium (bezogen auf 1 l)

10 g Bacto-Hefe-Extrakt und 20 g Bacto-Pepton wurden in 900 ml H_2O gelöst. Nach dem Autoklavieren wurden 80 ml Glukose 25% (w/v) und 20 ml Adeninsulfat 0,2% (w/v) zugegeben.

Minimal-Flüssigmedium (bezogen auf 1 l)

1,45 g Difco Yeast N_2 Base, 5,25 g $(NH_4)_2SO_4$, 10 g Succinat und 2,8 g KOH wurden in 820 ml H_2O gelöst. Nach dem Autoklavieren wurden 80 ml Glukose 25% (w/v) und 100 ml 10 x Dropout zugegeben.

Minimal-Plattenmedium (bezogen auf 1 l)

1,45 g Difco Yeast N_2 Base, 5,25 g $(NH_4)_2SO_4$, 10 g Succinat, 8,5 g KOH und 15 g Bacto-Agar (Life Technologies) wurden in 900 ml H_2O gelöst. Nach dem Autoklavieren wurden 80 ml Glukose 25% (w/v) und 100 ml 10 x Dropout zugegeben.

10 x Dropout (bezogen auf 1 l)

1500 mg L-Valin, 200 mg L-Adeninhemisulfat, 200 mg L-Arginin HCl, 200 mg L-Histidin HCL Monohydrat, 1000 mg L-Leucin, 300 mg L-Lysin HCl, 200 mg L-Methionin, 500 mg L-Phenylalanin, 2000 mg L-Threonin, 200 mg L-Tryptophan, 300 mg L-Tyrosin und 200 mg L-Uracil wurden in 1 l H₂O gelöst und autoklaviert.

Für Selektivmedien werden die entsprechenden Aminosäuren im 10 x Dropout weggelassen.

III. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von eukaryonten Zellen

Die verwendete Zelllinie HT3 wuchs adhärent und wurde als Monolayer-Kultur in Zellkulturschalen vermehrt. Als Medium wurde DMEM mit FKS und Gentamicin verwendet. Die Zellen wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet. Die Zellen wurden solange mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt, bis sie sich vom Boden der Zellkulturschalen ablösten. Anschließend wurden sie mit einer Pipettenspitze vereinzelt und auf Schalen mit frischem Medium (10 ml/10 cm Schale) verteilt.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluente Zellen in Einfriermedium überführt und bei -80°C gelagert. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert und in 20 ml Kulturmedium für 5 min bei 250 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde in einer geeigneten Menge eiskaltem DMSO-haltigem Einfriermedium (siehe 2.9.1) aufgenommen und in 1 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für das Auftauen von Zellen wurde der Inhalt einer Einfrierampulle in 15 ml Kulturmedium aufgenommen und auf eine 10 cm Zellkulturschale gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Kulturen für Plasmidisolierung

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmid-DNA diente der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α . Die verwendeten Konstrukte enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen, weshalb die plasmidhaltigen Stämme auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 50-100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin kultiviert wurden. Als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen dienten 3 ml Übernachtskultur. Zur Extraktion größerer Mengen an DNA wurden 500 ml LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C 12-16 h im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Langzeitlagerung wurden die Bakterien mit sterilem Glycerin, Endkonzentration 25% (v/v), vermischt und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die Fähigkeit zur Aufnahme zirkulärer Plasmid-DNA (Kompetenz) von *Escherichia coli* wurde durch eine Behandlung mit CaCl_2 , RbCl_2 und MnCl_2 erreicht (Ausubel *et al.*, 1990; Hanahan, 1983). Dabei wurden 490 ml LB-Flüssigmedium mit 10 ml *Escherichia coli* DH5 α einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei $\lambda=600$ nm (OD_{600}) von 0,45 im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml TFB1 (10 mM MES, 100 mM RbCl_2 , 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 5,8, 50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml TFB2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl_2 , 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 6,5, 15% Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.2.3 Transformation von Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Hitzeschock nach dem bei Ausubel *et al.* (1990) und Maniatis *et al.* (1989) beschriebenen Protokoll, wobei 4 µg Plasmid-DNA 30 min mit kompetenten DH5α auf Eis inkubiert wurden. Nach dem Hitzeschock (42°C, 1 min) und einer nachfolgenden Inkubation von 2 min auf Eis wurde 900 µl SOC-Medium zugegeben. Anschließend wurden die Bakterien 30 min in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert und Aliquots auf LB-Platten mit Ampicillin (50-100 µg/ml) ausplattiert.

3.3 Hefekultur

3.3.1 Anzucht von Hefezellen

S. cerevisiae wurden auf Festmedium bei 30°C kultiviert. Bei Verwendung von *HIS3* als GAL4-abhängigem Reportergen wurde dem Medium 3-Aminotriazol (Sigma, München) in Konzentrationen von 15 bis 60 mM zugesetzt.

Die Zelldichtebestimmung von *S. cerevisiae* erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) im Photometer bei 600 nm. Dabei gilt:

$$1 \text{ OD}_{600} = 3 \times 10^7 \text{ Zellen/ml}$$

3.3.2 Transformation von Hefezellen

Transformation von *S. cerevisiae* nach der Lithiumacetat-Methode

Nach der Lithiumacetat-Methode (Ito *et al.*, 1983; Rothstein, 1983) können Hefezellen schnell und effizient transformiert werden, da ihre Zellmembran durch Alkalimetallionen kurzfristig für ringförmige Plasmid-DNA permeabel wird (*Kompetenz*).

Die Transformationseffizienz beträgt 10^5 bis 10^6 Transformanden/µg eingesetzte Plasmid-DNA.

Methoden

50 ml YAPD-Medium wurden in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit mehreren 2-3 mm großen Kolonien des zu transformierenden Hefestammes beimpft und über Nacht bei 30°C angezogen. Diese Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 in frischem YAPD-Medium verdünnt und nochmals etwa 3 Stunden bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 ± 0,1 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (1000 x g, 5 min, RT), einmal mit sterilem H₂O gewaschen und anschließend in 1,5 ml frischem 1 x TE/LiAc resuspendiert. 100 µl dieser Hefezellen wurden 100 µg der aufbereiteten Lachssperma-DNA (Clontech, Heidelberg) und 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA zugesetzt und kurz gemischt. Nach Zugabe von 600 µl PEG-Lösung (480 µl 50% (w/v) PEG; 60 µl 10 x TE, pH 7,5; 60 µl 10 x LiAc, pH 7,5) wurde erneut gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 70 µl DMSO zugegeben. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen pelletiert (14000 rpm, 5 s, RT), in 1 ml 1 x TE gewaschen, in 150 µl 1 x TE aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 6-7 Tage bei 30°C.

3.3.3 Homologe Rekombination in *S. cerevisiae*

Die homologe Rekombination in das Genom von *S. cerevisiae* erfolgte analog der Transformation nach der Lithiumacetat-Methode. Die zu transformierende Plasmid-DNA wurde hierbei in linearisierter Form eingesetzt, um die für eine Rekombination notwendige DNA-Struktur und Sequenzabfolge zu gewährleisten.

3.3.4 ONPG-Test zur Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Zum quantitativen Nachweis der β -Galactosidase-Expression in Hefezellen wurde die Enzymaktivität im ONPG-Test untersucht. Hierzu wurde die Enzymaktivität von Zellextrakten gemessen (Guarente, 1983).

Durch die Protein-DNA-Interaktion im "Yeast One-Hybrid"-System kommt es zur Expression des (GAL4-abhängigen) Reportergens *lacZ*. Durch die gebildete β -Galactosidase wird gelbes o-Nitrophenol quantitativ aus dem Substrat ONPG

Methoden

freigesetzt. Die Bestimmung der β -Galactosidase-Einheiten erfolgt nach Miller (1972) gemäß der Formel:

$$1 \beta\text{-Galactosidase-Einheit} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600}),$$

wobei OD_{420} = Absorption von o-Nitrophenol, t = Inkubationszeit, V = Volumen der Ausgangskultur, OD_{600} = Absorption der Ausgangskultur.

1,5 ml einer Ausgangskultur mit bekannter OD_{600} wurden bei 10000 x g für 30 sec pelletiert, einmal in Z-Puffer gewaschen, der Überstand entfernt und das Pellet in 300 μl Z-Puffer aufgenommen. 100 μl der Zellsuspension wurden durch dreimaliges Schockgefrieren in Stickstoff aufgeschlossen. Anschließend wurden 700 μl Z-Puffer mit β -Mercaptoethanol (0,27% (v/v)) zugegeben. Es wurden 160 μl ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer) hinzugefügt und der Ansatz für 15 min bei 30°C inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung auftrat. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μl 1 M Na_2CO_3 beendet und die Zellreste durch Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min sedimentiert. 1 ml des Überstandes wurde abgenommen und die OD_{420} im Photometer bestimmt.

3.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen wurde nach der Methode von Hoffman und Winston (1987) durchgeführt.

5 ml der entsprechenden Hefe-Übernachtskultur wurden bei 2500 rpm für 5 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Anschließend wurden 300 mg Glaskugeln (Durchmesser: 0,5 mm) und 300 μl Lysispuffer (2% (w/v) Triton X-100; 1% (v/v) SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) hinzugefügt und der Ansatz für 2 min gevortext. Danach wurden 200 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und die Zellreste durch Zentrifugation bei 2500 rpm für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß ethanolpräzipitiert.

3.4 DNA-Methoden

3.4.1 Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokollen, die bei Ausubel *et al.* (1990) und Maniatis *et al.* (1989) beschrieben sind, durchgeführt:

- **Analytische Isolierung von Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse von Bakterien (Minipräparation)**
- **Aufreinigung der DNA mittels Phenol / Chloroform**
- **Ethanol-fällung von DNA und RNA**
- **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**
- **DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen**
- **Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten mittels alkalischer Phosphatase**
- **Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)**

3.4.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem "QIAGEN Plasmid Prep Kit" nach Anleitung des Herstellers. Die gewonnene DNA wurde in 500-1000 μ l sterilem H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektralphotometers (Perkin Elmer, BioLambda; OD₂₅₈) bestimmt.

3.4.3 DNA-Sequenzierung

Sequenzierung mit dem automatischen Sequenziersystem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

Die vollständige Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente erfolgte mit dem DNA-Sequenziersystem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt). Das System beruht auf der Strangabbruch-Methode nach Sanger. Hierbei werden mit Hilfe der Taq-Polymerase in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in neusynthetisierte DNA eingebaut. Die Sequenzierreaktion mit den 4 Didesoxy-

nukleotiden kann in einem Reaktionsgefäß ablaufen, da die unterschiedlichen Basen an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt vorliegen. Für eine Sequenzierreaktion wurden 1 µg doppelsträngige Plasmid-DNA, 2,5 pmol Primer und 2 µl "BigDye™ Terminator RR Mix" (Gesamtvolumen: 10µl) eingesetzt. Die anschließende PCR (96°C, 2 min; 30 Zyklen: 96°C, 10 sec; 50°C, 5 sec, 60°C, 4 min) sorgte für die Amplifikation und Bildung der Strangabbruchprodukte. Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte durch Fällen mit 3 M Natriumacetat, 100%-igem Ethanol und 20 µg Dextranblau (Gesamtvolumen: 350 µl). Die Pellets wurden in je 20 µl Template Suppression Reagent aufgenommen und elektrophoretisch in einer 47 cm langen Kapillare (Performance Optimized Polymer 6) aufgetrennt. Die fluoreszenzgekoppelten Didesoxynukleotide wurden von einem Argonlaser angeregt, die Lichtemission erfasst und die Nukleotidabfolge durch ein Computerprogramm bestimmt. Die resultierenden Sequenzen wurden mit der *Genbank* des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) verglichen.

3.4.4 Fragmentelution aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden in 1%-igen präparativen Agarosegelen (SeaKem GTG Agarose, Biozym) elektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschten Banden unter UV-Licht ($\lambda=366$ nm) identifiziert und ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem "QIAGEN Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers eluiert und gereinigt sowie die erhaltene DNA-Ausbeute anhand eines Agarosegels abgeschätzt.

3.4.5 Radioaktive Markierung von DNA

Die 5'-Endmarkierung von DNA erfolgte durch die T4-Polynukleotidkinase (MBI, Fermentas). Dabei katalysierte die Polynukleotidkinase (PNK) den Transfer der terminalen Phosphatgruppe des γ -³²P-ATPs auf das endständige Nukleotid eines Polynukleotids. Die Reaktion lief in folgendem Ansatz ab: 5 µg Polynukleotid; 5 µl 5x Exchange Reaction (PNK)-Puffer; 3 µl γ -³²P-ATP (10 µCi/µl); 11 µl H₂O und 1 µl T4-PNK (Gesamtvolumen: 25 µl). Nach 30 min

bei 37°C wurden freie Nukleotide durch Reinigung mit einer Sephadex G50-Säule (NucTrap®Probe Purification-Säule, Stratagene) entfernt.

3.5 RNA-Methoden

3.5.1 Isolation von gesamtzellulärer RNA aus eukaryonten Zellen

Gesamtzelluläre RNA wurde aus der Zelllinie HT3 nach der Guanidinium-Hydrochlorid-Methode von Nasser *et al.* (1982) isoliert.

Pro Zellkulturschale (10 cm) wurden dem Medium 150 µl einer wässrigen Cycloheximid-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit 2 ml Lösung II (1x TBS mit Cycloheximid 100 µg/ml) gewaschen und anschließend mit cycloheximidhaltigem Trypsin vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden bei 4°C im Ausschwingrotor pelletiert (3500 rpm, 5 min). Alle anschließenden Arbeitsschritte bis zur ersten Ethanolpräzipitation wurden auf Eis durchgeführt.

Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium vorsichtig resuspendiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation (4°C, 3500 rpm) wurde das Zellpellet in 5-fachem Volumen 8 M Guanidinium-HCl pH 4,9 aufgenommen und durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Das Zelllysate wurde durch Zugabe von 2/3 Vol. Ethanol gefällt und nach mindestens 4 h Inkubation bei -20°C für 15 min bei 4°C zentrifugiert (10000 rpm) und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 2 ml RNA-Extraktionspuffer gelöst, 4 ml azides Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (10:10:4) zugegeben und durch kräftiges Vortexen gemischt. Nach 5 min Inkubation im Wasserbad bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln wurde erneut für 10 min bei 3200 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgezogen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml azidem Phenol versetzt. Dem Phenolrückstand im Ausgangsgefäß wurden weitere 2,8 ml RNA-Extraktionspuffer zugesetzt, danach erneut bei 50°C für 5 min inkubiert und abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit dem Überstand aus dem

ersten Durchgang vereinigt. Im dritten und vierten Durchgang wurden für die RNA-Extraktion jeweils 1,4 ml RNA-Extraktionspuffer zugegeben. Die vereinigten Überstände aus allen vier Durchgängen wurden zusammen mit dem aziden Phenolanteil nochmals für 5 min bei 50°C inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der RNA wurde abgezogen und mit 2 Vol. Ethanol gefällt. Zuletzt wurde die RNA durch drei aufeinanderfolgende Ethanolfällungen mit 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6 und 1 mM EDTA pH 8,0 aufgereinigt.

3.5.2 Poly(A)⁺-mRNA-Isolation aus gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung von Poly(A)⁺-mRNA aus gesamtzellulärer RNA erfolgte durch Chromatographie an Oligothymidin-Zellulose (Aviv and Leder, 1972). Die Durchführung erfolgte mit dem mRNA Separator Kit von Clontech nach Anleitung des Herstellers. Poly(A)⁺-mRNA, aufgenommen in Sample buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 M NaCl), bindet aufgrund der hohen NaCl-Konzentration an das Oligothymidin der Zellulose. Nach Elution der mRNA mit Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) wurde die mRNA-Konzentration photometrisch (OD₂₅₈) bestimmt.

3.6 Erstellen einer cDNA-Bank

Für die cDNA-Synthese wurde das "SUPERSCRIPT Choice System for cDNA Synthesis" der Firma Life Technologies (Karlsruhe) verwendet. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese wurden 5 µg Poly(A)⁺-mRNA eingesetzt. Die Poly(A)⁺-mRNA wurde unter Verwendung von 1 µg Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primern sowie 150 ng Random Hexamer-Primern durch reverse Transkriptase in den ersten cDNA-Strang umgeschrieben. Als Primer für die Zweitstrangsynthese dienten kurze RNA-Stücke, die nach einem kontrollierten *RNase H*-Verdau der eingesetzten Poly(A)⁺-mRNA erhalten wurden und am cDNA-Erststrang verblieben. Nach der Synthese des zweiten Stranges wurden die Reaktionsansätze mit T4-DNA-Polymerase inkubiert, um klonierbare Enden

Methoden

der cDNA ohne einzelsträngige Nukleotidüberhänge zu schaffen. Durch eine Phenolbehandlung wurden die synthetisierten cDNA-Fragmente von Proteinen gereinigt und anschließend mit Ethanol präzipitiert. Da die cDNA-Fragmente in einen durch das Restriktionsenzym *EcoRI* gespaltenen Vektor kloniert werden sollten, wurden an die glatten Enden der cDNA-Fragmente *EcoRI*-vorgeschnittene Adaptoren ligiert und diese durch eine T4-Polynukleotid-Kinase an den Enden phosphoryliert. Danach wurden die cDNA-Fragmente mit Hilfe einer Sephacryl® S-500HR-Säule fraktioniert, wobei Fragmente kleiner als 500 Bp Länge sowie nichteingebaute Nukleotide und Adaptoren abgetrennt wurden. Die so aufbereiteten cDNA-Fragmente wurden in den *EcoRI*-vorgeschnittenen, dephosphorylierten Vektor pGAD10 ligiert und in *E. coli* ULTRAMAX™ DH5 α -FT™ transformiert. Um den Prozentsatz der Bakterien zu überprüfen, die den Vektor pGAD10 mit einem einklonierten cDNA-Fragment erhalten hatten, wurde Plasmid-DNA aus den transformierten DH5 α -FT™ isoliert und mit *EcoRI* testgespalten.

Der komplette Transformationsansatz wurde anschließend zur Amplifikation auf LB-Platten mit Ampicillin (50 μ g/ml) ausplattiert, alle Kolonien vereinigt und in 25% (v/v) Glycerol gelagert. Zur Testung im "Yeast One-Hybrid"-System wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des "QIAGEN Plasmid Prep Kit" isoliert.

IV. Ergebnisse

4.1 Herstellung einer cDNA-Bank aus HT3-Zellen

Die Expression der beiden frühen Gene E6 und E7 von HPV6a wird über die Bindung des viralen Proteins E2 an seine vier in der NCR gelegenen Bindestellen in den beiden Zelllinien RTS3b und HT3 unabhängig voneinander reguliert. RTS3b-Zellen zeigen ein E6/E7-Expressionsmuster, das demjenigen natürlich vorkommender, HPV6-infizierter Kondylome ähnelt. In Anwesenheit des E2-Proteins wird eine Aktivierung des E7-Promotors (P2) beobachtet, während gleichzeitig der E6-Promotor (P1) reprimiert wird. Die Aktivierbarkeit von P2 ist vorwiegend von der promotordistalen E2-Bindestelle (E2BS-1) abhängig, während die promotorproximalen E2-Bindestellen 3 und 4 die Repression des E6-Promotors vermitteln. Im Gegensatz zu RTS3b-Zellen ist in der Zelllinie HT3 eine Aktivierung des E6-Promotors im Kontext aller E2-Bindestellen zu beobachten, wobei keine E7-Transkripte nachweisbar sind. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass möglicherweise zelluläre Faktoren der Karzinom-Zelllinie HT3 an der Umkehrung der E2-vermittelten Repression zur Aktivierung beteiligt sind.

Um solche zellulären Proteine, die durch Bindung an die E2-Bindestellen oder deren unmittelbare Umgebung mit der Funktion von E2 interferieren, mit Hilfe des „Yeast One-Hybrid“-Systems zu identifizieren, wird eine cDNA-Fusionsbank der betreffenden Zelllinien benötigt, bei der die cDNA-Stücke als Fusionsprotein mit der aktivierenden Domäne von GAL4 (GAL4 AD) exprimiert werden. Als Grundlage für einen späteren Vergleich beider Zelllinien hinsichtlich solcher zellulärer Faktoren wurde mit Hilfe des „SUPERScript Choice System for cDNA Synthesis“ der Firma Life Technologies (Karlsruhe) für die vorliegende Arbeit eine cDNA-Bank der Zelllinie HT3 hergestellt.

Ergebnisse

Aus den Zellen der Zelllinie HT3 wurde gesamtzelluläre RNA extrahiert (siehe 3.5.1) und anschließend in zwei aufeinanderfolgenden Durchgängen Poly(A)⁺-mRNA mittels Oligo(dT)-Cellulose angereichert (siehe 3.5.2).

Der nachfolgenden cDNA-Synthese (siehe 3.6) wurden 1 μ Ci (α -³²P)dCTP zur radioaktiven Markierung zugegeben. Als Primer dienten sowohl Oligo(dT)- als auch Random Hexamer-Primer, um sowohl lange cDNA-Fragmente, ausgehend vom Poly(A)-Tail der mRNA, als auch kleinere Fragmente zu erhalten, bei denen auch 5'-Bereiche der mRNA in ausreichender Menge vertreten sind.

Um den Erfolg der Erststrangsynthese zu überprüfen, wurde die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Die Auswertung ergab einen Einbau der Radioaktivität von 6%, was deutlich unter der vom Hersteller angegebenen Ausbeute von zwischen 25%-60% bei der verwendeten Kontroll-Zelllinie HeLa lag. Zusätzlich wurde ein Aliquot auf ein 1,4-%iges Alkalisches Agarosegel aufgetragen, um den Größenbereich festzustellen, in dem der Hauptanteil der synthetisierten cDNA-Fragmente lag. Nach dem Lauf wurde das Gel getrocknet und für 3 Tage autoradiographiert.

Die synthetisierten Fragmente lagen in einem Größenbereich von ca. 500 nt bis 3000 nt, was etwa der Größenverteilung der RNA-Fragmente in humanen Zelllinien und damit den Erwartungen entspricht. Die Größenverteilung der synthetisierten cDNA-Fragmente ist in *Abb. 7* dargestellt.

Nach der Zweitstrangsynthese wurden die Enden der synthetisierten cDNA-Fragmente mit T4-Polymerase behandelt und an die stumpfen Enden der cDNA-Fragmente *Eco*RI-vorgeschnittene Adaptoren für die Ligation in den Vektor pGAD10 angefügt.

Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* ULTRAMAX™ DH5 α -FT™ transformiert und zur Amplifikation vollständig auf LB-Agar ausplattiert.

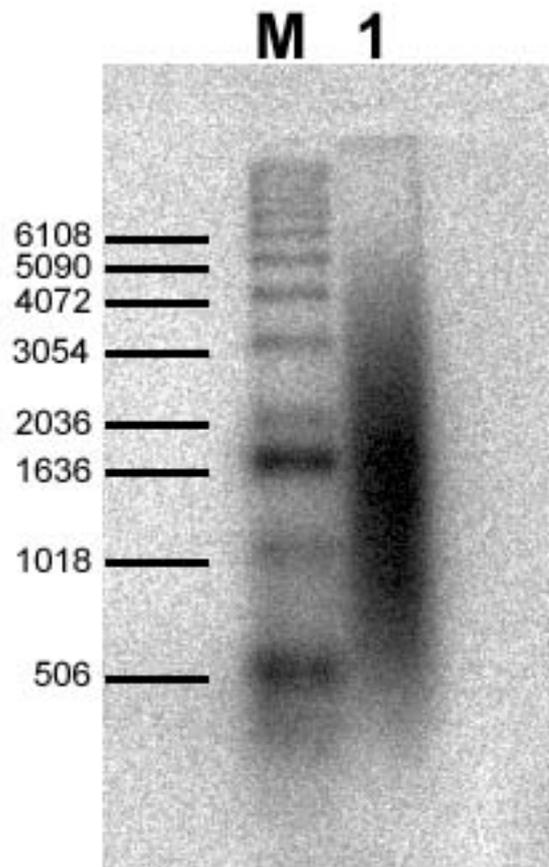


Abb. 7: Größenverteilung der cDNA-Fragmente aus Zellen der Linie HT3

Spur 1 zeigt die cDNA aus Zellen der Linie HT3. In Spur M ist der DNA-Größenstandard gezeigt, die Fragmentgrößen des Standards sind in kBp aufgeführt. Der Hauptanteil der Fragmente lag in einem Bereich von ca. 500 nt bis ca. 3000 nt.

Da bei der Klonierung in den Vektor sowohl alle drei Leseraster als auch beide Orientierungen des Fragments im Vektor gleich wahrscheinlich sind, kann nur 1/6 aller klonierten cDNA-Fragmente potentiell für ein Fusionsprotein kodieren. Eine cDNA-Bank sollte daher eine möglichst große Zahl an unabhängigen Klonen enthalten, damit auch cDNA von Transkripten enthalten ist, die nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen. Enthält eine cDNA-Bank mindestens 10^6 unabhängige Klone, kann sie als ausreichend betrachtet werden.

Ergebnisse

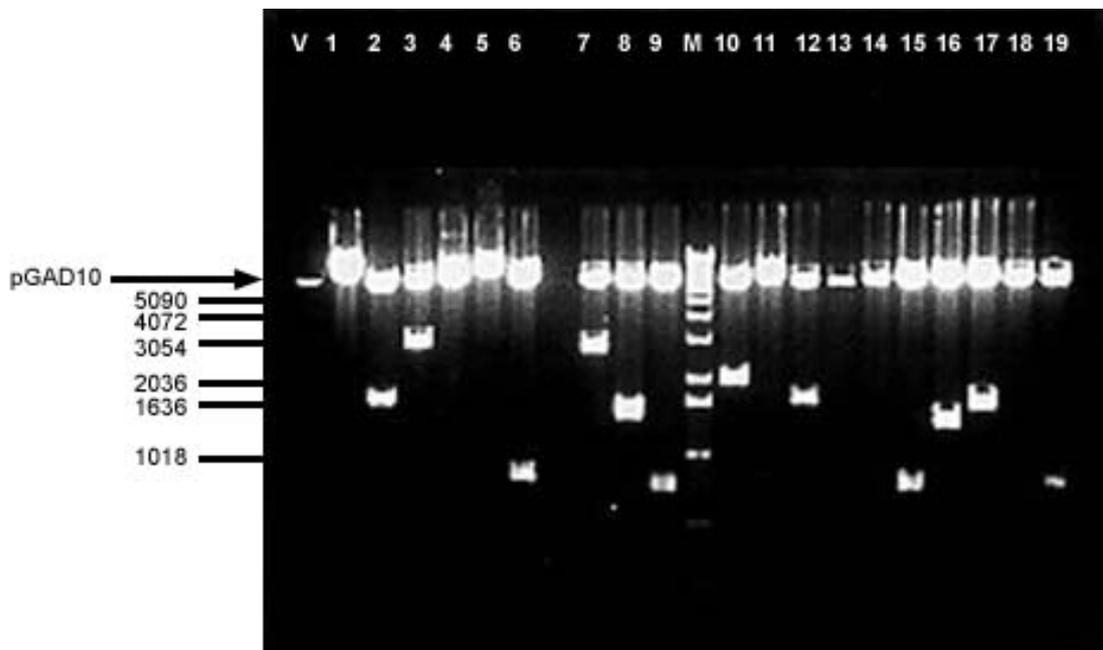
Die Bestimmung des Prozentsatzes unabhängiger Klone ergab eine Diversität von $2 - 5 \times 10^{12}$ unabhängigen Klonen und kann daher als gut bezeichnet werden.

