

# **KONTROLLE DES WACHSTUMS HPV-POSITIVER ZERVIXKARZINOMZELLEN DURCH VIRALE UND ZELLULÄRE PROTEINE**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

José Hurst

aus Stuttgart

Tübingen

2013

Tag der mündlichen Qualifikation: 27.03.2013

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Stubenrauch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Peschel

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	2
1. Einleitung .....	5
2.1 Klassifizierung und Pathogenität humaner Papillomviren ....	5
2.2 Lebenszyklus und Replikation der Papillomviren .....	8
2.3 Genomorganisation der Papillomviren.....	9
2.4 Virale Regulatorproteine .....	12
2.4.1 E1 und E2.....	12
2.4.2 E8^E2C.....	13
2.4.3 E6 und E7.....	15
2.5 Zelluläre Seneszenz .....	26
2.6 Der Tumorsuppressor p14ARF.....	28
3 Material und Methoden.....	37
3.1 Material .....	41
3.1.1 Chemikalien .....	41
3.1.2 Medien und Puffer.....	44
3.1.3 Eukaryotische Zellen.....	50
3.1.4 Oligonukleotide .....	54
3.1.5 siRNAs.....	55
3.1.6 Plasmide und Vektoren .....	56
3.1.7 Geräte.....	60
3.2 Methoden .....	63
3.2.1 Mikrobiologische Methoden .....	63
3.2.2 DNA-Methoden .....	63
3.2.3 RNA-Methoden.....	66
3.2.4 Analysen von eukaryotischen Zellen .....	69
3.2.5 Zellkultur-Methoden .....	74
3.2.6 Proteinbiochemische-Methoden.....	80
4 Ergebnisse .....	86
4.1 Die Effekte von HPV E8^E2C in HPV-negativen Zellen .....	86

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1.1	Das Repressorprotein 31 E8 <sup>E2C</sup> beeinflusst das Wachstumsverhalten von HPV negativen Zellen.....	86
4.1.2	HPV31 E8 <sup>E2C</sup> Mutanten haben keinen inhibitorischen Einfluss auf das Zellwachstum.....	88
4.1.3	Der inhibitorische Einfluss auf das Zellwachstum von E8 <sup>E2C</sup> verliert sich in höheren Zellpassagen.....	93
4.1.4	Das verzögerte Wachstum von RTS3b-Zellen kann auf einen Zellzyklusarrest durch E8 <sup>E2C</sup> zurück geführt werden.....	97
4.1.5	Die transiente Expression von E8 <sup>E2C</sup> führt zum Ablösen der Zellen.....	98
4.2	Vergleich der E2 und E8 <sup>E2C</sup> -Proteine verschiedener Hochrisiko-HPV-Typen .....	103
4.2.1	Die E2 und E8 <sup>E2C</sup> -Proteine von HPV 16, 18 und 31 induzieren die Expression von p53 und p21 in CxCa-Zellen.....	103
4.2.2	Die E2 und E8 <sup>E2C</sup> Proteine von HPV16, 18 und 31 inhibieren das Wachstum von HeLa Zellen über die Induktion einen Zellzyklusarrests .....	106
4.2.3	Langfristige Expression von E2 und E8 <sup>E2C</sup> induziert Seneszenz in CxCa-Zellen.....	109
4.3	Apoptoseinduktion in HPV-positiven Zellen .....	111
4.3.1	„Knockdown“ der Onkoproteine E6 und E7 von HPV16 und 18 erhöht geringfügig die Apoptoserate.....	111
4.3.2	Das Ausschalten des Tumorsupressorproteins p14ARF durch RNA Interferenz hat unerwartete Effekte auf HPV-positive Zellen.....	114
4.3.3	Der „Knockdown“ von p14ARF führt in den HPV positiven Zellen zu einem Verlust der Viabilität und zu einem Anstieg der Apoptose .....	119
4.3.4	CxCa-Zellen exprimieren die <i>Wildtyp</i> Form von p14ARF... ..	124
4.3.5	Die Effekte von siARF1 können durch Überexpression von p14ARF kompensiert werden .....	127
4.3.6	Der „Knockdown“ von p14ARF führt zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials.....	130
4.3.7	Der „Knockdown“ von p14ARF reduziert die Mcl-1 Proteinmenge .....	132

# Inhaltsverzeichnis

---

4.3.8	Die Mcl-1 Degradation nach p14ARF „Knockdown“ wird durch Mule vermittelt .....	139
4.3.9	Weitere Interaktionspartner von Mule .....	145
4.3.10	„Knockdown“ von p14ARF führt in weiteren HPV-positiven Zelllinien ebenfalls zur Apoptoseinduktion .....	148
4.3.11	Der Verlust von p14ARF sensitiviert HeLa Zellen gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose .....	150
4.4	Regulation von p14ARF .....	153
4.4.1	Die p14ARF Expression ist abhängig von der Expression der HPV E6/E7 Onkogene .....	153
4.4.2	Das p14ARF Protein wird nur Zervixkarzinomzelllinien überexprimiert. ....	157
4.4.3	NPM ist verantwortlich für die nukleäre Lokalisation von p14ARF .....	161
5	Diskussion .....	166
5.1	Die Auswirkungen von HPV 31 E8 <sup>E2C</sup> auf HPV-negative Zellen 167	
5.2	Die Auswirkungen von E8 <sup>E2C</sup> auf HPV-positive Zellen....	169
5.3	Die Funktion von p14ARF .....	170
5.3.1	Das p14ARF Protein verhindert mitochondriale Apoptose in CxCa-Zellen.....	171
5.3.2	Der Verlust von p14ARF sensitiviert HeLa-Zellen gegenüber TRAIL-Behandlung.....	179
5.3.3	Das p14ARF Protein wird nur in Zervixkarzinomzelllinien überexprimiert. ....	180
6	Literaturverzeichnis .....	183
7	Akademischer Lebenslauf .....	213
8	Publikationen .....	214
9	Danksagungen.....	215

### Zusammenfassung

Infektionen mit bestimmten HPV Typen wie HPV16 oder 18 können zur Entstehung von Karzinomen des Gebärmutterhalses (Zervixkarzinom, CxCa) führen. Interessanterweise ist für das Wachstum von CxCa-Zellen eine kontinuierliche Expression der HPV E6 und E7 Onkoproteine notwendig. E6 und E7 inaktivieren Zellzykluskontrollpunkte und verhindern die Induktion von Apoptose. Daher werden seit längerem unterschiedliche Möglichkeiten intensiv erforscht, die Expression der Onkoproteine in Karzinomzellen zu inhibieren. Eine Möglichkeit besteht in der RNA-Interferenz gegen E6/E7 Transkripte und eine andere in der Überexpression der HPV E2 oder E8<sup>E2C</sup> Regulatorproteine, welche den E6/E7 Promotor transkriptionell inhibieren. Während allen Methoden gemeinsam ist, dass das Wachstum von CxCa-Zellen inhibiert wird, sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Wachstumsinhibition im Fall von E8<sup>E2C</sup> gänzlich unbekannt und werden für die RNA Interferenz und die E2-Expression unterschiedlich diskutiert. Es zeigte sich, dass die wachstumsinhibierenden Effekte von HPV E8<sup>E2C</sup> und E2 Proteinen hauptsächlich auf der Inhibition der E6/E7 Transkription beruht. Der Verlust von E6 und E7 in CxCa-Zellen führte nach zwei Tagen zu einem moderaten Anstieg der Apoptoserate und zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Die langfristige Inhibition von E6/E7 durch E8<sup>E2C</sup> oder E2 induzierte zelluläre

Seneszenz in HeLa-Zellen. Allerdings zeigten Untersuchungen in HPV-negativen, immortalisierten Zelllinien, dass E8<sup>E2C</sup> auch E6/E7-unabhängig das Zellwachstum verlangsamt. Dies beruht vermutlich auf verringerter Zelladhäsion und einer Reduktion der Zellzahl in der G2-Phase nach Expression des Regulatorproteins. Das lässt vermuten, dass E8<sup>E2C</sup> nicht nur die HPV E6/E7-Transkription inhibiert, sondern auch zelluläre Gene beeinflussen kann und daher als Gentherapeutikum nur bedingt geeignet ist.

Bei Untersuchungen zur Apoptoseregulation in CxCa-Zellen stellte sich heraus, dass das zelluläre p14ARF Protein, welches generell als Tumorsuppressor betrachtet wird, in allen untersuchten CxCa-Zellen, jedoch nicht in HPV-negativen Zellen, überexprimiert wird. Überraschenderweise beeinträchtigte der siRNA-vermittelte Verlust von p14ARF das Wachstum von HPV16- oder 18-positiven CxCa-Zellen. Dieser Phänotyp war spezifisch auf den Verlust von p14ARF zurückzuführen, da die Effekte mit der Effizienz der p14ARF Reduktion korrelierten und durch die Überexpression einer siRNA-resistenten Form von p14ARF aufgehoben werden konnten. Die Verringerung der p14ARF Menge führte zu DNA Fragmentierung, einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und der Spaltung von Caspase 3, was nahelegte, dass p14ARF die Apoptoseinduktion durch das Mitochondrium verhindert.

Damit einher ging die signifikante Reduktion der Mcl-1 Proteinmenge. Mcl-1 ist ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl2 Proteinfamilie und für die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials verantwortlich. Der

„Knockdown“ der E3 Ubiquitinligase Mule, welche in Verbindung mit der proteasomalen Degradation von Mcl-1 gebracht wird, die Aufhebung der siARF-vermittelten Apoptose durch Überexpression einer nicht-degradierbaren Form von Mcl-1, sowie publizierte Daten legen nahe, dass in CxCa-Zellen p14ARF Mule inhibiert und somit ausreichend Mcl-1 vorhanden ist, um die mitochondriale Apoptose zu verhindern.

Publikationen zeigten, dass CxCa-Zellen resistent gegenüber der Apoptoseinduktion durch extrazelluläre Todesliganden wie TRAIL sind und dass dies auf der Expression von Mcl-1 beruht. Im Einklang damit konnte die TRAIL-Resistenz von CxCa-Zellen durch den p14ARF „Knockdown“ überkommen werden.

Vergleiche von HPV-negativen mit E6/E7-exprimierenden Zellen und die Inhibition der E6/E7-Expression in CxCa-Zellen belegen, dass die transkriptionelle Induktion von p14ARF in HPV-positiven Zellen eine Konsequenz der HPV E6/E7 Expression ist. Die mangelnde Korrelation zwischen p14ARF Transkripten und Proteinmenge in unterschiedlichen HPV-positiven Zelllinien, Proteasomeninhibitorexperimente und der „Knockdown“ des p14ARF assoziierten nukleolären Nucleophosmin-Proteins demonstrieren darüber hinaus, dass post-translationale Mechanismen zur Überexpression des p14ARF Proteins in CxCa-Zellen beitragen.

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass p14ARF eine CxCa-spezifische Zielstruktur für neue Therapieansätze darstellen könnte



# 1. Einleitung

## 2.1 Klassifizierung und Pathogenität humaner Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine unbehüllte DNA-Viren, deren doppelsträngiges Genom assoziiert mit zellulären Histonen zu Chromatin-ähnlichen Komplexen im Inneren eines ikosaedrischen Kapsids vorliegt. Die Kapside haben einen Durchmesser von etwa 55 nm und bestehen aus den viralen Strukturproteinen L1 und L2. Zusammen mit den animalen Papillomviren bilden sie die Familie der Papillomaviridae. Bisher wurden 120 humane und 69 animale Papillomviren beschrieben (Bernard et al., 2011). Generell unterliegen die Papillomviren einem strikten Gewebetropismus für Keratinozyten der Haut und Schleimhaut (Knipe et al., 2007).

Humane Papillomviren sind wichtige Pathogene und werden in verschiedene Genera eingeteilt, von denen die alpha- und beta-Papillomviren am weitesten verbreitet sind (Abb. 1). Die größte Gruppe der humanen Papillomviren ist die der alpha-Papillomviren. In dieser Gruppe sind, neben einigen Viren mit kutanem Tropismus (z.B. HPV2), auch die genitalen HPV-Typen, die eine kausale Rolle bei der Entstehung von Karzinomen des Anogenitaltraktes, v. a. der Zervix spielen, enthalten (Doorbar 2006). Im Jahr 2002 war das Zervixkarzinom nach Brustkrebs die weltweit zweithäufigste Krebsart bei Frauen, mit 493 000 Neuerkrankungen und 274 000 Todesfällen. 83 % dieser Fälle

traten in Entwicklungsländern auf, in denen Zervixkarzinome sogar die häufigste Krebsart bei Frauen sind (15 %) (Parkin et al., 2005). In über 99,7% der Zervixkarzinome kann HPV-DNA nachgewiesen werden (Walboomers et al., 1999). Der häufigste HPV-Typ in diesen Tumoren ist HPV16 (ca. 50% der Fälle), gefolgt von HPV18, 45 und 31 (Walboomers et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind die HPV-Typen 6 und 11 hauptsächlich mit gutartigen Genitalwarzen und niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien assoziiert. Papillomviren werden daher in Abhängigkeit ihres unterschiedlichen karzinogenen Potentials in Hochrisiko- („high-risk“, HR) und Niedrigrisiko-Typen („low-risk“, LR) eingestuft (de Villiers et al., 2004; Munoz et al., 2006). Im Jahr 2005 wurden die HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35,39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 als Typ 1 Karzinogene für den Menschen durch die WHO klassifiziert (Cogliano et al., 2005)

Die Infektion mit beta-Papillomviren wird hingegen mit der Ausbildung von nicht-melanozytärem Hautkrebs (Nonmelanoma Skin Cancer, NMSC) in Zusammenhang gebracht, nachdem die virale DNA zunächst in primären Plattenepithelkarzinomen („Squamous cell carcinomas“) von Patienten mit der seltenen Erbkrankheit Epidermodysplasia verruciformis nachgewiesen wurde (Jablonska et al., 1994). Zudem konnte gezeigt werden, dass bis zu 70% der Patienten, die für längere Zeit immunsupprimiert waren, NMSC ausbilden. 80% der Karzinome dieser Patienten enthalten HPV-DNA (Berkhout et al., 1995) (Shamanin et al., 1994). Des Weiteren wurden HPV-Genome in der immunkompetenten Bevölkerung in NMSC-Läsionen nachgewiesen (de Villiers 1998; Harwood et al., 2000; Iftner et al., 2003).

# Einleitung

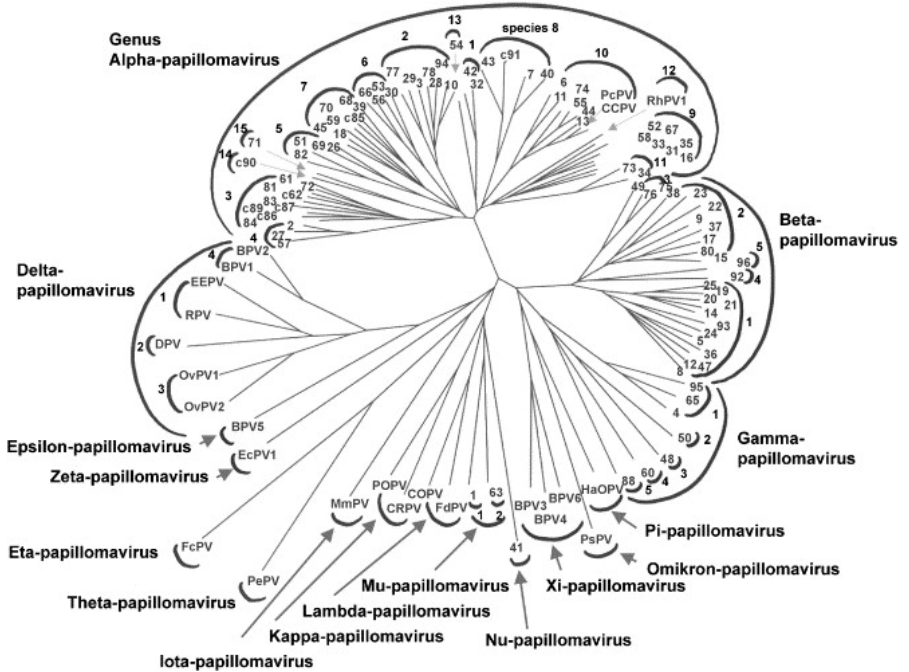


Abb. 1: Phylogenetischer Baum von 118 Typen der Papillomaviridae. Die Einteilung in die Gattung Alpha bis Gamma basiert auf der Sequenz des L1-Leserahmens. Die Nummer am Ende jedes Zweiges bezeichnet den jeweiligen HPV-Typ, die Nummern der inneren Halbkreis-Symbole betitelt die Spezies (de Villiers et al., 2004).

### **2.2 Lebenszyklus und Replikation der Papillomviren**

Durch Mikroläsionen im Epithel infizieren humane Papillomviren die basalen Stammzellen der Epidermis. Der Lebenszyklus der Papillomviren ist abhängig vom Differenzierungsgrad des Epithels der Wirtszelle (Knipe et al., 2007). In undifferenzierten, basalen Epithelzellschichten werden nur die frühen viralen Gene exprimiert, die zur Etablierung der viralen DNA mit 10 bis 100 episomalen Genom-Kopien pro Zelle beitragen (Sedman et al., 1996; Stubenrauch et al., 1999). Mit zunehmender Ausdifferenzierung der Keratinozyten wird die produktive Phase der viralen Replikation eingeleitet und es kommt zur Expression der späten Gene, was schließlich zur Bildung infektiöser Viruspartikel führt (Stubenrauch et al., 1999; Knipe et al., 2007)(Abb.2). Die reifen Viruspartikel werden vermutlich von den obersten Schichten des Epithels freigesetzt.

# Einleitung

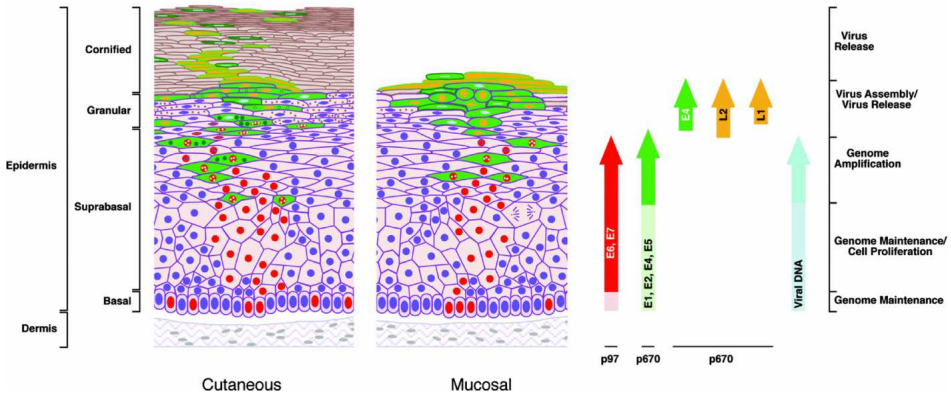


Abb. 2: Die Genexpression und Replikation der Viren verändert sich mit dem Differenzierungsgrad der Wirtszelle. In den basalen Epithelzellen werden nur die frühen Gene exprimiert und die Kopienzahlen sind niedrig. Mit ansteigender Differenzierung beginnt die Replikation und anschließend die Genexpression der späten Gene L1 und L2. Die Freisetzung der viralen Partikel erfolgt in den oberen Schichten. Abbildung modifiziert nach Doorbar, 2006.

## 2.3 Genomorganisation der Papillomviren

Alle Papillomviren besitzen als Genom ein doppelsträngiges zirkuläres DNA-Molekül von ca. 8 kB Größe, welches für 8-9 offene Leserahmen kodiert und in drei Bereiche eingeteilt werden kann. Eine frühe Region (early, E), eine späte Region (late, L) und eine regulatorische Region („long control region“ (LCR)), „non-

coding region“ (NCR), oder „upstream regulatory region“ (URR)). Die drei Bereiche sind bei allen Papillomviren durch zwei Poly-Adenylierungssignale (pA) getrennt: dem frühen pA und dem späten pA, die sich am Anfang und Ende der späten Region befinden. Die späte Region beinhaltet ungefähr 40% des Genoms und kodiert für die Strukturproteine L1 und L2, die zusammen das ikosaedrische Kapsid bilden (Abb. 3). Die nichtkodierende Region macht etwa 10% des Virusgenoms aus und beinhaltet den Replikationsursprung sowie Transkriptionselemente für die Genexpression (Ustav et al., 1991; Ustav et al., 1993; Kanaya et al., 1997; Sen et al., 2002; Thierry 2009).

Die frühe Region der humanen Papillomviren umfasst über 50% des kompletten Virusgenoms und kodiert für sechs der offenen Leserahmen (E1, E2, E4, E5, E6 und E7) (Danos et al., 1982), die einzelne Proteine translatieren (Abb. 3). Zudem wurde für einige Papillomviren ein zusätzlicher E8-Leserahmen identifiziert (Abb. 3). Dieser Leserahmen wird vermutlich nur von einer gespleißten mRNA in Form des E8<sup>E2C</sup> Fusionsproteins exprimiert (Doorbar et al., 1990; Stubenrauch et al., 2000; Jeckel et al., 2003), Frühe (HPV16:P97, HPV18:P105, HPV31:P97) und späte (HPV16:P672; HPV31:P742) Promotoren regulieren die Expression der polycistronischen Transkripte der Hochrisiko-HPV-Typen (Hummel et al., 1992; Grassmann et al., 1996) (Abb.3).

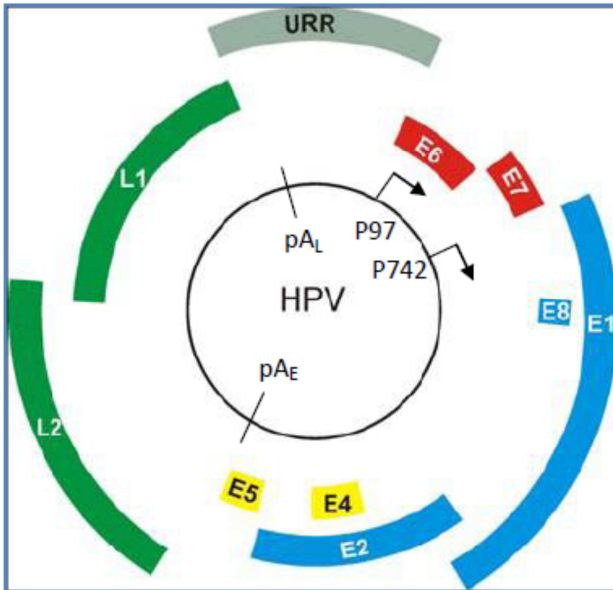


Abb. 3: Schematische Darstellung des Genoms von HPV31 mit den offenen Leserahmen der frühen (E1- E8) und späten Region (L1, L2). Früher (p97) und später (p742) Promotor sind durch Pfeile markiert. Die Poly-Adenylierungssignale ( $pA_E$ ,  $pA_L$ ), die die frühe von der späten Region trennen, sind durch Linien gekennzeichnet.

### 2.4 Virale Regulatorproteine

#### 2.4.1 E1 und E2

Die viralen Proteine E1 und E2 sind für die Replikation von Papillomviren essentiell (Ustav und Stenlund, 1991). Beide binden an die LCR (Spalholz et al., 1987; Sun et al., 1996), wobei E2 die E1-DNA-Bindung verstärkt (Frattini et al., 1994). E1 besitzt DNA-Helikase-Aktivität (Masterson et al., 1998) und rekrutiert zelluläre Replikationsproteine, um die virale DNA Replikation zu initiieren (Frattini et al., 1994). Es verfügt über eine konservierte N-terminale Transaktivierungsdomäne (ca. 200 AS) und eine konservierte C-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (ca. 90 AS)(Abb. 4). Die beiden Domänen sind über die nicht-konservierte Hinge-Region verbunden. Das E2 Protein bindet als Dimer an E2 Bindungsstellen (E2BS), die in mehreren Kopien in der LCR des viralen Genoms vorliegen (McBride et al., 1991). Entscheidend für die Regulation ist, welche E2BS der LCR von E2 gebunden werden (Steger et al., 1997). Das E2 Protein kann den frühen Promotor, der u.a. die Expression der Onkoproteine E6 und E7 reguliert, reprimieren. Bei der Integration des Genoms der Hochrisiko-HPV in die Wirts-DNA wird häufig der E2-ORF unterbrochen. Dadurch entfällt vermutlich die E2 vermittelte Repression der E6- und E7-Transkription in Zervixkarzinomzelllinien und erlaubt so eine unkontrollierte Expression der Onkogene (Schneider-Maunoury et al., 1987; Turek 1994; Park et al., 1997; Corden et al., 1999; Pett et al., 2004)



Die Expression von exogenem E2 in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen führt zur Repression von E6/E7 und zur Inhibition des Zellwachstums. Dies beruht v.a. auf der Reaktivierung der p53- und pRB-Signalwege (Hwang et al., 1993; Dowhanick et al., 1995; Hwang et al., 1996; Naeger et al., 1999; Wells et al., 2000; Johung et al., 2007; Stubenrauch et al., 2007). Allerdings wurde auch postuliert, dass manche E2 Proteine E6/E7-unabhängig Apoptose auslösen können, was auf Interaktionen der aminoterminalen Aktivator-domäne mit der Initiator Caspase 8 zurückgeführt wird (Demeret et al., 2003).

### 2.4.2 E8<sup>E2C</sup>

Bei einigen Papillomvirus-Typen konnten neben dem vollständigen E2 Protein Transkripte für alternativ gespleißte E2 Proteine nachgewiesen werden, bei denen der E2 Leserahmen mit dem E8 Leserahmen verbunden wird (Choe et al., 1989; Rotenberg et al., 1989; Doorbar et al., 1990; Chiang et al., 1991; Snijders et al., 1992; Stubenrauch et al., 2000; Jeckel et al., 2003). Das E8<sup>E2C</sup>-Protein setzt sich aus der N-terminalen E8-Domäne und der C-terminalen E2-Domäne zusammen (Spalholz et al., 1987; Hubbert et al., 1988; Choe et al., 1989; Lambert et al., 1989) (Abb. 3). Im Vergleich zum E2-Protein fehlt dem E8<sup>E2C</sup> die Transaktivierungsdomäne (Abb. 4). E8<sup>E2C</sup> ist in der Lage die virale Transkription und die E1/E2-abhängige DNA Replikation zu inhibieren (Stubenrauch et al., 2000; Stubenrauch et al., 2001; Zobel et al., 2003; Stubenrauch et al., 2007; Lacey et al., 2008).

Experimente in HeLa-Zellen belegten, dass das E8<sup>Δ</sup>E2C von HPV31 ebenso effizient wie das HPV31 E2 Protein die E6/E7-Onkogenexpression und das Wachstum von HeLa Zellen inhibieren kann (Stubenrauch et al., 2007). Mutationsanalysen des HPV31 E8<sup>Δ</sup>E2C Proteins zeigten, dass neben der E2C Domäne ebenso der E8-Anteil für die effiziente Transkriptions- und Replikationsinhibition benötigt wird (Stubenrauch et al., 2001; Zobel et al., 2003). Protein-Protein-Interaktionsstudien ergaben, dass E8<sup>Δ</sup>E2C über den E8-Anteil an die zellulären Korepressoren HDAC3 und NCoR bindet, und so die Transkription inhibiert (Ammermann et al., 2008; Powell et al., 2010).

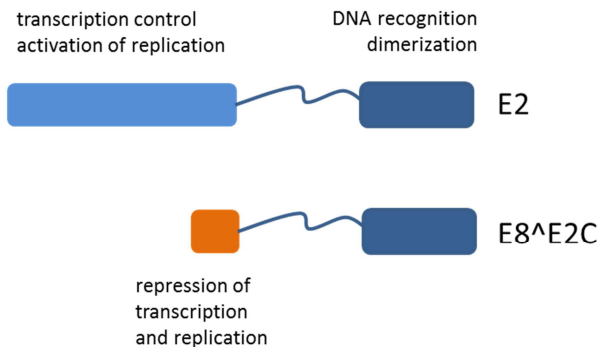


Abb. 4: Darstellung der E2 und E8<sup>Δ</sup>E2C Proteine von HPV31. Die N-terminale Domäne des E2 Proteins vermittelt die Transkriptionsmodulation und die Aktivierung der DNA Replikation und ist über eine "hinge"-Region mit dem C-Terminus verbunden, der für die Dimerisierungs- und DNA-Bindung verantwortlich ist. Das E8<sup>Δ</sup>E2C Protein besitzt anstelle der N-terminalen E2 Transaktivierungsdomäne die E8 Repressordomäne.

### 2.4.3 E6 und E7

Die Onkogene E5, E6 und E7 werden primär für die produktive Virusreplikation in der suprabasalen Hautschicht benötigt. Die Expression von E6 und E7 ist ausschlaggebend für die Transformation infizierter Zellen. In allen HPV-positiven Zervixkarzinomen kann eine kontinuierliche Expression der E6/E7-Gene nachgewiesen werden (Schwarz et al., 1985; Jeon et al., 1995). Die Koexpression von E6 und E7 führt zur Immortalisierung normaler humaner Zellen. Dies beruht auf der Interaktion von E6 und E7 mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen, die Zellproliferation, Apoptose und Zell-Zell-Interaktionen kontrollieren (siehe Abb. 6 - 8). Durch einen alternativen Spleißvorgang der E6 mRNA entstehen neben der eigentlichen E6-mRNA, ein bis zwei mRNAs mit verkürztem E6-Leserahmen (E6\*, E6\*\*) von denen E7 exprimiert wird (Bernard et al., 1989; Doorbar et al., 1990; Sotlar et al., 2004)(Abb. 5).

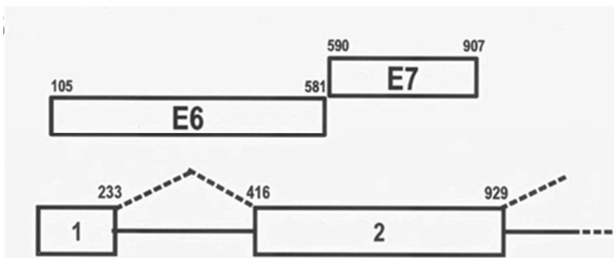
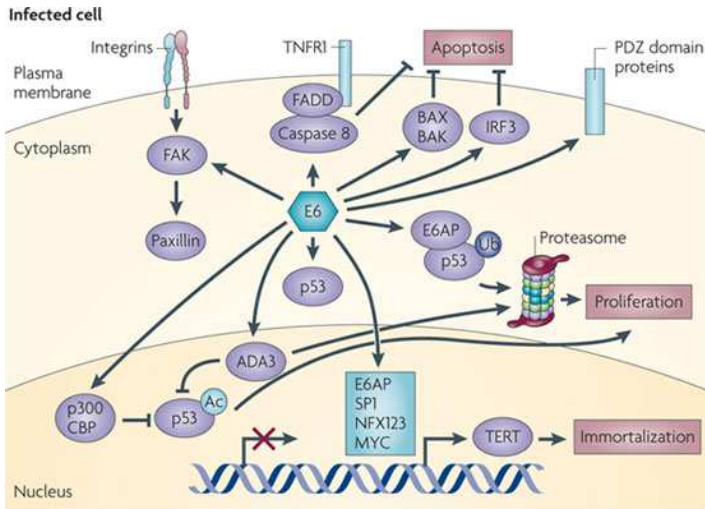


Abb. 5: Transkriptionsregulation der Onkoproteine E6/E7 bei HPV. E7 wird von einer gespleißten und damit verkürzten Form der bicistronischen E6/E7 mRNA translatiert (Tang et al., 2006).

Das größte der HPV Onkoproteine ist das E6 Protein (ca. 150 AS). Alle E6 Proteine der HR-HPV besitzen am C-Terminus eine PDZ-Bindedomäne (PDZBD). PDZ-Proteine interagieren häufig mit anderen, teilweise ebenfalls PDZ-Domänen besitzenden Proteinen. Diese Proteinkomplexe sind oftmals membranassoziiert und vermitteln Zell-Zell-Kontakte, Zelladhäsion oder sind in Signaltransduktionskaskaden involviert (Harris et al., 2001; Roh et al., 2003). Beispiele für Interaktionspartner der PDZBD von *high-risk* E6-Proteinen sind bisher neben hDLG1 und hDLG4 die PDZ-Proteine MAGI-1, -2 und -3 (Glaunsinger et al., 2000; Thomas et al., 2002), Scribble (Nakagawa et al., 2000), MUPP1 (Lee et al., 2000), PTPN13 (Spanos et al., 2008), PTPN3 (Jing et al., 2007), TIP-1 (Hampson et al., 2004) und CAL (Jeong et al., 2007).

Die Ubiquitinligase E6AP (E6-associated protein) war der erste nachgewiesene Interaktionspartner von HPV E6 (Huibregtse et al., 1991; Huibregtse et al., 1991). Es handelt sich um eine HECT-Ubiquitinligase („homologous to the E6AP carboxylterminus“) (Scheffner et al., 1993), die an der Degradation zellulärer Proteine über das Proteasom beteiligt ist. Die Interaktion mit E6 verändert das Substratspektrum von E6AP, und führt dazu, dass der E6/E6AP-Komplex das p53 Tumorsuppressorprotein erkennt, ubiquitiniert und so der proteasomalen Degradation zuführt (Scheffner et al., 1993). Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptoseinduktion oder DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, reguliert. Die intrazelluläre p53 Konzentration steigt bei Schäden in der Zelle stark an. DNA-Strangbrüche, Hypoxie oder onkogene Stimuli führen zur

Stabilisierung des Proteins, während es durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung an unterschiedlichen Positionen aktiviert und moduliert wird. In Abhängigkeit von den posttranslationalen Modifikationen entscheidet sich, ob p53 proapoptotische Gene wie Bax, Puma und Noxa aktiviert oder durch p21-Induktion einen Zellzyklusarrest auslöst (Levine 1997; Lavin et al., 2006; Aylon et al., 2007; Fuster et al., 2007) und die DNA-Reparaturmaschinerie in Gang setzt. Die verstärkte Degradation von p53 steht in engem Zusammenhang mit der transformierenden Aktivität der E6 Proteine und ist bei den Hochrisiko-HPV-Typen am stärksten ausgeprägt (Mantovani et al., 2001). Dadurch bewirkt das E6 Protein die Aufhebung der Zellzyklus-Kontrollpunkte und verhindert die p53-induzierte Apoptose.



Nature Reviews | Cancer

Abb. 6: Interaktionen von HPV E6 in der Wirtszelle.

E6 verhindert einen Zellzyklusarrest und die Einleitung der Apoptose, indem es über verschiedene Mechanismen zum Abbau oder zur Inaktivierung von p53 führt. Diese kann einerseits durch direkte oder E6AP-vermittelte Interaktion mit p53 und darauf folgendem proteasomalen Abbau des Proteins stattfinden. Zudem wird die Acetylierung von p53 durch p300/CBP oder ADA3 verhindert und verliert dadurch die Funktion als Transkriptionsfaktor. Über die Aktivierung des Promotors von hTERT, des Telomerasegens, sind die infizierten Zellen in der Lage sich weit über ihre normale Lebensspanne hinaus zu teilen. Dies trägt wesentlich zur Immortalisierung der infizierten Zelle bei. E6 vermittelt den Verlust der Zellpolarität und induziert morphologische Veränderungen durch Interaktion mit PDZ-Domänen-haltigen Proteinen. Zudem wird die Apoptoseinduktion über verschiedene Stimuli, wie z.B. Bax und Bak, durch E6 unterbunden (siehe Abb. 7). Modifiziert nach Moody (Moody et al., 2010).

Zudem konnte gezeigt werden, dass HPV E6 auch die durch Acetylierung bedingten Stabilisierung und Aktivierung von p53 beeinflusst, indem es die Histon-Acetyltransferasen p300, CBP (CREB-bindendes Protein) und ADA3 bindet bzw. dem proteasomalen Abbau zuführt (Moody et al., 2010). Außerdem blockiert E6 die Apoptoseinduktion in p53-negativen Zellen (Steller et al., 1996; Pan et al., 1995). Es gibt zwei Hauptwege der Apoptose, die durch verschiedene (Stress-) Faktoren eingeleitet werden können, den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Interessanterweise ist das E6 Onkoprotein in der Lage, beide Signalwege zu blockieren (Howie et al., 2009).

Der extrinsische Weg wird durch extrazelluläre Signale ausgelöst, die zur Aktivierung von sogenannten „Todesrezeptoren“, die auf der Zellmembran sitzen, führen. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der TNF („*Tumor necrosis factor*“) Rezeptoren. Durch die Bindung ihres Liganden, wie bspw. TRAIL trimerisieren die Rezeptoren. Dadurch werden an ihrer intrazelluläre Domäne Adaptormoleküle, wie FADD, TRADD („*TNF R1-associated death domain*“) rekrutiert, die zusammen mit den Vorläufer-Caspasen 8 und 10 den DISC- („*death inducing signaling complex*“) Komplex bilden. Der „DISC“ induziert die Spaltung und Aktivierung der Caspasen 8 und 10, die wiederum die „Exekutor-Caspasen“, wie Caspase 3 und 7 spalten und somit den Zelltod einleiten. Für E6 konnte gezeigt werden, dass es den extrinsischen Signalweg zu einem frühen Zeitpunkt noch inhibieren kann, indem es direkt mit dem Rezeptor oder den Adaptermolekülen interagiert und so die Aktivierung verhindert (Filippova et al., 2002; Duerksen-Hughes et al., 1999) (Abb. 7 Nr. 1 + 2).

Der intrinsische Signalweg wird durch apoptotische Stimuli ausgelöst, die innerhalb einer Zelle entstehen. Beispiele dafür sind DNA-Schäden, oxidativer Stress, Nährstoffmangel, Chemotherapeutika oder onkogene Stimuli (Salomon et al., 1995; Kaufmann et al., 2000; Wang et al., 2001). Diese Stress-Faktoren aktivieren zahlreiche Signalwege, die alle am Mitochondrium enden. Wird die intrinsische Apoptose induziert, so werden pro-apoptotische BH3 Proteine aktiviert und heben die Funktionen der anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder auf. Bax und Bak formieren Poren in der mitochondrialen Membran, was zum Austritt von mitochondrialen Proteinen wie Cytochrom c, AIF („apoptosis inducing factor“), Smac/Diablo und Endonuklease G in das Zytoplasma führt. Diese Proteine bilden das „Apoptosom“, das ähnlich wie der DISC einen „Apoptose-Signalkomplex“ darstellt und ebenfalls in der Spaltung von Caspase 3 und 7 und schließlich im Zelltod resultiert. Die E6 Proteine von HR und LR HPV sind in der Lage, Bak zu binden, dessen proteasomalen Abbau einzuleiten und somit die Porenbildung zu verhindern (Jackson et al., 2000; Thomas et al., 1998). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass E6 auch mit Proteinen interagiert, die beide Apoptosewege verknüpfen. So aktiviert E6 zum Beispiel die Expression der Apoptoseinhibitoren cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis 2“) und Survivin (James et al., 2006; Yuan et al., 2005 ), welche „Exekutor-Caspasen“ inhibieren können (Abb.7).



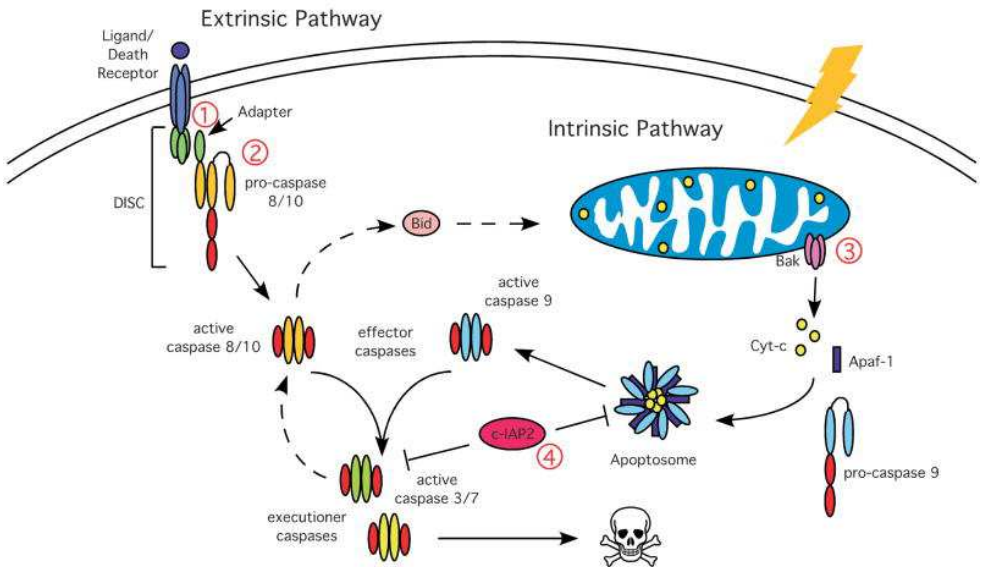


Abb. 7: Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung des Liganden an einen Rezeptor der TNF-Familie eingeleitet. Durch die Ligandenbindung induzierte Trimerisierung der Rezeptoren werden Adaptermoleküle (FADD, TNFR) rekrutiert und formieren zusammen mit der Pro-Caspase 8 den „DISC- Komplex“ (Nr.1+2). Das HPV E6 Protein kann diese Assoziation der Adaptermoleküle verhindern und zusätzlich deren Degradation einleiten (Duerksen-Hughes et al., 1999; Filippova et al., 2002). Die Aktivierung der intrinsischen Signalkaskade führt in der mitochondrialen Membran zur Porenbildung. Die Poren bestehen aus den pro- apoptotischen BH3- Proteinen Bak und Bax. Durch die Pore werden mitochondriale Proteine, darunter Cytochrom c, in das Zytosol freigesetzt. Die mitochondrialen Proteine bilden zusammen mit der Pro-Caspase 9 das Apoptosom, welches für die Spaltung der Caspasen 3 und 7 verantwortlich ist. E6 verhindert die Porenbildung indem es an Bak bindet und es über E6AP der Degradation zuführt (Thomas et al., 1998;

Thomas et al., 1999; Faderl et al., 1999; Underbrink et al., 2008). Zusätzlich wurde gezeigt, dass HPV16E6 die Expression von zwei Apoptoseinhibitoren (*inhibitor of apoptosis proteins, IAP*) c-IAP2 (James et al., 2006; Yuan et al., 2005) und Survivin (Borbely et al., 2006) hochreguliert. IAPs binden und inaktivieren die „ausführenden“ Caspasen.

