

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Phosphorylierungen des HPV31 E8^{E2} Proteins

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Saskia van de Poel
aus Tübingen

Tübingen
2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls
Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

01.03.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Boris Maček

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Frank Stubenrauch

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Charakterisierung und Klassifizierung humaner Papillomviren	3
2.2 Genomorganisation.....	5
2.3 Lebenszyklus und Replikation humaner Papillomviren.....	6
2.4 Die Onkoproteine E6 und E7	7
2.5 Das E1 Protein - Die virale Helikase.....	9
2.6 Das regulatorische E2 Protein	10
2.6.1 Post-Translationale Modifikationen von E2	11
2.7 Das Repressorprotein E8 [^] E2	12
2.8 Zielsetzung.....	13
3 MATERIAL UND METHODEN	14
3.1 Material	14
3.1.1 Chemikalien.....	14
3.1.2 Medien und Puffer	14
3.1.2.1 Puffer und Lösungen	14
3.1.2.2 Medien für Bakterienkultur	16
3.1.2.3 Medien für Zellkultur	17
3.1.3 Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien.....	20
3.1.4 Marker für Gelelektrophoresen	21
3.1.5 Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.6 Enzyme	22
3.1.7 Antikörper	22
3.1.8 Eukaryotische Zellen	24
3.1.9 Bakterienstämme	25
3.1.10 Oligonukleotide.....	25
3.1.11 Plasmide und Vektoren	28
3.1.12 Geräte.....	33
3.2 Methoden.....	34
3.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	34

3.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen	34
3.2.1.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen	35
3.2.1.3 Kultivierung von Bakterienzellen zur Plasmidisolierung	35
3.2.2 Zellkultur-Methoden	35
3.2.2.1 Kultivierung von Zellen und Arbeiten mit Zellen	35
3.2.2.2 Mitomycin-Behandlung von NIH3T3-J2	36
3.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
3.2.2.4 Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC).....	37
3.2.2.5 DNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner	37
3.2.2.6 Etablierung stabiler HPV31-positiver Zelllinien.....	38
3.2.2.7 Differenzierung von HPV31-positiven Zelllinien in organotypischen Zellkulturen	39
3.2.2.8 Ernten der organotypischen Zellkulturen	40
3.2.3 Analysen von eukaryotischen Zellen	40
3.2.3.1 Luziferase-Reporteranalyse.....	40
3.2.4 DNA-Methoden	41
3.2.4.1 DNA-Standardmethoden.....	41
3.2.4.2 Amplifikation von Gensequenzen mittels PCR.....	41
3.2.4.3 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienzellen	41
3.2.4.4 DNA-Fragmentelution aus Agarosegelen.....	41
3.2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	42
3.2.4.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA	42
3.2.4.7 Sequenzierung.....	42
3.2.4.8 DNA-Extraktion aus Zellen	42
3.2.4.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	43
3.2.4.10 Southern Blot.....	43
3.2.4.11 Multiplex qRT-PCR.....	44
3.2.5 RNA-Methoden	45
3.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	45
3.2.5.2 Synthese von copy-DNA	46
3.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	46
3.2.5.4 Transkriptomanalyse.....	47
3.2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.2.6.1 Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen.....	48
3.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.2.6.3 Phosphat-Affinitätselektrophorese (Phos-Tag TM SDS-PAGE)	48

3.2.6.4	Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)	49
3.2.6.5	Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine	49
3.2.6.6	Herstellung nukleärer Extrakte für Elektromobilitäts-Shift-Analyse.....	49
3.2.6.7	Elektromobilitäts-Shift-Analyse (EMSA).....	50
3.2.6.8	(Ko-) Immunpräzipitation.....	50
3.2.6.9	Verdau von Proteinen für die Proteom-Analyse.....	51
3.2.6.10	LC-MS/MS Analyse	51
3.2.6.11	MS Daten Verarbeitung und Analyse	52
3.2.6.12	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	53
3.2.6.13	Anfertigung von Kryoschnitten.....	53
3.2.6.14	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von Proteinen.....	53
4	ERGEBNISSE.....	55
4.1	Phosphorylierung von HPV31 E8 ^A E2.....	55
4.1.1	Massenspektrometrische Analyse von HPV31 E8 ^A E2 und E2.....	55
4.1.2	Validierung der vorhergesagten Phosphorylierungen	58
4.1.3	Die E8 ^A E2 Phosphorylierung wird <i>in vitro</i> durch CK2 Inhibitoren verändern.....	59
4.1.4	Phosphorylierung von HPV31 E8 ^A E2 reguliert dessen Repressionsaktivität	61
4.1.5	Phosphorylierung von HPV31 E8 ^A E2 hat keine Auswirkung auf die Stabilität oder die Lokalisation des Proteins.....	65
4.1.6	HPV31 E8 ^A E2 S78 Phosphorylierung reguliert nicht die DNA-Bindung	67
4.1.7	Die Interaktion von HPV31 E8 ^A E2 mit dem NCoR/SMRT-Komplex ist unabhängig von der S78 Phosphorylierung	69
4.1.8	Deletion der HPV31 E8 ^A E2 Hinge-Region hat keine Auswirkung auf die Replikation	70
4.1.9	Die Phosphorylierung von E8 ^A E2 S78 reguliert die Interaktion mit zellulären Proteinen ..	72
4.1.10	Phosphorylierung von HPV31 E8 ^A E2 hat keine Auswirkungen auf die virale Replikation in Keratinozyten	75
4.1.11	Die Phosphorylierung von HPV31 E8 ^A E2 S78 reguliert die Transkription zellulärer Gene .	83
4.2	HPV Replikation in normalen humanen Keratinozyten	86
4.2.1	Lokalisation und Stabilität des E1 Proteins ist in 31E6/E7-NHK nicht beeinträchtigt.....	88
4.2.2	Titrationen der E1 und E2 Expressionsplasmide resultieren nicht in einer Replikation des Reporterplasmids	89
4.2.3	5'-verlängerte E1-Konstrukte erhöhen die Luziferase-Aktivität	90
4.2.4	Codon-Optimierung von HPV31 E1 erhöht die Luziferase-Aktivität	91
4.2.5	Kotransfektion weiterer früher viraler Gene resultiert nicht in einer Replikation des Reporterplasmids	92

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.6	Die Inhibition der DNA-Schadensantwort führt nicht zur Replikation in 31E6/E7-NHK.....	93
5	DISKUSSION.....	97
5.1	Das E8 ^{E2} Protein von HPV31 wird phosphoryliert.....	98
5.2	Die Phosphorylierung des E8 ^{E2} Proteins hat Auswirkungen auf dessen Funktion als Repressor der Replikation und Transkription	100
5.3	Die virale Replikation in 31E6/E7-NHK.....	104
6	ANHANG	109
6.1	Nano LC-MS/MS Spektrum des S78 enthaltenden Phosphopeptids	109
6.2	Liste der durch Phosphorylierung des S78 regulierten Gene.....	110
7	LITERATURVERZEICHNIS	113
8	PUBLIKATIONEN.....	120
9	DANKSAGUNG.....	121

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATM Kinase	<i>ataxia telangiectasia mutated</i> Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAPS	Cyclohexaminopropansulfonsäure
cDNA	copy-DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CK2	Casein Kinase 2
CP	<i>crossing point</i>
CS	Kälberserum
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DDR	DNA-Schadensantwort (<i>DNA-Damage-Response</i>)
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles minimal essentielles Medium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	frühe Gene bzw. Genprodukte von HPV (<i>early</i>) bzw. Glutaminsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
E1BS	E1-Bindestellen
E2BS	E2-Bindestellen
F	<i>forward</i> für Primer in einer PCR
FKS	Fötales Kälberserum
Fluc	Firefly Luziferase
Gluc	Gaussia Luziferase
HA	Hämagglutinin
HC-FKS	Definiertes fötales Kälberserum
HDAC3	Histondeacetylase 3
(H)PV	(Humanes) Papillomvirus

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HR	<i>High Risk</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase(n)
KSFM	Keratinocyten-serumfreies Medium
L	späte Leserahmen der Papillomviren (<i>late</i>)
LB	Komplexes Medium zur Bakterienkultur (<i>lysogeny broth</i>)
LR	<i>Low Risk</i>
Luc	Luziferasegen
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal Antibody</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
NHK	Normale humane Keratinocyten
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
ORF	offener Leserahmen
ORI	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGK1	Phosphoglycerat-Kinase 1
PKA	Proteinkinase A
pRb	Retinoblastom-Protein
PTM	post-translationale Modifikation
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
R	<i>reverse</i> für Primer in einer PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
SILAC	Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur
SSC	Kochsalz-Natriumcitrat (<i>saline-sodium citrate</i>)
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA Puffer (<i>sodium chloride -sodium phosphate -EDTA</i>)
SV40	Simian Virus 40
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

URR	<i>upstream regulatory region</i>
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtprozent
WT	Wildtyp

Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen, SI-Einheiten und Präfixe verwendet.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur des linearisierten HPV31 Genoms. 5

Abbildung 2: Der Lebenszyklus der Papillomviren. 7

Abbildung 3: Schematische Darstellung der E1 Domänen des bovinen Papillomvirus Typ 1. 9

Abbildung 4: HPV31 E8^{E2} und E2 werden phosphoryliert. 56

Abbildung 5: Aminosäuresequenzvergleich des E8^{E2} Proteins 57

Abbildung 6: Phos-Tag-Analysen bestätigen die Phosphorylierung des E8^{E2} und E2 Proteins. 59

Abbildung 7: Der CK2 Inhibitor CX-4945 beeinflusst die HPV31 E8^{E2} Phosphorylierung. 60

Abbildung 8: Die Phosphorylierung von E8^{E2} S78 beeinflusst die Transkriptionsrepression. 63

Abbildung 9: E8^{E2} S78 Phosphorylierung beeinflusst die Repression der Replikation. 64

Abbildung 10: E8^{E2} Phosphorylierung verändert nicht Stabilität oder Lokalisation des Proteins. 66

Abbildung 11: E8^{E2} S78 Phosphorylierung wirkt sich nicht auf die DNA-Bindung aus. 68

Abbildung 12: Phosphorylierung von S78 hat keine Auswirkung auf die NCoR/SMRT-Interaktion. 69

Abbildung 13: Die Deletion der Hinge-Region führt zu einer Veränderung der Proteinlokalisierung. ... 71

Abbildung 14: Kontroll-Western Blot der Ko-Immünpräzipitation von E8^{E2} Proteinen in unterschiedlich markierten HeLa Zellen. 73

Abbildung 15: E8^{E2} Phosphorylierung hat keine Auswirkungen in undifferenzierten Keratinozyten. 77

Abbildung 16: E2 S266A hat keinen Einfluss auf die Repressionsaktivität von E8^{E2} S78A. 78

Abbildung 17: E8^{E2} Mutationen wirken sich nicht auf die Differenzierung der Keratinozyten aus... 80

Abbildung 18: Phosphorylierung beeinflusst nicht die Genomkopienzahl differenzierter Keratinozyten. 82

Abbildung 19: E8^{E2} S78 Phosphorylierung reguliert die Transkription von LYPD2. 85

Abbildung 20: 31E6/E7-NHK zeigen keine Replikation des pGL31URR-Luc Reporterplasmids. 86

Abbildung 21: 31E6/E7-NHK unterstützen die Aktivierung des pC18-SP1-Luc Reporterplasmids. 87

Abbildung 22: Lokalisation von E1 ist in 31E6/E7-NHK nicht beeinträchtigt. 88

Abbildung 23: E1- und E2-Titration in 31E6/E7-NHK. 89

Abbildung 24: Verlängerte E1-Konstrukte führen nicht zu einer Replikation des Reporterplasmids... 90

Abbildung 25: Codon-Optimierung von E1 führt nicht zu einer Replikation des Reporterplasmids. ... 92

Abbildung 26: Kotransfektion früher Genprodukten ermöglicht keine Replikation in 31E6/E7-NHK. . 93

Abbildung 27: Die Transfektion von E1 löst eine starke DNA-Schadensantwort in 31E6/E7-NHK aus. 95

Abbildung 28: E1 positive Zellen sind negativ für p21. 96

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien	20
Tabelle 2: Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 3: Primärantikörper	23
Tabelle 4: Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper	24
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 6: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Zelllinien	25
Tabelle 7: Bezeichnung, Sequenz und Verwendungszweck der verwendeten Oligonukleotide	26
Tabelle 8: Geräte	33
Tabelle 9: Interagierende Proteine, deren Bindung durch die S78A Mutation verringert wird.	74
Tabelle 10: Interagierende Proteine, deren Bindung durch die S78A Mutation verstärkt wird.....	74
Tabelle 11: Liste der differenziell exprimierten Gene (S78E vs. S78A)	110

1 ZUSAMMENFASSUNG

Humane Papillomviren (HPV) gehören zu den am häufigsten sexuell übertragbaren Krankheitserregern weltweit. Sie infizieren Keratinozyten der Haut oder Schleimhaut und die sogenannten *High Risk* HPV Typen sind mit der Entstehung von Oropharynx- und anogenitalen Karzinomen, insbesondere der Zervix, assoziiert. Der virale Lebenszyklus kann in drei Phasen eingeteilt werden. Unmittelbar nach der Infektion kommt es zu einer Genomamplifikation, wodurch die Anzahl der viralen Genome pro Zelle auf 50-100 extrachromosomale Kopien ansteigt. Diese Kopienzahl wird anschließend während der Teilung der Wirtszellen konstant gehalten. Erst nach der Differenzierung erfolgt eine zweite Amplifikationsrunde und neue infektiöse Partikel werden produziert. Die Virusreplikation ist abhängig von den beiden viralen Replikationsproteinen E1 und E2. Darüber hinaus ist E2 an der viralen Transkription sowie der Segregation der viralen Genome während der Zellteilung beteiligt. Für einige HPV Typen konnte gezeigt werden, dass die E2 Proteine in der zentralen Hinge-Region phosphoryliert werden, wodurch die Funktion des Proteins beeinflusst wird. Neben dem vollständigen E2 Protein kodieren humane Papillomviren eine alternative Version von E2, welche als Repressor der viralen Transkription und Replikation fungiert. Das E8^{E2} Protein entsteht durch Spleißen, wobei die N-terminale Domäne des E2 Proteins durch eine kurze E8-Domäne ersetzt wird.

Da diese Repressorproteine die Hinge-Region mit dem E2 Protein teilen, könnten sie auch durch Phosphorylierungen modifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte massenspektrometrische Analysen zeigen, dass sowohl das E2 Protein als auch das E8^{E2} Protein des *High Risk* HPV31 phosphoryliert wird. Phos-Tag Analysen der Proteine bestätigten, dass das Serin 78 die Hauptphosphorylierungsstelle des HPV31 E8^{E2} Proteins darstellt, wohingegen das entsprechende Serin bei E2 (S266) nur in einer geringen Fraktion des Proteins phosphoryliert vorliegt. Die Phosphorylierung des HPV31 E8^{E2} S78 beeinflusst die Repressionsaktivität des Proteins, wohingegen die Phosphorylierung von E2 keine Auswirkung auf dessen Funktion hat. Durch die Phosphorylierung von E8^{E2} an S78 wird weder die Proteinstabilität, Lokalisierung, DNA-Bindeaktivität oder die Interaktion mit dem zellulären NCoR/SMRT-Korepressorkomplex reguliert. Quantitative massenspektrometrische Analysen lassen vermuten, dass die Interaktion von E8^{E2} mit anderen zellulären Proteinen durch die S78 Phosphorylierung beeinflusst wird. Überraschenderweise zeigen Mutationen der phosphorylierten Serine im Kontext des gesamten viralen Genoms keine Unterschiede in der viralen Genomkopienzahl oder Transkription in undifferenzierten oder differenzierten Keratinozyten. Allerdings deuten globale Transkriptomanalysen von differenzierten HPV31 E8^{E2} S78A und S78E Zelllinien darauf hin, dass durch die Phosphorylierung die Expression

einiger weniger zellulärer Gene, wie LYPD2 reguliert wird. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die Hauptfunktion der Phosphorylierung von S78 des HPV31 E8^{E2} Proteins darin besteht, die Expression einiger weniger zellulären Gene zu modulieren.

Die Replikationsaktivität der viralen E1 und E2 Proteine lässt sich mittels Luziferase-Reporteranalysen in Karzinomzelllinien wie z.B. HeLa untersuchen. Dabei führt die Kotransfektion von Expressionsplasmiden für E1 und E2 und einem Reporterplasmid, welches den viralen Replikationsursprung enthält, zu einer Amplifikation des Reporterplasmids und in Folge dessen zur Zunahme der Luziferase-Aktivität. Überraschenderweise kann in humanen Keratinozyten, welche durch HPV31 E6 und E7 Proteinen immortalisiert wurden (31E6/E7-NHK), keine E1/E2-abhängige Zunahme der Aktivität des Reporterplasmids beobachtet werden. Die Ursache dafür wurde im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht. Dabei zeigten die durchgeführten Analysen, dass in 31E6/E7-NHK Zellen das virale E1 Protein nur in geringen Mengen exprimiert wird. Die insuffiziente E1 Expression scheint dabei zur Limitierung der Replikation des HPV-Reporterplasmids beizutragen, jedoch nicht ausschließlich dafür verantwortlich zu sein. Im Einklang mit publizierten Daten führt die Expression von E1 zur Induktion einer DNA-Schadensantwort in 31E6/E7-NHK. Allerdings kann auch nach Inhibition der DNA-Schadensantwort keine Replikation des Reporters beobachtet werden. Vielmehr scheint eine E1/E2-abhängige Replikation in 31E6/E7-NHK von weiteren frühen viralen Proteinen abhängig zu sein.

2 EINLEITUNG

2.1 Charakterisierung und Klassifizierung humaner Papillomviren

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine DNA-Viren, die zusammen mit den animalen Papillomviren die Familie der Papillomaviridae bilden. Insgesamt umfasst diese Familie über 300 verschiedene Typen, von denen ca. 220 den humanen Papillomviren zugeordnet werden (<https://pave.niaid.nih.gov/> Datenbank, Stand November 2017). Papillomviren sind unbehüllt und besitzen ein im Durchmesser ungefähr 55 nm großes ikosaedrisches Kapsid. Das ca. 8000 Basenpaare große Genom liegt als doppelsträngiges, kovalent geschlossenes DNA-Molekül vor.

HPV weisen einen strikten Gewebetropismus auf. Sie infizieren ausschließlich undifferenzierte Keratinozyten in Haut und Schleimhaut und gehören zu den am häufigsten sexuell übertragbaren Viren weltweit (Fields *et al.*, 2013). Ein Großteil der HPV-Infektionen verläuft dabei asymptomatisch und das Virus wird innerhalb der ersten 24 Monate vom Immunsystem erkannt und eliminiert (Moscicki *et al.*, 2006). In ca. 10 % der Infektionen werden die Viren jedoch nicht eliminiert, was eine dauerhafte HPV-Persistenz zur Folge hat (Stanley, 2008).

Basierend auf ihrer DNA-Sequenz lassen sich HPV in fünf Genera einteilen (Alpha, Beta, Gamma, Mu und Nu), wobei die Gruppe der Alpha-Papillomviren die größte Gruppe darstellt. Sie enthält sowohl Viren mit kutanem als auch mit genitalem bzw. mukosalem Tropismus, wohingegen die übrigen Genera nur kutane Papillomviren enthalten. Die persistente HPV-Infektion von einigen wenigen Alpha-HPV-Typen ist mit der Entstehung von Oropharynx- und anogenitalen Karzinomen, insbesondere der Zervix assoziiert (Doorbar, 2006). Gebärmutterhalskrebs ist die vierthäufigste Krebsart bei Frauen weltweit. Jedes Jahr werden über 500.000 Neuerkrankungen gemeldet und ca. 260.000 Frauen sterben jährlich an der Erkrankung (<http://www.hpvcentre.net/index.php>, Stand November 2017). DNA von humanen Papillomviren kann dabei in 99,7 % aller Zervixkarzinome nachgewiesen werden, wobei es sich am häufigsten um DNA vom HPV Typ 16 handelt (50 % der Fälle), gefolgt von HPV18, 45 und 31 (Walboomers *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu sind andere Alpha-HPV-Typen (z.B. HPV6 und 11) vor allem mit der Entstehung von benignen Genitalläsionen (Feigwarzen) sowie niedriggradigen intraepithelialen Neoplasien assoziiert. Ausgehend von ihrem karzinogenen Potential werden Alpha-Papillomviren daher weiter in *High Risk* (HR-HPV) und *Low Risk* (LR-HPV) unterteilt. Die dreizehn HR-HPV-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66) wurden im Jahre 2005 von der Weltgesundheitsorganisation als Typ 1 Karzinogene für den Menschen klassifiziert (Cogliano *et al.*, 2005).

Seit dem Jahr 2006 sind verschiedene prophylaktische HPV Impfungen verfügbar, die vor der Infektion mit bestimmten HPV-Typen schützen. Die Impfstoffe bestehen aus rekombinant hergestellten L1 Proteinen der Viruskapside, welche sich zu virusähnlichen Partikeln zusammenlagern. Derzeit sind zwei verschiedene Impfstoffe erhältlich: Der bivalente Impfstoff Cervarix® (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG), welcher vor Infektionen mit den HR-HPV-Typen 16 und 18 schützt und der 2015 zugelassene nonavalente Impfstoff Gardasil® 9 (Merck & Co.), welcher vor Infektionen mit den HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58 schützt. Gardasil® 9 schützt damit vor den sieben HR-HPV-Typen, die zusammen für ca. 90 % aller Fälle von Gebärmutterhalskrebs verantwortlich sind und zusätzlich vor den LR-HPV-Typen 6 und 11, welche für ca. 90 % aller Feigwarzen verantwortlich sind. Der nonavalente Impfstoff löste 2017 den quadrivalenten Impfstoff Gardasil® (Merck & Co.) ab, welcher gegen die vier HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 gerichtet war. Die Ständige Impfkommision (STIKO) empfiehlt die Impfung bei allen Mädchen unter 18 Jahre, bzw. vor dem ersten sexuellen Kontakt, durchzuführen. Da die aktuell vorhandenen Impfungen nicht vor einer Infektion mit allen potenziellen HPV-Typen schützen, können sie jedoch die bisherigen Früherkennungsuntersuchungen nicht ersetzen.

Außer einigen Alpha-Papillomviren stehen auch Beta-Papillomviren im Verdacht mit der Entstehung von Tumoren assoziiert zu sein. Beta-Papillomviren wurden zuerst in Flachwarzen und kutanen Plattenepithelkarzinomen von Patienten mit Epidermodysplasia verruciformis (EV) identifiziert (Lentz *et al.*; Howley & Pfister, 2015). Bei Epidermodysplasia verruciformis handelt es sich um eine erbliche Hauterkrankung die sich über eine abnorme Anfälligkeit für Beta-Papillomviren äußert (Haedicke & Iftner, 2013). In 30 bis 60 % der EV-Patienten treten Plattenepithelkarzinome auf, welche sich nach 10 bis 30 Jahren aus gutartigen Hautläsionen, vor Allem an sonnenexponierten Stellen entwickeln. In diese Plattenepithelkarzinomen können mehrere Genomkopien von Beta-Papillomviren, insbesondere der Typen 5 und 8 nachgewiesen werden, wohingegen in Plattenepithelkarzinomen welche nicht mit EV assoziiert sind nur weniger als eine Genomkopien pro Zelle gefunden werden. Zusätzlich weisen Transkriptomdaten darauf hin, dass die Beta-HPV-Genome in den Karzinomen nicht aktiv sind. In aktinischen Keratosen, der Vorstufe des Plattenepithelkarzinoms, ist die virale Genomkopienzahl mit 50 pro Zelle jedoch deutlich höher, weshalb angenommen wird, dass Beta-Papillomviren nicht bei der Aufrechterhaltung sondern bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen von Bedeutung sind. Seit dem Jahre 2009 werden die Beta-Papillomviren HPV5 und 8 daher als potentiell karzinogen eingestuft (Howley & Pfister, 2015).

2.2 Genomorganisation

Alle Papillomviren enthalten ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Molekül welches ca. 8000 Basenpaare (bp) groß ist. Das virale Genom lässt sich in drei Bereiche einteilen: einen ca. 1000 bp langen nicht kodierenden Bereich (*non-coding region*, NCR) auch *upstream regulatory region* (URR), sowie kodierende Bereiche für frühe (*early*, E) und späte (*late*, L) Proteine (Abbildung 1).

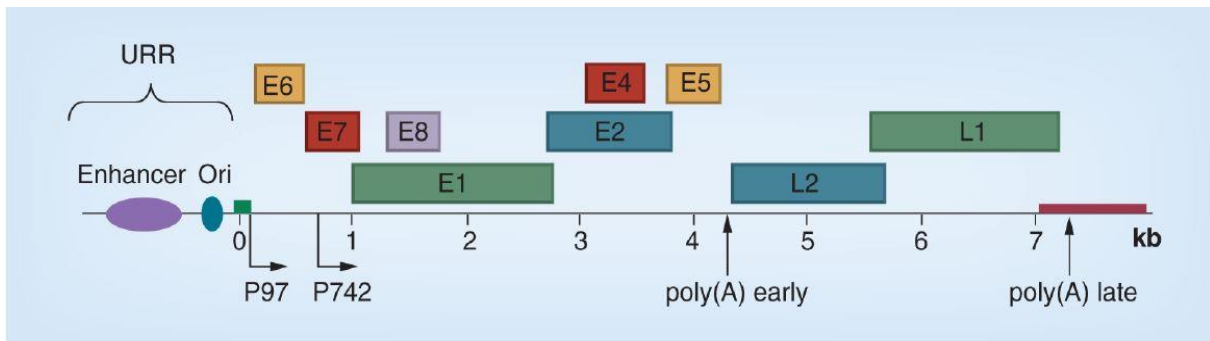


Abbildung 1: Struktur des linearisierten HPV31 Genoms. Dargestellt sind die offenen Leserahmen der frühen Region (E1-E8) und der späten Region (L1 und L2), die regulatorische Region (URR) welche den Replikationsursprung (Ori) und eine Enhancer-Region enthält sowie die Promotoren P97 und P742 und die Polyadenylierungssignale (Hong & Laimins, 2013).

Der nicht kodierende Bereich beinhaltet den viralen Replikationsursprung sowie Bindestellen für die Replikationsproteine E1 und E2. Des Weiteren befinden sich in diesem Bereich *Enhancer*-Regionen mit Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (z.B. SP1).

Der virale Replikationsursprung befindetet am 3'-Ende der URR und setzt sich aus mehreren E2-Bindestellen (E2BS) sowie einer A/T-reichen palindromischen Region zusammen. Die palindromische Sequenz enthält mehrere E1-Bindestellen (E1BS) mit der Konsensussequenz 5'-AT(A/G/T)G(C/T)(C/T)-3'. Die E1BS sind als invertierte Wiederholungen angeordnet und erlauben so die doppelte Dimerisierung des E1 Proteins am Replikationsursprung (Bergvall *et al.*, 2013).

Die frühe Region enthält offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) für die viralen Proteine E1, E2, E4, E5, E6, E7 und E8. Diese Proteine sind wichtig für die virale Replikation, Transkription und die Deregulation des Zellzyklus der infizierten Zelle. Die späte Region enthält offene Leserahmen für L1 und L2, die beiden Strukturproteine welche das Kapsid bilden. Die unterschiedlichen Regionen werden getrennt durch frühe und späte Polyadenylierungssignale (PAE bzw. PAL), welche sich am Anfang und am Ende der späten Region befinden.

Die Transkription der polycistronischen mRNA von HR-HPV wird durch zwei Hauptpromotoren reguliert, welche abhängig vom Differenzierungsstatus der Keratinozyten aktiv sind. Der früher Promotor PE (P97 bei HPV16 und 31, P105 bei HPV18) befindet sich in der URR und ist in frühen viralen Lebensphasen aktiv. Die Expression der Replikationsproteine E1 und E2 sowie die Expression der Onkoproteine E6 und E7 wird vom frühen Promotor kontrolliert. Der später Promotor PL (P670 bei HPV16, P742 bei HPV31) befindet sich im Leserahmen von E7 und wird erst in differenzierten Keratinozyten aktiviert, wodurch die Expression von den Proteinen E1^{E4}, E5, L1 und L2 initiiert wird (Hong & Laimins, 2013). Für HPV16 wurde zusätzlich ein Promotor im E1-Leserahmen identifiziert, welcher die Expression von E8^{E2} kontrolliert (Straub *et al.*, 2015).

2.3 Lebenszyklus und Replikation humaner Papillomviren

Papillomviren infizieren mehrschichtige Plattenepithelien von Haut und Schleimhaut (Abbildung 2). Der Lebenszyklus der Papillomviren ist dabei eng an die Differenzierung dieser Epithelien gekoppelt (Fields *et al.*, 2013). Bedingt durch Mikrowunden gelangen die Viren in die untere Basalschicht des Epithels und infizieren dort die Basalzellen (Doorbar *et al.*, 2012). Nach der primären Infektion werden die frühen viralen Gene exprimiert und es kommt zu einer initialen Genamplifikation, wodurch eine Etablierung der viralen Genome mit 50-100 episomalen Kopien pro Zelle erreicht wird (Stubenrauch & Laimins, 1999). Anschließend gehen die Viren in einen persistenten Zustand über, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die virale Genomkopienzahl konstant gehalten wird. Wenn sich die infizierte Zelle von der Basalmembran ablöst und in die oberen Schichten des Epithels wandert startet die terminale Differenzierung der Zelle. Mit der zunehmenden Differenzierung der Zelle beginnt auch die produktive Phase des viralen Lebenszyklus. Es kommt zu einer verstärkten Expression der frühen regulatorischen Gene und somit zu einer starken Replikation des viralen Genoms. Die Kapsidproteine L1 und L2 werden exprimiert und neue infektiöse Viruspartikel werden gebildet und in den oberen Epithelschichten frei gesetzt (Doorbar *et al.*, 2012).

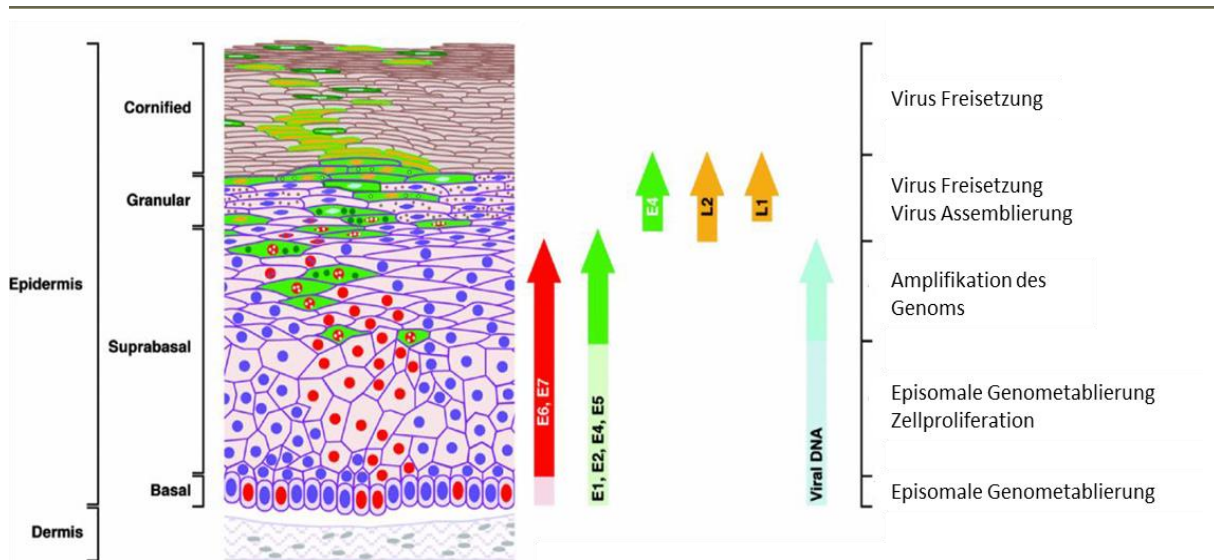


Abbildung 2: Der Lebenszyklus der Papillomviren. Dargestellt ist ein Querschnitt des Epithels der Haut mit den Schlüsselereignissen des viralen Lebenszyklus und die virale Genexpression. In den basalen Zellen und unteren Epithelschichten liegt das Virusgenom als Episom in niedrigen Kopienzahlen vor und es werden nur die frühen Gene E6 und E7 (rot) sowie E1, E2, E4 und E5 (grün) exprimiert. Mit zunehmender Differenzierung beginnt die produktive Phase des Virus mit verstärkter Genomamplifikation und Expression der späten Gene L1 und L2 (gelb). Die Freisetzung der infektiösen Partikel erfolgt in den obersten Schichten. Infizierte Zellen sind durch rote Zellkerne dargestellt. Grün dargestellte Zellen repräsentieren E4 positive Zellen, ein Marker für die produktive Lebensphase des Virus. Modifiziert nach (Doorbar, 2006).

2.4 Die Onkoproteine E6 und E7

Papillomviren besitzen außer der E1-Helikase keine eigenen Enzyme für die DNA-Replikation und sind daher auf das Replikationssystem der Wirtszelle angewiesen. Die produktive Phase des viralen Lebenszyklus findet jedoch nur in differenzierenden Keratinozyten statt, welche sich natürlicherweise während des Differenzierungsprozesses aus dem Zellzyklus zurückziehen. Die Papillomviren müssen daher die Wirtszellen dahingehend manipulieren, dass trotz Differenzierung weiterhin ein aktiver Zellzyklus aufrecht erhalten bleibt. Gleichzeitig muss sichergestellt werden, dass durch die unkontrollierte Zellteilung keine Apoptose der Wirtszelle vermittelt wird. Diese Manipulation wird über die beiden viralen Onkoproteine E6 und E7 erreicht (Bodily & Laimins, 2011). Die Expression dieser Proteine und die damit verbundene unkontrollierte Zellteilung sind daher ausschlaggebend für die Entartung der infizierten Zellen und die Entstehung von Karzinomen.

Hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus in differenzierenden Keratinozyten ist die Aktivität des viralen Onkoproteins E7. Dieses bindet an die zellulären Proteine der Retinoblastom-Familie (pRB; auch p105, p107 und p130) und inhibieren deren Funktion (Bodily & Laimins, 2011). Die Tumorsuppressorproteine sind normalerweise mit E2F-Transkriptionsfaktoren assoziiert, wodurch diese inaktiviert werden. Während der G1-Phase des Zellzyklus werden die RB Proteine durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) phosphoryliert, dadurch die E2F-Transkriptionsfaktoren frei gesetzt und daraufhin eine Vielzahl an Genen aktiviert, welche für den Übergang der Zelle in die S-Phase benötigt werden (Alberts *et al.*, 2014). Binden virale E7 Proteine an die zellulären RB Proteine werden E2F-Transkriptionsfaktoren Zellzyklus-unabhängig freigesetzt, wodurch der unkontrollierte Übergang in die S-Phase ermöglicht wird. Die E7 Proteine von HR-HPV Typen binden mit einer deutlich stärkeren Affinität an RB Proteine als die E7 Proteine von LR-HPV Typen. Weiterhin bindet E7 auch an die CDK Inhibitoren p21 und p27 welche normalerweise den Cyclin-Cdk2-Komplex inhibieren und somit den G1/S-Phasen Übergang verhindern (Helt *et al.*, 2002; Moody & Laimins, 2010).

Einer der wichtigsten und am besten untersuchten Interaktionspartner des E6 Proteins ist das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53. Das p53 Protein liegt normalerweise nur in geringer Menge und im inaktiven Zustand in der Zelle vor. Beim Auftreten einer DNA-Schädigung wird p53 jedoch durch post-translationale Modifikationen stabilisiert und vermittelt einen Zellzyklusarrest in der G1- oder der G2-Phase, welcher die Reparatur der DNA-Schäden ermöglicht. Der Zellzyklusarrest wird über die Transaktivierung von p21 vermittelt, einem Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (Alberts *et al.*, 2014). Ist eine Reparatur des DNA-Schadens nicht möglich vermittelt p53 die Initiation der Apoptose. Das virale Onkoprotein E6 bindet zusammen mit der zellulären E3-Ubiquitinligase E6AP (*E6 associated protein*) an p53 und vermittelt dessen Ubiquitinierung und dadurch dessen proteasomalen Abbau (Scheffner *et al.*, 1993). Auf diese Weise vermittelt E6 die Umgehung der Zellzyklus-Kontrollpunkte sowie der durch p53-induzierte Apoptose. Sowohl HR-HPV E6 Proteine als auch LR-HPV E6 Proteine können mit p53 interagieren, allerdings interagieren die Proteine mit unterschiedlichen Domänen des p53 Proteins. Nur die HR-HPV E6 Proteine sind dazu in der Lage an die Kernregion von p53 zu binden, was zu einer Degradierung von p53 führt (Howie *et al.*, 2009). Zusätzlich zur Degradierung von p53, welche nur durch HR-HPV E6 induziert werden kann, können weitere Mechanismen eine transkriptionelle Aktivität von p53 verhindern. So kann die Interaktion von E6 mit p53 dessen Bindung an die DNA verhindern, die Intrazelluläre Lokalisation von p53 verändern oder die post-translationale Modifikation von p53 beeinflussen. Darüber hinaus können E6 Proteine auch p53-unabhängige Apoptose-Signalwege inhibieren und die Aktivierung des Enzyms hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) induzieren. Dies ist die katalytische Untereinheit der Telomerase, welche die Verkürzung der Telomere im Laufe der Zellteilungen und somit die Seneszenz der Zellen verhindert (Howie *et al.*, 2009).

2.5 Das E1 Protein - Die virale Helikase

Das E1 Protein ist das am stärksten konservierte Protein und das einzige Enzym das von Papillomviren kodiert wird. E1 fungiert als virale Helikase, welche für die Replikation während des gesamten viralen Lebenszyklus benötigt wird. Das Protein ist, abhängig vom Virustyp, 600 bis 650 Aminosäuren groß und lässt sich in drei funktionelle Domänen einteilen: eine N-terminale regulatorische Region, eine zentrale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (DBD) und die C-terminale enzymatische Oligomerisierungsdomäne mit ATPase Aktivität (Bergvall *et al.*, 2013).



Abbildung 3: Schematische Darstellung der E1 Domänen des bovinen Papillomvirus Typ 1. Das E1 Protein besteht aus drei Domänen: die N-terminale regulatorische Region, welche das Kernlokalisierungssignal (NLS) enthält, die zentrale Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (DBD) und die C-terminale Oligomerisierungsdomäne (O) und ATPase Domäne. Modifiziert nach (Bergvall *et al.*, 2013).

Die N-terminale regulatorische Region besteht aus ungefähr 200 Aminosäuren und enthält ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS). Für die HPV Typen 11 und 31 wurde in dieser Region zusätzlich ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) lokalisiert (Deng *et al.*, 2004; Fradet-Turcotte *et al.*, 2010). Durch die Phosphorylierung des NLS und des NES über Cdk2 (*cyclin-dependent kinase 2*) kann die Lokalisation des E1 Proteins reguliert und an den Zellzyklus angepasst werden (Deng *et al.*, 2004; Fradet-Turcotte *et al.*, 2010).

E1 bindet mittels der DBD an E1-Bindestellen (E1BS) im viralen Replikationsursprung, jedoch nur mit geringer Affinität. Für die spezifische DNA-Bindung ist E1 daher auf die Interaktion mit dem E2 Protein angewiesen. E2 bindet simultan sowohl an E1 als auch an E2-Bindestellen (E2BS), welche ebenfalls im viralen Replikationsursprung vorhanden sind und bringt das E1 Protein somit in räumliche Nähe der E1BS (McBride, 2013). Nachdem E1 an die DNA gebunden hat bildet sich ein E1-Dimer aus, wodurch dessen Affinität für die spezifischen DNA-Sequenzen um das ca. 10-fache erhöht wird (Titolo *et al.*, 2003). Dabei ist es möglich, dass zwei E1 Proteine gleichzeitig an den viralen Replikationsursprung, auf unterschiedlichen Seiten der DNA binden. Über die Oligomerisierungsdomäne werden die E1-Dimere anschließend in doppelte E1-Trimere und letztlich

in doppelte Hexamere umgewandelt, wobei jedes Hexamer einen separaten DNA-Strang umschließt. Die doppelten Hexamere besitzen Helikase-Aktivitäten und entwinden die DNA ATP-abhängig (Bergvall *et al.*, 2013). Des Weiteren könne E1 Proteine zelluläre Replikationsfaktoren rekrutieren, welche für das Fortschreiten der viralen Replikation benötigt werden. Dazu zählen unter anderem die Polymerase- α /Primase, welche für die Synthese von RNA-DNA-Primern bei der Replikation zuständig ist, die DNA Topoisomerase I, welche während der Replikation die entstehende superhelikale DNA entspannt und das Replikationsprotein A, welches während der Replikation einzelsträngige DNA bindet und dadurch stabilisiert (Bergvall *et al.*, 2013).

