

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Daniela Holland
aus Bremen

Tag der mündlichen Prüfung:

**Gezielte Hemmung der E7-Funktion
humaner Papillomviren durch RNA-Interferenz
und Peptid-Inhibitoren**

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann
Prof. Dr. Gabriele Petersen

Für meine Eltern

„Wenn man es nur versucht, so geht´s.

Das heißt mitunter, doch nicht stets.“

Wilhelm Busch (1832-1908)

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg im Forschungsschwerpunkt "Infektion und Krebs" in der Arbeitsgruppe "Molekulare Therapie virusassoziierter Tumore" unter Anleitung von Prof. Dr. Felix Hoppe-Seyler angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Felix Hoppe-Seyler danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine Diskussionbereitschaft und die kritische Begleitung der Arbeit.

Für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für die allgemeine und besondere Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann.

Herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Gabriele Petersen für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Für die Betreuung während der Durchführung der praktischen Arbeiten und ihre Diskussionsbereitschaft geht mein Dank an Frau Prof. Dr. Karin Hoppe-Seyler.

Dem Arbeitskreis Dürst, insbesondere Herrn Prof. Dr. Matthias Dürst und Julia Maroldt, danke ich für die fruchtbare Kooperation.

Ganz besonders möchte ich Nina und Claire für die schöne und spannende Zeit im „kleinen“ Labor, für ihre Hilfe und Unterstützung, Kritik und Ermutigung, ihre Freundschaft und das Ertragen meiner Spinnereien danken.

Dr. Markus Vogt danke ich für seine unendliche Geduld, seine Hilfsbereitschaft und seinen unverwechselbaren Humor. Bei Julia Bulkescher und Claudia Lohrey möchte ich mich für die vielen wertvollen praktischen Tipps und ihre Hilfe bei zäher Pipettierarbeit ganz herzlich bedanken. Für die nette Zeit und die Unterstützung danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises Hoppe-Seyler. Besonders möchte ich mich auch bei Thomas Holz für seine stete Hilfsbereitschaft bei kleinen und großen Computerkatastrophen bedanken.

Schliesslich danke ich ganz besonders meinen Eltern, meinem Bruder Christian sowie Susanne und Karen dafür, dass sie mich während der gesamten Doktorarbeit unterstützt und ermutigt haben und dafür, dass sie an mich glauben.

Ergebnisse dieser Arbeit sind zur Publikation vorgesehen in:

Wagener, N., Holland, D., Bulkescher, J., Crnković-Mertens, I., Hoppe-Seyler, K., Zentgraf, H., Pritsch, M., Buse, S., Pfitzenmaier, J., Haferkamp, A., Hohenfellner, M., Hoppe-Seyler, F.

“The *Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)* gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells.”

(Zur Veröffentlichung eingereicht)

Holland, D., Dürst, M., Maroldt, J., Hoppe-Seyler, K., Hoppe-Seyler, F.

“Activation of the *Enhancer of Zeste homolog 2* Gene by the Human Papillomavirus E7 Onkoprotein.”

(Manuskript in Vorbereitung)

Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab bei folgenden Gelegenheiten präsentiert:

Holland, D., Dürst, M., Maroldt, J., Hoppe-Seyler, K., Hoppe-Seyler, F. (2007)

„*Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)* – a new target of the HPV18 E7 oncoprotein?“, RNAi Europe, Barcelona, *Posterpräsentation*.

Holland, D., Butz, K., Hoppe-Seyler, F. (2006)

“*Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)* – a new target of the HPV18 E7 oncoprotein?“, DKFZ, Heidelberg, *Posterpräsentation*.

(Posterpreis des PhD-Programms)

Holland, D., Butz, K., Hoppe-Seyler, F. (2006)

“Peptides targeting the HPV18 E7 protein“, International Papillomavirus Conference, Prag, *Posterpräsentation*.