Ein weiteres Kriterium für die Qualität einer cDNA-Bank ist der Prozentsatz der Klone, die ein cDNA-Fragment tragen. Hierfür wurde Plasmid-DNA aus 19 beliebigen Klonen isoliert, die cDNA-Fragmente mit *EcoRI* freigespalten und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Um eine gute Qualität der cDNA-Bank zu gewährleisten, sollte der Anteil der Klone, die ein cDNA-Fragment tragen, mindestens 2/3 betragen. Bei der erstellten cDNA-Bank von HT3 war dieses Kriterium mit 63,2% (12/19) erfüllt.

Bei einer weiteren Untersuchung der 12 cDNA-tragenden Klone zur Bestimmung unabhängiger Klone mittels Verdau mit dem Restriktionsenzym *RsaI* bzw. einem Doppelverdau *EcoRI/RsaI* ergaben sich keine Übereinstimmungen und somit ausschließlich individuell verschiedene Klone, was ebenfalls für eine gute Qualität der cDNA-Bank spricht.

Die Ergebnisse zeigen die *Abbildungen 8a-c*:

Abb. 8a: Restriktionsverdau *EcoRI*



Ergebnisse

Abb 8b: Doppelverdau *EcoRI* / *RsaI*

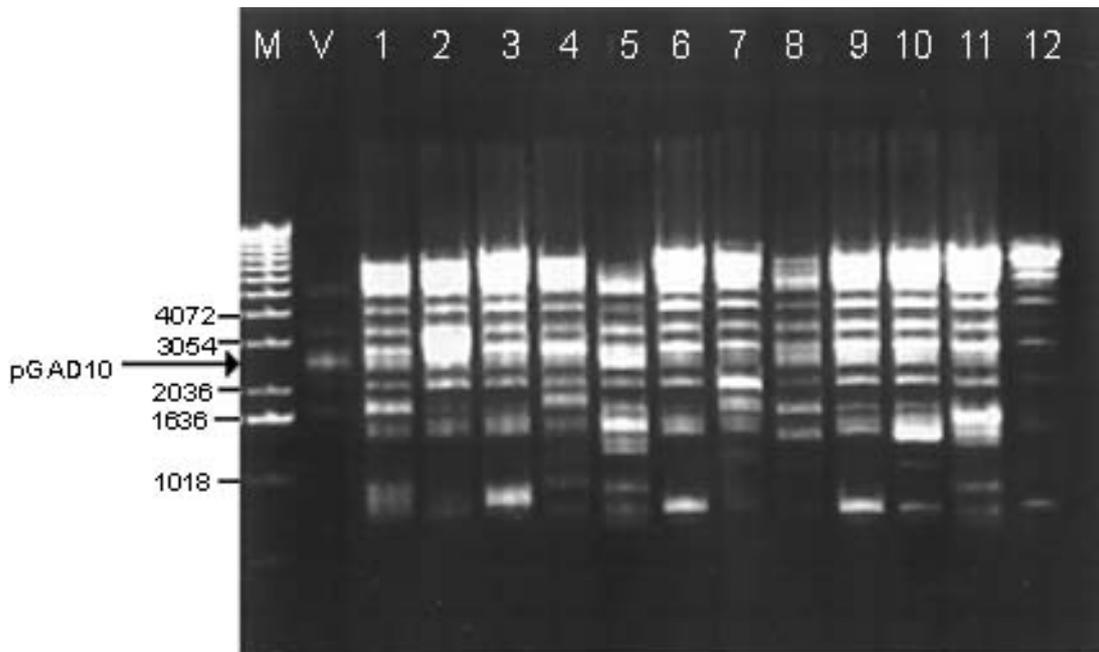


Abb. 8c: Restriktionsverdau *RsaI*

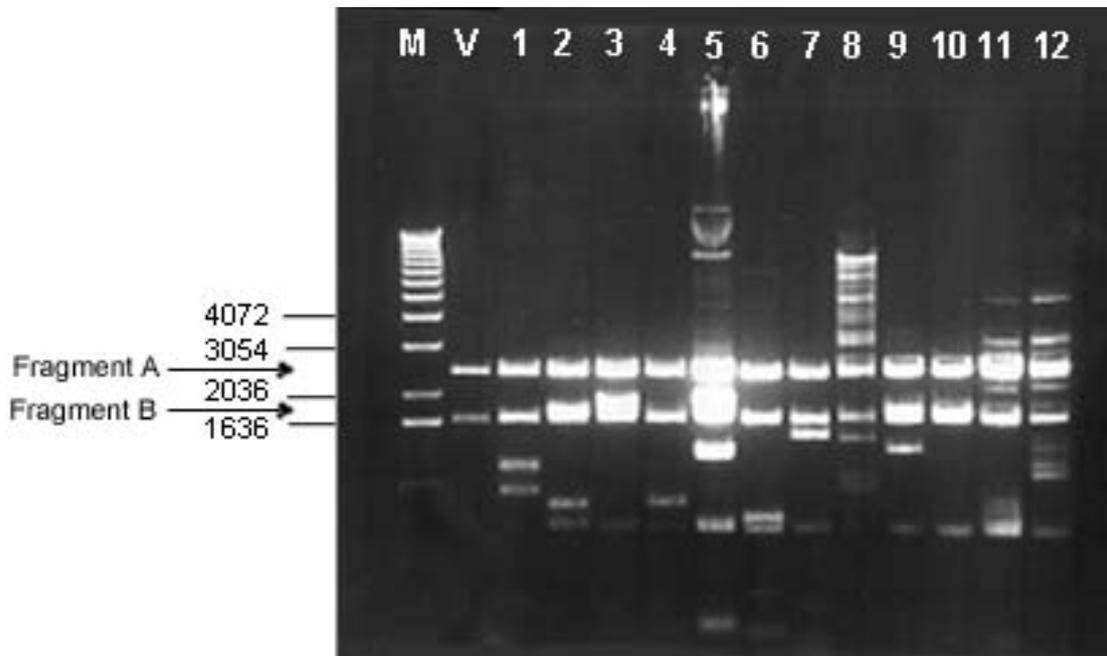


Abb. 8: (a) Die Spuren 1-19 zeigen *EcoRI*-Restriktionsverdau der Klone 1-19. (b,c) Die Spuren 1-12 zeigen Testverdau der inserttragenden Klone aus Abb. 8(a) mit *EcoRI* / *RsaI* bzw. *RsaI*.

In Spur M ist jeweils der DNA-Größenstandard gezeigt, die Fragmentgrößen des Standards sind in kbp aufgeführt. Spur V zeigt jeweils den leeren Vektor pGAD10 im entsprechenden Verdau.

4.2 Prinzip des „Yeast One-Hybrid“-Systems

Mit dem „Yeast One-Hybrid“-System können *in vivo* über die Aktivierung von Reportergenen spezifische DNA-Bindungen von Proteinen an bestimmte DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

Das Prinzip des „Yeast One-Hybrid“-Systems beruht auf der Tatsache, dass viele eukaryote Transkriptionsfaktoren aus strukturell und funktional voneinander unabhängigen DNA-bindenden und aktivierenden Domänen aufgebaut sind. Daher ist es möglich, beide Domänen unabhängig voneinander zu exprimieren und gegebenenfalls unterschiedliche Domänen zu einem neuen Fusionsprotein zu kombinieren. Wird dieses Fusionsprotein in Hefezellen exprimiert, kann einerseits die DNA-bindende Domäne an eine DNA-Erkennungssequenz binden und gleichzeitig die aktivierende Domäne die Transkription eines Reportergens aktivieren. Wird hierbei eine bekannte aktivierende Domäne als Fusionsprotein mit einem fraglich DNA-bindenden Protein exprimiert, kann im Falle einer DNA-Bindung diese über die Aktivierung des Reportergens nachgewiesen werden. Erfolgt keine Bindung, kommt es zu keiner räumlichen Nähe zwischen aktivierender Domäne und Promotor des Reportergens und somit zu keiner Aktivierung der Transkription.

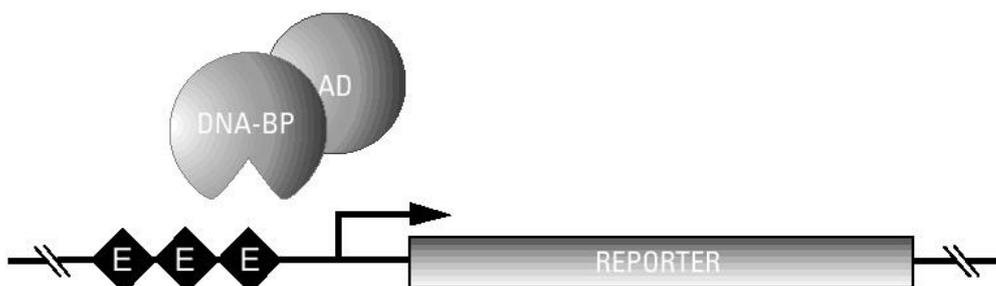


Abb. 9: Prinzip des „Yeast One-Hybrid“- Systems (aus: „MATCHMAKER One-Hybrid System User Manual“, Clontech). In der Testung wird das DNA-bindende Protein (DNA-BP) durch das zu testende, fraglich DNA-bindende Protein ersetzt. Findet eine DNA-Bindung statt, wird über die aktivierende Domäne (AD) die Expression des Reportergens vermittelt. Die klonierten DNA-Erkennungssequenzen sind mit „E“ angegeben.

Ergebnisse

Zum Nachweis der spezifischen DNA-Bindung eines Proteins muss ein Reportergenkonstrukt hergestellt werden, das die fragliche DNA-Zielsequenz vor einem Reporter gen enthält.

Hierzu wird ein Oligonukleotid mit der entsprechenden DNA-Zielsequenz hergestellt und als Dreifachkopie vor den das Reporter gen kontrollierenden Promotor in einen Vektor integriert. Dieser wird anschließend linearisiert und in Hefezellen transformiert. Über homologe Rekombination des linearisierten Vektors mit den entsprechenden Genloci der Hefen wird der Vektor mit der Zielsequenz ins Hefegenom integriert.

Der zur Transformation verwendete Hefestamm weist einen Defekt in der Histidinbiosynthese auf. Erst nach Integration des Vektors in das Genom erhält der Hefestamm die Fähigkeit, Histidin zu synthetisieren. Die entstandenen Transformanten können somit auf Histidin-Mangelmedium selektioniert werden. Um eine weitere Kontrollmöglichkeit für die spezifische DNA-Bindung zu haben, wird als zusätzliches Reporter gen *lacZ* in den Hefestamm integriert, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Der verwendete Hefestamm ist für die Synthese von β -Galactosidase ebenfalls defizient, so dass die entsprechende Enzymaktivität als Selektionsmarker verwendet werden kann.

Um eine DNA-Bindung nachweisen zu können, wird das fragliche Protein als Fusionsprotein mit der aktivierenden Domäne von GAL4 (GAL4 AD), einem hefespezifischen Transkriptionsfaktor, exprimiert. Hierzu werden die cDNA-Stücke einer cDNA-Bank in den Vektor pGAD10 kloniert, der für die GAL4 AD kodiert. Die Klonierung erfolgt direkt stromaufwärts des für die GAL4 AD kodierenden Bereichs, so dass ein Fusionsprotein von GAL4 AD und cDNA-Fragment entsteht. Der Expressionsvektor wird nun in den rekombinanten Hefestamm transformiert und auf dem entsprechenden Selektivmedium ohne Histidin (-His) ausplattiert. Findet eine Interaktion im Sinne einer Bindung des Fusionsproteins an die DNA-Zielsequenz statt, kommt es zur Expression des Reporter gens, so dass ein Koloniewachstum auf dem entsprechenden Selektivmedium möglich ist bzw. die β -Galactosidase-Aktivität über entsprechende Assays nachgewiesen werden kann.

4.2.2 Integration der E2-Zielsequenz in Reportervektoren

Das Oligonukleotid sollte vor dem Promotor des Reportergens in den entsprechenden Reportervektor integriert werden. Als Reportervektoren wurden pHISi-1 und pLacZi aus dem MATCHMAKER „One-Hybrid“-System der Firma Clontech (Heidelberg) verwendet (siehe auch 2.4.3). pHISi-1 enthält *HIS3* als Reportergen, das unter der Kontrolle des Minimal-Promotors für den *HIS3*-Lokus steht (P_{minHIS}). pLacZi enthält *lacZ* als Reportergen, das über den Minimal-Promotor für das Hefe-Zyclin-Gen 1 (P_{CYC1}) reguliert wird.