2.6 Das regulatorische E2 Protein

Das E2 Protein verfügt über eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (bestehend aus ungefähr 200 Aminosäuren) sowie eine C-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (ca. 100 Aminosäuren groß). Über die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne kann das E2 Protein an E2-Bindestellen (E2BS), bestehend aus der spezifischen Sequenz 5'-ACCN₆GGT-3', binden. Diese liegen in mehreren Kopien vor allem in der URR des viralen Genoms vor. Beide Regionen sind über eine flexible Hinge-Region verbunden, welche in Länge und Sequenz stark zwischen verschiedenen PV Typen variiert und mit dem offenen Leserahmen des E4 Proteins überlappt (McBride, 2013).

E2 vermittelt die Initiation der viralen Replikation über die Interaktion der E2-Transaktivierungsdomäne mit dem E1 Protein. Die Initiation erfolgt dabei durch die gleichzeitige Bindung der Transaktivierungsdomänen eines E2-Dimers an zwei E1-Monomere und die Bindung der DBD an E2BS im viralen Replikationsursprung wodurch E1 an den Replikationsursprung rekrutiert wird. Nach der Bindung des E1/E2-Dimers wird E2 wieder vom Replikationsursprung entfernt und E1 wird zu einem doppelten Hexamer mit Helikase-Aktivität konvertiert (vgl. Abschnitt 2.5), (McBride, 2013).

Neben der Initiation der Replikation ist eine Hauptfunktion des E2 Proteins die Regulation der viralen Transkription. E2 rekrutiert zelluläre Proteine an die URR, was abhängig von den zellulären Proteinen und der Position der gebundenen E2BS die virale Transkription entweder aktivieren oder reprimieren kann (McBride, 2013). Über die Bindung an E2BS, welche sich proximal des Promotors befinden, reprimiert E2 den frühen viralen Promoter, der unter anderem für die Expression der beiden Onkoproteine E6 und E7 verantwortlich ist. Durch eine Mutation von E2, welche die Funktion des Proteins beeinträchtigt oder die Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom, wodurch der offene Leserahmen des E2 Proteins unterbrochen wird, kann es zu einer unkontrollierten Expression der Onkoproteine kommen, was zur malignen Entartung bei der Infektion mit HR-HPV beitragen

kann. Über die Bindung an E2BS, welche sich distal des Promoters befinden kann E2 den frühen viralen Promoter aktivieren, was jedoch nur bei geringen E2 Konzentrationen möglich ist (Thierry & Yaniv, 1987; Bernard *et al.*, 1989; Thierry & Howley, 1991).

Während der Mitose der Wirtszellen vermittelt das E2 Protein die Bindung der viralen Genome an die Wirtschromosomen. Auf diese Weise wird der korrekte Erhalt der viralen Genome während der Zellteilung sichergestellt (McBride, 2013).

2.6.1 Post-Translationale Modifikationen von E2

Für die E2 Proteine vieler Papillomvirus Typen konnte nachgewiesen werden, dass sie post-translational durch Phosphorylierung, Acetylierung oder Sumoylierung modifiziert werden.

Das BPV1 E2 Protein enthält sowohl Phosphoserine als auch Phosphothreonine, wobei die Hauptphosphorylierungsstellen an den Serinen 298 und 301 lokalisiert sind (McBride *et al.*, 1989). Diese befinden sich in der Hinge-Region des Proteins und können von der Casein 2 Kinase (CK2) phosphoryliert werden. Die Mutation dieser Serine zu Alanin (eine Aminosäure, welche nicht phosphoryliert werden kann) führt zu einer verstärkten Genomreplikation (McBride & Howley, 1991; Schuck *et al.*, 2013). Dies ist darauf zurückzuführen, dass E2 durch die Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau markiert wird (Penrose & McBride, 2000; Penrose *et al.*, 2004). Neuere Studien konnten zusätzlich zeigen, dass durch die Phosphorylierung auch die DNA-Bindungsaffinität der Proteine vermindert wird (Schuck *et al.*, 2013).

Für das HR-HPV16 E2 Protein konnten ebenfalls Phosphorylierungen in der Hinge-Region des Proteins identifiziert werden. Die Phosphorylierung des Serins 243 ist dabei wichtig für die Bindung von E2 an mitotische Wirtschromosomen und führt darüber hinaus zu einer Stabilisierung der Proteine während der S-Phase (Johansson *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2014). Des Weiteren kann das Threonin an Position 286 von Cdk2 phosphoryliert werden, die funktionelle Konsequenz dieser Modifikation ist jedoch noch nicht geklärt (Chang *et al.*, 2014).

Die Hinge-Region von HPV8 E2 weist mehrere Phosphorylierungsstellen auf (Sekhar *et al.*, 2010; Sekhar & McBride, 2012). Die Phosphorylierung des Serins 253 durch die Proteinkinase A (PKA) bewirkt eine Stabilisierung des Proteins und verstärkt dessen Bindung an das Wirtschromatin (Sekhar & McBride, 2012).

Die Funktion der E2 Proteine wird außer durch Phosphorylierungen auch durch Acetylierungen und Sumoylierungen beeinflusst. So konnte für BPV1 E2 gezeigt werden, dass die E2-abhängige Transkriptionsaktivierung durch Acetylierungen verstärkt und auch die Kernlokalisierung von E2 durch

Acetylierung moduliert wird (Quinlan *et al.*, 2013). Die Sumoylierung von HPV11, HPV16 und HPV18 E2 führt zu einer erhöhten Stabilität der Proteine (Deyrieux *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009).

2.7 Das Repressorprotein E8^{E2}

Alle Papillomviren haben das Potenzial zusätzlich zum vollständigen E2 Protein durch alternatives Spleißen eine verkürzte Variante des E2 Proteins zu kodieren (McBride, 2013). Dabei wird der kurze E8 Leserahmen über eine Spleißdonorstelle im E1 ORF an eine Spleißakzeptorstelle im E2 ORF gespleißt. Dieses, als E8^{E2} bezeichnete Protein besteht somit aus einem kurzen E8-Leserahmen und der Hinge-Region sowie der C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne des E2 Proteins. Die E8^{E2} Proteine sind wichtige Regulatoren der viralen Transkription und Replikation (Stubenrauch *et al.*, 2000; Stubenrauch *et al.*, 2001; Zobel *et al.*, 2003; Lace *et al.*, 2008; Kurg *et al.*, 2010; Sankovski *et al.*, 2014; Straub *et al.*, 2014; Isok-Paas *et al.*, 2015; Dreer *et al.*, 2016). HPV16 und HPV31 Genome, die kein E8^{E2} mehr exprimieren können (*Knock-out* Mutanten) zeigen in Kurzzeit-Analysen eine starke Erhöhung der viralen Genomkopienzahl im Vergleich zu Wildtyp Zellen (Stubenrauch *et al.*, 2000; Zobel *et al.*, 2003; Lace *et al.*, 2008). Langfristig bleiben jedoch nur HPV16 *Knock-out* Genome als extrachromosomale Moleküle erhalten, wohingegen HPV31 *Knock-out* Genome in das Wirtschromosom integrieren (Stubenrauch *et al.*, 2000; Lace *et al.*, 2008; Straub *et al.*, 2014). Die Repressionsaktivität von E8^{E2} wird von dem N-terminalen E8-Anteil des Proteins vermittelt (Stubenrauch *et al.*, 2001). Dabei sind besonders die unter Alpha-Papillomviren konservierten Aminosäuren an den Positionen fünf bis sieben (Lysin, Tryptophan, Lysin; KWK) entscheidend für die Repressionsaktivität. Durch eine Mutation dieses KWK-Motivs kann die E8-vermittelte Repression aufgehoben werden, was in Genomen zu einem Überreplikationsphänotyp führt, der vergleichbar mit dem der E8^{E2} *Knock-out* Mutanten ist (Zobel *et al.*, 2003). Über den E8-Anteil des Proteins wird auch die Interaktion mit dem zellulären NCoR/SMRT-Korepressorkomplex vermittelt. Dieser zelluläre Komplex besteht aus den Proteinen GPS2 (*G-protein pathway suppressor 2*), HDAC3 (*Histone Deacetylase 3*), NCoR (*Nuclear receptor corepressor*), SMRT (*silencing mediator of retinoic and thyroid receptors*, auch NCoR2), TBL1 (*Transducin (beta)-like 1X-linked*) und TBLR1 (*Transducin (beta)-like 1X-linked-related*) und ist für die E8-vermittelte Repression der virale Replikation sowie Transkription von entscheidender Bedeutung (Ammermann *et al.*, 2008; Powell *et al.*, 2010; Dreer *et al.*, 2016).

2.8 Zielsetzung

Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass die Aktivität der HPV E2 Proteine über post-translationale Modifikationen moduliert werden kann. Dabei wird im Besonderen die Hinge-Region der Proteine häufig von Serin-/Threonin-Kinasen phosphoryliert. Interessanterweise variiert die funktionelle Konsequenz dieser Phosphorylierungen abhängig vom Papillomvirus Typ. Während die Phosphorylierung des BPV1 E2 Proteins zu einer verstärkten Degradation und einer verminderten DNA-Bindeaktivität führt werden E2 Proteine von HPV8 und HPV16 durch die Phosphorylierung stabilisiert und die DNA-Bindeaktivität verstärkt. Das E8^{E2} Repressorprotein der Papillomviren entsteht durch alternatives Spleißen und teilt sich die C-terminale Region sowie die Hinge-Region mit den E2 Proteinen. Daher ist anzunehmen, dass auch E8^{E2} Proteine durch Phosphorylierungen post-translationally modifiziert werden. Ob dies tatsächlich der Fall ist, wurde bisher jedoch nicht geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob die E2 Proteine sowie die E8^{E2} Proteine des HR-HPV31 ebenfalls post-translationally modifiziert werden und welche Auswirkungen die etwaigen Modifikationen auf die Funktionen der Proteine haben.

Die Replikationsaktivität der viralen Proteine E1 und E2 kann in Zellkultursystemen mittels Luziferase-Reporteranalysen untersucht werden. Die Kotransfektion von E1 und E2 Proteinen sowie einem Reporterplasmid, welches den viralen Replikationsursprung enthält führt in permanenten Zelllinie (z.B. HeLa Zellen) zu einer Amplifikation des Reporterplasmids und in Folge dessen zur Zunahme der Luziferase-Aktivität. Überraschenderweise kann in primären Keratinozyten oder in davon abgeleiteten E6/E7-immortalisierten Zelllinien bei diesem Testsystem keine Zunahme der Luziferase-Aktivität gemessen werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, wodurch die Replikation des Reporterplasmids in diesen Zellen limitiert wird.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, 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.

3.1.2 Medien und Puffer

3.1.2.1 Puffer und Lösungen

Annealingpuffer 2x

200 mM Kaliumacetat, 4 mM Magnesiumacetat, 60 mM HEPES-KOH pH=7,4

Antikörper Verdünnungspuffer (Immunfluoreszenz)

PBS mit 1 % (w/v) BSA Fraction V und 0,3 % (v/v) Triton-X 100

Bindepuffer 5x (Elektromobilitäts-Shift-Analyse)

100 mM HEPES pH=7,9, 2,5 mM EDTA pH=8,0, 25 % Glycerin, 1 mM DTT

Blockingpuffer (Immunfluoreszenz)

PBS mit 5 % (v/v) normales Ziegenserum und 0,3 % (v/v) Triton-X 100

Blockingpuffer (Westernblot)

PBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver

CAPS-Transferpuffer (Westernblot)

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

DAPI-Färbelösung

0,01 µg/ml in PBS

Denhardt's 50x

1 % (w/v) Ficoll 400; 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone; 1 % (w/v) BSA Fraction V; H₂O

DNA-Ladepuffer 10x

20 % (w/v) Ficoll 400; 0,1 M Na₂EDTA pH=8,0; 1 % (w/v) SDS; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyano

Ethidiumbromidlösung 1000x

50 mg Ethidiumbromid in 100 ml H₂O

(Prä-)Hybridisierungspuffer

6x SSPE; 5x Denhardt's; 10% Dextransulfat (w/v), 50 % Formamid; 1 % SDS; H₂O

Luziferase-Lysepuffer

100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH=7,8; 1 % (v/v) Triton-X 100; 1 mM DTT

Luziferase-Reaktionspuffer

100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH=7,8; 15 mM MgSO₄; 5 mM rATP

Luziferin-Lösung

1 mM D-Luziferin (PJK) gelöst in Luziferase-Reaktionspuffer

Lysepuffer (DNA-Extraktion)

400 mM NaCl; 10 mM Tris pH=7,5, 10 mM EDTA

Lysepuffer (Immunpräzipitation)

50 mM Hepes pH=7,9; 1 mM DTT; 150 mM NaCl; 0,3 % Igepal 630 (NP40); 1x SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma); 0,3 μM PD106 (HDAC Inhibitor); 1x PhosSTOP (Roche)

Lysepuffer (Immunpräzipitation für HPV31 E8^{E2} PTM-Analysen)

50 mM Hepes pH=7,9; 1 mM DTT; 500 mM NaCl; 0,5 % Igepal 630 (NP40); 1x SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma); 0,3 μM PD106 (HDAC Inhibitor); 1x PhosSTOP (Roche)

PBS 10x

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄ pH=7,2

PBS-T

PBS Puffer + 0,1 % (v/v) TWEEN®20 (Uniqema Americas LCC)

Poly(dA-dT)

1 μg/μ gelöst in 10 mM HEPES pH=7,9 und 100 mM NaCl

Puffer A (nukleäre Extrakte)

10 mM Hepes / KOH, pH=7,9; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 1x SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma); 1x PhosSTOP (Roche)

Puffer C (nukleäre Extrakte)

20 mM Hepes / KOH, pH=7,9; 1,5 mM MgCl₂; 420 mM NaCl; 25 % (v/v) Glycerin; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 1x SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma); 1x PhosSTOP (Roche)

Sammelgelpuffer (Westernblot)

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

SDS-Laufpuffer 5x

125 mM Tris / HCl; 960 mM Glycin; 17,3 mM SDS

SDS-Probenpuffer

Roti®-Load 1, 4x (Carl Roth)

SSC 20x

3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH=7,0 (eingestellt mit HCl)

SSPE 20x

3 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M EDTA; pH=7,4 (eingestellt mit NaOH)

TAE-Puffer 50x

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

TBE-Puffer 10x

890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH=8,0

Trenngelpuffer (Western Blot)

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

Waschpuffer (PhosTag)

CAPS-Transferpuffer mit 1 mM EDTA pH=8,0

3.1.2.2 Medien für Bakterienkultur

Bakterien-Einfriermedium

65 % Glycerol; 0,1 M MgSO₄; 0,025 M Tris; pH=8,0

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

25 g LB Medium (Carl Roth) auf 1 l H₂O; bei Bedarf Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

LB-Agar (Luria-Bertani-Agar): 25 g LB Medium (Carl Roth) und 12 g Select Agar (Invitrogen) auf 1 l H₂O, bei Bedarf Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin

SOC-Medium

2 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose; pH=7,0

3.1.2.3 Medien für Zellkultur

CX-4945 (Silmitasertib; Casein Kinase 2 Inhibitor, Cayman Chemical)

Stammlösung 10 mM in DMSO

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

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

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

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

DMEM 10x ohne NaHCO₃ und Serum

1x DMEM Pulver (1 l Packung; Sigma) in 100 ml H₂O

Doxycyclin

Stammlösung 1 mg/ml gelöst in H₂O

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); 5 ng/µl epidermale Wachstumsfaktoren (EGF); 50 % DMEM + 50 % DMEM/Ham's F12 1:1; 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin; mit 5 % definiertem fötalem Kälberserum (HC-FKS; Perbio)

E-Medium-FKS

Adenin (1,8 mM); Hydrocortison (417 µg/ml); Insulin (50 µg/ml); Transferrin (50 µg/ml); Trijodthyronin T₃ (20 pM); Cholera toxin (10 nM); 5 ng/µl EGF; 50 % DMEM + 50 % DMEM/Ham's F12 1:1; 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin; mit 10 % (v/v) FKS (PAA Laboratories)

G418 (Biochrom)

Stammlösung 100 mg/ml in ddH₂O

Gentamycin (Isok-Paas *et al.*)

Stammlösung 10 mg/ml in ddH₂O

H-89 (Proteinkinase A Inhibitor; Cayman Chemical)

Stammlösung 10 mM in DMSO

Kollagen Typ 1 vom Rattenschwanz (Corning)

Stammlösung 3,59 mg/ml

KSFM (Keratinocyten-serumfreies Medium) (Gibco, Invitrogen)

Serumfreies Medium für die Kultivierung von Keratinocyten mit Rinderhypophysenextrakt und EGF als Zusatz, sowie 50 mg/l Gentamycin

Ku-55933

Stammlösung 10 mg/ml in DMSO

MG132

Stammlösung 1 mM in DMSO

Mitomycin C (Medac)

Stammlösung 4 mg/ml in PBS

OptiMEM (Gibco, Invitrogen)

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

PBS Dulbecco's (Gibco, Invitrogen)

Fertiglösung ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat

Pimelic Diphenylamide 106 (PD106; HDAC Inhibitor; Cayman Chemical)

Stammlösung 1 mM in ddH₂O

Puromycin (Calbiochem)

Stammlösung 1 mg/ml in ddH₂O

Rekonstitutionspuffer 10x

2,2 g NaHCO₃ (Sigma) und 4,77 g HEPES (Calbiochem) gelöst in 100 ml 0,05 M NaOH

SILAC-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) „Leicht“ (K0; R0)

DMEM-Medium mit leichten Aminosäuren (K0 und R0) und Zusatz von 1 % (w/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) dialysiertem fötalem Kälberserum

SILAC-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) „Medium“ (K4; R6)

DMEM-Medium mit mittelschweren Aminosäuren (K4 und R6) und Zusatz von 1 % (w/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) dialysiertem fötalem Kälberserum

SILAC-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) „Schwer“ (K8; R10)

DMEM-Medium mit schweren Aminosäuren (K8 und R10) und Zusatz von 1 % (w/v) L-Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 10 % (v/v) dialysiertem fötalem Kälberserum

Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen)

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

Versen

PBS-Fertiglösung mit 0,5 mM EDTA

3.1.3 Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien

Tabelle 1: Fertige Reaktionssysteme und Reagenzien

NAME	HERSTELLER	ANWENDUNG
DecaLabel DNA Labeling Kit	Thermo Fisher Scientific	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden
EZ1 DNA Tissue Kit	Qiagen	DNA-Extraktion
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega	Transfektion von Plasmid-DNA
Gaussia-Juice Big Kit	PJK	Messung der Gaussia Luziferase-Aktivität
LightCycler SYBR Green I Master	Roche	quantitative Real-Time PCR
Lipofectamin™ 3000 Reagenz	Thermo Fisher Scientific	Transfektion von Plasmid-DNA
Phos-Tag™ Acrylamide AAL-107	Wako Chemicals	Phos-Tag™-SDS-PAGE
QIAgen® Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmidisolation
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen	Aufreinigung von DNA-Sonden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen	DNA-Extraktion aus Gelstücken
QIAshredder® Kit	Qiagen	Homogenisierung des Zelllysats
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	Reverse Transkription, cDNA Synthese
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas	DNA-Ligation
RNEasy® Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolation
SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	Cell Signaling	Chromatin-Immunpräzipitation
SlowFade™ Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific	Fixieren von Glasplättchen auf Objektträgern
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific	Multiplex qRT-PCR

Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura® Finetek	Einbettmedium für Kryoschnitte
µMACS HA Isolation Kit	Miltenyi Biotec	HA-Immunpräzipitation

3.1.4 Marker für Gelelektrophoresen

DNA-Längenstandard:	1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Fisher Scientific)
Protein-Größenstandard:	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

3.1.5 Kleingeräte/Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Kleingeräte und Verbrauchsmaterialien

GERÄT/ MATERIAL UND BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Einweg-Skalpelle	B. Braun Biotech
Gel-Blotting-Filterpapier	Whatman
Glasbodenschälchen, 35 mm	MatTek Corporation
Kryoeinbettformen, eckig	Sakura® Finetek
Kryoröhrchen, Cellstar Cryo.s	Greiner bio-one
Magnet-Säulen µMACS® columns	Miltenyi Biotec
Nitrozellulose-Membran, Protan 0,22 µm	Whatman
Nylon-Membran, GeneScreenPlus	NEN
PCR-Reaktionsgefäße, PCR-Softtubes 0,2 ml	Biozym
Pipettenspitzen gestopft (10, 20, 200, 1000 µl), ART® Aerosol Resistant Tips	Molecular Bio Products
Pipettenspitzen: 0,5-10 µl (transparent)	Biozym®
Pipettenspitzen: 10-200 µl (gelb); 200 – 1000 µl (blau)	Greiner bio-one
Plastikpipette: 5, 10, 25, 50 ml	Becton/Dickinson
Reaktionsgefäße: 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf

Zentrifugenröhrchen: 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one
Real-Time Platten, LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
Polystyrol-Röhrchen für Bakterienkulturen, PP-Tube 14 ml steril	Greiner bio-one
Röhrchen für Bakterienstock, Cryotube 3,5 ml SI	Thermo Fisher Scientific
Röhrchen für Luziferase-Messung, 5 ml	Sarstedt
Saugfähiges Gel-Blotting Filterpapier (P-7921, 15*15)	Sigma
Sterilfilter: 0,2 µm und 0,44 µm	Millipore
SuperFrost® Objektträger	Carl Roth
Transfektionsröhrchen: 3,5 ml	Sarstedt
Zellkultureinsätze für 6 x 35 mm Zellkulturschalen, Porengröße 3 mm	Thermo Fisher Scientific
Zellkulturplatten: 24 x 10 mm, 6 x 35 mm	Nunc
Zellkulturschalen: 35 mm, 60 mm, 100 mm, 150 mm	Nunc
Zellschaber, cell lift costar®	Corning Incorporated

3.1.6 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Fermentas und New England Biolabs bezogen.

Sonstige Enzyme:

- Alkalische Phosphatase (Thermo Fisher Scientific)
- Benzonase (Novagen)
- Proteinase K (Fermentas)
- Pyrobest® DNA-Polymerase (Takara)
- RNase A (Roche)
- T4-DNA-Ligase (Fermentas)

3.1.7 Antikörper

Nachfolgend sind die, in dieser Arbeit verwendeten Antikörper angegeben.

(WB = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz, ChIP = Chromatin-Immunpräzipitation)

Tabelle 3: Primärantikörper

ANTIGEN	SPEZIES (KLONALITÄT)	HERSTELLER (BESTELLNUMMER)	EINGESETZTE VERDÜNNUNG		
			WB	IF	CHIP
Anti-Phospho-Histone 2A.X Ser139 (JBW301)	Mouse (mAb)	Millipore (# 05-636)	-	1:500	-
α -Tubulin	Mouse (mAb)	Calbiochem (CP06)	1:1000	-	-
Cytokeratin10 (DE-K10)	Mouse (mAb)	Dako (M7002)	-	1:50	-
DYKDDDDK-Tag (Flag) (9A3)	Mouse (mAb)	Cell Signaling (#8146)	1:1000	1:1600	-
HA-Tag	Rabbit (pAB)	Abcam (ab9110)	-	-	1:100
HA-Tag (6E2)	Mouse (mAb)	Cell Signaling (#2367)	1:1000	-	-
HA-Tag (C29F4)	Rabbit (mAb)	Cell Signaling (#3724)	1:1000	1:1600	-
HDAC3	Rabbit (pAB)	Cell Signaling (#2632)	1:500	-	-
Histone H3 (D2B12)	Rabbit (mAb)	Cell Signaling (#4620)	-	-	1:50
Normal Rabbit IgG	Rabbit (pAB)	Cell Signaling (#2729)	-	-	1:500
p21 (SX118)	Mouse (mAb)	BD Pharmingen (556430)	-	1:50	-
Pan-E4	Mouse (mAb)	(Griffin <i>et al.</i> , 2012)	-	1:50	-
TBL1XR1 (L-08)	Mouse (mAb)	Santa Cruz BT (SC-100908)	1:500	-	-

Tabelle 4: Fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper

ANTIGEN	QUELLE	HERSTELLER	EINGESETZTE VERDÜNNUNG	
			WB	IF
Mouse, Alexa Fluor® 555	Donkey	Life Technologies (A-31570)	-	1:2000
Mouse, Alexa Fluor® 488	Goat	Life Technologies (A-11029)	-	1:2000
Mouse, IRDye® 680RD	Goat	LiCor (926-68070)	1:15000	-
Mouse, IRDye® 800CW	Goat	LiCor (926-32210)	1:15000	-
Mouse, Fluorescent TrueBlot® DyLight™ 800 (eB144)	Rat	Rockland™ antibodies & assays (18-4517-32)	1:10000	-
Mouse, Alexa Fluor® 555	Donkey	Life Technologies (A-31570)	-	1:2000
Mouse, Alexa Fluor® 488	Goat	Life Technologies (A-11029)	-	1:2000
Rabbit, IRDye® 680RD	Goat	LiCor (926-68071)	1:15000	-
Rabbit, IRDye® 800CW	Goat	LiCor (926-32211)	1:15000	-
Rabbit, Fluorescent TrueBlot® IRDye 800® (eB182)	Mouse	Rockland™ antibodies & assays (18-3216-32)	1:10000	-

3.1.8 Eukaryotische Zellen

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

ZELLINIE	BESCHREIBUNG
HeLa	HPV18 positive Zervixkarzinom-Zelllinie
HPV31wt-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV31 Genom, welches episomal in der Zelle vorliegt.
NHK	Normale humane Keratinozyten (Ruesch <i>et al.</i> , 1998)
NIH3T3-J2	Murine Fibroblasten Zelllinie (Rheinwald & Green, 1975)

Neomycin-resistente 3T3-J2-NHP	NIH3T3-J2-Zellen mit einer Resistenz gegenüber Neomycin, Hygromycin und Puromycin (Dickson <i>et al.</i> , 2000)
HeLa pInducer 31E8 ^{E2} -HA	Stabile HeLa Zellen, welche mit dem Plasmid pInducer20 31E8 ^{E2} -HA transduziert wurden. Durch Zugabe von Doxycyclin wird die Expression von HPV31 E8 ^{E2} induziert.
RTS3b	p53-defiziente Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (Purdie <i>et al.</i> , 1993)
31E6/E7-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit HPV31 E6 und E7

Tabelle 6: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Zelllinien

ZELLINIE	BESCHREIBUNG
HPV31 E8 ^{E2} S78A-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV31 E8 ^{E2} S78A mutierten Genom.
HPV31 E8 ^{E2} S78E-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV31 E8 ^{E2} S78E mutierten Genom.
HPV31 E8 ^{E2} S81A-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV31 E8 ^{E2} S81A mutierten Genom.
HPV31 E8 ^{E2} S100A-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV31 E8 ^{E2} S100A mutierten Genom.
HPV31 E8 ^{E2} S100E-NHK	Humane Keratinozyten, immortalisiert mit dem HPV31 E8 ^{E2} S100E mutierten Genom.

3.1.9 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Clontech)

3.1.10 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Invitrogen synthetisiert. Oligonukleotide und Sonden für die Multiplex qRT-PCR wurden von Invitrogen synthetisiert bzw. als vorgefertigte Oligonukleotid-Sonden Mischung von Applied Biosystems gekauft. Oligonukleotide für die Elektromobilitäts-Shift Analysen sind am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY681 markiert.

Tabelle 7: Bezeichnung, Sequenz und Verwendungszweck der verwendeten Oligonukleotide

BEZEICHNUNG	SEQUENZ (5'-3')	VERWENDUNG
pC18 CHIP 4F	CCCCCTGAACCTGAAACATA	ChIP
pC18 CHIP 2R	CAACAGTACCGGAATGCCAAG	ChIP
E2BS pC18 DY681 F	CTAGACCGAAAACGGTCGGG	EMSA
E2BS pC18 DY681 R	CCCGACCGTTTTCGGTCTAG	EMSA
HPV31 107 EcoRI F	GCTAGTGAATTCCATGTTCAAAAATCCT	Klonierung
HPV31 1076R	GCATGAAACAATGCCTGTGCT	Klonierung
HPV31 747 EcoRI F	GCTAGTGAATTCTACACTTCGTTTG	Klonierung
HPV31 E2 S266A F	CAACAAGTTGTTGCGAGGCGACGCCGTGGAC	Klonierung
HPV31 E2 S266A R	GTCCACGGCGTCGCCTCGCAACAACCTGTTG	Klonierung
HPV31 E2 S266E F	CAACAAGTTGTTGCGAGGCGACGAAGTGGAC	Klonierung
HPV31 E2 S266E R	GTCCACTTCGTCGCCTCGCAACAACCTGTTG	Klonierung
HPV31 E2 S269E F	GTGGACGAAGTCAACTGTGGGGTTATCAGTG	Klonierung
HPV31 E2 S269E R	CACTGATAACCCACAGTTGACTTCGTCCAC	Klonierung
HPV31 E2 S288A F	AAACAAGGGCTGTCGCTTGCTCTGCAACTA	Klonierung
HPV31 E2 S288A R	TAGTTGCAGGACAAGCGACAGCCCTTGTTT	Klonierung
HPV31 E2 S288E F	AAACAAGGGCTGTCGAATGTCCTGCAACTA	Klonierung
HPV31 E2 S288E R	TAGTTGCAGGACATTTCGACAGCCCTTGTTT	Klonierung
ACTB	TaqMan Gene Expression Assay Hs03023880_g1	Multiplex
HPV31 E2 fw	GTTGTCAGTATCAAAGGCCAAAG	Multiplex
HPV31 E2 rev	CACCCTGTAGGTGCAGTTAAATA	Multiplex
HPV31 E2 Sonde	(Cy5)-ACTTGTTTGCTGCATTGTCCAGTCC-(3IAbRQSp)	Multiplex
HPV31 E6 fw	ACCGTTGTGTCCAGAAGAAA	Multiplex
HPV31 E6 rev	GGTTTCAGTACGAGGTCTTCTC	Multiplex
HPV31E6Sonde	(56-FAM)-TGGACAGGA-(ZEN)-CGTTGCATAGCATGT-(3IABkFQ)	Multiplex
CALB1 Ex4 F	AATTTCTGCTGCTCTTCCG	qRT-PCR

MATERIAL UND METHODEN

CALB1 Ex5 R	TCTATGAAGCCACTGTGGTCAG	qRT-PCR
HPV31 E6* F	AATTGTGTCTACTGCAAAGGTGTA	qRT-PCR
HPV31 508 R (E6*)	CCAACATGCTATGCAACGTC	qRT-PCR
HPV31 804 F (E1^E4)	TGTTAATGGGCTCATTGGAA	qRT-PCR
HPV31 3373 R (E1^E4)	GGTTTTGGAATTCGATGTGG	qRT-PCR
HPV31 1519 F (E1)	GTGTGTAGCTGCGTTTGGAG	qRT-PCR
HPV31 1739 R (E1)	CGTAATTTGGGTGGCTGAAT	qRT-PCR
HPV31 E2 F	CTGTTGTGGAAGGGCAAGTT	qRT-PCR
HPV31 E2 R	TCCCAGCAAAGGATATTTTCG	qRT-PCR
HPV31 1242 F (E8^E2)	ACTTCCAGACAGCGGGTATG	qRT-PCR
HPV31 3461 R (E8^E2)	GGTGGGTGTTTCTGTGCTCT	qRT-PCR
HPV31 6338 F (L1)	AATAGATCAGGCACGGTTGG	qRT-PCR
HPV31 6534 R (L1)	TTGCCCCAACAAATACCATT	qRT-PCR
IFI27 Ex2 F	TCTGGCTCTGCCGTAGTTTT	qRT-PCR
IFI27 Ex4 R	ATCTTGGCTGCTATGGAGGA	qRT-PCR
INSR Ex5 F	TCGAGGAGAGACCTTGAAAA	qRT-PCR
INSR Ex6 R	CCCTGAGTGATGGTGAGGTT	qRT-PCR
LyPD2 Ex2 F	ACGAAACCATGTGCAAGACC	qRT-PCR
LyPD2 Ex3 R	ACATCCGAGGGCTTACACTTG	qRT-PCR
PGK1 F	CTGTGGGGGTATTTGAATGG	qRT-PCR
PGK1 R	CTTCCAGGAGCTCCAAACTG	qRT-PCR
UCA1 1F	TAGTGGCTGAAGACTGATGCTG	qRT-PCR
UCA1 1R	AGCTAGGGTGTCTTCATATGGC	qRT-PCR
HPV31 4182R	TTTGGACCGCATGGTAATAAT	Sequenzierung
HPV31 5027 R	GGCAGGCCTATGTAATGCTATAAT	Sequenzierung
pBr 2772 F	TGCTTTTCTGTGACTGGTGAGT	Sequenzierung
pSG 1167 R	ACCACAAC TAGAATGCAGTGAA	Sequenzierung
pSG5 978 F	ACGTGCTGGTTATTGTGCTGT	Sequenzierung

3.1.11 Plasmide und Vektoren

pCMV-Gluc: Ein Kontrollplasmid, welches die codierende Sequenz für das Luziferase-Gen von *Gaussia princeps* unter Kontrolle des CMV-Promotors enthält (New England Biolabs).

pCMV neo 3xFlag-31E1 (Fradet-Turcotte *et al.*, 2010): Ein von pCMV-3Tag-1a (Stratagene) abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E1. Es enthält eine Codon-optimierte kodierende Sequenz für HPV31 E1 sowie drei Flag-Epitope, welche N-Terminal an E1 fusioniert sind.

pC18-SP1-Luc (Zobel *et al.*, 2003): Ein vom Luziferase-Reporterplasmid pAluc abgeleitetes Plasmid. Es enthält vier synthetische E2-Bindungsstellen und zwei synthetische SP1-Bindungsstellen 5' von der TATA-Box und dem Initiator-Element des späten Adenovirus-Hauptpromoters.

pGL31URR-Luc (Stubenrauch *et al.*, 1998): Ein von pGL3-Basic (Promega) abgeleitetes Luziferase-Reporterplasmid in dessen MluI/XhoI-Restriktionsstellen die vollständige regulatorische Region von HPV31 mit dem frühen Promotor P97 (HPV31 Nt. 7068-106) inseriert wurde.

pMOD BR HPV31 (Stubenrauch *et al.*, 2000): Ein von pBR322 abgeleiteter Vektor in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das vollständige HPV31 Genom inseriert wurde.

pmTagBFP-HPV31 E1^{E4} C-Ter (hergestellt von Giada Corradini Bartoli): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für HPV31 E1^{E4} und einen C-terminalen BFP-Tag enthält.

pSG HPV31 E5 (hergestellt von Maike Voges): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für HPV31 E5 enthält.

pmTagBFP-HPV31 E6 sm N-Ter (hergestellt von Giada Corradini Bartoli): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für ein HPV31 E6 Protein enthält, in welchem der Spleißdonor an Position 210 mutiert wurde ohne dabei die Aminosäuresequenz zu verändern. Zusätzlich befindet sich N-Terminal ein BFP-Tag.

pmTagBFP-HPV31 E7 N-Ter (hergestellt von Giada Corradini Bartoli): Ein von pmTagBFP-C1 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die kodierende Sequenz für HPV31 E7 und einen N-terminalen BFP-Tag enthält.

pSG5: Ein eukaryontes Expressionsplasmid. Die Expression des inserierten Gens steht unter Kontrolle des frühen SV40 Promotors (Stratagene).

pSG 31 E1 (Frattini & Laimins, 1994): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für HPV31 E1 enthält.

pSG 31 E8^{E2} (Stubenrauch *et al.*, 2001): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8^{E2}, welches die codierende Sequenz für HPV31 E8^{E2} (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) enthält.

pSG 31 E8^{E2}-HA (Stubenrauch *et al.*, 2007): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E8^{E2}, welches die codierende Sequenz für HPV31 E8^{E2} (HPV31 Nt. 1259-1296 und 3295-3810) sowie ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG 31 E8^{E2} KWK mt-HA (Stubenrauch *et al.*, 2007): Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid, Die Aminosäuresequenz KWK an Position 5-7 des Proteins wurden durch die Aminosäuresequenz AEA ersetzt.

pSV2 neo (Southern & Berg, 1982): Expressionsplasmid, welches eine Resistenz gegenüber G418 kodiert.

pSX 31 E2 (Stubenrauch *et al.*, 1998): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für HPV31 E2 enthält.

pSX 31 E2-HA (Stubenrauch *et al.*, 2007): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für HPV31 E2 sowie ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Plasmide hergestellt:

pMOD BR HPV31 S78A: Ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das vollständige HPV31 Genom inseriert wurde. Die Aminosäure Serin 78 im E8^{E2} Protein wurde zu Alanin mutiert. Dies führte zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz im überlappenden E4 Protein.

pMOD BR HPV31 S78E: Ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das vollständige HPV31 Genom inseriert wurde. Die Aminosäure Serin 78 im E8^{E2} Protein wurde zu Glutaminsäure mutiert. Diese Mutation verändert die Aminosäuresequenz T73/P74 im E4 Protein zu R73/S74.

pMOD BR HPV31 S81A: Ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das vollständige HPV31 Genom inseriert wurde. Die Aminosäure Serin 81 im E8^{E2} Protein wurde zu Alanin mutiert. Diese Mutation verändert die Aminosäure V77 im E4 Protein zu L77.

pMOD BR HPV31 S100A: Ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das vollständige HPV31 Genom inseriert wurde. Die Aminosäure Serin 100 im E8^{E2} Protein wurde zu Alanin mutiert. Diese Mutation verändert die Aminosäure V96 im E4 Protein zu L96.

pMOD BR HPV31 S100E: Ein von pBR322 abgeleiteter Vektor, in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das vollständige HPV31 Genom inseriert wurde. Die Aminosäure Serin 100 im E8^{E2} Protein wurde zu Glutaminsäure mutiert. Diese Mutation verändert die Aminosäure V96 im E4 Protein zu N96.

pSG 31 E1 3xFlag (Codon-optimiert): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid für HPV31 E1. Es enthält eine Codon-optimierte kodierende Sequenz für HPV31 E1 sowie drei Flag-Epitope, welche N-Terminal an E1 fusioniert sind.

pSG 31 P97/E1: Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für HPV31 E1, sowie die oberhalb des E1 Leserahmen liegende DNA-Sequenz, beginnend am P97 Promoter enthält.

pSG 31 P742/E1: Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches die codierende Sequenz für HPV31 E1, sowie die oberhalb des E1 Leserahmen liegende DNA-Sequenz, beginnend am P742 Promoter enthält.

pSG 31 E8^{E2} S78A: Ein von pSG 31 E8^{E2} abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 78 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde.

pSG 31 E8^{E2} S78A-HA: Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 78 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG 31 E8^{E2} S78E: Ein von pSG 31 E8^{E2} abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 78 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde.

pSG 31 E8^{E2} S78E-HA: Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 78 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG 31 E8^{E2} S81A: Ein von pSG 31 E8^{E2} abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 81 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde.

pSG 31 E8^{E2} S81A-HA: Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 81 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG 31 E8^{E2} S81E: Ein von pSG 31 E8^{E2} abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 81 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde.

pSG 31 E8^{E2} S81E-HA: Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 81 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG 31 E8^{E2} S100A: Ein von pSG 31 E8^{E2} abgeleitetes Expressionsplasmid, bei dem die Aminosäure Serin 100 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde.

pSG 31 E8^{E2} S100A-HA: Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 100 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG 31 E8^{E2} S100E: Ein von pSG 31 E8^{E2} abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 100 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde.

pSG 31 E8^{E2} S100E-HA: Ein von pSG 31 E8^{E2}-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 100 des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSG HPV31 E8^{E2} (1-13)-HA-(103-184): Ein von pSG5 abgeleitetes Expressionsplasmid, welches für ein E8^{E2} Protein mit deletierter Hinge-Region codiert. Zwischen den Aminosäuren des E8-Peptids

(1-13) und den Aminosäuren 103-184 des C-Terminus von E2 befindet sich ein HA-Epitop. Das Gen wurde von Life Technologies synthetisiert und in die EcoRI/BglII-Restriktionsschnittstellen von pSG5 eingefügt.

pSX 31 E2 S266A: Ein von pSX 31 E2 abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 266 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde.

pSX 31 E2 S266A-HA: Ein von pSX 31 E2-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 266 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSX 31 E2 S266E: Ein von pSX 31 E2 abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 266 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde.

pSX 31 E2 S266E-HA: Ein von pSX 31 E2-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 266 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSX 31 E2 S269A: Ein von pSX 31 E2 abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 269 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde.

pSX 31 E2 S269A-HA: Ein von pSX 31 E2-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 269 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSX 31 E2 S269E: Ein von pSX 31 E2 abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 269 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde.

pSX 31 E2 S269E-HA: Ein von pSX 31 E2-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 269 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSX 31 E2 S288A: Ein von pSX 31 E2 abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 288 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde.

pSX 31 E2 S288A-HA: Ein von pSX 31 E2-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 288 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Alanin ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

pSX 31 E2 S288E: Ein von pSX 31 E2 abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 288 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde.

pSX 31 E2 S288E-HA: Ein von pSX 31 E2-HA abgeleitetes Expressionsplasmid bei dem die Aminosäure Serin 288 des HPV31 E2 Proteins durch die Aminosäure Glutaminsäure ersetzt wurde und das zusätzlich ein HA-Epitop in der nicht konservierten Hinge-Region enthält.