Eine weitere Fähigkeit der Onkoproteine E6 und E7 die zelluläre Telomeraseaktivität zu induzieren, ist für die Immortalisierung von infizierten Zellen essenziell (Liu et al., 2008; Liu et al., 2009). Bei der Telomerase handelt es sich um ein zelluläres Enzym, welches während der Replikation für eine Verlängerung der Chromosomenenden, der Telomere, sorgt. Replikationsbedingt treten Chromosomenverkürzungen auf. Um den Verlust von genetischer Information zu verhindern, elongiert die Telomerase die verkürzten Enden. In Abhängigkeit von der Anzahl der Teilungen wird die Expression der Telomerase eingestellt, wodurch es zur Zellalterung (Seneszenz) und einer begrenzten Teilungskapazität kommt.

Für HPV E6 ist nachgewiesen, dass es die Expression des hTERT-Gens, welches die Telomerase kodiert, durch einen E6AP-abhängigen Mechanismus induziert, in dem die hTERT-Transkriptionsaktivatoren, wie c-Myc und SP1 rekrutiert und Repressoren, wie NFX1-91 und USF1/2, inhibiert werden (Gewin et al., 2004; Xu et al., 2008). Zudem führt der E6/E6AP-Komplex zu einer erhöhten Histonacetylierung am hTERT-Promotor (James et al., 2006).

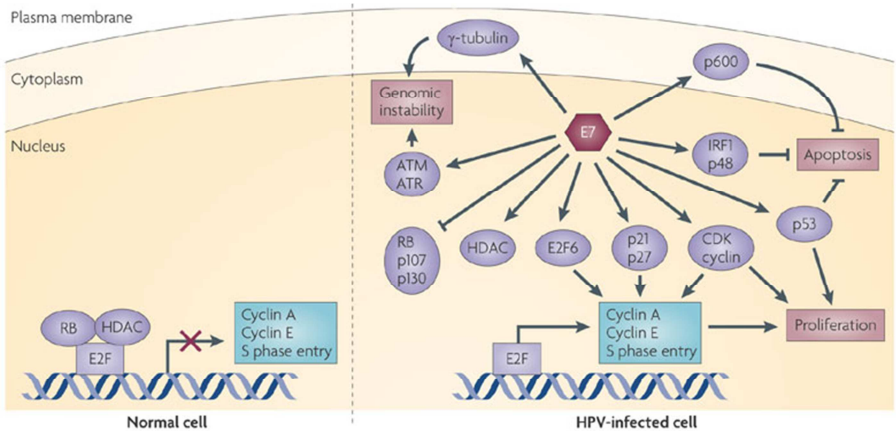
Die HPV E7 Proteine werden hingegen eher mit den Mechanismen der alternativen Telomerverlängerung (ALT, "alternative lengthening of telomeres") assoziiert (Moody et al., 2010). Das 100 AS große E7 Protein der HR- HPV ist in der Lage, alleine primäre Keratinozyten zu immortalisieren. In Kooperation mit E6 wird die Effizienz der Immortalisierung deutlich gesteigert. Dagegen kann HR HPV E6 alleine Keratinozyten nicht transformieren (Halbert et al., 1991; Hawley-Nelson et al., 1989; Sedman et al., 1991).

E7 Proteine besitzen keinerlei enzymatische oder DNA-Bindungsaktivitäten. Ihre Wirkung wird über die Bindung an unterschiedliche zelluläre Faktoren vermittelt. Eine der Hauptfunktionen dieser Proteine ist die Dereglulation des Zellzyklus. Die am besten charakterisierte Interaktion von E7 mit zellulären Proteinen sind die Wechselwirkungen mit Mitgliedern der Retinoblastoma- (pRb) Familie.

Sowohl HR wie auch LR E7 Proteine sind in der Lage pRB, p107 und p130 zu binden (Ciccolini et al., 1994; Munger et al., 1989), wodurch es zu einer Aktivierung des Zellzyklus kommt (Abb. 8). Die Interaktion erfolgt über ein konserviertes LXCXE Motiv im N-Terminus der Proteine (Munger et al., 1989) und die HR E7-Proteine induzieren eine proteasomale Degradation von pRb (Boyer et al., 1996; Huh et al., 2007). Rb-Proteine kontrollieren den Übergang von der G1 in die S-Phase, indem sie die Proteine der Transkriptionsfaktorenfamilie E2F binden und damit die Transkription der S-Phasen-Genen verhindern. In nicht-infizierten Zellen wird pRb von CDK/Zyclin-Komplexen hyperphosphoryliert und dissoziiert so von E2F-Transkriptionsfaktoren. E2F aktiviert

daraufhin zahlreiche Gene, die für die DNA-Synthese benötigt werden (Stevaux et al., 2002).

Parallel zu dieser indirekten E2F Aktivierung wurde für HPV16 E7 eine direkte Interaktion mit Proteinen der E2F-Familie (E2F1 und E2F6) belegt, wodurch sich die Aktivierung des Zellzyklus weiter verstärkt (Hiebert et al., 1992; Frolov et al., 2004; Hwang et al., 2002; McLaughlin-Drubin et al., 2008). Darüber hinaus bindet E7 an die CDK-Inhibitoren p21 und p27 und verhindert so, dass diese den Zyklin/cdk2-Komplex während des G1/S-Übergangs blockieren (Funk et al., 1997; Helt et al., 2002). Des Weiteren induziert E7 zyklinabhängige Kinasen, welche für die Progression des Zellzyklus notwendig sind (Zerfass et al., 1995). Das HR E7 Protein interagiert zudem (über zu den Rb-Bindungsmotiven verschiedenen Sequenzen) mit den Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 (Longworth et al., 2006) und kann dadurch die Transkription positiv oder negativ beeinflussen (Longworth et al., 2004; McLaughlin-Drubin et al., 2008 ; Brehm et al., 1998)(Abb. 8). Die E7-Rb-HDAC Interaktion ist notwendig für die Aufrechterhaltung des episomalen Status der viralen Genome und die Einleitung der S-Phase nach Zelldifferenzierung und daher essentiell für die produktive virale Replikation (Longworth et al., 2005).



Nature Reviews | Cancer

Abb. 8: HPV E7 manipuliert zahlreiche zelluläre Mechanismen. Das E7 Protein beeinflusst neben apoptotischen Regulationsmechanismen und Genomstabilität hauptsächlich die Proliferation. In nicht infizierten Zellen wird die Zellzyklusprogression durch die Komplexbildung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, Cyclin-CDK-Komplexen und HDACs reguliert. In HPV-infizierten Zellen führt die Bindung des E7 Proteins an pRb und dessen Abbau zu der Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren und damit wird der S-Phase-Eintritt forciert. Zudem wird durch Interaktion mit verschiedenen Cyclin-CDK-Komplexen der Zellzyklus unabhängig von externen Stimuli vorangetrieben. Über die Interaktion mit p600 wird die Apoptose, die durch den Verlust des Kontakts zum Zellverbund induziert wird („anchorage independent Growth- Anoikis“), verhindert. Modifiziert nach (Moody et al., 2010)

Zusammenfassend ist die Konsequenz der E6/ E7-Expression die Aufhebung der Zellzykluskontrolle, sowie das Verhindern der Apoptose, was eine unkontrollierte Teilung der Zelle zur Folge hat.

### **2.5 Zelluläre Seneszenz**

Charakteristisch für zelluläre Seneszenz ist, dass Zellen ihre Fähigkeit verlieren zu proliferieren. Daher wird die Seneszenz auch als dauerhafter Zellzyklusarrest definiert (Hayflick et al., 1961). Senescente Zellen sind in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert und auch nicht mehr in der Lage nach mitogener Stimulation in die S-Phase einzutreten (Sherwood et al., 1988). Damit einhergehen funktionelle und morphologische Änderungen. Die Zellen erscheinen abgeflachter, verlieren ihre ursprüngliche Form und werden größer. Bedingt durch die auslösenden Faktoren unterscheidet man verschiedene Formen der Seneszenz. Zum einem gibt es die replikative Seneszenz, die durch Telomerverkürzung induziert wird. Im Gegensatz dazu wird die onkogen-induzierte Seneszenz auf eine erhöhte Expression von p16 und p14ARF oder anderen Stressfaktoren wie Onkogenen oder reaktive Sauerstoff-Spezies zurückgeführt (Collado et al., 2005). Sie stellt eine Art Schutzmechanismus vor unkontrollierter Zellteilung dar. Eine dritte Form der Seneszenz wird durch Doppelstrangbrüche in der DNA ausgelöst und ist abhängig von den „Checkpoint“ Kinasen ATM und Chk2 (Di Leonardo et al., 1994). Es gibt verschiedene Biomarker für die Seneszenz, jedoch beschränken sie sich meist auf einzelne Zelltypen. Der zuverlässigste Biomarker für die Seneszenz ist die Aktivität der

*Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal)* (Dimri et al., 1995). Die Ursache der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität war lange Zeit unklar. Untersuchungen von Kurz und Mitarbeitern an humanen Endothelzellen ergaben, dass bei zunehmender Zellalterung der lysosomale Anteil und gleichzeitig der Gehalt an lysosomaler  $\beta$ -Galaktosidase ansteigen. Dadurch wird die gesteigerte Enzymaktivität bei einem suboptimalen pH-Wert (pH=6) detektierbar (Kurz et al., 2000). Die molekularen Seneszenz-Mechanismen sind noch nicht endgültig aufgeklärt. Es ist teilweise schwer zu unterscheiden, ob Signaltransduktionswege ursächlich oder seneszenzverursacht ablaufen. Ein Problem dabei ist, dass der Seneszenzprozess nicht in allen Zellen einheitlich ist (Zhang et al., 2003). Bislang sind zwei Signaltransduktionswege beschrieben. Der erste Weg wird über die p53-p21 Achse vermittelt (Webley et al., 2000). P21 kann nach gesteigerter Expression über cdk2-Inhibierung den Zellzyklus arretieren (Sherr et al., 1999). Der zweite diskutierte Weg geht über die pRb-p16 Achse. In vielen seneszenten Zellen kann eine starke p16-Expression nachgewiesen werden. Die Inhibition des Zellzyklus erfolgt hierbei über die Bindung an Zyklin D-abhängige Kinasen, wodurch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) gehemmt wird. Das hypophosphorylierte pRb bindet und inaktiviert E2F-Transkriptionsfaktoren, dadurch wird die Expression von S-Phase-Genen inhibiert (Sherr et al., 1999).

## 2.6 Der Tumorsuppressor p14ARF

Eines der Zielgene von E2F1 kodiert für den Tumorsuppressor p14ARF („*alternativ reading frame*“). P14ARF ist ein alternatives Spleißprodukt des INK4a/ARF Locus. Der humane CDKN2A Locus kodiert für zwei unterschiedliche Proteine, p16 und p14ARF (p19 in Mäusen) (Sherr 2001) (Abb. 9). Die beiden Transkripte unterscheiden sich im ersten Exon, was zu einer alternativen Proteintranslation führt. Daher weisen p14ARF und p16 Proteine keinerlei Sequenzhomologie auf.

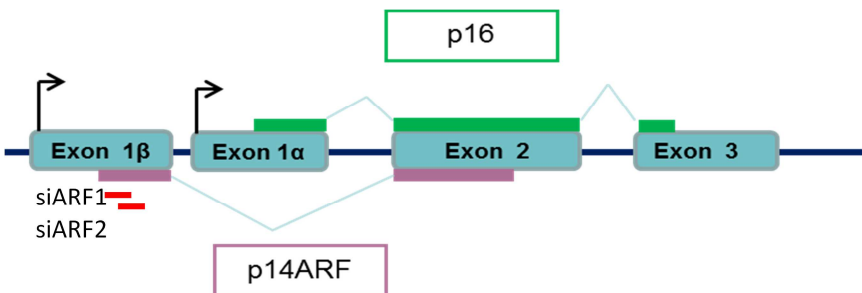


Abb. 9: Schematische Darstellung des INK4a/ARF Locus. Die alternativen ersten Exons (1 $\alpha$  und 1 $\beta$ ) werden von verschiedenen Promotoren transkribiert. Die Positionen der verwendeten siRNAs gegen p14ARF sind in Rot eingezeichnet.

Für p14ARF und p16 konnte in verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass sie Tumorsuppressorfunktionen besitzen. Zusammen mit p53 und pRb sind p14ARF und p16 Teil eines komplexen Signal-Netzwerkes, das die Antwort auf onkogene Signale reguliert. Folglich ist in vielen humanen Tumoren p14ARF



und p16 funktionell inaktiviert. Dies wird entweder durch Deletion, Mutation oder epigenetischem „Silencing“ vermittelt (Sharpless et al., 1999; Rocco et al., 2001; Ozenne et al., 2010). Nach onkogenen Stimuli stabilisiert p14ARF (bzw. p19) p53, indem es die Ubiquitinligasen, die für den proteasomalen Abbau verantwortlich sind, inhibiert. Dadurch wird ein Wachstumsarrest und Apoptose in der betroffenen Zelle eingeleitet (Pomerantz et al., 1998; Stott et al., 1998). Darüber hinaus wurden auch p53 unabhängige Funktionen von p14ARF beschrieben. So kann p14ARF direkten Einfluss auf die Genexpression nehmen, in dem es mit c-Myc und E2F interagiert, was die Verminderung ihrer transkriptionellen Aktivität zur Folge hat (Eymin et al., 2001; Qi et al., 2004; Datta et al., 2004).

Das humane p14ARF ist mit 132 AS wesentlich kleiner als das murine p19ARF (169 AS). Kennzeichnend für beide Proteine ist, dass sie zu über 20% aus Arginin bestehen und keine Lysine besitzen. Aufgrund der hohen Basizität wird angenommen, dass ARF alleine unstrukturiert vorliegt und Komplexe mit anderen Molekülen eingeht, um einerseits seine Struktur zu stabilisieren und andererseits seine Ladungen zu neutralisieren. P19ARF und p14ARF weisen keinerlei Homologien zu anderen Proteinen auf. Die aminoternale Region zwischen p14ARF und p19ARF ist konserviert und für die nukleäre Lokalisation, MDM2 Interaktion und die Fähigkeit den Zellzyklus zu arretieren, verantwortlich (Gallagher et al., 2006).

Durch die Charakterisierung transgenerer Mäuse, bei denen einzelnen Exons innerhalb des Lokus durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurden, konnte eine Tumorsuppressorrolle der INK4a Proteine etabliert werden. Es

stellte sich heraus, dass Mäuse, denen eines der Gene fehlte, wesentlich anfälliger waren gegenüber kanzerogenen Substanzen (Serrano et al., 1996; Sharpless et al., 2001; Sharpless et al., 2004). Unterschiede zwischen p14ARF und p19ARF wurden erst einige Jahre später genauer beschrieben (Wadhwa et al., 2002; Sharpless et al., 2004). Beispielsweise fehlen dem humanen Protein Domänen, die bei der p53-unabhängigen Apoptoseinduktion eine Rolle spielen (Matsuoka et al., 2003). Dahingegen besitzt p14ARF die Fähigkeit die Sumoylierung seiner Bindungspartner zu induzieren (Xirodimas et al., 2002). Die Überexpression von p19ARF führt in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zur Seneszenz. Murine Zellen, denen p19ARF fehlt, können keine Seneszenz einleiten (Sharpless 2005). Im Gegensatz dazu scheint p14ARF nicht erforderlich für diesen Prozess zu sein und p14ARF-negative Zellen können ebenfalls die Seneszenz induzieren (Sharpless 2005). Auch die Expression der beiden Proteine wird auf unterschiedliche Weise reguliert. P19ARF wird durch unterschiedliche Onkogene wie c-myc, E1A, E2F1, Ras und vAbl induziert (Palmero et al., 1998; Groth et al., 2000). Zudem können Seneszenzinhibitoren wie bmi-1, bck6, tbx3 (T-box Protein 3) die Transkription von p19ARF hemmen. Zur Regulation von p14ARF ist weniger bekannt. Die Transkription wird von E2F1 induziert, nicht jedoch von Ras oder Myc (Ferbeyre et al., 2000; Wei et al., 2001; Berkovich et al., 2003). Inhibiert wird die Transkription von tbx-2 und tbx-3 über das Initiatorelement des Promotors (Lingbeek et al., 2002) jedoch nicht von bmi-1. Weiterhin wird p14/19ARF posttranslational reguliert. Das murine und das humane Protein sind relativ stabile Proteine mit einer Halbwertszeit von einer bis sechs Stunden. Die ARF-Degradation

erfolgt proteasomal, obwohl p14/p19ARF keinen Lysinrest besitzt (Pollice et al., 2008). Unlängst wurde eine für p14ARF spezifische Ubiquitinligase (Snapir et al., 1998) identifiziert, die eine Lysin-unabhängige Degradation von p14ARF herbeiführt (Chen et al., 2010; Chen et al., 2010; Kuo et al., 2004). Die Stabilität des Proteins wird hauptsächlich durch die Interaktion mit Nucleophosmin (NPM) vermittelt und die dadurch bedingte Lokalisation im Nukleolus bietet Schutz vor dem proteasomalen Abbau (Rodway et al., 2004). NPM ist ein multifunktionelles, hochkonserviertes Protein, das hauptsächlich in den Nucleoli vorkommt. Die Expression korreliert mit den Zellzyklusphasen und wird durch mitogene Stimuli aktiviert (Li et al., 2008). NPM ist an einer Reihe verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt. Unter anderem reguliert es die Ribosomenbiogenese und die Verdopplung der Zentrosome. Darüber hinaus rekrutiert es Proteine in den Nucleolus und wird mit der „DNA Damage Response“ in Verbindung gebracht (Szebeni et al., 1999; Gjerset 2006; Grisendi et al., 2006; Okuda et al., 2000). Zellen, die große Mengen an NPM exprimieren, sind resistent gegen UV- oder Hypoxie-induzierter Apoptose (Li et al., 2004; Wu et al., 2002). Umgekehrt verzögert der Verlust von NPM den Eintritt in die M-Phase (Jiang et al., 1999). Die biologischen Konsequenzen, die sich aus der ARF-NPM Interaktion ergeben, sind Gegenstand vieler Diskussionen. Unklar ist, welchen Einfluss p14ARF auf NPM hat. Ferner wird diskutiert, ob p14ARF innerhalb des Nucleolus, wo es hauptsächlich vorliegt, aktiv ist oder ob es seine Funktionen eher im Nucleoplasma ausübt. Die vorwiegende Meinung geht dahin, dass p14ARF auch innerhalb des Nucleolus einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstum der Zelle hat. In

der Tat wurde gezeigt, dass p14ARF die Transkription und Prozessierung der ribosomalen RNA verzögert (Itahana et al., 2003; Ayrault et al., 2004; Sugimoto et al., 2003). Außerdem beeinträchtigt p14ARF den Transport von NPM ins Zytoplasma und erschwert den ribosomalen Export (Yu et al., 2006; Bertwistle et al., 2004). Allerdings erforderten diese beobachteten Effekte eine Überexpression des Proteins und konnten unter physiologischen Bedingungen nicht wiederholt werden (Sherr 2006). Eine andere Sichtweise ist, dass p14ARF im Nukleolus, gebunden an NPM, inaktiv vorliegt, jedoch nach Verlagerung in das Zytoplasma Komplexe mit z.B. MDM2 eingeht und so seiner Tumorsuppressor-Rolle nachkommt (Weber et al., 1999; Rodway et al., 2004; Gjerset et al., 2006; Korgaonkar et al., 2005).

Die am besten untersuchte Funktion des p14ARF Tumorsuppressors ist die Stabilisierung von p53 nach onkogenen Stimuli, die in einem Wachstumsarrest und Apoptose resultiert (Kamijo et al., 1997). Dabei inhibieren p19ARF und p14ARF die E3-Ubiquitinligasen, die für die Degradation von p53 verantwortlich sind (Abb. 8). Diese Funktion wurde 1998 zuerst für die E3 Ubiquitinligase MDM2 (Pomerantz et al., 1998; Stott et al., 1998) und im Jahr 2005 auch für ARF-BP1 Mule (weitere Bezeichnungen: HECTH9/LASU1/UREB1/HUWE1) beschrieben (Abb. 10). P14ARF kann durch zwei Mechanismen MDM2 inhibieren. Einerseits bindet p14ARF MDM2 und hält es so im Nukleolus (Weber et al., 1999), andererseits gibt es Evidenz, dass p14ARF auch direkt die Aktivität von MDM2 inhibiert (Lin et al., 2001; Llanos et al., 2001; Midgley et al., 2000).

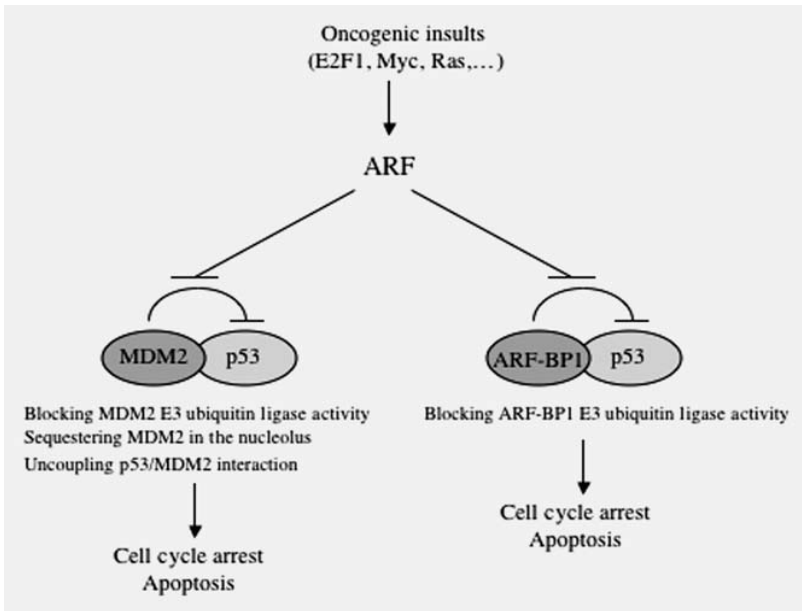


Abb. 10: Modell der p53 Regulation durch p14ARF.

Onkogene Stimuli führen zu einer Anreicherung von p14ARF. Dies führt dazu, dass p53 stabilisiert wird über die Inhibition der Ubiquitinligasen MDM2 und ARF-BP1, die für den proteasomalen Abbau von p53 verantwortlich sind. Modifiziert nach (Ozenne et al., 2010).

Chen et al. zeigten 2005, dass Ligaseaktivität von ARF-BP1 (im folgenden Mule genannt) ebenfalls durch die direkte Interaktion mit dem N-Terminus von p14ARF blockiert wird. Mit der Degradation von p53 belegten Chen et al. (Chen et al., 2005) eine anti-apoptotische Rolle von ARF-BP1/Mule, während Zhong et al. im selben Jahr (Zhong et al., 2005) zeigten, dass Mule für die

Degradation des anti-apoptotischen Mcl-1 Proteins verantwortlich ist (Abb. 11).

Mcl-1 gehört zur Familie der Bcl-2 Proteine und verhindert hauptsächlich die Porenbildung in der mitochondrialen Membran (Michels et al., 2005).

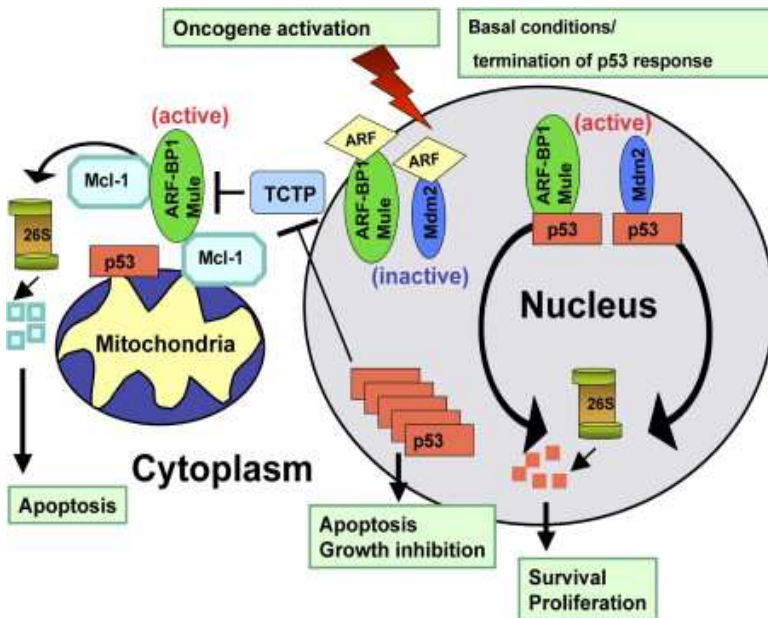


Abb. 11: Interaktion von Mule und Mule/ARF. In einer normalen Zelle muss die p53 Antwort begrenzt werden. Dazu wird p53 von Mule (ARF-BP1) und MDM2 ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Die Anwesenheit von ARF inhibiert die Aktivität der beiden Ligasen, was zu einer Akkumulation von p53 führt und in Apoptose (Humbey et al., 2008) resultiert. Ist Mule im Zytoplasma aktiv, führt dies zur Ubiquitinierung von Mcl-1 und dessen Degradation, was wiederum die

Apoptose begünstigt. Modifiziert nach Shmueli 2005 (Shmueli et al., 2005).

Mule ubiquitiniert auch c-Myc, allerdings führt die Modifizierung nicht zum proteasomalen Abbau, sondern verändert die transkriptionellen Eigenschaften von c-Myc (Adhikary et al., 2005). Des Weiteren wurden Interaktionen mit CDC6 (Hall et al., 2007), Histonen (Liu et al., 2005), TopBP1 (Herold et al., 2008), HDAC2 (Zhang et al., 2011), DNA-Polymerase  $\beta$  und DNA-Polymerase  $\lambda$  (Parsons et al., 2009) beschrieben. Für letztere konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Mule Aktivität durch p14ARF sogar die DNA-Reparatur verstärkt. Was wiederum darauf hindeutet, dass p14ARF in bestimmten Situationen auch eine Rolle beim Überleben der (Tumor-)Zelle spielen könnte (Parsons et al., 2009). Unlängst zeigten die Ergebnisse von Olivier Humbey, dass der Verlust von ARF durch RNA Interferenz die Progression bestimmter Tumoren deutlich vermindert, was gegen eine ausschließliche Rolle als Tumorsuppressor spricht (Humbey et al., 2008).

### **Zielstellung**

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass das E8<sup>E2C</sup> Protein von HPV31 einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von HPV-positiven Karzinomzellen (HeLa) hat und die E6/E7-Transkription reprimiert (Stubenrauch, Straub et al. 2007). Unklar war, ob die Beeinträchtigung des Zellwachstums auf einem Zellzyklusarrest oder Apoptoseinduktion beruht und ob es E6/E7-unabhängige Effekte gibt. Daher wurden die Konsequenzen einer E8<sup>E2C</sup> Expression in HPV-positiven und -negativen Zelllinien genauer charakterisiert. Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass p14ARF, welches als Tumorsuppressor beschrieben wurde, in HPV-positiven Karzinomzellen hoch exprimiert wird und dass der Verlust von p14ARF die Apoptose in den Zervixkarzinomzellen signifikant erhöht. Die Charakterisierung und Erforschung dieser unerwarteten Ergebnisse bildet den zweiten Aspekt dieser Arbeit



### 3 Material und Methoden

#### Verwendete Abkürzungen

$\alpha$	“anti-„
A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Tissue Type Culture Collection"
ARF	“alternative reading frame”
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CxCa	Zervixkarzinom
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
ca.	circa
cDNA	copy-DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP	”crossing point”
CS	Kälberserum
CxCa	Zervixkarzinom
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco’s modifiziertes, minimal essentielles Medium

## Material und Methoden

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
E6AP	“E6-associated protein“
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin-Epitop
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2- Ethansulfonsäure
HPV	Humanes Papillomvirus
HR	„High Risk“
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
LCR	siehe URR
LR	„Low Risk“
μ	micro
mM	Milimolar
M	Molar
min	Minute
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Normal

## Material und Methoden

---

Nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierten $\beta$ -Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	"small hairpin" RNA
siRNA	"small interfering" RNA
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodaminester
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
URR	"upstream regulatory region"
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
V/V	Volumen-/Volumenverhältnis
W/V	Gewichts-/Volumenverhältnis
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat
WT	Wildtyp

## Material und Methoden

---

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Anwendung</i>
FuGene® HD Transfection Reagent	Roche Diagnostics; Promega	Transfektion von Plasmid-DNA
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen	Transfektion von siRNA
LightCycler SYBR Green I Master	Roche	qRT-PCR
QIAgen Plasmid Midi Kit	Qiagen	Plasmidisolierung
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidisolierung
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	DNA-Gelextraktion
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas	DNA-Ligation
SuperSignal® West Dura Extended Duration	Pierce (Fisher Science)	Western Blot-Detektion
RNEasy® Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolation
QIAshredder® Kit	Qiagen	Homogenisierung des Zelllysats
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	Reverse Transkription, cDNA Synthese
One Step RT-PCR	Qiagen	Reverse Transkription
WST-1	Roche	Viabilitäts Assay
TMRE (T669)	Invitrogen	Messung des mitoch. Membranpotentials
Propidium Iodid	AppliChem	Messung des DNA Gehalts
rhTRAIL (375-TL)	R&D	Apoptoseinduktion
x-Gal	PeQlab	Seneszenzfärbung
MG132 (540411)	Calbiochem	Proteasomeninhibitor
DAPI	Fluka	Interkalierender Fluoreszenzfarbstoff

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien im Reinheitsgrad p.a. („*pro analysis*“, zur Analyse) von den Firmen AppliChem, BioRad, Biozym, Fluka, Medac, Merck, Perkin-Elmer, PeQlab, Roche, Roth und Sigma bezogen.

##### **3.1.1.1 Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien**

##### **3.1.1.2 Enzyme**

Restriktionsenzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

- Fermentas
- New England Biolabs

##### Sonstige Enzyme:

- Alkalische Phosphatase (New England Biolabs)
- Proteinase K (Fermentas)
- Pyrobest DNA-Polymerase (Takara)
- RNase A (Roche)
- T4-DNA-Ligase (Fermentas)

##### **3.1.1.3 Antikörper**

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

## Material und Methoden

---

### Primärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Spezies, Klonalität</i>	<i>Hersteller (Bestellnummer)</i>	<i>Eingesetzte Verdünnung WB/IF</i>
p14ARF	mouse monoclonal	Santa Cruz BT (sc-73434)	1:800 / 1:75
HSP90	mouse monoclonal	Santa Cruz BT (sc-69703)	1:2000
HA	rabbit polyclonal	Covance (MMS-101P)	1:1000 / 1:50
HDAC2	mouse monoclonal	Santa Cruz BT (sc-55542)	1:750
Mcl-1	rabbit polyclonal	Santa Cruz BT (sc-815)	1:800 / 1:50
Mule	rabbit polyclonal	Bethyl (A300-486)	1: 300 / 1:30
NPM	rabbit polyclonal	Santa Cruz BT (sc-5564)	1:600 / 1:50
p53	mouse monoclonal	Santa Cruz (sc-126)	1:1000
TRIM28 (=KRIP-1)	rabbit polyclonal	Transduction Laboratories	1:1000
$\alpha$ -Tubulin	mouse monoclonal	Calbiochem (CP06)	1:1000
Caspase-3	Goat monoclonal	R&D (AF-605-NA)	1:1000
p16	mouse monoclonal	Santa Cruz BT (sc-56330)	1:1000

## Material und Methoden

---

### Sekundärantikörper

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

<i>Antigen</i>	<i>Spezies, Klonalität</i>	<i>Hersteller (Bestellnummer)</i>	<i>Eingesetzte Verdünnung</i>
anti-rabbit IgG	swine polyclonal	Dako (P0399)	1:1000
anti-mouse IgG	rabbit polyclonal	Dako (P0260)	1:2000
anti- goat IgG	rabbit polyclonal	Dako (P0449)	1:1000

#### Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Hersteller (Bestellnummer)</i>	<i>Eingesetzte Verdünnung</i>
anti-mouse (green)	goat anti-mouse, IRDye 800	Odyssey Infrared Imaging (926-32210D)	1:20000
anti-mouse (red)	goat anti-mouse, IRDye 680	Odyssey Infrared Imaging (926-32211D)	1:20000
anti-rabbit (green)	goat anti-rabbit IRDye 800	Odyssey Infrared Imaging (926-32211D)	1:20000
anti-rabbit (red)	goat anti-rabbit IRDye 680	Odyssey Infrared Imaging (926-32221D)	1:20000
anti- goat (red)	donkey anti goat IRDye 680	Odyssey Infrared Imaging (926-68071)	1:20000

### 3.1.2 Medien und Puffer

#### **Blocking Puffer (für Western Blot)**

TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver

#### **CAPS-Transferpuffer**

10 mM CAPS; 10% (v/v) Methanol; pH 10,3 (eingestellt mit NaOH)

#### **10x DNA-Ladepuffer**

20% (w/v) Ficoll 400;

0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0);

1% (w/v) SDS;

0,25% (w/v) Bromphenolblau;

0,25% (w/v) Xylencyanol

#### **Eosin-Färbelösung**

178 ml Ethanol p.a.,

2 ml Eisessig,

20 ml 1%-ige Eosinlösung (w/v)

#### **4x Proteinauftragungspuffer**

Roti®-Load 1 (Carl Roth)

#### **Sammelgelpuffer**

1,5 M Tris/HCl; pH 6,8



### **5x SDS-PAGE Laufpuffer**

125 mM Tris/HCl;  
0,96 M Glycin;  
17,3 mM SDS

### **50x TAE Puffer**

2 M Tris;  
1 M Essigsäure;  
0,1 M EDTA; pH 8,5

### **10x TBS**

500 mM Tris;  
1,5 M NaCl; pH 7,5

### **1x TBS-T**

TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma)

### **Trenngelbuffer**

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

### **10x PBS**

137 mM NaCl;  
2,7 mM KCl  
1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2

### **1x PBS-T**

PBS mit 0,1% (v/v) Tween 20 (Sigma)

### **RIPA-Puffer**

50 mM Tris/HCl pH 7,5;  
150 mM NaCl;  
0,1 % (v/v) SDS;  
0,1% (v/v) Natrium-Deoxycholat;  
1 % (v/v) NP-40;  
1mM DTT;  
Protease-Inhibitoren

### **Puffer A (nukleäre Extrakte)**

10mM Hepes / KOH pH 7,9;  
1,5mM MgCl<sub>2</sub>;  
10mM KCl;  
0,5mM DTT  
Proteaseinhibitor

### **Puffer C (nukleäre Extrakte)**

20mM Hepes / KOH pH 7,9  
1,5mM MgCl<sub>2</sub> ;  
420mM NaCl;  
25% (v/v) Glycerin;  
0,2mM EDTA;  
0,5mM DTT ;  
Proteaseinhibitor

### **Nicoletti-Puffer (PI-Puffer)**

0,1% Na-Citrat;  
0,1% Triton X-100;

50 µg/ml Propidium Iodid

### **Färbelösung für Seneszenz assoziierte $\beta$ -Galaktosidase**

1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl P3-D-Galaktosidase (X-Gal)

40mM Zitronensäure/Natriumphosphat, pH 6.0;

5mM Kaliumferrozyanid;

5mM Kaliumferrizyanid;

150mM NaCl;

2mM MgCl<sub>2</sub>

### **Medien für Bakterienkultur**

#### **LB-Medium**

(Luria-Bertani-Medium)

20g LB Broth Base (Invitrogen) auf 1 Liter H<sub>2</sub>O

#### **SOC-Medium**

2% (w/v) Bacto-Trypton,

0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extrakt,

10mM NaCl,

2,5mM KCl,

10mM MgCl<sub>2</sub>,

10mM MgSO<sub>4</sub>,

20mM Glukose

#### **LB-Agar(Luria-Bertani-Agar)**

30 g Lennox L Agar (Invitrogen) auf 1 Liter H<sub>2</sub>O

### **Einfriermedium**

10 mM Tris-HCl pH 7,  
mM MgSO<sub>4</sub>,  
50 % (v/v) Glycerin

### **Medien für die Zellkultur**

#### **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Invitrogen)**

##### **FKS**

Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin und 10% (v/v)  
fötalem Kälberserum (FKS, Seromed Biochrom)

#### **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, Invitrogen)**

##### **CS**

Fertiglösung mit Zusatz von 50 mg/l Gentamycin und 10%  
Kälberserum (CS, Gibco Invitrogen)

#### **E-Medium**

Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (417 µg/ml); Insulin (50 µg/ml);  
Transferrin (50 µg/ml); Trijodthyronin T3 (20 pM); Cholera toxin  
(10 nM); 50% DMEM + 50% DMEM/Ham's F12 1:1; 10µl/ml  
Penicillin/Streptomycin; mit 5% definiertem fötalem Kälberserum  
(HC-FKS; Perbio)

#### **E-Medium FKS**

Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (41µg/ml); Insulin (50µg/ml);  
Transferrin (50µg/ml); Trijodthyronin T3 (20 pM); Cholera toxin  
(10 nM); 50% DMEM; 50% DMEM/Ham's F12 1:1; 10µl/ml

Penicillin/Streptomycin; mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, Seromed Biochrom)

### **PBS Dulbecco's (PAA)**

Fertiglösung ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat

### **Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen)**

0,5 g Trypsin (1:250) und 0,2 g EDTA pro Liter modifizierter PUCK's Salzlösung A

### **Gentamycin (PAA)**

Stammlösung 10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

### **Mitomycin C (Medac)**

Stammlösung 4 mg/ml in PBS

### **OptiMEM (Gibco, Invitrogen)**

Serumreduziertes Medium mit Glutamax-I (L-Alanyl-L-Glutamin)

### **Versene**

PBS-Fertiglösung mit 0,5 mM EDTA

### **Puromycin (Calbiochem)**

Stammlösung 1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

### **G418 (Biochrom)**

Stammlösung 100 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

### **Marker für Gelelektrophoresen**

#### **DNA-Längenstandard**

*1 kb DNA Ladder* (Invitrogen)

#### **Protein-Größenstandard**

*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Fermentas)

*HiMark™ Pre-Stained Protein Standard* (Invitrogen)

#### **Bakterienstämme**

*Escherichia coli* DH5α (Clontech)

### **3.1.3 Eukaryotische Zellen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>
CC7	neu isolierte HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinien (Michnov et al., 2012)
CC10	neu isolierte HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinien (Michnov et al., 2012)
CaSki	HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Pattillo et al., 1977)

## Material und Methoden

---

HeLa	HPV18-positive Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey et al., 1952)
HeLa pInd 31E8 <sup>E2C</sup> -HA	HeLa Zellen, die mit dem Plasmid pInducer 20 31 E8 <sup>E2C</sup> -HA stabil transduziert wurden
HEK293T Human Embryonic Kidney	Humane embryonale Nierenzelllinie, immortalisiert mit Adenovirus E1A und SV40 Large-T-Antigen (Graham et al., 1977)
HEK 293T pRESpuo E8 <sup>E2C</sup> HA	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
HEK 293T pRESpuo E8 <sup>E2C</sup> KWK HA	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> KWK HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
HEK 293T pRESpuo E8 <sup>E2C</sup> 118/119 HA	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> 118/119 HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
HEK 293T pRESpuo E8 <sup>E2C</sup> KWK-118/119 HA	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> KWK-118/119 HA exprimiert, stabil transfiziert wurde

## Material und Methoden

---

HK52-HPV16E6/E7	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV16-E6/E7 (Reiser, Hurst et al., 2011)
HK52-HPV18E6/E7	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV18-E6/E7 (Reiser, Hurst et al., 2011)
HK58-HPV16E6/E7	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV16-E6/E7 (Reiser, Hurst et al., 2011) )
HK58-HPV18E6/E7	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV18-E6/E7 (Reiser, Hurst et al., 2011)
HK58-HPV31E6/E7	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV31-E6/E7 (Reiser, Hurst et al., 2011)
NHK	normale humane Keratinozyten (Ruesch et al., 1998)
NIH3T3-J2	murine Fibroblasten-Zelllinie (Rheinwald et al., 1975)
RTS3b	p53-defiziente Plattenepithelkarzinomzelllinie (Purdie et al., 1993)
RTS3b pRESpuro E8 <sup>Δ</sup> E2C-HA	RTS3b-Zelllinie, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>Δ</sup> E2C HA exprimiert, stabiltransfiziert wurde



## Material und Methoden

---

RTS3b pRESpuro E8 <sup>E2C</sup> KWK-HA	RTS3b-Zelllinie, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> KWK HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
RTS3b pRESpuro E8 <sup>E2C</sup> 118/119-HA	RTS3b-Zelllinien, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> 118/119 HA exprimiert, stabil transfiziert wurde
RTS3b pRESpuro E8 <sup>E2C</sup> KWK- 118/119-HA	RTS3b-Zelllinien, die mit einem puromycinresistenz Plasmid, welches HPV31 E8 <sup>E2C</sup> KWK-118/119 HA exprimiert, stabil transfiziert wurde

### 3.1.4 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide zur Verwendung in der quantitativen Real-Time PCR wurden von Invitrogen oder Qiagen (QuantiTect) synthetisiert und sind in 5'-3' Orientierung dargestellt.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
β-actin fw	GGAAGGTCCGTGCGAGG
β-actin rev	GAGACGGAGCAGGTCCCA
PGK1 fw	CTGTGGGGGTATTTGAATGG
PGK1 rev	CTTCCAGGAGCTCCAAACTG
Mcl-1 fw	AGAAAGCTGCATCGAACCAT
Mcl-1 rev	CCAGCTCCTACTCCAGCACC
p14ARF fw	AGGGTTTTTCGTGGTTCACAT
p14ARF rev	CTGCCATCATCATGACCT
ITGB4 fw	CCCCCTTCTCCTTCAAGAAC
ITGB4 rev	GCTGACTCGGTGGAGAAGAC
HPV16 E6 fw	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC
HPV16 E6 rev	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC
HPV16 E6/E7 fw	GACAAGCAGAACCGGACAGA
HPV16 E6/E7 rev	ACCGAAGCGTAGAGTCACAC
HPV 18E6 fw	CAGTATTGGAATTACAGAGGTATTTGAATT
HPV 18E6 rev	TGTATAACCCAGTGTTAGTTAGTTTTTCCA
HPV 18E6/E7 fw	ACGACTCCAACGACGCAGAG
HPV 18E6/E7 rev	CGGAATTTCAATTTGGGGCT
Mule (HUWE1)	QT01013943 SG QuantiTect Primer

Die folgenden Oligonukleotide wurden zu Klonierungszwecken verwendet und sind in 5'-3' Orientierung dargestellt:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
hsARF 161 fw	ATGGTGCGCAGGTTCTTGGTGACC
hsARF 559 rev	TACGCCAGGTCCACGGGCAGAC
ARF-siRes-NheI fw	ATATGCTAGCTTTCGATGGTCAGACGCTTCTTGGTGACC
ARF-NheI fw	ATATATGCTAGCAGAACATGGTGCGCAGGTTCTT
ARF-BamHI rev	ATATATGGATCCTCAGCCAGGTCCACGG

Zur Sequenzierung wurden die folgenden in 5'-3' Orientierung dargestellten Oligonukleotide genutzt:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>
hsARF 161 fw	ATGGTGCGCAGGTTCTTGGTGACC
hsARF 559 rev	TACGCCAGGTCCACGGGCAGAC
ARF-siRes-NheI fw	ATATGCTAGCTTTCGATGGTCAGACGCTTCTTG GTGACC

### 3.1.5 siRNAS

## Material und Methoden

---

<u>Bezeichnung</u> <u>(Bestellnummer)</u>	<u>Zielsequenz (5'-3')</u>	<u>Hersteller</u>
Allstars Neg. Control (1027281)		QIAGEN
AllStars Cell Death Control (10727298)		QIAGEN
siARF1	AAAGAACATGGTGCGCAGGTT	QIAGEN
siARF2 (SASI_Hs01_00075731)	GCGAGAACATGGTGCGCAG	Sigma
siMcl-1 (SI02781205)		QIAGEN
sip53 (S605)		Applied Biosystems/Ambion
siMule (siHUWE1 L- 007185-00-0010)		ThermoScientific
si16E6	AAGAGGGTATATGACTTTGCTT	QIAGEN
si16E6/E7	GTGTGACTCTACGCTTCGGTT	QIAGEN
si18E6 (Lea et al., 2007)	CACTTCACTGCAAGACATA	QIAGEN
si18E6/E7(Lea et al., 2007)	CCACCAACGTACACAATGT	QIAGEN
siNPM (SI00300979)		QIAGEN

Die siRNAs wurden nach Anleitung des Herstellers auf eine Konzentration von 20µM eingestellt.