Es handelt sich bei beiden Vektoren um Minimalpromotoren, die auch ohne Aktivierung eine geringe Basalaktivität der Expression zeigen. Im Fall von P_{minHis} ist diese geringe Aktivierung ausreichend für eine Selektion auf Integration des Vektors auf entsprechendem Mangelmedium, kann bei der Testung auf Interaktion aber durch Zugabe von 3-Aminotriazol (3-AT) zum Medium unterdrückt werden (siehe auch 4.2.4).

Beide Vektoren tragen ein Ampicillin-Resistenzgen, das zur Selektion bei der Vermehrung in *E. coli* dient.

Die Klonierung des Oligonukleotids mit der E2-Zielsequenz erfolgte über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* (pHisi-1) bzw. *EcoRI* und *SaI* (pLacZi). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und auf LB-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin ausplattiert. Als Negativkontrolle für die Ligation diente ein Religationsansatz der verwendeten Vektoren, dem kein Oligonukleotid zugegeben wurde.

Die erfolgreiche Klonierung der Oligonukleotide wurde durch geeignete Testspaltungen zur Insertfreispaltung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* (pHisi-1) bzw. *NcoI* und *BamHI* (pLacZi) überprüft und durch Sequenzierung bestätigt.

4.2.3 Integration des Reportervektors mit integrierter E2-Zielsequenz in *S. cerevisiae*

Zur Testung im „Yeast One-Hybrid“-System müssen die Reportergenkonstrukte ins Genom der Hefen integriert werden.

Als Selektionsmarker für die Integration der Vektoren in *S. cerevisiae* dienen die Aminosäuren Histidin (pHisi-1) bzw. Uracil (pLacZi), für die der verwendete Hefestamm YM4271 auxotroph ist. Die Integration der Vektoren erfolgte nach Linearisierung der betreffenden Plasmide mit den Restriktionsenzymen *XhoI* (pHisi-1) bzw. *NcoI* (pLacZi) über homologe Rekombination in die entsprechenden Loci des Hefegenoms.

Die Integration der beiden Reportergerkonstrukte erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Transformationen. Zuerst wurde pHisi-1 in den *HIS3*-Locus der Hefen integriert. Die erhaltenen Transformanden wurden über Selektivmedium ohne Histidin selektiert. Die geringe Basalaktivität des Minimalpromotors ist hierbei ausreichend, um ein geringes Wachstum auf histidinfreiem Mangelmedium auch ohne Aktivierung zu ermöglichen.

Im darauffolgenden Schritt wurde pLacZi in den *URA3*-Locus der Hefen integriert. Die erhaltenen Transformanden, die beide Reportergerkonstrukte tragen, wurden auf Selektivmedium ohne Histidin und Uracil (-His/-Ura) selektiert.

Als Negativkontrolle für die homologe Rekombination wurde jeweils der ungeschnittene Vektor verwendet.

4.2.4 Überprüfung der Basalaktivität des Reportergens *HIS3* in *S. cerevisiae*

Für eine Verwendung von *HIS3* als Reporterger ist es unerlässlich, zwischen geringer Basalaktivität und Aktivierung zu unterscheiden. Daher wurde dem histidinfreien Selektivmedium 3-Aminotriazol (3-AT), ein kompetitiver Inhibitor des *HIS3*-Proteins der Hefen (Durfee *et al.*, 1993; Fields, 1993), zugesetzt. 3-AT wird dafür verwendet, geringe Mengen von *HIS3*-Protein zu inhibieren, das aufgrund der geringen Basalaktivität exprimiert wird. Damit ist es möglich, das Hintergrundwachstum auf histidinfreiem Selektivmedium zu unterdrücken.

Um die optimale 3-AT-Konzentration zu bestimmen, bei welcher die von einer Interaktion unabhängige *HIS3*-Expression und damit das Wachstum der Hefen gerade vollständig unterdrückt wird, wurden mehrere rekombinante Hefeklone

Ergebnisse

gepickt und auf histidinfreiem Selektivmedium mit steigenden Konzentrationen von 3-AT (0, 15, 30, 45, 60 mM) ausplattiert.

Die Ergebnisse der Titration zeigt die folgende Tabelle:

Tab. 3: Wachstum rekombinanter Hefen auf Selektivmedium

Aufgetragen ist das Wachstum der einzelnen Klone (2.1-2.3, 3.1-3.3) auf histidinfreiem Selektivmedium in Anwesenheit steigender Konzentrationen von 3-AT.

+++	zahlreiche Kolonien pro Platte
+	wenige Kolonien pro Platte
(+)	vereinzelt Wachstum von Kolonien
-	kein Wachstum
v	<i>Die Platte des Klons 3.3 mit der 3-AT-Konzentration von 15 mmol wurde wegen Kontamination verworfen</i>

Konzentration 3-AT [mM]	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
15	+	+	(+)	-	-	v
30	-	+	-	-	-	+
45	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-

Es wurde mit Klon 2.1 ein Hefeklon ausgewählt, der bei 0 mM 3-AT gutes Wachstum, bei 15 mM nur noch Wachstum weniger Kolonien und bei allen höheren Konzentrationen kein Wachstum mehr zeigte und folglich eine geringe Basalaktivität aufwies.

4.2.5 Suche nach zellspezifischen Proteinen der Zelllinie HT3, die mit den E2-Bindestellen 3 und 4 von HPV6 interagieren

Für die Suche nach HT3-zellspezifischen Proteinen wurde der in IV.2.4 ausgewählte Hefeklon mit 10 µg der erstellten cDNA-Bank der Karzinom-Zelllinie HT3, deren cDNA-Stücke in den Expressionsvektor pGAD10 kloniert vorlagen, nach der Lithiumacetat-Methode (siehe 3.3.2) transformiert. Der Vektor pGAD10 gewährleistet die Expression von Fusionsproteinen aus den cDNA-Fragmenten und der GAL4 AD. Über Expression der Reportergene kann die Interaktion eines Proteins aus der cDNA-Bank mit den E2-Konsensussequenzen erkannt werden.

Der Transformationsansatz wurde auf Selektivmedium ohne Leucin zur Bestimmung der Transformationseffizienz sowie auf Selektivmedium ohne Leucin und Histidin zur Selektion von Klonen mit positiver Protein-DNA-Interaktion ausplattiert. Das Selektivmedium ohne Leucin und Histidin enthielt 10 mM 3-AT, um unspezifisches Wachstum zu unterbinden. Die 3-AT-Konzentration wurde hierbei bewusst unter der für den verwendeten Hefeklon optimalen Konzentration von 20 mM gewählt, um das durch die Integration der Reportervektoren sehr langsame Wachstum der Hefen zu beschleunigen. Da es sich bei der Selektion über Histidin-Mangelmedium um eine qualitative Vorselektion der Transformanden handelte, die anschließend mittels der Testung der β -Galactosidase-Aktivität quantifiziert werden sollte, war ein gewisses Hintergrundwachstum tolerierbar, das zudem durch die selektive Weiterverwendung ausschließlich größerer Kolonien berücksichtigt wurde.

Die Transformationseffizienz betrug 3×10^2 Transformanden/ μg eingesetzte DNA, was deutlich unter der vom Hersteller empfohlenen Transformationseffizienz von mindestens 10^4 Transformanden/ μg eingesetzte DNA lag. Da der zeitliche Rahmen der vorliegenden Arbeit begrenzt war und auch in weiteren Testtransformationen die geforderte Effizienz nicht erreicht wurde, wurde dieser Ansatz als Vorselektion toleriert und trotz der nicht optimalen Effizienz weiter bearbeitet.

Nach einer Inkubationszeit von sechs Tagen zeigten sich neben einem Anteil geringfügigen Hintergrundwachstums (Kolonien $<0,5$ mm) einige entscheidend größere Kolonien (>2 mm). Davon wurden 85 unabhängige Transformanden auf Platten mit Selektivmedium ohne Leucin und Histidin überimpft. Hierbei konnte das Wachstum von 67 Klonen reproduziert werden.

4.2.6 Überprüfung der gefundenen Interaktionen im ONPG-Test

Als weitere Kontrollmöglichkeit für die spezifische DNA-Bindung wurde zusätzlich zu *HIS3* auch *lacZ* als Reportergen in das Genom von *S. cerevisiae* integriert. *LacZ* kodiert für das Enzym β -Galactosidase, dessen Aktivität quantitativ im ONPG-Test nachgewiesen werden kann.

Ergebnisse

Die Hefekolonien, die zuvor auf Selektivmedium ohne Leucin und Histidin gewachsen waren, wurden zur quantitativen Bestimmung der Interaktionsstärke zwischen DNA-bindendem Protein und DNA-Zielsequenz im ONPG-Test herangezogen (siehe 3.3.4).

Insgesamt wurden 52 Klone getestet. Der ONPG-Test wurde jeweils dreifach durchgeführt und die Zahlenwerte gemittelt. Als Negativkontrolle diente der nicht mit cDNA transformierte Hefeklon [2.1].

Die Ergebnisse des ONPG-Tests zeigt *Abb. 12*.

Die HT3-Klone Nr. 1-8, 10 und 11 wurden aufgrund nicht valider Negativkontrolle und im Vergleich mit den absoluten Aktivitäten der weiteren Klone nicht erhöhter β -Galactosidase-Aktivität nicht im Diagramm aufgeführt und nicht weiter bearbeitet. Da der zeitliche Umfang der vorliegenden Arbeit begrenzt war, wurde keine erneute Testung der betreffenden Klone durchgeführt.

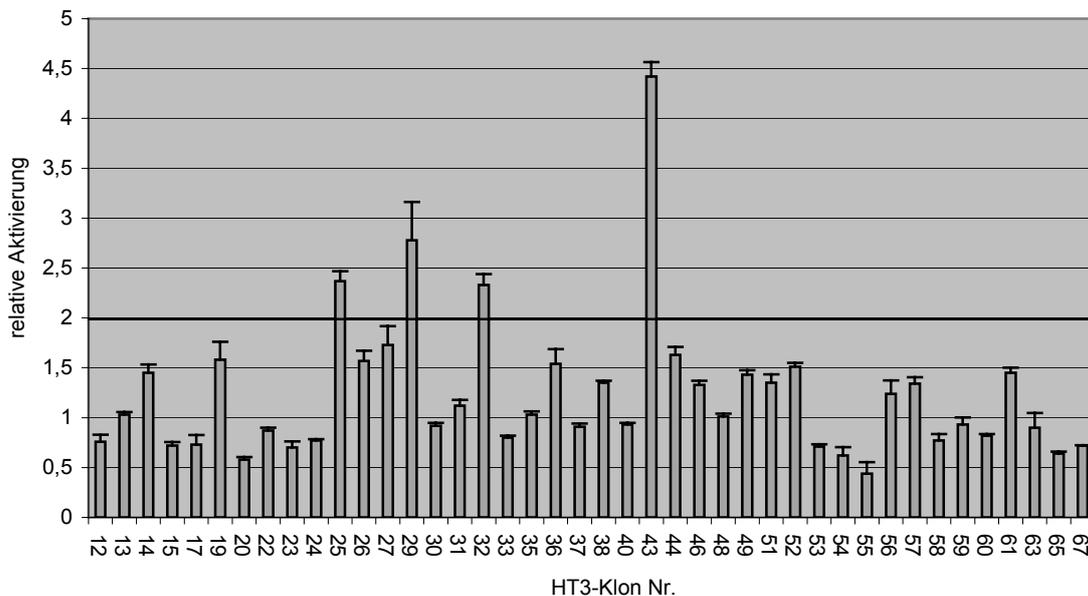


Abb. 11: Quantitative Bestimmung der Interaktionsstärke im ONPG-Test

Die β -Galactosidaseaktivität der Klone wurde nach Dreifachbestimmung im Verhältnis zur Negativkontrolle (Aktivierung = 1) aufgetragen. Die Standardabweichungen sind jeweils als Balken angegeben. Die Obergrenze des Normbereichs ist durch einen Querbalken markiert.

Ergebnisse

Von den verbleibenden 42 getesteten Klonen zeigten 4 eine Aktivierung, die oberhalb des Normbereiches lag, der als Aktivierung bis zum Zweifachen der Negativkontrolle definiert wurde. Dies waren im Einzelnen:

HT3- Klon Nr.	relative Aktivierung (x-fach)	Standardabweichung
25	2,37	0,097
29	2,78	0,383
32	2,33	0,108
43	4,42	0,145

4.2.7 Isolierung der Plasmid-DNA aus den ausgewählten Hefeklonen

Zur weiteren Analyse der ausgewählten Klone wurde Plasmid-DNA aus den Hefen isoliert (siehe 3.3.5). Die entsprechenden Klone wurden hierzu in Flüssigmedium ohne Leucin angezogen.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde zur Amplifikation in *E. coli* DH5 α transformiert und aus den rekombinanten Bakterien erneut Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.4.1).

4.2.8 Identifizierung der cDNA-Fragmente

Die ausgewählten Klone wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Die cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Primer *GAL4AD Sequencing Primer* bzw. *MATCHMAKER 5'AD LD-Insert Screening Amplimer* sowie *MATCHMAKER 3'AD LD-Insert Screening Amplimer* von beiden Seiten sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der *Genbank* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) auf Nukleotidebene (Programm blastn) verglichen.

Die Ergebnisse sind in *Tabelle 4* zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 4: Homologien der untersuchten cDNA-Sequenzen zu humanen Proteinen. Die Nomenklatur der Proteine folgt den Angaben des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. In Klammern ist jeweils die Erstreferenz angegeben. Die Länge der homologen DNA-Sequenz ist in Bp, die Homologie in Prozent angegeben. Die Position der gefundenen Homologie innerhalb des cDNA-Inserts ist mit „n“ (aminoterminal) bzw. „c“ (carboxyterminal) angegeben.