3.1.12 Geräte

Tabelle 8: Geräte

GERÄT UND BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern: mini-Sub Cell GT und Wide mini-Sub Cell GT	Bio Rad
BioRobot EZ1 Workstation	Qiagen
Blotkammer, groß, Trans-Blot Cell	Biorad
CO ₂ Inkubator, C200	Labotect
Cryostat Microtome	Reichert-Jung
Durchlichtmikroskop, DM IRB	Leica
Einfrierbox, MR. FROSTY	Nalgene
Feinwaage, GJ und 770	Kern
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert M200	Zeiss
Hybridisierungsofen, mini 10	Hybaid
Inkubator (Agar-Platten), Kelvitron® T	Hereaus
Kamerasystem (Agarosegele), Gel Doc 2000	Biorad
Kamerasystem (Western Blots), LiCor Odyssey Fc mit Auswertungssoftware <i>Image Studio</i>	LiCor®
Luminometer, Lumat LB 9507	EG & G Bertold
PCR-Maschine, PCT 200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
pH-Meter, pH526	WTW
Phosphoimager, Fujifilm BAS-1800	Fuji
Photometer, ND-1000	NanoDrop®

Pipetten, Pipetman 10, 20, 200, 1000	Gilson
Pipettierhilfe, Easypet®	Eppendorf
Pipettierhilfe, pipetus®	Hirschmann Laborgeräte
Real-Time-PCR, LightCycler® 480	Roche
Reinstwasseranlage, Milli-Q UF Plus	Millipore
Schüttelinkubator, Certomat IS	B. Braun Biotech Int.
Schüttler, Rocky 3D	Perkin-Elmer
Schüttler, Thermomixer 5436 und ThermoStat Plus	Eppendorf
SDS-PAGE-Kammer, mini Trans-Blot Cell	BioRad
Sonifizierer, SonoPuls	Bandelin
Spannungsversorgung, PowerPack 200 und 300	BioRad
Sterile Werkbank, HeraSafe	Heraeus
Szintillationszähler, 1409 Liquid Scintillation Counter	Wallac
Vakuum-Absaugvorrichtung, VacuSafe	IBS
Vortexer, REAXTop	Heidolph
Wasserbad, WB 10	Memmert
Zählkammer, Neubauer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Assistent
Zentrifugen: 5810R, 5417R und 5417C	Eppendorf

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Durch eine Behandlung mit CaCl₂, RbCl₂ und MnCl₂ erhielten exponentiell wachsende *Escherichia coli* Bakterien die Fähigkeit zirkuläre Plasmid-DNA aufzunehmen (Kompetenz) (Ausubel *et al.*, 1990).

3.2.1.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterienzellen

Die Transformation kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach der Hitzeschockmethode (Ausubel *et al.*, 1990).

3.2.1.3 Kultivierung von Bakterienzellen zur Plasmidisolierung

Für die Amplifikation von Plasmiden und ihrer anschließenden Isolation wurde der Stamm DH5 α des Bakteriums *Escherichia coli* verwendet. Für die Anzucht wurden die Bakterien direkt aus dem Einfrierröhrchen in LB-Medium gegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthalten alle ein Ampicillin- oder ein Kanamycin Resistenzgen. Für die Selektion der plasmidhaltigen Stämme wurde das Flüssigmedium daher mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bzw. 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin versetzt. Für eine Plasmid-Mini-Präparation erfolgte die Anzucht in 3 ml LB-Medium. Wurden größere DNA Mengen benötigt erfolgte die Anzucht in 50 ml LB-Medium (Plasmid-Midi-Präparation) bzw. in 200 ml (Plasmid-Maxi-Präparation). Die Bakterien wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht (16-18 h) inkubiert. Für die langfristige Lagerung wurde die Bakteriensuspension mit derselben Menge Bakterien-Einfriermedium versetzt (insgesamt 1-2 ml) und bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 Zellkultur-Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zellen und Arbeiten mit Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden als Adhäsionskulturen bei 37 °C, 5 % CO₂-Sättigung und humidifizierter Atmosphäre in Plastik-Gewebekulturschalen (Nunc) kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die im Folgenden aufgeführten Volumina der Medien und Lösungen beziehen sich auf die Verwendung einer 100 mm Kulturschale. Konfluente Zellen wurden zum Passagieren mit 10 ml sterilem PBS gewaschen. Durch die Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen von den Kulturschalen abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die vereinzelt Zellen in 8 ml serumhaltigem Medium aufgenommen und in einem angemessenen Verhältnis geteilt.

NIH3T3-J2-Fibroblasten wurden in DMEM-CS (10 % CS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert und maximal im Verhältnis 1:5 geteilt.

HeLa Zellen wurden in DMEM-FKS (10 % FKS und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert und maximal im Verhältnis 1:8 geteilt.

RTS3b Zellen wurden in E-Medium-FKS (10 % FKS) kultiviert und im maximalen Verhältnis 1:6 geteilt.

Immortalisierte NHK-Zellen wurden in E-Medium zusammen mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten in Kokultur gehalten. Zum Passagieren wurden diese Zellen nach der Aufnahme in serumhaltigem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 250 x g ab zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem E-Medium aufgenommen und im maximalen Verhältnis 1:4 auf Kulturschalen mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2-Fibroblasten gesplittet.

NHK wurden in KSFM (mit EGF, BPE und 50 mg/l Gentamycin) kultiviert. Beim Passagieren der Zellen wurden diese nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA in serumhaltigem Medium aufgenommen, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 250 x g ab zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in KSFM aufgenommen, erneut für 5 min bei 250 x g ab zentrifugiert, in frischem KSFM aufgenommen und im maximalen Verhältnis 1:3 gesplittet.

3.2.2.2 Mitomycin-Behandlung von NIH3T3-J2

Um Fibroblasten für die Kokultur teilungsunfähig zu machen, wurden die Zellen mit Mitomycin C behandelt. Dies verhindert weitere Zellteilungen, indem es die Ausbildung des Spindelapparates hemmt. Dazu wurde das Medium einer zu ca. 80 % konfluenten 100 mm Kulturschale mit NIH3T3-J2-Fibroblasten abgesaugt, durch 5 ml frisches DMEM-CS (10 % CS und 50 mg/l Gentamycin) ersetzt und mit 100 µl Mitomycin C (400 µg/ml in PBS) versetzt. Die Zellen wurden für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Die nun teilungsunfähigen Zellen wurden als *Feeder*-Zellen verwendet.

3.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer 100 mm Zellkulturschale mit 2 ml Trypsin-EDTA abgelöst und nach Inaktivierung des Trypsin-EDTA durch Zugabe von serumhaltigem Medium in Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 250 x g ab zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und auf zwei Einfriereröhrchen verteilt. Mit Hilfe einer Einfrierbox wurden die Zellen langsam (1 °C/min) auf -80 °C eingefroren und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff umgesetzt. Als Einfriermedium wurde das entsprechende Kulturmedium der Zelllinie verwendet, welches mit 10 % des jeweiligen Serums (FKS, CS bzw. HC-FKS) sowie 10 % DMSO (für DMEM-CS, DMEM-FKS und KSFM) bzw. 20 % Glycerin (für E-Medium und E-Medium-FKS) versetzt wurde.

Für das Auftauen von Zellen wurde das Einfrierröhrchen bei 37 °C im Wasserbad angewärmt, die Zellsuspension anschließend in 10 ml entsprechendem Kulturmedium aufgenommen und in eine 100 mm Zellkulturschale überführt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2.2.4 Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (SILAC)

Bei der SILAC Methode handelt es sich um eine massenspektrometrische Technik, welche die Quantifizierung von Proteinen aus unterschiedlichen Zellkulturen durch die Markierung mit stabilen Isotopen ermöglicht.

Dabei werden die zu vergleichenden Zellen in Zellkulturmedien kultiviert, welche die essentiellen Aminosäuren Arginin und Lysin in verschiedenen Varianten (leicht, medium oder schwer) enthalten. Diese Aminosäuren werden in die Proteine der Zellen eingebaut, wodurch sich die Masse der Proteine verändert ohne sonstige chemische oder physikalische Eigenschaften der Proteine zu verändern (Ong *et al.*, 2002; Macek *et al.*, 2009). Um eine möglichst vollständige Markierung zu gewährleisten müssen die verwendeten Zellen für mindestens fünf Zellteilungen in den entsprechenden SILAC-Medien kultiviert werden. Für die Experimente, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden die zu markierende HeLa Zellen daher für mindesten 14 Tage in den SILAC Medien kultiviert bevor sie mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert wurden.

3.2.2.5 DNA Transfektion von Humanzellen mit einem Komplexbildner

Für die Transfektion von DNA in Humanzellen wurden einen Tag vor der Transfektion die Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgte (mit Ausnahme für die SILAC Experimente) immer mit dem Komplexbildner FuGENE HD (Promega) nach Angaben des Herstellers. In einem sterilen Polystyrol-Röhrchen (PS-Röhrchen) wurde OptiMEM mit der DNA vermischt und anschließend FuGENE HD im Verhältnis 5:2 (5 µl FuGENE auf 2 µg DNA) zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde durch Vortexen gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Indessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium der transfizierten Zellen erneut gewechselt und 48 Stunden nach Transfektion die Zellen geerntet, bzw. die entsprechende Analyse durchgeführt.

Für die SILAC Experimente wurden Zellen mit dem liposomenbasierten Komplexbildner Lipofectamin™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben transfiziert. In einem sterilen Polystyrol-Röhrchen wurde das Reagenz in dem entsprechenden SILAC-Medium verdünnt und in

einem zweiten Polystyrol-Röhrchen wurde die DNA mit dem P3000™ Reagenz in dem entsprechenden SILAC-Medium verdünnt. Die DNA wurde anschließend zum Lipofectamin™ 3000 gegeben, der Ansatz gut gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Mediumwechsel der zu transfizierenden Zellen wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet.

Die Luziferase-Reporteranalysen wurden in 24 x 10 mm Zellkulturplatten durchgeführt. Dafür wurden pro Vertiefung 30.000 HeLa oder RTS3b Zellen bzw. 40.000 immortalisierte NHK Zellen ausgesät. Die Zellen wurden (falls nicht anders angegeben) nach folgendem Schema transfiziert:

HeLa und RTS3b Zellen:

REPORTERPLASMID	E1 PLASMID	E2 PLASMID	E8^E2 PLASMID
50 ng (pGL31URR-Luc)	100 ng	10 ng	10 ng
100 ng (pC18-SP1-Luc)	-	10 ng	10 ng

Immortalisierte NHK-Zellen:

REPORTERPLASMID	E1 PLASMID	E2 PLASMID	E8^E2 PLASMID
300 ng (pGL31URR-Luc)	300 ng	30 ng	30 ng
300 ng (pC18-SP1-Luc)	-	30 ng	30 ng

Wenn nötig wurde zum Ausgleich der DNA Menge das leere Expressionsplasmid pSG5 zugegeben. Als Expressionskontrolle wurde das Expressionsplasmid pCMV-Gluc verwendet (0,5 ng pro Ansatz).

3.2.2.6 Etablierung stabiler HPV31-positiver Zelllinien

Für die Etablierung stabiler HPV31 positiver NHK Zellen wurde zunächst ein Plasmid, welches das HPV31 Genom enthält (pMod BR HPV31) mit EcoRI gespalten um das virale Genom aus dem bakteriellen Vektor frei zu setzten und anschließend die virale DNA über ein Agarosegel auf gereinigt. Nach der Elution der DNA aus dem Agarosegelen (siehe Abschnitt 3.2.4.4) wurde diese mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (10 µg/ml, Fermentas) über Nacht bei 16 °C religiert. Um die DNA zu konzentrieren, wurden am nächsten Tag 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat zu den Proben

gegeben und diese über Nacht (16-18 h) bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für eine Stunde bei 20.000 x g ab zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 50 µl H₂O resuspendiert.

Die zu transfizierenden NHK Zellen wurden in KSFM Kulturmedium auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag unter Verwendung von FuGENE HD (Promega) mit 4 µg religiertem Genom transfiziert. Außerdem wurden die Zellen mit 2 µg des Expressionsplasmids pSV2neo kotransfiziert, welcher eine Resistenz gegenüber G418 kodiert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen auf 100 mm Zellkulturschalen mit teilungsunfähigen Neomycin-resistente 3T3-J2-NHP und E-Medium überführt und weitere 24 Stunden später die Zellen mit dem Neomycin-Analogon G418 (100 µg/ml) selektioniert. Die Selektion erfolgte für ca. eine Woche, wobei an jedem zweiten Tag das Zellkulturmedium entfernt und durch frisches Medium mit zugesetztem G418 (100 µg/ml) ersetzt wurde. Als Selektionskontrolle wurden nicht infizierte NHK mitgeführt. Nach abgeschlossener Selektion wurden die Zellen in Kokultur mit teilungsunfähigen NIH3T3-J2 kultiviert.

3.2.2.7 Differenzierung von HPV31-positiven Zelllinien in organotypischen Zellkulturen

Organotypische Zellkulturen (auch *Raft* Kulturen) sind dreidimensionale Zellkulturen, welche die Untersuchung der Keratinozytendifferenzierung ermöglichen. Für die Etablierung dieser Zellkulturen wurde zuerst eine Kollagen-Fibroblasen-Matrix als dermales Äquivalent generiert. Hierfür wurden 1×10^6 NIH3T3-J2 Zellen in 300 µl 10x Rekonstitutionspuffer, 300 µl 10x DMEM und 2,4 ml Kollagen Typ 1 (vom Rattenschwanz) aufgenommen. Je 3 ml dieser Suspension wurden in Zellkultureinsätze für 6 x 35 mm Zellkulturschalen überführt, welche eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 3,0 µm besitzen (Thermo Fisher Scientific) und zur Aushärtung für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Aushärten wurden 2 ml E-Medium auf die Kollagenmatrix und 2 ml in den äußeren Rand der Schale gegeben. Nach 30 Minuten erfolgte ein Mediumwechsel. Dieser Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt.

Auf die fertige Kollagen-Fibroblasen-Matrix wurden 4×10^6 Zellen der stabilen HPV31-positiven Keratinozytenzelllinien in 2 ml E-Medium aufgebracht und für 48 Stunden kultiviert, wobei nach 24 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte. Nach 48 Stunden erreichten die Zellen die Konfluenz, was durch eine Gelbfärbung des Zellkulturmediums zu erkennen war. Die Zellkultureinsätze wurden dann aus den 6 x 35 mm Zellkulturschalen entnommen und in je eine 100 mm Zellkulturschale überführt. Das Medium auf der Kollagenmatrix wurde vollständig entfernt und nur in die äußere Zellkulturschale wurden 7 ml E-Medium ohne EGF gegeben. Die Zellen wuchsen somit an der Grenze

von Medium und Luft und wurden nur durch Diffusion des Mediums durch die Polycarbonatmembran der Zellkultureinsätze versorgt. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt und nach 12 Tagen wurden die organotypischen Zellkulturen geerntet.

3.2.2.8 Ernten der organotypischen Zellkulturen

Zum Ernten der organotypischen Zellkulturen wurden diese zusammen mit der darunterliegenden Kollagenmatrix aus den Zellkultureinsätzen herausgeschnitten und die Polycarbonatmembran entfernt. Anschließend wurde das Epithel von der Kollagenmatrix abgezogen. Das Gewebe wurde zuletzt mit einem Skalpell in kleinere Proben für die DNA-Isolation, die RNA-Isolation oder die Anfertigung von Kryoschnitten zerteilt. Für die Anfertigung der Kryoschnitte wurde das gewonnene Gewebe zweimal zusammengefaltet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in Kryoeinbettformen mit Tissue-Tek® O.C.T. Compound überführt und auf Trockeneis tiefgefroren. Die Lagerung des eingebetteten Gewebes erfolgte bei -80 °C.

3.2.3 Analysen von eukaryotischen Zellen

3.2.3.1 Luziferase-Reporteranalyse

Die Luziferase-Reporteranalysen wurden 48 Stunden nach DNA-Transfektion durchgeführt. Zunächst erfolgte die Aktivitätsmessung der Gaussia Luziferase, welche nach der Synthese sekretiert wird und daher im Überstand nachweisbar ist. Jeweils 100 µl Gaussia-Juice (Gaussia-Juice Big Kit, PJK), welcher 2 µl des Substrates Coelenterazine (CTZ) enthält, wurden in einem Luziferase-Röhrchen mit 5 µl des Zellkulturüberstandes vermischt und der Substratumsatz im Luminometer gemessen. Um die Firefly Luziferase-Aktivität zu bestimmen wurden die Zellen zweimal mit 500 µl kaltem PBS gewaschen und anschließend in 150 µl kaltem Lysepuffer für 10 min lysiert. Von diesem Lysat wurden 100 µl mit 100 µl Analysepuffer vermischt und die Luziferase-Aktivität im Luminometer bestimmt.

Für jeden Transfektionsansatz wurden Doppelwerte gemessen. Die RLU-Werte der Firefly Luziferase wurden in Relation zu den RLU-Werten der Gaussia Luziferase gesetzt (Fluc/Gluc) und anschließend die Doppelansätze gemittelt. Die auf diese Weise gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des EDV-Programmes Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet.

3.2.4 DNA-Methoden

3.2.4.1 DNA-Standardmethoden

Folgende Methoden wurden nach Protokoll gemäß (Ausubel *et al.*, 1990) durchgeführt:

- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren (Agarosegele)

3.2.4.2 Amplifikation von Gensequenzen mittels PCR

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wurden spezifische Oligonukleotide und die Pyrobest® DNA-Polymerase (Takara) aus *Pyrococcus* sp. verwendet.

Für die Amplifikation wurde folgendes Standardprotokoll des Herstellers verwendet:

Initiale Denaturierung	95 °C, 5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95 °C, 10 min	
Primerbindung	55 °C, 30 s	
Elongation	72 °C, 60 s	
Finale Elongation	72 °C, 10 s	
Ende	10 °C, ∞	

3.2.4.3 Präparative Plasmidisolierung aus Bakterienzellen

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgte mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit, dem QIAgen® Plasmid Plus Midi Kit oder dem QIAgen® Plasmid Plus Maxi Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 50-400 µl ddH₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration und Reinheit mit Hilfe des Spektralphotometers ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt.

3.2.4.4 DNA-Fragmentelution aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden unter ultraviolettem Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

3.2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation der aus Agarosegelen eluierten DNA-Fragmente mit linearisierten Vektoren erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben. Die dadurch erzeugten zirkulären Plasmide wurden anschließend in kompetente *E.coli* DH5 α transformiert.

3.2.4.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA

Die Oligonukleotidpaare wurden in dem entsprechenden Volumen ddH₂O gelöst, sodass sie in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vorlagen. Zu 25 μl 2xAnnealingpuffer wurden jeweils 12,5 μl der gelösten Oligonukleotide gegeben.

Die Hybridisierung erfolgte in einer PCR-Maschine unter folgenden Bedingungen:

95 °C, 5 min
70 °C, 10 min
0.1 °/s to 60 °C
60 °C, 10 min
0.1 °/s to 50 °C
50 °C, 10 min
0.1 °/s to 40 °C
40 °C, 10 min
0.1 °/s to 25 °C
25 °C, 10 min
0.1 °/s to 4 °C
4 °C, ∞

3.2.4.7 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC-Biotech (Nürnberg) durchgeführt.

3.2.4.8 DNA-Extraktion aus Zellen

Für Southern Blots wurde das Medium einer konfluenten 100 mm Zellkulturschale verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen anschließend in 1 ml PBS von der Zellkulturschale abgelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Bei Zellen, die mit *Feeder*-Zellen kokultiviert wurden mussten diese vor der

Ernte entfernt werden. Dazu wurden die Zellen zuerst nach dem Waschen mit PBS für 3-5 min bei 37 °C mit Versen inkubiert. Die auf diese Weise angelösten Fibroblasten konnten nun mit PBS abgewaschen werden und die zu erntenden Zellen nach zwei Waschschritten mit PBS wie oben beschrieben geerntet werden. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Proteinase K (10 mg/ml, Fermentas) und 0,2 % SDS für drei Stunden bei 55 °C inkubiert. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Die wässrige Phase wurde mit RNase A (50 µg/ml) versetzt und für eine Stunde bei 55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die zweite Phenol-Chloroform-Extraktion und die wässrige Phase wurde zuletzt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat versetzt und über Nacht (16-18 h) bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe für eine Stunde bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet, in 50 µl H₂O resuspendiert und die DNA-Konzentration und Reinheit mit dem Spektralphotometer ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt.

DNA aus organotypischen Zellkulturen für die Analyse in der Multiplex qRT-PCR wurde mit dem EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen) isoliert. Dafür wurden das Gewebe zunächst mit 190 µl Proteinase K Puffer sowie 10 µl Proteinase K versetzt und über Nacht bei 65 °C im Schüttler inkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe der BioRobot EZ1 Workstation und dem dazugehörigen EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.2.4.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde das HPV31wt-Genom aus dem Plasmid pMod BR HPV31 als Template benutzt. Die durch EcoRI linearisierte DNA wurde mit Hilfe des DecaLabel DNA Labeling Kits (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Dabei erfolgte nach einem ersten Denaturierungsschritt die Markierung durch eine Auffüllreaktion mit α -³²P-dCTP und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli*. Die DNA-Sonden wurden anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit folgenden Änderungen: Es wurden 5 Volumen Puffer PNI zu den Proben gegeben und die Elution erfolgte in 150 µl Puffer EB. Die Aktivität der Sonde wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt.

3.2.4.10 Southern Blot

Jeweils 15 µg der entsprechenden Proben wurden für drei Stunden bei 37 °C mit HindIII (linearisiert das virale Genom) oder mit NotI (schneidet das virale Genom nicht) verdaut. Die verdauten Proben

wurden auf ein 0,7 %iges Agarosegel mit 5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und bei 70 Volt für ca. drei Stunden aufgetrennt. Als Längenstandards wurden der λ-HindIII-Marker und 100 pg des linearisierten HPV31wt-Genoms aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel für 30 min in 0,25 M HCl geschüttelt (Depurinierungsschritt) und anschließend mit ddH₂O gewaschen. Die Nylonmembran (GeneScreenPlus, PerkinElmer) wurde zunächst mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 15 min in 0,4 M NaOH äquilibriert. Für den Transfer wurde eine Wanne mit Transferpuffer (0,4 M NaOH) befüllt. Als Unterlage für den Transferaufbau diente eine Platte, welche auf die Wanne mit Transferpuffer gelegt wurde. Auf die Platte wurden zwei mit NaOH befeuchtete Gel-Blotting Filterpapiere gelegt. Die Enden der Filterpapiere hingen dabei in den Transferpuffer. Auf diese Filterpapiere wurden zwei weitere befeuchtete Filterpapiere gelegt und auf diese wurde zunächst das Agarosegel und dann die äquilibrierte Membran gelegt und zuletzt zwei weitere befeuchtete Gel-Blotting Filterpapiere. Der Transferaufbau wurde mit einer Plastikpipette luftblasenfrei ausgerollt. Auf den Transferaufbau wurden zum Schluss zehn saugfähige Gel-Blotting-Papiere und eine Lage Zellstoff gelegt. Zum Beschweren wurde auf den Zellstoff eine gefüllte 500 ml Glasflasche gestellt. Die DNA wurde über Nacht transferiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst zweimal mit 2x SSC gewaschen und für zwei Stunden bei 80 °C in einem Wärmeschrank getrocknet (Fixierung der DNA). Für die Prähybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre für eine Stunde im Hybridisierungsöfen bei 42 °C mit 10 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung und 200 µl Lachssperma-DNA inkubiert. Die Lachssperma-DNA wurde dabei zunächst für 10 min bei 95 °C hitzedenaturiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Während der Prähybridisierung wurde die DNA-Sonde radioaktiv markiert, mit 200 µl Lachssperma-DNA gemischt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Die Prähybridisierungslösung wurde nach eine Stunde verworfen und durch 10 ml frische Hybridisierungslösung, versetzt mit der denaturierten Sonde, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung verworfen und die Membran 60 min mit 2x SSC mit 1 % SDS bei Raumtemperatur und zweimal für 45 min mit 0,2x SSC mit 1 % SDS bei 50 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen, luftgetrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt und die hybridisierte Sonde mit einem Phosphoimager detektiert.

3.2.4.11 Multiplex qRT-PCR

Die Multiplex qRT-PCR ermöglicht die simultane Bestimmung von HPV31E2, HPV31E6 und des Referenzgens Beta-Aktin in einem Reaktionsansatz. Die Reaktion wurde nach folgendem Schema in einer LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 (Roche) angesetzt:

- 10 µl Fast Advanced Mastermix (10x)
- 3 µl Oligonukleotid-Sonden Mischung (jeweils 4 µM)
- 5 µl H₂O
- 2 µl DNA (10 ng/µl)

Die Analyse erfolgte unter folgenden Bedingungen im LightCycler® 480:

Initialer Aktivierungsschritt:	95 °C, 15 min	
2-Schritt Zyklus:	56 °C, 10 s	} 45 Zyklen
	72 °C, 5 s (Messung)	

Die Farbkompensation für die Farbstoffe VIC, Cy5 und FAM wurde bereits zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt (Manawapat-Klopfer, 2013) und abgespeichert und konnte daher für alle Multiplex qRT-PCR Experimente angewandt werden. Um die Effizienz der Oligonukleotid-Sonden Paare zu ermitteln, wurden Verdünnungsreihen eines Plasmids mit dem HPV31 Genom (pMod BR HPV31, 10⁷ Kopien - 1 Kopie in 1:10 Verdünnungsschritten) und DNA humaner primärer Keratinozyten (20 ng/µl - 2 pg/µl DNA in 1:2 Verdünnungsschritten) hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden mit den drei Oligonukleotid-Sonden Paaren gemessen. Die ermittelte Standardkurve wurde abgespeichert und konnte durch das Mitführen eines Kalibrators auf sämtliche Multiplex-Experimente angewendet werden. Die Proben wurden jeweils in Duplikaten gemessen. Die Messung des Referenzgens Beta-Aktin ermöglichte es die absolute Zellzahl pro µl Probe zu berechnen. Dazu wurde die Menge an genomischer DNA (ng) in der Probe durch das Gewicht eines Genom Äquivalents (6,6 pg/Zelle) geteilt. Die Viruslast in der Probe wurde als die Anzahl der HPV31 E2 Kopien pro Zelle berechnet. Die auf diese Weise gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des EDV-Programmes Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet.

3.2.5 RNA-Methoden

3.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Der Lysepuffer RLT wurde nach Entfernen des Mediums direkt auf die Zellen gegeben bzw. für die RNA Isolierung aus organotypischen Zellkulturen wurden das Gewebe in 350 µl Lysepuffer RLT gegeben. Anschließend wurde das Lysat mit Hilfe des QIAshredder® Kits (Qiagen) homogenisiert. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration und Reinheit mit dem Spektralphotometer ND-1000 (Nanodrop®) bestimmt. Die Isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.5.2 Synthese von copy-DNA

Die isolierte Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Insgesamt wurden 1000 ng Gesamt-RNA umgeschrieben und nach abgeschlossener Reaktion wurde das Volumen mit 180 µl ddH₂O auf 200 µl aufgefüllt, so dass sich eine Endkonzentration von 5 ng/µl cDNA ergab.

3.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) wurde im LightCycler® 480 mit dem Master Mix LightCycler® SYBR Green Master I (Roche) durchgeführt. SYBR Green interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffes verstärkt wird. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende der Elongationsphase statt und ermöglicht die Quantifizierung des entstehenden PCR-Produkts. Pro Reaktionsansatz wurde 15 µl Mastermix auf einer LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 (Roche) vorgelegt:

- 10 µl SYBR Green Master I
- 2 µl Primer Forward
- 2 µl Primer Reverse
- 1 µl H₂O

Anschließend wurden 5 µl (25 ng) der entsprechenden cDNA zu dem Mastermix pipettiert, die Platte mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und für 5 min bei 2000 x g und 4 °C ab zentrifugiert.

Die Analyse erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Initiale Denaturierung	95 °C, 10 min	
Denaturierung	95 °C, 10 s	} 45 Zyklen
Primerbindung	55 °C, 15 s	
Amplifikation	72 °C, 15 s	
Schmelzkurve	95 °C, 10 s	
	65 °C, 30 s	
	90 °C	
Ende	∞, 4 °C	

Mit der zugehörigen Software des LightCycler® 480 konnte nach der PCR der CP-Wert (Crossing Point) für jeden Reaktionsansatz ermittelt werden. Der CP-Wert entspricht dabei dem Zyklus, bei dem sich die Fluoreszenz erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Alle cDNAs wurden in Duplikaten gemessen um methodisch bedingte Schwankungen auszugleichen. Zusätzlich

zum Zielgen wurde auch ein konstant exprimiertes Referenzgen (PGK1) mitgemessen. Die Expression des Zielgens wurde stets auf die Expression des Referenzgens normiert, um verschiedene Proben und Experimente vergleichen zu können.

Die Berechnung der relativen mRNA-Expression des Zielgens erfolgte nach dem Modell von Pfaffl (Pfaffl, 2001):

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

Die auf diese Weise gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des EDV-Programmes Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet.

3.2.5.4 Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse wurden von der *Core Facility* für Angewandte Transkriptomik und Genomik der Universität Tübingen durchgeführt; die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch das Zentrum für Quantitative Biologie der Universität Tübingen.

Beschreibung des Zentrums für Quantitative Biologie der Universität Tübingen:

“Die *RNA-Seq libraries* wurden mit dem TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina Inc.) nach Herstellerangaben angefertigt. Die Qualität und Konzentration der RNA in jeder Library wurde mittels Qubit und einem *Bioanalyzer* (Agilent) gemessen. Dabei hatten alle Proben einen RIN-Wert von >7. Die Proben wurden mit Hilfe eines HiSeq2500 Systems (Illumina Inc.) mit einem Ausgangsformat von 125 bp paired-end Reads sequenziert. Die Qualität der Rohwerte wurde mit Hilfe von FastQC (Version V0.11.4) bewertet und mit der Cutadapt Software (Version 1.8.3) die Illumina Adaptersequenzen und Basen niedriger Qualität getrimmt (Martin, 2012). Die bearbeiteten *Reads* wurden anschließend mit der Tophat2 Software (Version 2.1.1) und den Standardoptionen mit dem humanen Referenzgenom (Version hg19) abgeglichen (Kim *et al.*, 2013). Mit Hilfe von HTSeq (Version 0.6.0) wurden die *Reads*, welche eine Sequenzübereinstimmung mit Genen oder Exons aufwiesen gezählt (Anders *et al.*, 2015), indem der „union“ Modus für die „Gene-ID“ Funktionen ausgewählt wurde. Um unterschiedlich exprimierte Gene zu identifizieren wurde das R Paket DESeq2 (Version 1.10.1) verwendet (Love *et al.*, 2014). R Standard Pakete (Version 3.2.1) und ggplot2 wurden verwendet um Abbildungen zu generieren.“

3.2.6 Proteinbiochemische Methoden

3.2.6.1 Gesamtproteinextraktion aus eukaryotischen Zellen

Für die Gesamtproteinextraktion wurde zunächst das Kulturmedium der Zellen verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber die Zellen in 1 ml PBS von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Roti®-Load 1 (4x, Carl Roth) gelöst und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurde die Probe für 15 s mit dem Sonifizierer SonoPuls (Bandelin) sonifiziert um die DNA zu zerkleinern. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinextrakte wurden in eindimensionalen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). In Abhängigkeit von der Größe der zu detektierenden Proteine wurden für die Trenngele Acrylamidkonzentrationen von 8-12 % verwendet. Nach Zugabe des Polymerisationsstarters Ammoniumpersulfat wurde die Trenngellösung zwischen zwei vertikale Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, mit Wasser nachgewaschen und eine 4 % Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben. Als Protein-Größenmarker wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific verwendet). Die Gelelektrophorese erfolgte in 1x SDS-Puffer für 45-60 min bei einer Spannung von 200 Volt.

3.2.6.3 Phosphat-Affinitätselektrophorese (Phos-Tag™ SDS-PAGE)

Der Phosphorylierungsstatus viraler Proteine wurde mittels Phosphat-Affinitätselektrophorese (Mn²⁺-Phos-Tag™ SDS-PAGE) analysiert (Kinoshita *et al.*, 2006). Dazu wurde MnCl₂ (Endkonzentration 100 µM) sowie das funktionelle Molekül Phos-Tag™ (Endkonzentration 50 µM) in die Polyacrylamidmatrix eines Trenngels ein polymerisiert. Da phosphorylierte Proteine mit diesem Phos-Tag™ interagieren, verringert sich ihre Migrationsgeschwindigkeit und man erhält eine Trennung der phosphorylierten von der nicht phosphorylierten Form. Um eine optimale Auftrennung zu erzielen erfolgte die Gelelektrophorese bei einer maximalen Spannung von 120 V. Für den nachfolgenden Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mussten zunächst die Mangan-Ionen aus dem Gel entfernt werden. Dazu wurde dieses zunächst in CAPS-Transferpuffer mit 1 mM EDTA für 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 10 min in CAPS-Transferpuffer ohne EDTA gewaschen.

3.2.6.4 Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Für den immunologischen Nachweis der Proteine nach der SDS-PAGE oder dem Phos-Tag wurden die Proteine zunächst im Tank-Blot Verfahren (Western Blot) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zunächst wurden vier Gel-Blotting Filterpapiere (Whatman) und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Trenngels (6 cm x 9 cm) zurechtgeschnitten und in CAPS-Transferpuffer äquilibriert. Eine zweilagige Schicht aus Filterpapier wurde auf die Kathode der Transferapparatur gelegt. Darauf wurde erst das Trenngel, dann die Membran und abschließend zwei weitere Filterpapiere gelegt und der Aufbau mit einem Zentrifugenröhrchen luftblasenfrei ausgerollt. Der Transfer der Proteine erfolgte in CAPS-Transferpuffer in einer gekühlten Blot-Transfer-Kammer bei einer konstanten Spannung von 90 Volt.

3.2.6.5 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine

Die auf eine Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden mit Hilfe von proteinspezifischen Primärantikörpern sowie mit gegen die Primärantikörper gerichtete, Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen. Zuerst wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockingpuffer inkubiert um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden proteinspezifischen Primärantikörper in PBS-T über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper in PBS-T inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in PBS-T erfolgte die Detektion der Proteine mit dem LiCor® Odyssey Fc und der dazugehörigen Auswertungssoftware *Image Studios*. Um die Ergebnisse quantifizieren zu können wurde bei jedem Westernlot auch eine Ladekontrolle detektiert. Dafür wurde in dieser Arbeit das Protein α -Tubulin detektiert, welches in konstanter Menge in Zellen vorhanden ist und daher zur Normalisierung verwendet werden kann. Alle Waschschritte und Inkubationen wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

3.2.6.6 Herstellung nukleärer Extrakte für Elektromobilitäts-Shift-Analyse

Die Extraktion nukleärer Proteine für Elektromobilitäts-Shift-Analyse erfolgte nach (Andrews & Faller, 1991). Die Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 20 s bei 20.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 400 μ l kaltem Puffer A resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 s auf einem Vortexer

geschüttelt und für 10 s bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet je nach Größe in 30-100 µl Puffer C resuspendiert und die Probe für 20 min auf Eis inkubiert (Hochsalz-Extraktion). Nach einer zwei minütigen Zentrifugation bei 20.000 x g und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.2.6.7 Elektromobilitäts-Shift-Analyse (EMSA)

Zur Analyse der Protein-DNA-Interaktionen *in vitro* wurden Elektromobilitäts-Shift-Analysen durchgeführt. Hierzu wird ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid mit dem zu analysierenden Protein inkubiert und die Protein-DNA-Komplexe in einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Neben einem Fluoreszenzsignal des nicht gebundenen Oligonukleotids tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine weitere Bande mit verändertem Laufverhalten auf (*Shift*).

Für Elektromobilitäts-Shift-Analysen wurden 3×10^5 HeLa Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 Stunden mit dem Expressionsplasmid für das zu untersuchende Protein transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden aus den Zellen nukleäre Proteine extrahiert (Abschnitt 3.2.6.6). Zwei komplementäre Oligonukleotide, welche die zu untersuchende Bindungsstelle enthalten und am 5'-Ende mit dem Farbstoff DY681 markiert sind wurden miteinander hybridisiert (Abschnitt 3.2.4.6) und anschließend mit H₂O auf eine Endkonzentration von 40 fmol/µl eingestellt. Anschließend erfolgte die Bindungsreaktion des fluoreszenzmarkierter DNA-Doppelstrang-Oligonukleotid mit den nukleären Proteinen nach folgendem Schema:

2 µl 5x Bindepuffer
0,5 µl Poly(dA-dT) (1 µg/µl)
2,5 µl H₂O
3 µl nukleärer Extrakt
1 µl Oligonukleotid

Der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend direkt auf ein natives 4 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen, welches bereits für 30 min bei 100 V und 4 °C vorgelaufen lassen wurde. Nach Auftragen der Proben wurde das Gel unter denselben Bedingungen für weitere 45 min laufen gelassen und anschließend mit dem LiCor® Odyssey Fc und der dazugehörigen Auswertungssoftware *Image Studios* analysiert.

3.2.6.8 (Ko-) Immunpräzipitation

Zur Analyse möglicher Bindungspartner oder post-translationaler Modifikationen (PTM) der viralen Proteine wurden (Ko-) Immunpräzipitationen in HeLa bzw. HeLa pInducer 31E8^ΔE2-HA Zellen

durchgeführt. Für PTM-Analysen von HPV31E2 wurden ca. 5×10^7 HeLa Zellen (20x 150 mm Zellkulturschalen), für PTM-Analysen von HPV31 E8^{E2} ca. $2,25 \times 10^8$ HeLa pInducer 31E8^{E2}-HA Zellen (90x 150 mm Schalen), für die Analyse möglicher Bindungspartner mittels Western Blot ca. 5×10^6 HeLa Zellen (2x 150 mm Schalen) und für die SILAC Massenspektrometrie ca. $7,5 \times 10^6$ zuvor markierte HeLa Zellen (3x 150 mm Zellkulturschalen) ausgesät. HeLa Zellen wurden 24 Stunden nach dem Aussäen transfiziert, HeLa pInducer 31E8^{E2}-HA Zellen bei Erreichen der Konfluenz mit Doxycyclin (1 µg/ml) induziert. Vierundzwanzig Stunden nach Doxycyclin-Induktion bzw. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zweimal in jeweils 5 ml PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers in 3 ml PBS abgeschabt und für 5 min bei 500 x g und 4°C ab zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem entsprechenden Lysepuffer (250 µl pro verwendeter 150 mm Zellkulturschale) mit zugesetzter Benzonase (250 U, Novagen) für 30 min bei 4 °C in einem Überkopffrotator lysiert. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurden 10 % des Lysats abgenommen, direkt mit Roti[®]-Load 1 (4x, Carl Roth) versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht ($\hat{=}$ Input; IN). Das restliche Lysat wurde mit anti-HA Beads (10 µl pro verwendeter 150 mm Zellkulturschale) von Miltenyi Biotech versetzt und für zwei Stunden bei 4 °C in einem Überkopffrotator inkubiert. Das Zelllysate-Bead-Gemisch wurde nach der Inkubation auf eine µMACS[®] column (Miltenyi Biotech) Säule gegeben, welche zuvor mit 500 µl Lysepuffer äquilibriert wurde. Nachfolgend wurde die Säule 2x mit 1 ml Lysepuffer gewaschen. Alle Schritte wurden dabei bei 4 °C durchgeführt. Die gebundenen Proteine wurden mit Roti[®]-Load 1 (4x, Carl Roth) von den Beads eluiert, anschließend für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und die Eluate entweder mittels Massenspektrometrie analysiert oder zusammen mit dem Input mittels Western Blot auf die Anwesenheit der entsprechenden Interaktionspartner untersucht.