### 3.1.6 Plasmide und Vektoren

**pInducer 20 HPV 31E8 HA** (Meerbrey et al., 2011): Tetrazyklin induzierbares Expressionsplasmid, das die codierende Region von 31 E8<sup>E2C</sup> (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) mit einem internen HA-Epitop enthält.

**pIRES puro3** (Clontech): kommerziell erhältlicher eukaryonter Expressionsvektor, der eine „internal ribosome entry site“ des Encephalomyokarditisvirus (EMCV) unter der Kontrolle eines CMV Promoters enthält. Die IRES erlaubt die Translation des Puromycin-Resistenzgens von einer bicistronischen mRNA. Bei Selektionsdruck wird so sichergestellt, dass das Gen von Interesse exprimiert wird, da die Resistenzbildung nur erfolgt, wenn die gesamte Expressionskassette abgelesen wird.

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

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

**pIRES puro 31E8<sup>E2C</sup> 118/119 HA** : pIRES puro-Expressionsplasmid für HPV31E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region

von E8<sup>Δ</sup>E2C (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) mit einem HA-Epitop in der Hinge-Region enthält. Die Aminosäuresequenz KC an der Stelle 118/119 des Proteins wurde durch MR ersetzt.

**pIRES puro 31E8<sup>Δ</sup>E2C KWK-188/119 HA** : pIRES puro-Expressionsplasmid für HPV31 E8<sup>Δ</sup>E2C, das die codierende Region von E8<sup>Δ</sup>E2C (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295- 3810) mit einem HA-Epitop in der Hinge-Region enthält. Die Aminosäuresequenz KWK an der Stelle 5, 6, 7 des Proteins sind durch AEA ersetzt worden, sowie die Sequenz KC an der Stelle 188/119 durch MR.

**pIRES p14ARF-WT**: pIRES puro-Expressionsplasmid für humanes p14ARF. Über eine RT-PCR wurde die Sequenz umgeschrieben, amplifiziert sowie mit Schnittstellen für NheI und BamHI versehen. Über diese Schnittstellen wurde es in den Vektor pIRESpuro3 kloniert.

**pIRES p14ARF-siRes**: pIRES puro-Expressionsplasmid für humanes p14ARF. Über eine RT-PCR wurde die Sequenz umgeschrieben und amplifiziert sowie mit den entsprechenden Schnittstellen NheI/BamHI versehen. Die Mutation der siRNA bindenden Sequenz erfolgte ebenfalls mittels PCR und einem spezifischen Primer. Über die Schnittstellen wurde es in den Vektor pIRESpuro3 kloniert.

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

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

**pSG-18E8<sup>E2C</sup> HA:** von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV18 E8<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E8<sup>E2C</sup> (HPV18 nt. 1288 – 3996), sowie ein HA-Epitop im nicht konservierten Hinge-Bereich enthält

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

**pSG E9<sup>E2C</sup>-HA** (CRPV): von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für CRPV E9<sup>E2C</sup>, das die codierende Region von E9<sup>E2C</sup>, sowie ein HA-Epitop im nicht konservierten Hinge-Bereich enthält.

**pSG-Mcl-1 K5R:** von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für eine Form von Mcl-1, bei der die ersten 5 Lysine (Position 5, 40, 136, 194, 197) gegen Arginine ausgetauscht wurden, um den proteasomalen Abbau zu verhindern (Snyder et al., 2009). Die Mcl1-K5R Sequenz im pMK Plasmid wurde synthetisch von Life Technologies hergestellt und über einen Restriktionsverdau mit EcoRI und BamHI in den Expressionvektor pSG5 kloniert.

### 3.1.7 Geräte

<b>Gerät und Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Blotkammer, Trans-Blot Cell	Biorad
CO2 Inkubator, C200	Labotect
Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen
Durchlichtmikroskop, DM IRB	Leica
Durchflusszytometer, FACS Calibur	BD
Einfrierbox, MR. FROSTY	Nalgene
Feinwaage, GJ und 770	Kern
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert M200	Zeiss
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern, Sub Cell GT Mini-Sub Cell GT Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
Inkubator (Agar-Platten), Kelvitron® T	Heraeus
Kamerasystem (Agarose-Gele), Gel Doc 2000	Biorad
Kamerasystem (Western Blot), Fluor-S Multi Imager mit Auswertungssoftware QuantityOne	Biorad
Kamerasystem (Western Blot, fluoreszenzbasiert), Li-Cor Odyssey Fc mit Auswertungssoftware „Image Studio“	Li-Cor®
PCR-Maschine, PTC 200 Peltier Thermal	MJ Research



## Material und Methoden

---

Cycler	
pH-Meter, pH526	WTW
Photometer, ND-1000	NanoDrop®
Pipettierhilfe, pipetus® Easypet®	Hirschmann Laborgeräte Eppendorf
Pipetten, Pipetman 10, 20, 200, 1000	Gilson
Real-Time PCR, LightCycler 480	Roche
Reinstwasseranlage, Milli-Q UF Plus	Millipore
Schüttelinkubator, Certomat IS	B. Braun Biotech Int.
Schüttler, Thermomixer 5436 ThermoStat Plus Rocky 3D	Eppendorf Perkin-Elmer
SDS-PAGE-Kammer, Mini Trans-Blot Cell	BioRad
Sonifizierer, SonoPuls	Bandelin
Spannungsversorgung, PowerPac 200 Powerpac 300	BioRad
Sterile Werkbank, HeraSafe	Heraeus
Wasserbad, WB 10	Memmert
Vakuum-Absaugvorrichtung, VacuSafe	IBS
Vortexer, REAXtop	Heidolph
Zentrifugen 5810R, 5417R und 5417C Sorvall	Eppendorf DuPont Instruments
Zählkammer, Neubauer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Assistent

### 3.1.7.1 Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien

<b><i>Gerät und Bezeichnung</i></b>	<b><i>Hersteller</i></b>
Blue-Cap Tubes, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one
Einweg-Skalpell, surgical disposable scalpels	B. Braun Biotech
Gel-Blotting Filterpapier	Whatman
Kryoröhrchen, Cellstar Cryo.s	Greiner
Nitrozellulose-Membran, Protran 0,22 µm	Whatman
PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2 ml	Biozym
Plastikpipette; 2, 5, 10, 25, 50 ml	Becton/Dickinson
Pipettenspitzen gestopft (10, 20, 200, 1000 µl), ART® Aerosol Resistant Tips	Molecular Bio Products
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl (transparent) 10-200 µl (gelb) 200-1000 µl (blau)	Biozym® Greiner

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Mikrobiologische Methoden**

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

Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen

Kulturen für Plasmidisolierung

### **3.2.2 DNA-Methoden**

#### **Standardmethoden**

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

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

### **3.2.2.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die präparative Plasmidisolierung aus Bakterien erfolgte entweder mit "Plasmid Mini-" oder " Plasmid Midi-Kits" (QIAprep®) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA – Elution erfolgte in 50- 200 µl ddH<sub>2</sub>O und die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop) bestimmt.

### **3.2.2.2 DNA-Fragmentelution aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden unter UV-Licht mit Hilfe des "Qiaquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde in 40 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

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

Die Ligation eluierter DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren erfolgte mit dem Rapid DNA-Ligation-Kit (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers. Die dadurch erhaltenen zirkulären Plasmide wurden anschließend in kompetente *E.coli* DH5α transfiziert.

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

Die Oligonukleotidpaare wurden in dem entsprechenden Volumen ddH<sub>2</sub>O gelöst, sodass eine Endkonzentration von jeweils 1 µg/µl gegeben war.

25  $\mu$ l 2x Annealingpuffer wurden mit jeweils 12,5  $\mu$ l der gelösten Oligonukleotiden vermischt und in einem ThermoCycler unter den folgenden Bedingungen inkubiert:

- 5min bei 95°C
- 10min bei 70°C 0.1°/s to 60°C
- 10min bei 60°C 0.1°/s to 50°C
- 10min bei 50°C 0.1°/s to 40°C
- 10min bei 40°C 0.1°/s to 25°C
- 10min bei 25°C 0.1°/s to 4°C
- $\infty$  bei 4°C

### **3.2.2.5 Amplifikation von Gensequenzen mittels PCR**

Zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt.

Dabei werden durch eine hohe Temperatureinwirkung die Doppelstränge der DNA-Matrizen zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. Durch das anschließendes Absenken der Temperatur können die Oligonukleotide an die Einzelstränge hybridisieren. Um die Neusynthese der Doppelstränge auch bei hoher Temperatur durchführen zu können, wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet, in diesem Fall die Pyrobest® DNA-Polymerase (Takara) aus *Pyrococcus* sp., die eine Synthese bei 72°C ermöglicht. Die Temperatur von 72°C wurde gewählt, um unspezifische Bindungen der Primer an die DNA zu verhindern. Das folgende Takara-

Standardprotokoll wurde für die Amplifikation verwendet:

Initiale Denaturierung: 95°C, 5 min

Denaturierung: 95°C, 10 s

Primerbindung: 55°C, 30 s 30 Zyklen

Elongation: 72°C, 60 s

Finale Elongation: 72°C, 10 min Ende: 10°C, ∞

Die folgende Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, durch eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender DNA-Extraktion.

### **3.2.2.6 Sequenzierung**

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Dafür wurden 30-100 ng der aufgereinigten Plasmid-DNA in einem Endvolumen von 30 µl zusammen mit einem geeigneten Sequenzierungsprimer (Konzentration 10 µM) eingeschickt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem BLAST Algorithmus abgeglichen.

## **3.2.3 RNA-Methoden**

### **3.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen**

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde das fertige Reaktionssystem *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) verwendet. Nach der Ernte der Zellen wurde das Zellpellet in Lysepuffer RLT aufgelöst und das Zelllysate anschließend mithilfe des

*QIAshredder® Kits* (Qiagen) homogenisiert. Die RNA wurde mit einem Volumen von 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration mit dem Spektralphotometer ND-1000, Nanodrop® bestimmt.

### **3.2.3.2 Synthese von copy-DNA**

Unter Verwendung des *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) wurde die isolierten gesamtzellulären RNA zu copy-DNA (cDNA) durch reverse Transkription nach Herstellerangaben umgeschrieben. Es wurden immer 1000 ng Gesamt-RNA eingesetzt und das Volumen wurde nach abgeschlossener Reaktion mit 180 µl ddH<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt, so dass man eine Konzentration von 5ng/µl cDNA erhielt.

### **3.2.3.3 RT-PCR**

Die Reverse Transkription der RNA in DNA wurde unter Verwendung des QIAGEN One Step RT-PCR Kits durchgeführt nach Anweisungen des Herstellers.

### **3.2.3.4 Quantitative Real-Time PCR**

Die quantitative RealTime PCR wurde mit dem *LightCycler® 480* (Roche) durchgeführt.

Hierzu wurde ein kommerziell erwerblicher MasterMix *LightCycler® SYBR Green Master I* (Roche) der alle nötigen Komponenten wie dNTPs, Polymerase etc. sowie SYBR Green enthält, benutzt.

SYBR Green lagert sich unspezifisch in doppelsträngige DNA ein, somit kann die Zunahme der entstandenen PCR-Produkte sofort am Ende jedes Zyklus bestimmt werden. Im idealen Fall zeigt diese Kurve deutlich den linear exponentiellen Anstieg der PCR-Produktmenge während der Reaktion. In der Regel wurde pro Reaktionsansatz 10µl Mastermix, insgesamt 4 µl Primer, 1µl Wasser und 5µl cDNA in einem Gesamtansatz von 20 µl zusammen in eine LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 (Roche) pipettiert und mit einer selbstklebenden Abdeckfolie versiegelt. Wobei zuerst der Reaktionsmix von 15µl vorgelegt und anschließend die cDNA hinzugefügt wurde. Passend zu dem zu untersuchenden Gen wurden sequenzspezifische Primer eingesetzt.

Die PCR lief nach folgendem Programm ab:

Denaturierung 15 min bei 95°C 1 Zyklus

Amplifikation 40 Zyklen

Annealing 30 sec 55°C

Elongation 30 sec bei 72°C

Schmelzkurve Hochheizen auf 95°C,

60°C, 2 min

0,1°C/sec bis 95°C

45 Zyklen

Mittel der zugehörigen Software wurden die CP-Werte (Crossing Point) der jeweiligen Reaktionsansätze bestimmt.

Der CP-Wert entspricht dem Zyklus, an dem sich die Fluoreszenzsignalintensität der cDNA-Probe erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet.

Über die Korrelation der Stärke des Fluoreszenzsignals mit der Menge an PCR-Produkt, kann die relative Expression des zu



untersuchenden Gens indirekt festgestellt werden. Um methodischen Schwankungen auszugleichen, wurden alle cDNAs in Duplikaten gemessen. Zudem wurde parallel zum Zielgen immer ein Haushaltsgen ( $\beta$ -Aktin oder PGK1) mitgemessen, dessen Expression konstant sein sollte. Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression des Zielgens wurde nach dem Modell von Pfaffl (Pfaffl, 2001) gearbeitet. Dabei bezieht man sich immer auf eine Kontrollprobe (Kontrolle):

$$\text{relative mRNA – Expression}_{\text{Zielgen}} = \frac{\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}}^{\Delta CP_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}{\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}}^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})}}$$

Die Effizienzen der Primer wurden anhand einer cDNA-Verdünnungsreihe und anschließender Real-Time PCR über eine Standardkurve ermittelt.

### 3.2.4 Analysen von eukaryotischen Zellen

#### 3.2.4.1 Durchflusszytometrische Analysen- DNA-Färbung nach Nicoletti

Charakteristisch für Apoptose ist die DNA-Fragmentierung in oligonukleosomale Einheiten durch spezifische Endonukleasen. Im Histogramm erscheinen diese Zellen mit vermindertem DNA-Gehalt in der sogenannten SubG1-Fraktion. Bei der DNA-Färbung nach Nicoletti wird ausgenutzt, dass das Detergens Triton X-100 nur die

zytoplasmatische Membran von Zellen lysiert, nicht aber die Kernmembran (Riccardi et al., 2006). Im geeigneten Lysispuffer wird somit direkt die Zelle lysiert, die Zellkerne freigesetzt und die nukleäre DNA mit Propidiumiodid gefärbt. Im Durchflusszytometer wird der DNA-Gehalt einzelner Zellkerne gemessen. Diese Methode wurde angewandt, um die Apoptose in transfizierten Zervixkarzinomzelllinien zu analysieren. Dazu wurden die Zellen (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) 48h nach Transfektion mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und für 20s bei 14 000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 800µl des dem hypotonen PI-Puffer gelöst und der Ansatz in ein entsprechendes Röhrchen überführt. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis waren die Zellen vollständig lysiert. Vor Beginn der Messung wurden die Proben für 10s gevortext. Die Analyse von jeweils 10.000 Zellen erfolgte am FACSCalibur von BD. Die Auswertung wurde mit Hilfe der CellQuest Pro Software vorgenommen. Zur Auswertung der Messdaten wird ein Histogramm erstellt, indem die Zellzahl gegen die DNA-Menge aufgetragen wird. In der entstandenen Grafik lassen sich die einzelnen Zellzyklusphasen anhand ihrer phasenspezifischen DNA-Menge darstellen und so die Veränderung der Werte bei unterschiedlicher Behandlung beobachten. Die subG1-Phase (M1) entspricht einem reduzierten DNA-Gehalt wie er z.B. bei apoptotischen Zellen zu finden ist. Bei G0/G1 (M2) liegt ein haploider DNA-Satz vor. Es folgen die Synthese- (S) (M3) und die Mitosephase (G2M – diploider DNASatz) (M4).

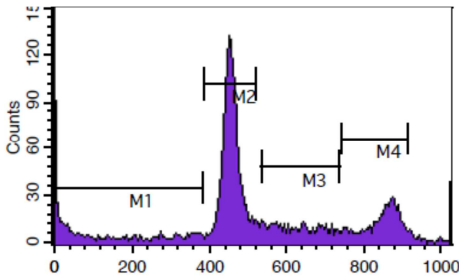


Abb. 12: Histogramm des DNA-Gehalts von Zellkernen. Für die Bestimmung der Apoptose von NHK-Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet. Die NHK-Zellen wurden durch Trypsinbehandlung geerntet, in einer Zentrifuge pelletiert und anschließend in je 300µl kaltem Methanol/Aceton (1:1 v/v) zur Fixierung der Zellen aufgenommen. Nach 15min wurden die NHK-Zellen erneut pelletiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und das Zellpellet in 800µl des PI-Puffers aufgenommen, der zusätzlich 10µg/ml RNase enthält. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben.

### 3.2.4.2 TMRE-Färbung

Der kationische Fluoreszenzfarbstoff TMRE (tetramethylrhodamine methyl ester) diffundiert in lebenden Zellen in das Mitochondrium und verbleibt dort solange das Membranpotential aufrechterhalten wird. Dies kann im Durchflusszytometer erfasst werden. Kommt es zur Porenbildung, diffundiert der Farbstoff ins Zytoplasma, was sich wiederum in einer reduzierten Fluoreszenzintensität widerspiegelt und mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials korreliert. Dies kann in einem Histogramm dargestellt und ausgewertet werden.

Für diesen Assay wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung geerntet, pelletiert und, mit 500µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in jeweils 200µl TMRE-Färbelösung (25nM, Tetramethylrhodamine Ethyl Ester Perchlorate, MoBiTec, AZT-669 in Medium) resuspendiert und für 20min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2min bei 8000rpm zentrifugiert und in 500µl des jeweiligen Zellkulturmediums aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen transferiert. Die Analyse erfolgte am FACSCalibur von BD (Beckton Dickinson, Heidelberg, Germany). Zur Auswertung wurde die CellQuest Pro Software verwendet.

### **3.2.4.3 Nachweis der Seneszenz-assoziierten $\beta$ -Galaktosidase**

Der gebräuchlichste Biomarker für Seneszenz ist der Nachweis der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal). Der Nachweis der SA- $\beta$ -Gal-Aktivität erfolgte leicht abgewandelt nach der Methode von Dimri und Mitarbeitern (Dimri et al., 1995). Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Umsetzung von X-Gal durch SA- $\beta$ -Gal bei pH 6, wodurch im zweiten Schritt durch Reaktion mit Luftsauerstoff ein tiefblauer Indigofarbstoff entsteht. Die Zellen wurden, wie unter 3.2.5. beschrieben, kultiviert und 5-7 Tage nach der Transfektion mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 4 % Formaldehyd bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die frisch angesetzte Färbelösung (1mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl P3-D-Galaktosidase (X-Gal) pro ml (Stock = 20mg/ml in Dimethylformamid), 40 mM Zitronensäure/Natriumphosphat, pH 6.0, 5mM

Kaliumferrozyanid, 5mM Kaliumferrizyanid, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln und ohne CO<sub>2</sub> für 48 h bei 37°C. Eine Positivkontrolle für die Färbung stellen normale Zellen dar, die mit derselben Färbelösung inkubiert wurden, allerdings bei einem pH-Wert von 4, da die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in nicht seneszenten Zellen bei pH4 gemessen wird.

Die Analyse und Bilddarstellung erfolgten mit einem Axiovert 200M Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) und der zugehörigen Axio Vision 4.8 Software unter Einstrahlung von sichtbarem Licht bei 10facher Vergrößerung.

### **3.2.4.4 WST-1 Test**

Dieser Assay wurde speziell für die spektrophotometrische Quantifizierung von Zellproliferation, -wachstum, -lebensfähigkeit konzipiert. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Umsetzung von wasserlöslichem Tetrazolium-Salz zu Formazan in Abhängigkeit von der NAD(P)H-Produktion der Zelle. Da dieser Vorgang in einem Farbumschlag resultiert, kann das gebildete Formazan im ELISA-Reader gemessen werden (Ishiyama et al., 1996). Die Menge an Formazan korreliert direkt mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Daher ist Absorption des Farbstoffs direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und kann mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen werden (Roche). HeLa- und CC10-Zellen wurden 24h vor der Transfektion mit einer Zelldichte von 1000 Zellen in 100  $\mu$ l Medium pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Die siRNA Transfektion erfolgte wie oben beschrieben mit dem Komplexbildner HiPerFect Transfection

Reagent von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Für jedes Well wurde ein Gesamtansatz von 25  $\mu$ l 0,2 nM siRNA zusammen mit 0,75  $\mu$ l HiPerFect eingesetzt. Die Transfektionen erfolgten in Triplikaten um methodischen Schwankungen vorzubeugen. Die Überlebensrate der Zellen wurde nach 48h, 72h und 96 h bestimmt. Für die Analyse der Viabilität nach TRAIL Behandlung wurde das Medium zusätzlich 24h nach der Transfektion mit 50  $\mu$ g/ml TRAIL versetzt und nach weiteren 24h die Absorption gemessen. Für die Messung wurden 10  $\mu$ l WST-1 Reagenz pro Well gegeben und 1h unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte mithilfe des ELISA-Readers ausgewertet. Hier wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Von diesem Wert wurde die Extinktion bei 690 nm abgezogen. Zur Auswertung der erhaltenen Werte wurde die Absorption der Triplikate gemittelt, der mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen als 100 % Überlebensrate definiert und 1 gesetzt. Die Werte wurden in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet.

### **3.2.5 Zellkultur-Methoden**

#### **3.2.5.1 Kultivierung von Säugierzellen und Arbeiten mit Säugierzellen**

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

Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die im Folgenden angegebenen Volumina der Medien und Lösungen sind auf die Verwendung einer 100 mm Kulturschale bezogen. Zum Passagieren konfluenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml sterilem PBS kurz gewaschen. Die Zellen wurden durch eine kurze Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung im Brutschrank von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 8 ml serumhaltigem Medium inaktiviert, die Zellen aufgenommen und vereinzelt.

**CasKi-Zellen, HeLa-Zellen, HEK293T sowie Derivate der Zelllinien** wurden in DMEM/10% FKS und Gentamicin kultiviert und maximal im Verhältnis 1:6 geteilt.

**RTS3b und Derivate** wurden in E-Medium mit 10 % FKS gehalten und maximal im Verhältnis 1:4 geteilt.

**NIH3T3-J2-Zellen** wurden bis Passage 25 in DMEM-CS (10 % CS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert und im Verhältnis 1:3 geteilt.

**CC10-, CC7-Zellen und NHK- sowie immortalisierte NHK-Zellen** wurden in E-Medium zusammen mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten in einer Kokultur gehalten. Zum Teilen wurden die Zellen auch hier mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA für etwa 5 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit zur Inaktivierung des Trypsins mit serumhaltigem Medium

versetzt und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 250 g abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in frischem E-Medium aufgenommen und die Zellen im Verhältnis 1:4 auf eine neue Kulturschale (mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2) gesplittet.

### **Mitomycinbehandlung von NIH3T3-J2**

Um teilungsunfähige Fibroblasten für Kokulturen zu erhalten, wurden die Zellen mit Mitomycin C behandelt. Es verhindert weitere Teilungen der Fibroblasten, indem es die Ausbildung des Spindelapparates hemmt. Dazu wurde das Medium einer zu 80-90% konfluenten 100 mm-Platte NIH3T3-J2 abgesaugt, durch 5 ml frisches DMEM (mit 10% CS und Gentamycin) ersetzt und anschließend mit 100 µl Mitomycin C (400 µg/ml in PBS) versetzt. Die Platte wurde für 60 min im Brutschank inkubiert. Anschließend wurden die nun teilungsunfähigen Zellen dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen und als „Feeder“-Zellen verwendet.

### **3.2.5.2 Ernten von Zellen**

Zum Ernten der Zellen wurden die Zellen mit einem Zellschaber in dem jeweiligen Medium von der Schale gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (30s, 10000 rpm) wurde das Pellet abhängig von der weiteren Verwendung in der entsprechenden Lösung aufgenommen.



### **3.2.5.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur langfristigen Lagerung wurden konfluent gewachsene Zellen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden die Zelllinien von einer 10 cm Zellkulturschale mit Trypsin abgelöst und nach Zugabe des entsprechenden Zellkulturmediums bei RT 5 min bei 250g zentrifugiert. Der Zellrückstand wurde in kaltem Einfriermedium (HeLa, CaSki und 293T sowie HeLa und 293T Derivate: 70% DMEM, 20% FKS, 10% DMSO; RTS3b und Derivate: 70% E-Medium, 20% FKS, 10% Glycerol; CC7, CC10 und NHK- sowie immortalisierte NHK-Zellen: 70% E-Medium, 20% FKS, 10% Glycerol) resuspendiert und zumeist auf mehrere Einfriereröhrchen verteilt, die zunächst in einer Einfrierbox langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden. Nach 24 h wurden die Zellen auf  $-196^{\circ}\text{C}$  gebracht. Für das Auftauen der Zellen wurde der Inhalt des Einfriereröhrchens in 10 ml Medium aufgenommen und in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

### **3.2.5.4 Koloniereduktionsassay**

Die Zellen wurden am Vortag wie oben beschrieben zur Transfektion ausgesät. Es wurde stets eine 60mm-Schale pro Ansatz benutzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten wie im Abschnitt XX beschrieben transfiziert. Am nächsten Tag wurden die kompletten Zellen auf eine 100mm-Schale überführt und nach weiteren 24 h das Selektionsmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum hinzugegeben. In der Regel wurde mit  $0,4\mu\text{g/ml}$  Puromycin selektioniert. Die

Selektion wurde nach 12 Tagen beendet. Die verbliebenen Kolonien wurden einmal mit PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton für 2 Minuten bei RT fixiert. Nach dem Trocknen der Platten wurde für 5 Minuten Eosin-Lösung zugegeben und die Zellen anschließend noch einmal mit PBS gespült. Nach dem Trocknen der Platten konnten die Kolonien gezählt werden.

### **3.2.5.5 DNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner**

Für diese Methode der Transfektion wurde der liposomenbasierte Komplexbildner FuGene HD (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Verwendung einer 60 mm-Schale. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf Plastik-Kulturschalen ausgesät (Zelldichte:  $3 \times 10^6$  pro 60 mm Schale). Pro Transfektionsansatz wurde ein steriles PS-Röhrchen mit jeweils 100  $\mu$ l OptiMEM vorbereitet, in das die DNA in der entsprechenden Menge mit FuGene HD im Verhältnis 5:2 (5  $\mu$ l FuGene HD auf 2  $\mu$ g DNA) pipettiert wurde. Nach Vortexen des Gemischs wurde es für 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt und nach Ablauf der Inkubationszeit das Transfektionsgemisch tropfenweise zum Medium gegeben. In der Regel wurden HeLa-Zellen in einer 60 mm Schale mit 0,5  $\mu$ g DNA transfiziert, RST3b und 293T mit jeweils 1  $\mu$ g DNA und CC10-Zellen mit 0,8  $\mu$ g DNA.

### **3.2.5.6 siRNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner**

Die Transfektion von Humanzellen mit siRNA erfolgte mit dem liposomenbasierten Komplexbildner HiPerFect Transfection Reagent von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Plastik Kulturschalen ausgesät. Zelldichte für eine 6-Well Kulturschale betrug pro Well  $1,8 \times 10^5$  Zellen; pro 60mm Schale waren es  $3 \times 10^5$  Zellen. Für den Transfektionsansatz in der 6-Well Kulturschale wurden  $12\mu\text{l}$  HiPerFect, 600ng siRNA (finale siRNA M: 20nM) und für eine 60mm Schale  $20\mu\text{l}$  HiPerFect, 1024ng siRNA (finale siRNA Konzentration: 20nM) vorbereitet. Bei der gleichzeitigen/kombinierten Transfektion verschiedener siRNAs wurde die Konzentration von 20nM pro siRNA beibehalten und in den einzelnen Ansätzen mit einer unspezifischen siRNA (AllStars Negative Control siRNA, QIAGEN) ausgeglichen, während die HiPerFect Menge beibehalten wurde. Die Transfektionsansätze wurden mit OptiMEM auf  $100\mu\text{l}$  aufgefüllt, durch Vortexen vermischt und für 10min bei RT inkubiert. Während dieser 10min wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt. Das siRNA-Gemisch wurde nach Ablauf der Inkubation tropfenweise in das Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde erneut das Medium gewechselt. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

### **3.2.5.7 Kombinierte Transfektion von siRNA und Plasmid-DNA**

Für diese Methode wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in Plastik Kulturschalen ausgesät. Zelldichte für eine 6-Well Kulturschale betrug pro Well  $1,8 \times 10^5$  Zellen; pro 60mm Schale waren es  $3 \times 10^5$  Zellen. Die Zellen wurden zuerst mit den siRNAs transfiziert wie oben beschrieben. Nach 8h wurde das Medium gewechselt und die DNA Transfektion erfolgte ebenfalls wie zuvor beschrieben. Nach 24h wurde das Medium erneut gewechselt.

### **3.2.5.8 Behandlung der Zellen mit MG132**

MG-132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucina) ist ein Peptid aldehyd, das reversibel die Aktivität des 26S Proteasomenkomplexes inhibiert. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  über einen Zeitraum von 0-12 h behandelt. Da das MG-132 in DMSO gelöst ist, wurden die Kontrollen mit derselben Menge DMSO behandelt.

## **3.2.6 Proteinbiochemische-Methoden**

### **3.2.6.1 Herstellung von Zellextrakten aus eukaryoten Zellen**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und der Zellrückstand wurde für 10 min auf Eis in  $40 \mu\text{l}$  RIPA-Puffer lysiert. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (10 min,

14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 15µl Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt.

### **3.2.6.2 Herstellung zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte aus eukaryoten Zellen**

Zur genaueren Analyse der Proteinlokalisierung wurde die nukleäre und die zytoplasmatische Fraktion extrahiert (beschrieben bei Andrews und Faller, 1991). Zwei Tage nach Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1ml kaltem PBS abgeschabt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 14000rpm 20sec lang pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 100µl kaltem Puffer A resuspendiert und 10min lang auf Eis schwelen gelassen. Nach der Inkubation wurde die Suspension 10sec gevortext und 10sec bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die zytoplasmatischen Proteine befinden, wurde mit 25µl Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Das Pellet wurde in 40 µl Puffer C resuspendiert und die Suspension für die Hochsalz-Extraktion 20min auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die Suspension für 2min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und zur Verwendung in der Immunoblotanalyse wurden die Proben mit 15µl Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt.

### **3.2.6.3 SDS-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli 1970). Die 6-12 %-ige Trenngel-Lösung wurde direkt nach der Zugabe des Polymerisationsstarters APS zwischen zwei vertikale Glasplatten (Spacerabstand oder 1,5 mm) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, mit Wasser nachgewaschen und anschließend das 4% Sammelgel gegossen.

Als Größenstandard wurden in Gelen 8 µl von „HiMark Pre-Stained Protein Standard“ (Invitrogen) oder 7µl „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) benutzt. Die Gelelektrophorese erfolgte über eine Dauer von circa 45-60 min in 1x SDS-Puffer bei 200V.

### **3.2.6.4 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Immunoblot)**

Für die immunologische Detektion wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im Tank-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zwei Gel-Blotting-Papiere (Schleicher & Schüll) und eine Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Trenngels (5,5 x 8,5 cm) zurechtgeschnitten. Die Membran wurde in H<sub>2</sub>O befeuchtet und anschließend zusammen mit dem Papier für wenige Minuten in CAPS-Puffer pH 10,3 (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol) äquilibriert. Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel kurz in CAPS-Puffer gewaschen. Auf die Kathode der Blotapparatur wurden zwei

Lagen Gel-Blotting-Papier, gefolgt von dem Trenngel und anschließend die Nitrocellulose-Membran sowie zwei weitere Lagen Gel-Blotting-Papier gelegt. Der ganze Aufbau erfolgte luftblasenfrei. Für den Transfer wurde für 90 min eine konstante Spannung von 90 V in einer Tank-Blotkammer mit Kühlschleife, angelegt. Für den Transfer wurde CAPS-Puffer (10 mM CAPS, 10% (v/v) Methanol) mit einem pH-Wert von 10,3 verwendet.

### **3.2.6.5 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine**

Der Nachweis der auf die Membran transferierten Proteine erfolgte durch für die jeweiligen Proteine spezifischen Erstantikörper sowie einem gegen den Erstantikörper gerichteten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper war entweder an das Enzym HRP oder an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Damit die Ergebnisse quantifizierbar sind, wurde für jeden Blot auch immer eine Ladekontrolle mitdetektiert. Dabei handelt es sich um ein Protein, von dem angenommen wird, dass es immer in gleicher Menge in den Zellen vorhanden ist (hier verwendet wurden HSP90, Aktin und  $\alpha$ -Tubulin). Alle Inkubationen und Waschschriffe wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mindestens 1 h lang bei RT bei 4°C in Blocklösung (5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST Puffer) inkubiert. Nach zwei Waschschriffen mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem (gemäß Abschnitt 3.1.5 in TBS-T Puffer verdünnten) proteinspezifischen Primärantikörper über Nacht

bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für 10 min mit TBS-T gewaschen, um überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Die daran anschließende Inkubation mit dem Zweitantikörper (Verdünnungen gemäß Abschnitt 3.1.4) erfolgte für 1h bei RT. Nach erneuten Waschschritten (3x 10min mit TBS-T) erfolgte die Detektion.

### *Detektion durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP):*

Das HRP erzeugt bei Anwesenheit eines entsprechenden Substrats Chemilumineszenz. Die Detektion erfolgte des Chemilumineszenz-Substrats Super Signal® West Dura mit Hilfe des Fluor-S Multimagers (BioRad). Als Auswertungssoftware wurde das Programm QuantityOne verwendet.

### *Detektion durch Fluoreszenz:*

In diesem Fall waren die Sekundärantikörper an IRDye (Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffe) gekoppelt und konnten durch eine Anregung bei einer Wellenlänge von 680nm bzw. 800nm detektiert werden. Die Verwendung der fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper erforderte PBS bzw. PBS-T anstelle von TBS als Puffer. Die Detektion erfolgte mit dem Li-Cor® Odyssey Fc und der zugehörigen Auswertungssoftware „Image Studios“.



### **3.2.6.6 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Proteinen**

Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden zunächst Zellen, wie beschrieben auf

Glasplättchen ausgesät und falls erforderlich, am nächsten Tag mit der entsprechenden DNA oder siRNA transfiziert.

Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton für 2

Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Glasplättchen mit PBS mit 3% BSA und den entsprechenden Primärantikörpern für 1 Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,05% Triton-X-100 wurden die Glasplättchen mit PBS mit 3% BSA

und den entsprechenden Sekundärantikörpern für 45-60 min in einer feuchten Kammer inkubiert.

Anschließend wurde die Lösung abgenommen und DAPI-Färbelösung (0,01µg/ml in PBS) für 20 Sekunden zugegeben.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,05% Triton-X-100 wurden die Glasplättchen mit Fluoroprep

(Biomérieux) auf Objektträgern fixiert. Die Aufnahmen

wurden in der Regel mit einer Vergrößerung von 630fach in

Verbindung mit einem Apotom mit einem Zeiss Axiovert

200M Mikroskop gemacht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Effekte von HPV E8<sup>E2C</sup> in HPV-negativen Zellen

#### 4.1.1 Das Repressorprotein 31 E8<sup>E2C</sup> beeinflusst das Wachstumsverhalten von HPV negativen Zellen.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass das E8<sup>E2C</sup> Protein von HPV31 einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von HPV-positiven HeLa CxCa-Zellen hat und dass dies mit der Inhibition der Expression der HPV18 E6 und E7 Onkogene korreliert (Stubenrauch et al., 2007). Um E6/E7-unabhängige Effekte von E8<sup>E2C</sup> zu analysieren, wurde das Protein in HPV-negativen Zellen exprimiert. Hierzu wurden RTS3b Zellen, eine spontan immortalisiert humane Keratinozytenzelllinie (Purdie et al., 1993) und HEKT293T Zellen, eine humane embryonale Nierenzelllinie, verwendet. Beide Zelllinien wurden mit dem Kontrollvektor pRESpuro oder pRESpuro-31E8<sup>E2C</sup>-HA, der HPV31 E8<sup>E2C</sup> exprimiert, stabil transfiziert. Da gegen das E8<sup>E2C</sup> Protein keine spezifischen Antikörper verfügbar waren, wurde ein HA-markiertes E8<sup>E2C</sup> Protein verwendet (Stubenrauch et al., 2007). Zuerst wurden definierte Zellzahlen der stabilen

## Ergebnisse

Zelllinien ausgesät und die Zellzahl nach zwei Tagen bestimmt. Wie in der Abbildung 13 zu erkennen ist, weisen die E8<sup>E2C</sup> exprimierenden RTS3b- und 293T Zellen deutlich geringere Zellzahlen auf als die Zellen mit dem Leervektor, was auf Defizite im Wachstum hindeutet.