Klon Nr.	Name des Proteins (Referenz)	Länge in Bp (Homologie in %)
25	„Homo sapiens glioma tumor suppressor candidate region protein 2 (GLTSCR2)“ (Smith <i>et al.</i> , 2000)	n: 437/452 (96%) c: 285/287 (99%)
29	- (leerer Vektor pGAD10)	-
32	„Human p97 mRNA“ (Imataka <i>et al.</i> , 1997)	n: 557/572 (97%) c: 658/676 (97%)
43	„Homo sapiens paired-like homeodomain transcription factor 1 (Ptx1)“ (Crawford <i>et al.</i> , 1997)	n: 271/273 (99%)

4.2.9 Parallele Bearbeitung weiterer Klone unabhängig von ihrer β -Galactosidase-Aktivität

Parallel zur Bearbeitung der Klone mit erhöhter β -Galactosidase-Aktivität im ONPG-Test wurden unabhängig von ihrer β -Galactosidase-Aktivität einige zusätzliche Klone bearbeitet, die zuvor Wachstum auf Histidin-freiem Mangelmedium gezeigt hatten. Insgesamt wurden 34 weitere Klone sequenziert und die Sequenzen mit der *Genbank* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* verglichen.

Die Ergebnisse aller sequenzierten Klone sind in *Tabelle 5* zusammengefasst:

Ergebnisse

Tab. 5: Übersicht über die Homologien der sequenzierten cDNA-Inserts zu humanen Gensequenzen. Die Nomenklatur der Gensequenzen folgt den Angaben des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Im Falle mehrerer homologer Proteine sind die entsprechenden Synonyme vermerkt. In Klammern ist jeweils die Erstreferenz, nebenstehend zusätzlich die *NCBI Entrez Nucleotide Access No.* angegeben. Die Länge der homologen DNA-Sequenz ist in Bp, die Homologie in Prozent angegeben. Sofern nicht anders vermerkt, handelt es sich um Homologien im n-terminalen Bereich des cDNA-Inserts, ansonsten ist die Position der gefundenen Homologie innerhalb des cDNA-Inserts mit „n“ (aminoterminal) bzw. „c“ (carboxyterminal) angegeben.

Die Orientierung der Inserts ist mit „sense“ (5'-3') bzw. „invers“ (3'-5') angegeben; bei „sense“-Orientierung wurde zusätzlich die Korrektheit des Leserahmens überprüft bzw. - bei Homologien außerhalb des kodierenden Bereichs - die Lokalisation relativ zum kodierenden Bereich angegeben. Bei Genen ohne bekannte für Proteine kodierende Bereiche wurde der Nukleotidbereich der gefundenen Sequenzhomologie des entsprechenden Gens angegeben.

In allen Fällen wurde - unabhängig von der Orientierung des Inserts - der durch die Klonierung der Inserts in den Vektor entstandene Leserahmen überprüft und die Position des ersten im Leserahmen auftretenden Stopcodons als „in-frame Stopcodon nach x Aminosäuren (AS)“ angegeben. Bei korrekter Orientierung und korrektem Leserahmen innerhalb eines kodierenden Genbereichs wurde stattdessen „ORF“ (offener Leserahmen) vermerkt.

Grau unterlegte Nummern markieren diejenigen Klone, welche im ONPG-Test eine signifikant erhöhte β -Galactosidase-Aktivität zeigten.

Weitere verwendete Abkürzungen: H.s.: Homo sapiens, 5'-UTR: untranslatierte Region im 5'-Bereich des Gens

Ergebnisse

Klon Nr.	Access No. (Version)	cDNA-Insert	Länge in Bp/ Homologie in %	Orientierung	Leserahmen/ Genbereich	in-frame Stopcodon
1	AC000076.2	"H.s. Chromosom 22q11.2 Cosmid Clone 2h In DGCR Region" (Budarf and Emanuel, unveröffentlicht)	418/434 (96%)	invers	-	11 AS
3	AY195775.1	"H.s. haplotype E1H mitochondrion" (Mishmar <i>et al.</i> , 2003)	421/428 (98%)	invers	-	58 AS
4	X76400.2 AF060231.1 NIM_002855.2	"H.s. mRNA for nectin 1 (PRR1 gene)" (Lopez <i>et al.</i> , 1995) "H.s. herpesvirus entry protein C (HVEC)" (Geraghty <i>et al.</i> , 1998) "H.s. poliovirus receptor-related 1 (PVRL1)" (Yoon and Spear, 2002)	331/338 (97%)	sense	in-frame: ORF	-
6	BC014861.1	"H.s. actin, beta, clone MGC: 8968 IMAGE:3870487" (Strausberg, direct submission)	276/293 (94%)	invers	-	direkt nach Adapter
7	NIM_002812.2	"H.s. proteasome (prosome, macropain) 26s subunit, non-ATPase, 8 (PSMD8)" (Coux <i>et al.</i> , 1996)	324/351 (97%)	invers	-	12 AS
9	AC006285.13	"H.s. Chromosome 22 clone p1087110 map 22q11" (Fang <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	429/435 (98%)	invers	-	9 AS
10	NIM_138323.1 AC023024.6	"H.s. paired basic amino acid cleaving system 4 (PACE4), transcript variant 5" (Tsuji <i>et al.</i> , 2003) "H.s. clone RP11-299G20" (Birren <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	380/388 (97%) 313/319 (98%)	invers sense	- 154851-155169	16 AS

Ergebnisse

Klon Nr.	Access No. (Version)	cDNA-Insert	Länge in Bp/ Homologie in %	Orientierung	Leserahmen/ Genbereich	in-frame Stopcodon
13	NM_005722	„H.s. ARP2 actin-related protein 2 homolog (Yeast) (ACTR2)“ (Caron, 2003)	398/402 (99%)	sense	downstream d. bekannten kodierenden Bereichs	20 AS
14	AC020779.10	„H.s. chromosome 15, clone RP11-2117“ (Birren <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	456/466 (97%)	sense	136050- 136515	8 AS
15	AF056320.1	„H.s. inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase (IPFK-2)“ (Chesney <i>et al.</i> , 1999)	395/408 (96%)	sense	downstream d. bekannten kodierenden Bereichs	37 AS
16	AC004520.2	„H.s. BAC clone CTB-119C2 from 7“ (Sulston and Waterston, 1998)	391/404 (96%)	sense	131971- 132474	8 AS
	BC000506.2	„H.s. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1“ (Strausberg <i>et al.</i> , 2002)	391/404 (96%)	invers	-	
17	NM_014014.1	„H.s. U5 snRNP-specific protein, 200 kD (U5-200 kD), mRNA“ (Lauber <i>et al.</i> , 1996)	381/398 (96%)	invers	-	22 AS
19	BC017712.1	„H.s. cleavage stimulation factor, 3'-pre-RNA, subunit 2, 64 kD, clone MGC:21255 IMAGE:4447470“ (Strausberg, direct submission)	114/128 (89%)	invers	-	mind. 48 AS (dann Sequenz nicht mehr sicher beurteilbar)
21	AY195792.1	„H.s. haplotype As9Y mitochondrion“ (Mishmar <i>et al.</i> , 2003)	268/276 (97%)	invers	-	Anfang der Sequenz nicht sicher beurteilbar

Ergebnisse

Klon Nr.	Access No. (Version)	cDNA-Insert	Länge in Bp/ Homologie in %	Orientierung	Leserahmen/ Genbereich	in-frame Stopcodon
22	Y000052.1	"Human mRNA for T-cell cyclophilin" (Haendler <i>et al.</i> , 1987)	420/424 (99%)	invers	-	23 AS
	NIM_021130.1	"H.s. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A" (Bose <i>et al.</i> , 2003)				
25	BC010095.1	"H.s. glioma tumor suppressor candidate region protein 2 (GLTSCR2)" (Smith <i>et al.</i> , 2000)	n: 437/452 (96%) c: 285/287 (99%)	sense	frame-shift	27 AS
28	D23661.1	"H.s. mRNA for ribosomal protein L37" (Kato, unveröffentlicht)	303/304 (99%)	invers	-	6 AS
29	-	- (leerer Vektor pGAD10)	-	-	-	-
32	U73824.1	"Human p97 mRNA" (Imataka <i>et al.</i> , 1997)	n: 557/572 (97%) c: 658/676 (97%)	sense	2 in-frame Stopcodons in der 5'-UTR	30 AS
34	XM_113714.4	"H.s. density-regulated protein (DENR)" (International Human Genome Sequencing Consortium, unveröffentlicht)	253/255 (99%) u. 55/56 (98%) (gap)	invers	-	9 AS
	AC027290.31	"H.s. 12 BAC RP 11-463012 (Muzny <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	253/255 (99%) u. 55/56 (98%) (gap)	sense	158569-158823 u.158872-158927	
38	BC007201.1	"H.s. clone IMAGE:2961284, mRNA" (Strausberg, direct submission)	58/72 (80%)	invers	-	Sequenz nicht sicher beurteilbar
	AC009955.4	"H.s. BAC clone RP11-256I23 from 2" (Sulston and Waterston, 1998)	58/72 (80%)	sense	32711-32782	

Ergebnisse

Klon Nr.	Access No. (Version)	cDNA-Insert	Länge in Bp/ Homologie in %	Orientierung	Leserahmen/ Genbereich		in-frame Stopcodon
39	BC002661.1	"H.s. keratin 13, clone MGC: 3781 IMAGE: 3610361" (Strausberg, direct submission)	398/411 (96%)	invers	-	mind. 52 AS (dann Sequenz nicht mehr sicher beurteilbar)	
42	AC005081.3 BC010021.1	"H.s. BAC clone CTA-270D13 from 7" (Sulston and Waterston, 1998) "H.s. similar to Williams-Beuren-Syndrome chromosome region 1, clone IMAGE: 2960402" (Strausberg, direct submission)	429/433 (99%) 429/433 (99%)	sense invers	176501-176933 -	4 AS	
43	NIM_002653.1	"H. s. paired-like homeodomain transcription factor 1 (Ptx1)" (Crawford <i>et al.</i> , 1997)	271/273 (99%)	sense	Stop-Codon in 5'-UTR	3 AS	
45	BC021983.1	"H.s. nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin), clone MGC:22736 IMAGE: 4106023" (Strausberg, direct submission)	422/428 (98%)	invers	-	34 AS	
46	AP001360.5	"H.s. genomic DNA, chromosome 11 clone: RP11-831A10" (Hattori <i>et al.</i> , 2000)	414/418 (99%)	invers	-	12 AS	
48	AY082894 U28946.1	"H.s. mutS homolog (E.coli) (MSH6) gene" (Rieder <i>et al.</i> , direct submission) "Human G/T mismatch binding protein (GTBP)" (Palombo <i>et al.</i> , 1995)	332/338 (98%)	sense	frame-shift	43 AS	

Ergebnisse

Klon Nr.	Access No. (Version)	cDNA-Insert	Länge in Bp/ Homologie in %	Orientierung	Leserahmen/ Genbereich	in-frame Stopcodon
50	XM_055013.6	"H.s. ubiquitin C (UBC)" (International Human Genome Sequencing Consortium, unveröffentlicht)	100/107 (93%)	invers	-	23 AS
	AC126309.8	„H.s. 12 BAC RP11-59202 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC library)“ (Muzny <i>et al.</i> , direct submission)	100/107 (93%)	sense	103985-104091	
51	AC012318.7	"H.s. chromosome 19 clone LLNLF-143B12" (DOE Joint Genome Institute and Stanford Human Genome Center, unveröffentlicht)	399/405 (98%)	sense	30397-30800	12 AS
	D85429.1	"H.s. gene for heat-shock protein 40" (Hata <i>et al.</i> , 1996)	399/405 (98%)	invers	-	
52	AL121790.4	"Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-35609 of library RPCI-11 from chromosome 14 of H.s." (Heilig <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	317/ 322 (98%) u.116/11 (100%) (overlap)	sense	121215-121536 u. 120618-120733	18 AS
	AF176112.1	"H.s. hepatocyte nuclear factor-3 alpha (HNF3A) gene, exon 2" (Navas <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	126/127 (99%) u.116/16 (100%) (overlap)	invers	-	
60	AF322220.1	"H.s. cervical cancer suppressor 3 mRNA" (Kim, unveröffentlicht)				
	AF328730.1	„H.s. CTCL tumor antigen HD-CL-08 mRNA“ (Eichmüller <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	414/418 (99%)	sense	in-frame: ORF	-
	BC019669.1	"H.s. eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1" (Strausberg, direct submission)				

Ergebnisse

Klon Nr.	Access No. (Version)	cDNA-Insert	Länge in Bp/ Homologie in %	Orientierung	Leserahmen/ Genbereich	in-frame Stopcodon
62	AF316873.1	„H.s protein kinase BRPK mRNA“ (Nakajima <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	404/411 (98%)	invers	-	21 AS
	NIM_032409.1	“H.s. PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)” (Unoki and Nakamura, 2001)	405/414 (97%)	sense	upstream des bekannten kodierenden Bereichs	
63	AK090466.1	“H.s. mRNA for FLJ00387 protein” (Jikuya <i>et al.</i> , 2002)	440/447 (98%)	sense	frame-shift	30 AS
65	AY249140.1	“H.s. cell-cycle and apoptosis regulatory protein 1 mRNA (CARP1)” (Rishi <i>et al.</i> , 2003)”	260/270 (96%) u. 31/32(96%) (gap)	sense	in-frame Stopcodon in der 5'-UTR	4 AS
	AF465616.1	“H.s. death inducer with SAP domain DIS mRNA” (Tian <i>et al.</i> , direct submission)	259/270 (96%) u. 31/32(96%) (gap)	sense		
66	BC008775.2	“H.s. nardilysin (N-arginine dibasic convertase)” (Strausberg <i>et al.</i> , 2002)	440/448 (98%)	invers	-	min.47, max.57 AS (Sequenz nicht eindeutig beurteilbar)
67	Z19574.1	“H.s. gene for cytokeratin 17” (Trojanovsky <i>et al.</i> , 1992)	398/407 (97%)	sense	frame-shift	16 AS

Ergebnisse

Alle weiteren, unabhängig von ihrer β -Galactosidase-Aktivität sequenzierten Klone enthielten ein kloniertes cDNA-Insert. Bei 9 der 32 Klone (28,1%) konnte ein cDNA-Insert in „sense“- (5'-3'-)Orientierung identifiziert werden, bei 14 Klonen (43,8%) lag ein Insert in inverser (3'-5'-)Orientierung vor. Bei 9 Klonen (28,1%) ergaben sich Homologien zu humanen Gensequenzen beider Orientierungen.