3.2.6.9 Verdau von Proteinen für die Proteom-Analyse

Beschreibung und Ausführung durch das *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen*:

„Die Proteinproben wurden auf ein SDS-PAGE Gel geladen und nach dem Lauf Coomassie gefärbt. Die Coomassie gefärbten Gelstücke wurden wie zuvor beschrieben verdaut (Burian *et al.*, 2015). Die extrahierten Peptide wurden mit *C18 Stage tips* entsalzen und mittels LC-MS/MS analysiert.“

3.2.6.10 LC-MS/MS Analyse

Beschreibung und Ausführung durch das *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen*:

„Die LC-MS/MS Analysen wurden mit Hilfe einer EasyLC nano-HPLC (Proxeon Biosystems), gekoppelt an einen LTQ Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Auftrennung der Peptid-Gemische erfolgte auf einem 15 cm Quarzglas Emitter mit 75 µm inneren Durchmessern (Proxeon Biosystems), auf welchem hausintern Reversed-Phase-Kieselgel ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm (Dr. Maisch GmbH) aufgebracht wurde. Die Peptide wurden mit einer Durchflussrate von 500 nl/min in Lösung A (0,5 % Essigsäure) in die Trennsäule eingebracht und mit einer Durchflussrate von 200 nl/min aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte mittels eines linearem 60 min Gradienten von 5-33 % Lösung B (80 % Acetonitril in 0,5 % Essigsäure). Der LTQ Orbitrap Elite wurde im positiven Ionenmodus betrieben. Die Erfassung der Übersichtsspektren erfolgte in einem Bereich von m/z 300 bis 2000 in einem *Orbitrap Mass Analyzer* mit einer Auflösung von 120.000. Die 15 oder 20 intensivsten Ionen wurden sequentiell isoliert. Hochauflösende HCD MS/MS Spektren wurden mit einer Auflösung von 15.000 und einem Zielwert von 40.000 erfasst. Die normalisierte Kollisionsenergie wurde auf 35, die Aktivierungszeit auf 0,1 Milisekunden und die erste Masse auf 120 Th eingestellt. Die fragmentierten Massen wurden nach MS/MS für 60 Sekunden ausgeschlossen. Die Zielwerte betragen 10⁶ Ladungen für den MS-Prüfmodus und 5000 Ladungen für den MS/MS Prüfstand mit einer Laufzeit von 100 Milisekunden bzw. 150 Milisekunden.“

3.2.6.11 MS Daten Verarbeitung und Analyse

Beschreibung und Ausführung durch das *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen*:

„Die MS Daten wurden mit dem MaxQuant Software Paket (Version 1.2.2.9) prozessiert (Cox & Mann, 2008). Die Datenbank Suche wurde mit der, im MaxQuant integrierten, Andromeda Suchmaschine durchgeführt (Cox *et al.*, 2011). Die Datenbank Suche wurde mit einer von „Uniprot“ abgerufenen, humanen Datenbank (Taxonomienummer 9606) durchgeführt, welche 91646 Proteine und 285 häufig auftretende Laborkontaminanten beinhaltet. Zusätzlich wurde eine HPV Datenbank und Datenbanken für die Tag-Sequenzen verwendet. Die Endoprotease Trypsin wurde als Protease definiert und maximal zwei fehlende Schnitte toleriert. Die Oxidation und N-terminale Acetylierung von Methioninen sowie Acetylierung (K) und Phosphorylierung (STY) wurden als variable Modifikationen spezifiziert. Die maximale Massentoleranz wurde auf sechs ppm festgelegt. Carbamidomethylierung von Cysteinen wurde als feste Modifikation definiert. Requantifizierung wurde aktiviert. Es wurden nur Peptide verwendet, bei denen die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen, falschen Zuordnung bei bzw. unter einem Prozent lag.“

3.2.6.12 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Experimente wurden 1×10^7 HeLa Zellen auf 150 mm Zellkulturschalen ausgesät ($2,5 \times 10^6$ Zellen je Schale) und nach 24 Stunden transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde die Chromatin-Immunpräzipitation mit dem SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads, Cell Signaling) nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurden 4 μ l anstatt 5 μ l Mikrokokken Nuklease für den Verdau des Chromatins verwendet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die präzipitierte DNA wurde in einer qRT-PCR gemessen und die Signalanreicherung für den anti-HA Antikörper relativ auf die Positivkontrolle H3 bezogen. Die auf diese Weise gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des EDV-Programmes Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet.

3.2.6.13 Anfertigung von Kryoschnitten

Die eingefrorenen Gewebe (vgl. Abschnitt 3.2.2.8) wurden mit einem gekühlten Cryostat Microtome (Reichert-Jung) geschnitten. Die 6 μ m dicke Schnitte wurden auf einen SuperFrost® Objektträger (Carl Roth) aufgenommen und die Objektträger zum Fixieren der Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur in PBS mit 4 % Paraformaldehyd inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe entwässert (50 %, 75 %, 100 %, jeweils fünf Minuten Inkubation). Die Schnitte wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.6.14 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von Proteinen

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen entweder auf Glasplättchen in einer 6x 35 mm Zellkulturplatten (HeLa Zellen) oder in 35 mm Glasbodenschälchen (MatTek, immortalisierte Keratinozyten) ausgesät und nach 24 Stunden transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen zwei Mal in PBS gewaschen und anschließend mit einem 1:1 (v/v) Gemisch aus Methanol und Aceton für 2 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden erneut dreimal in PBS gewaschen und mit einem proteinspezifischen Primärantikörper in PBS mit 3 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-T wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen und die Zellen mit einer DAPI-Färbelösung (0,01 μ g/ml in PBS) für 20 Sekunden gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurden die Glasplättchen mit SlowFade™ Gold Antifade Mountant (Thermo

Fisher Scientific) auf Objektträgern fixiert, bzw. die Zellen in den Glasbodenschälchen in 1 ml PBS direkt mikroskopiert.

Für die indirekte Immunfluoreszenz der Kryoschnitte wurden diese zunächst für eine Stunde in Blockingpuffer inkubiert. Die Primärantikörper wurden in Antikörper-Verdünnungspuffer angesetzt und mit den Schnitten bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach einem Waschritt mit PBS wurden die Schnitte mit Fluorophor-gekoppelte Sekundärantikörpern (angesetzt in Antikörper-Verdünnungspuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden erneut gewaschen, mit der DAPI-Färbelösung (0,01 µg/ml in PBS) für 20 s inkubiert und mit SlowFade™ Gold Antifade Mountant ein gedeckelt.

Die Aufnahmen wurden mit einer 200-fachen Vergrößerung (Kryoschnitte) bzw. mit einer 630-fachen Vergrößerung an einem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop in Kombination mit einem Zeiss ApoTome gemacht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2}

4.1.1 Massenspektrometrische Analyse von HPV31 E8^{E2} und E2

Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die E2 Proteine von Papillomviren post-translational modifiziert werden, und dass diese Modifikationen Auswirkungen auf die Aktivität der Proteine haben. Für das E2 Protein vom bovinen Papillomvirus 1 (BPV1) konnten die beiden Hauptphosphorylierungsstellen S298 und S301 identifiziert werden, welche sich beide in der Hinge-Region des Proteins befinden (McBride *et al.*, 1989). Auch für die humanen Papillomvirus Typen 8 und 16 konnten Phosphorylierungen in der Hinge-Region der E2 Proteine lokalisiert werden (Johansson *et al.*, 2009; Sekhar *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2014).

Um die Frage zu beantworten, ob auch die E2 sowie E8^{E2} Proteine des Hochrisiko-Typ HPV31 post-translational modifiziert werden, wurden zunächst massenspektrometrische Analysen in Kooperation mit dem *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen* durchgeführt. Für die Analyse des Phosphorylierungsstatus der HPV31 E8^{E2} Proteine wurde eine HeLa basierte Zelllinie verwendet, in welcher die Expression des HA-markierten HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Zugabe von Doxycyclin induziert werden kann (HeLa pInducer 31E8^{E2}-HA Zellen). Sechzehn Stunden nach Induktion wurden die Zelllysate mit magnetischen anti-HA Beads präzipitiert und das Präzipitat anschließend massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden in einem ersten Experimente die Peptide durch einen Trypsinverdau generiert, wodurch eine Sequenzabdeckung von 68 % erreicht werden konnte. In diesem Experiment wurden Phosphorylierungen an den Serinen 78 (S78) und 81 (S81) identifiziert. Um die Sequenzabdeckung im nachfolgenden Experiment zu erhöhen, wurden die Proteine zusätzlich zum Verdau mit Trypsin auch mit LysC verdaut, was in einer Sequenzabdeckung von 94 % resultierte. In diesem Experiment konnten die beiden Phosphorylierungen an den Serinen 78 und 81 bestätigt werden und zusätzlich eine weitere Phosphorylierung an dem Serin 100 (S100) identifiziert werden (Abbildung 4A).

Um den Phosphorylierungsstatus von HPV31 E2 Proteinen zu untersuchen wurden HeLa Zellen mit dem Expressionsplasmid für HA-markiertes HPV31 E2 transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und E2 mit magnetischen anti-HA Beads präzipitiert. In einem ersten Experiment wurden die Proteine für die anschließende massenspektrometrische Analyse mit Trypsin verdaut, was in einer Sequenzabdeckung von 56 % und der Identifizierung von

ERGEBNISSE

Phosphorylierungen an den Serinen 266 (S266) und 269 (S269) resultierte. Diese Serine entsprechen dabei den Serinen 78 und 81 des E8^{E2} Proteins (Abbildung 4A und B). Beide Modifikationen konnten jedoch in dem nachfolgenden Experiment, bei welchem die Proteine ebenfalls mit Trypsin verdaut wurden, nicht bestätigt werden. Obwohl die Sequenzabdeckung mit 35 % nur sehr gering war ist dies nicht der Grund für die fehlende Reproduzierbarkeit, da Peptide welche die entsprechenden Serine beinhalten nachgewiesen werden konnten. Für die erneute Wiederholung der Analyse wurden die Peptide durch einen Verdau mit Trypsin und LysC generiert, wodurch einer Sequenzabdeckung von 61 % erzielt wurde (Abbildung 4A). Jedoch konnten auch bei dieser Analyse die Phosphorylierungen der Serine 266 und 269 nicht bestätigt werden, obwohl auch in diesem Experiment Peptide nachgewiesen wurden, welche diese Serine enthalten. Ebenfalls konnte in keinem der Experiment eine Phosphorylierung des Serins 288 identifiziert werden, welches dem Serin 100 des E8^{E2} Proteins entspricht.

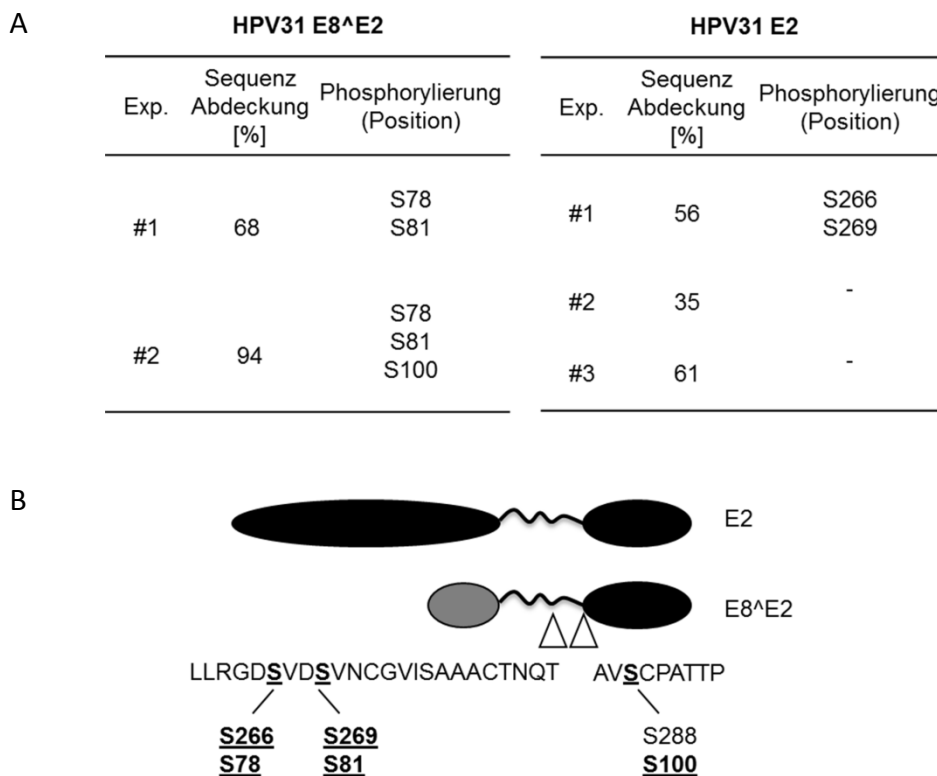


Abbildung 4: HPV31 E8^{E2} und E2 werden phosphoryliert. Zellysate von HeLa pInducer 31E8^{E2}-HA Zellen bzw. von E2-HA transfizierten HeLa Zellen wurden mit magnetischen anti-HA Beads präzipitiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. (A) Ergebnisse der Nano LC-MS/MS Analysen mit Angabe der Sequenzabdeckung und der identifizierten Phosphorylierungen. (B) Schematische Darstellung der E2 und E8^{E2} Proteine. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen sind unterstrichen.

Beim Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Alpha-9 Papillomviren, zu welcher Gattung auch HPV31 gehört zeigte sich, dass die Serine 78, 81 und 100 in den E8^{E2} Proteinen nur mäßig konserviert sind. Das Serin an Position 78 ist bei HPV16, 31, 52 und 67 vorhanden, Serin 81 bei HPV16, 31, 35, 52 und 58 und Serin 100 nur bei HPV31 und 35 (Abbildung 5A). Beim Vergleich aller Alpha-Papillomviren zeigte sich, dass das Serin 78 in den E8^{E2} Proteinen von HPV11, 16, 26, 31, 39, 42, 43, 44, 51, 52, 59, 67, 68, 74, 82, 85, 87 und 125 vorhanden ist (Abbildung 5B).

A

```

HPV31 LLRGD-SVDSVNC--GVI SAAACTNQTRAVS CPATTP
HPV16 LLHRD-SVDSAP----ILTAFNSSHKGRINCNSNTTP
HPV33 LFCADPALDNRTA----RTATNCTNKQRTVCSSNVAP
HPV35 RVRLS-AVDSVDR--GVYSTSDCTNKDRCGSCSTTTP
HPV52 LLRGQQSVDSSTTR--GLVTATECTNKGRVAHTTCTAP
HPV58 Y--TDCAVDSRPRGGGLHSTTNCTYKGRNVCSSKVSP
HPV67 LLCRQRSVDCTSV--GLVPGPQCTNKGRSVCAPNTAP
    
```

B

```

HPV11 NTLCVANIRSVDSTINNIV
HPV16 -TKLLHRD-SVDSAP--IL
HPV26 TTAATQPGQSVDYTNNNLH
HPV31 -NKLLRGD-SVDSVNCGVI
HPV39 -----DGVSLDHLNNPLH
HPV42 --IPSIPASVDPGLCGVR
HPV43 -----VGRGSDSSDSRLV
HPV44 NTVCVRNSDSDSTNNNIL
HPV51 -----SVDNTNNQIH
HPV52 -NNLLRGQQSVDSSTTRGLV
HPV59 -----SVSDYCDNPVV
HPV67 -TKLLCRQRSVDCTSVGLV
HPV68 -----DNVSDGVLDLPLL
HPV74 STVCITNGDSDSANNNII
HPV82 -----SVDTCDHQIH
HPV85 -----DGLSDHLNNPLL
HPV87 -----SVDSCYTRTN
HPV125 PQTTERASQSLDG-DRTRD
    
```

Abbildung 5: Aminosäuresequenzvergleich des E8^{E2} Proteins (A) innerhalb der Alpha-9 Papillomviren bzw. (B) aller Alpha-Papillomviren in welchen das Serin 78 konserviert ist.

4.1.2 Validierung der vorhergesagten Phosphorylierungen

Um die, durch massenspektrometrische Analysen vorhergesagten Phosphorylierungen von HPV31 E8^{E2} und E2 zu bestätigen, wurden Gesamtzellextrakte von HeLa Zellen, welche zuvor mit Expressionsplasmiden für HA-markierte HPV31 E8^{E2} oder E2 Proteine transfiziert wurden, mittels Phosphat-Affinitätselektrophorese (Phos-TagTM SDS-PAGE) analysiert. Phos-TagTM ist ein zweiwertiger Metallionenkomplex, welcher selektiv an Phosphatgruppen an Serin-, Threonin- und Tyrosin-Seitenketten binden kann. Wird das Phos-TagTM Reagenz in die Polyacrylamidmatrix eines Trenngels ein polymerisiert kann somit das Laufverhalten phosphorylierter Proteine beeinflusst werden, was zu einer Trennung der Proteinspezies nach Anzahl ihrer Phosphorylierungen führt.

Für das HPV31 E8^{E2} Protein konnten in transfizierten HeLa Zellen sechs Banden von unterschiedlicher Intensität beobachtet werden (Abbildung 6A). Die unterste Bande stellt dabei die unphosphorylierte Form des Proteins dar, wohingegen die langsamer migrierenden Banden einfach bzw. mehrfach phosphoryliertes Protein repräsentieren. Um zu untersuchen, ob die in massenspektrometrischen Analysen identifizierten Phosphorylierungen dabei den in der Phosphat-Affinitätselektrophorese beobachteten Bandenverschiebungen entsprechen, wurden Mutanten des E8^{E2} Proteins generiert. Dabei wurde das Serin an Position 78, 81 oder 100 gegen die Aminosäure Alanin (A) ausgetauscht, welche nicht phosphoryliert werden kann. Für die E8^{E2} S78A Mutante konnte eine Bande mit hoher Intensität sowie zwei langsamer migrierende Banden mit schwächerer Intensität beobachtet werden. Das Migrationsmuster der E8^{E2} S81A sowie der S100A Mutante unterschied sich jedoch nicht wesentlich von dem des Wildtyp Proteins. Zusätzlich wurde dieses Experiment in einer Keratinozyten Zelllinie durchgeführt welche extrachromosomale HPV31 Genome enthält (HPV31wt-NHK). In diesen Zellen konnten für das Wildtyp Protein ebenfalls zwei Banden von hoher Intensität sowie mehrere langsamer migrierende Banden von geringerer Intensität beobachtet werden (Abbildung 6B). Für die S78A Mutante konnte hingegen nur noch eine Bande von hoher Intensität beobachtet werden, welche vermutlich das unphosphorylierte Protein darstellt. Die Migrationsmuster der S81A und S100A Mutanten hingegen zeigten erneut keinen Unterschied im Migrationsverhalten, verglichen mit dem Wildtyp Protein. Dies deutet darauf hin, dass S78 die Hauptphosphorylierungsstelle des HPV31 E8^{E2} Proteins in unterschiedlichen Keratinozyten Zelllinien darstellt, wohingegen die Phosphorylierung der Serine 81 und 100 wesentlich seltener vorkommt.

Für das E2 Protein konnte sowohl in HeLa Zellen als auch in HPV31wt-NHK nur eine Bande mit hoher Intensität sowie langsamer migrierende Banden von niedrigerer Intensität beobachtet werden. Für die E2 S266A, S269A und S288A Mutanten unterschied sich dabei das Bandenmuster nicht wesentlich

von dem des Wildtyp Proteins. Daraus lässt sich schließen, dass nur eine geringe Fraktion des E2 Proteins phosphoryliert wird.

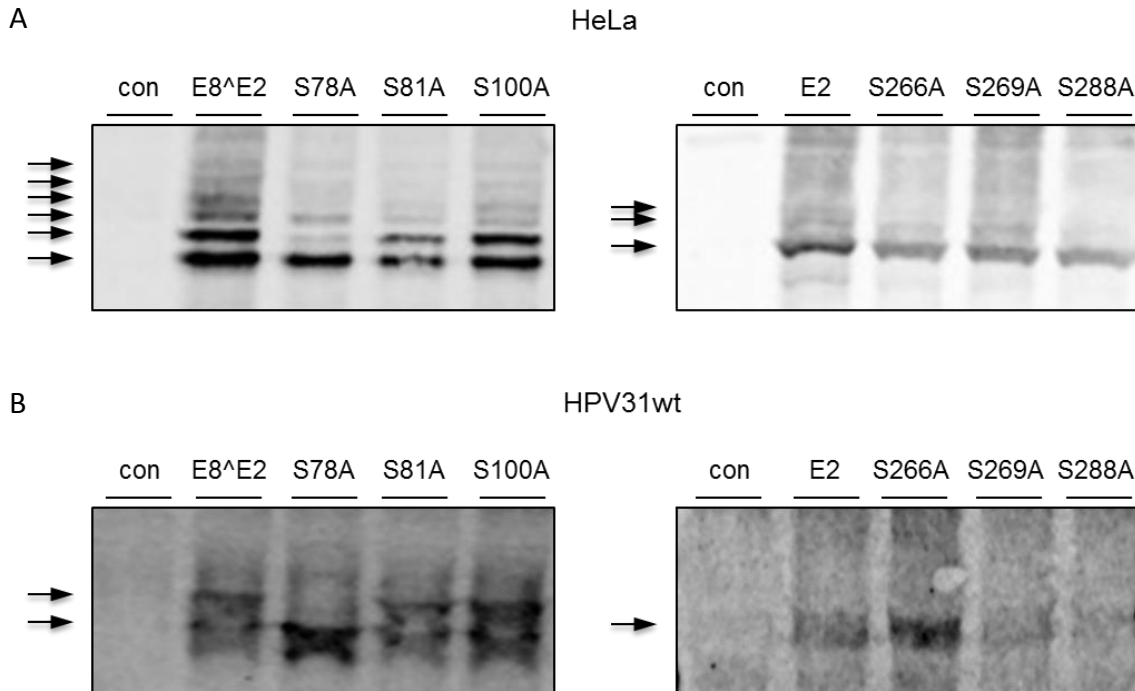


Abbildung 6: Phos-Tag-Analysen bestätigen die Phosphorylierung des E8^{E2} und E2 Proteins. HeLa Zellen (A) oder HPV31wt Zellen (B) wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 (con) oder mit Expressionsplasmide für HA-markierte HPV31 E8^{E2} oder E2 Proteine transfiziert (Wildtyp oder Mutanten). Gesamtzellextrakte wurden 48 Stunden nach Transfektion mittels Phosphat-Affinitätselektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitocellulosemembran transferierten und die Proteine mit einem anti-HA Antikörper detektiert. Die Pfeile deuten die unterschiedlich migrierende Proteinspezies an.

4.1.3 Die E8^{E2} Phosphorylierung wird *in vitro* durch CK2 Inhibitoren verändern

Für BPV1 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des E2 S301 durch die Casein Kinase 2 erfolgt (Schuck *et al.*, 2013). Die Phosphorylierung von S253 des HPV8 E2 Proteins hingegen wird durch die Proteinkinase A (PKA) katalysiert (Sekhar & McBride, 2012).

Um zu überprüfen ob eine dieser Kinasen auch in die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} involviert ist, wurden HeLa pInducer 31E8^{E2}-HA Zellen für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren CX-4945 (CK2 Inhibitor) oder H-89 (PKA Inhibitor) behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen für 24 Stunden mit Doxycyclin behandelt, um die Expression von HPV31 E8^{E2} in den Zellen zu induzieren. Gesamtzellextrakte der Zellen wurden anschließend mittels Phosphat-

Affinitätselektrophorese analysiert. In Übereinstimmung mit den in Abbildung 6 dargestellten Ergebnissen konnten für Zellen, welche nicht mit einem Inhibitor behandelt wurden dabei zwei Banden von hoher Intensität beobachtet werden, wobei die schneller migrierende Bande das unphosphorylierte Protein repräsentiert und die langsamer migrierende Bande das einfach phosphorylierte Protein (Abbildung 7). Des Weiteren waren weitere langsamer migrierende Bande zu beobachten, welche eine deutlich geringere Intensität aufwiesen. Wurden die Zellen mit H-89 behandelt, konnte weder bei einer Endkonzentration von 1 μM noch bei einer Endkonzentration von 10 μM eine Änderung des Bandenmusters beobachtet werden. Wurden die Zellen mit dem H-89 Inhibitor in einer Endkonzentration von 25 μM behandelt, war in der Phosphat-Affinitätselektrophorese kein E8^AE2 mehr detektierbar. Dies ist am ehesten darauf zurück zu führen, dass die Proteinkinase A eine Vielzahl an Funktionen in der Zelle ausübt. Die Behandlung der Zellen mit einer hohen Konzentration des PKA Inhibitors führte daher vermutlich zum Absterben der Zellen. HeLa pInducer 31 E8^AE2-HA Zellen, welche mit niedrigen Konzentrationen (1 μM) des CK2 Inhibitors behandelt wurden zeigten ebenfalls keine Veränderung im Bandenmuster bei der Phos-Tag Analyse. Bei einer Endkonzentration des Inhibitors von 10 μM konnte jedoch ein Intensitätsverlust der Bande beobachtet werden, welche das einfach phosphorylierte Protein repräsentiert. Dieser Phänotyp war bei einer Endkonzentration von 25 μM noch deutlicher ausgeprägt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass CK2 an der Phosphorylierung von HPV31 E8^AE2 beteiligt ist.

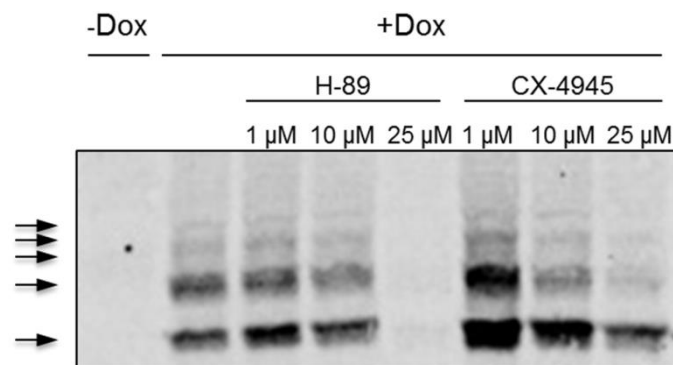


Abbildung 7: Der CK2 Inhibitor CX-4945 beeinflusst die HPV31 E8^AE2 Phosphorylierung. HeLa pInducer 31E8^AE2-HA Zellen wurden mit den angegebenen Konzentration des PKA Inhibitors H-89 oder des CK2 Inhibitors CX-4945 behandelt. Gesamtzellextrakte wurden 24 Stunden nach Inhibitor Behandlung und Doxycyclin-Induktion mittels Phosphat-Affinitätselektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einem anti-HA Antikörper detektiert. Die Pfeile deuten die unterschiedlich migrierenden Proteinspezies an.

4.1.4 Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} reguliert dessen Repressionsaktivität

Um die Frage zu beantworten, ob sich die Phosphorylierung der E2 bzw. der E8^{E2} Proteine auf ihre Funktion als Transkriptionsmodulator auswirkt wurden zusätzlich zu den Mutanten mit einem Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin auch Mutanten generiert, in denen die entsprechenden Serine zu Glutaminsäure (E) mutiert wurden, wodurch eine konstitutive Phosphorylierung stimuliert wird. Die Aktivität dieser Mutanten wurde anschließend in Luziferase-Reporteranalysen untersucht. Dafür wurden Expressionsplasmiden für die Wildtyp Proteine sowie für die Mutanten zusammen mit einem Luziferase-Reporterplasmid in HeLa Zellen und HPV31wt-NHK transfiziert. Das dabei verwendete Reporterplasmid pC18-SP1-Luc enthält vier E2-Bindungsstellen oberhalb eines minimalen Promotors, welcher die Expression der Firefly Luziferase kontrolliert. Zusätzlich wurde ein Expressionsplasmid für die Gaussia Luziferase, welche in den Überstand sekretiert wird, als Kontrolle für die Transfektionseffizienz kotransfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der Firefly Luziferase gemessen und zum Ausgleich von Unterschieden in der Transfektionseffizienz auf die Aktivität der Gaussia Luziferase normalisiert.

Wie in Abbildung 8A dargestellt führte die Kotransfektion des Wildtyp E2 Proteins mit pC18-SP1-Luc in HeLa Zellen zu einer 27-fach erhöhten Aktivität des Reporterplasmids. Bei der Analyse der Serin zu Alanin bzw. Serin zu Glutaminsäure Mutanten zeigten sich im Vergleich zum Wildtyp Protein keine signifikanten Unterschiede in der Transkriptionsaktivität.

Das E8^{E2} Wildtyp Protein reprimierte die Aktivität des Reporterplasmids in HeLa Zellen um das 11,8-fache (Abbildung 8A). Hingegen zeigte die Analyse der mutierten E8^{E2} Proteine sowohl für die S78A als auch für die S100E Mutante einen signifikanten Verlust in der Repression des Reporterplasmids. Auch für die S81E und die S100A Mutanten konnte ein Verlust der Repressionsaktivität beobachtet werden, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant. Die S81A Mutante unterschied sich in ihrer Aktivität nicht vom Wildtyp Protein. Die Beobachtung, dass sich auch die S78E Mutante ähnlich wie das Wildtyp Protein verhielt und somit den Phänotyp der S78A Mutante aufhebt, lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um einen phosphorylierungs-abhängigen Phänotyp handelt. Da die phosphorylierten Serine im E8^{E2} Protein unter Verwendung HA-markierter Proteine identifiziert wurden, wurden zusätzlich Luziferase-Reporteranalysen mit HA-markierten Proteinen durchgeführt. Dabei konnten keine funktionellen Unterschiede zwischen den markierten und den nativen Proteinen (Wildtyp oder Mutanten) festgestellt werden (Abbildung 8C).

Die Luziferase-Reporteranalysen der E8^{E2} Proteine wurden zusätzlich in Keratinozyten Zelllinien mit episomalen HPV31 Genomen (HPV31wt-NHK) durchgeführt. Auch in diesen Zellen führte die S78A Mutation zu einem signifikanten Verlust der Repressionsaktivität, wohingegen die S78E Mutante zu

einer Repression des Reporterplasmids, vergleichbar zum Wildtyp Protein führte (Abbildung 8B). Für die S100E Mutante zeigte sich ebenfalls ein Verlust der Repression des Reporterplasmids, wohingegen die S100A Mutante sich nicht vom Wildtyp Protein unterschied. Der Unterschied zwischen Wildtyp und S100E war jedoch nicht statistisch signifikant. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die transkriptionelle Repression des E8^{E2} Proteins in verschiedenen Keratinozyten Zelllinien von der Phosphorylierung des S78 abhängig ist.

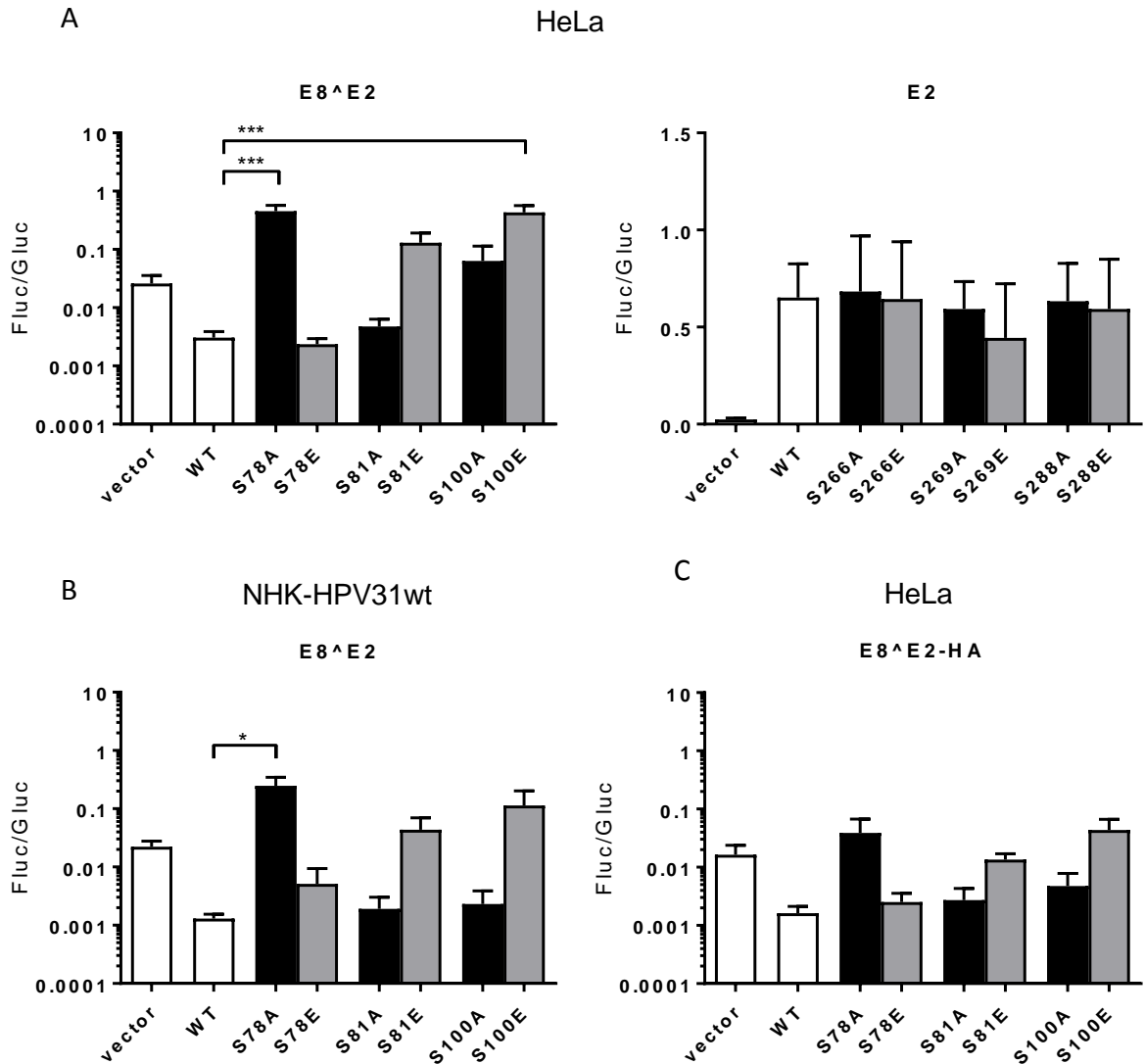


Abbildung 8: Die Phosphorylierung von E8^EE2 S78 beeinflusst die Transkriptionsrepression. (A) HeLa Zellen wurden mit 100 ng des Reporterplasmids pC18-SP1-Luc, 10 ng des leeren Expressionsplasmid (vector) oder 10 ng der angegebenen Expressionsplasmide für E8^EE2 (links) bzw. E2 (rechts) und 0,5 ng pCMV-Gluc als interne Kontrolle kotransfiziert. (B) HPV31wt Zellen wurden mit 300 ng des Reporters, 30 ng des leeren Expressionsplasmids (vector) oder der Expressionsplasmide für E8^EE2 und 0,5 ng pCMV-Gluc kotransfiziert. (C) HeLa Zellen wurden mit 100 ng des Reporterplasmid und 10 ng der angegebenen Expressionsplasmide für E8^EE2-HA und 0,5 ng pCMV-Gluc kotransfiziert. Dargestellt sind die Verhältnisse der Aktivitäten der Firefly Luziferase (Fluc) zur Gaussia Luziferase (Gluc). Die Fehlerbalken zeigen den SEM von $n \geq 7$ (HeLa) bzw. $n=3$ (HPV31wt) unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung auch Auswirkungen auf die E8^{E2} vermittelte Repression der viralen Replikation hat, wurde ein Reporterplasmid verwendet, welches die HPV31 URR enthält (pGL31URR-Luc). Das Luziferase-Gen wird dabei vom frühen viralen Promoter exprimiert. Die Kotransfektion der E1 und E2 Proteine führt zur Replikation des Reporterplasmids und infolge dessen zur Zunahme der Luziferase-Aktivität. Bei der Kotransfektion des Reporterplasmids mit Expressionsplasmiden für E1 und E2 in RTS3b Zellen, einer HPV-negativen Keratinozyten Zelllinie, konnte auf diese Weise eine 10,9-fache Zunahme der Luziferase-Aktivität, verglichen mit der Kotransfektion mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5, beobachtet werden. Wurde zusätzlich das Expressionsplasmid für das Wildtyp E8^{E2} Protein kotransfiziert verringerte sich die Luziferase-Aktivität um das 10-fache (Abbildung 9). Die Kotransfektion der S78A bzw. der S100E Mutante zeigte jedoch eine signifikante Abnahme der Repressionsaktivität (2,5-fach bzw. 2,1-fach), wohingegen die S78E und die S100A Mutante keinen Einfluss auf die Repression hatten. Die S81A Mutante zeigte ebenfalls keinen Unterschied in der Repressionsaktivität verglichen zum Wildtyp Protein. Für die S81E Mutante konnte ein Verlust an Repressionsaktivität beobachtet werden, dieser war statistisch jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse der Replikationsanalysen korrelieren somit mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalysen. Allerdings zeigen die S78A und S100E nur einen partiellen Verlust der Repressionsaktivität in Gegenwart der E1 und E2 Proteine, wohingegen mit dem pC18-SP1-Luc Reporterplasmid ein vollständiger Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte.

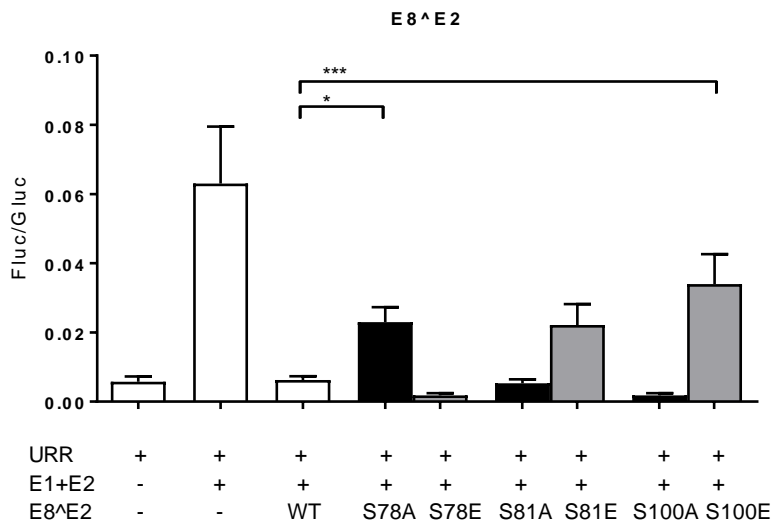


Abbildung 9: E8^{E2} S78 Phosphorylierung beeinflusst die Repression der Replikation. RTS3b Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng Reporterplasmid pGL31URR-Luc (URR) und Expressionsplasmide für HPV31 E1 (100 ng), HPV31 E2 (10 ng) und Wildtyp oder mutiertem HPV31 E8^{E2} (10 ng) kotransfiziert. Unterschiede in der DNA Menge wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=5 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Duplikate. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test ermittelt (*p<0.05, *** p<0.001).

4.1.5 Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} hat keine Auswirkung auf die Stabilität oder die Lokalisation des Proteins

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Phosphorylierung verschiedener E2 Proteine in der Hinge-Region die Stabilität dieser Proteine beeinflusst. Die Phosphorylierung des BPV1 E2 Proteins induziert eine Konformationsänderung des Proteins, was dazu führt, dass das Protein vom Ubiquitin-Proteasom-System erkannt und abgebaut wird (Penrose *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu konnte für die E2 Proteine von HPV8 und HPV16 gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Serinen in der Hinge-Region zu einer Stabilisierung der Proteine führt (Johansson *et al.*, 2009; Sekhar & McBride, 2012; Chang *et al.*, 2014).

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} ebenfalls die Stabilität des Proteins beeinflusst, wurden die E8^{E2} Proteinmengen des Wildtyp Proteins sowie der mutierte Proteine in HeLa Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit HA-markierten Wildtyp-Proteinen bzw. mit Serin zu Alanin mutierten Proteinen transfiziert und die Zelllysate in einem Western Blot analysiert. Die Quantifizierung der Proteinmengen mehrerer unabhängiger Analysen zeigte dabei, dass die S78E und die S100E Mutanten zu einer leicht erhöhten Proteinmenge führten, wohingegen für die S81E Mutante leicht verringerte Proteinmengen zu beobachten waren (Abbildung 10B). Keiner der Unterschiede erreichte jedoch statistische Signifikanz (ermittelt mit einer einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test). Die Proteinmengen der S78A, S81E und S100A Mutanten unterschieden sich nicht wesentlich vom Wildtyp Protein.

Zusätzlich zur Proteinmenge wurde auch die zelluläre Lokalisation der Proteine mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle E8^{E2} Mutanten sowie auch das Wildtyp Protein im Zellkern der HeLa Zellen lokalisiert waren (Abbildung 10C).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust an Repressionsaktivität der S78A und S100E Mutanten nicht daraus resultiert, dass die Mutationen zu einer verringerten Stabilität oder abnormen Lokalisierung der Proteine führt.