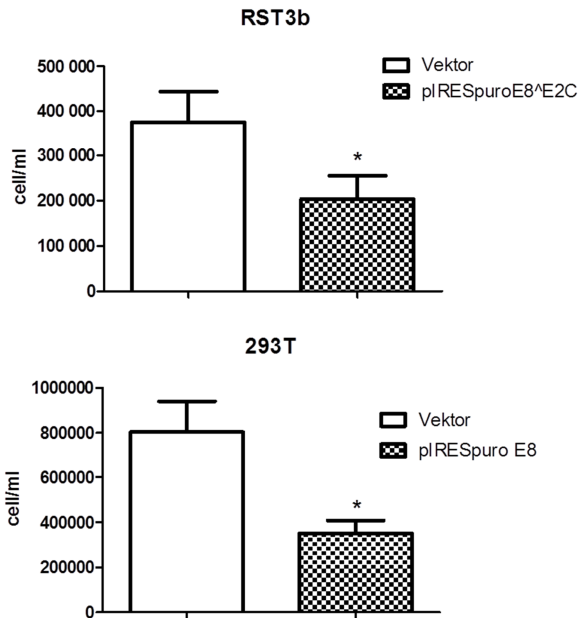


Abb. 13: Wachstumsverhalten von HPV31 E8<sup>E2C</sup>-HA exprimierenden RTS3b-Zellen und HEK293T-Zellen. Jeweils 800 000 Zellen wurden in Puromycin-haltigem Medium ausgesät. Nach zwei Tagen wurde die Zahl der Zellen pro ml ermittelt. Die Daten stellen Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

### **4.1.2 HPV31 E8<sup>E2C</sup> Mutanten haben keinen inhibitorischen Einfluss auf das Zellwachstum**

Um weitere Hinweise auf mechanistische Aspekte des E8<sup>E2C</sup> induzierten Wachstumsarrest zu erhalten, wurden Mutanten des E8<sup>E2C</sup> Proteins, untersucht. Bei der E8<sup>E2C</sup>-KWK-HA Mutante wurde im E8-Anteil das KWK-Motiv verändert (KWK → AEA), was zu einem Verlust der Transkriptions- und Replikationsrepression führt (Stubenrauch et al., 2001; Zobel et al., 2003; Stubenrauch et al., 2007). Die Mutante E8<sup>E2C</sup>-118/119-HA hat eine Mutation an den Aminosäurepositionen 118/119 (KC → MR) und ist DNA-bindungsdefizient (Stubenrauch et al., 2007). Zusätzlich wurde eine E8<sup>E2C</sup>-KWK-118/119-HA Doppelmutante eingesetzt.

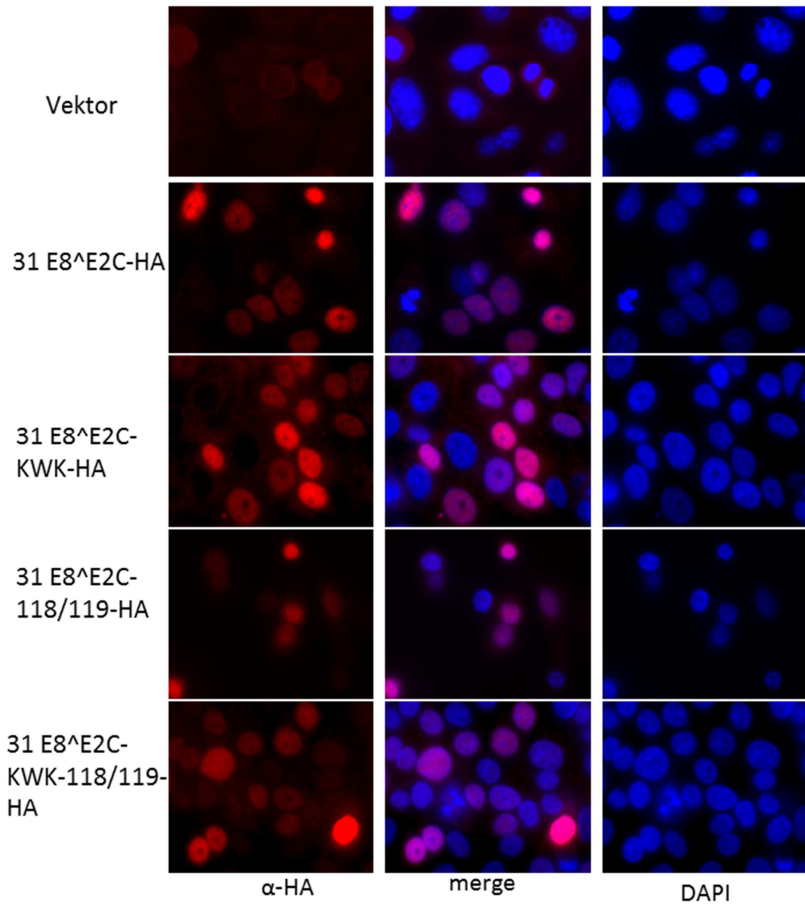
Um die Expression der E8<sup>E2C</sup> Proteine sowie der Mutanten in beiden Zelllinien zu untersuchen wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Zudem wurde mittels Immunfluoreszenz die die Lokalisation von E8<sup>E2C</sup>-HA, E8<sup>E2C</sup>-KWK-HA, E8<sup>E2C</sup>-118/119-HA und E8<sup>E2C</sup>-KWK-118/119-HA in RTS3b analysiert. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, werden E8<sup>E2C</sup>-HA und die Mutanten in RST3b Zellen im Kern exprimiert. Die Western-Blot-Analysen mit einem HA-Antikörper zeigten, dass in beiden Zelltypen ähnliche Proteinmengen von Wildtyp und Mutanten exprimiert werden. Daher kann man ausschließen, dass etwaige Abweichungen in den Phänotypen der Zellenlinien

## Ergebnisse

---

durch unterschiedliche Proteinmengen oder Lokalisationen bedingt werden.

a)



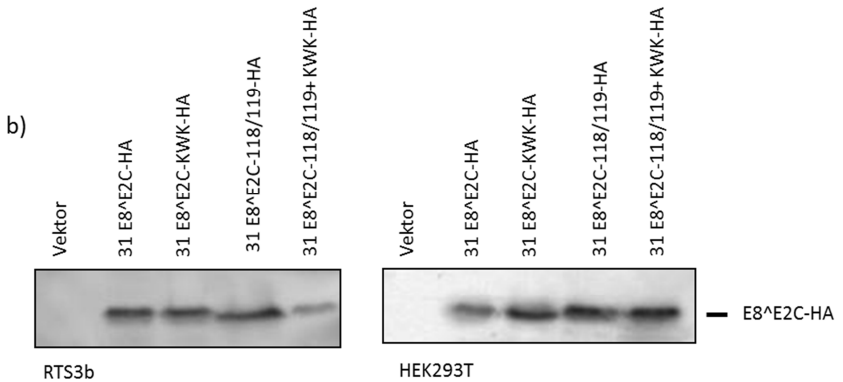


Abb.14: a) Immunfluoreszenzanalyse von stabilen RTS3b Zelllinien. Die Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und nach 12h fixiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem  $\alpha$ -HA Antikörper und einem  $\alpha$ -Maus-IgG-Alexa555 Sekundärantikörper. Die DNA wurde mit DAPI sichtbar gemacht und die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop mit einem 63x Objektiv mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltersets aufgenommen.

b) Immunoblotanalyse der stabilen RTS3b und HEK293T Zelllinien. Nach Gesamtproteinextraktion, Auftrennung der Proteine in einem SDS-PAGE und Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine im Immunoblot mit einem  $\alpha$ -HA Primärantikörper und einem gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Für die Wachstumsanalyse der verschiedenen Zelllinien wurden die Zellen ausgesät und nach 2, 4, 6 und 8 Tagen abtrypsinisiert, Trypanblau gefärbt und die Zellzahlen mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (Countess<sup>®</sup>, Invitrogen)

ermittelt. Es ist deutlich zu erkennen, dass 31 E8<sup>E2C</sup>-HA exprimierende RTS3b und HEK293T Zellen ein stark verzögertes Wachstum im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie zeigen (Abb. 15). Im Gegensatz dazu wachsen die 31 E8<sup>E2C</sup>-KWK-HA, 31 E8<sup>E2C</sup>-118/119-HA und 31 E8<sup>E2C</sup>-KWK-118/119-HA-Zelllinien ähnlich oder sogar schneller als die Leervektorzellen (Abb. 15). Basierend auf diesen Ergebnissen kann man davon ausgehen, dass für die E8<sup>E2C</sup> Effekte auf HPV- negative Zellen die Bindung an DNA und die Repressordomäne benötigt werden. Dies lässt vermuten, dass HPV 31 E8<sup>E2C</sup> an zelluläre DNA binden kann und durch die Repressordomäne direkt oder indirekt die Genexpression von zellulären Genen beeinflusst.

## Ergebnisse

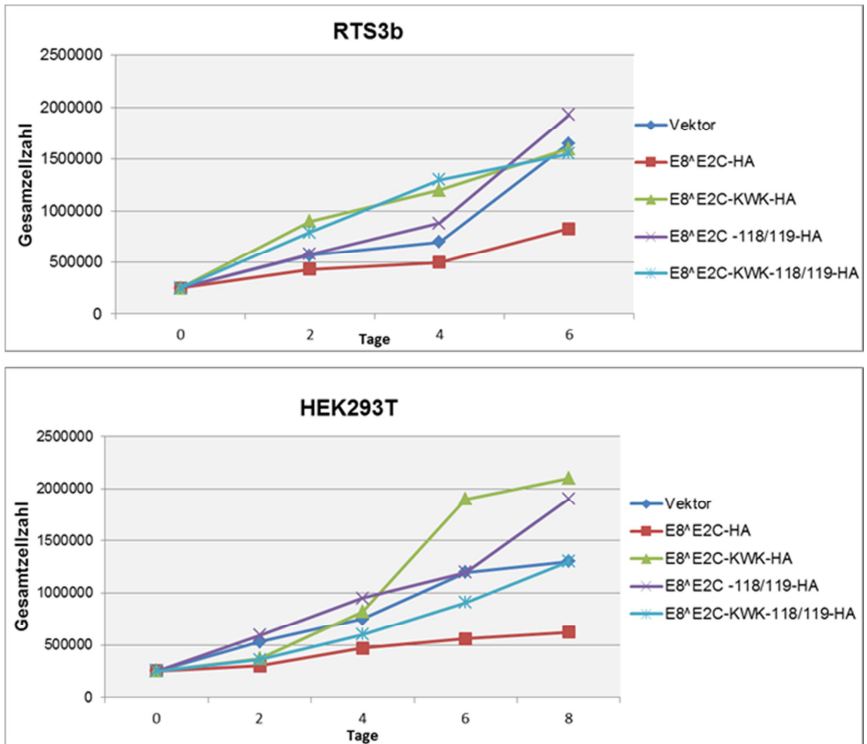


Abb. 15: Wachstumskurven von HPV31 E8<sup>Δ</sup>E2C-HA Wildtyp und Mutanten exprimierenden Zelllinien. Die Zellen wurden in puromycinhaltigem Medium 2, 4, 6 und 8 Tage kultiviert. Am Tag 0 wurden jeweils 250 000 Zellen ausgesät. Zur Ermittlung der Zellzahlen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einem identischen Volumen Medium resuspendiert. Die Daten zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.



### **4.1.3 Der inhibitorische Einfluss auf das Zellwachstum von E8<sup>Δ</sup>E2C verliert sich in höheren Zellpassagen.**

Im längeren Umgang mit den stabilen E8<sup>Δ</sup>E2C Zelllinien manifestierte sich der Eindruck, dass die Wachstumsrepression über die Zeit nachließ. Um dies zu untersuchen, wurden frühe (P2 bzw. P4) mit späteren (P11 bzw. P14) Passagen der RTS3b und 293T E8<sup>Δ</sup>E2C-HA Zelllinien und den entsprechenden Kontroll-Zelllinien verglichen. Dafür wurden erneut, wie oben beschrieben, die Zelllinien ausgesät und nach 2, 4 und 6 Tage die Zellzahl bestimmt. Parallel wurde durch Immunoblot untersucht, ob die E8<sup>Δ</sup>E2C Proteinmenge in frühen und späten Passagen vergleichbar ist (Abb. 16). Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die E8<sup>Δ</sup>E2C-exprimierenden RTS3b und die 293T Zellen in den späteren Passagen eine höhere Wachstumsrate aufweisen als in den frühen Passagen, und in etwa ähnlich proliferierten wie Leervektor-Zelllinien. Dieser Phänotyp ist jedoch nicht auf einen Verlust der E8<sup>Δ</sup>E2C Expression zurückzuführen (Abb. 16).

## Ergebnisse

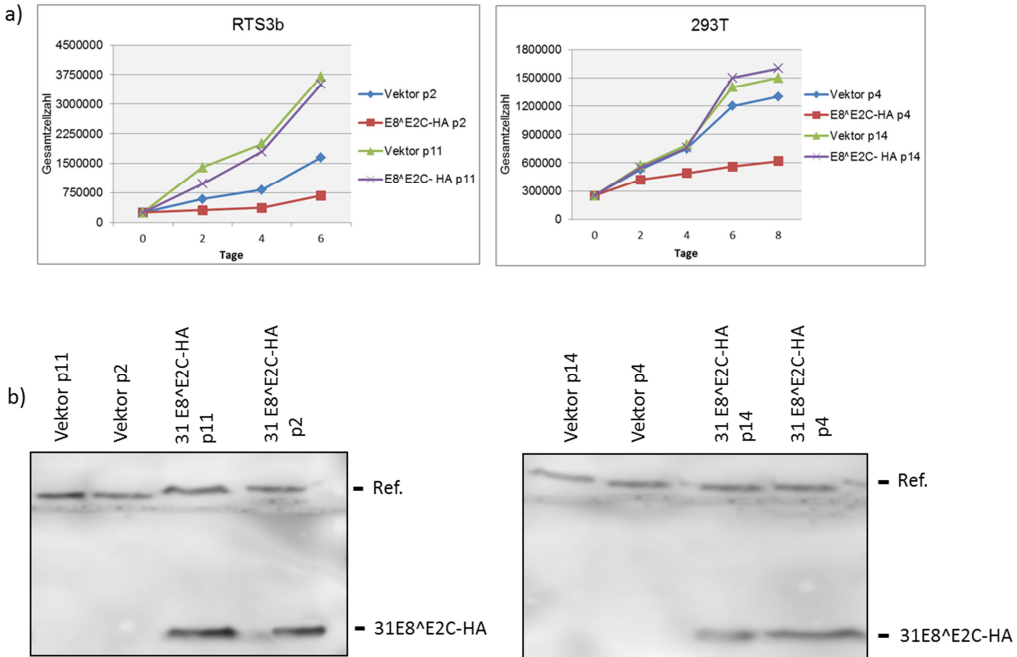


Abb. 16: a) Vergleich von frühen und späten Passagen E8<sup>E2C</sup>-HA exprimierender RTS3b- und 293T-Zellen. Für die Wachstumskurve wurden die Zellen in puromycinhaltigem Medium 2, 4 und 6 Tage bzw. 8 Tage kultiviert. Am Tag 0 wurden jeweils 250 000 Zellen ausgesät. Zur Ermittlung der Zellzahlen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einem identischen Volumen Medium resuspendiert. Die Daten zeigen ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten.

b) Die Proteinexpression wurde im Immunoblot mittels anti-HA Antikörper und einem Referenzprotein untersucht.

Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus wurden Koloniebildungsassays durchgeführt. Dies erlaubt die Aussage, ob sich im Vergleich zur Kontrolle weniger Kolonien von den stabil E8<sup>Δ</sup>E2C transfizierten Zellen ausbilden und somit die Zellanheftung beeinträchtigt ist und zum anderen, ob sich die Kolonien in ihrer durchschnittlichen Zellzahl unterscheiden und somit im Wachstum beeinträchtigt sind. Dafür wurden RTS3b-Zellen mit dem Leervektor oder dem E8<sup>Δ</sup>E2C-HA Vektor transfiziert, am nächsten Tag in 100mm Schale umgesetzt und nach weiteren 24h wurde mit Puromycin selektioniert. Nach 8 Tagen wurden die Kolonien gezählt sowie die durchschnittlichen Zellzahlen der Kolonien ermittelt. Wie in dem Diagramm in Abbildung 16 zu erkennen ist, zeigten die mit E8<sup>Δ</sup>E2C transfizierten Zellen eine signifikant verminderte Anzahl an Kolonien mit durchschnittlich weniger Zellen (Abb. 17). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass weniger RTS3b Zellen unter E8<sup>Δ</sup>E2C Expression auswachsen können und dass diese Zellen von Beginn an ein verlangsamtes Wachstum zeigen.

## Ergebnisse

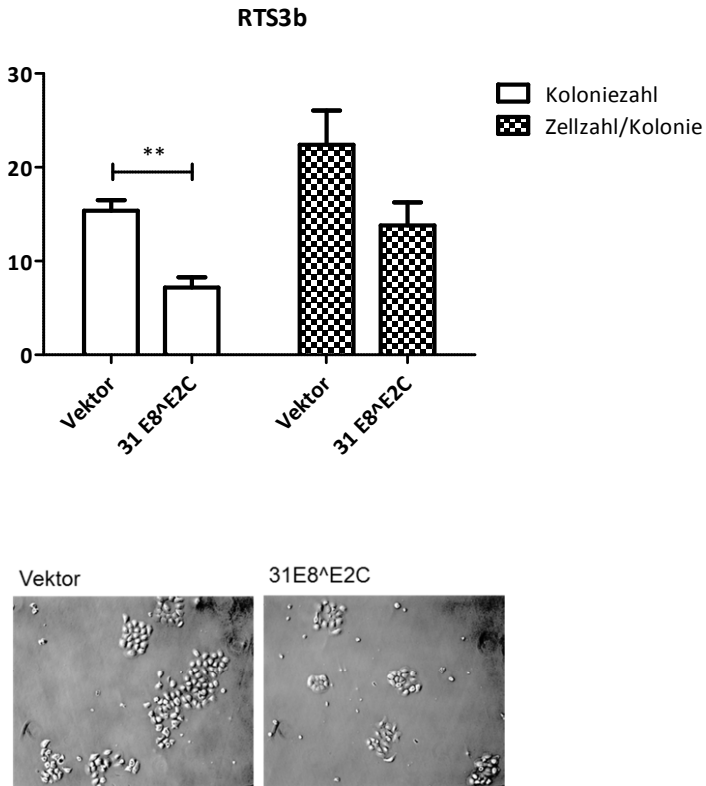


Abb. 17: Die Koloniebildung in RTS3b Zellen wird durch 31E8<sup>E2C</sup> Expression reduziert. RTS3b-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für E8<sup>E2C</sup> oder dem Leervektor transfiziert, 8 Tage lang selektioniert (0,4µg/ml Puromycin) und anschließend die Kolonien gezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

Unten: Phasenkontrastaufnahme der Zellen (Zeiss Axiovert 200M Mikroskop; 10x Vergrößerung).

### **4.1.4 Das verzögerte Wachstum von RTS3b-Zellen kann auf einen Zellzyklusarrest durch E8<sup>E2C</sup> zurück geführt werden**

Als mögliche Ursache der Wachstumsverzögerung durch E8<sup>E2C</sup> wäre eine Störung im Zellzyklus oder Apoptoseinduktion denkbar. Um dies zu eruieren, wurde der DNA-Gehalt der stabil transfizierten RTS3b Zellen in frühen Passagen nach Propidiumiodid-Färbung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dadurch ist es möglich Aussagen über die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu treffen, sowie über die Menge an fragmentierter DNA in einer Zellpopulation (Sub-G1-Population), was wiederum Rückschlüsse auf die Apoptoserate zulässt. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Expression von HPV31 E8<sup>E2C</sup> kaum die Apoptoserate verändert. Des Weiteren befinden sich in beiden stabilen Zelllinien 52% der Zellen in der G1 Phase. Geringe Unterschiede sind in der S-Phase zu erkennen, mit 6,2% zeigen E8<sup>E2C</sup>-exprimierende RTS3b eine moderate Erhöhung im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie, während die G2 Fraktion mit 16,9% eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Vektorkontrolle mit 22,1% ausweist. Das bedeutet, dass weniger Zellen die Mitose durchlaufen, was eine Ursache für das verzögerte Wachstum der E8<sup>E2C</sup>-exprimierenden Zellen sein könnte.

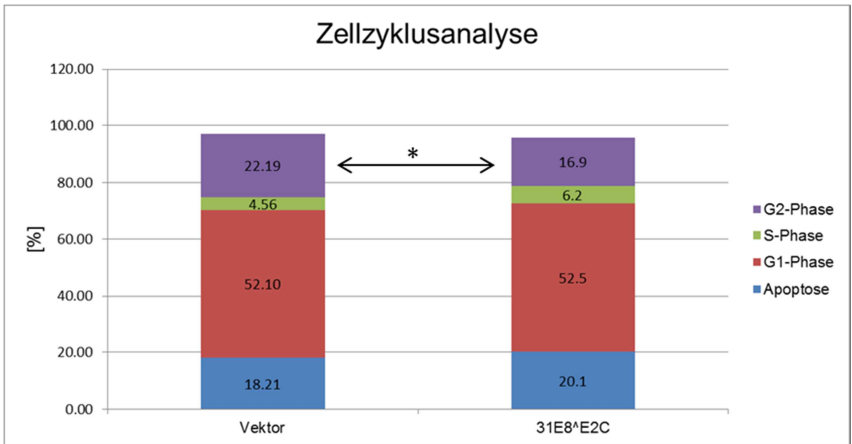


Abb. 18: Für die Analyse des Zellzyklus und der Apoptoserate mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden stabile RTS3b, die 31 E8^E2C exprimieren oder den Leervektor enthalten, verwendet. Die zelluläre DNA wurde mit Propidiumiodid gefärbt und der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen im FACSCalibur von BD detektiert. Zur Erfassung und Auswertung der Daten wurde die CellQuest Pro Software verwendet. Die gemittelten Prozentangaben stammen von sieben unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

### 4.1.5 Die transiente Expression von E8^E2C führt zum Ablösen der Zellen

Bei transienten Transfektionsexperimenten mit E8^E2C Vektoren wurden mehr Zellen im Überstand beobachtet als bei der Kontrolle. Da diese Beobachtung ebenfalls eine

Erklärung für das verlangsamte Wachstums sein könnte, wurde dies genauer untersucht. Hierfür wurden  $3 \times 10^5$  RTS3b-Zellen mit den Expressionsvektoren pSG5 31E8<sup>E2C</sup>, pSG5 31E8<sup>E2C</sup>-KWK, pSG5 31E8<sup>E2C</sup>-118/119 oder dem Leervektor pSG5 transfiziert. Nach 48h wurde der gesamte Überstand abgenommen und die Anzahl der sich darin befindenden lebenden und toten Zellen mit einem automatischen Zellzähler (Countess<sup>®</sup>, Invitrogen) nach Trypanblaufärbung ermittelt. Wie aus dem Diagramm in Abbildung 19 deutlich zu ersehen ist, befinden sich nach der Transfektion mit 31E8<sup>E2C</sup> dreimal mehr Zellen im Überstand als in der Vektor-Kontrolle. Ebenso kam es nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Zellzahl im Überstand durch die E8<sup>E2C</sup> Mutanten, was zu den vorherigen Ergebnissen der Wachstumsanalysen passt. Interessanterweise sind bei allen Zelllinien nur 20%-30% der Zellen im Überstand tot, was darauf hindeutet, dass die Ablösung der Zellen nicht durch Apoptose hervorgerufen wird.

## Ergebnisse

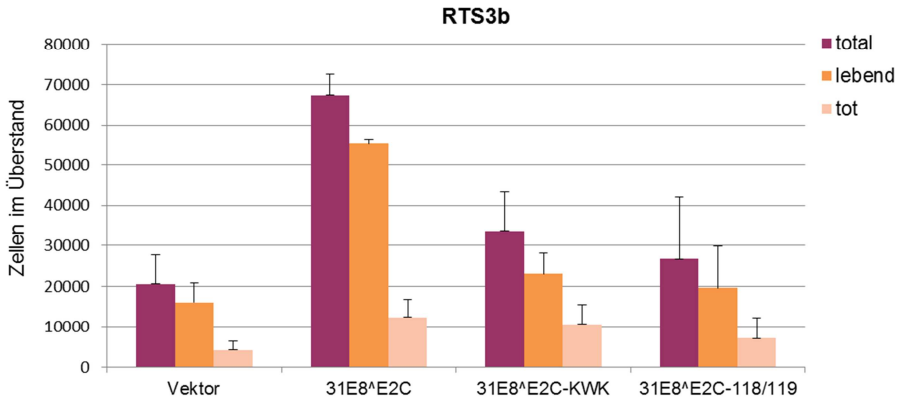


Abb. 19: Grafische Darstellung der Zellzahlen im Überstand von transient mit transfizierten RTS3b Zellen. Die Zellen wurden mit  $1\mu\text{g}$  DNA der jeweiligen Expressionsplasmide oder dem Leervektor pSG5 transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellzahlen im Überstand ermittelt. Mittels Trypanblau-Färbung konnte zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Die Ergebnisse basieren auf drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Expression der E8^E2C Proteine von HPV16 und 18 und des E9^E2C Proteins des Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) einen ähnlichen Phänotyp hervorruft. Die Expression der HR E8^E2C Proteine und des E9^E2C Proteins führte zu einer erhöhten Zellzahl im Überstand im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20). Offenbar wird



dieser Effekt von HPV16 und HPV18 E8<sup>E2C</sup> noch stärker induziert als von HPV31 E8<sup>E2C</sup>.

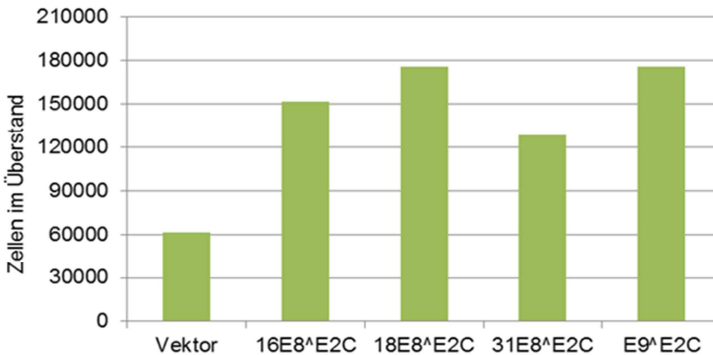


Abb. 20: Bestimmung der RTS3b Zellzahlen im Überstand nach Transfektion von E8<sup>E2C</sup> Expressionsvektoren. Die Zellen wurden mit 1 µg DNA der jeweiligen Expressionsplasmide pSG16E8<sup>E2C</sup>, pSG18E8<sup>E2C</sup>, pSG31E8<sup>E2C</sup> und pSGE9<sup>E2C</sup> sowie dem Leervektor pSG5 transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen im Überstand gezählt.

Um zu überprüfen, ob dieser Phänotyp nur in HPV-negativen Zellen auftritt, wurde als nächster Schritt HPV31 E8<sup>E2C</sup> in HPV16-positiven CC10-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit je 1 µg des 31 E8<sup>E2C</sup> Expressionsvektor sowie dem Leer-Vektor als Kontrolle transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellzahlen im Überstand ermittelt und zusätzlich wurden die Menge an E6 und E6/E7 Transkripten bestimmt. Die Zellzahlen wurden in drei

unabhängigen Experimenten ermittelt und belegen, dass die Expression von 31 E8<sup>E2C</sup> in der CC10 Zelllinie nur zu einem geringen Anstieg der Zellzahl im Überstand im Vergleich zur Vektorkontrolle führt (Abb. 20). Die Tabelle in Abbildung 21 gibt die auf den Leer-Vektor relativierte Expressionsmenge der mRNA für HPV16 E6 und E6/E7 an. Die verringerte Expression der E6/E7 Transkripte nach E8<sup>E2C</sup> Transfektion belegt, dass ausreichend 31 E8<sup>E2C</sup> exprimiert wird (Stubenrauch et al., 2007) (Abb. 21b).

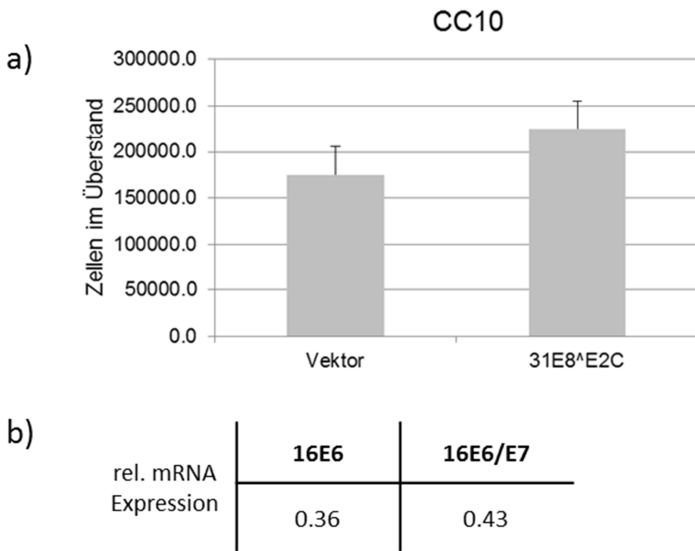


Abb.21: Expression von 31E8<sup>E2C</sup> in HPV16 positiven CC10 Zellen.  
a) Bestimmung der Zellzahlen im Überstand nach transients Transfektion von CC10- Zellen mit einem Expressionsvektor für 31E8<sup>E2C</sup>. 48h nach Transfektion wurden die Zellen im Überstand

gezählt. Die Ergebnisse basieren auf drei unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

b) Relative E6 bzw. E6/E7 mRNA Expression von 31E8<sup>E2C</sup> transient transfizierten CC10 Zellen. Die Werte sind relativ zu kontroll-vektor-transfizierten Zellen (=1) dargestellt.

### **4.2 Vergleich der E2 und E8<sup>E2C</sup>-Proteine verschiedener Hochrisiko-HPV-Typen**

#### **4.2.1 Die E2 und E8<sup>E2C</sup>-Proteine von HPV 16, 18 und 31 induzieren die Expression von p53 und p21 in CxCa-Zellen**

Die Expression von E2 Proteinen in HPV18-positiven HeLa Zellen reprimiert die E6/E7 Transkription und führt so zur Reaktivierung von p53 und pRB Proteinen, was zu Seneszenz und Apoptose führt (Hwang et al., 1993; Dowhanick et al., 1995; Hwang et al., 1996; Naeger et al., 1999; Wells et al., 2000; Johung et al., 2007; Stubenrauch et al., 2007). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression von HPV31 E8<sup>E2C</sup> in HeLa Zellen zur Reduktion der E6/E7 Transkription und zu einer Wachstumsinhibition führt (Stubenrauch et al., 2007). Da für manche E2 Proteine insbesondere für HPV18 E2 eine direkte pro-apoptotische Aktivität beschrieben wurde (Demeret et al., 2003) bestand die Möglichkeit, dass der Wachstumsarrest von HPV31 E8<sup>E2C</sup> nicht nur durch die

Repression der E6/E7 Transkription verursacht wird, sondern auch durch pro-apoptotische Aktivitäten. Daher wurde der Einfluss von HPV16, 18 und 31 E2 und E8<sup>E2C</sup> Proteinen auf den Zellzyklus und die Apoptoseinduktion in HeLa Zellen untersucht. Zusätzlich wurde überprüft, ob E6 Zielgene wie p53 und p21 aktiviert werden (Howie et al., 2009; McLaughlin-Drubin et al., 2009). Dafür wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden Expressionsvektoren für die HA-markierten E2 und E8<sup>E2C</sup>-Proteine transfiziert und mittels Immunoblot die Proteinmenge von p53 und p21 analysiert. Als Kontrolle diente der leere Vektor pSG5.

Wie in Abbildung 22 gezeigt, führte die Expression von HPV 16, 18 und 31 E2-HA oder E8<sup>E2C</sup>-HA zu einem Anstieg der p53 und p21 Proteinmengen, wobei die E8<sup>E2C</sup> Proteine eine etwas stärkere p53 Induktion zeigen. Da dies nicht auf erhöhte E8<sup>E2C</sup> Proteinmengen zurückzuführen ist, lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass die E8<sup>E2C</sup> Proteine die effizienteren Repressoren des frühen Promotors und der damit verminderten E6/E7-Expression sind.

## Ergebnisse

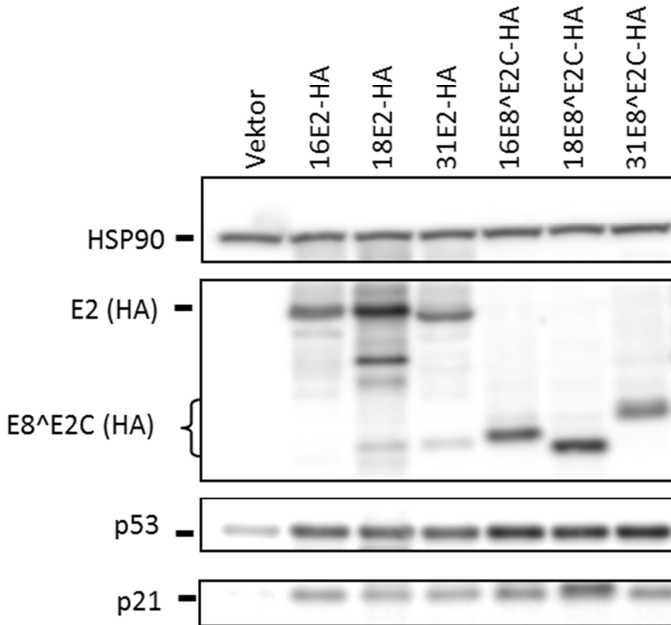


Abb. 22: Die Expression der E2 und E8<sup>E2C</sup>-Proteine von HPV16, 18 und 31 erhöht die p21 und p53 Proteinmengen. HeLa-Zellen wurden in 60mm-Schalen mit je 1µg der entsprechenden Expressionsvektoren oder dem Leervektor transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, in SDS-Ladepuffer (Rotiload) lysiert und die Proteine mittels spezifischer Antikörper im Immunoblot nachgewiesen. Modifiziert von Fertey, Hurst et al., 2011.

### **4.2.2 Die E2 und E8<sup>E2C</sup> Proteine von HPV16, 18 und 31 inhibieren das Wachstum von HeLa Zellen über die Induktion einen Zellzyklusarrests**

Um zu untersuchen welchen Einfluss die Rekonstitution von p53 und die Aktivierung seiner Zielgene auf die Zelle hat, wurden der DNA-Gehalt der transfizierten HeLa Zellen parallel zu den Western Blot-Analysen im Durchflusszytometer analysiert. Die Expression von HPV16, 18 und 31 E8<sup>E2C</sup> erhöhte den prozentualen Anteil der Zellen in der G1 Phase von 52,1% auf 63,4%, 65,5% bzw. 66,1% und reduzierte die Zellen in der G2 Phase von 19,3% auf 10,2%, 10,9% bzw. 9,5% (Abb. 23). Zu vergleichbaren Ergebnissen führte auch die Expression der entsprechenden E2 Proteine. Hier wurde ein Anstieg in der G1 Phase von 52,2% auf 60,6%, 57,9% bzw. 57,2% und eine Abnahme in der G2 Phase beobachtet von 19,3% auf 10,1%, 12,0% bzw. 11,3%. Dies bestätigt, dass E8<sup>E2C</sup> Proteine effizientere Repressoren des frühen Promotors sind. Jedoch führt die Expression beider Proteine zu einem Zellzyklusarrest, der auf den Verlust von E7 und die Reaktivierung der Rb Proteine und p21 zurückzuführen ist. Des Weiteren war nach Expression von E2 und E8<sup>E2C</sup> bei allen Typen ein leichter Anstieg in der sub-G1 Fraktion zu beobachten, was auf eine moderate Erhöhung der Apoptoserate hinweist (Abb. 23 a).

Um zu klären, ob die Apoptoseinduktion nur auf dem Verlust E6/E7 oder auf der für HPV18 E2 beschriebenen proapoptotischen Aktivität beruht, wurde die Expression der

Onkoproteine E6/E7 mittels siRNA verhindert. Dazu wurden HeLa Zellen mit je 600ng einer siRNA gegen E6 und E7 sowie einer Kontroll-siRNA behandelt. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle für die Reduktion der E6 und E7 Menge wurde die p53 Proteinmenge im Western Blot überprüft (Abb. 22). Die Analyse der siE6/E7- transfizierten Zellen ergab einen Anstieg von 56,0% auf 65,2% von Zellen in der G1 Phase und eine Reduktion der Zellen in der G2 Phase von 22,1% auf 9,5%. Zusätzlich kam es zu einer moderaten Erhöhung der apoptotischen Zellen von 7,0% auf 10,7%. Demzufolge ist die Apoptoseinduktion alleine auf den Verlust von E6/E7 zurückzuführen und nicht auf proapoptotischen Aktivitäten von E2 oder E8<sup>E2C</sup>.

## Ergebnisse

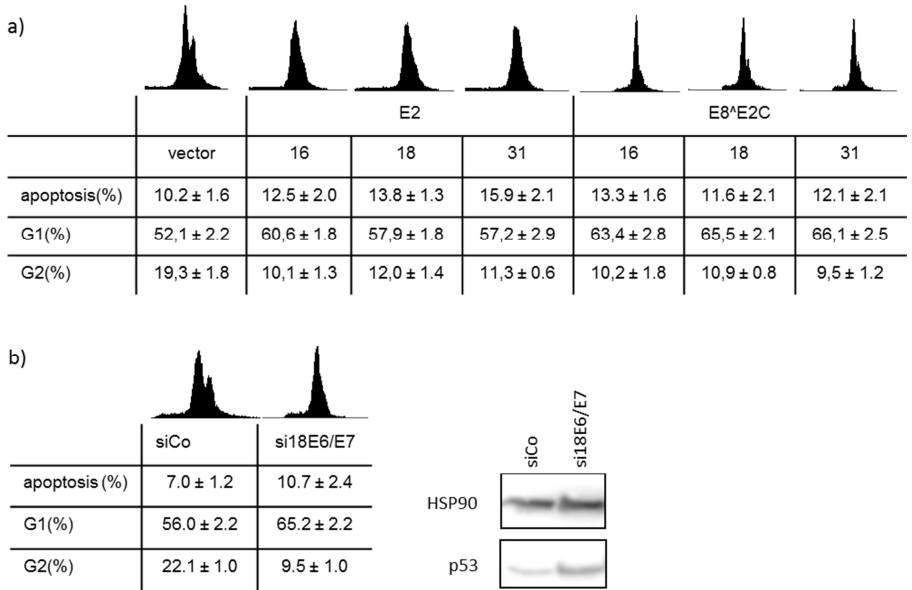


Abb. 23: a) Für die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus und der Apoptoseraten wurden HeLa- Zellen mit 1µg der entsprechenden Expressionsplasmide oder dem Leervektor transfiziert. Nach 48h wurde die zelluläre DNA mit PI angefärbt und der DNA Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Erfassung und Auswertung der Daten wurde die CellQuest Pro Software verwendet. Die gemittelten Prozentangaben stammen von fünf unabhängigen Transfektionsexperimenten.

b) HeLa-Zellen wurden mit siRNA transfiziert und 48h nach Transfektion wurden durch Immunoblotan p53 und HSP90- Proteinmengen nachgewiesen und Zellzyklusprofile sowie Apoptoseraten im Durchflusszytometer analysiert. Die Daten stellen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten dar.

Modifiziert von Fertey, Hurst et al., 2011

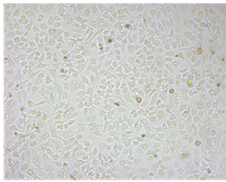


### **4.2.3 Langfristige Expression von E2 und E8<sup>E2C</sup> induziert Seneszenz in CxCa-Zellen**

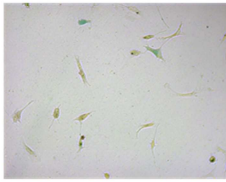
Um die Effekte einer langfristigen Expression von E2 und E8<sup>E2C</sup> in HeLa Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden für HPV16, 18 oder 31 E8<sup>E2C</sup> oder E2 und einem Puromycin-Resistenz Plasmid (pPur) in einem 5:1 Verhältnis kotransfiziert. Als Kontrolle wurde das leere Expressionsplasmid (pSG5) verwendet. Die Zellen wurden in Puromycin-haltigem Medium für 12 Tage kultiviert. Nach etwa fünf Tagen konnte man morphologische Veränderungen bei E2 und E8<sup>E2C</sup> transfizierten Zellen beobachten. Im Vergleich zur Vektorkontrolle waren sie abgeflacht, vergrößert und wuchsen nicht mehr in Kolonien sondern vereinzelt. Da derartige Veränderungen durch Induktion von zellulärer Seneszenz hervorgerufen werden können, wurden die Zellen zusätzlich auf die Aktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) untersucht. Die Detektion erfolgt über die Umsetzung von X-Gal durch SA- $\beta$ -Gal bei pH6 und der anschließenden Oxidation des Produkts durch Luftsauerstoff, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht (Dimri et al., 1995). Die Färbung ergab, dass der Großteil der E2 und E8<sup>E2C</sup> transfizierten Zellen, die eine morphologische Veränderung aufwiesen, auch positiv für SA- $\beta$ -Gal-Aktivität waren, während keinerlei Aktivität in der Vektorkontrolle vorhanden war (Abb. 24). Daraus kann man schließen, dass der durch die E2 und E8<sup>E2C</sup> Proteine verursachte Zellzyklusarrest zelluläre Seneszenz induziert.