Zusammenfassend fanden sich bei insgesamt 36 untersuchten Klonen 12 Klone, die ein cDNA-Insert in „sense“-Orientierung (33,3%), 14 Klone, die ein Insert in inverser Orientierung (38,9%) und 9 Klone, die Homologien zu humanen Gensequenzen beider Orientierungen (25%) enthielten. Ein Klon enthielt lediglich den leeren Expressionsvektor (2,8%).

Bei der Überprüfung des korrekten Leserahmens konnte in 2 Fällen ein offener Leserahmen, der für ein bekanntes humanes Protein kodiert, identifiziert werden. Bei den verbleibenden 33 Klonen, die ein cDNA-Insert enthielten, zeigte sich ein innerhalb des Leserahmens gelegenes Stopcodon nach maximal 58 Aminosäuren.

V. Diskussion

Humane Papillomviren werden aufgrund ihres unterschiedlichen malignen Entartungsrisikos der induzierten Primärläsion in hoch-karzinogene („high-risk“) und niedrig-karzinogene („low-risk“) Virustypen eingeteilt (Munoz *et al.*, 2003). Das onkogene Potential der genitalen Papillomviren wird durch die Aktivität der viralen Onkogene E6 und E7 bestimmt, die bei HPV6 als Vertreter der niedrig-karzinogenen Virustypen über zwei unabhängige Promotoren reguliert werden. Die Regulation der beiden Promotoren erfolgt differentiell und zelltypspezifisch über den viralen Transkriptionsfaktor E2 und seine Bindung an spezifische Erkennungssequenzen in der nicht-kodierenden Region sowie durch zelluläre Proteine.

Vorhergehende Studien ergaben, dass das E2-Protein von HPV6 in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Aktivierungsmuster von E6 und E7 bewirkt. So zeigten RTS3b-Zellen in Anwesenheit von E2 ein E6/E7-Expressionsmuster, das demjenigen natürlich infizierter, gutartiger Kondylomata ähnelte. In Anwesenheit von E2 wurde eine zwei- bis fünffache Aktivierung des E7-Promotors (P2) beobachtet, während gleichzeitig der E6-Promotor (P1) auf 50% seiner Basalaktivität reprimiert wurde. Die Aktivierbarkeit des E7-Promotors war hierbei hauptsächlich von der promotordistalen E2-Bindestelle 1 (E2BS-1) abhängig, während die promotorproximalen E2-Bindestellen 3 und 4 die Repression des E6-Promotors vermittelten. Im Gegensatz zu RTS3b-Zellen wurde bei der Zelllinie HT3 eine Aktivierung des E6-Promotors im Kontext aller E2-Bindestellen beobachtet, wobei keine E7-Transkripte nachweisbar waren (Rapp *et al.*, 1997). Diese unterschiedliche E2-vermittelte Regulation der frühen Promotoren in den beiden Epithelzelllinien deutet auf eine Beteiligung zellulärer Faktoren hin, die durch Bindung an die E2-Bindestellen oder deren unmittelbare Umgebung mit der Funktion von E2 interferieren, durch sterische Behinderung die E2-vermittelte Repression verhindern und somit zu einer malignen Entartung benigner HPV-induzierter Läsionen beitragen könnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mittels des „Yeast One-Hybrid“-Systems (Wang und Reed, 1993) solche HT3-zellspezifischen Faktoren, die durch Bindung an die promotorproximalen E2-Bindestellen 3 und 4 mit E2 interferieren, identifiziert werden. Erst vor kurzem war mit Hilfe dieses Systems die Identifikation eines an eine E2-Bindestelle von HPV8 bindenden zellulären Proteins, dem papillomavirus-bindenden Faktor (PBF), gelungen (Boeckle *et al.*, 2002).

Für die Identifikation HT3-zellspezifischer Faktoren, die mit den promotorproximalen Bindestellen E2BS-3 und -4 von HPV6 interagieren, wurden Genabschnitte einer cDNA-Bank aus HT3-Zellen als Fusionsproteine mit der aktivierenden Domäne von GAL4 (GAL4 AD) exprimiert.

Die fraglichen E2-Bindestellen wurden vor den jeweiligen Minimalpromotor (P_{minHIS} bzw. P_{CYC1}) stabil in die Reporterkonstrukte pHisi-1 bzw. pLacZi integriert. Hierbei zeigte der Minimalpromotor für das *HIS3*-Reportergen (P_{minHIS}) in pHisi-1 eine geringfügige Basalaktivität, die durch Zugabe von 3-Aminotriazol (3-AT), das spezifisch in den Histidin-Stoffwechsel eingreift, zum Histidin-freien Selektivmedium unterdrückt werden kann.

Da in vorhergehenden Arbeiten trotz Zugabe großer Mengen an 3-AT, die deutlich über der vorher getesteten optimalen Konzentration lagen, Probleme mit einer starken unspezifischen Aktivierung des *HIS3*-Reportergens aufgetreten waren (Spaderna, 1998), wurde als weitere, unabhängige Möglichkeit, die spezifische Aktivierung der Reportergene nachzuweisen, das Reporterkonstrukt pLacZi mit *lacZ* als Reportergen, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert, herangezogen, das zudem eine quantitative Analyse der Aktivierung erlauben sollte.

Um unspezifisches Wachstum zu unterdrücken, wurden die Transformanden auf Histidin- und Leucin-freiem Medium unter Zugabe von 10 mM 3-AT selektioniert. Die 3-AT-Konzentration wurde hierbei bewusst unter der für den verwendeten Hefeklon optimalen Konzentration von 20 mM gewählt, um das durch die Integration der Reportervektoren sehr langsame Wachstum der Hefen zu beschleunigen. Da es sich bei der Selektion über Histidin-Mangelmedium um eine qualitative Vorselektion der Transformanden handelte, die anschließend

Diskussion

mittels der Testung der β -Galactosidase-Aktivität quantifiziert werden sollte, war ein gewisses Hintergrundwachstum tolerierbar, das zudem durch die selektive Weiterverwendung ausschließlich größerer Kolonien berücksichtigt wurde.

Bei einem erwarteten geringfügigen unspezifischen Hintergrundwachstum kleinerer Kolonien konnten einige entscheidend größere Kolonien identifiziert werden, deren Wachstum im Fall von 67 Klonen reproduziert werden konnte.

Diese wurden anschließend auf ihre Aktivität des *lacZ*-Reportergens getestet. Hierbei zeigten 4 Klone eine im Vergleich zum untransformierten Hefeklon signifikante Erhöhung der β -Galactosidase-Aktivität.

Drei dieser Klone enthielten Interaktoren mit großer Sequenzhomologie zu bekannten humanen Proteinen. Ein Klon jedoch enthielt trotz signifikanter Aktivierung des *lacZ*-Reportergens nur den leeren Vektor pGAD10 ohne cDNA-Insert.

Somit wurde trotz der Verwendung von zwei unabhängigen Reportersystemen bei mindestens einem Klon eine unspezifische Aktivierung sowohl im Sinne von Wachstum auf Selektionsmedium mit 3-AT als auch im Hinblick auf die β -Galactosidase-Aktivität beobachtet. Da eine solche unspezifische Promotoraktivierung des *HIS3*-Reportergens bereits in vorhergehenden Studien beobachtet wurde (Spaderna, 1998), wurde statt des von Spaderna verwendeten Reportervektors pHisi in der vorliegenden Arbeit der Reportervektor pHisi-1 ausgewählt, der sich durch eine im allgemeinen niedrigere Basalaktivität der *HIS3*-Expression auszeichnet.

Möglicherweise ist das hier verzeichnete unspezifische Wachstum des Klons auf die unter dem Konzentrationsoptimum gewählte 3-AT-Konzentration und das damit in gewissem Umfang zu erwartende unspezifische Hintergrundwachstum zurückzuführen, das aufgrund der nachfolgenden quantitativen Auswertung tolerierbar erschien. Dies erklärt jedoch nicht die signifikant erhöhte β -Galactosidase-Aktivität eines selektierten Klons, der nur den leeren Vektor pGAD10 enthielt. Eine Unterscheidung, ob es sich bei den gefundenen Aktivitätserhöhungen um die Folge einer spezifischen Interaktion eines DNA-bindenden Proteins mit der verwendeten DNA-Zielsequenz oder um eine unspezifische Promotoraktivierung handelt, war daher nicht möglich.

In Studien anderer Arbeitsgruppen, in denen mit Hilfe des „Yeast One-Hybrid“-Systems die Identifikation DNA-bindender Proteine gelang (Boeckle *et al.*, 2002), wurde neben deutlich höheren 3-AT-Konzentrationen von 75 mM eine höhere Kopienzahl (4-5 Kopien) der entsprechenden E2-Bindestelle vor das Reporterogen integriert, um eine stärkere Interaktion zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde nach Empfehlung der Herstellerfirma Clontech lediglich eine Dreifachkopie der gewünschten E2-Bindestellen vor dem Reporterogen integriert. Möglicherweise war die Möglichkeit einer spezifischen Bindung an die Zielsequenz daher schwächer als in anderen Studien und somit weniger deutlich von der Hintergrundaktivität zu unterscheiden.

Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass in anderen Studien, die erfolgreich das „Yeast One-Hybrid“-System verwendeten, ebenfalls eine Dreifachkopie der fraglichen Bindesequenz benutzt sowie auf Histidin- und Leucin-freiem Selektionsmedium mit nur 20 mM 3-AT und ohne zusätzliche Verwendung des *lacZ*-Reportergens selektiert wurde (Lopez *et al.*, 2000). Somit bleibt die Ursache der hier verzeichneten erhöhten Hintergrundaktivität unklar.

Eine weitere mögliche Erklärung für die erhöhte β -Galactosidase-Aktivität des leeren Expressionsvektors wäre der Verlust einer kodierenden Sequenz im Zuge des Transfers der Plasmide von den Hefen in Bakterien. So wäre es denkbar, dass zum Zeitpunkt der Testung ein entsprechender Vektor mit einem cDNA-Insert vorlag, der später im Rahmen der Umklonierung des Plasmids verloren wurde.

Weiterhin ist nicht vollständig auszuschließen, dass durch die niedrige Transformationseffizienz von 3×10^2 Transformanden/ μg eingesetzte DNA, welche deutlich unter der vom Hersteller empfohlenen Transformationseffizienz von mindestens 10^4 Transformanden/ μg eingesetzte DNA lag, eine zu geringe Anzahl von cDNA-Kotransformanden gescreent wurde und so möglicherweise kein interagierendes Protein identifiziert werden konnte. In diesem Fall würde es sich bei allen gefundenen Aktivitätserhöhungen lediglich um eine Aktivierung im Bereich der statistischen Streubreite handeln.

Im Falle einer lediglich unspezifischen Aktivierung der Reporterkonstrukte wären auch weitere Faktoren, die eine Interaktion verhindern, wie sterische

Diskussion

Behinderung der Interaktionsstellen des Fusionsproteins, fehlerhafte Faltung des Proteins oder Toxizität des exprimierten Proteins für die Zelle, denkbar.

Bei den gefundenen potentiellen Interaktoren der verbleibenden drei identifizierten Klone mit erhöhter *HIS3*- und *lacZ*-Reporteraktivität handelt es sich um Proteine aus verschiedenen Bereichen:

Ein Proteinfragment zeigte große Homologien zum humanen Protein „p97“, einem ubiquitär vorkommenden Translationsregulator mit großer Homologie zum carboxyterminalen Anteil des eukaryoten Translations-Initiationsfaktors (eIF) 4G. Dieser bildet gemeinsam mit den Faktoren eIF4A und eIF4E den Komplex eIF4F, der wesentlich an der cap-abhängigen und -unabhängigen Translationsinitiation beteiligt ist. p97 bindet an eIF4A und fungiert über Konkurrenz mit eIF4G als grundlegender Inhibitor sowohl von cap-abhängiger als auch cap-unabhängiger Translation.

p97 hat eine Gesamtlänge von ungefähr 3,8 kBp, von der ein Fragment von ca. 2,8 kBp (Pos. 87-2950) als cDNA-Insert identifiziert werden konnte. Dieses enthält den fast vollständigen für das p97-Protein kodierenden offenen Leseraster sowie stromaufwärts angrenzend ca. 75% der 5'-untranslatierten Region einschließlich zweier hochkonservierter Stop-Codons innerhalb des Leserasters. Die Translation des Proteins *in vivo* erfolgt AUG-unabhängig; die entsprechende Initiationsstelle liegt weiter stromabwärts an einem GUG-Codon (Pos. 307-309 der Referenz) (Imataka *et al.*, 1997; Yamanaka *et al.*, 1997). Für die Testung im „Yeast One-Hybrid“-System ist jedoch in der Regel die Expression eines Fusionsproteins für die Transaktivierung des Reportergens nach DNA-Bindung notwendig, die aufgrund der gefundenen Stop-Codons unwahrscheinlich ist. Somit kann primär nicht von einer spezifischen Aktivierung der Reportergene ausgegangen werden.