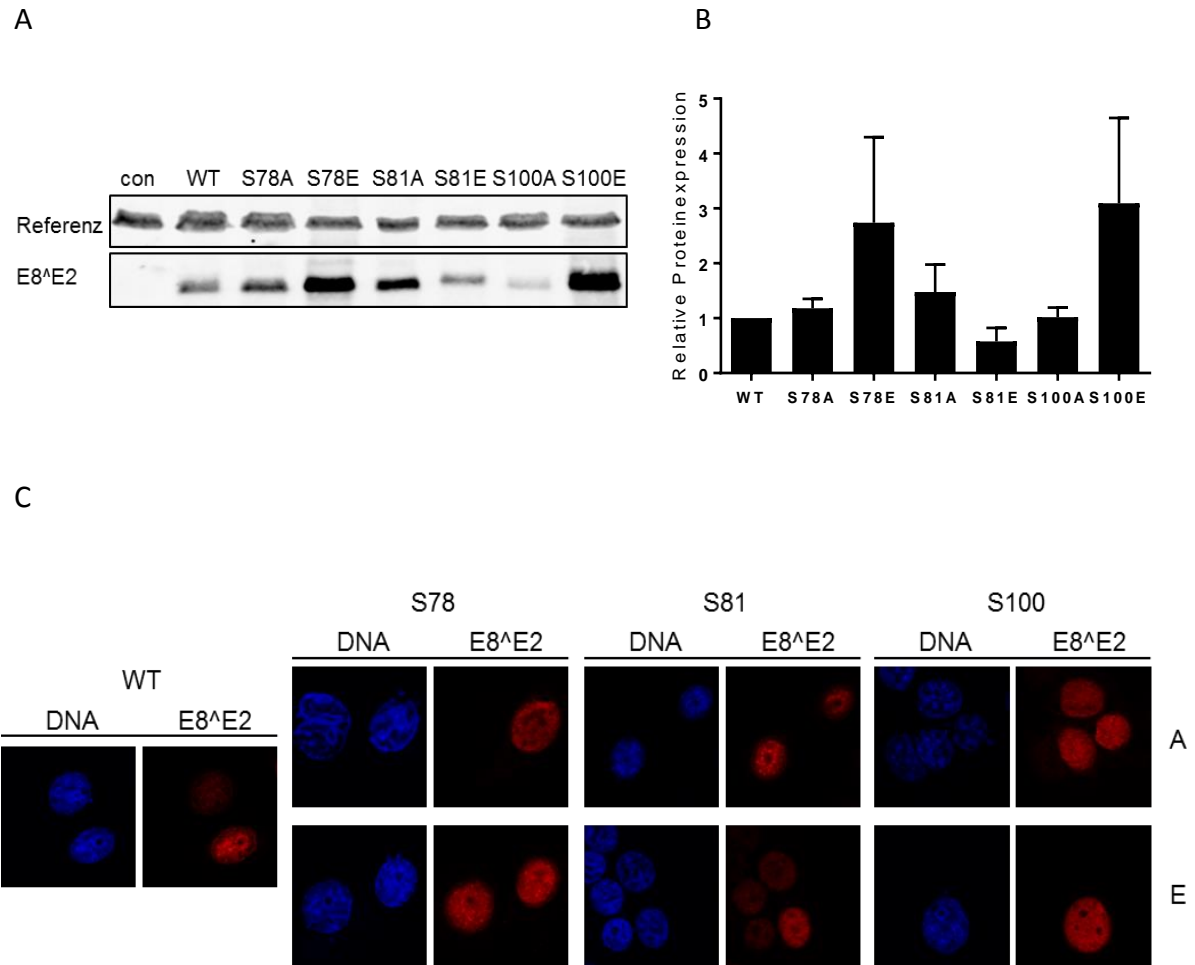


Abbildung 10: E8^{E2} Phosphorylierung verändert nicht Stabilität oder Lokalisation des Proteins. HeLa Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HA-markierte E8^{E2} Proteine (Wildtyp oder Mutanten) transfiziert. (A) Gesamtzellextrakte der transfizierten Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion in einem Western Blot mit einem anti-HA Antikörper und einem anti- α -tubulin Antikörpern (Referenz) analysiert. (B) Für die Quantifizierung der Western Blots wurde die Software *Image Studio* verwendet. Dabei diente α -tubulin als Referenz für die Normalisierung der E8^{E2} Signale. Dargestellt ist die relative Proteinexpression bezogen auf das Wildtyp Protein. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten. (C) HeLa Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion mit einem anti-HA Antikörper (rot) gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

4.1.6 HPV31 E8^{E2} S78 Phosphorylierung reguliert nicht die DNA-Bindung

Die Phosphorylierung von E2 Proteinen in der Hinge-Region kann die DNA Bindung dieser Proteine beeinflussen. Für die E2 Proteine von BPV1 konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindeaktivität durch die Phosphorylierung der Serine 298 und 301 geschwächt wird (Schuck *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung der E2 Proteine von HPV8 und HPV16 zu einer verstärkten Bindung der Proteine an Chromosomen der Wirtszelle (Sekhar & McBride, 2012; Chang *et al.*, 2014).

Um die Frage zu beantworten, ob die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} ebenfalls Auswirkungen auf die DNA-Bindung des Proteins hat wurden Elektromobilitäts-Shift-Analysen (EMSA) mit nukleären Extrakten von transfizierten HeLa Zellen durchgeführt. Für diese Analysen wurden markierte Oligonukleotide verwendet, welche die vier E2-Bindungsstellen des pC18-SP1-Luc Reporterplasmids enthalten. Wie erwartet konnte dabei für nukleäre Proteine von Zellen, welche mit Wildtyp E8^{E2} transfiziert wurden eine Veränderung des Laufverhaltens der Oligonukleotide (*Shift*) bei der elektrophoretischen Auftrennung beobachtet werden, welche bei untransfizierten Zellen (Kontrolle) nicht zu beobachten war (Abbildung 11A). Diese Veränderung des Laufverhaltens ist auf eine Bindung der E8^{E2} Proteine an die Oligonukleotide zurück zu führen. Die Bindung des E8^{E2} Proteins an die Oligonukleotide veränderte sich dabei auch nicht, wenn das Serin 78 zu Alanin oder Glutaminsäure mutiert wurde, was daran zu erkennen ist, dass auch bei der Analyse dieser nukleären Extrakte eine Veränderung des Laufverhaltens zu beobachten ist.

Zusätzlich wurde die DNA-Bindeaktivität der verschiedenen E8^{E2} Proteine auch mittels Chromatin-Immunpräzipitation untersucht. Anders als die Elektromobilitäts-Shift-Analyse ermöglicht diese Methode die *in vivo* Analyse der Protein-DNA-Interaktion im Kontext der natürlichen Chromatin-Struktur der Zelle. Für diese Experimente wurden HeLa Zellen mit dem pC18-SP1-Luc Reporterplasmid sowie Expressionsplasmide für HA-markierte Wildtyp oder mutierte E8^{E2} Proteine transfiziert und 48 Stunden später die Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt. Unter Verwendung von Oligonukleotiden, welche die E2-Bindestellen des pC18-SP1-Luc Reporterplasmids abdecken, wurde anschließend in qRT-PCR-Analysen die Signalanreicherung der, mit anti-HA Antikörpern bzw. dem Kontrollantikörper H3 präzipitierten DNA gemessen. Das Wildtyp Protein zeigte dabei eine 6,7-fache Anreicherung verglichen mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 (Abbildung 11B). Für die S78A und die S78E Mutanten konnten ähnliche Signalanreicherungen beobachtet werden (5,5-fach bzw. 5,8-fach), wohingegen für die S100E Mutante nur eine 3,5-fache Anreicherung gemessen wurde, was einer verringerten DNA-Bindeaktivität von ca. 52 %, verglichen mit dem Wildtyp Protein entspricht.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung des Serins 78 keinen Einfluss auf die DNA-Bindung des E8^AE2 Proteins hat, wohingegen eine Phosphorylierung des Serins 100 die DNA-Bindeaktivität von E8^AE2 *in vivo* geringfügig vermindert.

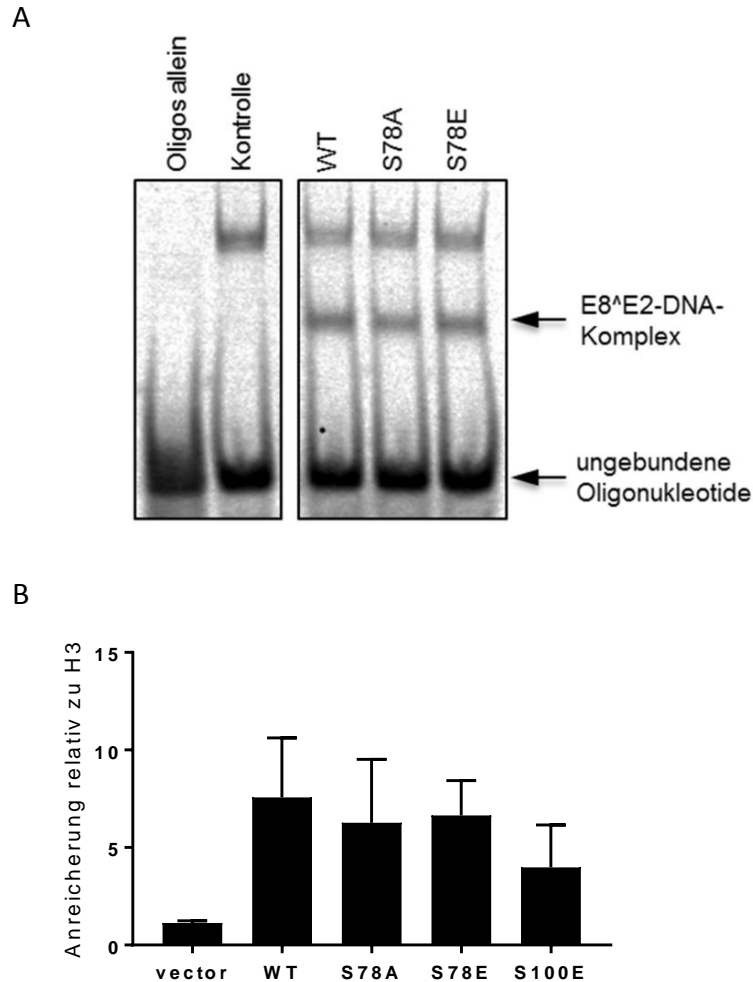


Abbildung 11: E8^AE2 S78 Phosphorylierung wirkt sich nicht auf die DNA-Bindung aus. (A) Analyse der DNA-Bindung mittels EMSA. HeLa Zellen wurden mit Expressionsplasmide für HPV31 E8^AE2 transfiziert (Wildtyp, S78A oder S78E) oder untransfiziert belassen (Kontrolle). Nukleäre Proteine wurden 48 Stunden nach Transfektion isoliert und mit DY681-markierten Oligonukleotiden inkubiert, welche die Sequenz für die E2-Bindestellen des Reporterplasmids pC18-SP1-Luc enthalten. Anschließend wurden die Proben in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. (B) Analyse der DNA-Bindung mittels ChIP. HeLa Zellen wurden mit dem Reporterplasmid pC18-SP1-Luc und HA-markierten HPV31 E8^AE2 (Wildtyp, S78A, S78E oder S100E) kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurde das Chromatin der Zellen isoliert und verdaut und die Immunpräzipitation mit einem anti-HA und einem anti-H3 Antikörper durchgeführt. Die Anreicherung des Reporterplasmids wurde mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die, auf H3 normalisierte Anreicherung relativ zur Vektorkontrolle (vector). Die Fehlerbalken zeigen den SEM von $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten.

4.1.7 Die Interaktion von HPV31 E8^AE2 mit dem NCoR/SMRT-Komplex ist unabhängig von der S78 Phosphorylierung

Vorausgegangene Studien konnten zeigen, dass die E8-Domäne der E8^AE2 Proteine mit dem zellulären NCoR/SMRT-Korepressorkomplex interagieren, wobei diese Interaktion vom KWK-Motiv in der E8-Domäne abhängig ist. Die Repression der viralen Replikation sowie Transkription durch E8^AE2 wird durch diese Interaktion vermittelt (Powell *et al.*, 2010; Dreer *et al.*, 2016).

Um zu testen, ob die Interaktion des E8^AE2 Proteins mit dem zellulären NCoR/SMRT-Komplex durch die Phosphorylierung von S78 beeinflusst wird, wurden HeLa Zellen mit Expressionsplasmiden für HA-markierte E8^AE2 Proteine transfiziert. Neben Expressionsplasmiden für das Wildtyp Protein und die S78A Mutante wurde als Negativkontrolle zusätzlich das leere Expressionsplasmid pSG5 und ein Expressionsplasmid für das E8^AE2 KWK mutierte Protein (KWK mt) verwendet. Die Immunpräzipitation mit magnetischen anti-HA Beads erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion und die präzipitierten Proben wurden anschließend mittels Western Blot auf die Anwesenheit der Komplexkomponenten HDAC3 und TBLR1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Wildtyp Protein, wie erwartet sowohl mit HDAC3 als auch mit TBLR1 interagiert (Abbildung 12). Die S78A Mutante war ebenfalls dazu in der Lage an die NCoR/SMRT-Komplexkomponenten zu binden, wohingegen die KWK Mutante wie erwartet keine Interaktion mit HDAC3 oder TBLR1 aufweist.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Serins 78 in der Hinge-Region von HPV31 E8^AE2 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Interaktion mit dem NCoR/SMRT-Komplex hat.

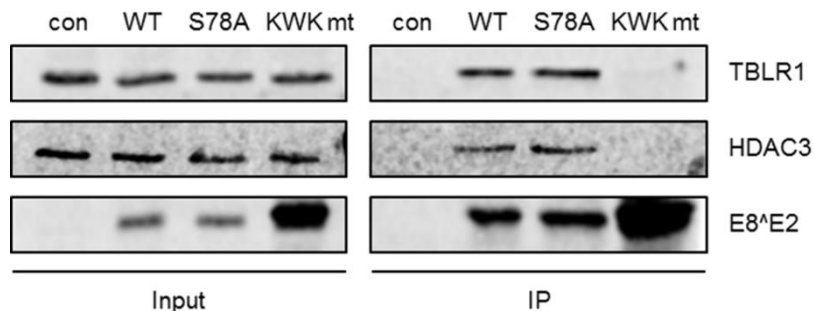


Abbildung 12: Phosphorylierung von S78 hat keine Auswirkung auf die NCoR/SMRT-Interaktion. HeLa Zellen wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 (con) oder mit Expressionsplasmide für HA-markierte E8^AE2 Proteine (Wildtyp, S78A oder KWK mt) transfiziert. Gesamtzellextrakte wurden 48 Stunden nach Transfektion entweder direkt analysiert (Input) oder mit magnetischen anti-HA Beads die E8^AE2 Proteine immunpräzipitiert (IP). Mittels Western Blot wurden die Proben anschließend auf ihre Anwesenheit von E8^AE2, HDAC3 und TBLR1 untersucht.

4.1.8 Deletion der HPV31 E8^ΔE2 Hinge-Region hat keine Auswirkung auf die Replikation

Da die Phosphorylierungen des HPV31 E8^ΔE2 Proteins ausschließlich in der Hinge-Region des Proteins zu finden sind und da bei einer Mutation des phosphorylierten Serins 78 zu Alanin eine drastische Auswirkung auf die Transkriptionsrepression sowie die Replikationsrepression zu beobachten ist, stellte sich die Frage, ob die Hinge-Region des HPV31 E8^ΔE2 Proteins relevant für die Proteinaktivität als Repressor der Transkription und Replikation ist.

Aus diesem Grund wurde ein mutiertes HPV31 E8^ΔE2 Konstrukt generiert, in welchem die gesamte Hinge-Region (Aminosäure 14-102) des Proteins deletiert wurde. Dabei wurde zwischen die 13 Aminosäuren des E8-Peptids und die Aminosäuren 103-184 des C-Terminus von E2 ein HA-Epitop eingefügt (pSG HPV31 E8^ΔE2 (1-13)-HA-(103-184)). Wurden RTS3b Zellen mit dieser E8^ΔE2 Mutante transfiziert zeigte sich bei der Untersuchung der zelluläre Lokalisation dieser Proteine mittels Immunfluoreszenz-Analyse, dass anstatt der ausschließlich nukleären Lokalisation eines Wildtyp Proteins für die (1-13)-HA-(103-184) Mutante zusätzlich auch cytoplasmatische Signale beobachtet werden können, bzw. in einigen Zellen sogar nur cytoplasmatische Signale vorhanden sind. Das mutierte Protein scheint sich dabei vor Allem an der Kernmembran anzulagern (Abbildung 13A). Überraschenderweise zeigte sich bei der Durchführung von Luziferase-Reporteranalysen unter der Verwendung des pC18-SP1-Luc Reporterplasmids für die Analyse der Transkriptionsaktivität bzw. dem pGL31URR-Luc Reporterplasmids für die Analyse der Replikationsaktivität, dass das mutierte E8^ΔE2 Protein die Luziferase-Aktivität vergleichbar mit dem Wildtyp Protein reprimieren kann (Abbildung 13B). Dies lässt darauf schließen, dass die Hinge-Region des Proteins nicht für die eigentliche Funktion als Repressor benötigt wird. Ebenfalls lassen die Ergebnisse erkennen, dass trotz der veränderten Lokalisation des mutierten Proteins noch immer genügend E8^ΔE2 Proteine im Zellkern vorhanden sind, um eine Repression der Transkription und Replikation zu bewirken.

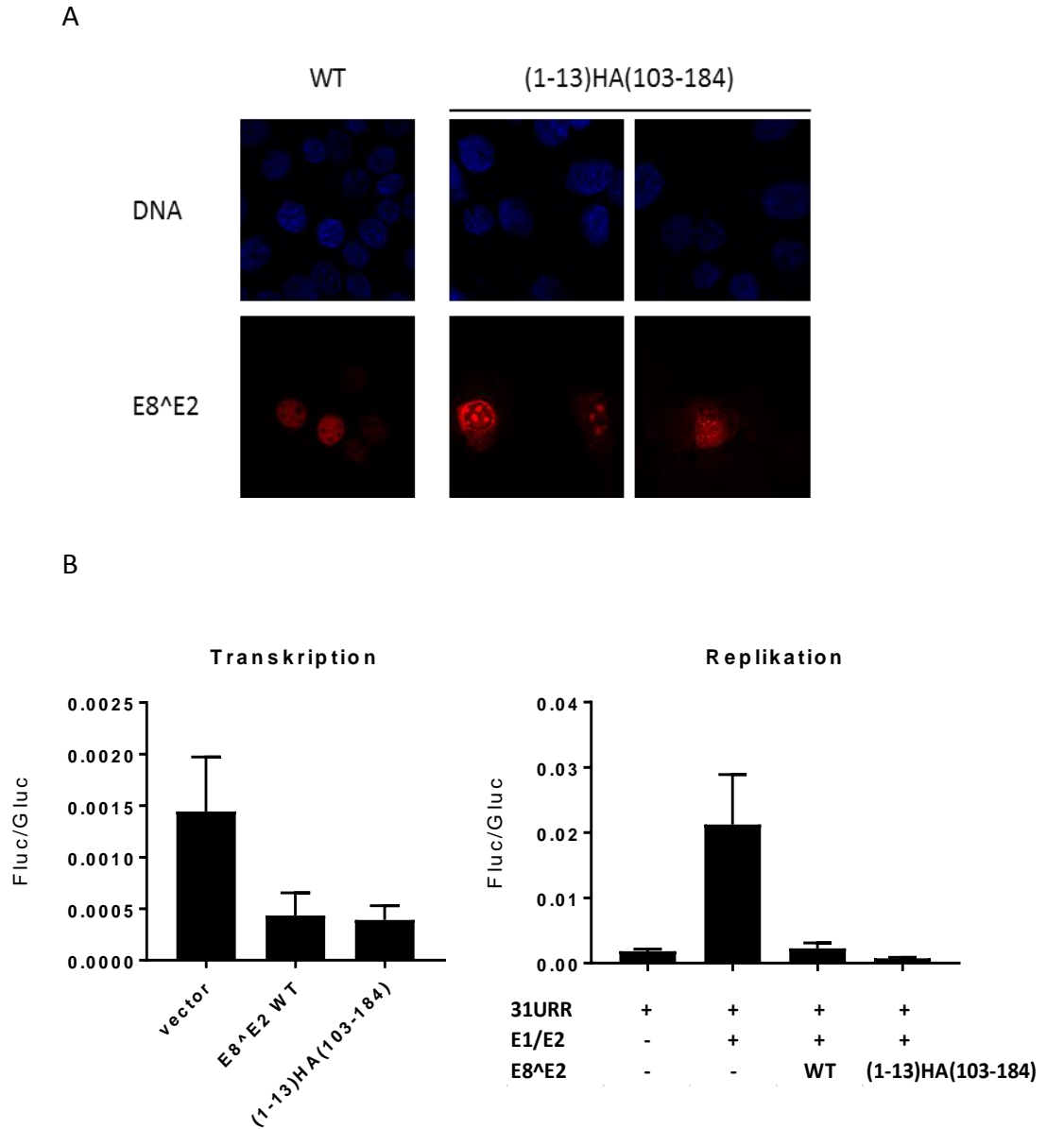


Abbildung 13: Die Deletion der Hinge-Region führt zu einer Veränderung der Proteinlokalisierung. (A) RTS3b Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für HA-markierte E8^{E2} Proteine (Wildtyp oder Mutanten) transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit einem anti-HA Antikörper (rot) gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. (B) RTS3b Zellen wurden für die Messung der Transkription (links) mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 100 ng Reporterplasmid pC18-SP1-Luc (vector) und 10 ng HPV31 E8^{E2} (Wildtyp oder mutiert) kotransfiziert. Für die Messung der Replikation (rechts) wurden die Zellen mit 50 ng pGL31URR-Luc (31URR) und Expressionsplasmiden für HPV31 E1 (100 ng), HPV31 E2 (10 ng) und Wildtyp oder mutiertem HPV31 E8^{E2} (10 ng) kotransfiziert. Unterschiede in der DNA Menge wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von jeweils n=3 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Duplikate.

4.1.9 Die Phosphorylierung von E8^AE2 S78 reguliert die Interaktion mit zellulären Proteinen

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass der Verlust der Repressionsaktivität von HPV31 E8^AE2 S78A weder durch eine Veränderung der Proteinstabilität, der Lokalisierung des Proteins, einer Verminderung der DNA-Bindeaktivität oder der Bindung an Komponenten des zellulären NCoR/SMRT-Korepressorkomplexes zu begründen ist. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass die Phosphorylierung des S78 über einen bisher noch nicht bekannte Mechanismus zur transkriptionellen Repression durch E8^AE2 beiträgt. Denkbar wäre zum Beispiel, dass durch die Phosphorylierung die Interaktion mit einem anderen zellulären Protein beeinflusst wird. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden in Kooperation mit dem *Quantitative Proteomics & Proteome Center Tuebingen* quantitative massenspektrometrische SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Analysen durchgeführt. SILAC Analysen ermöglichen die gemeinsame Quantifizierung von Proteinen aus unterschiedlichen Zellkulturbedingungen, durch die differentielle Markierung mit stabilen Isotopen. Peptide mit leichten bzw. schweren Isotopen können im Massenspektrometer so durch ihre Massendifferenz unterschieden werden.

Für die SILAC Experimente wurden HeLa Zellen mit isotopenmarkierten Aminosäuren metabolisch markiert. Die unterschiedlich markierten Zellen wurden dann mit Expressionsplasmiden für HPV31 E8^AE2 S78A („Leicht“-markierte Zellen) oder HPV31 E8^AE2 S78E („Schwer“-markierte Zellen) transfiziert, bzw. als Kontrolle untransfiziert belassen („Medium“-markierte Zellen). Die Wahl des Phospho-Mimetikums anstelle des Wildtyp Proteins ist damit zu begründen, dass für diese Kombination größere Effekte zu erwarten sind als für den Vergleich mit Wildtyp Zelllinien, in denen natürlicherweise sowohl phosphorylierte als auch nicht phosphorylierte E8^AE2 Proteine vorliegen. In einem zweiten Versuch wurden die Markierungen getauscht (S78A wurde in „Schwer“-markierte Zellen transfiziert und S78E in „Leicht“-markierte Zellen) um die Anzahl an Falsch-positiven Ergebnissen zu minimieren. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zelllysate mit magnetischen anti-HA Beads präzipitiert. Vor der massenspektrometrische Analyse wurde die Präzipitation von E8^AE2 mittels Western Blot überprüft. Außerdem wurde als Kontrolle die Kopräzipitation des bekannten Interaktionspartners TBLR1 untersucht. Wie in Abbildung 14 dargestellt war die Immunpräzipitation dabei für beide Experimente erfolgreich.

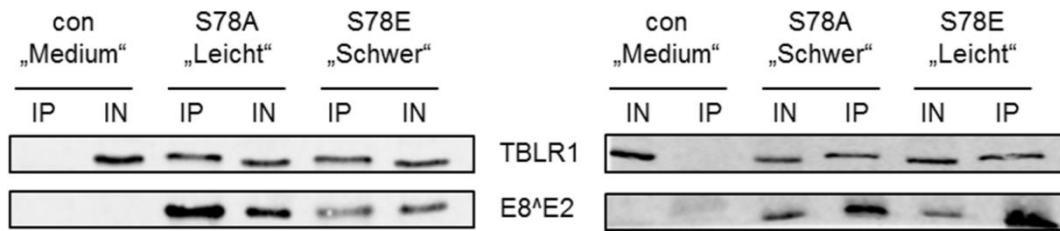


Abbildung 14: Kontroll-Western Blot der Ko-Immunpräzipitation von E8^{E2} Proteinen in unterschiedlich markierten HeLa Zellen. Unterschiedlich markierte HeLa Zellen (Schwer, Medium oder Leicht) wurden nicht transfiziert (con) oder mit Expressionsplasmiden für HA-markierte E8^{E2} Proteine (S78A oder S78E) transfiziert. Gesamtzellextrakte wurden 48 Stunden nach Transfektion entweder direkt analysiert (Input) oder mit magnetischen anti-HA Beads die E8^{E2} Proteine immunpräzipitiert (IP). Mittels Western Blot wurden die Proben anschließend auf ihre Anwesenheit von E8^{E2} und TBLR1 untersucht.

Für die Auswertung der quantitativen massenspektrometrischen Analysen wurden nur Proteine berücksichtigt, die in beiden Experimenten einen deutlichen Unterschied zwischen der Anreicherung durch S78A und der S78E Mutante aufwiesen (p-Wert <0,1). Des Weiteren wurden für die Auswertung nur Proteine berücksichtigt, die in beiden Experimenten in die gleiche Richtung (Anreicherung oder Abreicherung) reguliert waren. In Tabelle 9 sind alle Proteine mit den Intensitäten in den einzelnen Proben, den p-Werten für beide Experimente sowie einer kurze Funktionsbeschreibung (<http://www.uniprot.org/>, Stand November 2017) aufgelistet, welche in S78A transfizierten Zellen gegenüber den S78E transfizierten Zellen abgereichert waren. In Tabelle 10 sind zusätzlich die in S78A transfizierten Zellen angereicherte Proteine darstellt.

Insgesamt zeigte die Auswertung der quantitativen massenspektrometrischen Analysen, dass die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} S78 nur die Interaktion mit einer geringen Anzahl an zellulären Proteinen reguliert. Besonders auffällig ist dabei, dass die unphosphorylierte Form des E8^{E2} S78 eine verstärkte Bindung an Histone sowie an Proteine, die mit der Transkription assoziiert sind, aufweist.

ERGEBNISSE

Tabelle 9: Interagierende Proteine, deren Bindung durch die S78A Mutation verringert wird. Dargestellt sind die Intensitäten in den einzelnen Proben im ersten Experiment bzw. im zweiten Experiment sowie die p-Werte und eine kurze Beschreibung der Funktion.

GEN NAME	INTENSITÄTEN #1		INTENSITÄTEN #2		P-WERT		FUNKTION (UNIPROT.ORG)
	S78A	S78E	S78A	S78E	#1	#2	
FRG1	1,4E+08	1,5E+08	1,1E+08	1,4E+08	0,090	0,038	Bindet sequenzunabhängig an mRNA
MKI67	4,7E+06	6,2E+06	3,6E+06	5,4E+06	0,066	0,029	Assoziiert mit mitotischen Chromosomen
MRPS11	5,3E+06	1,1E+07	1,4E+06	7,6E+06	0,000	0,000	Ribosomales Protein
NONO	1,8E+07	3,3E+07	4,5E+08	6,3E+08	0,000	0,074	DNA- and RNA Bindeprotein

Tabelle 10: Interagierende Proteine, deren Bindung durch die S78A Mutation verstärkt wird. Dargestellt sind die Intensitäten in den einzelnen Proben im ersten Experiment bzw. im zweiten Experiment sowie die p-Werte und eine kurze Beschreibung der Funktion.

GEN NAME	INTENSITÄTEN #1		INTENSITÄTEN #2		P-WERT		FUNKTION (UNIPROT.ORG)
	S78A	S78E	S78A	S78E	#1	#2	
CCDC30	3,0E+07	1,7E+07	6,9E+06	3,0E+06	0,013	0,007	unbekannt
CHD2	3,4E+07	2,4E+07	9,9E+06	4,9E+06	0,066	0,017	DNA-bindende Helikase, Chromatin-remodulierung
H2AFV; H2AFZ	5,2E+08	3,1E+08	1,2E+08	6,9E+07	0,034	0,006	Histon H2A, Kernkomponenten von Nukleosomen
HIST1H2AJ; HIST1H2AH; H2AFJ; HIST2H2AC; HIST2H2AA3; HIST1H2AG; HIST1H2AD	5,1E+09	3,4E+09	2,0E+09	1,0E+09	0,097	0,007	Histon H2A, Kernkomponenten von Nukleosomen
HIST1H2BC; HIST1H2BN; HIST1H2BM; HIST1H2BH; HIST2H2BF; HIST1H2BD; HIST1H2BK; H2BFS	5,7E+09	3,8E+09	2,9E+09	1,5E+09	0,089	0,007	Histon H2B, Kernkomponenten von Nukleosomen

ERGEBNISSE

HIST1H4A	1,2E+10	9,2E+09	6,3E+09	3,1E+09	0,067	0,003	Histon H4, Kernkomponente von Nukleosomen
HIST2H3PS2	4,5E+08	3,2E+08	2,4E+08	1,1E+08	0,051	0,001	Histon H3, Kernkomponente von Nukleosomen
PELP1	3,3E+07	1,9E+07	6,0E+06	2,8E+06	0,026	0,064	Koregulator von Transkriptionsfaktoren und nukleärer Hormonrezeptoren
PNN	2,2E+07	1,2E+07	3,9E+06	2,3E+06	0,001	0,071	Transkriptionsaktivator
QARS	2,3E+06	1,7E+06	5,5E+07	5,5E+07	0,045	0,048	Glutamine-tRNA Ligase

4.1.10 Phosphorylierung von HPV31 E8^AE2 hat keine Auswirkungen auf die virale Replikation in Keratinozyten

Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich die Phosphorylierung des HPV31 E8^AE2 Proteins auf den gesamten Lebenszyklus der Viren in normalen humanen Keratinozyten auswirkt. Zu diesem Zweck wurden zunächst HPV31 Genome generiert, in denen die Serine an Position 78, 81 oder 100 zu Alanin bzw. die Serine an Position 78 oder 100 zu Glutaminsäure mutiert wurden. Für die S78A Mutante führte dies zu keinem Aminosäuren Austausch im E4 Protein, dessen Leserahmen mit dem Leserahmen des E8^AE2 Gens überlappt, wohingegen für die S78E, S81A, S100A und S100E Mutanten ebenfalls das E4 Protein mutiert wurde. Anschließend wurden sowohl die Wildtyp Genome als auch die verschiedenen mutierten Genome in normale humane Keratinozyten (NHK) von verschiedenen Spendern transfiziert und durch Antibiotika-Selektion stabile HPV31-positive Zelllinien generiert.

Zunächst wurde überprüft, ob das HPV31 Genom in den hergestellten Zelllinien episomal vorlag. Dazu wurde gesamtzelluläre DNA der Zelllinien in einem Southern Blot analysiert. Wie in Abbildung 15A dargestellt, waren die HPV31 Genome aller Mutanten als extrachromosomale Moleküle sowie in vergleichbarer Kopienzahl vorhanden. Die S100E Mutante zeigte eine partielle Integration des Genoms, dies war jedoch für stabile Zelllinien basierend auf Keratinozyten von einem anderen Spender nicht zu beobachten. Die Kopienzahl der verschiedenen HPV31 Genome wurde anschließend mit Hilfe einer Multiplex qRT-PCR quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass in HPV31 Wildtyp Zelllinien im Mittel 288 Viruskopien pro Zelle vorhanden sind (Abbildung 15B). Die Kopienzahlen der Zelllinien mit mutierten HPV31 Genomen unterschieden sich dabei nicht signifikant von den Wildtyp Zelllinien: In S78A Zelllinien lagen im Mittel 372 Kopien pro Zelle vor, in S78E Zelllinien 257 Kopien pro Zelle, in S81A Zelllinien 256 Kopien pro Zelle, in S100A Zelllinien 541 Kopien pro Zelle und in S100E Zelllinien

242 Kopien pro Zelle. Zusätzlich zur viralen Genomkopienzahl wurde in den verschiedenen HPV31 positiven Zelllinien auch die Expression der viralen E1 und E2 Transkripte mittels qRT-PCR ermittelt. Dabei zeigte sich, dass sich in mutierten Zelllinien weder die Expression von E1 noch von E2 signifikant von der Expression der viralen Transkripte in Wildtyp Zelllinien unterschieden (ermittelt über einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test, Abbildung 15C).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Phosphorylierung der HPV31 E8^{E2} Proteine überraschenderweise keine Auswirkungen auf die virale Genomkopienzahl, den physikalischen Zustand des viralen Genoms in der Wirtszelle oder die viralen Genexpression in undifferenzierten Keratinozyten hat.

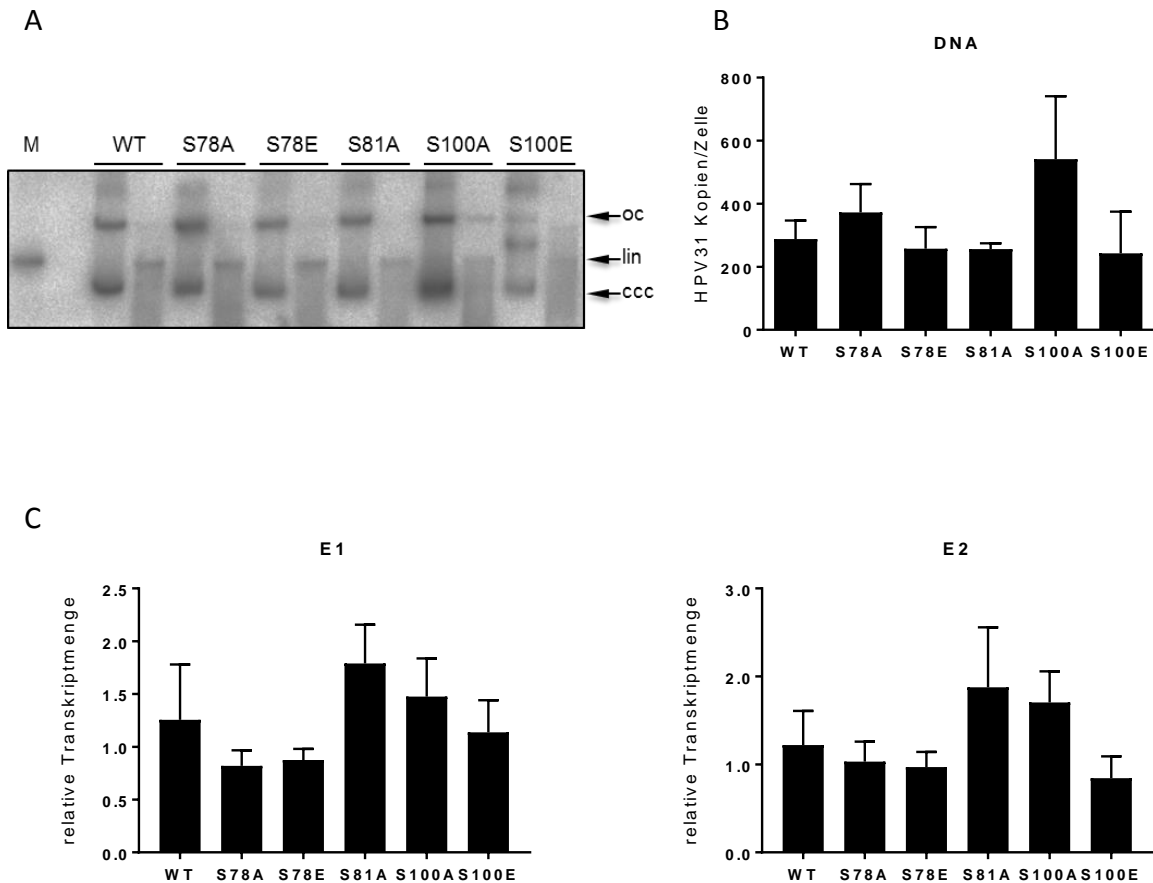


Abbildung 15: E8^ΔE2 Phosphorylierung hat keine Auswirkungen in undifferenzierten Keratinozyten. (A) Southern Blot Analyse von gesamtzellulärer DNA der HPV31 positiven Zelllinie (Wildtyp oder Mutanten). Die DNA wurde mit dem Restriktionsenzym NotI oder HindIII verdaut, in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mittels Hybridisierung mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde (HPV31-Genom) auf die verschiedenen DNA-Formen (*open circle* (oc), linearisiert (lin) und *covalently closed circular* (ccc)) der HPV31 Genome hin analysiert. Als Marker (M) wurden 100 pg des linearisierten HPV31 Wildtyp Genoms verwendet. (B) HPV31 Genomkopienzahlen wurden mittels Multiplex qRT-PCR analysiert. Dazu wurden 50 ng der isolierten gesamtzellulären DNA der verschiedenen HPV31 positiven Zelllinien analysiert. Dargestellt sind die HPV31 E2 Kopien pro zwei beta-Aktin Kopien. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=2-3 unabhängigen DNA-Proben. (C) RNA wurde aus den verschiedenen HPV31 positiven Zelllinien extrahiert und mittels qRT-PCR die Expression der E1 (links) und E2 (rechts) Transkripte gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit PGK1 als Referenz bezogen auf die Wildtyp Zelllinien. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=4 unabhängigen RNA Proben.

Die HPV31 E8^ΔE2 S78A mutierten Genome exprimieren ebenfalls ein E2 Protein mit der S266A Mutation. Luziferase-Reporteranalysen zeigten, dass der Verlust an Repressionsaktivität der S78A Mutanten in Anwesenheit von Wildtyp E1 und E2 Proteine deutlich geringer ausgeprägt ist (Abbildung 9). Dies lässt vermuten, dass die S78A Mutante in der Anwesenheit der E2 S266A Mutante die Repressionsaktivität zurück erlangen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden RTS3b Zellen mit einem Luziferase-Reporterplasmid transfiziert, welches die HPV31 URR enthält (pGL31URR-Luc). Des Weiteren wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für Wildtyp E1, Wildtyp E2 oder E2 S266A und Wildtyp E8^ΔE2 oder E8^ΔE2 S78A kotransfiziert und 48 Stunden nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität in den Zellen gemessen. Dabei konnte bei Kotransfektion von E1 und E2 S266A eine etwas höhere Luziferase-Aktivität gemessen werden als bei der Kotransfektion von E1 und Wildtyp E2 (Abbildung 16). Die Kotransfektion mit dem Wildtyp E8^ΔE2 Protein führte jedoch in beiden Fällen zu einer vergleichbaren Repression der Replikation. Die Kotransfektion der S78A Mutante und dem Wildtyp E2 Protein führte zu einer 3-fachen Abnahme der Repressionsaktivität, was den Daten aus Abbildung 9 entspricht. Bei der Kotransfektion der S78A Mutante und dem E2 S266A Protein konnte eine 6,5-fache der Abnahme der Repressionsaktivität beobachtet werden, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass E2 S266A der reduzierten Repressionsaktivität der S78A Mutante nicht entgegenwirkt.

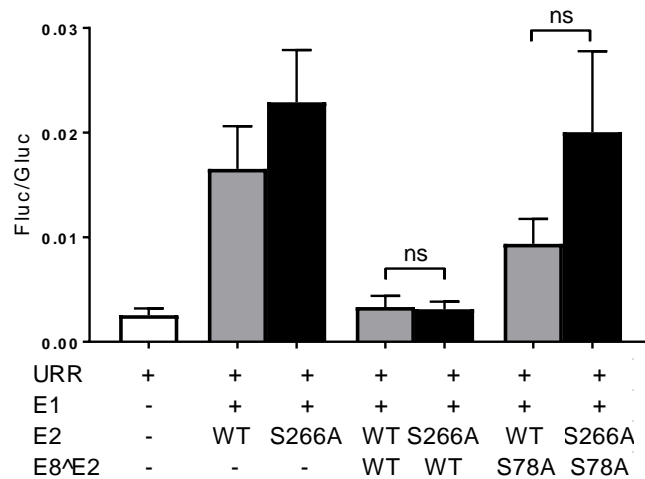


Abbildung 16: E2 S266A hat keinen Einfluss auf die Repressionsaktivität von E8^ΔE2 S78A. RTS3b Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng des Reporterplasmids pGL31URR-Luc, 100 ng des Expressionsplasmids für E1 und 10 ng der entsprechenden Expressionsplasmide für E2 und E8^ΔE2 kotransfiziert. Unterschiede in der DNA Menge wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=4 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Duplikate. Statistische Signifikanz wurde mit einer einseitigen ANOVA mit Tukey-Test ermittelt (nicht signifikant ns).

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von HPV31 E8^AE2 Auswirkungen auf den produktiven Vermehrungszyklus von HPV31 hat. Dafür wurden HPV31 Wildtyp Zelllinien sowie die mutanten Zelllinien als organotypische Zellkulturen (*Raft*-Kulturen) kultiviert und nach 12 Tagen geerntet und analysiert. Organotypische Zellkulturen führen im Gegensatz zu einschichtigen Zellkulturen zu einer vollständigen Differenzierung der transfizierten Keratinozyten, wodurch die Untersuchung des gesamten viralen Lebenszyklus ermöglicht wird (Frattini *et al.*, 1996).