## Ergebnisse

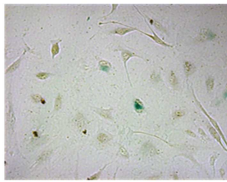
---



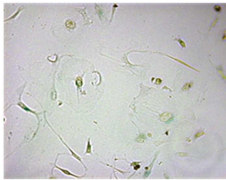
control



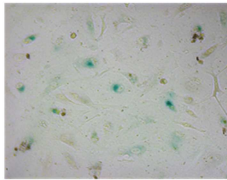
16 E8^E2C



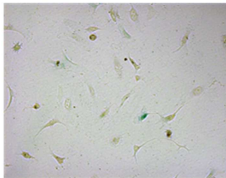
16 E2



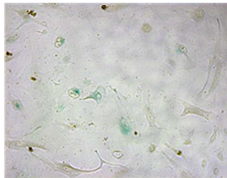
18 E8^E2C



18 E2



31 E8^E2C



31 E2

Abb 24:  
Langzeitexpression von E8^E2C in HeLa Zellen resultiert in morphologischen Veränderungen und der Aktivierung von Seneszenzmarkern, wie der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal). HeLa Zellen wurden mit einem Puromycin-

Resistenz Plasmid und den

Expressionsplasmiden für 16 E2, 18 E2, 31 E2, 16 E8^E2C, 18 E8^E2C, 31 E8^E2C und dem leeren Vektor als Kontrolle transfiziert. Nach Selektion mit Puromycin wurden die Zellen fixiert und SA- $\beta$ -Gal Aktivität durch x-Gal Zugabe bestimmt. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop aufgenommen (10x Vergrößerung). Modifiziert von Fertey, Hurst et al., 2011

### **4.3 Apoptoseinduktion in HPV-positiven Zellen**

#### **4.3.1 „Knockdown“ der Onkoproteine E6 und E7 von HPV16 und 18 erhöht geringfügig die Apoptoserate**

Wie in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, führt der Verlust der HPV-Onkoproteine E6 und E7 zu einer Wachstumsinhibition von CxCa-Zellen, was auf der Induktion eines Zellzyklusarrests und Apoptose beruht. E7 ist durch die Inaktivierung von pRB Proteinen hauptsächlich verantwortlich für die Proliferation, während E6 v.a. anti-apoptotische Aktivitäten besitzt. Um zu untersuchen, ob E7 die Apoptoserate beeinflusst, wurden zusätzlich siRNAs verwendet, welche spezifisch für E6 sind und somit nur zu einer Reduktion von E6 führen sollten. HPV16-positive CC10 und HPV18-positive HeLa Zellen wurden mit si16E6 und si16E6/E7 bzw. si18E6 und si18E6/E7 oder einer Kontrolle (siCo) transfiziert. Zur Validierung des „Knockdowns“ wurde durch Immunoblot die p53 Menge bestimmt, da ein direkter Nachweis von HPV16 oder 18 E6 und E7 Proteinen mit kommerziellen Antikörpern nicht erfolgreich war. Dies ergab, dass die p53 Menge im Vergleich zur Kontrolle nach Transfektion von si16E6 oder si16E6/E7 bzw. si18E6 oder si18E6/E7 erhöht war. Daraus lässt sich schließen, dass der „Knockdown“ von E6 bzw. E6/E7 in sowohl HeLa- als auch

CC10-Zellen erfolgreich war. Zum Nachweis der Anwesenheit von E7 wurde das Zellzyklusprofil der transfizierten Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Dies zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen siE6 und siE6/E7, da das gleichzeitige Ausschalten von HPV E6 und E7 in beiden Zelllinien zu einem Verlust von Zellen in der G2-Phase führte, während der alleinige „Knockdown“ von E6 keinen Einfluss auf den Zellzyklus hatte (Abb. 25). Dies belegt, dass siE6 nur die Expression von E6 aber nicht von E7 beeinträchtigt.

## Ergebnisse

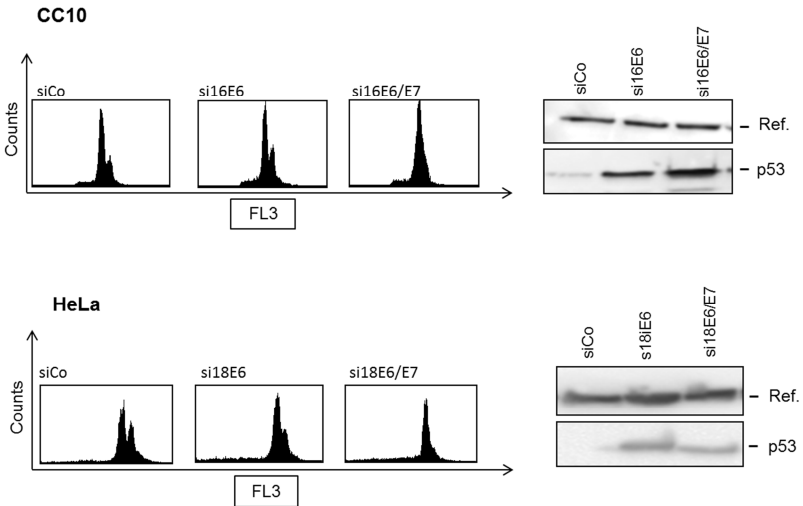


Abb. 25: Zellzyklusprofile und p53 Proteinmengen nach RNA Interferenz gegen E6 bzw. E6/E7 in HPV-positiven Zellen. Die Zellen wurden mit jeweils 1024ng siRNA und transfiziert und nach 48h geerntet. Eine Hälfte wurde in 4x SDS-Ladepuffer (Roti-Load) lysiert und ein Aliquot im Immunoblot auf die Anwesenheit von p53 überprüft (rechts). Bei der anderen Hälfte wurde die zelluläre DNA mit PI gefärbt und der DNA-Gehalt durch Durchflusszytometrie bestimmt. FL3 bezeichnet den verwendeten Fluoreszenzkanal.

Parallel zum Zellzyklus wurde die sub-G1 Population gemessen, um den Anteil der apoptotischen Zellen zu bestimmen. SiE6 und siE6/E7 erhöhten die DNA-Fragmentierung in beiden Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen siE6 und siE6/E7 beobachtet werden (Abb. 26).

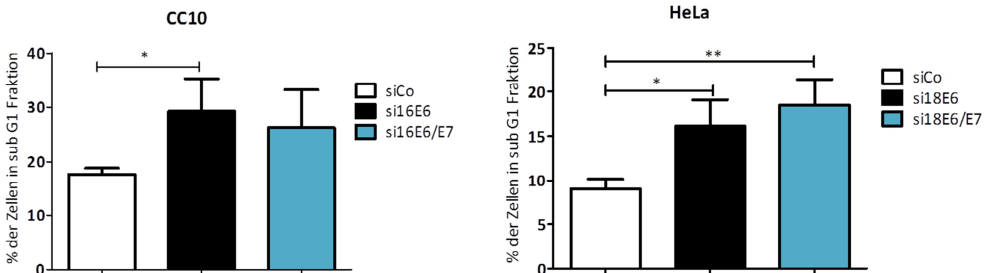


Abb. 26: Quantifizierung des Anteils der Zellen mit reduziertem DNA-Gehalt. Die sub-G1 Fraktion wurde nach siRNA-Transfektion, wie in Abb. 5 beschrieben, bestimmt. Die gemittelten Prozentangaben basieren auf mindestens fünf unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

### 4.3.2 Das Ausschalten des Tumorsupressorproteins p14ARF durch RNA Interferenz hat unerwartete Effekte auf HPV-positive Zellen

Diese Daten stehen im Gegensatz zur postulierten, pro-apoptotischen Rolle von E7, die sich darin begründet, dass E7 pRb Proteine inaktiviert und so nicht nur proliferationsrelevante Gene durch E2F, sondern auch p14ARF, einen Aktivator von p53 aktivieren sollte (Hwang et al., 2002; Hashii et al., 2004; Brooks et al., 2002). P14ARF inhibiert die beiden Ubiquitinligasen MDM2 und ARF-BP1/Mule, die u. a. für die Degradation von p53 verantwortlich sind. Während in E6-

positiven Zellen dieser Regulationsmechanismus keine Rolle spielen sollte, da die p53 Menge durch den HPV E6/E6AP-Komplex konstant niedrig gehalten wird, sollte in der Abwesenheit von E6 und Anwesenheit von E7 eine höhere p53 Menge und Aktivität beobachtet werden (Abb. 27).

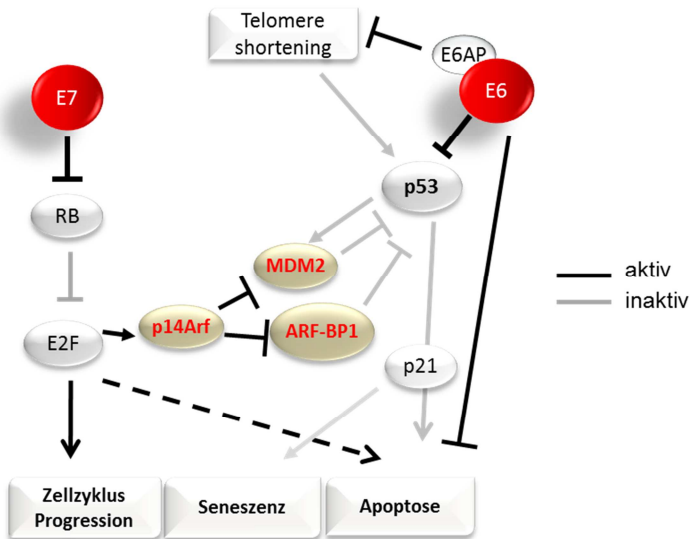


Abb. 27 : Vereinfachtes Modell der HR HPV E6 und E7 Interaktionen mit zellulären Proteinen.

Dies warf die Frage auf, ob CxCa-Zellen p14ARF exprimieren. Um das zu untersuchen, wurde die p14ARF Expression in HeLa-, CC10-, sowie in den HPV16 positiven CxCa-Zelllinien CaSki und CC7 durch Immunoblot überprüft. Als Kontrolle wurden normal humane Keratinozyten (NHK) verwendet. Es

## Ergebnisse

zeigte sich, dass in allen HPV-positiven CxCa Zelllinien aber nicht in NHK p14ARF Protein nachweisbar war (Abb. 28 a). Die Quantifizierung der p14ARF mRNA Transkripte durch qPCR ergab, dass CxCa Zelllinien 5- bis 17-mal mehr p14ARF Transkripte exprimieren als NHK-Zellen, was nahelegt, dass p14ARF v.a. transkriptionell in CxCa-Zellen reguliert wird (Abb. 28 b).

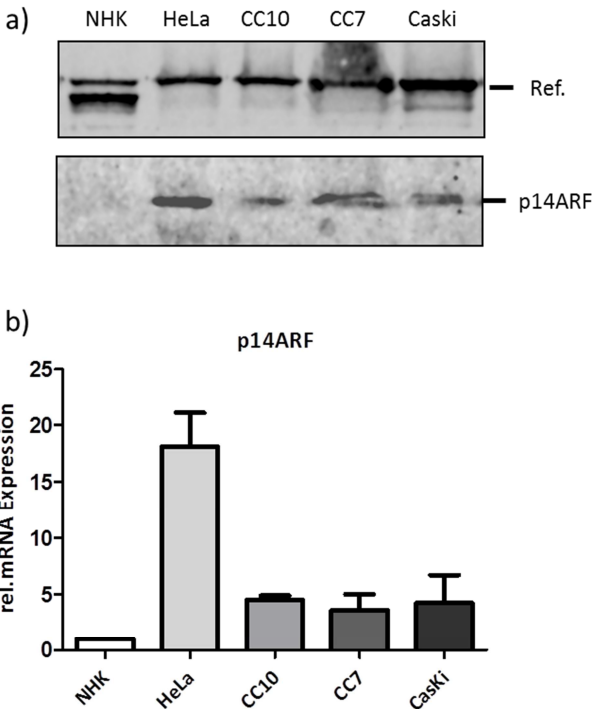


Abb.28: a) Analyse der p14ARF Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien. Die Zellen wurden ausgesät, nach 24h geerntet, in RIPA-



Puffer lysiert und Aliquots im SDS Puffer aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper. HSP90 wurde als Referenzprotein (Ref.) verwendet.

b) Bestimmung der relativen p14ARF mRNA Mengen durch qRT-PCR. Die gemittelten Ergebnisse basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. Alle Werte sind relativ zur mRNA Menge in NHK dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Da p14ARF in CxCa Zelllinien vorhanden ist, aber keine erhöhte Apoptoserate nach E6-„Knockdown“ zu beobachten war, wurde die Funktion von p14ARF weiter durch RNAi Experimente untersucht. Dazu wurden HeLa- und CC10-Zellen mit einer siRNA, welche gegen das p14ARF-spezifische Exon 1 gerichtet ist (Abb. 8) transfiziert. Immunoblotanalysen bestätigen eine Verringerung der p14ARF aber nicht der p16Ink4a Proteinmenge (Abb. 28 b). Überraschenderweise führte siARF1 zu einer veränderten Morphologie von HeLa- und CC10-Zellen und es waren vermehrt Zellen im Überstand zu beobachten (Abb. 28a). Zur Validierung der Beobachtungen und um Nebeneffekte auszuschließen, wurde eine zweite siRNA (siARF2) eingesetzt, deren Zielsequenz ebenfalls im ersten Exon liegt (Abb. 9). Auch siARF2 reduzierte spezifisch die p14ARF Proteinmenge und führte zu Veränderungen der Zellmorphologie sowie zu erhöhten Zellzahlen im Überstand (Abb. 29a, b). Eine Quantifizierung der p14ARF Transkripte durch qPCR nach siRNA-„Knockdown“ zeigte, dass siARF1 effizienter als siARF2 die RNA Mengen in beiden Zelllinien reduzierte (Abb. 29c).

## Ergebnisse

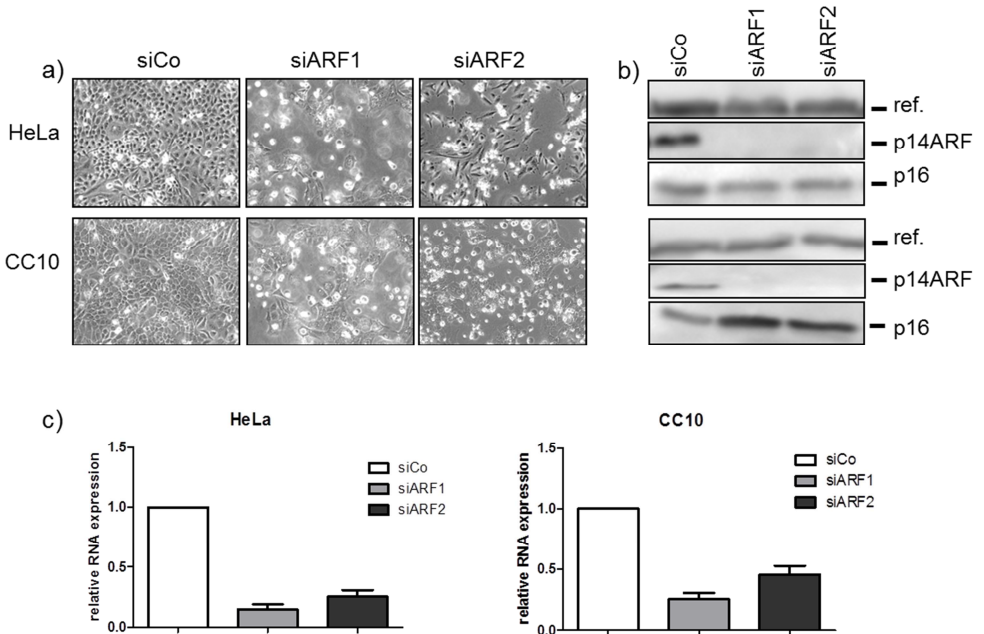


Abb.29: RNA Interferenz gegen p14ARF a) Morphologie von CC10- und HeLa-Zellen nach RNAi „Knockdown“ von p14ARF durch unterschiedliche siRNAs (siARF1 und siARF2) oder Kontroll-siRNA (siCo). Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop aufgenommen (10x Vergrößerung).

b) Immunoblotanalyse der p14ARF und p16 Proteinmengen nach siRNA Transfektion. HeLa- und CC10-Zellen wurden mit je 1024ng siRNA ARF-1, -2 oder siCo transfiziert. Nach 48h wurden Zellextrakte hergestellt und im Immunoblot auf die Anwesenheit von p14ARF, p16 und einem Referenzprotein (Ref.) kontrolliert.

c) Die Veränderung der Transkriptmengen nach siRNA Transfektion wurde durch qRT-PCR überprüft. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben transfiziert und RNA isoliert. Die Detektion der p14ARF mRNA erfolgte mit spezifischen Primern. Die Mittelwerte aus fünf

unabhängigen Experimenten sind im Diagramm dargestellt und beziehen sich auf die mRNA Menge der siCo transfizierten Zellen (=1).

### **4.3.3 Der „Knockdown“ von p14ARF führt in den HPV positiven Zellen zu einem Verlust der Viabilität und zu einem Anstieg der Apoptose**

Um den Einfluss von p14ARF auf das Zellwachstum zu quantifizieren, wurde die Zellproliferation nach siRNA Transfektion über vier Tage mit einem WST-Assay bestimmt. Zusätzlich zu siARF1, siARF2 und siCo wurde ein siRNA-Pool verwendet, welcher Zelltod („*AllStars Hs Cell Death Control siRNA*“; im Folgenden: siCellDeath, Qiagen) induziert. Die Überlebensrate wurde nach 2, 3 und 4 Tagen bestimmt und ist bezogen auf den Wert für Kontroll-siRNA transfizierte Zellen (=100 % Überlebensrate) (Abb. 30). SiCellDeath resultierte schon nach zwei Tagen in einer 50% reduzierten Viabilität und diese nahm im Verlaufe der Zeit in beiden Zelllinien auf 20% ab. Die siRNAs gegen p14ARF hatten zwei Tage nach Transfektion noch keinen großen Einfluss auf das Wachstum der HeLa-Zellen. Erst nach drei Tagen zeigte sich eine Abnahme der metabolischen Aktivität und nach vier Tagen waren nur noch 20% (siARF1) bzw. 60% (siARF2) lebende Zellen zu beobachten (Abb. 30). Bei CC10-Zellen verhielt es sich ähnlich. Allerdings war eine moderate Reduktion lebender Zellen bereits nach zwei Tagen zu beobachten. Nach vier Tagen war der Anteil der lebenden

## Ergebnisse

Zellen auf 40% bei siARF1 und auf 70% bei siARF2 reduziert. In beiden Zelllinien zeigte siARF1 stärkere Effekte als siARF2, was vermutlich auf die unterschiedliche Effizienz der siRNAs (Abb. 29c) zurückzuführen ist. Die Ergebnisse des WST-Assays bestätigen die zuvor gemachten Beobachtungen, dass der Verlust von p14ARF zur Reduktion der Zellproliferation führt.

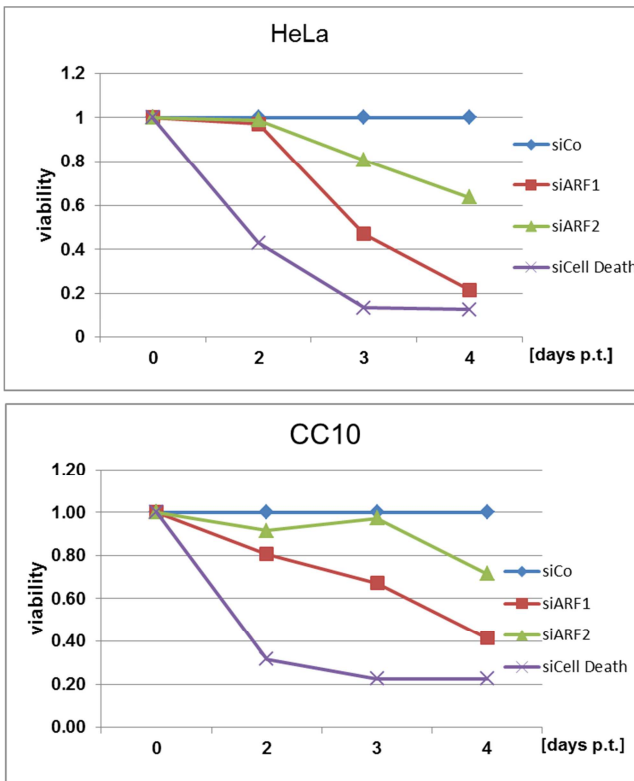


Abb. 30: Bestimmung der metabolischen Aktivität von HeLa- und CC10- Zellen 2, 3 und 4 Tage nach RNA Interferenz gegen p14ARF.

## Ergebnisse

---

HeLa- und CC10-Zellen (1500 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte) wurden mit je 50ng siRNA in Triplikaten transfiziert. Die Fraktion der lebenden Zellen wurde durch WST-1 Assay bestimmt. Die Resultate basieren auf den gemittelten Werten von zwei Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler.

Um zu untersuchen, ob das reduzierte Zellwachstum auf der Induktion von Apoptose beruht, wurde als nächster Schritt die DNA-Fragmentierung in Zellen nach siRNA-Transfektion durch Durchflusszytometrie gemessen. Als Zeitpunkt wurde 48h nach Transfektion gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die apoptotischen Effekte einsetzen sollten, aber noch ausreichend Zellen für die Analyse vorhanden sind. Zur Messung der DNA-Fragmentierung wurde in diesem Fall ein modifizierter Nicoletti-Assay verwendet, um auch p14ARF-negative NHK analysieren zu können. SiARF1 und 2 zeigten gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Anstieg von fragmentierten DNA in NHK, wohingegen siARF1 in HeLa- und CC10- Zellen die Apoptoseinduktion signifikant verdoppelte (Abb. 31). SiARF2 hatte einen geringen, signifikanten Anstieg der Apoptose zur Folge (Abb. 31). Demnach führt die RNA Interferenz gegen p14ARF nur in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen zur Apoptose.

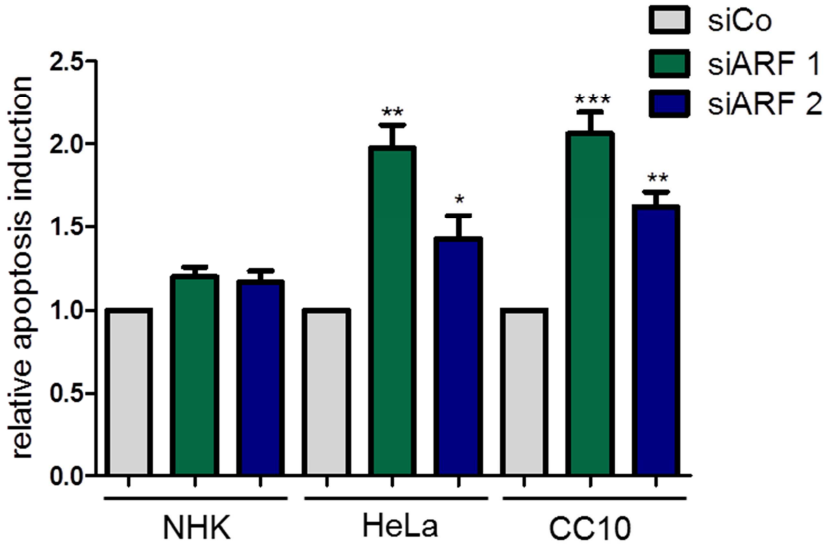


Abb. 31: Quantifizierung der Apoptoseinduktion nach Transfektion von siRNAs gegen p14ARF (siARF-1 und- 2). Der DNA-Gehalt wurde durchflusszytometrisch nach PI-Färbung bestimmt. Die gemittelten Prozentangaben von mindestens fünf unabhängigen Experimenten sind dargestellt und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

Um zu validieren, dass der Verlust von p14ARF Apoptose auslöst, wurde als zusätzlicher Apoptosemarker die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 durch Immunoblot überprüft, da Caspase 3 nach Aktivierung von Apoptosesignaltransduktionswegen in gespaltener Form

vorliegt. Zur Verifizierung einer effizienten siRNA Transfektion von NHK, wurden diese zusätzlich mit sip53 transfiziert und dies im Immunoblot überprüft. In NHK war eine deutliche Reduktion der p53 Menge nach sip53 Transfektion zu erkennen, was auf eine effektive siRNA Transfektion schließen lässt. Des Weiteren ist in Abbildung 32 eindeutig zu erkennen, dass CC10-Zellen wesentlich höhere p53 Proteinexpression als HeLa-Zellen aufweisen. Außerdem wird die p53 Proteinmenge in CxCa-Zellen nicht durch einen p14ARF „Knockdown“ beeinflusst. Im Gegensatz dazu, führt die Verringerung der p14ARF Menge zu einem Anstieg der gespaltenen, aktiven Form der Caspase 3 in HeLa- und CC10-Zellen. In NHK war dies nicht der Fall (Abb. 32). Zusammengefasst lässt dies schließen, dass p14ARF eine anti-apoptische Rolle in CxCa-Zellen besitzt.

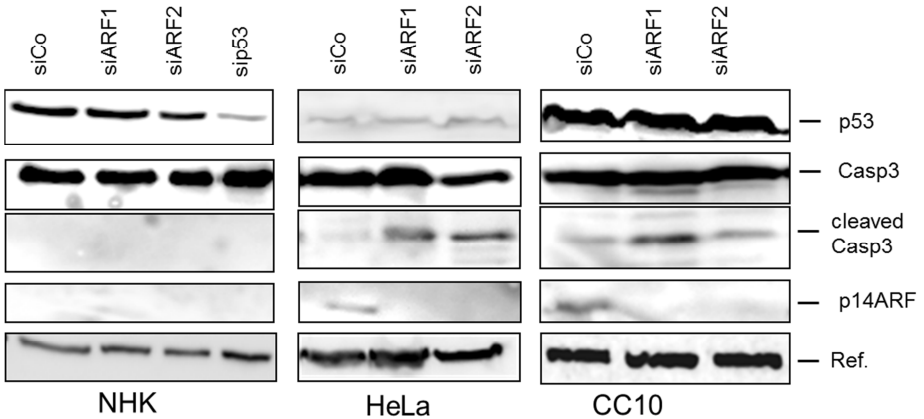


Abb. 32: Nachweis von p53, Caspase 3, p14ARF sowie einem Referenzprotein durch Immunoblot nach siRNA Transfektion gegen p14ARF. Aliquots der Zellextrakte wurden in einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper und einer Chemilumineszenzreaktion.

#### 4.3.4 CxCa-Zellen exprimieren die *Wildtyp* Form von p14ARF

P14ARF ist in der Literatur als Tumorsuppressorprotein beschrieben und eine p14ARF Überexpression in verschiedenen Zelllinien führt zur Apoptose. Dennoch weisen die untersuchten CxCa-Zelllinien hohe Mengen von p14ARF auf und eine Reduktion von p14ARF führte zur



Apoptoseinduktion. Eine mögliche Erklärung für diese unerwarteten Resultate wäre eine Mutation in dem Protein, die es funktionell inaktiviert.

Um dies zu kontrollieren wurde die p14ARF mRNA mit spezifischen Primern aus der Gesamt-RNA von HeLa- und CC10-Zellen amplifiziert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm *Vector NTI Advance10* mit der Referenzsequenz des humanen p14ARF verglichen (Abb. 33). Dies ergab, dass das p14ARF Protein in den HPV-positiven Zellen Wildtyp ist.

## Ergebnisse

		Section 1					
	(1)	1	10	20	30	40	53
p14ARF human	(1)	ATGGTGC GCAGGT TCTTGGT GACCC TCCGG ATTCGG CGCGCG TGC GGGCCCGC					
CC10 p14ARF	(1)	ATGGTGC GCAGGT TCTTGGT GACCC TCCGG ATTCGG CGCGCG TGC GGGCCCGC					
HeLa p14ARF	(1)	ATGGTGC GCAGGT TCTTGGT GACCC TCCGG ATTCGG CGCGCG TGC GGGCCCGC					
Consensus	(1)	ATGGTGC GCAGGT TCTTGGT GACCC TCCGG ATTCGG CGCGCG TGC GGGCCCGC					
		Section 2					
	(54)	54	60	70	80	90	106
p14ARF human	(54)	GCGAGT GAGGG TTTTCGT GGGTTCACAT CCCGCGGCTCACGGGGAGTGGGCAG					
CC10 p14ARF	(54)	GCGAGT GAGGG TTTTCGT GGGTTCACAT CCCGCGGCTCACGGGGAGTGGGCAG					
HeLa p14ARF	(54)	GCGAGT GAGGG TTTTCGT GGGTTCACAT CCCGCGGCTCACGGGGAGTGGGCAG					
Consensus	(54)	GCGAGT GAGGG TTTTCGT GGGTTCACAT CCCGCGGCTCACGGGGAGTGGGCAG					
		Section 3					
	(107)	107	120	130	140	159	
p14ARF human	(107)	CGCCAGGGGCGCCCGCCGCTGTGGCCCTCGTGTGATGCTACTGAGGAGCCAG					
CC10 p14ARF	(107)	CGCCAGGGGCGCCCGCCGCTGTGGCCCTCGTGTGATGCTACTGAGGAGCCAG					
HeLa p14ARF	(107)	CGCCAGGGGCGCCCGCCGCTGTGGCCCTCGTGTGATGCTACTGAGGAGCCAG					
Consensus	(107)	CGCCAGGGGCGCCCGCCGCTGTGGCCCTCGTGTGATGCTACTGAGGAGCCAG					
		Section 4					
	(160)	160	170	180	190	200	212
p14ARF human	(160)	CGTCTAGGGCAGCAGCCGCTTCCTAGAAGACCAGGTCATGATGATGGGCAGCG					
CC10 p14ARF	(160)	CGTCTAGGGCAGCAGCCGCTTCCTAGAAGACCAGGTCATGATGATGGGCAGCG					
HeLa p14ARF	(160)	CGTCTAGGGCAGCAGCCGCTTCCTAGAAGACCAGGTCATGATGATGGGCAGCG					
Consensus	(160)	CGTCTAGGGCAGCAGCCGCTTCCTAGAAGACCAGGTCATGATGATGGGCAGCG					
		Section 5					
	(213)	213	220	230	240	250	265
p14ARF human	(213)	CCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGAC					
CC10 p14ARF	(213)	CCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGAC					
HeLa p14ARF	(213)	CCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGAC					
Consensus	(213)	CCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCAACTGCGCCGAC					
		Section 6					
	(266)	266	280	290	300	318	
p14ARF human	(266)	CCCCGCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGA					
CC10 p14ARF	(266)	CCCCGCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGA					
HeLa p14ARF	(266)	CCCCGCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGA					
Consensus	(266)	CCCCGCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGA					
		Section 7					
	(319)	319	330	340	350	360	371
p14ARF human	(319)	CACGCTGGTGGTGTGTCACCGGGCCGGGGCGGGCTGGACGTGCGCGATGCCCT					
CC10 p14ARF	(319)	CACGCTGGTGGTGTGTCACCGGGCCGGGGCGGGCTGGACGTGCGCGATGCCCT					
HeLa p14ARF	(319)	CACGCTGGTGGTGTGTCACCGGGCCGGGGCGGGCTGGACGTGCGCGATGCCCT					
Consensus	(319)	CACGCTGGTGGTGTGTCACCGGGCCGGGGCGGGCTGGACGTGCGCGATGCCCT					
		Section 8					
	(372)	372	380	399			
p14ARF human	(372)	GGGGCCGCTCTGCCCGTGGACCTGGCTGA					
CC10 p14ARF	(372)	GGGGCCGCTCTGCCCGTGGACCTGGCTGA					
HeLa p14ARF	(372)	GGGGCCGCTCTGCCCGTGGACCTGGCTGA					
Consensus	(372)	GGGGCCGCTCTGCCCGTGGACCTGGCTGA					

Abb. 33: Sequenzvergleich der p14ARF mRNA aus HeLa- sowie CC10-Zellen und der Referenzsequenz für humanes p14ARF. Das „Alignment“ wurde mit der Software *Vector NTI Advance10* erstellt.

### **4.3.5 Die Effekte von siARF1 können durch Überexpression von p14ARF kompensiert werden**

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Apoptoseinduktion auf den Verlust von p14ARF beruht oder durch Nebeneffekte der siARF1 ausgelöst wird, wurden Expressionsplasmide kloniert, die die Wildtyp Form von p14ARF (pIRES p14ARF-WT) oder eine Mutante exprimieren, die resistent gegenüber der siARF1 ist (pIRES p14ARF-siRes). Bei diesen Experimenten erfolgte zuerst die Transfektion der siRNAs gegen p14ARF und der Kontroll-siRNA. Nach 8h wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert. Nach weiteren 48h wurden die Zellen geerntet und Zellextrakte für die Immunoblotanalyse sowie für die Analyse des DNA-Gehalts hergestellt.

Der Immunoblot in Abbildung 37 zeigt einen deutlichen Anstieg der p14ARF Menge nach Transfektion von pIRES-p14ARF-siRes in beiden Zelllinien, der nicht durch siARF1 reduziert wurde. Die Analyse des DNA-Gehalts ergab, dass in HeLa- und CC10-Zellen eine Überexpression von p14ARF die siARF1-ausgelöste Apoptoserate signifikant reduzierte (Abb. 34). Diese Resultate belegen, dass die siARF1-induzierte Apoptose auf dem Verlust von p14ARF beruht.

## Ergebnisse

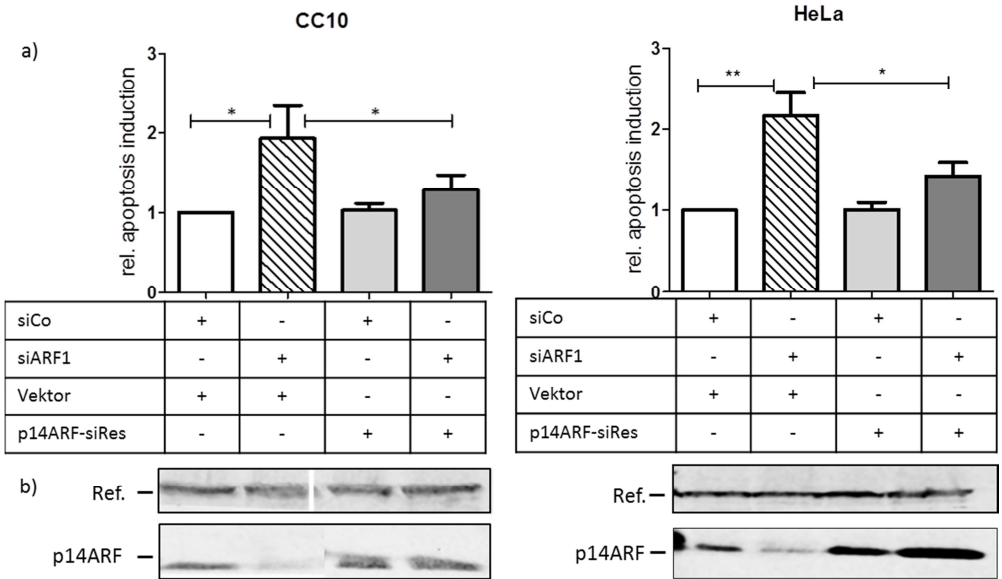


Abb.34: a) Überexpression einer siRNA-resistenten Mutante von p14ARF reduziert die Apoptoserate in HeLa- und CC10-Zellen. Die Zellen wurden zuerst mit siRNA und anschließend mit den Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 48h wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA bestimmt und ist relativ zur Kontroll-Transfektion (pIRESpuro + siCo) dargestellt. Die gemittelten Prozentangaben von mindestens sechs unabhängigen Experimenten sind abgebildet und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

b) Nachweis von p14ARF und einem Referenzprotein durch Immunoblot nach siRNA/DNA Transfektion. Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen.

Zusätzlich wurde mittels Immunfluoreszenz die Expression der exogenen Proteine überprüft. Dafür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit dem Expressionsplasmid pIRES p14ARF-WT transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen p14ARF gefärbt. Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, wird das exogene Protein stark exprimiert und zeigt dieselbe Lokalisation wie das endogene p14ARF. Ausserdem zeigten Zellzyklusanalysen, dass eine p14ARF Überexpression keinen Einfluss auf den Zellzyklus in HeLa Zellen besitzt (Abb. 35 b).

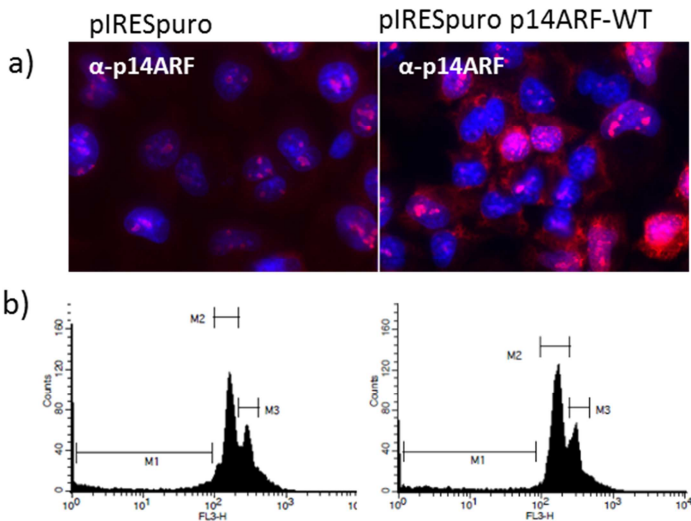


Abb. 35: a) Immunfluoreszenzanalyse von p14ARF-WT transient transfizierten Zellen. Die Zellen wurden auf Deckgläsern transfiziert,

fixiert und gefärbt. Für den Nachweis der Proteine wurden spezifische Primärantikörper und ein Alexa555-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop aufgenommen (63x Vergrößerung).

b) Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse nach Überexpression von p14ARF in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion nach dem Nicoletti Protokoll angefärbt und der DNA-Gehalt gemessen.

Im Histogramm dargestellt, ist die sub G1-Phase (M1), die G1-Phase (M2) und die S/G2-Phase (M3). FL3-H bezeichnet den verwendeten Fluoreszenzkanal.

### **4.3.6 Der „Knockdown“ von p14ARF führt zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials**

Um die Apoptoseinduktion näher zu charakterisieren, sollte zunächst untersucht werden, ob der extrinsische oder der intrinsische Weg aktiviert wird. Charakteristisch für den extrinsischen Weg ist die Einleitung der Apoptose über Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie (z.B. CD95). Beim intrinsischen Weg ist immer das Mitochondrium beteiligt und es kommt zur Porenbildung in der mitochondrialen Membran, was zu einem das Membranpotential herabsetzt und zur Freisetzung mitochondrialer Proteine, wie Cytochrom c, in das Zytoplasma. Daher wurde die Abnahme des

Membranpotentials gemessen. Der Fluoreszenzfarbstoff TMRE diffundiert in lebenden Zellen in das Mitochondrium und wird dort zurückgehalten, solange das Membranpotential aufrechterhalten wird. Dies kann im Durchflusszytometer erfasst werden. Kommt es zur Porenbildung, diffundiert der Farbstoff in das Zytoplasma, was zu einer reduzierten Fluoreszenzintensität führt. Als negative Kontrolle dienten siCo-transfizierte und als Positivkontrolle siCellDeath-transfizierte Zellen. Im Histogramm repräsentiert der rechte Gipfel Zellen mit intaktem mitochondrialen Membranpotential. In dem linken Areal (M1) befinden sich alle Zellen die eine reduzierte Fluoreszenzintensität aufweisen und folglich ein reduziertes mitochondriales Membranpotential haben. Ein Anstieg von M1 spricht für eine Induktion der mitochondrialen Apoptose. Wie aus Abbildung 36 zu ersehen ist, führt in beiden Zelllinien der „Knockdown“ von p14ARF zu einem Anstieg der Zellen mit reduzierter Fluoreszenzintensität. In CC10-Zellen nimmt der prozentuale Anteil von durchschnittlich 11,9% auf 24,9% zu und in HeLa-Zellen von durchschnittlich 19,7% auf 35,7% zu, was bedeutet, dass es in diesen Zellen zur Porenbildung kam. Dies war nicht der Fall in NHK, wo nur ein geringer Anstieg von 8,5% auf durchschnittlich 10,3% beobachtet wurde. Dies legt nahe, dass der Verlust von p14ARF in HPV-positiven Zellen zur Induktion der mitochondrialen Apoptose führt.

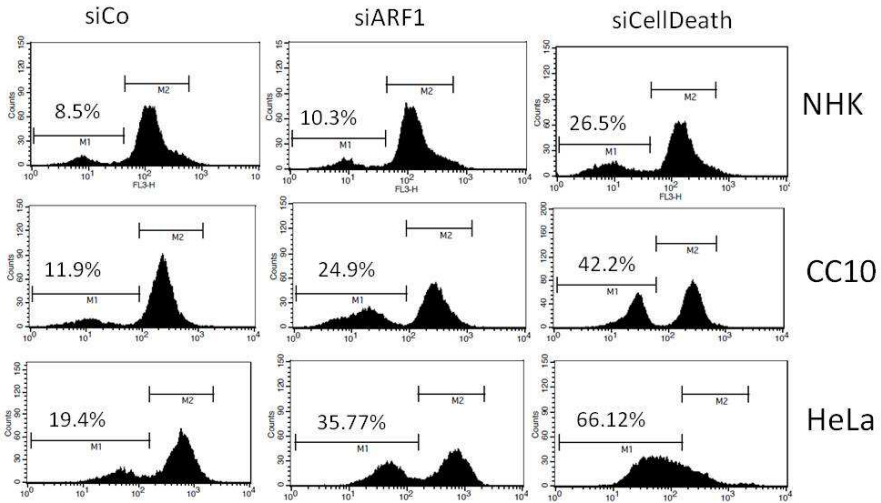


Abb. 36: Messung des mitochondrialen Membranpotentials nach siRNA Transfektion mittels TMRE Färbung und Durchflusszytometrie. HeLa-, CC10- und NHK-Zellen wurden in 6-Well Kulturschalen mit je 600ng siRNA transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, pelletiert und mit dem TMRE Farbstoff inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die gemittelten Prozentangaben basieren auf drei unabhängigen Experimenten.