Ein weiteres Proteinfragment zeigte große Homologien zum „Pituitary homeobox Protein“ (Ptx1 oder Pitx1), einem Protein aus der Gruppe der Homeobox-Proteine, bei denen es sich um Transkriptionsfaktoren handelt, die an der Positiv- und Negativregulation von Zielgenen beteiligt sind. Die entsprechenden Gene enthalten eine hochkonservierte Sequenz von 180 Bp,

die sogenannte „Homeobox“, die für ein 60-AS-Protein, die sogenannte „Homeodomain“, kodiert. Letztere repräsentiert die DNA-bindende Domäne dieser Faktoren. Das „Pituitary homeobox Protein“ (Pitx1), ein humanes Homolog des murinen „*bicoid*-related pituitary homeobox“, ist als negativer Regulator an der Modulation der differentiellen Expression verschiedener Interferon-A-Gene durch spezifische Bindung an deren distales negativ-regulatorisches Element (DNRE) beteiligt. Es wird konstitutiv in Zelllinien transkribiert, die eine differentielle Expression von Interferon-(IFN)-A-Genen nach Virusinduktion aufweisen. Interferon vermittelt die antivirale Immunabwehr sowie die Immun- und Zellwachstumsregulation.

Eines der identifizierten Proteinfragmente zeigte große Homologien zu „GLTSCR2“ („glioma tumor suppressor candidate region 2“), einem Transkript, das auf dem q-Arm des humanen Chromosoms 19 lokalisiert ist. Dies ist eine Genregion, die bei Deletionen und Allelverlust häufig mit humanen diffusen Gliomata assoziiert ist (Smith *et al.*, 2000). Es handelt sich um ein Protein ohne signifikante Homologien zu bekannten Genen. Die genaue Funktion von „GLTSCR2“ ist bislang unbekannt; es wird jedoch ein möglicher Beitrag zur Tumorigenese durch Haploinsuffizienz oder Mutationen auf Intron- oder Promotorebene bzw. epigenetische Veränderungen wie z.B. DNA-Methylierung diskutiert.

Bei keinem der drei identifizierten Klone mit erhöhter β -Galactosidase-Aktivität war in der Bearbeitung der DNA-Sequenzen ein offener Leserahmen nachzuvollziehen. Bei zwei Klonen (Nr. 32 und Nr. 43) lagen Stop-Codons innerhalb des Leserahmens in der 5'-untranslatierten Region vor. Bei einem weiteren Klon (Nr. 25) war eine Verschiebung des Leserahmens nachvollziehbar. In allen drei Fällen konnte ein Stop-Codon innerhalb des Leserahmens im Bereich der ersten 30 Aminosäuren identifiziert werden. Die Expression eines Fusionsproteins ist somit unwahrscheinlich, so dass es sich bei den beobachteten erhöhten *HIS3*- und β -Galactosidase-Aktivitäten vermutlich um unspezifische Aktivierungen der Reportergene handelt.

Im Rahmen einer parallel durchgeführten Bearbeitung einiger zusätzlicher Klone unabhängig von ihrer β -Galactosidase-Aktivität wurden insgesamt 34 weitere Klone sequenziert. Hierbei konnte bei 9 Klonen (28,1%) ein cDNA-Insert in „sense“- (5'-3'-)Orientierung identifiziert werden, bei 14 Klonen (43,8%) lag ein Insert in inverser (3'-5'-)Orientierung vor. Bei 9 Klonen (28,1%) ergaben sich Homologien zu humanen Gensequenzen beider Orientierungen. Bei der Überprüfung des korrekten Leserahmens wurde in 2 Fällen ein offener Leserahmen, der für ein bekanntes humanes Protein kodiert, identifiziert.

Einer der beiden Klone zeigte deutliche Sequenzhomologien zu drei homologen humanen Proteinen, „Nectin 1 (PRR1 gene)“ (Lopez *et al.*, 1995), „herpesvirus entry protein C (HVEC)“ (Geraghty *et al.*, 1998) bzw. „poliovirus receptor-related 1“- Protein (PVRL1) (Yoon and Spear, 2002). Hierbei handelt es sich um ein an der Zelloberfläche gelegenes Rezeptorprotein, was eine Interferenz mit der E2-vermittelten Transkriptionsregulation durch DNA-Bindung eher unwahrscheinlich macht.

Bei der zweiten identifizierten Sequenz, die einen offenen Leserahmen zeigt, handelt es sich ebenfalls um drei für das gleiche humane Protein kodierende Genabschnitte: „cervical cancer suppressor 3 mRNA“ (Kim, unveröffentlicht), „CTCL tumor antigen HD-CL-08 mRNA“ (Eichmüller *et al.*, unveröffentlicht) bzw. „eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1“ (Strausberg, direct submission). Angesichts der durch die Namensgebung zu vermutenden Assoziation dieses Proteins mit Cervixkarzinomen bzw. der Funktion als Tumorantigen sowie in der Translationselongation erscheint dieses Ergebnis durchaus interessant und könnte möglicherweise zur weiteren Aufklärung der vermuteten Interferenz zellulärer Proteine mit der Transkriptionsregulation durch E2 beitragen. Leider handelt es sich ausschließlich um bislang unveröffentlichte Daten, so dass eine genauere Überprüfung des entsprechenden Proteins bislang nicht möglich war.

Bei den verbleibenden 30 Klonen zeigte sich ein innerhalb des Leserahmens gelegenes Stopcodon nach maximal 58 Aminosäuren, so dass auch hier nicht primär von der Expression eines Fusionsproteins der aktivierenden Domäne von GAL4 mit einem cDNA-kodierten Protein ausgegangen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels des „Yeast One-Hybrid“-Systems ein humanes Protein identifiziert werden, das potentiell mit der Bindung von E2 an die E2-Bindestellen 3 und 4 von HPV6 interferieren und so an der Regulation der frühen Promotoren von HPV6 in der Zelllinie HT3 beteiligt sein könnte.

Bei der Etablierung des „Yeast One-Hybrid“-Systems traten Probleme mit einer unspezifischen Aktivierung der Reporterkonstrukte auf, die auch durch die Einführung eines zweiten, unabhängigen Reporterkonstrukts nicht vollständig beherrschbar war. Die Frage, ob es sich bei den beobachteten Aktivitätserhöhungen um die Folge einer spezifischen Interaktion zwischen den gefundenen potentiellen Interaktoren und der verwendeten DNA-Zielsequenz oder um eine unspezifische Promotoraktivierung handelt, konnte somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit geklärt werden. Eine endgültige Beurteilung, ob es sich bei den identifizierten humanen Proteinen tatsächlich um Faktoren handelt, die mit der DNA-Bindung von E2 und damit der E2-vermittelten Transkriptionsregulation von HPV6 interferieren, kann erst nach Verifizierung der Expression von Fusionsproteinen und gegebenenfalls Überprüfung der DNA-Bindung durch unabhängige Methoden erfolgen. Eine genauere Untersuchung der Klone mit erhöhter β -Galactosidase-Aktivität im ONPG-Test sollte als nächster Schritt erfolgen, da eine spezifische Aktivierung der Reportergene zwar aufgrund der nach derzeitigem Wissensstand fehlenden Expression eines Fusionsproteins unwahrscheinlich ist, aber über bisher nicht berücksichtigte Mechanismen wie DNA-bindungsunabhängige Transaktivierung oder Expression eines Fusionsproteins nach Splicingvorgängen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. So erlauben letztendlich erst weiterführende Studien eine abschließende Beurteilung der Ergebnisse sowie auch der Effizienz des „Yeast One-Hybrid“-Systems.

Trotz der technischen Probleme in dieser Arbeit stellen die gefundenen Proteine, insbesondere das humane „cervical cancer suppressor 3“-Protein, interessante Kandidaten für nachfolgende Untersuchungen bezüglich ihrer Beteiligung und Funktion bei der Regulation der Genexpression der Onkogene E6 und E7 in der Zelllinie HT3 dar, die in Zukunft erfolgen sollen und möglicherweise, auch im Vergleich mit der Zelllinie RTS3b, zu weiterführenden

Diskussion

Erkenntnissen der Transkriptionsregulation von Humanen Papillomviren beitragen könnten.

VI. Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) induzieren benigne Tumoren der Haut oder Schleimhaut, die nach langjähriger viraler Persistenz maligne entarten können. Je nach Entartungsrisiko der induzierten Primärläsion werden die humanen Papillomviren in hoch-karzinogene („high-risk“) und niedrig-karzinogene („low-risk“) Virustypen eingeteilt. Das onkogene Potential humaner genitaler Papillomviren wird durch die Aktivität der viralen Onkogene E6 und E7 bestimmt, die bei HPV6 als Vertreter der niedrig-karzinogenen Virustypen über zwei unabhängige Promotoren P1 und P2 reguliert werden, während bei den hoch-karzinogenen Typen die Regulation über nur einen Promotor erfolgt.

Die Regulation der beiden frühen Promotoren von HPV6 erfolgt differentiell und zelltypspezifisch über den viralen Transkriptionsfaktor E2 und seine Bindung an vier spezifische Erkennungssequenzen in der nicht-kodierenden Region des HPV6-Genoms sowie vermutlich durch zelluläre Proteine. So zeigen RTS3b-Zellen in Anwesenheit von E2 ein E6/E7-Expressionsmuster, das demjenigen natürlich infizierter, gutartiger Kondylomata ähnelt, während in der Karzinom-Zelllinie HT3 eine Umkehrung der E2-vermittelten Repression von E6 zu einer Aktivierung beobachtet wird. Diese unterschiedliche E2-vermittelte Regulation der frühen Promotoren in den beiden Epithelzelllinien deutet auf eine Beteiligung zellulärer Faktoren hin, die durch Bindung an die E2-Bindestellen oder deren unmittelbare Umgebung mit der Funktion von E2 interferieren könnten.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels des „Yeast One-Hybrid“-Systems ein humanes Protein, das „cervical cancer suppressor 3“-Protein, identifiziert werden, das potentiell mit der Bindung von E2 an die E2-Bindestellen 3 und 4 von HPV6 interferieren und so an der Regulation der frühen Promotoren von HPV6 in der Zelllinie HT3 beteiligt sein könnte.

Eine endgültige Beurteilung, ob es sich bei dem identifizierten humanen Protein tatsächlich um einen Faktor handelt, der mit der DNA-Bindung von E2 und damit der E2-vermittelten Transkriptionsregulation von HPV6 interferiert, kann

Zusammenfassung

erst nach Verifizierung der Expression eines Fusionsproteins und gegebenenfalls Überprüfung der DNA-Bindung durch unabhängige Methoden erfolgen.

VII. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

λ	Wellenlänge in nm
γ - ³² P-ATP	mit ³² P an der γ -Position markiertes ATP
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierende Domäne
Amp.	Ampicillin
AS	Aminosäure(n)
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
ATP	Adenosintriophosphat
Bp	Basenpaare
BS	Bindestelle
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
Ci	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E1-E8	Frühe Leserahmen der Papillomviren ("early")
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EV	Epidermodysplasia verruciformis
FKS	Fötale Kälberserum
g	Normalfallbeschleunigung
GTP	Guanosintriophosphat
HIS3	Reportergen, das für die Aminosäure Histidin kodiert
HPV	Humanes Papillomvirus

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

H.s.	Homo sapiens
kBp	Kilobasenpaare
L1/L2	späte Leserahmen der Papillomviren ("late")
<i>lacZ</i>	Reportergen, das für β -Galactodidase kodiert
LB	Luria-Bertani-Medium
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
NCR	nicht-kodierende Region (Non-Coding Region)
nt	Nukleotid(e)
OD _x	Optische Dichte bei x nm
ONPG	Ortho-Nitro-Phenyl-Galaktosid
ORF	offener Leserahmen
P	Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PNK	Polynukleotidkinase
pRB	Retinoblastomprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ("rounds per minute")
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase des <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymatische Einheit ("units")
UTP	Uridintriphosphat
5'-UTR	untranslatierte Region im 5'-Bereich der betreffenden Gensequenz
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
v/v	Volumenprozent

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

w/v Gewichtsprozent

Die Symbole der chemischen Elemente folgen den IUPAG-Regeln.