Um zu untersuchen, ob sich die Mutation des E8^AE2 Proteins auf die Differenzierung der Wirtszellen auswirkt, wurden zunächst Kryoschnitte der Wildtyp oder mutierten organotypischen Hautkulturen angefertigt und mit einem Antikörper gegen den Differenzierungsmarker Keratin 10 angefärbt. Für Wildtyp Kulturen zeigte sich dabei, dass Keratin 10 wie erwartet oberhalb der Basalschicht (Stratum basale), in der gesamten Epidermis exprimiert wurde. Diese Verteilung war auch in den mutanten Hautkulturen zu beobachten, was darauf hinweist, dass die E8^AE2 Mutationen keinen Einfluss auf die Differenzierung der Keratinozyten haben (Abbildung 17).

Zusätzlich wurde die Expression des viralen E4 Proteins, welches erst in differenzierten Keratinozyten exprimiert wird, in den Kryoschnitten der organotypischen Zellkulturen untersucht. Wie in Abbildung 17 dargestellt, konnten dabei in den oberen Zellschichten des Wildtyp Epithels einige E4 positive Zellen beobachtet werden, was auf eine erfolgreiche Initiierung der späten Phase des viralen Lebenszyklus (Aktivierung des P742 Promotors) in den organotypischen Zellkulturen hinweist. Auch in den mutierten HPV31 positiven organotypischen Zellkulturen konnten in den oberen Zellschichten E4 positive Zellen beobachtet werden, was bedeutet, dass auch hier die späte Phase des viralen Lebenszyklus initiiert wurde.

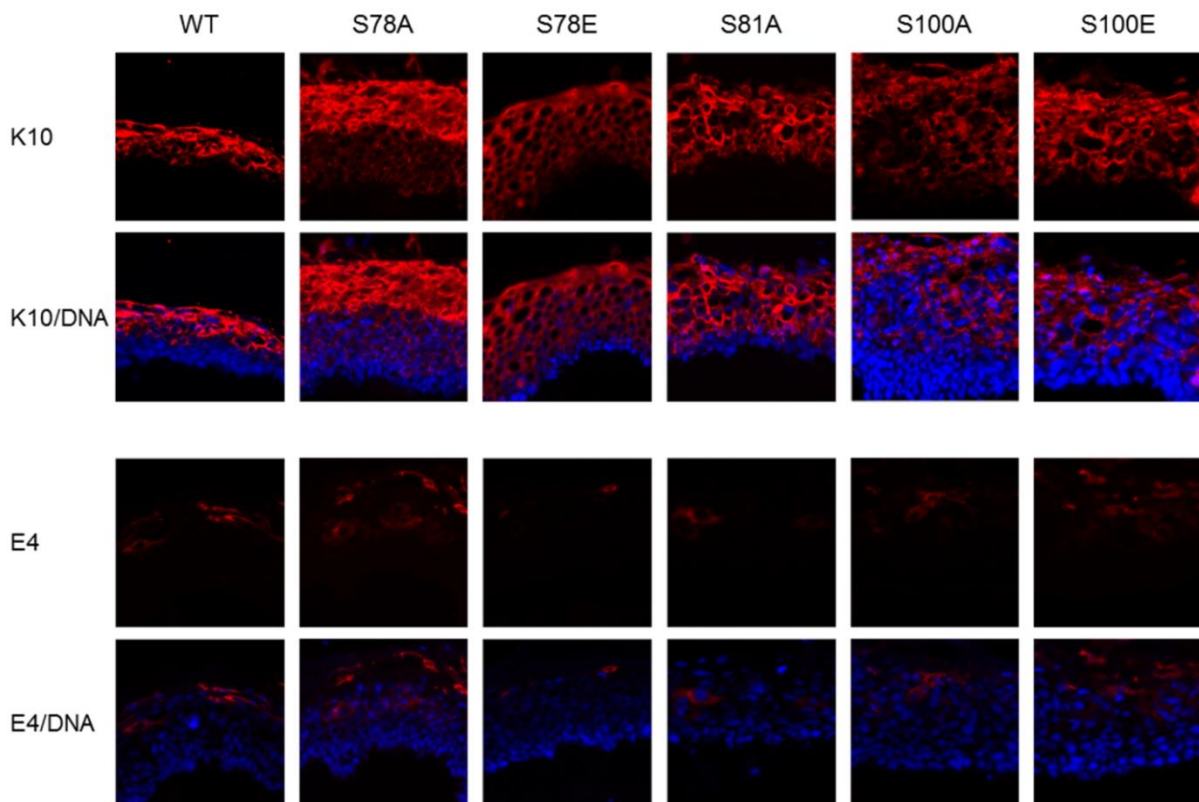


Abbildung 17: E8^{E2} Mutationen wirken sich nicht auf die Differenzierung der Keratinozyten aus. Die verschiedenen HPV31 positiven Zelllinien wurden als organotypische Zellkulturen kultiviert und nach 12 Tagen wurden Kryoschnitte der Kulturen hergestellt. Diese wurden mit einem Antikörper gegen Keratin 10 (K10) bzw. E4 gefärbt (rot). Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

Als nächstes wurde untersucht, ob E8^{E2} mutierte organotypische Zellkulturen Unterschiede in der viralen Genomkopienzahl aufweisen. Dazu wurde gesamtzelluläre DNA aus den Kulturen isoliert und mittels Multiplex qRT-PCR analysiert. Wie in Abbildung 18A dargestellt waren dabei generell nur geringe Unterschiede zwischen den viralen Genomkopienzahlen in einschichtigen Zellkulturen und organotypischen Zellkulturen zu beobachten. Diese Beobachtung ist dabei vereinbar mit der Annahme, dass nur in einem geringen Anteil der differenzierten Zellen virale Genomamplifikation initiiert wird. Für HPV31 Wildtyp Zelllinien konnten im Mittel 212 Viruskopien pro Zelle gemessen werden. Für die S78A Mutante war die virale Kopienzahl mit 280 Viruskopien pro Zelle leicht erhöht. Für die S78E Mutante war jedoch ebenfalls eine geringfügig erhöhte virale Kopienzahl zu beobachten (431 Viruskopien pro Zelle) was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei nicht um einen phosphorylierungs-abhängigen Phänotyp handelt. Auch für die S100A Mutante konnte eine Erhöhung der Kopienzahl beobachtet werden (575 Viruskopien pro Zelle), wohingegen für die S100E Mutante nur 65 Viruskopien pro Zelle gemessen werden konnte. Diese Unterschiede waren jedoch

statistisch nicht signifikant (ermittelt über einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test). Außer der viralen Kopienzahl wurden ebenfalls die Expression viraler Transkripte in organotypischen Zellkulturen gemessen. Beim Vergleich der einschichtigen und organotypischen Wildtyp Zellkulturen zeigte sich, dass es durch Differenzierung zu einem Anstieg der viralen Transkription kam. Für E6* war dabei ein 2,8-facher Anstieg zu beobachten, für E1 war dieser Anstieg 3,6-fach, für E2 3,5-fach, für E8^E2 1,8-fach, für E1^E4 3,3-fach und für L1 28,1-fach. Dies bestätigt erneut, dass in den organotypischen Zellkulturen die späte Phase des viralen Lebenszyklus erfolgreich initiiert wurde (Abbildung 18B). Für die S78A Mutante konnte eine leicht verringerte Expression von E6*, verglichen mit dem Wildtyp oder der S78E Mutante beobachtet werden (1,6-fach bzw. 1,4-fach), wohingegen die Expression von E1, E2, E8^E2 und E1^E4 nicht verändert war. L1 Transkripte waren für die S78A und S78E Mutanten gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht (4,6-fach bzw. 5,3-fach), jedoch erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz (ermittelt über einseitigen ANOVA mit Dunnett-Test).

Für die S100A Mutante waren die E6* Transkripte gegenüber dem Wildtyp leicht reduziert (1,5-fach), die E8^E2 und E1^E4 Transkripte leicht erhöht (1,7-fach bzw. 3-fach) und die L1 Transkripte deutlich erhöht (28-fach). Für die S100E Mutante konnte, verglichen mit der S100A Mutante für alle Transkripte eine Abnahme beobachtet werden. Keiner dieser Unterschiede erreichte jedoch statistische Signifikanz.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass weder die Phosphorylierung von S78 noch die Phosphorylierung von S100 im E8^E2 Protein die virale Replikation oder Transkription in undifferenzierten oder differenzierten Keratinozyten beeinflusst.

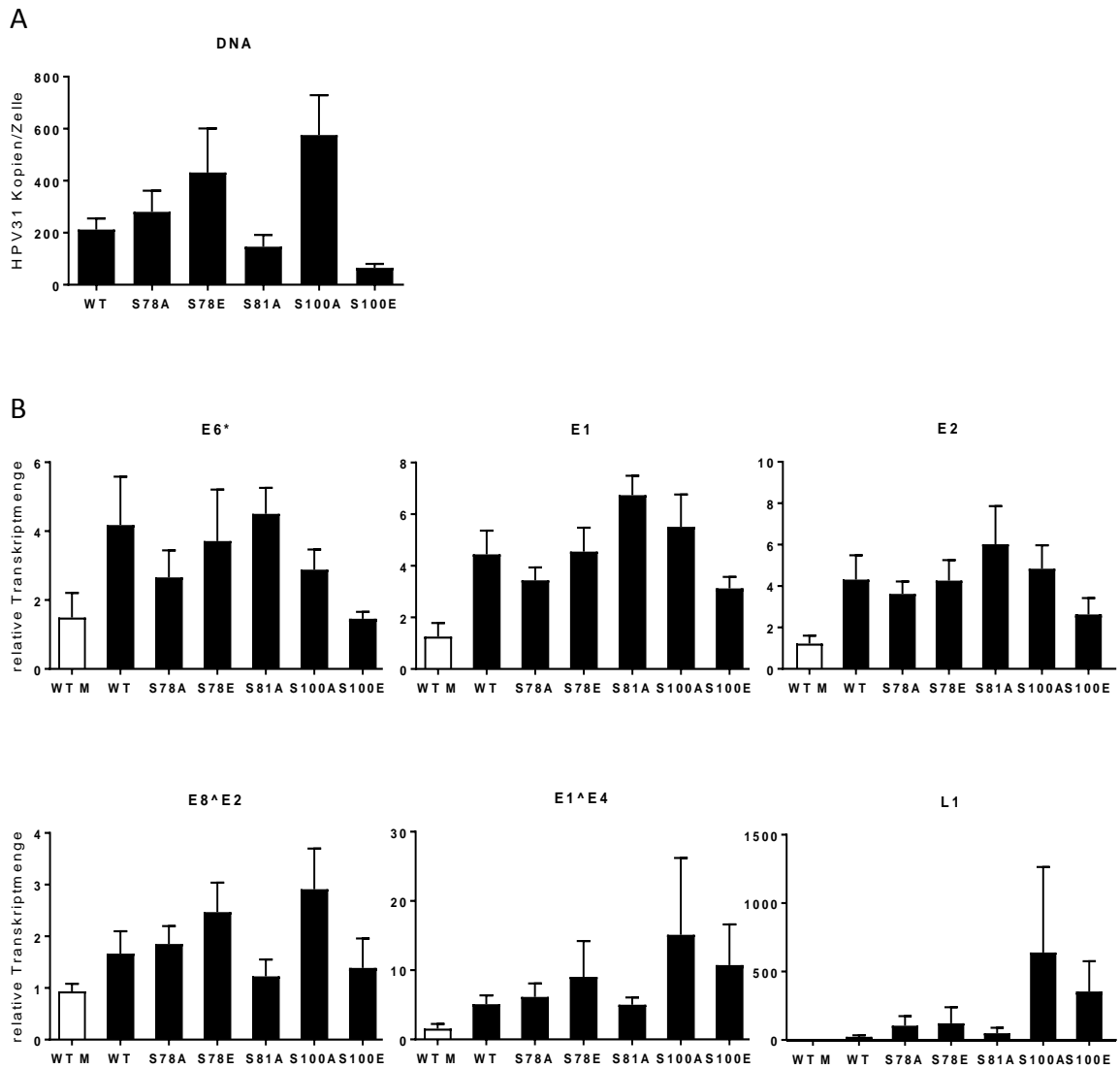


Abbildung 18: Phosphorylierung beeinflusst nicht die Genomkopienzahl differenzierter Keratinozyten. (A) Gesamtzelluläre DNA wurde nach 12 Tagen aus organotypischen Zellkulturen (HPV 31 Wildtyp oder Mutanten) isoliert und 50 ng mittels Multiplex qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind die HPV31 E2 Kopien pro zwei beta-Aktin Kopien. (C) RNA der HPV31 positiven organotypischen Zellkulturen (Wildtyp oder Mutanten) bzw. aus einschichtigen HPV31wt-Zelllinien (WT M) wurde isoliert und mittels qRT-PCR die Expression viralen Transkripte gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit PGK1 als Referenz bezogen auf die Wildtyp Zelllinien. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von $n \geq 4$ unabhängigen organotypischen Zellkulturen.

4.1.11 Die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} S78 reguliert die Transkription zellulärer Gene

Die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} S78 könnte die Regulation der Expression zellulärer Gene beeinflussen. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. RNA von HPV31 E8^{E2} S78A Zelllinien, welche als organotypischen Zellkulturen kultiviert wurden, sollte dabei mit RNA aus organotypischen Zellkulturen der HPV31 E8^{E2} S78E Zelllinien verglichen werden. Die Wahl des Phospho-Mimetikums anstelle des Wildtyp Proteins ist, wie bereits für die SILAC-Experimente (vgl. Abschnitt 4.1.8) damit zu begründen, dass für diese Kombination die maximalen Effekte zu erwarten sind. Insgesamt wurde die RNA von jeweils drei Zelllinien von jeder Mutante (basierend auf Keratinozyten von unterschiedlichen Spendern) mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Die RNA-Sequenzierung wurde dabei von MFT Services in Tübingen durchgeführt, die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch das Zentrum für Quantitative Biologie der Universität Tübingen.

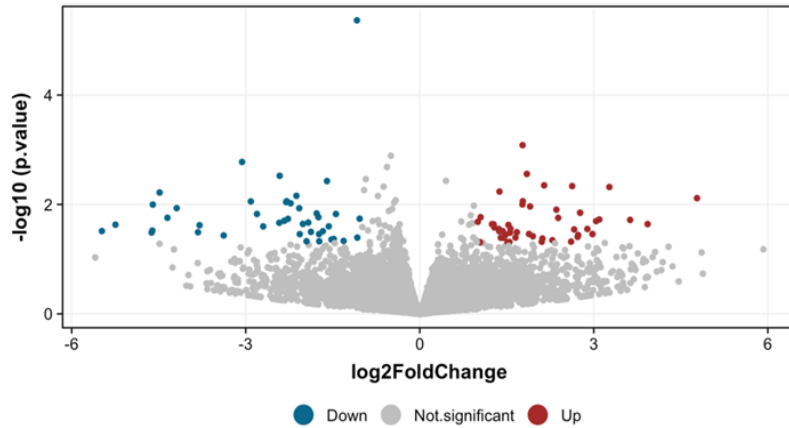
Wurde bei der Auswertung ein, für die falsch positive Entdeckungsrate angepasstes Signifikanzniveau von $p=0,05$ gewählt konnten keine Gene detektiert werden, welche in den beiden Zelllinien signifikant unterschiedlich reguliert wurden. Ohne Anpassung für die falsch positive Entdeckungsrate und einem Signifikanzniveau von $0,05$ konnten 92 unterschiedlich regulierte Gene mit einer mindestens 2-fachen Änderung der Genexpression detektiert werden (Abbildung 19A). Dabei war die Expression von 43 Genen in S78A Zelllinien vermindert und die Expression von 49 Genen erhöht (Tabelle 11 im Anhang).

Von diesen 92 Genen wurden im Folgenden fünf ausgewählt, deren Expression mittels qRT-PCR validiert werden sollte. Dabei handelte es sich um die Gene CALB1 ($p=0,0008$), IFI27 ($p=0,03$), INSR1 ($p=0,02$), LYPD2 ($p=0,000004$) und UCA1 ($p=0,005$). Für die Validierung wurde neben der RNA, die für die Transkriptomanalyse verwendet wurde auch RNA von jeweils drei weiteren S78A bzw. S78E Zelllinien untersucht. Wie in Abbildung 19 dargestellt zeigte sich dabei, dass sich nur die Expression von LYPD2 (Ly6/PLAUR domain-containing protein 2) in S78A Zelllinien signifikant von der Expression in S78E Zelllinien unterschied (1,6-facher Unterschied). Für dieses Gen wurde daher zusätzlich die Expression in Wildtyp Zelllinien untersucht. Diese ähnelte dabei der Expression in S78E Zelllinien, was dafür spricht, dass es sich hierbei um eine phosphorylierungs-abhängige Regulation durch HPV31 E8^{E2} handelt. Des Weiteren wurde RNA von Zelllinien untersucht, welche als einschichtige Kulturen gehalten wurden. Dabei zeigte sich, dass die Expression von LYPD2 durch die Differenzierung verstärkt wird, wobei keine Unterschiede zwischen Wildtyp und mutierten Zelllinien zu erkennen waren (27,8-fach in Wildtyp Zelllinien, 30,2-fach in S78A Zelllinien und 21,4-fach in S78E Zelllinien).

Auch in den undifferenzierten Zelllinien zeigte sich eine 2-fach reduzierte Expression von LYPD2 in S78A Zelllinien verglichen mit Wildtyp Zelllinien und eine 2,3-fach reduzierte Expression verglichen mit S78E Zelllinien.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass durch die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} S78 die Transkription des zellulären Gens LYPD2 in undifferenzierten und differenzierten Keratinozyten reguliert wird.

A



B

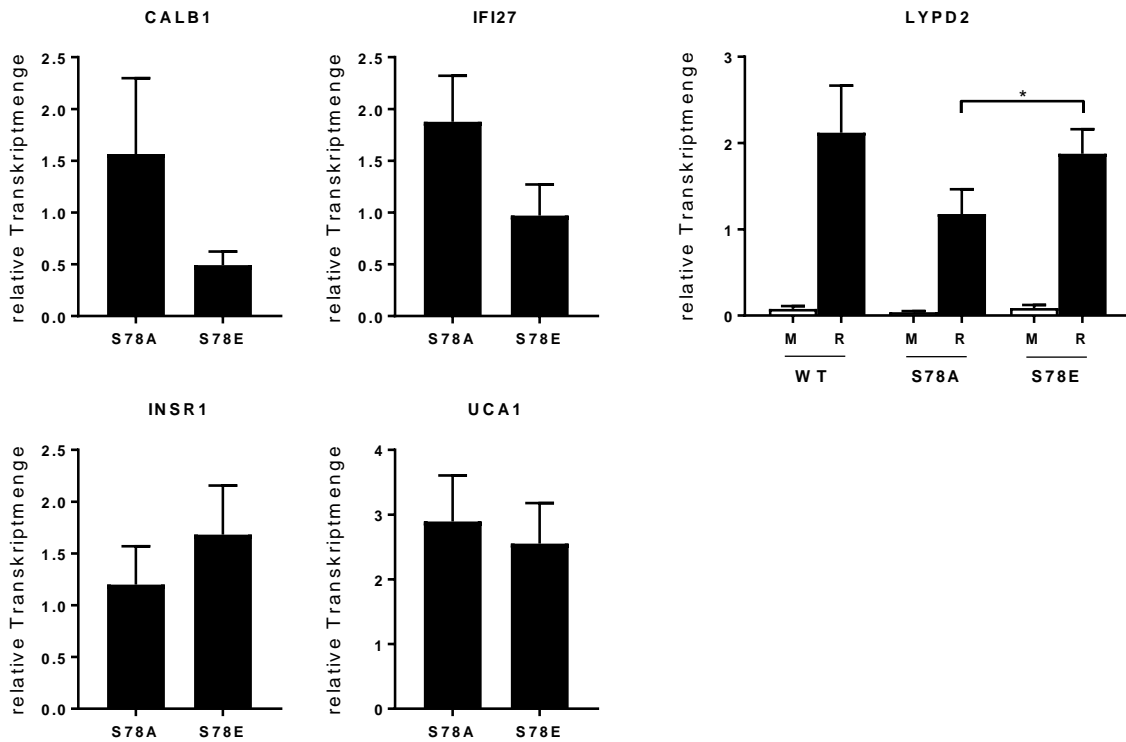


Abbildung 19: E8^AE2 S78 Phosphorylierung reguliert die Transkription von LYPD2. (A) Grafische Darstellung der Verteilung von hoch- (rote Punkte) bzw. herunterregulierten Genen (blaue Punkte) in HPV31 E8^AE2 S78A organotypischen Zellkulturen verglichen mit HPV31 S78E organotypischen Zellkulturen. (B) RNA von S78A und S78E organotypischen Kulturen (links) oder RNA von Wildtyp, S78A und S78E Zelllinien, welche als einschichtige Kulturen (M) oder organotypische Kulturen (R) kultiviert wurden (rechts), wurde isoliert und mittels qRT-PCR die Expression der angegebenen Transkripte gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit PGK1 als Referenz bezogen auf S78A organotypischen Kulturen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=6 unabhängigen organotypischen Zellkulturen und n=4 unabhängigen RNA-Präparationen aus einschichtigen Kulturen. Statistische Signifikanz wurde mit einem gepaarten t-Test ermittelt (*p<0.05).

4.2 HPV Replikation in normalen humanen Keratinozyten

Die Analysen der viralen Proteine im ersten Teil dieser Arbeit wurden größtenteils in permanenten Zelllinien (HeLa und RTS3b) durchgeführt. Diese Zelllinien wurden bereits über einen langen Zeitraum kontinuierlich passagiert, wodurch sie teilweise abweichende Charakteristika zu den Zellen aufweisen, die ursprünglich aus dem Gewebe gewonnen wurden. Um virale Proteinfunktionen in Zellen untersuchen zu können, welche die *in vivo* Situation besser widerspiegeln, wurden daher primäre humane Keratinozyten verwendet, welche mit den beiden Onkoproteinen HPV31 E6 und E7 immortalisiert wurden. In diesen immortalisierten Keratinozyten (31E6/E7-NHK) ist es dabei, anders als in HeLa oder RTS3b Zellen, weiterhin möglich die terminale Differenzierung und somit den produktiven Lebenszyklus der Papillomviren zu induzieren.

Die primären humanen Keratinozyten sind, wie in Abschnitt 4.1.10 gezeigt dazu in der Lage die virale Genomreplikation zu unterstützen. Wurden in den davon abgeleiteten immortalisierten Zellen jedoch Luziferase-Reporteranalysen, als Testsystem für virale Replikation (vgl. Abschnitt 4.1.4) durchgeführt konnte, anders als beispielsweise in HeLa Zellen überraschenderweise keine Zunahme der Luziferase-Aktivität gemessen werden (Abbildung 20).

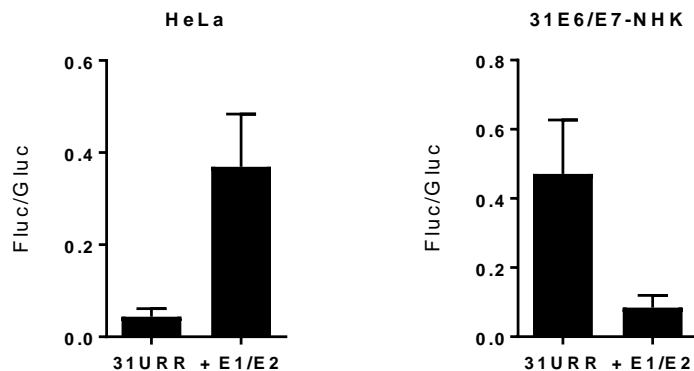


Abbildung 20: 31E6/E7-NHK zeigen keine Replikation des pGL31URR-Luc Reporterplasmids. 31E6/E7-NHK wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 300 ng pGL31URR-Luc und der angegebenen Menge der Expressionsvektoren für HPV31 E1 und HPV31 E2 kotransfiziert. Unterschiede in der DNA-Menge wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=6 (HeLa) bzw. n=7 (31E6/E7-NHK) unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden.

Gleichzeitig sind diese Zellen jedoch dazu in der Lage, die Aktivierung des Reporterplasmids pC18-SP1-Luc zu unterstützen (Abbildung 21). Dieses Reporterplasmid enthält vier E2-Bindungsstellen oberhalb eines minimalen Promotors, welcher die Expression der Firefly Luziferase kontrolliert und ermöglicht somit die Analyse der viralen Transkriptionsmodulation durch das E2 Protein. Dies deutet darauf hin, dass die Replikation des Reporterplasmids in diesen Zellen nicht auf Grund einer unzureichenden E2 Expression oder einer veränderten E2 Funktion gestört ist.

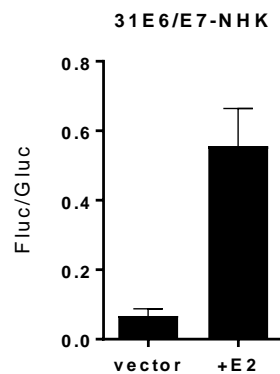


Abbildung 21: 31E6/E7-NHK unterstützen die Aktivierung des pC18-SP1-Luc Reporterplasmids. 31E6/E7-NHK wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 100 ng des pC18-SP1-Luc Reporters sowie 10 ng des HPV31 E2 Expressionsplasmids kotransfiziert. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von n=7 unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, weshalb es in HPV31 E6/E7-immortalisierten humanen Keratinozyten (31E6/E7-NHK) nicht möglich ist eine E1/E2-vermittelte Replikation des HPV-Reporterplasmids zu beobachten. Die Untersuchungen wurden dabei beispielhaft am HPV Typ 31 durchgeführt.

4.2.1 Lokalisation und Stabilität des E1 Proteins ist in 31E6/E7-NHK nicht beeinträchtigt

Die N-terminale Region der E1 Proteine enthält sowohl Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS) als auch Kernexportssignale (*nuclear export signal*, NES). Obwohl das E1 Protein hauptsächlich in den Zellkernen der infizierten Zellen lokalisiert ist, konnten verschiedene Studien zeigen, dass ein ständiger Transport der E1 Proteine von BPV1, HPV11 und HPV31 zwischen Zellkern und Zytoplasma stattfindet. Dieser Transport wird durch die Phosphorylierung des Proteins reguliert (Deng *et al.*, 2004; Fradet-Turcotte *et al.*, 2010). Die nicht statt findende Replikation des Reporterplasmids in 31E6/E7-NHK könnte darauf zurück zu führen sein, dass der E1-Kern-Zytoplasmatransports in diesen Zellen nicht korrekt reguliert wird, wodurch nicht genügend E1 Proteine im Zellkern lokalisiert sind, um eine Replikation zu gewährleisten.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden 31E6/E7-NHK mit einem Expressionsvektor für ein Flag-markiertes E1 Protein transfiziert und nach 48 h die Lokalisation von E1 in den Zellen mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich, dass in allen Zellen, welche positiv für E1 waren, das Protein vor allem im Zellkern lokalisierte, wohingegen im Zytoplasma der Zellen nur sehr schwache Signale zu beobachten waren (Abbildung 22). Auffällig war jedoch, dass insgesamt nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen positiv für E1 war.

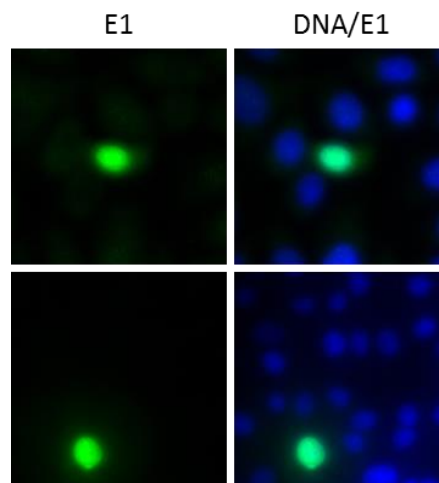


Abbildung 22: Lokalisation von E1 ist in 31E6/E7-NHK nicht beeinträchtigt. 31E6/E7-NHK wurden mit 500 ng eines Expressionsplasmids für Flag-markiertes E1 Protein (pCMV neo 3xFlag-31E1) transfiziert, 48 Stunden nach Transfektion mit einem anti-Flag Antikörper gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

4.2.2 Titrationsen der E1 und E2 Expressionsplasmide resultieren nicht in einer Replikation des Reporterplasmids

Interessanterweise konnte in 31E6/E7-NHK nicht nur keine Replikation (Zunahme der Luziferase-Aktivität) beobachtet werden, sondern sogar eine 5,6-fache Repression des Reporterplasmids (Abbildung 20). Für das virale E2 Protein ist bekannt, dass es den frühen viralen Promotor inhibieren kann (McBride, 2013). Die beobachtete Repression könnte darauf hinweisen, dass die für die Luziferase-Reporteranalyse transfizierte DNA Menge des Expressionsplasmids für E2 (30 ng) nicht optimal, sondern zu hoch gewählt ist. Ebenfalls könnte eine zu niedrig gewählte Konzentration des E1 Expressionsplasmids Grund für die insuffiziente E1 Expression in diesen Zellen und somit Grund für die nicht stattfindende virale Replikation sein. Um diese Annahmen zu untersuchen, wurde daher getestet, ob eine Veränderung der transfizierten DNA Menge zu einer Zunahme der Luziferase-Aktivität führt. Wie in Abbildung 23 dargestellt, konnte jedoch auch bei einer Erhöhung der transfizierten E1 DNA Menge keine virale Replikation beobachtet werden. Ebenfalls wurde auch durch eine Verringerung der transfizierten E2 DNA Menge keine Zunahme der Luziferase-Aktivität erzielt, was darauf hinweist, dass die beobachtete Repression nicht E2-vermittelt ist.

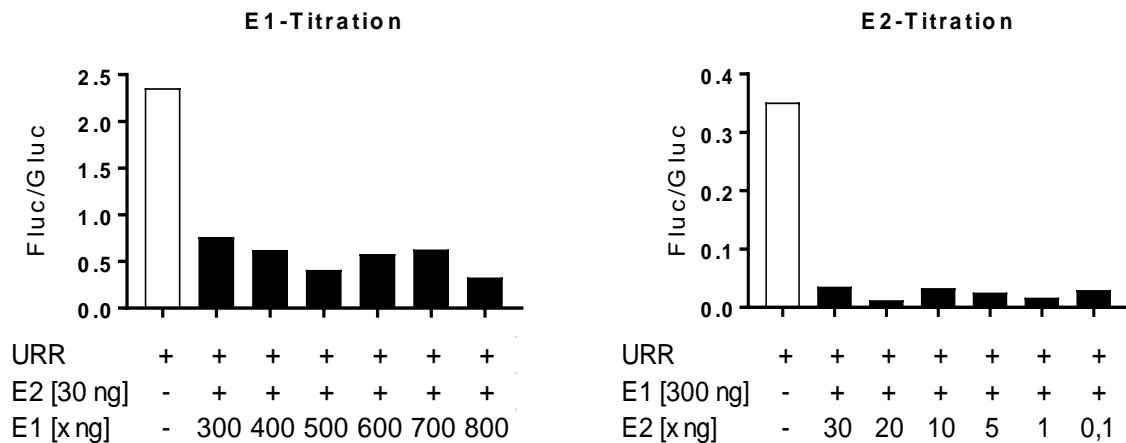


Abbildung 23: E1- und E2-Titration in 31E6/E7-NHK. Die Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 300 ng pGL31URR-Luc und der angegebenen Menge der Expressionsplasmide für HPV31 E1 und HPV31 E2 kotransfiziert. Unterschiede in der DNA Menge wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt.

4.2.3 5'-verlängerte E1-Konstrukte erhöhen die Luziferase-Aktivität

HPV18 E1 Proteine werden von einer polycistronischen mRNA exprimiert, welche Leserahmen für E6, E7 und E1 enthält (Remm *et al.*, 1999). Remm und Kollegen beobachteten, dass E1 Proteine von HPV6, HPV11 und HPV18 nur gering exprimiert werden, wenn der Leserahmen für das E1 Protein ohne flankierende 5'-Sequenzen in Expressionsplasmide kloniert wird. Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob die Expression des HPV31 E1 Proteins durch das Einfügen von flankierenden Sequenzen ebenfalls verbessert und dadurch die E1/E2-vermittelte Replikation des pGL31URR-Luc Reporterplasmids ermöglicht werden kann. Zu diesem Zweck wurden zwei E1 Expressionsplasmide generiert, welche zusätzlich die oberhalb des E1 Leserahmen liegende DNA-Sequenz, beginnend beim P97 bzw. P742 Promoter, enthalten (pSG31 P97/E1 bzw. pSG31 P742/E1). Diese Expressionsplasmide wurden zusammen mit dem Expressionsplasmid für E2 und dem pGL31URR-Luc Reporterplasmid in 31E6/E7-NHK und zur Kontrolle in HeLa Zellen transfiziert und nach 48 Stunden die Luziferase-Aktivität gemessen. In HeLa Zellen konnte durch eine Kotransfektion der 5'-verlängerten E1 Expressionsvektoren eine 3,5-fach (pSG31 P97/E1) bzw. 3,8-fach (pSG31 P742/E1) stärkere Replikation des Reporterplasmids beobachtet werden (Abbildung 24). Auch in 31E6/E7-NHK konnte mit beiden Konstrukten eine erhöhte Luziferase-Aktivität beobachtet werden (1,6-fach für P97/E1 bzw. 4,1-fach für P742/E1 gegenüber dem einfachen E1-Konstrukt). Allerdings konnte in dieser Zelllinie auch unter Verwendung der verlängerten Konstrukte keine Replikation des Reporterplasmids beobachtet werden.

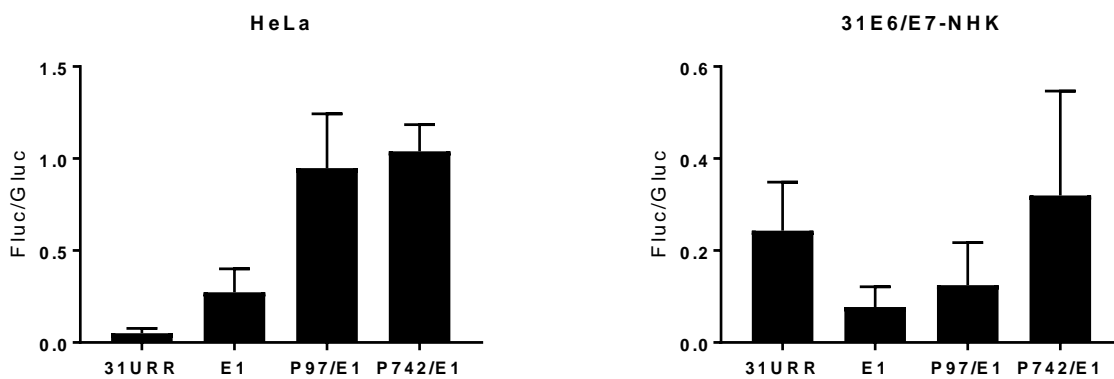


Abbildung 24: Verlängerte E1-Konstrukte führen nicht zu einer Replikation des Reporterplasmids. HeLa Zellen und 31E6/E7-NHK wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng bzw. 300 ng pGL31URR-Luc, 100 ng bzw. 300 ng der angegebenen E1 Expressionsplasmide und 10ng bzw. 30ng des E2 Expressionsplasmids kotransfiziert. Unterschiedliche DNA Mengen wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von jeweils n=4 (HeLa) bzw. n=5 (31E6/E7-NHK) unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden.

4.2.4 Codon-Optimierung von HPV31 E1 erhöht die Luziferase-Aktivität

Eine insuffiziente E1 Expression in 31E6/E7-NHK könnte außer durch eine zu geringe transfizierte E1 DNA Menge auch dadurch bedingt sein, dass Spleiß-Signale im E1 Leserahmen die Expression des E1 Proteins beeinflussen. Dem würde durch eine Codon-Optimierung des E1 Gens entgegen gewirkt werden. Um zu untersuchen, ob eine Codon-Optimierung von E1 zu einer besseren E1 Expression und dadurch zu einer Replikation des Reporterplasmid in 31E6/E7-NHK führt, wurden 31E6/E7-NHK und als Kontrolle HeLa Zellen mit dem Reporterplasmid pGL31URR-Luc sowie mit Expressionsplasmide für HPV31 E1 und E2 kotransfiziert. Dabei wurden zusätzlich zum unmodifizierten E1 Expressionsplasmid zwei unterschiedliche Expressionsplasmide für Codon-optimiertes E1 verwendet (pCMV neo 3xFlag-31E1 und pSG 31 E1 3xFlag). Bei der Codon-Optimierung wurde die Gensequenz so modifiziert, dass die im menschlichen Organismus statistisch am häufigsten genutzten Codons für die entsprechenden Aminosäuren kodieren.

Wie in Abbildung 25 dargestellt konnte bei der Kotransfektion der Codon-optimierten E1 Konstrukte in HeLa Zellen eine deutliche Verbesserung der viralen Replikation beobachtet werden, verglichen mit der Kotransfektion des nicht modifizierten E1 Gens (7,6-fache Verbesserung durch pCMV neo 3xFlag-31E1 bzw. 4,2-fache Verbesserung durch pSG 31 E1 3xFlag). In 31E6/E7-NHK hingegen konnte auch unter Verwendung der Codon-optimierten E1 Konstrukte keine Replikation des Reporterplasmids beobachtet werden. Allerdings wurde die Repression des Reporterplasmid aufgehoben, was darauf hindeutet, dass die Verwendung der Codon-optimierten Konstrukte die Expression des E1 Proteins auch in 31E6/E7-NHK verbessert.

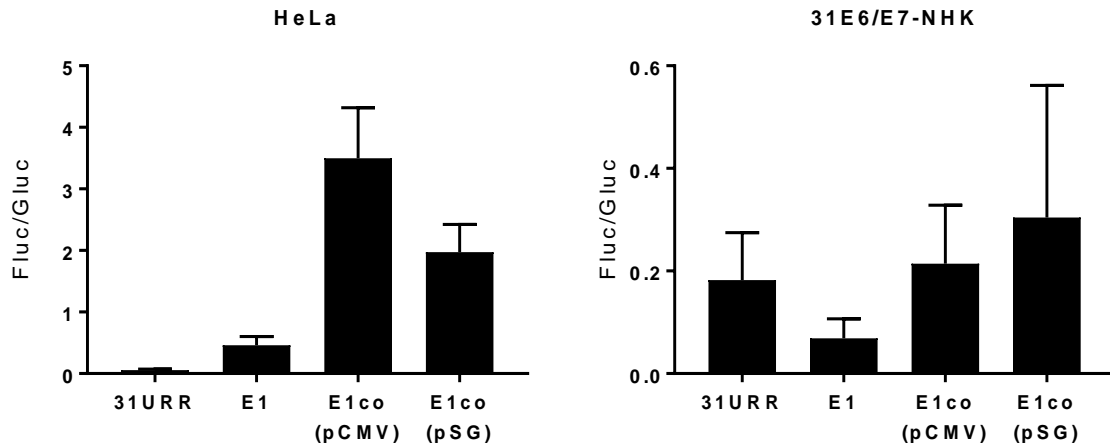


Abbildung 25: Codon-Optimierung von E1 führt nicht zu einer Replikation des Reporterplasmids. HeLa Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 50 ng pGL31URR-Luc, 100 ng der angegebenen E1 Expressionsplasmide und 10 ng des E2 Expressionsplasmids kotransfiziert. 31E6/E7-NHK wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 300 ng pGL31URR-Luc, 300 ng der angegebenen E1 Expressionsplasmide und 30 ng des E2 Expressionsplasmids kotransfiziert. Unterschiede in der DNA Menge wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von jeweils $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden.

4.2.5 Kotransfektion weiterer früher viraler Gene resultiert nicht in einer Replikation des Reporterplasmids

Primäre Keratinozyten, von welchen die 31E6/E7-NHK Zelllinie abgeleitet ist, sind in der Lage die virale Genomreplikation in der Zellkultur zu unterstützen. In undifferenzierten Keratinozyten werden neben den E1 und E2 Proteinen noch weitere frühe Proteine (E4, E5, E6, E7 und E8^{E2}) von den viralen Genomen exprimiert. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch für die Replikation des Reporterplasmids außer den Replikationsproteinen E1 und E2 noch die frühen Proteine E4 und E5 benötigt werden, bzw. dass in den 31E6/E7-NHK die Menge der viralen E6 und E7 Proteine nicht ausreicht um die Replikation des Reporterplasmids zu gewährleisten. Auch denkbar wäre, dass geringe Mengen des Repressors E8^{E2} benötigt werden, um Gleichgewichte zwischen den viralen Proteinen zu regulieren und so eine korrekte Replikation zu gewährleisten. Um dies zu untersuchen, wurden 31E6/E7-NHK mit dem Reporterplasmid pGL31URR-Luc sowie mit Expressionsplasmide für HPV31 E1 und E2 kotransfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen auch mit zwei unterschiedlichen Mengen der Expressionsplasmide für HPV31 E4, E5, E6 oder E7 transfiziert bzw. mit einer geringen Menge des Expressionsplasmids für HPV31 E8^{E2}. Wie in Abbildung 26 dargestellt zeigte sich dabei, dass die Kotransfektion von keinem der frühen Genprodukte zu einer erfolgreichen Replikation des Reporterplasmids führte. Durch die Kotransfektion von 300 ng an E4, E6 oder E7 war es lediglich

möglich die E1/E2-vermittelte Repression des Reporters aufzuheben. Diese Daten zeigen, dass die E1/E2-vermittelte Replikation des Reporterplasmids in 31E6/E7-NHK nicht durch das Fehlen eines einzelnen weiteren frühen Proteins bedingt wird.