Holland, D., Butz, K., Vogt, M., Dymalla, S., Semzow, J., Hoppe-Seyler, F. (2006)

“Inhibition of Human Papillomavirus Oncogene Expression by siRNAs“, RNA Networks and Imaging Conference, Heidelberg, *Posterpräsentation*.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einleitung	3
1.1. Humane Papillomviren (HPV)	3
1.1.1. <i>Organisation der humanen Papillomviren</i>	3
1.1.2. <i>Lebenszyklus humaner Papillomviren</i>	4
1.2. HPV-assoziierte Karzinogenese	5
1.3. Die viralen Onkoproteine E6 und E7	5
1.3.1. <i>Das E6-Onkoprotein humaner high-risk Papillomviren</i>	5
1.3.2. <i>Das E7-Onkoprotein humaner high-risk Papillomviren</i>	6
1.3.3. <i>Funktionelle Kooperation des E6- und E7-Onkoproteins</i>	8
1.4. Analyse der HPV-assoziierten Karzinogenese durch Transkriptomanalysen .	8
1.4.1. <i>Das humane Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)-Gen</i>	9
1.5. Therapeutische Strategien	10
1.5.1. <i>RNA-Interferenz (RNAi)</i>	11
1.5.2. <i>Transkriptionelle Hemmung der Genexpression durch siRNAs</i>	13
1.5.3. <i>Peptid-Inhibitoren und Peptid-Aptamere</i>	14
1.6. Zielsetzung der Arbeit	17
2. Ergebnisse	18
2.1. EZH2 – Ein neues Zielgen onkogener humaner Papillomviren	18
2.1.1. <i>Inhibition der E6/E7-Expression durch RNAi führt zur Hemmung der EZH2-Expression</i> 18	
2.1.2. <i>Die Expression von E7 aktiviert den EZH2-Promotor über den pRb-E2F Signalweg</i>	20
2.1.3. <i>Die Hemmung der EZH2-Expression durch RNAi führt zum Zellzyklus-Arrest in G1 und vermindertem Zellwachstum in HPV-positiven Zellen</i>	22
2.1.4. <i>Die Hemmung des Zellwachstums ist mit Apoptoseinduktion assoziiert, nicht aber mit Seneszenzinduktion</i>	24
2.1.5. <i>Differentielle Regulation von p21 und p53 nach Hemmung der EZH2-Expression</i>	26
2.1.6. <i>Die EZH2-Expressionsspiegel sind in HPV-positiven Läsionen deutlich erhöht.</i>	27
2.2. Spezifische Hemmung der HPV18 E7-Expression durch RNAi	28
2.2.1. <i>HPV18 E7-spezifische shRNAs</i>	29
2.2.2. <i>19mer shRNAs hemmen die HPV18 E7-Expression nicht</i>	29
2.2.3. <i>Eine 29mer shRNA hemmt die HPV18 E7-Expression</i>	30
2.2.4. <i>Die Hemmung der HPV18 E7-Expression durch RNAi führt zu Zellzyklus-Arrest in G1 und Stabilisierung der pRb-Proteinspiegel</i>	33
2.2.5. <i>Eine Langzeitinhibition der E7-Expression in HPV18-positiven Zellen führt zu vermindertem Zellwachstum und Seneszenz</i>	34