### 4.3.7 Der „Knockdown“ von p14ARF reduziert die Mcl-1 Proteinmenge

Es konnte belegt werden, dass die Reduktion des Tumorsuppressorproteins p14ARF in HPV positiven Zellen die



Apoptoserate erhöht und dass es sich hierbei um die Induktion mitochondrialer Apoptose handelt. Chen et al. beschrieben 2005, dass p14ARF in der Lage ist die E3 Ubiquitinligase ARF-BP1 (LASU-1, HECTH9, HUWE-1, Mule im folgenden Mule genannt) zu inhibieren. Eine andere Arbeit von Zong et al. belegt das Mule u.a. den proteasomalen Abbau von Mcl-1 reguliert (Zhong et al., 2005). Mcl-1 gehört zu den anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie und ist in der Lage, die Bildung membran-durchspannender Poren zu verhindern. Um zu überprüfen, ob p14ARF Mcl-1 reguliert, wurde zunächst die Mcl-1 Proteinmenge nach RNA-Interferenz gegen p14ARF bestimmt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Transfektion von siARF1 in beiden CxCa Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Mcl-1 Menge führt (Abb. 37). Dies weist daraufhin, dass eine Korrelation zwischen der p14ARF und der Mcl-1 Proteinmenge besteht.

## Ergebnisse

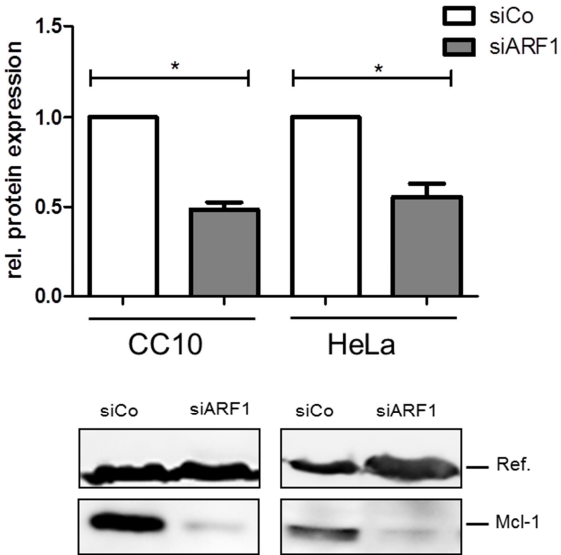


Abb. 37: Relative Proteinexpression von Mcl-1 nach RNA Interferenz gegen p14ARF. In mindestens acht unabhängigen Experimenten wurden die Mcl-1 Proteinmenge der HeLa- und CC10-Zellen im Immunoblot überprüft. Die Quantifizierung erfolgte mit der ImageLab Software der Firma LiCor und die statistische Auswertung mit der GraphPad Software. Die Proteinmengen wurden auf das Referenzprotein HSP90 (Ref.) normiert. Die Proteinmengen sind relativ zur Negativkontrolle (=1) dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

QRT-PCR Experimente belegten, dass die sich Menge der Mcl-1 mRNA durch den p14ARF „Knockdown“ nicht verändert. Daraus lässt sich schließen, dass die Reduktion der Mcl-1

## Ergebnisse

Proteinmenge nach p14ARF „Knockdown“ auf post-transkriptionellen Mechanismen beruht.

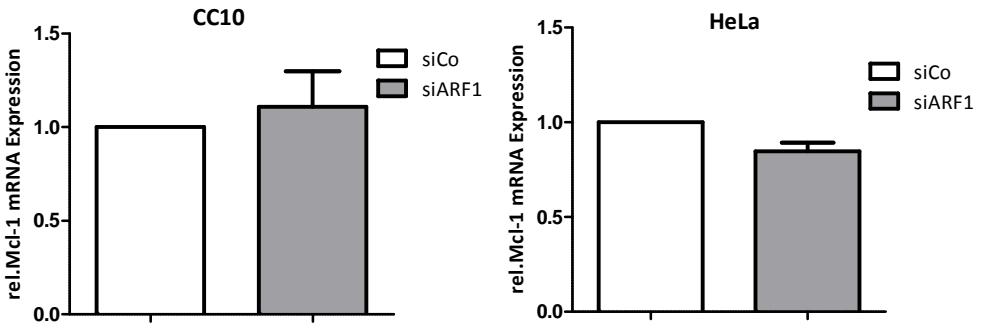


Abb. 38: Bestimmung der Mcl-1 mRNA Menge nach p14ARF „Knockdown“ durch qRT-PCR. Die Ermittlung der relativen mRNA-Expression bezogen auf die Kontrolle erfolgte nach Pfaffl (Pfaffl 2001). Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens vier unabhängigen Experimenten und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Als nächstes wurde durch RNA Interferenz gegen Mcl-1 überprüft, ob die Reduktion von Mcl-1 ausreicht um die Apoptoserate zu erhöhen. Die Reduktion der Mcl-1 Menge im Immunoblot beweist, dass die RNA Interferenz in beiden Zelllinien funktionierte (Abb. 39). Parallel konnte in den Zellen, die mit siMcl-1 transfiziert wurden, eine erhöhte Anzahl an Zellen mit fragmentierter DNA detektiert werden, was dafür spricht, dass der Verlust von Mcl-1 ausreicht, um die Apoptoserate zu steigern.

## Ergebnisse

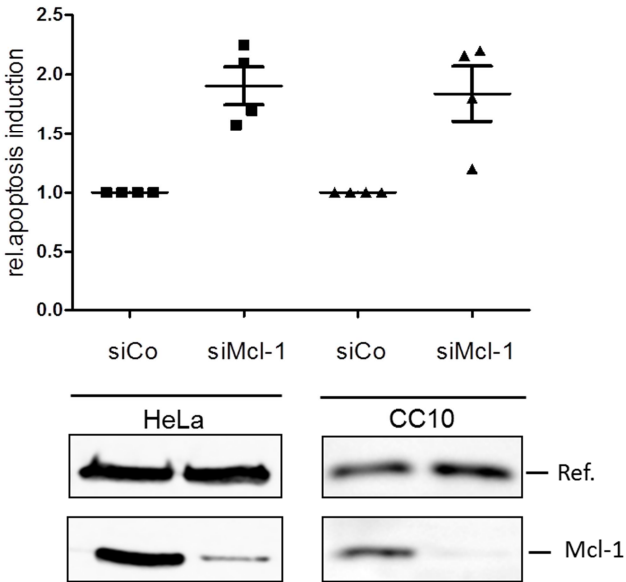


Abb. 39: Graphische Darstellung der relativen Apoptosezunahme nach Mcl-1 „Knockdown“ in HPV-positiven CC10- und HeLa-Zellen. Der prozentuale Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA wurde im Durchflusszytometer bestimmt und in Relation zur Kontroll-siRNA gesetzt. Die relativen Werte von vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt und die horizontalen Striche repräsentieren den Mittelwert.

Unten: Nachweis der Proteinreduktion nach RNA-Interferenz gegen Mcl-1 im Immunoblot für beiden HPV-positiven Zelllinien.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die durch die siARF1 induzierte Apoptose im direkten Zusammenhang mit der Mcl-1 Reduktion steht. Dazu wurde zusätzlich zu

siARF1 eine Mcl-1 Mutante (Mcl-1 K5R) kotransfiziert, die nicht mehr ubiquitiniert und degradiert werden kann, ansonsten aber funktional ist (Snyder et al., 2009). Im Immunoblot ist eine Abnahme des Mcl-1 Proteins in den mit siARF1 und pSG5 transfizierten Zellen festzustellen. Dahingegen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Mcl-1 K5R Proteinmenge in den Zellen, die zusätzlich mit dem Mcl-1 K5R Expressionsvektor transfiziert wurden. Zudem ist keine Abnahme der Mcl-1 K5R Menge zwischen Kontroll-siRNA- und siARF1-transfizierten Zellen zu erkennen. Im Einklang damit führte die Überexpression von Mcl-1 K5R zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials und kompensierte die Effekte von siARF1 (Abb. 40). Daraus lässt sich schließen, dass die Apoptose nach „Knockdown“ von p14ARF durch die Degradation von Mcl-1 eingeleitet wird.

## Ergebnisse

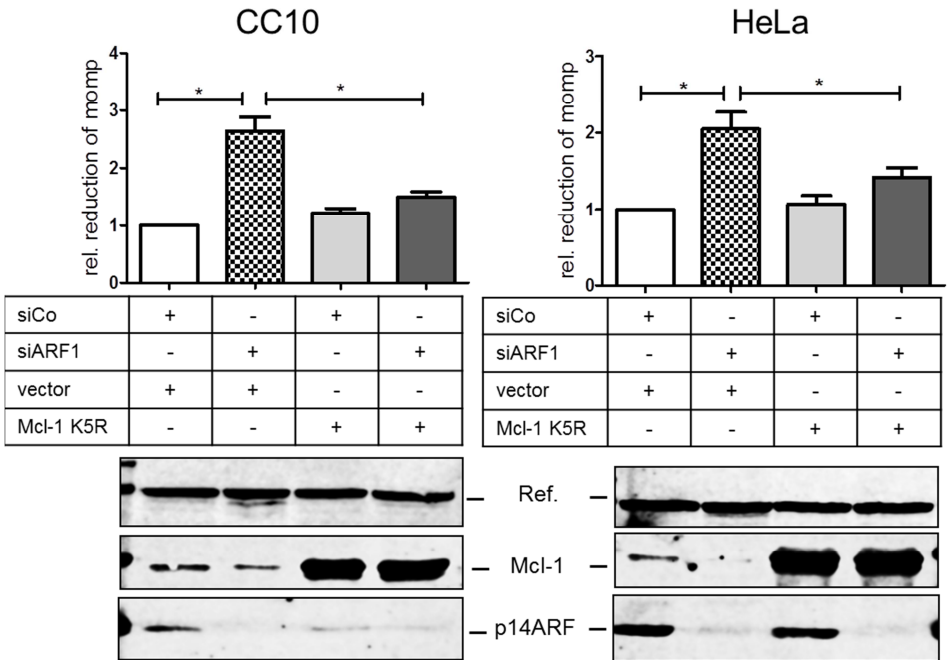


Abb. 40: Graphische Darstellung der relativen Zellzahlen von CC10- und HeLa-Zellen, die nach siRNA Behandlung ein vermindertes Membranpotential haben. Die Transfektion der Zellen erfolgt wie in Kap 4.3.6 beschrieben. Nach 48h wurden die Zellen mit Trypsin gelöst, 20min mit TMRE inkubiert und die Fluoreszenzemission im Durchflusszytometer gemessen. Zur Auswertung wurden die mit siCo und pIRESpuro transfizierten Zellen 1 gesetzt. Die gemittelten Prozentangaben von mindestens sechs unabhängigen Experimenten sind abgebildet und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

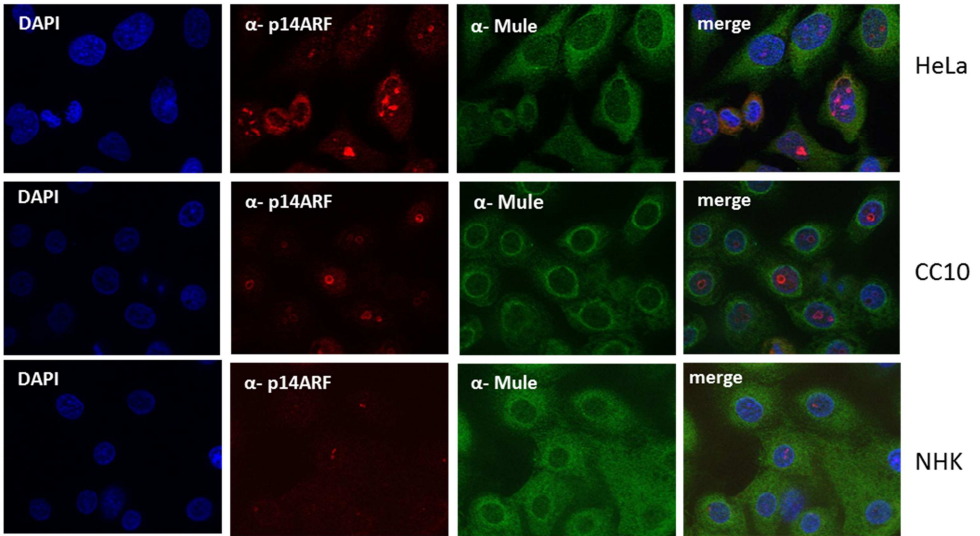
Unten: Immunologischer Nachweis der Mcl-1 K5R Überexpression in HeLa- und CC10- Zellen in Kombination mit siRNA Transfektion. Aliquots des Zelllysats wurde nach 48h hergestellt, in 12%igen SDS-Gelen aufgetrennt und im Immunoblot die Proteinmenge mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt.

### **4.3.8 Die Mcl-1 Degradation nach p14ARF „Knockdown“ wird durch Mule vermittelt**

Zunächst wurde die Expression und Lokalisation der Proteine p14ARF, Mcl-1 und Mule mit Immunfluoreszenzfärbungen in HeLa-, NHK- und CC10-Zellen überprüft. In Abbildung 44 ist abermals zu sehen dass p14ARF in den HPV positiven Zellen hauptsächlich im Nukleolus vorliegt, während in den NHK-Zellen kein Protein zu detektieren ist. In HPV-positiven und-negativen Zellen konnten Signale für Mule im Zytoplasma und an der Kernmembran detektiert, was konform ist mit der beschriebenen Lokalisation für Mule ( Parsons et al., 2009). Der Mcl-1 Antikörper zeigte ein überwiegend zytoplasmatisches Signal (Abb. 41 b). Eine Immunfluoreszenzanalyse zur Kolokalisation von Mule und Mcl-1 war nicht möglich, da beide Antikörper vom Kaninchen stammten.

## Ergebnisse

a)



b)

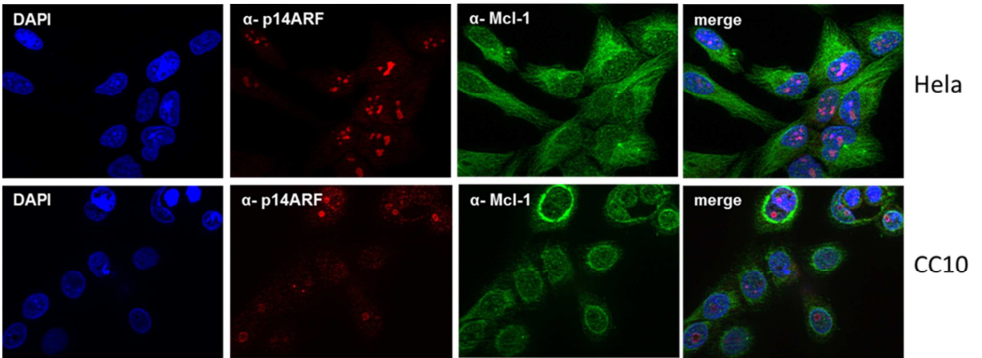


Abb. 41: Immunfluoreszenz a) Nachweis von p14ARF und Mule sowie b) p14ARF und Mcl-1 in HeLa-, CC10- und NHK-Zellen. Die Zellen wurden fixiert und gefärbt. Für die Darstellung der Proteine wurden spezifische Primärantikörper gegen p14ARF, Mule und Mcl-1 sowie Alexa488 bzw. 555-gekoppelte Sekundärantikörper



verwendet. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

Um zu testen, ob Mule für die p14ARF-regulierte Degradation von Mcl-1 verantwortlich ist, wurden HeLa- und CC10 -Zellen mit siARF1 und siMule alleine oder in Kombination transfiziert. Erwartet wurde, dass im Vergleich zum alleinigen „Knockdown“ von p14ARF, der kombinierte „Knockdown“ von p14ARF und Mule zu einer Rekonstitution der Mcl-1 Menge führt und die Apoptoseinduktion reduziert. Nach 48h wurde das mitochondriale Membranpotential der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt und Zellextrakte für die Immunoblotanalyse hergestellt. In Abbildung 42 ist zu sehen, dass in beiden HPV-positiven Zelllinien durch siMule die Mule Menge reduziert wird. Darüber hinaus zeigt der gleichzeitige „Knockdown“ von p14ARF und Mule einen Anstieg der Mcl-1 Proteinmenge.

## Ergebnisse

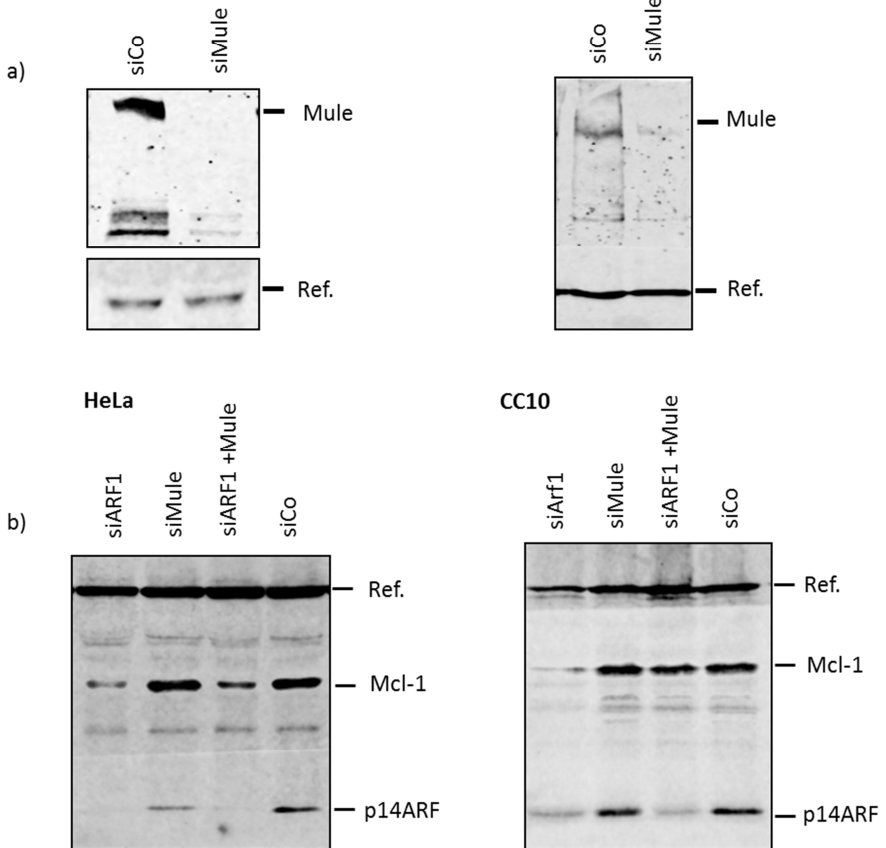


Abb. 42: Im Immunoblot wurden die Mengen von Mule a), Mcl-1 und p14ARF b) in HeLa- und CC10-Zellen nach siRNA Transfektion mit siRNAs gegen die angeführten Proteine überprüft.

Die Zellen wurden in 60mm Zellkulturschalen mit 2048ng siRNA transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen geerntet, ein

Aliquot jedes Transfektionsexperimentes wurde in 7%igen bzw. 12%igen SDS-PAGE Gelen aufgetrennt und im Immunoblot der Protein-Gehalt mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt. Die andere Hälfte wurde für die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials verwendet.

Die Messung des mitochondrialen Membranpotentials bestätigte den Zusammenhang. Während siARF-1, aber nicht siMule, in beiden Zelllinien zu einem Verlust des Membranpotentials führte, wurde dieser Effekt durch die Kotransfektion siARF-1/siMule wieder reduziert (Abb. 43 a). Allerdings sind die Ergebnisse der DNA Fragmentierung derselben Ansätze nicht so eindeutig. In HeLa-Zellen war auch eine signifikante Reduktion der Apoptoserate nach kombiniertem „Knockdown“ von p14ARF und Mule zu beobachten, jedoch ist dies in CC10-Zellen nicht der Fall (Abb. 43 b). Anders als in HeLa-Zellen induziert schon der „Knockdown“ von Mule in CC10-Zellen eine erhöhte DNA-Fragmentierung und die Kombination beider siRNAs reduziert die DNA-Fragmentierung nicht. Das bedeutet, dass der Verlust von Mule in CC10-Zellen zum Zelltod über einem Mitochondrium-unabhängigen Weg führt. damit im Einklang ist auch, dass die Mcl-1 Menge durch den Mule-„Knockdown“ nicht beeinflusst wird (Abb. 41 b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mule in CC10-Zellen noch weitere Funktionen hat, die nicht von p14ARF inhibiert werden. Damit konnte belegt werden, dass p14ARF in CxCa-Zellen eine protektive Rolle spielt, indem es die Induktion der mitochondrialen Apoptose verhindert. Der Mechanismus

## Ergebnisse

beruht vermutlich auf der Interaktion mit Mule, was in der Stabilisierung von Mcl-1 resultiert.

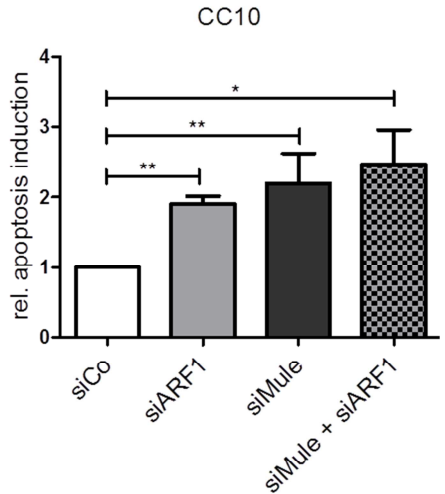
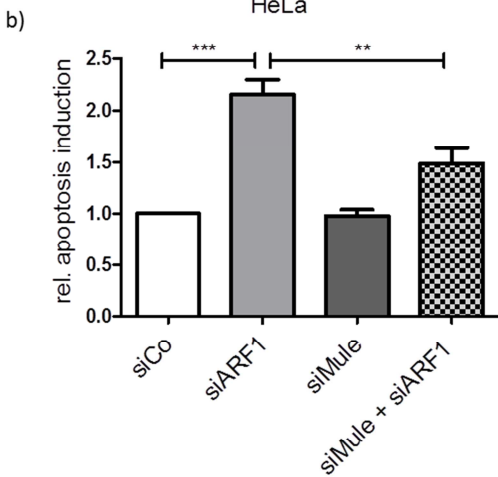
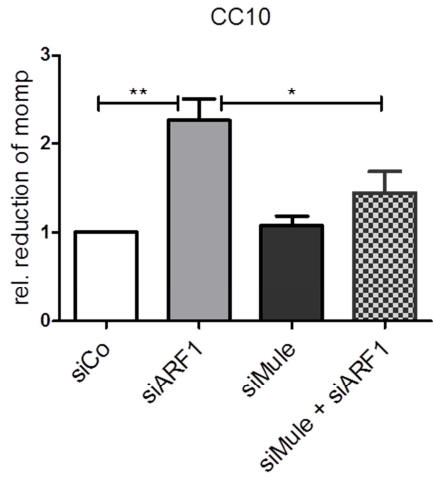
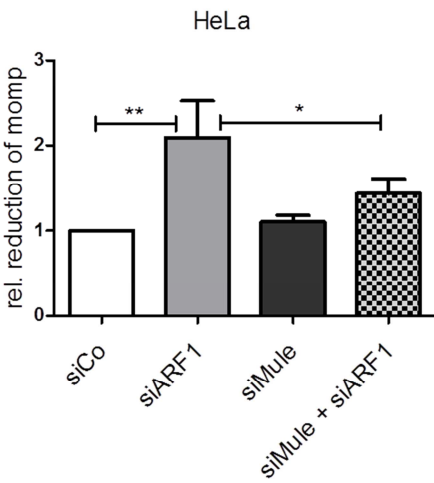


Abb.43: a) Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials von HeLa- und CC10-Zellen nach siRNA Transfektion. Nach insgesamt 48h wurden die Zellen mit Trypsin gelöst, 20min mit dem TMRE Farbstoff inkubiert und anschließend erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer. Die Daten wurden auf siCo transfizierte Zellen normalisiert. Die Mittelwerte von mindestens sechs unabhängigen Experimenten sind dargestellt und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

b) Quantifizierung der Apoptoseinduktion nach Transfektion von siRNAs gegen p14ARF und Mule. Der DNA-Gehalt wurde durchflusszytometrisch nach PI-Färbung bestimmt. Die gemittelten Prozentangaben von mindestens sieben unabhängigen Experimenten sind dargestellt und die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test ermittelt.

### **4.3.9 Weitere Interaktionspartner von Mule**

Im vorherigen Kapitel konnte bewiesen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen p14ARF, Mule und Mcl-1 Stabilität in HPV-positiven Zellen gibt. Allerdings haben die Versuche in den CC10- Zellen gezeigt, dass der Verlust von Mule auch zum Zelltod führt. Daher muss es noch weitere Funktionen von Mule geben, die nicht von p14ARF inhibiert werden und in HPV16-positiven CC10 Zellen wichtig für das Überleben sind. In der Literatur sind zahlreiche Interaktionspartner von Mule beschrieben worden (siehe Kap. 2.6), so konnte für DNA-Polymerase  $\beta$  und  $\lambda$  gezeigt werden, dass die Inhibition der

Mule-Aktivität durch p14ARF die DNA Reparatur verstärkt. Ein weiteres Protein, das durch Mule der proteasomalen Degradation zugeführt wird ist HDAC2 (Zhang et al., 2011).

Dabei handelt es sich um eine Histon-Deacetylase der Klasse I, welche über die Acetylierung spezieller Lysinreste von Histone die Transkription reguliert.

Aufgrund der zuvor beschriebenen Beobachtungen trat die Frage auf, ob der „Mule-Knockdown“ in HeLa- und CC10-Zellen einen Einfluss auf die HDAC2 Proteinmenge hat und ob es diesbezüglich einen Unterschied zwischen HeLa- und CC10-Zellen gibt, der eine Erklärung für den Zelltod nach dem „Mule-Knockdown“ geben würde. Dafür wurden die Zellen mit siMule transfiziert und im Immunoblot die Mengen von HDAC2 überprüft. In Abbildung 44 ist in beiden Zelllinien ein deutlicher Anstieg der HDAC2 Proteinmenge nach „Mule-Knockdown“ zu sehen, was bestätigt, dass Mule für den proteasomalen Abbau von HDAC2 verantwortlich ist.

Allerdings sind keine Unterschiede in den HDAC2 Mengen zwischen HeLa- und CC10-Zellen zu erkennen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich HeLa- von den CC10-Zellen in speziellen Genen, deren Transkription HDAC2 reguliert, unterscheiden oder dass noch ein weiterer Interaktionspartner von Mule für die Apoptose in den CC10-Zellen verantwortlich ist.

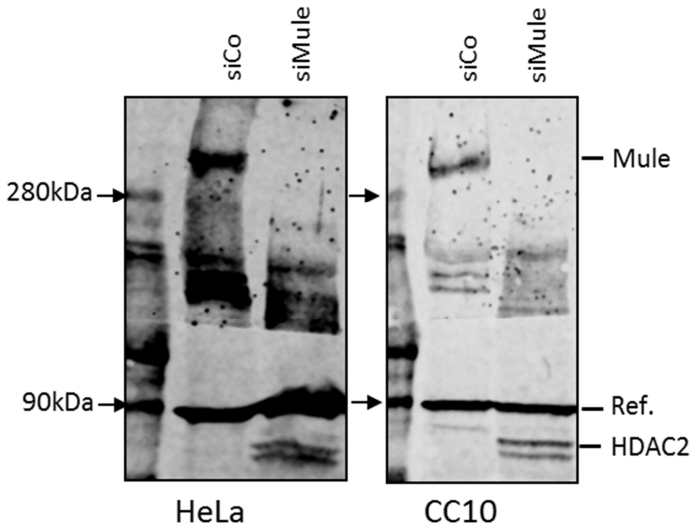


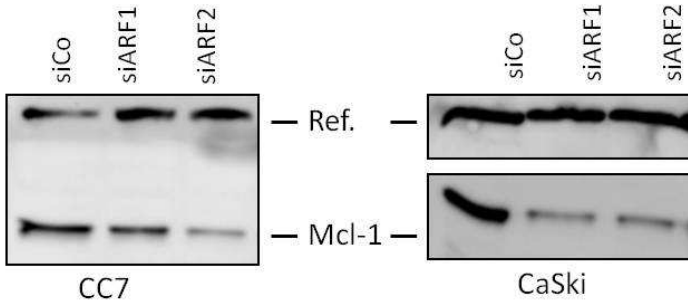
Abb. 44: Nachweis von HDAC2. Im Immunoblot wurden die Mengen von Mule, HDAC2 und einem Referenzprotein in HeLa- und CC10-Zellen nach siRNA Transfektion von siMule überprüft. Hierfür wurde ein 7%iges SDS-PAGE verwendet, um den Nachweis von Mule zu gewährleisten.

### **4.3.10 „Knockdown“ von p14ARF führt in weiteren HPV-positiven Zelllinien ebenfalls zur Apoptoseinduktion**

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die anti-apoptotische Funktion von p14ARF in HPV16-positiven CxCa-Zelllinien, welche p14ARF überexprimieren (Abb. 28), konserviert ist. Dazu wurden CaSki-Zellen, eine seit längerem kultivierte Zelllinie und CC7-Zellen die, wie die CC10-Zellen, eine neu etablierte CxCa Zelllinie darstellen, ausgewählt. Beide Zelllinien wurden mit siARF1 und -2 transfiziert und die Mcl-1 Menge im Immunoblot und die DNA-Fragmentierung im Durchflusszytometer analysiert. Auch in diesen Zellen kam es nach Transfektion von siARF1 und -2 zu einer deutlichen Reduktion der Mcl-1 Proteinmengen (Abb. 45). Übereinstimmend damit, konnte ein Anstieg von fragmentierter DNA detektiert werden (Abb. 45). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die p14ARF-Mule Interaktion und die damit verbundene Mcl-1 Stabilisierung in allen zervikalen Krebszellen konserviert ist und diese Zellen vor Apoptose schützt.



## Ergebnisse



CC7	siCo	siARF1	siARF2
rel. Apop. Ind	1.00	1.52	1.38

CaSki	siCo	siArf1	siArf2
rel. Apop. Ind	1.00	1.62	1.27

Abb. 45: Immunologischer Nachweis der Mcl-1 Proteinreduktion nach RNA Interferenz gegen p14ARF. Zelllysate wurden 48h nach Transfektion hergestellt, in 12%igen SDS-Gelen aufgetrennt und im Immunoblot die Proteinmenge mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt.

Tabelle: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoseinduktion nach siRNA Transfektion von HPV-positiven CC7- und CaSki-Zellen. Hierzu wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA im Durchflusszytometer bestimmt und ist relativ zur Kontrolle (siCo=1) dargestellt.

### **4.3.11 Der Verlust von p14ARF sensitiviert HeLa Zellen gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose**

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) gehört zu den zytotoxischen Liganden der TNF Familie und ist einer der wichtigsten Faktoren für die Inaktivierung von Tumorzellen (Huang et al., 2007; Merino et al., 2007). TRAIL induziert Zelltod in einer Vielzahl von Krebsarten, unabhängig vom p53 Status und ohne ersichtliche, toxische Effekte auf das normale Gewebe. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass TRAIL und andere Todesliganden wie CD95/FasL und TNF $\alpha$  Tumorzellen gegenüber ionisierter Strahlung und Medikamenten induzierter Apoptose empfänglicher machen (Marini et al., 2005; Fulda 2009; Daniel et al., 2001). Liganden der TNF-Familie leiten über Bindung an die Oberflächen „Todesrezeptoren“ den extrinsischen Weg der Apoptose ein. Die Vernetzung der Rezeptoren führt zur Oligomerisierung und Formierung des „Death-inducing signaling complex“ (DISC), was die Aktivierung der Caspase 8 zur Folge hat (Muzio et al., 1996). Die Gruppe von Gillissen konnte belegen, dass die Resistenz gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose von HeLa-Zellen durch den Verlust von Mcl-1 überkommen werden kann (Gillissen et al., 2010). Um zu überprüfen, ob die Mcl-1 Reduktion nach p14ARF „Knockdown“ CxCa-Zellen gegen TRAIL sensitiviert, wurden HeLa- und CC10 -Zellen mit siARF-1, siARF-2, siMcl-1 oder siCellDeath transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit 50ng/ml TRAIL behandelt und nach weiteren 24h die Überlebensrate durch WST-Assay bestimmt. Zudem wurde, wie in Abbildung

46 b zu erkennen ist, der Phänotyp der transfizierten und behandelten Zellen dokumentiert. Sowohl in siCo-transfizierten HeLa- und CC10- Zellen führte die Behandlung mit TRAIL nur bei vereinzelt Zellen zum Zelltod. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der WST-Messung. Hier führt die TRAIL Behandlung zu einem Verlust von 20% bei HeLa und von 30% bei CC10-Zellen der Viabilität. Der „Knockdown“ von Mcl-1 reduziert die Viabilität um knapp 20% in CC10- und um 25% in HeLa-Zellen. Die gleichzeitige Behandlung mit TRAIL und siMcl-1 verringert die Viabilität in beiden Zelllinien auf 50%. Wesentlich effizienter ist der „Knockdown“ von p14ARF in Kombination mit der TRAIL Behandlung. Hier wird die Viabilität auf 40% in den HeLa-Zellen und auf weniger als 30% in den CC10-Zellen vermindert, was in etwa der Effizienz von siCellDeath entspricht (Abb. 46 a). Auch sind deutliche morphologische Veränderungen in beiden Zelllinien zu beobachten, die belegen, dass nach RNA Interferenz in Kombination mit TRAIL massiv Zelltod induziert wurde.

## Ergebnisse

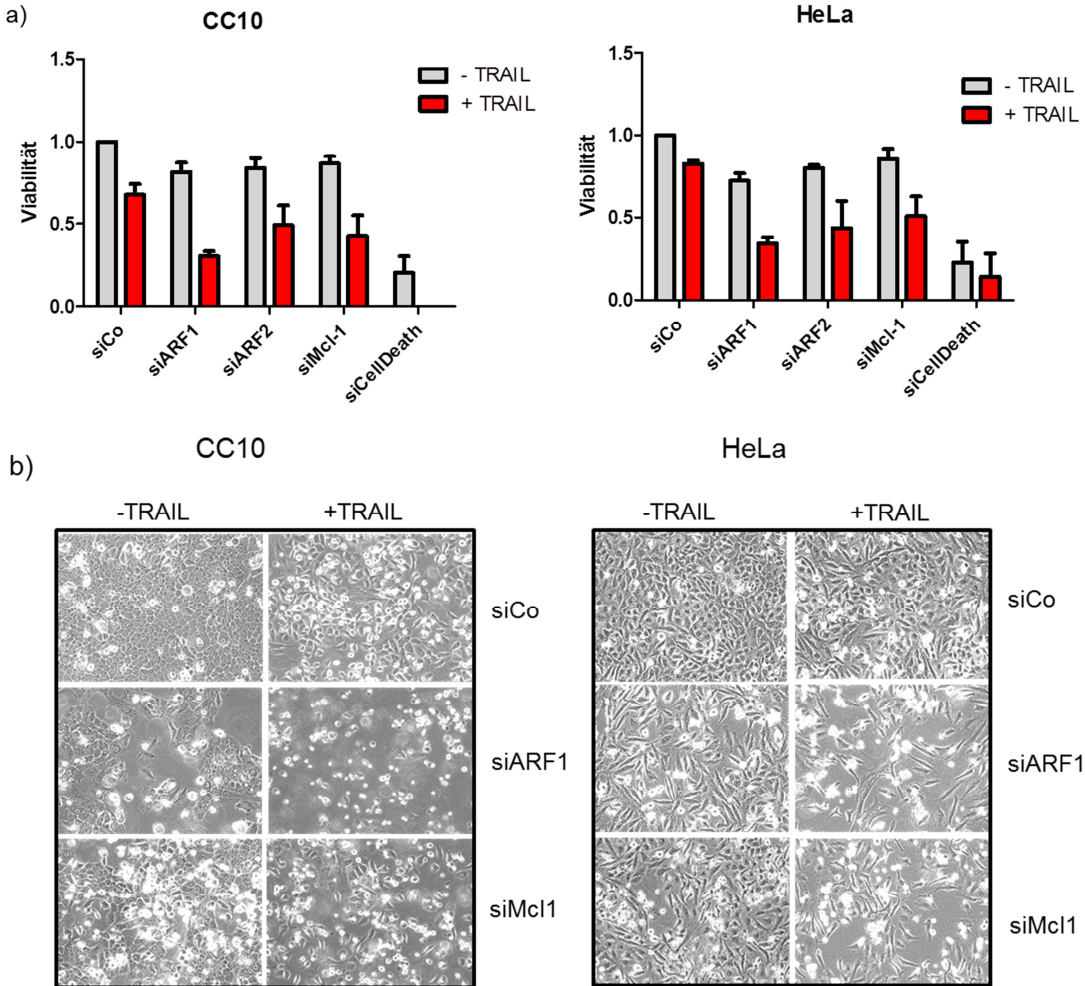


Abb. 46: a) Quantifizierung der Viabilität nach siRNA Transfektion und TRAIL-Behandlung. HeLa- und CC10-Zellen (1500 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte) wurden ausgesät und nach 24h mit 50ng

der jeweiligen siRNA in Triplikaten transfiziert. Nach 24h wurde dem Medium 50ng/ml TRAIL hinzugegeben. Nach weiteren 24h wurden die Fraktion der lebenden Zellen durch WST-1 Assay bestimmt. Die Resultate basieren auf den gemittelten Werten von zwei Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler.

b) Vor der WST-Messung wurden Bilder mit einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop (10x Vergrößerung) aufgenommen.

### **4.4 Regulation von p14ARF**

#### **4.4.1 Die p14ARF Expression ist abhängig von der Expression der HPV E6/E7 Onkogene**

In dieser Arbeit sollte auch die Frage beantwortet werden, wie die p14ARF Expression in CxCa-Zellen reguliert wird. Vermutlich ist in diesen Zellen HPV E7 an der Aktivierung der Genexpression beteiligt, da p14ARF zu den Zielgenen des Transkriptionsfaktors E2F1 gehört, welcher durch die Interaktion von E7 mit pRb aktiviert wird. Um zu klären, ob E7 eine Rolle bei der p14ARF Expression spielt, wurden p14ARF Transkripte in HPV16 E6/E7, HPV18 E6/E7 und HPV 31E6/E6 exprimierenden Zellen quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Transkriptmengen in den HPV16 E6/E7, HPV18 E6/E7 HPV31 E6/E7 exprimierenden Zellen 3- 4fach höher waren als in NHK und somit vergleichbar mit den Mengen in HPV-positiven

CxCa-Zellen (Abb. 47). Da der Hauptunterschied zwischen den HPV-negativen NHK und den immortalisierten Zellen die kontinuierliche Expression von HPV16, 18 und 31 E6/E7 ist, lässt sich schlussfolgern, dass die Onkoproteine für die transkriptionelle Aktivierung des p14ARF Promotors verantwortlich sind.

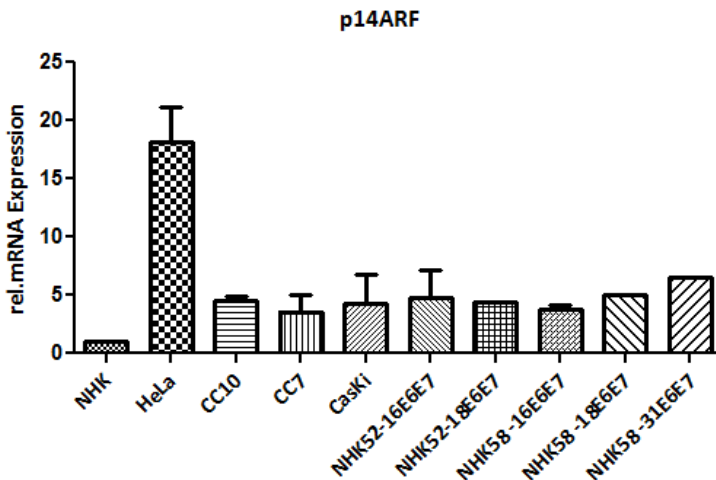


Abb. 47: Quantifizierung der p14ARF mRNA Expression in verschiedenen HPV E6/E7 exprimierenden Zelllinien mit qPCR. Die Mittelwerte basieren auf mind. zwei unabhängigen Experimenten und sind relativ zu den NHK (=1) dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte nach Pfaffl (2001) und ist bezogen auf das geometrische Mittel von sechs unabhängigeren NHK-Kontrollen mit PGK1 als Referenzen.