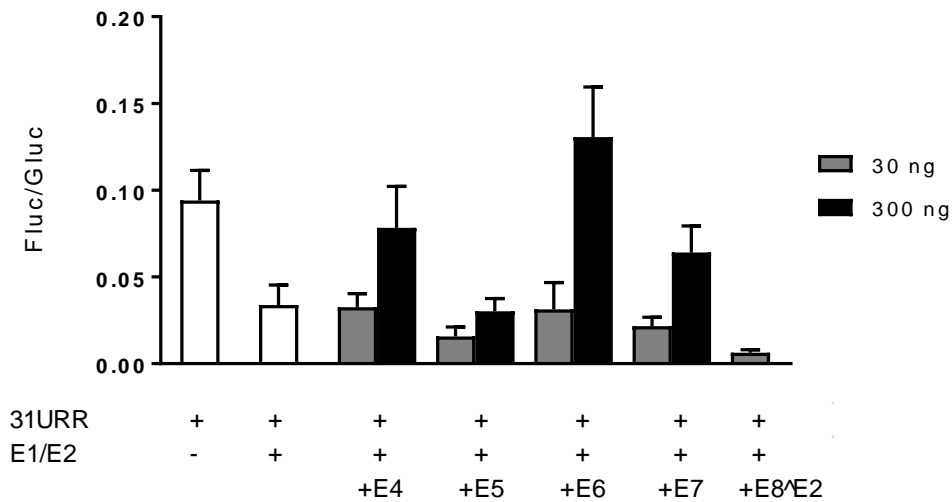


Abbildung 26: Kotransfektion früher Genprodukten ermöglicht keine Replikation in 31E6/E7-NHK. Die Zellen wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 300 ng pGL31URR-Luc, 300 ng des E1 Expressionsplasmids (pSG31 E1), 30 ng des E2 Expressionsplasmids sowie 20 ng bzw. 300 ng der Expressionsplasmide für E4, E5, E6, E7 oder E8^{E2} kotransfiziert. Unterschiedliche DNA Mengen wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von jeweils n=3-4 unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden.

4.2.6 Die Inhibition der DNA-Schadensantwort führt nicht zur Replikation in 31E6/E7-NHK

Mehrere Publikationen zeigen, dass E1 Proteine eine DNA-Schadensantwort (*DNA-Damage-Response*, DDR) in den Wirtszellen auslösen können. Dies liegt vermutlich an der Helikase-Aktivität von E1 bzw. an der Interaktion von E1 mit der zellulären DNA und der daraus resultierender unregulierten Entwindung der zellulären DNA, die Auslöser für die DNA-Schadensantwort ist (Bristol *et al.*, 2017). In differenzierten Keratinozyten zeigte sich, dass diese DNA-Schadensantwort vorteilhaft für den viralen Lebenszyklus ist, vermutlich da auf diese Weise zelluläre DNA-Replikationsproteine und DNA-Schadensreparaturproteine auch für die virale Replikation verfügbar gemacht werden (Spriggs & Laimins, 2017). Zugleich werden durch die DNA-Schadensantwort, die in einer Aktivierung der ATM-Kinase (*ataxia telangiectasia mutated* Kinase) resultiert, auch Signalwege initiiert, welche letztendlich zu einem Zellzyklusarrest oder der Apoptose führen. Die Aktivierung der

ATM Kinase führt darüber hinaus auch zur Phosphorylierung des Histonproteins H2AX am Serin 139. Diese phosphorylierte Form von H2AX wird auch als γ H2AX bezeichnet, ist an der Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen beteiligt und ist somit ein DNA-Schadensmarker (Alberts *et al.*, 2014). In undifferenzierten, sich noch teilenden Keratinozyten muss dem ATM-vermittelten Zellzyklusarrest entgegen gewirkt werden, um sicher zu stellen, dass sich die infizierten Zellen weiterhin teilen und somit den langfristigen Erhalt der Viren zu gewährleisten (Spriggs & Laimins, 2017). Dies wird unter anderem auch über eine Regulation des E1-Kern-Zytoplasmatransports erreicht (Fradet-Turcotte *et al.*, 2010).

Diese Befunde könnten darauf hinweisen, dass nicht eine insuffiziente E1 Expression, sondern eine zu starke DNA-Schadensantwort für das Ausbleiben der viralen Replikation in 31E6/E7-NHK verantwortlich ist. Um diese Annahme zu untersuchen, wurden zunächst 31E6/E7-NHK mit dem Reporterplasmid pGL31URR-Luc sowie mit Expressionsplasmide für Flag-markiertes E1 (pCMV neo 3xFlag-31E1) und E2 kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Flag-E1 und γ H2AX angefärbt und die Expression dieser Proteine mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass alle E1 positiven Zellen eine sehr starke Expression von γ H2AX aufwiesen (Abbildung 27), wohingegen E1 negative Zellen meist auch negativ für den DNA-Schadensmarker γ H2AX waren. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass eine zu starke DNA-Schadensantwort die virale Replikation in 31E6/E7-NHK verhindert.

Um diese Theorie weiter zu untersuchen, wurden 31E6/E7-NHK mit dem Reporterplasmid pGL31URR-Luc und Expressionsplasmide für HPV31 E1 und E2 kotransfiziert und 48 Stunden nach Transfektion die virale Replikation als Zunahme der Luziferase-Aktivität gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen 24 Stunden bzw. 48 Stunden vor der Messung mit dem ATM Kinase Inhibitor Ku-55933 behandelt, um einen durch die DNA-Schadensantwort ausgelösten Zellzyklusarrest der Zellen zu verhindern und eine virale Replikation zu ermöglichen. Überraschenderweise zeigte sich dabei, dass auch nach Behandlung mit Ku-55933 in 31E6/E7-NHK keine Zunahme der Luziferase-Aktivität bei Kotransfektion von E1 und E2 zu beobachten war, also keine virale Replikation stattfand (Abbildung 27).

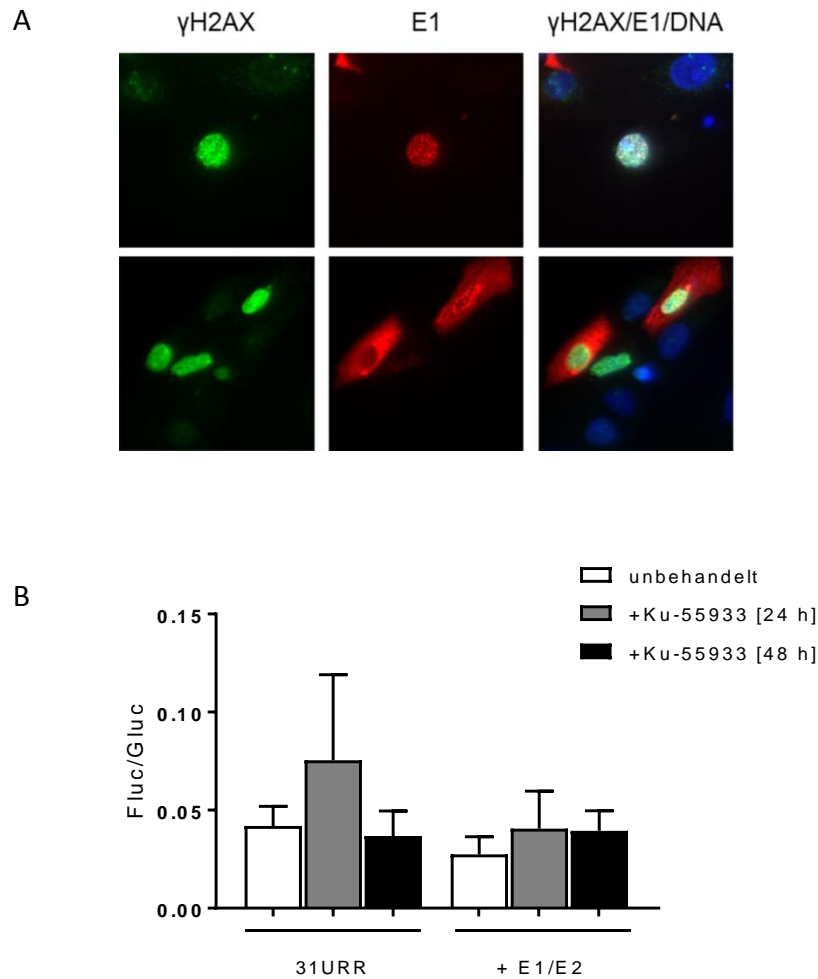


Abbildung 27: Die Transfektion von E1 löst eine starke DNA-Schadensantwort in 31E6/E7-NHK aus. (A) 31E6/E7-NHK wurden mit 700 ng des Reporterplasmids pGL31URR-Luc, 700 ng eines Expressionsplasmids für Flag-markiertes E1 Protein (pCMV neo 3xFlag-31E1) und 70 ng des Expressionsplasmids für E2 kotransfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit einem anti-Flag Antikörper (rot) oder einem anti- γ H2AX Antikörper (grün) gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt. (B) 31E6/E7-NHK wurden mit 0,5 ng pCMV-Gluc, 300 ng pGL31URR-Luc, 300 ng des E1 Expressionsplasmids (pSG31 E1) und 30 ng des E2 Expressionsplasmids kotransfiziert. Unterschiedliche DNA Mengen wurden mit dem leeren Expressionsplasmid pSG5 ausgeglichen. Die Zellen wurden zusätzlich für 24 Stunden, bzw. 48 Stunden mit dem Inhibitor Ku-55933 (Endkonzentration 10 μ M) behandelt. Die Werte sind als Verhältnisse der Fluc zur Gluc Aktivität dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM von jeweils n=3-4 unabhängigen Experimenten, welche als Duplikate durchgeführt wurden.

Die Aktivierung der ATM Kinase resultiert in der Phosphorylierung mehrere Substratproteine. Unter anderem wird p53 an Serin 15 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Das aktivierte p53 führt über die Aktivierung des p21 Proteins und der dadurch bedingten Inhibition von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK) zu einem Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase.

Um die Auswirkungen der DNA-Schadensantwort in 31E6/E7-NHK auf die virale Replikation weiter zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt die Expression des Effektorproteins p21 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden 31E6/E7-NHK, welche mit dem Reporterplasmid sowie Expressionsplasmide für HPV31 E1 und E2 kotransfiziert wurden 48 Stunden nach Transfektion mit Antikörpern gegen Flag-E1 und p21 angefärbt und mikroskopiert. Überraschenderweise zeigte sich dabei, dass alle Zellen, welche das viralen E1 Protein exprimierten keine p21 Expression aufwiesen, bzw. alle p21 positiven Zellen negativ für das E1 Protein waren (Abbildung 28). Dies könnte darauf hinweisen, dass sich die Zellen nicht in der optimalen Zellzyklusphase (der frühen S-Phase) befinden, um die Replikation des Reporterplasmids zu unterstützen.

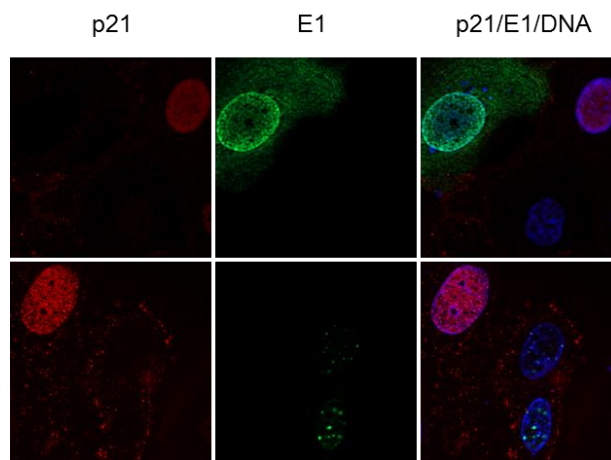


Abbildung 28: E1 positive Zellen sind negativ für p21. 31E6/E7-NHK wurden mit 700 ng des Reporterplasmids pGL31URR-Luc, 700 ng des pCMV neo 3xFlag-31E1 Expressionsplasmids und 70 ng des Expressionsplasmids für E2 kotransfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit einem anti-Flag Antikörper (grün) oder einem anti-p21 Antikörper (rot) gefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DNA wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

5 DISKUSSION

Humane Papillomviren (HPV) gehören zu den am häufigsten sexuell übertragbaren Krankheitserregern weltweit. Während die meisten Infektionen asymptomatisch verlaufen kann die persistente Infektion einiger weniger Alpha-Papillomviren die Entstehung von Oropharynxkarzinomen oder Karzinomen des Anogenitaltrakts, insbesondere der Zervix bewirken.

HPV infizieren undifferenzierte Keratinozyten der basalen Epithelschicht von Haut und Schleimhäuten. Nach der Primärinfektion findet in den Wirtszellen eine initiale Amplifikation statt, wodurch die virale Kopienzahl auf ungefähr 100 ansteigt. Danach gehen die Viren in eine persistente Phase über, in welcher die Zahl der viralen Genome pro Zelle konstant gehalten wird. Der HPV Lebenszyklus hängt stark von der Differenzierung der infizierten Keratinozyten ab. Erst durch die Differenzierung der Wirtszelle wird eine zweite starke Amplifikationsrunde eingeleitet, die Kapsidproteine L1 und L2 exprimiert und letztendlich neue infektiöse Partikel produziert. Die Replikation während der initialen Amplifikationsphase ist abhängig von den beiden viralen Proteinen E1 und E2, welche im Komplex an den viralen Replikationsursprung binden (Bergvall *et al.*, 2013; McBride, 2013). E1 besitzt eine Helikase-Aktivität und rekrutiert zelluläre Replikationsproteine zum viralen Replikationsursprung, wodurch die Replikation eingeleitet wird. E2 dient nicht nur als Replikationsprotein sondern ist auch ein Regulator der viralen Transkription und vermittelt die Bindung des viralen Genoms an die Wirtschromosomen während der Mitose.

Neben dem vollständigen E2 Protein kodieren mehrere HPV für eine verkürzte Form des E2 Proteins, welches durch alternatives Spleißen entsteht. Dieses E8^{E2} Protein besteht aus der C-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne sowie der Hinge-Region des E2 Proteins und einer kurzen N-Terminale E8-Domäne. Das HPV E8^{E2} Protein ist ein wichtiger Regulator der viralen Transkription und Replikation wobei die E8-Domäne für die Repressionsaktivität verantwortlich ist (Zobel *et al.*, 2003; Dreer *et al.*, 2016). Virale Genome, welche kein E8^{E2} exprimieren können, zeigen eine stark erhöhte Genomkopienzahl in Kurzzeitanalysen (Stubenrauch *et al.*, 2000; Zobel *et al.*, 2003; Lace *et al.*, 2008). In Langzeitanalysen zeigt sich eine erhöhte Genomkopienzahl für HPV16 Genome, wohingegen HPV31 Genome in die Wirtschromosomen integrieren (Stubenrauch *et al.*, 2000; Lace *et al.*, 2008; Straub *et al.*, 2014).

5.1 Das E8^{E2} Protein von HPV31 wird phosphoryliert

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die E2 Proteine verschiedener Papillomviren post-translational modifiziert werden (McBride, 2013). Die Hauptphosphorylierungsstellen des E2 Proteins des bovinen Papillomvirus 1 (S298 und S301) befinden sich in der Hinge-Region des Proteins und regulieren die Proteinstabilität sowie die DNA-Bindungsaktivität. Auch die Phosphorylierungsstellen der humanen Papillomviren 8 und 16 sind in der Hinge-Region der Proteine lokalisiert und sind mit der Proteinstabilität sowie DNA-Bindungsaktivität der Proteine assoziiert (Sekhar & McBride, 2012; Chang *et al.*, 2014). Bisher gibt es jedoch keine Studien die untersuchen, ob die viralen E8^{E2} Repressorproteine, welche sowohl im C-Terminus als auch in der Hinge-Region mit dem E2 Protein identisch sind, ebenfalls durch Phosphorylierungen modifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter Verwendung einer HeLa basierten Zelllinie, in der die Expression des HPV31 E8^{E2} Proteins durch die Behandlung mit Doxycyclin induziert werden kann, mittels massenspektrometrischer Analysen gezeigt werden, dass das HPV31 E8^{E2} Protein ebenfalls phosphoryliert wird. In Übereinstimmung mit den Befunden für BPV1, HPV8 und HPV16 sind auch die phosphorylierten Serine 78, 81 und 100 des HPV31 E8^{E2} Proteins in der Hinge-Region lokalisiert. Massenspektrometrische Analysen von HeLa Zellen, welche mit E2 Expressionsplasmiden transfiziert wurden zeigten, dass die korrespondierenden Serine 266 und 269 im E2 Protein ebenfalls phosphoryliert werden. Interessanterweise konnte eine Phosphorylierung von S288, welches dem S100 von E8^{E2} entspricht in den durchgeführten Experimenten nicht detektiert werden.

Phos-Tag Analysen von unterschiedlichen HPV31 E8^{E2} transfizierten Keratinozyten Zelllinien lassen außerdem erkennen, dass S78 die Hauptphosphorylierungsstelle des Proteins darstellt; ungefähr 50 % der Proteine weisen an dieser Stelle eine Phosphorylierung auf. Eine deutlich geringere Fraktion des Proteins scheint hingegen an den Serin-Seitenketten 81 und 100 phosphoryliert zu sein.

Überraschenderweise deuten die Phos-Tag Analysen darauf hin, dass das E2 Protein hauptsächlich in der unphosphorylierten Form vorliegt. Dies könnte erklären, warum die Phosphorylierungsstellen des E2 Proteins in massenspektrometrischen Analysen nicht reproduzierbar identifiziert werden konnten. Ob die Phosphorylierung von S288 aus demselben Grund nicht identifiziert werden konnte oder ob dieses Serin in E2 Proteinen tatsächlich nicht phosphoryliert wird konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Da sich das E8^{E2} Protein nur im N-Terminus von E2 unterscheidet deutet der Befund, dass die Phosphorylierung der Proteine unterschiedlich stark ausgeprägt ist darauf hin, dass die Phosphorylierung des E8^{E2} Proteins von der E8-Domäne moduliert wird. Für HPV16 konnte gezeigt

werden, dass der N-Terminus von E2 die Calcineurin Phosphatase rekrutiert, was in einer Dephosphorylierung des E2 Proteins resultiert (Chang *et al.*, 2011). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für den unterschiedlichen Grad an Phosphorylierung von HPV31 E2 und E8^{E2} verantwortlich sein. Ebenfalls denkbar wäre, dass die Unterschiede in der Größe des N-Terminus von E2 (200 Aminosäuren) und E8^{E2} (12 Aminosäuren) zu einer Strukturveränderung der Hinge-Region führt, wodurch die phosphorylierten Serine der beiden Proteine unterschiedlich exponiert werden. Um genau zu klären, wodurch die Unterschiede in der Phosphorylierung von E2 und E8^{E2} zu Stande kommen sind in Zukunft weitere Untersuchungen nötig.

Serin 301 des BPV1 E2 Proteins wird von der Casein Kinase 2 (CK2) phosphoryliert. Diese acidophile Kinase phosphoryliert Serin- und Threonin-Seitenketten bevorzugt dann, wenn die Proteinsubstrate das Sequenzmotiv pS/pT-X-X-D/E aufweisen (Salvi *et al.*, 2009). Dabei kann das X an den Positionen +1 und +2 bezogen auf das phosphorylierte Serin (pS) bzw. das phosphorylierte Threonin (pT) für jede beliebige Aminosäure stehen, wohingegen sich an der +3 Position eine saure Aminosäure (Asparaginsäure D oder Glutaminsäure E) befindet. An der +3 Position des Serins 78 von HPV31 E8^{E2} befindet sich keine saure Aminosäure, jedoch ist an der +2 Position ein Asparaginsäurerest (D80) vorhanden. S78 befindet sich daher im untypischen CK2 Sequenzmotiv pS/pT-X-D/E und stellt somit ein potenzielles Substrat für diese Kinase dar. Interessanterweise ist D80 in allen Alpha-HPV-Typen konserviert, welche auch S78 aufweisen (Abbildung 5B). Der saure Aminosäurerest an der +3 Position des Sequenzmotivs kann ebenfalls durch eine phosphorylierte Aminosäure ersetzt werden, was eine hierarchischen Phosphorylierung des Substrates bedingt. Phos-Tag Analysen zeigen jedoch, dass dies bei der Phosphorylierung von S78 nicht der Fall ist, da die S81A Mutation keine Veränderung in der Intensität der unterschiedlich migrierenden Banden aufweist (Abbildung 6). Die S78 Phosphorylierung ist also nicht von der Phosphorylierung des S81 abhängig.

Serin 253 des HPV8 E2 Proteins befindet sich in der für viele verschiedene Kinasen gängigen Konsensussequenz R-X-X-pS. Das R an der -3 Position stellt dabei die Aminosäure Arginin dar, wohingegen das X an den -2 und -1 Positionen für eine beliebige Aminosäure steht. HPV8 E2 S253 wird von der Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert (Sekhar & McBride, 2012). Da sich auch S78 des HPV31 E8^{E2} Proteins innerhalb eines R-X-X-pS Sequenzmotivs befindet, kann vermutet werden, dass auch dieses Serin von der PKA phosphoryliert wird. Anders als der Asparaginsäurerest D80 ist R75 unter Alpha-Papillomviren jedoch nicht besonders stark konserviert. Auch die Phos-Tag Analysen der HeLa pInducer 31 E8^{E2}-HA Zellen, welche mit einem PKA oder CK2 Inhibitor behandelt wurden, lassen vermuten, dass PKA bei der Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} weniger von Bedeutung ist, wohingegen sich für CK2 eine Beteiligung an der Phosphorylierung vermuten lässt (Abbildung 7). Um endgültig aufzuklären welche Kinase für die Phosphorylierung des S78 verantwortlich ist, müssen in Zukunft jedoch weitere Analysen durchgeführt werden.

5.2 Die Phosphorylierung des E8^{E2} Proteins hat Auswirkungen auf dessen Funktion als Repressor der Replikation und Transkription

Die Untersuchungen der funktionellen Konsequenz einer HPV31 E8^{E2} Phosphorylierung wurden mittels Luziferase-Reporteranalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Mutation des Serins 78 zu Alanin die Aktivität des Proteins deutlich beeinflusste, wohingegen die entsprechende Mutation des E2 Proteins (S266A) keine Auswirkungen auf die Aktivität von E2 hatte. Durch eine Mutation des Serins 78 zu Glutaminsäure, was eine konstitutive Phosphorylierung des Proteins simuliert, konnte der beobachtete Effekt aufgehoben werden, wohingegen die entsprechende E2 Mutation (S266E) ebenfalls keine Auswirkung auf die Proteinaktivität hatte. Diese Daten zeigen deutlich, dass durch Phosphorylierung die E8^{E2} Repressionsaktivität spezifisch beeinflusst wird. Dabei ist die Phosphorylierung von S78 wichtig für die Funktion von E8^{E2} als Repressor der Replikation und Transkription. Der Phänotyp konnte in unterschiedlichen Keratinozyten basierten Zelllinien beobachtet werden und steht dabei im Einklang mit der Beobachtung, dass eine große Fraktion des E8^{E2} Proteins an diesem Serin phosphoryliert ist.

Für die Mutation des Serins 100 zeigte sich ebenfalls ein phosphorylierungs-abhängiger Phänotyp, wohingegen die entsprechenden E2 Mutationen keine Auswirkungen hatten. Interessanterweise scheint sich die Phosphorylierung an dieser Position jedoch negativ auf die Repressionsaktivität von E8^{E2} auszuwirken: Während die S100A Mutation keinen Funktionsveränderung aufweist, nimmt die Repressionsaktivität für die S100E Mutante deutlich ab. In Übereinstimmung damit zeigten Phos-Tag Analysen, dass nur ein geringer Anteil des E8^{E2} Proteins eine Phosphorylierung des S100 aufweist.

Für Phosphorylierung von E2 Proteinen an Aminosäureresten in der Hinge-Region konnte gezeigt werden, dass dies die DNA-Bindung der Proteine beeinflusst (Sekhar & McBride, 2012; Schuck *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). Für BPV1 führt die Phosphorylierung von S298 und S301 zu einer Verminderung der DNA-Bindeaktivität, wohingegen die Phosphorylierung von HPV8 und HPV16 eine gegenteilige Wirkung hat. Sie führt zu einer Verstärkung der E2-Bindung an Chromosomen der Wirtszelle.

Für die HPV31 E8^{E2} S100E Mutante zeigte sich eine um ca. 50 % verringerte DNA-Bindeaktivität, verglichen mit dem Wildtyp Protein, bei der Durchführung von *in vivo* Experimenten. Dies könnte mit dafür verantwortlich sein, dass die Repressionsaktivität dieser Mutante gegenüber dem Wildtyp Protein verringert ist. Überraschenderweise konnten für die Mutanten des Serins 78 bei der Analyse der DNA-Bindeaktivität weder bei *in vitro* noch bei *in vivo* Analysen ein Unterschied, verglichen mit dem Wildtyp Protein beobachtet werden. Eine verringerte DNA-Bindeaktivität an E2-Bindestellen ist daher nicht die Ursache des Funktionsverlusts von E8^{E2} S78A. Ebenso zeigten Immunfluoreszenz-

Analysen sowie Western Blot Analysen der mutierten Proteine, dass sich die verringerte Repressionsaktivität der S78A Mutante nicht auf eine veränderte Proteinlokalisierung oder Proteinmenge zurückführen lässt.

Die Phosphorylierung von BPV1 E2 führt zu einer Strukturänderung des Proteins (Penrose *et al.*, 2004). Die Hinge-Region, in der die Phosphorylierungsstelle lokalisiert ist, dient als flexibler Linker zwischen der DNA-Bindedomäne und der N-terminalen Domäne des E2 bzw. des E8^{E2} Proteins. Für die eigentliche Transkriptions-, bzw. Replikationsaktivität des E2 Proteins scheint diese Region nicht relevant zu sein, jedoch scheint sie als Abstandshalter zwischen der Transaktivierungsdomäne und der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne zu dienen, um eine sterische Hinderung zwischen den Domänen zu vermeiden (Winokur & McBride, 1992). Darüber hinaus konnte für das E2 Protein von HPV11 gezeigt werden, dass die Hinge-Region nukleäre Lokalisationssignale sowie nukleäre Matrixassoziationskomponenten enthält (Zou *et al.*, 2000). Dazu passend zeigt die E8^{E2}-Mutante, in welcher die komplette Hinge-Region deletiert und durch ein HA-Epitop ersetzt wurde keine Beeinträchtigung der Repressionsaktivität jedoch eine abweichende intrazelluläre Lokalisierung, verglichen mit dem Wildtyp Protein. Dies deutet zum einen darauf hin, dass auch in der Hinge-Region von HPV31 E2 bzw. E8^{E2} Proteinen ein nukleäres Lokalisationssignal vorhanden ist. Des Weiteren zeigen diese Ergebnisse, dass auch im Repressorprotein die Hinge-Region nicht für die eigentliche Funktion benötigt wird (Abbildung 13). Denkbar wäre jedoch, dass für ein voll funktionsfähiges Protein die DNA-Bindedomäne und die N-terminale Transaktivierungsdomäne eine bestimmte Ausrichtung zueinander aufweisen müssen. Eine Phosphorylierung des S78 könnte diese Ausrichtung verändern, was in einer Funktionsstörung resultiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht untersucht werden, ob die Phosphorylierung der HPV31 E8^{E2} Hinge-Region tatsächlich die Proteinstruktur beeinflusst und ob dies Auswirkungen auf die Funktion des Proteins hat.

Die E8^{E2} vermittelte Repression der Replikation und Transkription ist abhängig von der Interaktion mit dem zellulären NCoR/SMRT-Korepressorkomplex. Dabei ist das in Alpha-HPV hoch konservierte KWK-Motiv in der E8-Domäne des Proteins entscheidend für diese Interaktion (Powell *et al.*, 2010; Dreer *et al.*, 2016). Proteine mit einer mutierten KWK-Sequenz können nicht mehr mit den Komponenten des NCoR/SMRT-Komplexes interagieren und die E8-vermittelte Repression der Replikation und Transkription wird aufgehoben. Ko-Immunpräzipitationsanalysen in HeLa Zellen zeigten, dass die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} diese Interaktion nicht offensichtlich beeinflusst. Sowohl Proteine mit einer S78A Mutation, als auch Proteine mit einer S100E Mutation zeigen keine Beeinträchtigung in der Interaktion mit TBLR1 und HDAC3, zwei Komponenten des NCoR/SMRT-Komplexes.

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung des HPV31 E8^{E2} S78 die Interaktion mit anderen zellulären Proteinen beeinträchtigt, wurden quantitative massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Markierte S78A oder S78E transfizierte HeLa Zellen wurden hierfür hinsichtlich ihrer unterschiedlich stark ausgeprägten Anreicherung von zellulären Proteinen untersucht. Die Ergebnisse dieser Interaktionsstudie zeigten, dass durch die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} S78 nur die Interaktion mit wenigen zellulären Proteinen beeinflusst wird. Dabei weist die unphosphorylierte Form des E8^{E2} vor allem eine verstärkte Bindung an Histone auf. Auch die Bindung an die Proteine CHD2 (*chromodomain helicase DNA binding protein 2*) und PELP1 (*Proline-, glutamic acid-, and leucine-rich protein 1*) ist für unphosphorylierte E8^{E2} Proteine verstärkt. CHD2 gehört zur CHD-Proteinfamilie, welche durch die Modifizierung von Chromatin die Genexpression beeinflussen kann (Marfella & Imbalzano, 2007). PELP1 ist ein transkriptioneller Koregulator von zahlreichen Transkriptionsfaktoren und nukleären Rezeptoren (z.B. *Estrogen-Related Receptor* ERRA oder Androgenrezeptor AR). PELP1 bindet des Weiteren an Histone und kann ebenfalls mit mehreren Chromatin modifizierenden zellulären Proteinkomplexen interagieren (Sareddy & Vadlamudi, 2016). Zusammenfassend deuten die Daten der Interaktionsstudie darauf hin, dass durch die Phosphorylierung des S78 die Interaktion von HPV31 E8^{E2} mit Histonen sowie die Modifikation der Histone und damit verbunden die Transkription verhindert wird. Der Verlust der Repressionsaktivität von unphosphorylierten E8^{E2} Protein hingegen könnte mit der verstärkten Bindung an Chromatin modifizierende Proteine und der damit verbundenen transkriptionellen Aktivierung assoziiert sein. Der genaue Mechanismus der zum Verlust der Repressionsaktivität der E8^{E2} S78A Mutante führt bleibt jedoch weiterhin zu klären.

Für HPV16 Genome konnte gezeigt werden, dass der Ausschalten des E8^{E2} Gens zu einer starken Erhöhung der viralen Genomkopien in undifferenzierten und differenzierten Keratinozyten führt (Lace *et al.*, 2008; Straub *et al.*, 2014). HPV31 Genome, welche kein E8^{E2} exprimieren zeigen ebenfalls eine stark erhöhte virale Genomkopienzahl in undifferenzierten Zellen, wobei Langzeitstudien zeigten, dass diese Genome in die Chromosomen der Wirtszellen integrieren (Stubenrauch *et al.*, 2000; Lace *et al.*, 2008).

Um zu analysieren wie sich die Phosphorylierung von HPV31 E8^{E2} auf das vollständige virale Genom auswirkt wurden als nächster Schritt HPV31 Genome konstruiert, in denen die phosphorylierten Serine an Position 78, 81 und 100 zu Alanin oder Glutaminsäure mutiert wurden. Diese Mutanten wurden anschließend in einschichtigen Zellkulturen analysiert. Zusätzlich sollte auch untersucht werden, wie sich die HPV31 E8^{E2} Phosphorylierung auf den gesamten viralen Lebenszyklus auswirkt. Daher wurden HPV31 positive Zelllinien zusätzlich als organotypische Zellkulturen kultiviert, welche die Differenzierung von Keratinozyten ermöglichen.

Southern Blot Analysen der unterschiedlichen HPV31 positiven Zelllinien zeigten, dass die Phosphorylierung des E8^AE2 Proteins keine Auswirkungen auf den episomalen Erhalt der viralen Genome hat. Auch die Differenzierung der Wirtszellen wird durch die Phosphorylierung nicht beeinträchtigt, was durch Immunfluoreszenz-Analysen der organotypischen Zellkulturen belegt wurde.

Bei der Analyse der viralen Genomkopienzahl in undifferenzierten oder differenzierten Keratinozyten zeigte sich überraschenderweise, dass die S78A Mutante, welche in Reporteranalysen einen Verlust der Repressionsaktivität aufweist, keine Überreplikation der Genome zur Folge hatte, wie es die Studien der HPV16 und HPV31 Genommutanten ohne E8^AE2 Gen vermuten lassen. Auch die Expression der frühen oder späten viralen Transkripte unterschied sich in den mutierten HPV31 Genomen nicht wesentlich von der Expression in Wildtyp Genomen.

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass die Phosphorylierung des HPV31 E8^AE2 an der Position S78 keinen Einfluss auf die Etablierung der viralen Genome als Episomen, den extrachromosomalen Erhalt der Genome oder die produktive Amplifikation der HPV31 Genome in Zellkultursystemen hat. Diese Befunde stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass der Verlust an Repressionsaktivität der E8^AE2 S78A Mutante in Luziferase-Reporteranalysen in der Gegenwart von E1 und E2 Proteinen deutlich schwächer ausgeprägt ist (Abbildung 9).

Beim Vergleich der Aminosäuresequenz der E8^AE2 Proteine verschiedener Alpha-Papillomviren zeigte sich, dass das Serin an Position 78 nur schwach konserviert und auch nicht spezifisch für HR-HPV ist. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass die Phosphorylierung von E8^AE2 zu typspezifischen Unterschieden beiträgt und nicht an der Karzinogenese beteiligt ist.

Um einen Einblick zu bekommen, ob die Phosphorylierung des Serins 78 an der Regulation zellulärer Gene beteiligt ist wurde das Transkriptom organotypischer Zellkulturen von HPV31 E8^AE2 S78A oder S78E positiven Zelllinien verglichen. Dabei zeigte sich, dass durch die E8^AE2 Phosphorylierung nur wenige zelluläre Gene in ihrer Expression beeinflusst werden. Die in Transkriptomanalysen beobachtete unterschiedliche Expression von fünf Genen wurde anschließend in qRT-PCR Analysen weiter untersucht. Dabei zeigte sich, dass von diesen fünf Genen nur die Expression von LYPD2 (*Ly6/PLAUR domain-containing protein 2*) in S78A positiven Zellen signifikante Unterschiede zur Expression in S78E positiven Zelllinien aufwies, wobei die Expression des Gens in S78A positiven Zelllinien schwächer als in S78E positiven Zelllinien war. Zusätzlich zeigte sich, dass die Expression in Wildtyp Zelllinien vergleichbar mit der Expression der S78E Zelllinien war. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die LYPD2 Regulierung durch HPV31 E8^AE2 von der Phosphorylierung des viralen Proteins abhängig ist. Die Abnahme der LYPD2 Expression in S78A positiven Zelllinien deutet allerdings auch darauf hin, dass diese Regulation nicht direkt vermittelt wird, z.B. indem E8^AE2 direkt an das LYPD2 Gen bindet und somit seine Transkription verhindert.

Die Funktion von LYPD2 ist derzeit nicht bekannt, allerdings deuten Sequenzanalysen des Proteins darauf hin, dass es sich um ein Glycosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankertes Membranprotein handelt und als solches an zellulären Signaltransduktionen beteiligt ist. Da die S78 Phosphorylierung nicht zu Veränderungen der HPV31 Genomreplikation führt ist nicht anzunehmen, dass durch LYPD2 die virale Replikation moduliert wird. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um abschließend zu klären, welche Rolle das zelluläre LYPD2 bei der Papillomvirusreplikation *in vitro* und *in vivo* spielt.

Zusammenfassend deuten die durchgeführten Analysen darauf hin, dass die Hauptfunktion der HPV31 E8^AE2 S78 Phosphorylierung darin besteht, die Expression einiger weniger zellulärer Gene zu modulieren.

5.3 Die virale Replikation in 31E6/E7-NHK

Die Funktion der viralen Replikationsproteine E1 und E2 kann in einem Luziferase-Reporteranalyse basierendem Testsystem untersucht werden, bei dem die E1 und E2 Proteine die Replikation eines Reporterplasmids vermitteln, welches die regulatorische Region (URR) mit dem viralen Replikationsursprung und dem frühen viralen Promotor enthält. Der frühe virale Promotor kontrolliert dabei die Expression eines Luziferase-Reportergens. Durch die Vermehrung des Reporterplasmids und der damit verbundenen Zunahme der Luziferase-Aktivität kann somit indirekt die Replikation bestimmt werden. In permanenten Zelllinien, wie z.B. HeLa Zellen kann auf diese Weise eine deutliche Zunahme der Luziferase-Aktivität beobachtet werden (mindestens 10-fach). Überraschenderweise führt diese Kotransfektion in primären Keratinozyten oder in davon abgeleiteten Zelllinien, welche mit viralen E6 und E7 Proteinen immortalisiert wurden zu keiner Zunahme der Luziferase-Aktivität obwohl die Replikation des gesamten viralen Genoms in diese Zellen möglich ist. Tatsächlich ist in diesen Zelllinien sogar eine Abnahme der Luziferase-Aktivität zu beobachten. Der Grund hierfür könnte in der Repression des frühen viralen Promotors liegen. Überraschenderweise schien diese Repression dabei nicht durch das virale E2 Protein vermittelt zu werden, da auch durch eine 300-fache Reduktion der transfizierten E2 Menge keine Aufhebung dieser Reduktion zu beobachten war (Abbildung 23). Weitere Experimente werden daher nötig sein, um abschließend zu klären, wodurch die beobachtete Repression in 31E6/E7-NHK vermittelt wird.

Immunfluoreszenz-Analysen, Luziferase-Reporteranalysen mit dem Reporterplasmids pC18-SP1-Luc und Titrationsexperimente mit den viralen E1 und E2 Proteinen lassen vermuten, dass eine ineffiziente Expression des E1 Replikationsproteins in 31E6/E7-NHK ursächlich dafür ist, dass keine Replikation des Reporterplasmids stattfinden kann. Um diese Annahme genauer zu untersuchen, wurden daher unterschiedliche E1 Konstrukte generiert, welche zu einer besseren E1 Expression

führen sollten. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Codon-optimierung von E1, als auch das Einfügen von DNA-Sequenz, welche oberhalb des E1 Leserahmen auf dem E1 Expressionsplasmid liegen in einer Zunahme der Luziferase-Aktivität resultierten, was am ehesten auf eine verstärkte E1 Expression zurück zu führen ist. Dieses Ergebnis stimmt dabei mit dem Befund überein, dass das virale E1 Protein von einer polycistronischen mRNA exprimiert wird. Die flankierenden Sequenzen des E1 Leserahmen sind dabei für eine effiziente Expression des E1 Proteins essentiell und ohne diese flankierenden Sequenzen werden E1 Proteine nur gering exprimiert (Remm *et al.*, 1999). In HeLa Zellen war die Zunahme der Luziferase-Aktivität, bedingt durch eine verbesserte E1 Expression, deutlich ausgeprägt, wohingegen in 31E6/E7-NHK trotz der verbesserten Luziferase-Aktivität keine tatsächliche Replikation des Reporterplasmids zu erkennen war, sondern lediglich eine Abnahme der Repression. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die E1 Expression in 31E6/E7-NHK nicht so stark ausgeprägt ist wie in HeLa Zellen, dass das Ausbleiben der Replikation des HPV-Reporterplasmids allerdings nicht ausschließlich auf eine insuffiziente E1 Expression in diesen Zellen zurückzuführen ist.

In undifferenzierten Keratinozyten werden nach der Primärinfektion mit Papillomviren außer den Replikationsproteinen E1 und E2 weitere frühe Genprodukte exprimiert. Da primäre, *in vitro* kultivierte Keratinozyten die Replikation der gesamten viralen Genome ermöglichen, legt dies die Vermutung nahe, dass auch für die Replikation des HPV-Reporterplasmids in den, von primären Keratinozyten abgeleiteten 31E6/E7-NHK Zelllinien weitere frühe Genprodukte benötigt werden. Während die beiden Onkoproteine E6 und E7 für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus von essentieller Bedeutung sind, ist für die E4 und E5 Proteine der Beitrag zur viralen Replikation noch nicht vollständig geklärt (DiMaio & Petti, 2013; Doorbar, 2013).