VIII. Literaturverzeichnis

- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., and Smith, J. A.** (1990). *Current protocols in molecular biology* (Struhl, K. Ed.) Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Aviv, H. and Leder, P.** (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-1412
- Bartel, P. L., Chien, C. T., Sternglanz, R., and Fields, S.** (1993). *Cellular Interactions in development: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.135-179
- Boeckle, S., Pfister, H., and Steger, G.** (2002). A new cellular factor recognizes E2 binding sites of papillomaviruses which mediate transcriptional repression by E2. *Virology* **293**, 103-117
- Böhm, S., Wilczynski, S. P., Pfister, H., and Iftner, T.** (1993). The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. *Int. J. Cancer* **55**, 791-798
- Bose, S., Mathur, M., Bates, P., Joshi, N., and Banerjee, A. K.** (2003). Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *J. Gen. Virol.* **84**, 1687-1699
- Boshart, M. and zur Hausen, H.** (1986). Human papillomaviruses in Buschke-Löwenstein tumors: physical state of the DNA and identification of a tandem duplication in the noncoding region of a human papillomavirus 6 subtype. *J. Virol.* **58**, 963-966
- Caron, E.** (2003). Regulation by phosphorylation. Yet another twist in the WASP story. *Dev. Cell* **4**, 722-773
- Chesney, J., Mitchell, R., Benigni, F., Bacher, M., Spiegel, L., Al-Abed, Y., Han, J. H., Metz, C., and Bucala, R.** (1999). An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3047-3052
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L.** (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847
- Crawford, M. J., Lanctot, C., Tremblay, J. J., Jenkins, N., Gilbert, D., Copeland, N., Beatty, B., and Drouin, J.** (1997). Human and murine PTX1/ptx1 gene maps to the region for Treacher Collins Syndrome. *Mamm. Genome* **8**, 841-845
- de Villiers, E. M.** (1994). Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 1-12

- Demeret, C., Yaniv, M., and Thierry, F.** (1994). The E2 transcriptional repressor can compensate for SP1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *J. Virol.* **68**, 7075-7082
- Desaintes, C. and Demeret, C.** (1996). Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Cancer Biology* **7**, 339-347
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., and Elledge, S. J.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**, 555-569
- Elbel, M., Carl, S., Spaderna, S., and Iftner, T.** (1997). A comparative analysis of the interaction of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology* **239**, 132-149
- Fields, S.** (1993). The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Methods: A Companion to Methods Enzymol.* **5**, 116-124
- Fuchs, P. G. and Pfister, H.** (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* **37**, 159-167.
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Spear, P.G.** (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618-1620
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U., and Iftner, T.** (1996). Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J. Virol.* **70**, 2339-2349
- Guarente, L.** (1983). Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 181-191
- Haendler, B., Hofer-Warbinek, R. and Hofer, E.** (1987). Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO J.* **6**, 947-950
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hata, M., Okumura, K., Seto, M., and Ohtsuka, K.** (1996). Genomic cloning of a human heat shock protein 40 (Hsp40) gene (HSPF1) and its chromosomal localization to 19p13.2. *Genomics* **38**, 446-449
- Hattori, M., Ishii, K., Toyoda, A., Taylor, T. D., Hong-Seog, P., Fujiyama, A., Yada, T., Totoki, Y., Watanabe, H., and Sakaki, Y.** (2000). Homo sapiens genomic DNA. *Published only in Database.*
- Hoffman, C. S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272

- Hofmann, K. J., Cook, J. C., Joyce, J. G., Brown, D. R., Schultz, L. D., George, H. A., Rosolowsky, M., Fife, K. H., and Jansen, K. U.** (1995). Sequence Determination of Human Papillomavirus Type 6a and Assembly of Virus-like Particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* **209**, 506-518.
- Huibregtse, J. M. and Scheffner, M.** (1994). Mechanisms of tumor suppressor protein inactivation by the human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins. *Semin. Virol.* **5**, 357-367
- Hummel, M., Hudson, J. B., and Laimins, L.A.** (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J. Virol.* **66**, 6070-6080
- Imataka, H., Olsen, H. S., and Sonenberg, N.** (1997). A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. *EMBO J.* **16**, 817- 825
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168
- Jikuya, H., Takano, J., Kikuno, R., Nagase, T., and Ohara, O.** (2002) The nucleotide sequence of a long cDNA clone isolated from human spleen. *Published only in Database*
- Kubbutat, M. H. G. and Vousden, K. H.** (1996). Role of E6 and E7 oncoproteins in HPV-induced anogenital malignancies. *Seminars in Virology* **7**, 295-304
- Laimins, L. A.** (1996). Human papillomaviruses target differentiating epithelia for virion production and malignant conversion. *Seminars in Virology* **7**, 305-313
- Lauber, J., Fabrizio, P., Teigelkamp, S., Lane, W. S., Hartmann, E., and Luhrmann, R.** (1996). The HeLa 200 kDa U5 snRNP-specific protein and its homologue in *Saccharomyces cerevisiae* are members of the DEXH-box protein family of putative RNA helicases. *EMBO J.* **15**, 4001-4015
- Lopez, M., Eberle, F., Mattei, M. G., Gabert, J., Birg, F., Bardin, F., Maroc, C., and Dubreuil, P.** (1995). Complementary DNA characterization and chromosomal localization of a human gene related to the poliovirus receptor-encoding gene. *Gene* **155**, 261-265
- Lopez, S., Island, M.-L., Drouin, J., Bandu, M.-T., Christeff, N., Darracq, N., Barbey, R., Doly, J., Thomas, D., and Navarro, S.** (2000). Repression of Virus-induced Interferon A Promoters by Homeodomain Transcription Factor Ptx1. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7527- 7540
- Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (Maniatis, T. Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- McBride, A. A., Romanczuk, H., and Howley, P.M.** (1991). The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 18411-18414

- Miller, J. H.** (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A. G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M. D., Sukernik, R. I., Olckers, A., and Wallace, D. C.** (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 171-176
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J., International Agency for Research on Cancer multicenter Cervical Cancer Study Group** (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 518-527
- Nagase, T., Nakayama, M., Nakajima, D., Kikuno, R., and Ohara, O.** (2001). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res.* **8**, 85-95
- Nasseri, M., Wettstein, F. O., and Stevens J. G.** (1982). Two colinear and spliced viral transcripts are present in non-virus-producing benign and malignant neoplasms induced by the Shope (rabbit) papillomavirus. *J. Virol.* **44**, 263-268
- Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J. J., and Jiricny, J.** (1995). GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* **268**, 1912-1914
- Pfister, H. and Fuchs, P. G.** (1994). Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* **37**, 143-149
- Purdie, K. J., Sexton, C. J., Proby, Y. M., Glover, M.T., Williams, A. T., Stables, J. N., and Leigh, I. M.** (1993). Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res.* **53**, 5328-5333
- Rando, R. F., Groff, D. E., Chirikjian, J. G., and Lancaster, W. D.** (1986). Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. *J. Virol.* **57**, 353-356
- Rapp, B., Pawellek, A., Kraetzer, F., Schaefer, M., May, C., Purdie, K., Grassmann, K., and Iftner, T.** (1997). Cell-type-specific separate regulation of the E6 and E7 promoters of human papillomavirus type 6a by the viral transcription factor E2. *J. Virol.* **71**, 6956-6966
- Rishi, A. K., Zhang, L., Boyanapalli, M., Wali, A., Mohammad, R. M., Yu, Y., Fontana, J.A., Hatfield, J. S., Dawson, M. I., Majumdar, A. P. N., and Reichert, U.** (2003). Identification and Characterization of a Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Protein-1 as a Novel Mediator of Apoptosis Signaling by Retinoid CD437. *J. Biol. Chem.* **278**, 33422-33435

- Rothstein, R. J.** (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211
- Rübben, A., Beaudenon, S., Favre, M., Schmitz, W., Spelten, B., and Grussendorf Conen, E. I.** (1992). Rearrangements of the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6 can be found in both Buschke-Löwenstein tumors and in condylomata accuminata. *J. Gen. Virol.* **73**, 3147-3153
- Schmitt, A., Harry, J. B., Rapp, B., Wettstein, F. O., and Iftner T.** (1994). Comparison of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* **68**, 7051-7059
- Smith, J. S., Tachibana, I., Pohl, U., Lee, H. K., Thanarajasingam, U., Portier, B. P., Ueki, K., Ramaswamy, S., Billings, S. J., Mohrenweiser, H. W., Louis, D. N., Jenkins, R.B.** (2000). A transcript map of the Chromosome 19q-arm glioma tumor suppressor region. *Genomics* **64**, 44- 50
- Smotkin, D., Prokoph, H., and Wettstein, F. O.** (1989). Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* **63**, 1441-1447
- Smotkin, D. and Wettstein, F.O.** (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 4680-4684.
- Spaderna, S.** (1998). Suche nach zellspezifischen Faktoren, welche über die Bindung an Sequenzelemente der NCR von HPV6 mit der Funktion des viralen Transkriptionsfaktors E2 interferieren. Diplomarbeit, Universität Erlangen-Nürnberg
- Stanley, M. A.** (1994). Virus-keratinozyte interactions in the infectious cycle, p.116-145. In P. L. Stern and M. Stanley (ed.), Human papillomaviruses and cervical cancer. Biology and immunology. *Oxford University Press, Oxford, United Kingdom*
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A. A., Rubin, G. M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S. S., Loquellano, N. A., Peters, G. J., Abramson, R. D., Mullahy, S. J., Bosak, S. A., McEwan, P. J., McKernan, K. J., Malek, J. A., Gunaratne, P. H., Richards, S., Worley, K. C., Hale, S., Garcia, A. M., Gay, L. J., Hulyk, S. W., Villalon, D. K., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Lu, X., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A.,**

- Whiting, M., Madan, A., Young, A. C., Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Touchman, J. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S., Krzywinski, M. I., Skalska, U., Smailus, D. E., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J., and Marra, M. A.** (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16899-16903
- Stubenrauch, F. und Iftner, T.** (1999). Krebs durch Papillomviren. *TargetForum.* **1**, 5-15
- Sulston, J. E., and Waterston, R.** (1998). Toward a complete human genome sequence. *Genome Res.* **8**, 1097-1108
- Tan, S. H., Leong, L.E., Walker, P. A., and Bernard, H. U.** (1994). The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of SP1 and TFIID. *J. Virol.* **68**, 6411-6420
- Thierry, F. and Yaniv, M.** (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* **6**, 3391-3397
- Thomas J. T., Laimins, L. A., and Ruesch, M. N.** (1998). Perturbation of cell cycle control by E6 and E7 oncoproteins of human papillomaviruses. *Papillomavirus report.* **9**, 59-64
- Troyanovsky, S. M., Leube, R. E., and Franke, W. W.** (1992). Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern. *Eur. J. Cell Biol.* **59**, 127-137
- Tsuji, A., Sakurai, K., Kiyokage, E., Yamazaki, T., Koide, S., Toida, K., Ishimura, K., and Matsuda, Y.** (2003). Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix. *Biochim Biophys. Acta* **1645**, 95-104
- Unoki, M. and Nakamura, Y.** (2001) Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* **20**, 4457-4465
- Vousden, K. H.** (1995). Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **6**, 109-116
- Wang, M. M. and Reed, R. R.** (1993). Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* **364**, 121-126
- Walboomers, J. M. M., De Roda Husman, A.-M., Van Den Brule, A. J. C., Snijders, P. J. F., and Meijer C. J. L. M.** (1994). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer (Stern, P. L. and Stanley, M. A. Eds.) *Oxford University Press, Oxford.* 41-69

- Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer C. J. L. M., Muñoz, N.** (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* **189**, 12-19
- Wilczynski, S. P., Oft, M., Cook, N., Liao, S. Y., and Iftner, T.** (1993). Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. *Hum. Pathol.* **24**, 96-102
- Yamanaka, S., Poksay, K. S., Arnold, K. S., and Innerarity, T. L.** (1997). A novel translational repressor mRNA is edited extensively in livers containing tumors caused by the transgene expression of the apoB mRNA-editing enzyme. *Genes Dev.* **11**, 321-333
- Yoon, M. and Spear, P. G.** (2002). Disruption of adherens junctions liberates nectin-1 to serve as receptor for herpes simplex virus and pseudorabies virus entry. *J. Virol.* **76**, 7203-7208
- zur Hausen, H.** (1994). Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* **184**, 9-13

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Iftner möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und die Möglichkeit, die Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, bedanken. Weiterhin bedanke ich mich für die fachliche Betreuung der Arbeit und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Ebenso danken möchte ich Frau Dr. Magdalene Höfer-Pridzun und Herrn Dr. Frank Stubenrauch für ihre fachliche Betreuung und ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Mein weiterer Dank gilt Evamaria Huber, Angelika Iftner, Sonja Jeckel, Betti Schopp und Thomas Zobel für die Weitergabe von Arbeitstechniken, sowie der gesamten Papillomvirus-Arbeitsgruppe und allen MitarbeiterInnen der Sektion Experimentelle Virologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt geht mein besonderer Dank an meine Familie, die mich während meines Studiums in jeglicher Hinsicht unterstützt hat, sowie all diejenigen, die auf so viele verschiedene Weise ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Susanne Arbogast
Geburtsdatum: 22.09.1975
Geburtsort: Sulz a. N.

Schulbildung

08/1982 - 07/1986 Grundschule Wittlensweiler
08/1986 - 06/1995 Kepler-Gymnasium Freudenstadt
23.06.1995 Abitur

Studium

10/1995 - 05/2003 Medizinstudium an der Universität Tübingen
05.09.1997 Ärztliche Vorprüfung
27.08.1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28.03.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002 - 03/2003 Praktisches Jahr (PJ) im Klinikum am Steinenberg,
Reutlingen und im Spital Schwyz, Schweiz
Wahlfach: Pädiatrie
07.05.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

seit 11/2003 AiP im Fachbereich Pädiatrie im
Diakoniekrankenhaus Schwäbisch Hall

Promotion

10/2000 - 09/2004 Promotion am Institut für Medizinische Virologie und
Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität
Tübingen,
Sektion für Experimentelle Virologie, Prof. Dr. T. Iftner