Demzufolge müssten sich die p14ARF Mengen nach Inhibition der E6/E7 Expression reduzieren. Um dies zu überprüfen,

wurden HeLa Zellen verwendet, die stabil, doxyzyklin-induzierbar HPV31 E8<sup>E2C</sup> exprimieren. HeLa-Zellen wurden 11 Tage lang kontinuierlich ohne oder mit Doxyzyklin inkubiert, und zu verschiedenen Zeiten für Immunoblot- und durchflusszytometrische Analyse geerntet. Schon nach einem Tag der E8<sup>E2C</sup>-Expression stieg die Menge an p53 deutlich an, während die p14ARF Mengen abnehmen (Abb. 48). Nach zwei Tagen waren auch die Mcl-1 Mengen verringert, was vermutlich auf die reduzierte p14ARF Menge zurückzuführen ist (Abb. 48a). Dies bestätigt den Zusammenhang zwischen E6/E7- und p14ARF-Expression. Die Bestimmung der DNA-Fragmentierung ergab, dass in induzierten Zellen bis zum 4. Tag ein kontinuierlicher Anstieg der Apoptoserate beobachtet werden konnte (Abb. 48b). Vermutlich ist die Apoptoseinduktion eine Konsequenz der Reduktion von p14ARF und der gleichzeitigen Stabilisierung von p53. Am 5. Tag nahm die Apoptoserate ab. Allerdings stieg auch p14ARF wieder an und p53 nahm ab, was vermutlich auf einer Selektion der induzierbaren Zellen beruht (Abb. 48a).

## Ergebnisse

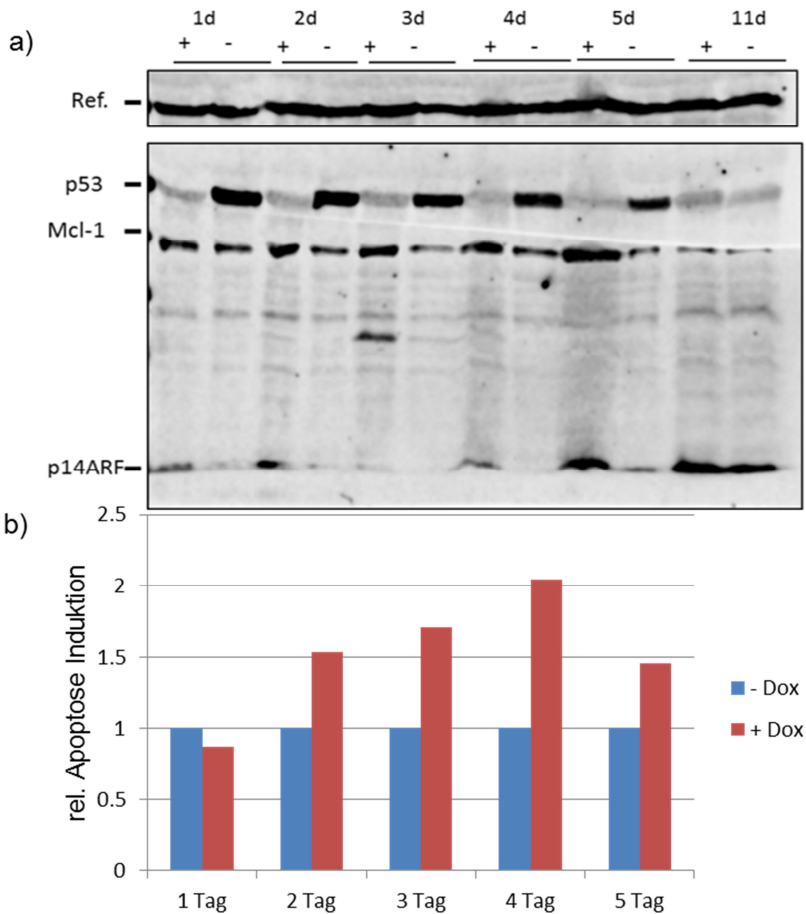


Abb. 48: a) Immunoblotanalyse: Nachweis der Reduktion der p14ARF Proteinmengen nach Induktion der HPV 31E8<sup>Δ</sup>E2C Expression und der damit einhergehenden Repression der Onkoproteine E6/E7. Die stabil unter einem Tetrazyklin Promotor HPV31 E8<sup>Δ</sup>E2C exprimierenden HeLa Zellen wurden über einen Zeitverlauf von 11 Tagen mit Doxycyclin behandelt und damit die



31E8<sup>E2C</sup> Expression induziert. Als Kontrolle wurde jeweils unbehandelte Zellen mitgeführt. An den angeführten Tagen wurden die Zellen geerntet und Aliquots für den Immunoblot und die PI-Färbung hergestellt. Nach Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE und Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurden der Protein-Gehalt mit Hilfe spezifischer Antikörper bestimmt.

b) Quantifizierung Apoptoserate nach Doxyzyklin-Induktion der stabilen HeLa-Zellen. An den jeweiligen Tagen wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit fragmentierter DNA im Durchflusszytometer gemessen und in Relation zu unbehandelten Zellen (=1) desselben Zeitraums dargestellt. Die Daten für den 11. Tag sind nicht gezeigt, da an diesem Tag offensichtlich keine 31E8<sup>E2C</sup> Expression mehr erfolgte.

#### **4.4.2 Das p14ARF Protein wird nur Zervixkarzinomzelllinien überexprimiert.**

Die HPV16 bzw. HPV18 E6/E7 immortalisierten NHK-Zellen haben ähnliche p14ARF mRNA Mengen wie Zervixkarzinomzelllinien. Interessanterweise konnte nur in CxCa-Zellen p14ARF Protein im Immunoblot nachgewiesen werden. Das legt nahe, dass die mRNA von p14ARF in E6/E7-Zellen nicht effizient translatiert wird oder, dass das Protein schneller degradiert wird als in CxCa-Zelllinien.

## Ergebnisse

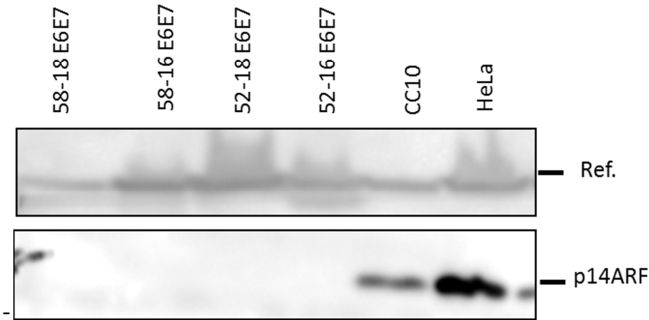


Abb. 49: Immunoblotanalyse von p14ARF in E6/E7 exprimierenden-, HeLa- und CC10-Zellen. Als Referenzprotein (Ref.) diente HSP90.

Um zu prüfen, ob der Unterschied in den p14ARF Proteinmengen durch proteasomalen Abbau hervorgerufen wird, wurde der Proteasomen-Inhibitor MG132 eingesetzt. Die Halbwertszeit von p14ARF wird mit 1-6h angegeben (Oguro, M. J. G. et al., 1996). Daher wurde für dieses Experiment ein Zeitrahmen von 12h gewählt. Eine repräsentative HPV16 E6/E7-Zelllinie, HeLa- und CC10-Zellen wurden ausgesät und 7h, 10h und 12h lang mit 10µg/ml MG132 behandelt. Als Kontrolle wurden DMSO-behandelte Zellen (= 0h) verwendet. In Abbildung 50 a ist zu sehen, dass die Inhibition des Proteasoms nahezu keinen Einfluss auf die p14ARF Menge in CC10- und HeLa-Zellen hat. Nach 12h Behandlung mit MG132

wurde massiv Zelltod ausgelöst, daher wurden dieser Zeitpunkt nicht in der Analyse berücksichtigt. In den HPV16 E6/E7-Zellen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der p14ARF Menge nach 10h (Abb. 50), was nahelegt p14ARF in diesen Zellen proteasomal degradiert wird. Da jedoch auch nach 10h MG132 Behandlung nur etwa die Hälfte der p14ARF Menge der CC10-Zellen zu beobachten war (Abb. 50b), müssen noch weitere post-transkriptionelle Mechanismen existieren, die zur Stabilität von p14ARF in Zervixkarzinomzellen beitragen.

## Ergebnisse

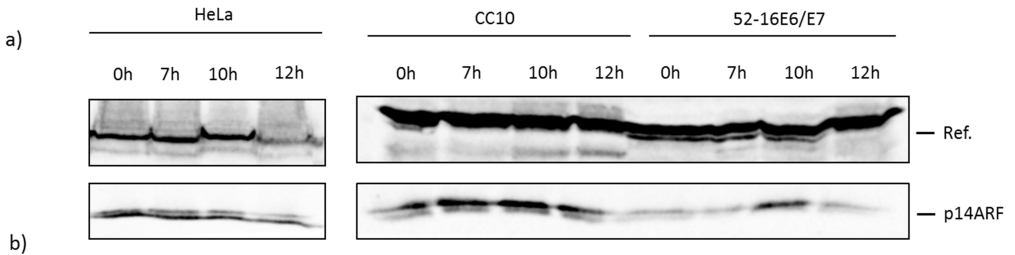


Abb. 50: a) Der Einfluss von Proteasomeninhibition auf die p14ARF Proteinmenge in verschiedenen Zellen. Die unterschiedlichen Zelllinien wurden mit 10 $\mu$ g/ml MG132 inhibiert und nach 7, 10 und 12h geerntet. P14ARF und ein Referenzprotein (Ref.) wurden durch spezifische Primärantikörper nachgewiesen  
b) Quantifizierung der p14ARF Proteinmenge. Die Mittelwerte basieren auf drei unabhängigen Experimenten und sind auf ein Referenzprotein ( $\alpha$ -Aktin) normiert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

### **4.4.3 NPM ist verantwortlich für die nukleäre Lokalisation von p14ARF**

In der Literatur wird NPM als ein wichtiger Interaktionspartner für p14ARF beschrieben. NPM ist ein nukleoläres Protein, das eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese spielt. Für einige Zelltypen konnte gezeigt werden, dass NPM mit p14ARF direkt interagiert und in den Nukleolus rekrutiert, wodurch p14ARF vor dem proteasomalen Abbau geschützt wird (Colombo et al., 2005; Gjerset 2006; Rodway et al., 2004). Um zu überprüfen, ob dies ebenfalls für CxCa-Zelllinien zutrifft und ob Unterschiede zu E6/E7-Zellen bestehen, wurden HeLa-, CaSki-, CC10-, E6/E7-exprimierende Zellen und NHK-Zellen durch Immunfluoreszenz auf die Anwesenheit von NPM und eine Kolokalisation mit p14ARF hin untersucht. In diesem Versuch wurden für die einzelnen Farbkanäle identische Belichtungszeiten gewählt, um eine semi-quantitative Aussage über die Proteinmengen in den verschiedenen Zelllinien treffen zu können. Die Immunfluoreszenzanalysen bestätigen, dass p14ARF nur in CxCa-Zellen aber nicht in NHK oder HPV16 E6/E7-Zellen exprimiert wird (Abb. 51). In Zervixkarzinomzelllinien kolokalisieren NPM und p14ARF (Abb.51). NPM ist aber auch in NHK und HPV16 E6/E7 Zellen in vermutlich nukleolären Strukturen vorhanden (Abb. 51) und ist daher nicht verantwortlich für die Abwesenheit von p14ARF.

## Ergebnisse

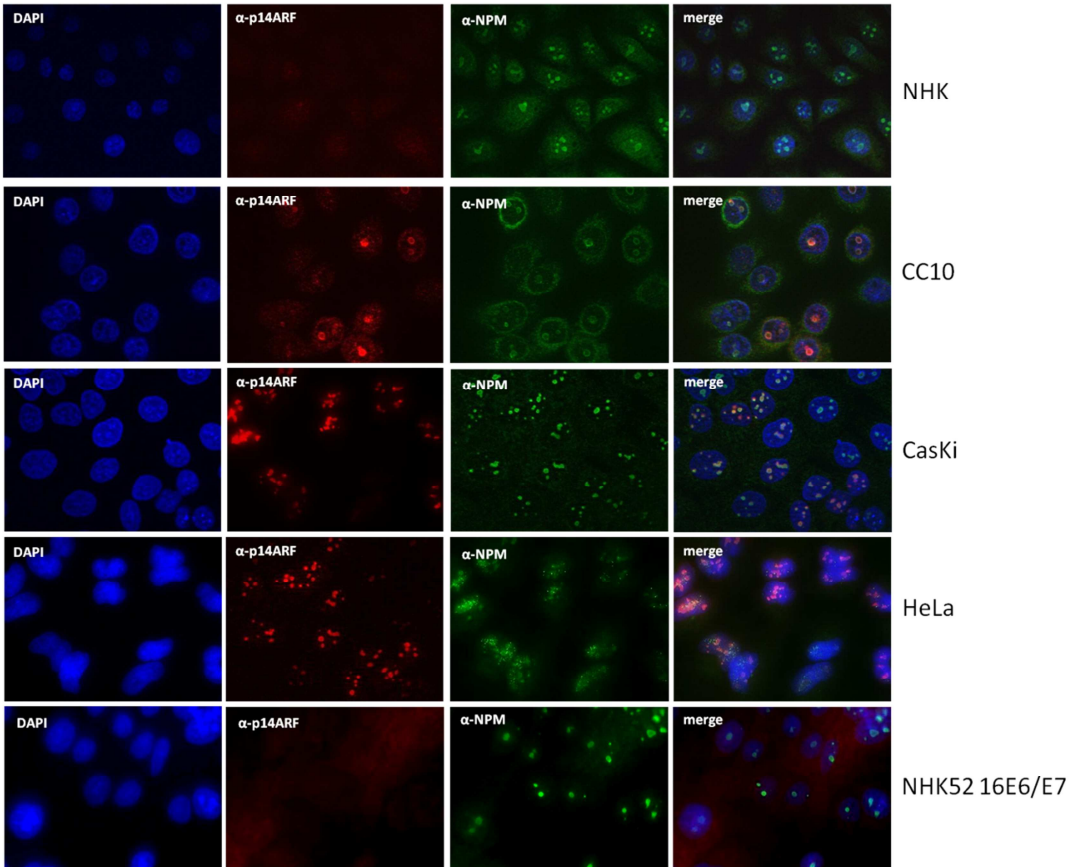


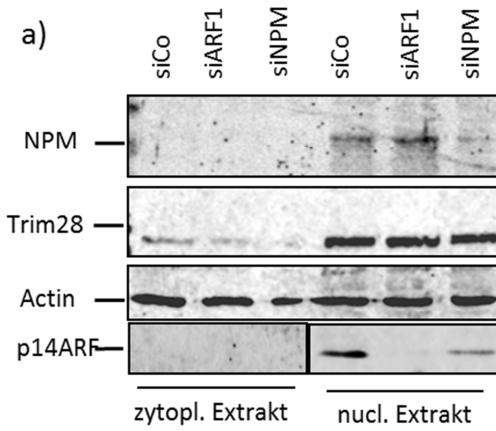
Abb. 51: Immunfluoreszenzfärbung von NHK, CC10-, CaSki- und HeLa-Zellen sowie von HPV16 E6/E7 exprimierenden NHKs. Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, nach 24h fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern gegen NPM und p14ARF sowie Alexa488 bzw. 555-gekoppelten sekundären Antikörpern gefärbt. Zur Darstellung des Nukleus wurde die DNA mit DAPI markiert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M

Mikroskop und mit einem 63x Objektiv sowie den entsprechenden Fluoreszenz Filtersets aufgenommen.

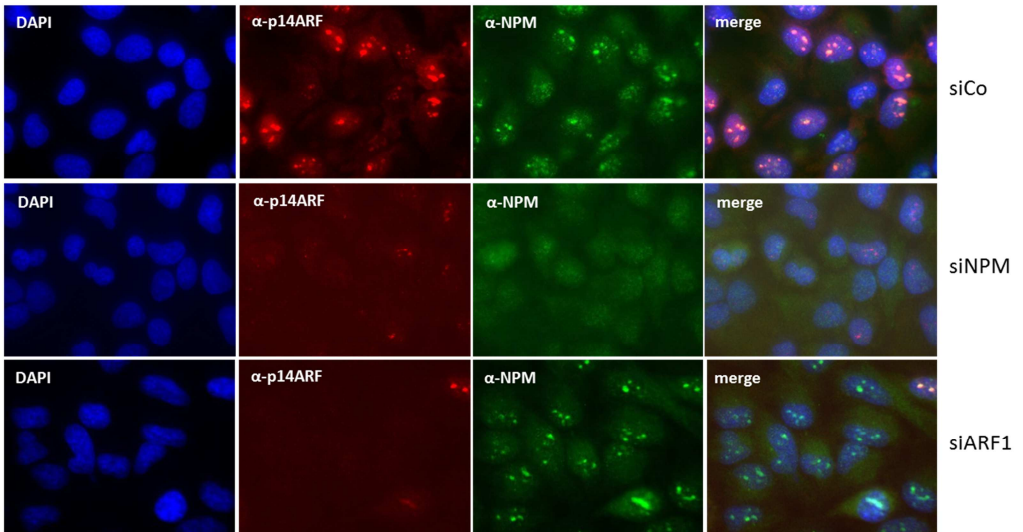
Chen et al. postulierten, dass NPM für die Stabilität von p14ARF verantwortlich ist, da p14ARF durch die Ko-Lokalisation mit NPM im Nukleolus vor dem Abbau geschützt wird (Chen et al., 2010). Um dieses Modell in CxCa-Zellen zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen mit siRNAs gegen NPM (siNPM), p14ARF oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und fraktionierte Zellextrakte hergestellt, was den Nachweis von NPM ermöglicht. Der Nachweis des nukleären Proteins TRIM28 diene als Kontrolle für die Reinheit der zytoplasmatischen Extrakte.

Parallel wurden die Effekte von siNPM auf p14ARF Lokalisation und Menge durch Immunfluoreszenzanalysen kontrolliert. Im Immunoblot ist zu erkennen, dass p14ARF und NPM nur in der nukleären Fraktion nachweisbar sind (Abb. 52 a). Des Weiteren ist ersichtlich, dass siNPM zu einer deutlichen Reduktion von NPM führt. Auffällig ist, dass der Verlust von NPM zu einer Reduktion der p14ARF Mengen führt. Diese Beobachtung konnte durch Immunfluoreszenz bestätigt werden, da siNPM zu einer Reduktion der p14ARF-„Dots“ führt (Abb. 52 b). Im Gegensatz dazu hat der „Knockdown“ von p14ARF keinerlei Einfluss auf die NPM-Menge und Lokalisation (Abb. 52 b). Dies bedeutet, dass auch in CxCa-Zellen die Kolo-kalisation von NPM mit p14ARF im Nukleolus einen Schutzmechanismus von dem Abbau bietet.

## Ergebnisse



b)





## Ergebnisse

---

Abb. 52: a) Immunoblotanalyse von NPM, p14ARF, TRIM28 und beta-Aktin nach siARF1 und siNPM Transfektion in HeLa-Zellen. Nach Fraktionierung wurden zytoplasmatische und nukleäre Extrakte getrennt analysiert.

b) Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen nach RNA Interferenz gegen p14ARF und NPM.

HeLa-Zellen wurden mit siCo, siARF1 oder siNPM transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen fixiert und Antigene mit spezifischen Primär- und fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht.

## 5 Diskussion

Infektionen mit bestimmten HPV Typen wie HPV16 oder 18 können zur Entstehung von Karzinomen des Gebärmutterhalses führen. Interessanterweise ist eine kontinuierliche Expression der HPV E6 und E7 Onkoproteine für das Wachstum von CxCa-Zellen notwendig. E6 und E7 inaktivieren Zellzykluskontrollpunkte und verhindern die Induktion von Apoptose (Ciccolini et al., 1994; Liu et al., 2009; Moody and Laimins 2010). Daher werden seit längerem intensiv unterschiedliche Möglichkeiten erforscht, die Expression der Onkoproteine zu inhibieren. Eine Möglichkeit besteht in der RNA-Interferenz gegen E6/E7 Transkripte und eine andere in der Überexpression der HPV E2 oder E8<sup>E2C</sup> Regulatorproteine, welche den E6/E7 Promotor transkriptionell inhibieren (Hwang et al., 1993; Dowhanick et al., 1995; Hwang et al., 1996; Naeger et al., 1999; Wells et al., 2000; Johung et al., 2007; Stubenrauch et al., 2007). Während allen Methoden gemeinsam ist, dass das Wachstum von CxCa-Zellen inhibiert wird, werden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Wachstumsinhibition unterschiedlich diskutiert. Bei beiden Methoden, der RNA Interferenz und auch der E2 Proteinexpression, wird von manchen Forschungsgruppen eine Induktion von Apoptose und von anderen Gruppen wiederum die Auslösung von zellulärer Seneszenz beobachtet (Desaintes et al., 1997; Hwang et al., 1996; Dowhanick et al., 1995; Goodwin et al.,

2000; Hall et al., 2003). Im Fall von E2 könnten die diskrepannten Beobachtungen darauf beruhen, dass manche E2 Proteine wie z.B. von HPV18 E2, nicht nur die E6/E7 Expression inhibieren, sondern auch per se eine pro-apoptotische Wirkung haben (Thierry et al., 2008). Im Gegensatz dazu war unklar, wie das verwandte Repressorprotein E8<sup>E2C</sup> das Zellwachstum von CxCa-Zellen inhibiert.

### **5.1 Die Auswirkungen von HPV 31 E8<sup>E2C</sup> auf HPV-negative Zellen**

Um E6/E7-unabhängige Effekte von HPV E8<sup>E2C</sup> auf das Zellwachstum zu analysieren, wurde das Protein in HPV-negativen humanen Zellen stabil exprimiert. Dies führte in zwei unterschiedlichen humanen Zelllinien zu einem verlangsamten Wachstum und war abhängig von der Repressordomäne und der DNA-Bindungsdomäne, wie Mutationsanalysen zeigten (Abb. 13 + 15). Dies lässt vermuten, dass E8<sup>E2C</sup> sequenz-spezifisch an zelluläre Gene bindet, deren Expression reguliert, und so das Wachstum beeinflusst. Interessanterweise verlor sich der Einfluss von HPV31 E8<sup>E2C</sup> auf das Zellwachstum in höheren Passagen, was nicht auf eine Abnahme der E8<sup>E2C</sup> Expression zurückzuführen war (Abb. 16). Dies bedeutet, dass in vitro Zellen selektioniert werden können, welche nicht durch E8<sup>E2C</sup> inhibiert werden.

Die E8<sup>E2C</sup>-vermittelte Wachstumsreduktion von HPV-negativen Zellen korrelierte nicht mit erhöhter Induktion von Apoptose (Abb. 19) und unterscheidet sich somit mechanistisch von den pro-apoptotischen Effekten von E2 in HPV-negativen Zellen (Webster et al., 2000; Wang et al., 2011). Eine Erklärung wäre ein Einfluss auf die Zelladhäsion und/oder eine Verlangsamung des Zellzyklus. Es zeigte sich, dass nach Transfektion eines E8<sup>E2C</sup> Expressionsvektors in HPV-negative RTS3b Zellen signifikant weniger Kolonien mit niedrigeren Zellzahlen zu beobachten waren (Abb. 17). Darüber hinaus ergaben Zellzyklusanalysen, dass E8<sup>E2C</sup> zu einer signifikanten Abnahme von Zellen in der G2/M Phase führte. Weiterhin wurden vermehrt lebende Zellen im Überstand nach der E8<sup>E2C</sup> Transfektion beobachtet (Abb. 19). Da Zellen in Mitose-Phase eine verringerte Adhäsion aufweisen (Terasima et al., 1963) könnte man vermuten, dass E8<sup>E2C</sup> primär die Expression von Genen verändert, welche die Mitose regulieren. Eine Deregulation der Mitose könnte zu verlangsamtem Zellwachstum und zu verringerter Adhäsion in der M-Phase führen und die beobachteten Phänomene erklären. Um zu überprüfen, ob ein Adhäsionsverlust auch in HPV-positiven Zellen auftritt, wurde HPV31 E8<sup>E2C</sup> in HPV-positiven CxCa-Zellen exprimiert. Es kam zu einem Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus, aber die Zellzahl im Überstand im Vergleich zur Vektorkontrolle veränderte sich nicht (Abb. 21). Indem E8<sup>E2C</sup> den E6/E7 Promotor inhibiert, kommt es zu einem Verlust von E7, was zu einem G1-Arrest führt (Abb. 23). Da derartige Zellen nicht mehr die G2/M-Phase durchlaufen

können, kommt es daher, vermutlich nicht zu einer vermehrten Ablösung der Zellen durch E8<sup>^</sup>E2C.

Eine alternative Erklärung könnte die direkte Beeinflussung der Zelladhäsion durch Inhibition der Expression von Adhäsionsmolekülen wie Integrin-beta-4-Gen (ITGB4) sein, was für das E2 Protein des beta-HPV8 beschrieben wurde (Oldak et al., 2004).

### **5.2 Die Auswirkungen von E8<sup>^</sup>E2C auf HPV-positive Zellen**

Für einige E2 Proteine v.a. von HPV18 wurde eine E6/E7-unabhängige, pro-apoptotische Aktivität beschrieben (Desaintes et al., 1999; Parish et al., 2006). Obwohl in HPV-negativen Zellen keine Evidenz dafür erhalten werden konnte, bestand dennoch die Möglichkeit, dass der Wachstumsarrest von CxCa-Zellen durch HPV31 E8<sup>^</sup>E2C nicht nur durch die Repression der E6/E7 Transkription sondern auch durch pro-apoptotische Aktivitäten verursacht wird. Um zwischen HPV-Typ-spezifischen und E6/E7-abhängigen Ereignissen unterscheiden zu können, wurden HeLa-Zellen mit Vektoren für E8<sup>^</sup>E2C oder E2 von HPV16, 18 oder 31 oder mit siRNA gegen HPV18 E6/E7 transfiziert und die Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion untersucht (Fertey, Hurst et al., 2011).

Die verschiedenen E2 und E8<sup>^</sup>E2C Proteine aber auch die si18E6/E7 führten in HeLa-Zellen zu einer vergleichbaren Erhöhung der p53 Menge und Aktivierung des p53-Zielgens

p21 (Abb. 22). Ebenso kam es zu einer ähnlichen, moderaten Apoptoseinduktion sowie einem deutlichen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und einer Reduktion von Zellen in der G2-Phase (Abb. 23). Im Gegensatz zur publizierten Literatur zeigte HPV18 E2 keine erhöhte Apoptoseinduktion (Desaintes et al., 1999; Thierry et al., 2008). Zusammenfassend legen diese Experimente nahe, dass die Wachstumsinhibition von HeLa-Zellen durch E8<sup>E2C</sup> und E2 Proteine hauptsächlich auf der Inhibition der E6/E7 Transkription und nicht auf proapoptotischen Aktivitäten von E2 oder E8<sup>E2C</sup> beruht. Die Expression von E2 und E8<sup>E2C</sup> über einen längeren Zeitraum führte zu morphologischen Veränderungen der Zellen und der Expression eines Markers für zelluläre Seneszenz (Abb. 24). Demnach kann man davon ausgehen, dass die Wachstumsinhibition von HeLa-Zellen durch E8<sup>E2C</sup> durch Induktion von Seneszenz und Apoptose vermittelt wird.

### **5.3 Die Funktion von p14ARF**

Basierend auf den oben beschriebenen Daten sollte versucht werden, die Apoptoseinduktion in HPV-positiven CxCa-Zellen zu erhöhen. Das E7 Onkoprotein ist durch die Inaktivierung von pRb Proteinen maßgeblich für die Stimulation der Proliferation verantwortlich, während das E6 Protein vor allem anti-apoptotisch wirksam ist (Ciccolini et al., 1994; Munger et al., 1989; Thompson et al., 2001; Thyrell et al., 2005; Garnett et al., 2006; Howie et al., 2009; Moody et al., 2010). Darüber hinaus könnte E7 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 zur Expression des

Tumorsuppressorproteins p14ARF führen, welches einen Aktivator von p53 darstellt (Brooks et al., 2002; Hwang et al., 2002; Kanao et al., 2004; Komori et al., 2005). Die stärkste Apoptoseinduktion in CxCa-Zellen sollte daher dann auftreten, wenn nur E6 inhibiert wird. Allerdings konnten nach RNA Interferenz gegen E6 weder Unterschiede in der p53 Menge noch in der Apoptoserate festgestellt werden (Abb. 25 +26). Diese Beobachtungen warfen die Frage nach der Rolle von p14ARF in CxCa-Zellen auf. Es zeigte sich, dass alle CxCa Zelllinien p14ARF mRNA und Protein überexprimieren (Abb. 28). Folglich war die geringe Induktion von Apoptose durch siE6 nicht auf eine fehlende p14ARF Expression zurückzuführen.

### **5.3.1 Das p14ARF Protein verhindert mitochondriale Apoptose in CxCa-Zellen.**

Aufgrund der unerwarteten Ergebnisse wurde die Funktion von p14ARF durch RNA Interferenz Experimente genauer untersucht. Das p14ARF und das p16Ink4a Protein werden vom CDKN2A Locus gebildet und die entsprechenden Transkripte unterscheiden sich nur im jeweiligen ersten Exon. Zwei unterschiedliche siRNAs mit Zielsequenzen im ersten, p14ARF-spezifischen Exon reduzierten die Menge von p14ARF, aber nicht von p16Ink4a in CxCa-Zelllinien (Abb. 29b). Überraschenderweise veränderte die Transfektion beider siRNAs die Zellmorphologie in beiden Zelllinien, die

Zellzahl reduzierte sich und es waren vermehrt Zellen im Überstand zu beobachten (Abb. 29a). Zur genaueren Quantifizierung dieser überraschenden Ergebnisse wurde das Wachstum von HeLa- und CC10-Zellen nach siARF Transfektion über 4 Tage beobachtet. Dies bestätigte, dass der Verlust von p14ARF zu einer stark reduzierten Viabilität führte (Abb. 30). Außerdem wurde deutlich, dass die Effekte auf das Zellwachstum durch siARF1 ausgeprägter waren, als durch siARF2, was mit einer unterschiedlichen Reduktion der p14ARF mRNA Menge korrelierte (Abb. 29c). Der Verlust von p14ARF führte zu einer erhöhten DNA-Fragmentierung und der Aktivierung von Caspase 3 in HeLa- und CC10-Zellen (und weiteren HPV-positiven Zellen) (Abb. 31 und 45), was nahelegte, dass die reduzierte Zellviabilität auf Apoptoseinduktion beruht.

Kontrollexperimente mit p14ARF-negativen NHK-Zellen zeigten, dass nur in p14ARF-positiven Zellen Apoptose ausgelöst werden konnte und die Wirkung der siRNAs nicht auf „off-size“ Effekten beruhte. Weiterhin konnte der siRNA Effekt durch Expression einer siRNA-resistenten p14ARF Mutante signifikant reduziert werden (Abb. 34).

Interessanterweise hatte die Überexpression von p14ARF in HeLa-Zellen keinen Einfluss auf den Zellzyklus oder die Induktion der Apoptose, wie es für p19ARF publiziert wurde (Quelle et al., 1995; Kamijo et al., 1997; Sharpless et al., 1999).

Die Sequenzierung des p14ARF-Gens zeigte, dass Wild-typ p14ARF in CxCa Zelllinien vorliegt (Abb. 33). Alle Ergebnisse wiesen überraschenderweise daraufhin, dass die „normale“



Form von p14ARF in CxCa-Zellen eine unerwartete, anti-apoptotische Funktion besitzt.

Die Induktion der Apoptose nach p14ARF Verlust steht im Gegensatz zu der beschriebenen Rolle von p14ARF als Tumorsuppressor. Diese Einstufung begründet sich in der Fähigkeit p53 zu stabilisieren und die Apoptoserate dadurch zu steigern (Stott et al., 1998; Lowe 1999; Weber et al., 1999; Tolbert et al., 2002; Sharpless 2005 ; Sherr et al., 2005). Allerdings wurden die ersten Experimente, die diese Funktion belegen, größtenteils mit dem murinen p19ARF durchgeführt, welches im Vergleich zum humanen p14ARF, zusätzliche 37 Aminosäuren und daher weitere Domänen besitzt, die eine Rolle bei der Apoptosestimulation spielen (Kamijo et al., 1997; Kamijo et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998; Wadhwa et al., 2002; Matsuoka et al., 2003; Wadhwa et al., 2004; Gallagher et al., 2006). Zudem wurden Überexpressionsversuche mit humanem p14ARF vorwiegend in anderen Zelltypen und nicht CxCa-Zellen durchgeführt (Eymin et al., 2006). Derzeit gibt es nur sehr vereinzelte Berichte zu den Auswirkungen einer p14ARF Reduktion durch RNA Interferenz (Lindstrom et al., 2003; Voorhoeve et al., 2003; Eymin et al., 2006; Parsons et al., 2009; Sato et al., 2010). Ausserdem lag der Fokus in diesen Arbeiten nicht auf Apoptoseregulation und daher wurden vermutlich keine Apoptosemarker abgefragt. Darüber hinaus hängt der anti-apoptotische Effekt von der Reduktionseffizienz ab (Abb. 29 + 30) und ist erst deutlich nach 72h ausgeprägt (Abb. 30). Daher konnte dieser Effekt möglicherweise nicht beobachtet werden. Allerdings gibt es auch vereinzelt Evidenz in der

Literatur, dass p14/19ARF nicht nur wachstumshemmende sondern auch -fördernde Funktionen haben kann. So verringert der „Knockdown“ von p19ARF in einem Maus-Lymphom-Modell das Tumorstadium (Humbey et al., 2008).

Die genauere Charakterisierung der Apoptose nach p14ARF-Reduktion ergab, dass das mitochondriale Membranpotential verringert wurde, was auf eine Induktion der mitochondrialen Apoptose hinweist (Abb. 36). Die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials wird durch Porenbildung durch die pro-apoptischen Proteine Bax und Bak in der Mitochondrienmembran hervorgerufen, durch die es zur Freisetzung mitochondrialer Proteine in das Zytoplasma kommt. Im Gegensatz dazu wird dies durch anti-apoptische Mitglieder der Bcl-2 Familie wie Mcl-1 verhindert (Kozopas et al., 1993; Zhong et al., 2005; Yang et al., 1996; Danial et al., 2004).

Die E3-Ubiquitinligase Mule (Arf-BP1) wird nicht nur mit dem proteasomalen Abbau von p53 sondern auch von Mcl-1 in Verbindung gebracht (Zhong et al., 2005). Da p14ARF Mule inhibieren kann und so p53 aktiviert, wurde untersucht, ob p14ARF die Mcl-1 Menge beeinflusst und dies zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führt. Es zeigte sich, dass der Verlust von p14ARF zu einer signifikanten Reduktion der Mcl-1 Proteinmenge, aber nicht der Mcl-1 Transkripte führt (Abb. 37 u. 38). Zudem konnte durch Überexpression einer nicht-degradierbaren Mcl-1 Mutante (K5R) die Apoptoseinduktion durch siARF-1 signifikant reduziert

werden (Abb. 40). Darüber hinaus führte die Verringerung von Mcl-1 durch siRNA zu einem Anstieg der Apoptoserate (Abb. 39). Zusammenfassend legten diese Daten nahe, dass p14ARF den Abbau von Mcl-1 und somit die Apoptose-induktion in CxCa Zellen verhindert.

Um zu beweisen, dass das fehlende Bindeglied zwischen p14ARF und Mcl-1 die E3 Ubiquitinligase Mule ist, wurden weitere siRNA Experimente durchgeführt. Der „Knockdown“ von Mule hatte keinen Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential und erhöhte leicht die Mcl-1 Proteinmenge (Abb. 42). Der gleichzeitige „Knockdown“ von p14ARF und Mule resultierte in einer Rekonstitution der Mcl-1 Menge und in einer signifikanten Reduktion der mitochondrialen Apoptose (Abb. 43a).

Dies bestätigt, dass p14ARF die Menge des Mcl-1 Proteins durch Mule und so das mitochondriale Membranpotential reguliert.

Die Bestimmung der DNA-Fragmentierung nach Ko-Transfektion von siMule und siARF bestätigte in HeLa-Zellen diesen Zusammenhang. Allerdings wurde in CC10-Zellen beobachtet, dass die DNA Fragmentierung durch siMule alleine und bei der Kombination siMule/siARF erhöht war (Abb. 43b). Das bedeutet, dass in diesen Zellen bereits der Verlust von Mule zur Apoptoseinduktion führt, diese jedoch nicht über das Mitochondrium vermittelt wird. Dies deutet darauf hin, dass Mule in CC10-Zellen noch weitere Funktionen bzw. Interaktionspartner hat und dass diese nicht, oder nur in geringem Ausmaß von p14ARF inhibiert werden, da ansonsten die Zellen sterben würden.

CC10- und HeLa-Zellen unterscheiden sich neben den unterschiedlichen Virustypen darin, dass HeLa-Zellen wesentlich länger in Kultur sind und nur noch E6 und E7 exprimieren, während die neu etablierten CC10-Zellen komplette Virusgenome enthalten und möglicherweise weitere virale Proteine exprimieren. Ob die unterschiedliche Reaktion auf die siMule auf den HPV-Typ, zusätzliche virale Proteine oder auf die Kultivierungszeit zurückzuführen ist, lässt sich schwer sagen. Möglicherweise haben sich HeLa-Zellen über die Jahre soweit evolviert, dass sie wesentlich unempfindlicher gegenüber bestimmten Reizen sind, während die CC10-Zellen „sensitiver“ reagieren. Dies wurde zumindest für die Resistenz gegen Cisplatin beschrieben, wo HeLa-Zellen deutlich resistenter als CC10-Zellen sind (Michnav et al., 2012).

In der Literatur sind neben p53 zahlreiche Interaktoren von Mule wie CDC6, c-myc, die DNA Polymerasen lamda und beta, sowie die Histondeacetylase HDAC2 beschrieben worden (Zhang et al., 2011). Möglicherweise spielt eines dieser Proteine oder ein noch unbekanntes Protein eine zentrale Rolle für das Überleben der HPV-16 positiven CC10-Zellen. Auf der Suche nach einer molekularen Ursache wurde zunächst p53 untersucht, da auffällig war, dass CC10-Zellen höhere p53 Mengen aufwiesen als HeLa-Zellen, was zu einer p53-vermittelten Apoptoseinduktion nach RNAi gegen Mule passen würde (Abb. 32). Allerdings konnte weder ein Anstieg der p53 Mengen noch eine Aktivierung von p21 nach Mule „Knockdown“ festgestellt werden. Weiterhin wurde HDAC2 untersucht, die den Zugang der basalen

Transkriptionsmaschinerie zur DNA reguliert und somit die Genexpression beeinflusst. Es zeigt sich, dass beide Zelllinien HDAC2 in geringer Menge exprimieren, und dass die HDAC2 Menge nach Mule „Knockdown“ ansteigt (Abb. 44). Allerdings gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien. In der Literatur wurde bisher hauptsächlich beschrieben, dass eine Inhibition der HDAC-Aktivität Apoptose in Krebszellen auslöst (Vigushin et al., 2002; Shankar et al., 2008; Stern et al., 2012). Im Gegensatz dazu, ist zu den Folgen einer Überexpression bisher wenig bekannt. Um zu überprüfen, ob die erhöhte HDAC2 Menge die DNA-Fragmentierung spezifisch in CC10-Zellen beeinflusst, müsste man HDAC2 in beiden Zelllinien überexprimieren und die Effekte auf die DNA Fragmentierung messen.

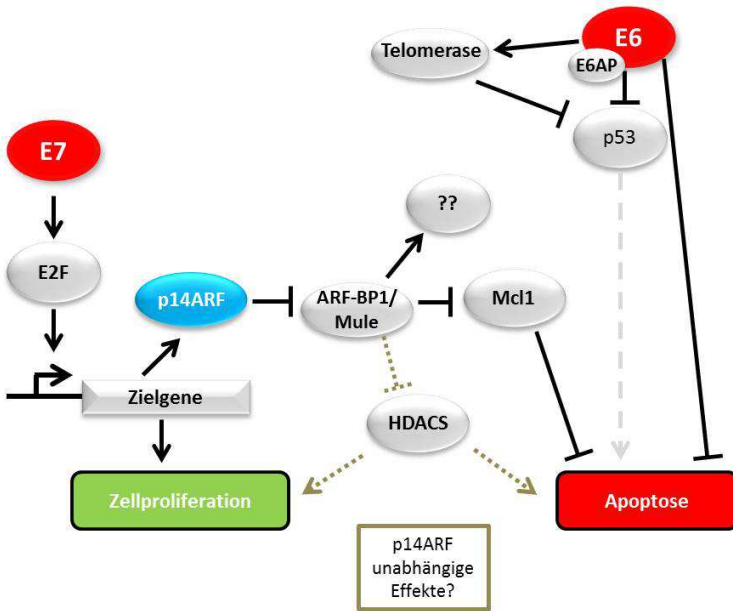


Abb. 53: Modell zur Rolle von p14ARF in CxCa-Zellen. Die Expression der Onkoproteine führt über die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren E2F zu einer kontinuierlichen Zellproliferation, gleichzeitig wird die Apoptose auf verschiedene Weise verhindert. Einer dieser Mechanismen beruht auf der Interaktion zwischen dem Tumorsuppressor p14ARF und der Ubiquitinligase Mule. P14ARF inhibiert die Aktivität der Ligase und stabilisiert somit deren „Zielproteine“. In CxCa-Zellen verhindert p14ARF so den proteasomale Abbau des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1, was die Zellen vor mitochondrialer Apoptose schützt und ihnen Resistenz gegenüber externen Apoptosestimuli vermittelt. Welche Auswirkungen die Wechselwirkung zwischen p14ARF und Mule auf weitere Interaktionspartner von Mule haben, muss im Einzelnen noch genauer untersucht werden, fest steht,

dass auch die Proteinmenge der Histondeacetylase HDAC2 über Mule reguliert wird.