Tatsächlich konnte bei der Kotransfektion des HPV-Reporterplasmids mit E1 und E2 sowie der frühen viralen Proteine E4, E6 und E7 eine Zunahme der Luziferase-Aktivität beobachtet werden. Dazu passend deuten neuere Studien darauf hin, dass die viralen E4 Proteine der HR-HPV Typen 16 und 18 an der Replikation von viralen Genome beteiligt sind (Egawa *et al.*, 2017). So kann durch E4 die Aktivität von zellulären Kinasen moduliert werden, welche unter anderem für die Phosphorylierung und somit die nukleäre Lokalisation von viralen E1 Proteinen verantwortlich sind (Deng *et al.*, 2004; Fradet-Turcotte *et al.*, 2010; Egawa *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnte in Gegenwart von E4 eine verstärkte E1/E2-vermittelte Replikation bei der Durchführung von *in vitro* Analysen beobachtet werden (Egawa *et al.*, 2017). Für die viralen E6 und E7 Proteine konnte eine funktionelle Beteiligung an der viralen Replikation ebenfalls nachgewiesen werden (Howie *et al.*, 2009; Roman & Munger, 2013).

Die Kotransfektion eines einzelnen frühen viralen Genproduktes bewirkte erneut keine tatsächliche Replikation des Reporterplasmids sondern lediglich eine Zunahme der Luziferase-Aktivität. Allerdings

kann auf Grund der vorliegenden Daten vermutet werden, dass für die erfolgreiche E1/E2-vermittelte Replikation eine bestimmte Kombination der frühen viralen Proteinen E1, E2, E4, E6 und E7 benötigt wird.

Bei der Untersuchung der 31E6/E7-NHK auf die Anwesenheit einer DNA-Schadensantwort zeigte sich, dass die Transfektion der Zellen mit Expressionsplasmiden für HPV31 E1 und E2 in einem deutlichen γ H2AX Signal, ein Marker für die Aktivität der ATM Kinase (*ataxia telangiectasia mutated kinase*) resultiert.

Die DNA-Schadensantwort (*DNA-Damage Response*, DDR) wird in Zellen als Reaktion auf Einzelstrangbrüche oder Doppelstrangbrüche der DNA initiiert, welche durch UV-Strahlen, reaktive Sauerstoffspezies oder ähnlichem hervorgerufen wurden. Die DDR ist ein komplexes Signalnetzwerk, welches abhängig von der Art des Schadens über drei unterschiedliche Kinasen initiiert werden kann: Die ATM Kinase, die ATR (*ATM and Rad3-related*) Kinase oder die DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Alberts *et al.*, 2014). Diese Kinasen aktivieren weitere Effektorinasen (Chk1 oder Chk2) wodurch letztendlich Zellzyklus Kontrollpunkte aktiviert werden und so die Zelle die Möglichkeit erhält vorhandene DNA-Schäden zu reparieren.

Die Infektion von zahlreichen DNA-Viren ist mit dem Auslösen einer DNA-Schadensantwort assoziiert. So kann z.B. das Simian-Virus 40 (SV40) die ATM-abhängige DNA-Schadensantwort auslösen, was vermutlich wichtig ist um eine optimale Virusreplikation zu gewährleisten (Shi *et al.*, 2005). Die lytische Replikation von latenten EBV infizierten Zellen hängt ebenfalls vom ATM-Signalweg ab (Wang'ondu *et al.*, 2015) und auch die Replikation des Parvovirus B19 ist abhängig von ATR-Chk1-Signalwegen (Luo *et al.*, 2011).

Für Papillomviren konnte gezeigt werden, dass der ATM-Signalweg kritisch für die produktive virale Replikation in differenzierten Keratinozyten ist. Er wird von HPV sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Keratinozyten, vor allem durch die E1 Helikase aktiviert (Spriggs & Laimins, 2017). In undifferenzierten Zellen wird das virale Genom allerdings synchron zur chromosomalen Replikation der Wirtszelle in der S-Phase repliziert und ist somit unabhängig von der DNA-Schadensantwort. Darüber hinaus muss in diesen Zellen einer DNA-Schadensantwort und dem daraus resultierenden Zellzyklusarrest entgegen gewirkt werden, um sicher zu stellen, dass sich die infizierten Zellen weiterhin teilen und somit der langfristigen Erhalt der Viren gewährleisten ist (Spriggs & Laimins, 2017). Für die produktive Replikation hingegen ist die DNA-Schadensantwort essentiell, da auf diese Weise DNA-Reparaturproteine für die virale Replikation zur Verfügung stehen (Hong & Laimins, 2013).

HPV Genome werden in definierten zellulären Regionen repliziert, welche auch als Replikationsfokus bezeichnet werden. Für gewöhnlich sind auch die γ H2AX Signale in diesen Replikationsfokussen

lokalisiert. Auf diese Weise werden die zellulären Reparaturfaktoren an den Ort der viralen Replikation rekrutiert und für diese zugänglich gemacht (Hong & Laimins, 2013). In 31E6/E7-NHK war nach der Transfektion mit E1 und E2 Expressionsplasmiden hingegen ein diffuses γ H2AX Signal im gesamten Zellkern zu beobachten, was zu der Vermutung führte, dass eine zu starke DNA-Schadensantwort die Replikation des Reporterplasmids in 31E6/E7-NHK beeinträchtigt. Um diese Vermutung zu untersuchen wurden daher die transfizierten 31E6/E7-NHK mit dem ATM Kinase Inhibitor Ku-55933 behandelt bevor die Luziferase-Aktivität gemessen wurde. Überraschenderweise konnte in diesen Zellen jedoch auch durch die Inhibition der ATM-abhängigen DNA-Schadensantwort keine Replikation des HPV-Reporterplasmids ermöglicht werden.

Der ATM-Signalweg besteht aus mehreren Armen, die zu einem Zellzyklusarrest an verschiedenen Kontrollpunkten führen können. So wird durch die ATM Kinase die Effektor Kinase Chk2 aktiviert, welche wiederum direkt p53 phosphorylieren und dadurch dessen Stabilität regulieren kann. In letzter Konsequenz führt dies über die Transkription des CKI (*Cip/Kip family of cyclin-dependent kinase inhibitors*) Proteins p21 zu einem G1/S-Phasen-Arrest. Nach der Reparatur der DNA-Schäden, bzw. im Falle eines ungestörten Zellzyklus wird p21 im Verlauf der S-Phase degradiert um eine korrekte Fortsetzung des Zellzyklus zu gewährleisten (Abbas *et al.*, 2008). Die ATM Kinase kann des Weiteren die Cdc25 Phosphatase inhibieren, was zu einem G2/M-Phasen Arrest der Zellen führt (Hong & Laimins, 2013). Für HPV31 E1 konnte gezeigt werden, dass die ausgelöste DNA-Schadensantwort zu einer Verzögerung der frühen S-Phase führt, wobei der genaue Mechanismus noch unbekannt ist (Fradet-Turcotte *et al.*, 2011). Durch den Block der Zellen in der S-Phase stehen den Viren zelluläre Replikationsproteine für die virale Replikation zur Verfügung.

Um einen genaueren Einblick zu bekommen, wie sich die DNA-Schadensantwort in 31E6/E7-NHK auf die virale Replikation auswirkt, wurde zunächst die Expression des Effektor Proteins p21 in diesen Zellen untersucht. Dabei zeigte sich überraschenderweise, dass Zellen, welche das virale E1 Protein exprimierten keine p21 Expression aufwiesen, was darauf hin deutet, dass in diesen Zellen kein G1/S-Phasen-Arrest induziert wurde. Dies könnte darauf hinweisen, dass sich die Zellen nicht in der optimalen Zellzyklusphase (der frühen S-Phase) befinden, um die Replikation des Reporterplasmids zu unterstützen.

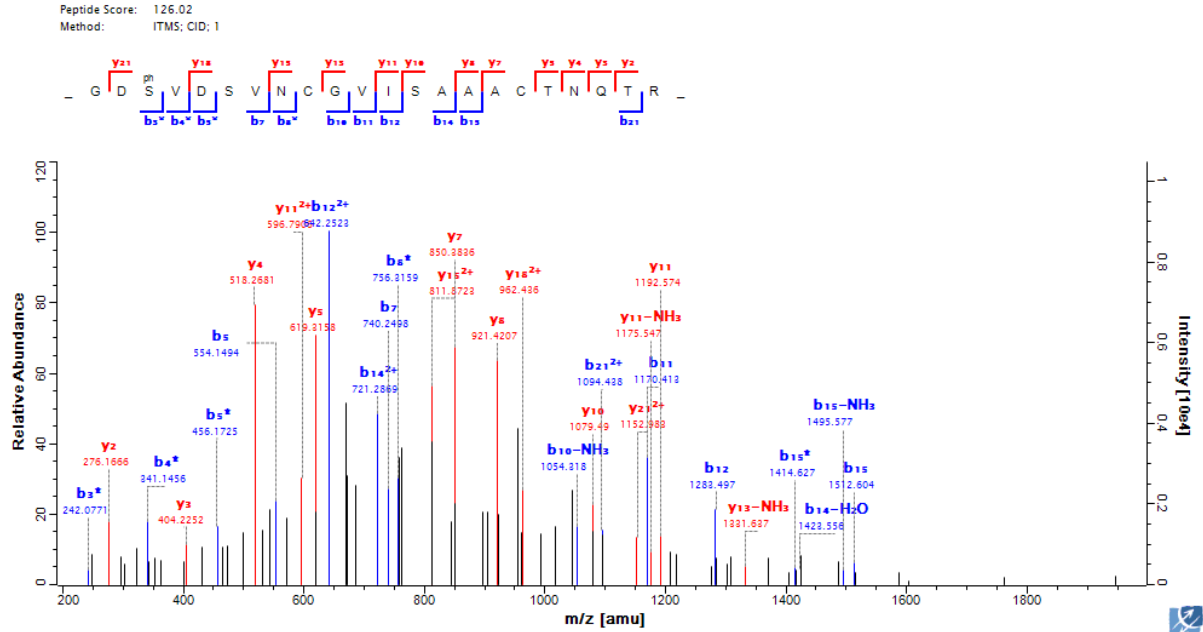
Um abschließend zu klären, inwiefern durch die Transfektion der viralen E1 und E2 Proteine den Zellzyklus der 31E6/E7-NHK beeinflusst wird und welche Bedeutung dies für die E1/E2-abhängige Replikation des HPV-Reporterplasmids hat müssen jedoch weitere Analysen durchgeführt werden. So könnten beispielsweise Zellzyklusanalysen in Form einer Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidium Iodid Färbung der Zellen und anschließender durchflusszytometrischer Analyse

Aufschluss darüber geben, wie sich die Transfektion der viralen Proteine auf die 31E6/E7-NHK auswirkt.

Zusammenfassend lassen die durchgeführten Analysen vermuten, dass in 31E6/E7-NHK das virale E1 Protein nur in geringen Mengen exprimiert wird. Die insuffiziente E1 Expression scheint dabei zur Limitierung der Replikation des HPV-Reporterplasmids beizutragen, jedoch nicht ausschließlich dafür verantwortlich zu sein. Darüber führt die Expression von E1 zur Induktion einer DNA-Schadensantwort in 31E6/E7-NHK. Allerdings kann auch nach Inhibition der DNA-Schadensantwort keine Replikation des Reporters beobachtet werden. Vielmehr scheint eine E1/E2-vermittelte Replikation in 31E6/E7-NHK von weiteren frühen viralen Proteinen abhängig zu sein.

6 ANHANG

6.1 Nano LC-MS/MS Spektrum des S78 enthaltenden Phosphopeptids



precursor information

Mass:	2360.97217
m/z:	System.Collections.
Charge:	System.Collections.
Retentiontime:	System.Collections.
Score:	126.0195
Mass Error [ppm]:	-0.19615
PEP:	5.424E-07
Precursor Type:	MULTI

general information

Annotation:	17 of 22
AminoAcids Coverage:	77 %
Intensity Coverage:	53 %
Protein Localisation:	88 ... 109

b ²⁺ ion		b ion		y ion		y ²⁺ ion	
Δ dalton	mass	Δ dalton	mass	seq		Δ dalton	mass
	58.02874		58.02874	1	G	21	
	173.0557		173.0557	2	D	20	2304.958
	340.054		340.054	3	S	19	2189.932
	439.1225		439.1225	4	V	18	2022.933
	554.1494	+0.157791	554.1494	5	D	17	1923.865
	641.1814		641.1814	6	S	16	1808.838
	740.2498	-0.107874	740.2498	7	V	15	1721.806
	854.2928		854.2928	8	N	14	1622.737
	1014.323		1014.323	9	C	13	1508.694
	1071.345		1071.345	10	G	12	1348.664
	1170.413	-0.028041	1170.413	11	V	11	1291.642
-0.103697	642.2523	-0.211226	1283.497	12	I	10	1192.574
	1370.529		1370.529	13	S	9	1079.49
+0.384437	721.2869		1441.567	14	A	8	992.4578
	1512.604	+0.059105	1512.604	15	A	7	921.4207
	1583.641		1583.641	16	A	6	850.3836
	1743.671		1743.671	17	C	5	779.3465
	1844.719		1844.719	18	T	4	619.3158
	1958.762		1958.762	19	N	3	518.2681
	2086.821		2086.821	20	Q	2	404.2252
+0.393175	1094.438		2187.868	21	T	1	276.1666
				22	R	0	175.119

6.2 Liste der durch Phosphorylierung des S78 regulierten Gene

Die differenziell exprimierten Gene in differenzierten HPV31 E8^{E2} S78E Zelllinien verglichen mit S78A Zelllinien, welche mittels RNA-Sequenzierung identifiziert wurden, sind in Tabelle 11 im Einzelnen aufgelistet.

Gen-ID: Identifikationsnummer der Ensembl-Datenbank

Base Mean: Mittelwert der normalisierten *Reads*

Log2Fold Change: Log2-fache Änderung der Expression zwischen den getesteten Bedingungen

lfcSE: Standardfehler des Log2Fold Change

stat: Wald Statistik

p-Wert: p-Wert des Wald Tests

Tabelle 11: Liste der differenziell exprimierten Gene (S78E vs. S78A)

GEN-ID	GEN SYMBOL	BASE MEAN	LOG2FOLD CHANGE	LFCSE	STAT	P-WERT
ENSG00000093072	ADA2	72,73	1,45	0,71	2,05	4,08E-02
ENSG00000042980	ADAM28	85,1	-1,73	0,87	-1,98	4,72E-02
ENSG00000154736	ADAMTS5	46,52	2,89	1,32	2,2	2,81E-02
ENSG00000173175	ADCY5	4,11	-5,48	2,54	-2,16	3,07E-02
ENSG00000106624	AEBP1	66,96	1,95	0,94	2,07	3,82E-02
ENSG00000126016	AMOT	190,45	-2,07	0,98	-2,11	3,49E-02
ENSG00000153930	ANKFN1	13,65	3,93	1,73	2,28	2,29E-02
ENSG00000074370	ATP2A3	65,24	-2,7	1,21	-2,24	2,52E-02
ENSG00000183778	B3GALT5	645,2	-1,31	0,66	-1,99	4,65E-02
ENSG00000231120	BTF3P10	6,15	2,39	1,01	2,37	1,76E-02
ENSG00000159403	C1R	334,97	1,53	0,68	2,26	2,37E-02
ENSG00000182326	C1S	242,27	1,48	0,71	2,1	3,57E-02
ENSG00000104327	CALB1	1165,62	1,77	0,53	3,34	8,25E-04
ENSG00000162949	CAPN13	104,24	-2,91	1,11	-2,62	8,81E-03
ENSG00000013297	CLDN11	15,77	2,76	1,13	2,45	1,42E-02
ENSG00000013297	CLDN11	15,77	2,76	1,13	2,45	1,42E-02
ENSG00000112782	CLIC5	20,86	-2,27	0,96	-2,36	1,83E-02
ENSG00000157613	CREB3L1	416,33	-1,57	0,7	-2,24	2,52E-02
ENSG00000164932	CTHRC1	53	1,37	0,63	2,17	3,03E-02
ENSG00000124875	CXCL6	485,67	-1,48	0,73	-2,02	4,29E-02
ENSG00000187908	DMBT1	233,11	-3,06	0,97	-3,14	1,67E-03
ENSG00000134769	DTNA	24,07	3,27	1,16	2,82	4,80E-03
ENSG00000214199	EEF1A1P12	34,73	1	0,43	2,31	2,08E-02
ENSG00000213704	EEF1A1P15	10,26	1,51	0,77	1,97	4,89E-02
ENSG00000213235	EEF1A1P16	181,81	1,04	0,53	1,97	4,88E-02
ENSG00000233476	EEF1A1P6	349,13	-1,6	0,55	-2,9	3,73E-03
ENSG00000049540	ELN	33	2,63	0,93	2,83	4,61E-03

ANHANG

ENSG00000138792	ENPEP	9,44	4,78	1,79	2,67	7,68E-03
ENSG00000196482	ESRRG	25,97	-2,08	0,82	-2,52	1,17E-02
ENSG00000214814	FER1L6	185,24	-2,29	0,87	-2,62	8,73E-03
ENSG00000227376	FTH1P16	86,79	1,27	0,56	2,27	2,31E-02
ENSG00000167588	GPD1	14,02	-2,3	0,88	-2,61	9,05E-03
ENSG00000170961	HAS2	35,74	2,11	1,04	2,03	4,20E-02
ENSG00000165949	IFI27	10947,7	1,43	0,66	2,16	3,08E-02
ENSG00000137959	IFI44L	1546,26	1,36	0,62	2,2	2,81E-02
ENSG00000126709	IFI6	5813,92	1,4	0,68	2,05	4,06E-02
ENSG00000185745	IFIT1	1061,04	1,29	0,58	2,22	2,63E-02
ENSG00000115461	IGFBP5	48,49	2,14	0,75	2,84	4,48E-03
ENSG00000171105	INSR	1471,16	-1,04	0,44	-2,36	1,82E-02
ENSG00000160255	ITGB2	96,09	-1,95	0,98	-1,99	4,71E-02
ENSG00000117009	KMO	28,33	-2,42	1,05	-2,3	2,17E-02
ENSG00000170454	KRT75	166,44	1,9	0,75	2,55	1,09E-02
ENSG00000214145	LINC00887	34,84	1,37	0,63	2,16	3,09E-02
ENSG00000227676	LINC01068	12,07	-4,61	2,13	-2,17	3,01E-02
ENSG00000228918	LINC01344	11,99	-2,34	1	-2,33	1,99E-02
ENSG00000185847	LINC01405	50,37	2,36	0,94	2,5	1,25E-02
ENSG00000180712	LINC02363	3,88	-3,38	1,62	-2,09	3,69E-02
ENSG00000172901	LVRN	4,54	3,04	1,31	2,32	2,01E-02
ENSG00000197353	LYPD2	1094,31	-1,08	0,24	-4,6	4,30E-06
ENSG00000090382	LYZ	21,95	-2,41	0,81	-2,97	2,99E-03
ENSG00000166391	MOGAT2	2,26	-4,62	2,16	-2,14	3,26E-02
ENSG00000178860	MSC	14,6	2,1	1,06	1,98	4,81E-02
ENSG00000181143	MUC16	1042,88	-1,45	0,59	-2,43	1,49E-02
ENSG00000145113	MUC4	82,55	-1,92	0,84	-2,3	2,14E-02
ENSG00000183486	MX2	696,62	1,56	0,71	2,2	2,77E-02
ENSG00000007952	NOX1	4,8	-3,8	1,68	-2,26	2,40E-02
ENSG00000104044	OCA2	30,79	1,77	0,69	2,58	1,00E-02
ENSG00000162745	OLFML2B	10,32	2,61	1,32	1,98	4,79E-02
ENSG00000117115	PADI2	119,15	-2,13	0,79	-2,7	6,97E-03
ENSG00000120327	PCDHB14	40,46	-1,75	0,73	-2,38	1,71E-02
ENSG00000175426	PCSK1	20,67	2,72	1,32	2,06	3,92E-02
ENSG00000154864	PIEZO2	10,14	2,73	1,3	2,09	3,62E-02
ENSG00000148735	PLEKHS1	24,84	-4,19	1,66	-2,52	1,17E-02
ENSG00000185664	PMEL	576,27	1,88	0,89	2,11	3,46E-02
ENSG00000005249	PRKAR2B	45,79	-2,23	0,86	-2,59	9,54E-03
ENSG00000139304	PTPRQ	6,77	3,63	1,55	2,34	1,92E-02
ENSG00000172794	RAB37	55,59	-2,81	1,15	-2,43	1,49E-02
ENSG00000142552	RCN3	10,23	2,98	1,41	2,11	3,48E-02
ENSG00000216412	RPL12P2	15,14	1,55	0,78	1,97	4,85E-02
ENSG00000134339	SAA2	418,61	-2,01	0,88	-2,28	2,27E-02
ENSG00000143416	SELENBP1	283,87	-1,52	0,76	-2,02	4,39E-02
ENSG00000132386	SERPINF1	95,16	1,85	0,62	2,99	2,77E-03
ENSG00000122852	SFTPA1	4,86	-3,82	1,79	-2,14	3,22E-02
ENSG00000233705	SLC26A4-AS1	16,02	-4,6	1,79	-2,57	1,01E-02

ANHANG

ENSG00000157765	SLC34A2	276,56	-1,78	0,73	-2,44	1,46E-02
ENSG00000172716	SLFN11	42,04	2,66	1,22	2,19	2,86E-02
ENSG00000185518	SV2B	23,63	-1,88	0,87	-2,15	3,18E-02
ENSG00000184988	TMEM106A	42,47	-1,08	0,53	-2,05	4,04E-02
ENSG00000147003	TMEM27	62,65	-1,74	0,82	-2,11	3,48E-02
ENSG00000117472	TSPAN1	2617,63	-1,67	0,77	-2,16	3,09E-02
ENSG00000214049	UCA1	1388,16	1,37	0,5	2,76	5,82E-03
ENSG00000184979	USP18	148,48	1,05	0,44	2,38	1,71E-02
ENSG00000038427	VCAN	50,58	2,29	1,14	2	4,51E-02
ENSG00000169554	ZEB2	62,12	1,78	0,68	2,62	8,73E-03
ENSG00000183199		26,73	1,24	0,55	2,27	2,30E-02
ENSG00000231409		14,49	1,56	0,73	2,13	3,29E-02
ENSG00000258789		8,31	1,67	0,78	2,14	3,22E-02
ENSG00000232499		8,83	1,65	0,8	2,05	4,04E-02
ENSG00000267756		4,76	3,1	1,32	2,35	1,88E-02
ENSG00000224810		7,55	-4,48	1,63	-2,75	6,05E-03
ENSG00000090920		150,48	-4,35	1,83	-2,38	1,75E-02
ENSG00000232517		3,49	-5,25	2,32	-2,27	2,35E-02

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, T, Sivaprasad, U, Terai, K, Amador, V, Pagano, M and Dutta, A (2008).** "PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex." *Genes Dev* **22**(18): 2496-2506.
- Alberts, B, Johnson, A, Walter, P, Lewis, J, Raff, M and Roberts, K (2014).** *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing.
- Ammermann, I, Bruckner, M, Matthes, F, Iftner, T and Stubenrauch, F (2008).** "Inhibition of transcription and DNA replication by the papillomavirus E8-E2C protein is mediated by interaction with corepressor molecules." *J Virol* **82**(11): 5127-5136.
- Anders, S, Pyl, PT and Huber, W (2015).** "HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data." *Bioinformatics* **31**(2): 166-169.
- Andrews, NC and Faller, DV (1991).** "A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **19**(9): 2499.
- Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA and Struhl, K (1990).** *Current protocols in molecular biology*. Brooklyn, N.Y. Media, Pa., Greene Pub. Associates.
- Bergvall, M, Melendy, T and Archambault, J (2013).** "The E1 proteins." *Virology* **445**(1-2): 35-56.
- Bernard, BA, Bailly, C, Lenoir, MC, Darmon, M, Thierry, F and Yaniv, M (1989).** "The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes." *J Virol* **63**(10): 4317-4324.
- Bodily, J and Laimins, LA (2011).** "Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression." *Trends Microbiol* **19**(1): 33-39.
- Bristol, ML, Das, D and Morgan, IM (2017).** "Why Human Papillomaviruses Activate the DNA Damage Response (DDR) and How Cellular and Viral Replication Persists in the Presence of DDR Signaling." *Viruses* **9**(10).
- Burian, M, Velic, A, Matic, K, Gunther, S, Kraft, B, Gonser, L, Forchhammer, S, Tiffert, Y, Naumer, C, Krohn, M, Berneburg, M, Yazdi, AS, Macek, B and Schitteck, B (2015).** "Quantitative proteomics of the human skin secretome reveal a reduction in immune defense mediators in ectodermal dysplasia patients." *J Invest Dermatol* **135**(3): 759-767.
- Chang, SW, Liu, WC, Liao, KY, Tsao, YP, Hsu, PH and Chen, SL (2014).** "Phosphorylation of HPV-16 E2 at serine 243 enables binding to Brd4 and mitotic chromosomes." *PLoS One* **9**(10): e110882.
- Chang, SW, Tsao, YP, Lin, CY and Chen, SL (2011).** "NRIP, a novel calmodulin binding protein, activates calcineurin to dephosphorylate human papillomavirus E2 protein." *J Virol* **85**(13): 6750-6763.

- Cogliano, V, Baan, R, Straif, K, Grosse, Y, Secretan, B and El Ghissassi, F (2005).** "Carcinogenicity of human papillomaviruses." *Lancet Oncol* **6**(4): 204.
- Cox, J and Mann, M (2008).** "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." *Nat Biotechnol* **26**(12): 1367-1372.
- Cox, J, Neuhauser, N, Michalski, A, Scheltema, RA, Olsen, JV and Mann, M (2011).** "Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment." *J Proteome Res* **10**(4): 1794-1805.
- Deng, W, Lin, BY, Jin, G, Wheeler, CG, Ma, T, Harper, JW, Broker, TR and Chow, LT (2004).** "Cyclin/CDK regulates the nucleocytoplasmic localization of the human papillomavirus E1 DNA helicase." *J Virol* **78**(24): 13954-13965.
- Deyrieux, AF, Rosas-Acosta, G, Ozbun, MA and Wilson, VG (2007).** "Sumoylation dynamics during keratinocyte differentiation." *J Cell Sci* **120**(Pt 1): 125-136.
- Dickson, MA, Hahn, WC, Ino, Y, Ronfard, V, Wu, JY, Weinberg, RA, Louis, DN, Li, FP and Rheinwald, JG (2000).** "Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics." *Mol Cell Biol* **20**(4): 1436-1447.
- DiMaio, D and Petti, LM (2013).** "The E5 proteins." *Virology* **445**(1-2): 99-114.
- Doorbar, J (2006).** "Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer." *Clin Sci (Lond)* **110**(5): 525-541.
- Doorbar, J (2013).** "The E4 protein; structure, function and patterns of expression." *Virology* **445**(1-2): 80-98.
- Doorbar, J, Quint, W, Banks, L, Bravo, IG, Stoler, M, Broker, TR and Stanley, MA (2012).** "The biology and life-cycle of human papillomaviruses." *Vaccine* **30** Suppl 5: F55-70.
- Dreer, M, Fertey, J, van de Poel, S, Straub, E, Madlung, J, Macek, B, Iftner, T and Stubenrauch, F (2016).** "Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8^{E2C} Proteins Inhibits Viral Replication." *PLoS Pathog* **12**(4): e1005556.
- Egawa, N, Wang, Q, Griffin, HM and Murakami, I (2017).** "HPV16 and 18 genome amplification show different E4-dependence, with 16E4 enhancing E1 nuclear accumulation and replicative efficiency via its cell cycle arrest and kinase activation functions." **13**(3): e1006282.
- Fields, BN, Knipe, DM and Howley, PM (2013).** *Fields virology*. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fradet-Turcotte, A, Bergeron-Labrecque, F, Moody, CA, Lehoux, M, Laimins, LA and Archambault, J (2011).** "Nuclear accumulation of the papillomavirus E1 helicase blocks S-phase progression and triggers an ATM-dependent DNA damage response." *J Virol* **85**(17): 8996-9012.

- Fradet-Turcotte, A, Moody, C, Laimins, LA and Archambault, J (2010).** "Nuclear export of human papillomavirus type 31 E1 is regulated by Cdk2 phosphorylation and required for viral genome maintenance." *J Virol* **84**(22): 11747-11760.
- Frattini, MG and Laimins, LA (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): 12398-12402.
- Frattini, MG, Lim, HB and Laimins, LA (1996).** "In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 3062-3067.
- Gey, GO, Coffman, WD and Kubicek, MT (1952).** "Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium." *Cancer research*: 264-265.
- Griffin, H, Wu, Z, Marnane, R, Dewar, V, Molijn, A, Quint, W, Van Hoof, C, Struyf, F, Colau, B, Jenkins, D and Doorbar, J (2012).** "E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease." *PLoS One* **7**(12): e49974.
- Haedicke, J and Iftner, T (2013).** "Human papillomaviruses and cancer." *Radiother Oncol* **108**(3): 397-402.
- Helt, AM, Funk, JO and Galloway, DA (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): 10559-10568.
- Hong, S and Laimins, LA (2013).** "Regulation of the life cycle of HPVs by differentiation and the DNA damage response." *Future Microbiol* **8**(12): 1547-1557.
- Howie, HL, Katzenellenbogen, RA and Galloway, DA (2009).** "Papillomavirus E6 proteins." *Virology* **384**(2): 324-334.
- Howley, PM and Pfister, HJ (2015).** "Beta genus papillomaviruses and skin cancer." *Virology* **479-480**: 290-296.
- Isok-Paas, H, Mannik, A, Ustav, E and Ustav, M (2015).** "The transcription map of HPV11 in U2OS cells adequately reflects the initial and stable replication phases of the viral genome." *Virology* **12**: 59.
- Johansson, C, Graham, SV, Dornan, ES and Morgan, IM (2009).** "The human papillomavirus 16 E2 protein is stabilised in S phase." *Virology* **394**(2): 194-199.
- Kim, D, Pertea, G, Trapnell, C, Pimentel, H, Kelley, R and Salzberg, SL (2013).** "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions." *Genome Biol* **14**(4): R36.
- Kinoshita, E, Kinoshita-Kikuta, E, Takiyama, K and Koike, T (2006).** "Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins." *Mol Cell Proteomics* **5**(4): 749-757.

- Kurg, R, Uusen, P, Vosa, L and Ustav, M (2010).** "Human papillomavirus E2 protein with single activation domain initiates HPV18 genome replication, but is not sufficient for long-term maintenance of virus genome." *Virology* **408**(2): 159-166.
- Lace, MJ, Anson, JR, Thomas, GS, Turek, LP and Haugen, TH (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): 10841-10853.
- Laemmli, UK (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lentz, MR, Stevens, SM, Jr., Raynes, J and Elkhoury, N (2006).** "A phosphorylation map of the bovine papillomavirus E1 helicase." *Virology* **3**: 13.
- Love, MI, Huber, W and Anders, S (2014).** "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biol* **15**(12): 550.
- Luo, Y, Lou, S, Deng, X, Liu, Z, Li, Y, Kleiboeker, S and Qiu, J (2011).** "Parvovirus B19 infection of human primary erythroid progenitor cells triggers ATR-Chk1 signaling, which promotes B19 virus replication." *J Virol* **85**(16): 8046-8055.
- Macek, B, Mann, M and Olsen, JV (2009).** "Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 199-221.
- Manawapat-Klopfer, A (2013).** "Identifikation und Charakterisierung von potentiellen Biomarkern für die Persistenz und Progression einer HPV16-Infektion." *Dissertation*.
- Marfella, CG and Imbalzano, AN (2007).** "The Chd family of chromatin remodelers." *Mutat Res* **618**(1-2): 30-40.
- Martin, M (2012).** "Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads." *Bioinformatics in Action* **17**: 10-12.
- McBride, AA (2013).** "The papillomavirus E2 proteins." *Virology* **445**(1-2): 57-79.
- McBride, AA, Bolen, JB and Howley, PM (1989).** "Phosphorylation sites of the E2 transcriptional regulatory proteins of bovine papillomavirus type 1." *J Virol* **63**(12): 5076-5085.
- McBride, AA and Howley, PM (1991).** "Bovine papillomavirus with a mutation in the E2 serine 301 phosphorylation site replicates at a high copy number." *J Virol* **65**(12): 6528-6534.
- Moody, CA and Laimins, LA (2010).** "Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 550-560.
- Moscicki, AB, Schiffman, M, Kjaer, S and Villa, LL (2006).** "Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer." *Vaccine* **24 Suppl 3**: S3/42-51.
- Ong, SE, Blagoev, B, Kratchmarova, I, Kristensen, DB, Steen, H, Pandey, A and Mann, M (2002).** "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics." *Mol Cell Proteomics* **1**(5): 376-386.

- Penrose, KJ, Garcia-Alai, M, de Prat-Gay, G and McBride, AA (2004).** "Casein Kinase II phosphorylation-induced conformational switch triggers degradation of the papillomavirus E2 protein." *J Biol Chem* **279**(21): 22430-22439.
- Penrose, KJ and McBride, AA (2000).** "Proteasome-mediated degradation of the papillomavirus E2-TA protein is regulated by phosphorylation and can modulate viral genome copy number." *J Virol* **74**(13): 6031-6038.
- Pfaffl, MW (2001).** "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Powell, ML, Smith, JA, Sowa, ME, Harper, JW, Iftner, T, Stubenrauch, F and Howley, PM (2010).** "NCoR1 mediates papillomavirus E8;E2C transcriptional repression." *J Virol* **84**(9): 4451-4460.
- Purdie, KJ, Sexton, CJ, Proby, CM, Glover, MT, Williams, AT, Stables, JN and Leigh, IM (1993).** "Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus." *Cancer Res* **53**(21): 5328-5333.
- Quinlan, EJ, Culleton, SP, Wu, SY, Chiang, CM and Androphy, EJ (2013).** "Acetylation of conserved lysines in bovine papillomavirus E2 by p300." *J Virol* **87**(3): 1497-1507.
- Remm, M, Remm, A and Ustav, M (1999).** "Human papillomavirus type 18 E1 protein is translated from polycistronic mRNA by a discontinuous scanning mechanism." *J Virol* **73**(4): 3062-3070.
- Rheinwald, JG and Green, H (1975).** "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." *Cell* **6**(3): 331-343.
- Roman, A and Munger, K (2013).** "The papillomavirus E7 proteins." *Virology* **445**(1-2): 138-168.
- Ruesch, MN, Stubenrauch, F and Laimins, LA (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): 5016-5024.
- Salvi, M, Sarno, S, Cesaro, L, Nakamura, H and Pinna, LA (2009).** "Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis." *Biochim Biophys Acta* **1793**(5): 847-859.
- Sankovski, E, Mannik, A, Geimanen, J, Ustav, E and Ustav, M (2014).** "Mapping of betapapillomavirus human papillomavirus 5 transcription and characterization of viral-genome replication function." *J Virol* **88**(2): 961-973.
- Sareddy, GR and Vadlamudi, RK (2016).** "PELP1: Structure, biological function and clinical significance." *Gene* **585**(1): 128-134.
- Scheffner, M, Huibregtse, JM, Vierstra, RD and Howley, PM (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.

- Schuck, S, Ruse, C and Stenlund, A (2013).** "CK2 phosphorylation inactivates DNA binding by the papillomavirus E1 and E2 proteins." *J Virol* **87**(13): 7668-7679.
- Sekhar, V and McBride, AA (2012).** "Phosphorylation regulates binding of the human papillomavirus type 8 E2 protein to host chromosomes." *J Virol* **86**(18): 10047-10058.
- Sekhar, V, Reed, SC and McBride, AA (2010).** "Interaction of the betapapillomavirus E2 tethering protein with mitotic chromosomes." *J Virol* **84**(1): 543-557.
- Shi, Y, Dodson, GE, Shaikh, S, Rundell, K and Tibbetts, RS (2005).** "Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) is a T-antigen kinase that controls SV40 viral replication in vivo." *J Biol Chem* **280**(48): 40195-40200.
- Southern, PJ and Berg, P (1982).** "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter." *J Mol Appl Genet* **1**(4): 327-341.
- Spriggs, CC and Laimins, LA (2017).** "Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication." *Viruses* **9**(8).
- Stanley, M (2008).** "Immunobiology of HPV and HPV vaccines." *Gynecol Oncol* **109**(2 Suppl): S15-21.
- Straub, E, Dreer, M, Fertey, J, Iftner, T and Stubenrauch, F (2014).** "The viral E8^{E2C} repressor limits productive replication of human papillomavirus 16." *J Virol* **88**(2): 937-947.
- Straub, E, Fertey, J, Dreer, M, Iftner, T and Stubenrauch, F (2015).** "Characterization of the Human Papillomavirus 16 E8 Promoter." *J Virol* **89**(14): 7304-7313.
- Stubenrauch, F, Colbert, A and Laimins, L (1998).** "Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions." *J Virol*. **72**(10): 8115-8123.
- Stubenrauch, F, Hummel, M, Iftner, T and Laimins, LA (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): 1178-1186.
- Stubenrauch, F and Laimins, LA (1999).** "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." *Semin Cancer Biol* **9**(6): 379-386.
- Stubenrauch, F, Straub, E, Fertey, J and Iftner, T (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): 2284-2292.
- Stubenrauch, F, Zobel, T and Iftner, T (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): 4139-4149.
- Thierry, F and Howley, PM (1991).** "Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter." *New Biol* **3**(1): 90-100.

-
- Thierry, F and Yaniv, M (1987).** "The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region." *Embo j* **6**(11): 3391-3397.
- Titolo, S, Brault, K, Majewski, J, White, PW and Archambault, J (2003).** "Characterization of the minimal DNA binding domain of the human papillomavirus e1 helicase: fluorescence anisotropy studies and characterization of a dimerization-defective mutant protein." *J Virol* **77**(9): 5178-5191.
- Walboomers, JM, Jacobs, MV, Manos, MM, Bosch, FX, Kummer, JA, Shah, KV, Snijders, PJ, Peto, J, Meijer, CJ and Munoz, N (1999).** "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." *J Pathol* **189**(1): 12-19.
- Wang'ondou, R, Teal, S, Park, R, Heston, L, Delecluse, H and Miller, G (2015).** "DNA Damage Signaling Is Induced in the Absence of Epstein-Barr Virus (EBV) Lytic DNA Replication and in Response to Expression of ZEBRA." *PLoS One* **10**(5): e0126088.
- Winokur, PL and McBride, AA (1992).** "Separation of the transcriptional activation and replication functions of the bovine papillomavirus-1 E2 protein." *Embo j* **11**(11): 4111-4118.
- Wu, YC, Bian, XL, Heaton, PR, Deyrieux, AF and Wilson, VG (2009).** "Host cell sumoylation level influences papillomavirus E2 protein stability." *Virology* **387**(1): 176-183.
- Zobel, T, Iftner, T and Stubenrauch, F (2003).** "The Papillomavirus E8 Δ E2C Protein Represses DNA Replication from Extrachromosomal Origins." *Mol Cell Biol* **23**(22): 8352-8362.
- Zou, N, Lin, BY, Duan, F, Lee, KY, Jin, G, Guan, R, Yao, G, Lefkowitz, EJ, Broker, TR and Chow, LT (2000).** "The hinge of the human papillomavirus type 11 E2 protein contains major determinants for nuclear localization and nuclear matrix association." *J Virol* **74**(8): 3761-3770.

8 PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

van de Poel, S, Dreer, M, Velic, A, Macek, B, Baskaranc, P, Iftner, T and Stubenrauch, F (2017). "Identification and functional characterization of phosphorylation sites of the HPV31 E8^{E2} protein." *JVirol.* pii: JVI.01743-17

Dreer, M, van de Poel, S and Stubenrauch, F (2017). "Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein." *Virus Res* **231**: 96-102.

Von dieser Arbeit unabhängige Publikationen:

Dreer, M, Fertey, J, van de Poel, S, Straub, E, Madlung, J, Macek, B, Iftner, T and Stubenrauch, F (2016). "Interaction of NCOR/SMRT Repressor Complexes with Papillomavirus E8^{E2C} Proteins Inhibits Viral Replication." *PLoS Pathog* **12**(4): e1005556

9 DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei

Prof. Dr. Frank Stubenrauch für die engagierte und geduldige Betreuung dieser Arbeit sowie die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und zahlreichen fachlichen Ratschläge, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

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

Prof. Dr. Boris Maček für die Betreuung dieser Arbeit durch die Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät und die Übernahme der Tätigkeit als Erstgutachter.

Mein Dank geht auch an alle **Kolleginnen und Kollegen** für die stete Hilfsbereitschaft, die vielen wertvollen Anregungen und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei **Elke Straub** dafür bedanken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Darüber hinaus danke ich meiner **Familie** und meinem Partner **Christoph** für ihre uneingeschränkte Unterstützung und den emotionalen Rückhalt während der Anfertigung dieser Arbeit.