2.3.	Hemmung der Expression der Onkogene E6 und E7 durch TGS	35
2.3.1.	<i>Promotor-spezifische siRNAs können die HPV18 E6/E7-Expression hemmen.....</i>	36
2.3.2.	<i>Der Effekt ist Promotor-spezifisch</i>	38
2.3.3.	<i>Die Behandlung mit Promotor-spezifischen siRNAs führt nicht zu de novo Methylierung der HPV18 URR.....</i>	38
2.4.	Spezifische Hemmung des HPV18 E7-Proteins durch Peptid-Inhibitoren	40
2.4.1.	<i>Y2H Screen nach HPV18 E7-bindenden Peptiden</i>	40
2.4.2.	<i>Einige der identifizierten Proteine binden HPV18 E7 auch in Säugerzellen</i>	41
2.4.3.	<i>Die Bindung der Peptide an das HPV18 E7-Protein ist hochspezifisch.....</i>	43
2.4.4.	<i>Die HPV18 E7-bindenden Peptide Pep21, Pep45 und Pep49 interferieren mit der Bindung zwischen E7 und pRb.....</i>	43
2.4.5.	<i>Die HPV18 E7-bindenden Peptide Pep1, Pep21 und Pep68 hemmen spezifisch das Wachstum HPV-positiver Zellen</i>	44
3.	Diskussion.....	46
4.	Material und Methoden	58
4.1.	Material	58
4.1.1.	<i>Geräte</i>	58
4.1.2.	<i>Materialien</i>	58
4.1.3.	<i>Chemikalien</i>	59
4.1.4.	<i>Puffer und Lösungen</i>	59
4.1.5.	<i>Kits.....</i>	60
4.1.6.	<i>Enzyme</i>	60
4.1.7.	<i>Standards.....</i>	60
4.1.8.	<i>Plasmide</i>	61
4.1.9.	<i>Oligonukleotide</i>	62
4.1.10.	<i>siRNAs.....</i>	62
4.1.11.	<i>Hybridisierungssonden.....</i>	62
4.1.12.	<i>Antikörper</i>	62
4.1.13.	<i>Bakterienstamm.....</i>	63
4.1.14.	<i>Zelllinien</i>	63
4.1.15.	<i>Zellkulturmedien und Zusätze</i>	63
4.2.	Methoden.....	64
4.2.1.	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	64
4.2.1.1.	<i>Transformation</i>	64
4.2.1.2.	<i>Aufarbeitung von Plasmid-DNA</i>	64
4.2.1.3.	<i>Klonierung von pSuper-Konstrukten zur Expression von shRNAs.....</i>	65
4.2.1.4.	<i>DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen</i>	66
4.2.1.5.	<i>Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen</i>	66
4.2.1.6.	<i>Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....</i>	67
4.2.1.7.	<i>Agarose-Gelelektrophorese von RNA.....</i>	67

4.2.1.8.	RNA-Transfer auf eine Nylon-Membran (Northernblot)	68
4.2.1.9.	Radioaktive Markierung und Reinigung von DNA.....	68
4.2.1.10.	Hybridisierung von RNA-Filtern mit DNA-Sonden	69
4.2.1.11.	Reverse Transkription	70
4.2.1.12.	PCR (Polymerase Chain Reaction)	70
4.2.2.	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	71
4.2.2.1.	Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen	71
4.2.2.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	72
4.2.2.3.	SDS-PAGE.....	72
4.2.2.4.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Westernblot).....	73
4.2.2.5.	Antikörperbehandlung des Westernblots	74
4.2.2.6.	Nachweis durch „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL).....	74
4.2.2.7.	Immunhistochemie	75
4.2.3.	<i>Zellbiologische Methoden</i>	75
4.2.3.1.	Kultivierung adhäsiv wachsender permanenter Zelllinien.....	75
4.2.3.2.	Kryokonservieren und Auftauen von Zellen	75
4.2.3.3.	Transfektion humaner Zellen mit synthetischen siRNAs	76
4.2.3.4.	Calciumphosphat-Transfektion	76
4.2.3.5.	Generierung stabil transfizierter Zellen.....	77
4.2.3.6.	Zellzyklus-Analyse mittels Durchflußzytometrie.....	77
4.2.3.7.	Wachstums-Assay (Colony Formation Assay).....	78
4.2.3.8.	SEAP-Assay.....	79
4.2.3.9.	Reportergen-Analysen	80
4.2.3.10.	CheckMate-Bindungsassay	80
4.2.3.11.	Messung der Luciferase-Aktivität in eukaryotischen Zellextrakten	80
4.2.3.12.	Messung der β -Galactosidase-Aktivität in eukaryotischen Zellextrakten	81
4.2.3.13.	TUNEL-Assay	82
4.2.3.14.	Seneszenz-Assay	83
4.2.4.	<i>Hefe Zwei-Hybrid-Assay und verwandte Methoden</i>	83
4.2.4.1.	Das Hefe Zwei-Hybrid-System.....	83
4.2.4.2.	Transformation von Hefezellen	84
4.2.4.3.	Herstellung von Selektionsnährböden	85
4.2.4.4.	Transformation der Peptid-Expressionsbank in Hefezellen.....	85
4.2.4.5.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen	86
4.2.4.6.	Replikaplattierung	87
5.	Literatur	88
6.	Abkürzungen	99

Zusammenfassung

Spezifische Typen humaner Papillomviren (HPVs) verursachen das Zervixkarzinom, die zweithäufigste Krebsart bei Frauen weltweit. Bisherige Therapien sind nicht HPV-spezifisch und können unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen. Die Entwicklung neuer HPV-spezifischer Therapieansätze war daher das übergeordnete Ziel dieser Studie.