### **5.3.2 Der Verlust von p14ARF sensitiviert HeLa-Zellen gegenüber TRAIL-Behandlung**

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) gehört zu den zytotoxischen Liganden der TNF-Familie und induziert unabhängig vom p53 Status spezifisch Zelltod in einer Vielzahl von Krebsarten (Huang et al., 2007; Merino et al., 2007). TRAIL. Darüber hinaus sensitivieren TRAIL und andere Todesliganden wie CD95/FasL und TNF $\alpha$  Tumorzellen gegenüber ionisierter Strahlung und Medikamenten induzierter Apoptose (Daniel et al., 2001; Marini et al., 2005; Fulda 2009). HeLa-Zellen sind resistent gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose und dies wird durch Mcl-1 vermittelt (Gillissen et al., 2010). Um zu testen, ob ein p14ARF „Knockdown“ CxCa-Zellen gegenüber TRAIL sensitiviert, wurden HeLa- und CC10-Zellen zusätzlich zur siRNA Transfektion mit TRAIL inkubiert. Es zeigte sich, dass die Kombination aus siARF und TRAIL das Zellüberleben nach 48h um mehr als 60% reduzierte und damit effizienter war als die siRNA gegen Mcl-1 in Kombination mit TRAIL-Behandlung (Abb. 46).

Dies belegt, dass eine Resistenz von CxCa-Zellen gegenüber pro-apoptotischen Stimuli durch eine Reduktion der p14ARF Menge deutlich erhöht werden kann.

Da p14ARF im Gegensatz zu Mcl-1 spezifisch in den Tumorzellen überexprimiert wird, könnte eine gegen p14ARF gerichtete Therapie hoch-spezifisch für CxCa sein.

### **5.3.3 Das p14ARF Protein wird nur in Zervixkarzinomzelllinien überexprimiert.**

Die p14ARF Expression kann von zahlreichen Faktoren, u.a. durch onkogene Signale, induziert werden (Ozenne et al., 2010). Für HPV ist der wahrscheinlichste Kandidat das E7 Protein, da es E2F-Faktoren aktiviert, welche die Transkription des Ink4a Locus stimulieren können (Lowe et al., 2003). Im Einklang damit war in allen E6/E7-exprimierenden Zellen die p14ARF Transkription gegenüber HPV-negativen NHK-Zellen erhöht (Abb. 47). Ebenso führte eine Reduktion von E6 und E7 durch E8<sup>E2C</sup> in HeLa-Zellen zu einer verringerten p14ARF Expression (Abb. 48). Zusammengefasst legt dies nahe, dass E7 für die p14ARF Induktion verantwortlich ist. Dies müsste jedoch in weiteren Experimenten geklärt werden.

Interessanterweise stellte sich heraus, dass trotz ähnlicher Transkriptmengen in E6/E7-exprimierenden NHKs und HPV16-positiven CxCa-Zellen das p14ARF Protein nur in CxCa-Zellen detektierbar war (Abb. 49). Im Einklang damit wurden in unterschiedlichen Modellsystemen post-transkriptionelle



Regulationsmechanismen für p14ARF beschrieben (den Besten et al., 2006; Pollice et al., 2008; di Tommaso et al., 2009 ; Chen et al., 2010 ). So wurde u.a. gezeigt, dass die p14ARF Degradationsrate von der E3 Ubiquitinligase ULF beeinflusst wird (Chen et al., 2010). Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen p14ARF Proteinmengen mit dem proteasomalen Abbau des Proteins zusammenhängen, wurde der Proteasomen-Inhibitor MG132 eingesetzt. Dies resultierte in einer Zunahme des p14ARF Proteins in den E6/E7-exprimierenden Zellen, während die p14ARF Menge in CxCa-Zellen nahezu gleich blieb (Abb. 50). Allerdings erreichte die p14ARF Menge in E6/E7-Zellen nur etwa die Hälfte der Menge der CC10-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass neben dem proteasomalen Abbau weitere Mechanismen existieren, die die Menge von p14ARF Protein in HPV-positiven Zellen regulieren.

Daher wurde die Rolle von NPM untersucht, welches p14ARF bindet und in den Nukleolus rekrutiert, und dadurch p14ARF vor dem proteasomalen Abbau schützt (Rodway et al., 2004; Chen et al., 2010).

Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigten, dass auch in CxCa-Zellen NPM mit p14ARF im Nukleolus kolokalisiert (Abb. 51). Eine Reduktion von NPM durch RNAi verringerte die p14ARF Menge, allerdings hatte eine Reduktion der p14ARF Menge weder einen Einfluss auf die Expression noch auf die Lokalisation von NPM (Abb. 52). Offensichtlich ist die Interaktion mit NPM für die Stabilisierung von p14ARF verantwortlich. Allerdings zeigten auch p14ARF-negative Zelllinien, wie die NHK- und E6/E7-exprimierende Zellen,

ähnliche Mengen von NPM im Nukleolus (Abb. 51). Eine genaue Quantifizierung der Proteinnengen durch z.B. Immunoblots wurde jedoch nicht durchgeführt, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass E6/E7-Zellen signifikant weniger NPM als CxCa-Zellen exprimieren und dass dies zur Stabilisierung von p14ARF beiträgt.

Die p14ARF Expression kann post-transkriptionell durch die Micro-RNA miR-24 reguliert werden (To et al., 2012). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die p14ARF Expression in CxCa-Zellen zusätzlich durch CxCa-spezifische Veränderungen der Micro-RNA Expression kontrolliert wird.

Die Überlebensraten bei fortgeschrittenen Zervixkarzinomen haben sich in den letzten Jahrzehnten kaum verändert. Die Daten der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass p14ARF spezifisch in CxCa durch transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen überexprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei der Protektion von CxCa-Zellen vor Apoptose besitzt. Dies lässt vermuten, dass Therapeutika, die auf eine Verringerung der p14ARF Menge in CxCa abzielen, erhebliches Potential haben könnten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adhikary, S., F. Marinoni, et al. (2005). "The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation." Cell **123**(3): 409-21.
- Ammermann, I., M. Bruckner, et al. (2008). "Inhibition of transcription and DNA replication by the papillomavirus E8-E2C protein is mediated by interaction with corepressor molecules." J Virol **82**(11): 5127-36.
- Aylon, Y. and M. Oren (2007). "Living with p53, dying of p53." Cell **130**(4): 597-600.
- Ayrault, O., L. Andrique, et al. (2004). "Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes." Oncogene **23**(49): 8097-104.
- Berkhout, R. J., L. M. Tieben, et al. (1995). "Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients." Journal of clinical microbiology **33**(3): 690-5.
- Berkovich, E., Y. Lamed, et al. (2003). "E2F and Ras synergize in transcriptionally activating p14ARF expression." Cell cycle **2**(2): 127-33.
- Bernard, H., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. z., Van Doorslaer, K., H. U. Bernard, et al. (2011). "Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and

- current nomenclature." Trends in microbiology **19**(2): 49-50; author reply 50-1.
- Bertwistle, D., M. Sugimoto, et al. (2004). "Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23." Molecular and cellular biology **24**(3): 985-96.
- Borbely, A. A., M. Murvai, et al. (2006). "Effects of human papillomavirus type 16 oncoproteins on survivin gene expression." The Journal of general virology **87**(Pt 2): 287-94.
- Boyer, S. N., D. E. Wazer, et al. (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." Cancer research **56**(20): 4620-4.
- Brehm, A., E. A. Miska, et al. (1998). "Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription." Nature **391**(6667): 597-601.
- Brooks, L. A., A. Sullivan, et al. (2002). "E7 proteins from oncogenic human papillomavirus types transactivate p73: role in cervical intraepithelial neoplasia." British journal of cancer **86**(2): 263-8.
- Chen, D., N. Kon, et al. (2005). "ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor." Cell **121**(7): 1071-83.
- Chen, D., J. Shan, et al. (2010). "Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses." Nature **464**(7288): 624-7.
- Chen, D., J. B. Yoon, et al. (2010). "Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF." Cell cycle **9**(15): 2946-51.
- Chiang, C. M., T. R. Broker, et al. (1991). "An E1M--E2C fusion protein encoded by human papillomavirus type 11 is

- asequence-specific transcription repressor." J Virol **65**(6): 3317-29.
- Choe, J., P. Vaillancourt, et al. (1989). "Bovine papillomavirus type 1 encodes two forms of a transcriptional repressor: structural and functional analysis of new viral cDNAs." J Virol **63**(4): 1743-55.
- Ciccolini, F., G. Di Pasquale, et al. (1994). "Functional studies of E7 proteins from different HPV types." Oncogene **9**(9): 2633-8.
- Cogliano, V., R. Baan, et al. (2005). "Carcinogenicity of human papillomaviruses." The lancet oncology **6**(4): 204.
- Collado, M., J. Gil, et al. (2005). "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." Nature **436**(7051): 642.
- Colombo, E., P. Bonetti, et al. (2005). "Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability." Molecular and cellular biology **25**(20): 8874-86.
- Corden, S. A., L. J. Sant-Cassia, et al. (1999). "The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma." Molecular pathology : MP **52**(5): 275-82.
- Daniel, P. T., T. Wieder, et al. (2001). "The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy." Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **15**(7): 1022-32.
- Danos, O., M. Katinka, et al. (1982). "Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae." EMBO J **1**(2): 231-6.
- de Villiers, E. M. (1998). "Human papillomavirus infections in skin cancers." Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie **52**(1): 26-33.

- de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.
- Demeret, C., A. Garcia-Carranca, et al. (2003). "Transcription-independent triggering of the extrinsic pathway of apoptosis by human papillomavirus 18 E2 protein." Oncogene **22**(2): 168-75.
- den Besten, W., M. L. Kuo, et al. (2006). "Ubiquitination of, and sumoylation by, the Arf tumor suppressor." The Israel Medical Association journal : IMAJ **8**(4): 249-51.
- Desaintes, C., C. Demeret, et al. (1997). "Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis." EMBO J **16**(3): 504-14.
- Desaintes, C., S. Goyat, et al. (1999). "Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cells." Oncogene **18**(32): 4538-45.
- Di Leonardo, A., S. P. Linke, et al. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes & development **8**(21): 2540-51.
- di Tommaso, A., J. Hagen, et al. (2009). "Residues in the alternative reading frame tumor suppressor that influence its stability and p53-independent activities." Experimental cell research **315**(7): 1326-35.
- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-7.
- Doorbar, J. (2006). "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." Clin Sci (Lond) **110**(5): 525-41.
- Doorbar, J., A. Parton, et al. (1990). "Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line." Virology **178**(1): 254-62.

- Dowhanick, J. J., A. A. McBride, et al. (1995). "Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein." J Virol **69**(12): 7791-9.
- Duerksen-Hughes, P. J., J. Yang, et al. (1999). "HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells." Virology **264**(1): 55-65.
- Eymin, B., P. Claverie, et al. (2006). "p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress." Molecular and cellular biology **26**(11): 4339-50.
- Eymin, B., L. Karayan, et al. (2001). "Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity." Oncogene **20**(9): 1033-41.
- Faderl, S., H. M. Kantarjian, et al. (1999). "The prognostic significance of p16INK4a/p14ARF and p15INK4b deletions in adult acute lymphoblastic leukemia." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **5**(7): 1855-61.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, et al. (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." Genes & development **14**(16): 2015-27.
- Fertey, J., I. Ammermann, et al. (2010). "Interaction of the papillomavirus E8-E2C protein with the cellular CHD6 protein contributes to transcriptional repression." Journal of virology **84**(18): 9505-15.
- Fertey, J., J. Hurst, et al. (2011). "Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8-E2C proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein." Journal of virology **85**(6): 2918-26.
- Filippova, M., H. Song, et al. (2002). "The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis

- factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis." The Journal of biological chemistry **277**(24): 21730-9.
- Frattini, M. G. and L. A. Laimins (1994). "Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12398-402.
- Frattini, M. G. and L. A. Laimins (1994). "The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b." Virology **204**(2): 799-804.
- Frolov, M. V. and N. J. Dyson (2004). "Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression." Journal of cell science **117**(Pt 11): 2173-81.
- Fulda, S. (2009). "Therapeutic opportunities for counteracting apoptosis resistance in childhood leukaemia." British journal of haematology **145**(4): 441-54.
- Funk, J. O., S. Waga, et al. (1997). "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." Genes Dev **11**(16): 2090-100.
- Fuster, J. J., S. M. Sanz-Gonzalez, et al. (2007). "Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy." Trends in molecular medicine **13**(5): 192-9.
- Gallagher, S. J., R. F. Kefford, et al. (2006). "The ARF tumour suppressor." The international journal of biochemistry & cell biology **38**(10): 1637-41.
- Garnett, T. O. and P. J. Duerksen-Hughes (2006). "Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins." Archives of virology **151**(12): 2321-35.
- Gewin, L., H. Myers, et al. (2004). "Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human



- papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex." Genes & development **18**(18): 2269-82.
- Gillissen, B., J. Wendt, et al. (2010). "Endogenous Bcl-2 inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma." The Journal of cell biology **188**(6): 851-62.
- Gjerset, R. A. (2006). "DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer." Journal of molecular histology **37**(5-7): 239-51.
- Gjerset, R. A. and K. Bandyopadhyay (2006). "Regulation of p14ARF through subnuclear compartmentalization." Cell cycle **5**(7): 686-90.
- Glaunsinger, B. A., S. S. Lee, et al. (2000). "Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins." Oncogene **19**(46): 5270-80.
- Goodwin, E. C. and D. DiMaio (2000). "Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12513-8.
- Grassmann, K., B. Rapp, et al. (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." Journal of virology **70**(4): 2339-49.
- Grisendi, S., C. Mecucci, et al. (2006). "Nucleophosmin and cancer." Nature reviews. Cancer **6**(7): 493-505.
- Groth, A., J. D. Weber, et al. (2000). "Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without

- activating cyclin D-dependent kinases." The Journal of biological chemistry **275**(35): 27473-80.
- Halbert, C. L., G. W. Demers, et al. (1991). "The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells." Journal of virology **65**(1): 473-8.
- Hall, A. H. and K. A. Alexander (2003). "RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells." J Virol **77**(10): 6066-9.
- Hall, J. R., E. Kow, et al. (2007). "Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage." Molecular biology of the cell **18**(9): 3340-50.
- Hampson, L., C. Li, et al. (2004). "The PDZ protein Tip-1 is a gain of function target of the HPV16 E6 oncoprotein." International journal of oncology **25**(5): 1249-56.
- Hao, Z., G. S. Duncan, et al. (2012). "The E3 ubiquitin ligase Mule acts through the ATM-p53 axis to maintain B lymphocyte homeostasis." The Journal of experimental medicine **209**(1): 173-86.
- Harris, B. Z. and W. A. Lim (2001). "Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly." Journal of cell science **114**(Pt 18): 3219-31.
- Harwood, C. A., T. Suretheran, et al. (2000). "Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals." Journal of medical virology **61**(3): 289-97.
- Hashii, Y., J. Y. Kim, et al. (2004). "A novel partner gene CIP29 containing a SAP domain with MLL identified in infantile myelomonocytic leukemia." Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **18**(9): 1546-8.

- Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, et al. (1989). "HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes." The EMBO journal **8**(12): 3905-10.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Experimental cell research **25**: 585-621.
- Helt, A. M., J. O. Funk, et al. (2002). "Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells." J Virol **76**(20): 10559-68.
- Herold, S., A. Hock, et al. (2008). "Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1." The EMBO journal **27**(21): 2851-61.
- Hiebert, S. W., S. P. Chellappan, et al. (1992). "The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F." Genes & development **6**(2): 177-85.
- Howie, H. L., R. A. Katzenellenbogen, et al. (2009). "Papillomavirus E6 proteins." Virology **384**(2): 324-34.
- Huang, Y. and M. S. Sheikh (2007). "TRAIL death receptors and cancer therapeutics." Toxicology and applied pharmacology **224**(3): 284-9.
- Hubbert, N. L., J. T. Schiller, et al. (1988). "Bovine papilloma virus-transformed cells contain multiple E2 proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(16): 5864-8.
- Huh, K., X. Zhou, et al. (2007). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor." Journal of virology **81**(18): 9737-47.

- Huibregtse, J. M., M. Scheffner, et al. (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." EMBO J **10**(13): 4129-35.
- Humbey, O., J. Pimkina, et al. (2008). "The ARF tumor suppressor can promote the progression of some tumors." Cancer research **68**(23): 9608-13.
- Hummel, M., J. B. Hudson, et al. (1992). "Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes." J Virol **66**(10): 6070-80.
- Hwang, E. S., L. K. Naeger, et al. (1996). "Activation of the endogenous p53 growth inhibitory pathway in HeLa cervical carcinoma cells by expression of the bovine papillomavirus E2 gene." Oncogene **12**(4): 795-803.
- Hwang, E. S., D. J. Riese, 2nd, et al. (1993). "Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene." J Virol **67**(7): 3720-9.
- Hwang, S. G., D. Lee, et al. (2002). "Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner." The Journal of biological chemistry **277**(4): 2923-30.
- Iftner, A., S. J. Klug, et al. (2003). "The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors." Cancer research **63**(21): 7515-9.
- Ishiyama, M., H. Tominaga, et al. (1996). "A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal

- violet." Biological & pharmaceutical bulletin **19**(11): 1518-20.
- Itahana, K., K. P. Bhat, et al. (2003). "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation." Molecular cell **12**(5): 1151-64.
- Jablonska, S. and S. Majewski (1994). "Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects." Current topics in microbiology and immunology **186**: 157-75.
- Jackson, S., C. Harwood, et al. (2000). "Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins." Genes & development **14**(23): 3065-73.
- James, M. A., J. H. Lee, et al. (2006). "Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner." Journal of virology **80**(11): 5301-7.
- Jeckel, S., E. Loetzsch, et al. (2003). "Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus." J Virol **77**(16): 8736-44.
- Jeckel, S., E. Loetzsch, et al. (2003). "Identification of the E9/E2C cDNA and functional characterization of the gene product reveal a new repressor of transcription and replication in cottontail rabbit papillomavirus." Journal of virology **77**(16): 8736-44.
- Jeon, S., B. L. Allen-Hoffmann, et al. (1995). "Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells." J Virol **69**(5): 2989-97.

- Jeong, K. W., H. Z. Kim, et al. (2007). "Human papillomavirus type 16 E6 protein interacts with cystic fibrosis transmembrane regulator-associated ligand and promotes E6-associated protein-mediated ubiquitination and proteasomal degradation." Oncogene **26**(4): 487-99.
- Jiang, P. S. and B. Y. Yung (1999). "Down-regulation of nucleophosmin/B23 mRNA delays the entry of cells into mitosis." Biochemical and biophysical research communications **257**(3): 865-70.
- Jing, M., J. Bohl, et al. (2007). "Degradation of tyrosine phosphatase PTPN3 (PTPH1) by association with oncogenic human papillomavirus E6 proteins." Journal of virology **81**(5): 2231-9.
- Johung, K., E. C. Goodwin, et al. (2007). "Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence." J Virol **81**(5): 2102-16.
- Kadaja, M., T. Silla, et al. (2009). "Papillomavirus DNA replication - from initiation to genomic instability." Virology **384**(2): 360-8.
- Kamijo, T., J. D. Weber, et al. (1998). "Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(14): 8292-7.
- Kamijo, T., F. Zindy, et al. (1997). "Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF." Cell **91**(5): 649-59.
- Kanao, H., T. Enomoto, et al. (2004). "Correlation between p14(ARF)/p16(INK4A) expression and HPV infection in uterine cervical cancer." Cancer letters **213**(1): 31-7.

- Kanaya, T., S. Kyo, et al. (1997). "The 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region acts as an enhancer which augments viral early expression through the action of YY1." Virology **237**(1): 159-69.
- Kaufmann, S. H. and W. C. Earnshaw (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." Experimental cell research **256**(1): 42-9.
- Knipe, D. M., P. M. Howley, et al. (2007). Field's Virology.
- Komori, H., M. Enomoto, et al. (2005). "Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression." The EMBO journal **24**(21): 3724-36.
- Korgaonkar, C., J. Hagen, et al. (2005). "Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function." Molecular and cellular biology **25**(4): 1258-71.
- Kuo, M. L., W. den Besten, et al. (2004). "N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor." Genes & development **18**(15): 1862-74.
- Kurz, D. J., S. Decary, et al. (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." Journal of cell science **113 ( Pt 20)**: 3613-22.
- Lace, M. J., J. R. Anson, et al. (2008). "The E8--E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes." J Virol **82**(21): 10841-53.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lambert, P. F., N. L. Hubbert, et al. (1989). "Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine

- papillomavirus-transformed cells." J Virol **63**(7): 3151-4.
- Lavin, M. F. and N. Gueven (2006). "The complexity of p53 stabilization and activation." Cell death and differentiation **13**(6): 941-50.
- Lea, J. S., N. Sunaga, et al. (2007). "Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells." Reprod Sci **14**(1): 20-8.
- Lee, S. S., B. Glaunsinger, et al. (2000). "Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins." Journal of virology **74**(20): 9680-93.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-31.
- Li, J., X. Zhang, et al. (2004). "Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53." The Journal of biological chemistry **279**(40): 41275-9.
- Li, Z., D. Boone, et al. (2008). "Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(48): 18794-9.
- Lin, A. W. and S. W. Lowe (2001). "Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(9): 5025-30.
- Lindstrom, M. S. and K. G. Wiman (2003). "Myc and E2F1 induce p53 through p14ARF-independent mechanisms in human fibroblasts." Oncogene **22**(32): 4993-5005.



- Lingbeek, M. E., J. J. Jacobs, et al. (2002). "The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator." The Journal of biological chemistry **277**(29): 26120-7.
- Liu, X., A. Dakic, et al. (2009). "HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(44): 18780-5.
- Liu, X., J. Roberts, et al. (2008). "HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function." Virology **375**(2): 611-23.
- Liu, Z., R. Oughtred, et al. (2005). "Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones." Molecular and cellular biology **25**(7): 2819-31.
- Llanos, S., P. A. Clark, et al. (2001). "Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus." Nature cell biology **3**(5): 445-52.
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31." Journal of virology **78**(7): 3533-41.
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2006). "Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src." Oncogene **25**(32): 4495-500.
- Longworth, M. S., R. Wilson, et al. (2005). "HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs." The EMBO journal **24**(10): 1821-30.

- Lowe, S. W. (1999). "Activation of p53 by oncogenes." Endocrine-related cancer **6**(1): 45-8.
- Lowe, S. W. and C. J. Sherr (2003). "Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles." Current opinion in genetics & development **13**(1): 77-83.
- Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." Oncogene **20**(54): 7874-87.
- Marini, P., A. Schmid, et al. (2005). "Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis." BMC cancer **5**: 5.
- Masterson, P. J., M. A. Stanley, et al. (1998). "A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit." J Virol **72**(9): 7407-19.
- Matsuoka, M., M. Kurita, et al. (2003). "Multiple domains of the mouse p19ARF tumor suppressor are involved in p53-independent apoptosis." Biochemical and biophysical research communications **301**(4): 1000-10.
- McBride, A. A., H. Romanczuk, et al. (1991). "The papillomavirus E2 regulatory proteins." J Biol Chem **266**(28): 18411-4.
- McLaughlin-Drubin, M. E., K. W. Huh, et al. (2008). "Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6." Journal of virology **82**(17): 8695-705.
- McLaughlin-Drubin, M. E. and K. Munger (2009). "The human papillomavirus E7 oncoprotein." Virology **384**(2): 335-44.
- Meerbrey, K. L., G. Hu, et al. (2011). "The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo." Proceedings of the National Academy of

- Sciences of the United States of America **108**(9): 3665-70.
- Merino, D., N. Lalaoui, et al. (2007). "TRAIL in cancer therapy: present and future challenges." Expert opinion on therapeutic targets **11**(10): 1299-314.
- Michnov, O., E. Solomayer, et al. (2012). "Knock down of p53 or its ubiquitin ligase E6AP does not affect the sensitivity of human papillomavirus-positive cervical cancer cells to cisplatin." American journal of cancer research **2**(3): 309-21.
- Midgley, C. A., J. M. Desterro, et al. (2000). "An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo." Oncogene **19**(19): 2312-23.
- Moody, C. A. and L. A. Laimins (2010). "Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation." Nature reviews. Cancer **10**(8): 550-60.
- Munger, K., B. A. Werness, et al. (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." The EMBO journal **8**(13): 4099-105.
- Munoz, N., X. Castellsague, et al. (2006). "Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer." Vaccine **24 Suppl 3**: S3/1-10.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." Cell **85**(6): 817-27.
- Naeger, L. K., E. C. Goodwin, et al. (1999). "Bovine papillomavirus E2 protein activates a complex growth-inhibitory program in p53-negative HT-3 cervical carcinoma cells that includes repression of cyclin A and cdc25A phosphatase genes and

- accumulation of hypophosphorylated retinoblastoma protein." Cell Growth Differ **10**(6): 413-22.
- Nakagawa, S. and J. M. Huibregtse (2000). "Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase." Molecular and cellular biology **20**(21): 8244-53.
- Okuda, M., H. F. Horn, et al. (2000). "Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication." Cell **103**(1): 127-40.
- Oldak, M., H. Smola, et al. (2004). "The human papillomavirus type 8 E2 protein suppresses beta4-integrin expression in primary human keratinocytes." J Virol **78**(19): 10738-46.
- Ozenne, P., B. Eymin, et al. (2010). "The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer." International journal of cancer. Journal international du cancer **127**(10): 2239-47.
- Palmero, I., C. Pantoja, et al. (1998). "p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras." Nature **395**(6698): 125-6.
- Pan, H. and A. E. Griep (1995). "Temporally distinct patterns of p53-dependent and p53-independent apoptosis during mouse lens development." Genes & development **9**(17): 2157-69.
- Parish, J. L., A. Kowalczyk, et al. (2006). "E2 proteins from high- and low-risk human papillomavirus types differ in their ability to bind p53 and induce apoptotic cell death." Journal of virology **80**(9): 4580-90.
- Park, J. S., E. S. Hwang, et al. (1997). "Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers." Gynecologic oncology **65**(1): 121-9.

- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA: a cancer journal for clinicians **55**(2): 74-108.
- Parsons, J. L., P. S. Tait, et al. (2009). "Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair." The EMBO journal **28**(20): 3207-15.
- Pattillo, R. A., R. O. Husa, et al. (1977). "Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line." Science **196**(4297): 1456-8.
- Pett, M. R., W. O. Alazawi, et al. (2004). "Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes." Cancer research **64**(4): 1359-68.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic acids research **29**(9): e45.
- Pollice, A., M. Vivo, et al. (2008). "The promiscuity of ARF interactions with the proteasome." FEBS letters **582**(23-24): 3257-62.
- Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, et al. (1998). "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." Cell **92**(6): 713-23.
- Powell, M. L. C., J. A. Smith, et al. (2010). "NCoR1 Mediates Papillomavirus E8<sup>E2C</sup> Transcriptional Repression." J. Virol. **84**(9): 4451-4460.
- Purdie, K. J., C. J. Sexton, et al. (1993). "Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus." Cancer Res **53**(21): 5328-33.

- Qi, Y., M. A. Gregory, et al. (2004). "p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53." Nature **431**(7009): 712-7.
- Quelle, D. E., F. Zindy, et al. (1995). "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest." Cell **83**(6): 993-1000.
- Reiser, J., J. Hurst, et al. (2011). "High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression." Journal of virology **85**(21): 11372-80.
- Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell **6**(3): 331-43.
- Riccardi, C. and I. Nicoletti (2006). "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." Nature protocols **1**(3): 1458-61.
- Rocco, J. W. and D. Sidransky (2001). "p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression." Experimental cell research **264**(1): 42-55.
- Rodway, H., S. Llanos, et al. (2004). "Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14(ARF)." Oncogene **23**(37): 6186-92.
- Roh, M. H. and B. Margolis (2003). "Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization." American journal of physiology. Renal physiology **285**(3): F377-87.
- Rotenberg, M. O., C. M. Chiang, et al. (1989). "Characterization of cDNAs of spliced HPV-11 E2 mRNA and other HPV mRNAs recovered via

- retrovirus-mediated gene transfer." Virology **172**(2): 468-77.
- Ruesch, M. N., F. Stubenrauch, et al. (1998). "Activation of papillomavirus late gene transcription and genome amplification upon differentiation in semisolid medium is coincident with expression of involucrin and transglutaminase but not keratin-10." J Virol **72**(6): 5016-24.
- Salomon, R. N. and S. Diaz-Cano (1995). "Introduction to apoptosis." Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B **4**(4): 235-8.
- Sato, K., Y. Kusama, et al. (2010). "FBXL16 is a novel E2F1-regulated gene commonly upregulated in p16INK4A- and p14ARF-silenced HeLa cells." International journal of oncology **36**(2): 479-90.
- Scheffner, M., J. M. Huibregtse, et al. (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." Cell **75**(3): 495-505.
- Schneider-Maunoury, S., O. Croissant, et al. (1987). "Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors." Journal of virology **61**(10): 3295-8.
- Schwarz, E., U. K. Freese, et al. (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." Nature **314**(6006): 111-4.
- Sedman, J. and A. Stenlund (1996). "The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure." EMBO J **15**(18): 5085-92.
- Sedman, S. A., M. S. Barbosa, et al. (1991). "The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has

- transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture." Journal of virology **65**(9): 4860-6.
- Sen, E., J. L. Bromberg-White, et al. (2002). "Genetic analysis of cis regulatory elements within the 5' region of the human papillomavirus type 31 upstream regulatory region during different stages of the viral life cycle." J Virol **76**(10): 4798-809.
- Serrano, M., H. Lee, et al. (1996). "Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality." Cell **85**(1): 27-37.
- Shamanin, V., M. Glover, et al. (1994). "Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients." Cancer research **54**(17): 4610-3.
- Shankar, S. and R. K. Srivastava (2008). "Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis." Advances in experimental medicine and biology **615**: 261-98.
- Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." Mutation research **576**(1-2): 22-38.
- Sharpless, N. E., N. Bardeesy, et al. (2001). "Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis." Nature **413**(6851): 86-91.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (1999). "The INK4A/ARF locus and its two gene products." Current opinion in genetics & development **9**(1): 22-30.
- Sharpless, N. E., M. R. Ramsey, et al. (2004). "The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis." Oncogene **23**(2): 379-85.
- Sherr, C. J. (2001). "The INK4a/ARF network in tumour suppression." Nature reviews. Molecular cell biology **2**(10): 731-7.



- Sherr, C. J. (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." Nature reviews. Cancer **6**(9): 663-73.
- Sherr, C. J., D. Bertwistle, et al. (2005). "p53-Dependent and -independent functions of the Arf tumor suppressor." Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **70**: 129-37.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes & development **13**(12): 1501-12.
- Sherwood, S. W., D. Rush, et al. (1988). "Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(23): 9086-90.
- Shmueli, A. and M. Oren (2005). "Life, death, and ubiquitin: taming the mule." Cell **121**(7): 963-5.
- Snapir, N., J. Rulf, et al. (1998). "Testosterone concentrations, testes weight and morphology of mule drakes (Muscovy drake x Khaki Campbell)." British poultry science **39**(4): 572-4.
- Snijders, P. J., A. J. van den Brule, et al. (1992). "Human papillomavirus type 33 in a tonsillar carcinoma generates its putative E7 mRNA via two E6\* transcript species which are terminated at different early region poly(A) sites." J Virol **66**(5): 3172-8.
- Snyder, C. M., E. H. Shroff, et al. (2009). "Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members." PloS one **4**(9): e7059.
- Spalholz, B. A., P. F. Lambert, et al. (1987). "Bovine papillomavirus transcriptional regulation: localization of the E2-responsive elements of the long control region." J Virol **61**(7): 2128-37.

- Spanos, W. C., A. Hoover, et al. (2008). "The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth." Journal of virology **82**(5): 2493-500.
- Steger, G. and S. Corbach (1997). "Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein." Journal of virology **71**(1): 50-8.
- Steller, M. A., Z. Zou, et al. (1996). "Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor." Cancer research **56**(21): 5087-91.
- Stern, P. L., S. H. van der Burg, et al. (2012). "Therapy of human papillomavirus-related disease." Vaccine **30 Suppl 5**: F71-82.
- Stevaux, O. and N. J. Dyson (2002). "A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function." Current opinion in cell biology **14**(6): 684-91.
- Stott, F. J., S. Bates, et al. (1998). "The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2." The EMBO journal **17**(17): 5001-14.
- Stubenrauch, F., M. Hummel, et al. (2000). "The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes." J Virol **74**(3): 1178-86.
- Stubenrauch, F. and L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." Semin Cancer Biol **9**(6): 379-86.
- Stubenrauch, F., E. Straub, et al. (2007). "The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for

- growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins." International journal of cancer. Journal international du cancer **121**(10): 2284-92.
- Stubenrauch, F., E. Straub, et al. (2007). "The E8 repression domain can replace the E2 transactivation domain for growth inhibition of HeLa cells by papillomavirus E2 proteins." Int J Cancer **121**(10): 2284-92.
- Stubenrauch, F., T. Zobel, et al. (2001). "The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31." J Virol **75**(9): 4139-49.
- Stubenrauch, F., T. Zobel, et al. (2001). "The E8 domain confers a novel long-distance transcriptional repression activity on the E8E2C protein of high-risk human papillomavirus type 31." Journal of virology **75**(9): 4139-49.
- Sugimoto, M., M. L. Kuo, et al. (2003). "Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing." Molecular cell **11**(2): 415-24.
- Sun, Y. N., J. Z. Lu, et al. (1996). "Mapping of HPV-11 E1 binding site and determination of other important cis elements for replication of the origin." Virology **216**(1): 219-22.
- Szebeni, A. and M. O. Olson (1999). "Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities." Protein science : a publication of the Protein Society **8**(4): 905-12.
- Tang, S., M. Tao, et al. (2006). "The E7 oncoprotein is translated from spliced E6\*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation." Journal of virology **80**(9): 4249-63.

- Terasima, T. and L. J. Tolmach (1963). "Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells." Experimental cell research **30**: 344-62.
- Thierry, F. (2009). "Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma." Virology **384**(2): 375-9.
- Thierry, F. and C. Demeret (2008). "Direct activation of caspase 8 by the proapoptotic E2 protein of HPV18 independent of adaptor proteins." Cell Death Differ **15**(9): 1356-63.
- Thomas, M. and L. Banks (1998). "Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6." Oncogene **17**(23): 2943-54.
- Thomas, M. and L. Banks (1999). "Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types." The Journal of general virology **80 ( Pt 6)**: 1513-7.
- Thomas, M., R. Laura, et al. (2002). "Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation." Oncogene **21**(33): 5088-96.
- Thompson, D. A., V. Zacny, et al. (2001). "The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts." Oncogene **20**(28): 3629-40.
- Thyrell, L., O. Sangfelt, et al. (2005). "The HPV-16 E7 oncogene sensitizes malignant cells to IFN-alpha-induced apoptosis." Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research **25**(2): 63-72.

- Tolbert, D., X. Lu, et al. (2002). "p19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53-mediated apoptosis and tumor suppression in vivo." Molecular and cellular biology **22**(1): 370-7.
- Turek, L. P. (1994). "The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer." Adv Virus Res **44**: 305-56.
- Underbrink, M. P., H. L. Howie, et al. (2008). "E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation." Journal of virology **82**(21): 10408-17.
- Ustav, E., M. Ustav, et al. (1993). "The bovine papillomavirus origin of replication requires a binding site for the E2 transcriptional activator." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 898-902.
- Ustav, M. and A. Stenlund (1991). "Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames." EMBO J **10**(2): 449-57.
- Vigushin, D. M. and R. C. Coombes (2002). "Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment." Anti-cancer drugs **13**(1): 1-13.
- Voorhoeve, P. M. and R. Agami (2003). "The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus." Cancer cell **4**(4): 311-9.
- Wadhwa, R., T. Sugihara, et al. (2002). "A major functional difference between the mouse and human ARF tumor suppressor proteins." The Journal of biological chemistry **277**(39): 36665-70.
- Wadhwa, R., T. Sugihara, et al. (2004). "The ARF-p53 senescence pathway in mouse and human cells." Histology and histopathology **19**(1): 311-6.

- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, et al. (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." The Journal of pathology **189**(1): 12-9.
- Wang, W., Y. Fang, et al. (2011). "Triggering of death receptor apoptotic signaling by human papillomavirus 16 E2 protein in cervical cancer cell lines is mediated by interaction with c-FLIP." Apoptosis : an international journal on programmed cell death **16**(1): 55-66.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." Genes & development **15**(22): 2922-33.
- Weber, J. D., L. J. Taylor, et al. (1999). "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53." Nature cell biology **1**(1): 20-6.
- Webley, K., J. A. Bond, et al. (2000). "Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage." Molecular and cellular biology **20**(8): 2803-8.
- Webster, K., J. Parish, et al. (2000). "The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway." The Journal of biological chemistry **275**(1): 87-94.
- Wei, W., R. M. Hemmer, et al. (2001). "Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts." Molecular and cellular biology **21**(20): 6748-57.
- Wells, S. I., D. A. Francis, et al. (2000). "Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways." EMBO J **19**(21): 5762-71.

- Wu, M. H., J. H. Chang, et al. (2002). "Resistance to UV-induced cell-killing in nucleophosmin/B23 over-expressed NIH 3T3 fibroblasts: enhancement of DNA repair and up-regulation of PCNA in association with nucleophosmin/B23 over-expression." Carcinogenesis **23**(1): 93-100.
- Xirodimas, D. P., J. Chisholm, et al. (2002). "P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2." FEBS letters **528**(1-3): 207-11.
- Xu, M., W. Luo, et al. (2008). "NFX1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes." Molecular and cellular biology **28**(15): 4819-28.
- Yu, Y., L. B. Maggi, Jr., et al. (2006). "Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export." Molecular and cellular biology **26**(10): 3798-809.
- Yuan, H., F. Fu, et al. (2005). "Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis." Oncogene **24**(32): 5069-78.
- Zerfass, K., A. Schulze, et al. (1995). "Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation." Journal of virology **69**(10): 6389-99.
- Zhang, H., K. H. Pan, et al. (2003). "Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(6): 3251-6.
- Zhang, J., S. Kan, et al. (2011). "Mule determines the apoptotic response to HDAC inhibitors by targeted

- ubiquitination and destruction of HDAC2." Genes & development **25**(24): 2610-8.
- Zhang, Y., Y. Xiong, et al. (1998). "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." Cell **92**(6): 725-34.
- Zhong, Q., W. Gao, et al. (2005). "Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis." Cell **121**(7): 1085-95.
- Zobel, T., T. Iftner, et al. (2003). "The papillomavirus E8-E2C protein represses DNA replication from extrachromosomal origins." Mol Cell Biol **23**(22): 8352-62.





## 8 Publikationen

Finke, S., H. Granzow, **J. Hurst**, et al. (2010).

"Intergenotypic replacement of lyssavirus matrix proteins demonstrates the role of lyssavirus M proteins in intracellular virus accumulation." Journal of virology **84**(4): 1816-1827.

Fertey, J., **J. Hurst**, et al. (2011). "Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8<sup>E2C</sup> proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein." Journal of virology **85**(6): 2918-2926.

Reiser, J., **J. Hurst**, et al. (2011). "High-risk human papillomaviruses repress constitutive kappa interferon transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression." Journal of virology **85**(21): 11372-11380.

**Hurst, J.** Stubenrauch, F., et al. (manuscript in preparation 2013) „p14Arf prevents mitochondrial apoptosis in cervical cancer cells“

### 9 Danksagungen

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

**Prof. Dr. Frank Stubenrauch** für die engagierte Betreuung, Beratung und stete Diskussionsbereitschaft während des gesamten Forschungsprojektes, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Außerdem für die immer geduldige Bereitschaft, Probleme zu Lösen und nicht zuletzt für die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

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

**Prof. Dr. Andreas Peschel** für die Betreuung dieser Arbeit durch die Fakultät für Biologie und seine Bereitschaft als Erstgutachter zu fungieren.

Ein herzlicher Dank gilt **Anna Manawapat, Jasmin Fertey** und **Elke Straub**, die durch ihr permanente Bereitschaft, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, unersetzlich geworden sind und nicht nur den Arbeitsalltag bereichert haben.

## Danksagungen

---

Ein Dank geht auch an meinen Kollegen, die mir immer mit Ratschlägen geholfen und für eine nette Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Ebenso danke ich all meinen Freunden, aber vor allem **Leonie, Petra** und **Anna** dafür, dass sie immer Verständnis und ein offenes Ohr hatten.

Ein ganz spezieller Dank geht an meinen Freund **Thomas Hirtzel**, der stets mit Ruhe, Ausdauer und Geduld jede Phase dieser Arbeit mitgemacht, mich unterstützt und motiviert hat.

Und nicht zuletzt danke ich besonders meiner Familie; **meinen Großeltern, meinen Brüdern** und **meinen Eltern**, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt und mich bei allem fortwährend unterstützt und gefördert haben.