Da Wachstum und Überleben HPV-positiver Krebszellen von der fortlaufenden Expression und funktionellen Kooperation der viralen Onkogene E6 und E7 abhängen, kann die gezielte Inhibition der viralen Onkogene einen spezifischen Therapieansatz bieten. In dieser Studie konnte erstmalig eine HPV18 E7-spezifische shRNA generiert werden. Weiterhin konnten mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems sechs Peptide identifiziert werden, die in der Hefe und in Säugerzellen an das E7-Protein von HPV18 binden. Diese Bindung ist hochspezifisch. Biochemische und funktionelle Studien mit der shRNA und den Peptiden validierten E7 als therapeutisches Zielprotein. So resultierte die Hemmung von E7 in einer Proliferationshemmung HPV-positiver Karzinomzellen, einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und letztendlich in Seneszenz. Neben der post-transkriptionell wirksamen shRNA konnten außerdem drei Promotor-spezifische siRNAs identifiziert werden, welche die Aktivität der transkriptionellen Kontrollregion von HPV18 inhibierten.

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist es weiterhin wichtig, detaillierte Einblicke in die Mechanismen der HPV-assoziierten Karzinogenese zu gewinnen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass onkogene HPVs das humane *Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)*-Gen aktivieren. Reporteranalysen zeigten, dass EZH2 primär über den E7/pRb/E2F-Signalweg aktiviert wird. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die fortlaufende EZH2-Expression essentiell für Proliferation und Überleben HPV-positiver Krebszellen ist. Immunhistochemische Analysen zeigten eine Korrelation zwischen der viralen Onkogenexpression und erhöhten EZH2-Expressionsspiegeln in HPV-positiven Läsionen.

Diese Ergebnisse definieren *EZH2* als ein neues Zielgen für das HPV E7-Onkoprotein. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Inhibitoren ermöglichen erstmals eine gezielte Hemmung der endogenen E7-Aktivität in HPV-positiven Karzinomzellen. Sie sollten daher auch für weitere Funktionsstudien von E7 hilfreich sein. Aufgrund ihrer zielgerichteten Wirkweise könnten die E7-Inhibitoren außerdem eine erste Grundlage für die Entwicklung spezifischer Therapieansätze zur Behandlung HPV-positiver präneoplastischer und neoplastischer Läsionen bieten.

Summary

Cervical cancer represents the second most common cancer in women worldwide and is almost regularly caused by oncogenic types of human papillomaviruses (HPVs). Current therapies can cause severe side-effects as they are not HPV-specific. Therefore, the overall aim of this study was to develop novel HPV-specific therapeutic approaches.

Both the proliferation and viability of HPV-positive cancer cells depend on the concerted action of the viral E6 and E7 oncogenes. Therefore, targeting the viral oncogenes for functional inhibition could provide a rational approach for therapy. This study, for the first time, identified a shRNA which can specifically inhibit HPV18 E7 expression. In addition, the yeast two-hybrid technology allowed the identification of six peptides which interact with the HPV18 E7 protein, both in yeast and mammalian cells. Binding of the peptides to E7 was highly specific. Results from biochemical and functional analyses with shRNA and peptides validated E7 as a therapeutic target, since inhibition of E7 in HPV-positive cancer cells acted anti-proliferative by inducing cell cycle arrest in G1 and eventually led to senescence. Besides the post-transcriptional active shRNA, three promoter-directed siRNAs were identified which blocked the activity of the HPV18 upstream regulatory region.

Further insight into the mechanism of HPV-associated carcinogenesis was gained by the identification and characterization of the *Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)* gene as novel HPV target gene. Reporter gene analyses revealed transcriptional induction of the EZH2 promoter by E7 via the pRb-E2F-pathway. Inhibition of EZH2 expression in HPV-positive cells led to cell cycle arrest in G1, reduced cell growth, and apoptosis. In addition, immunohistochemical analyses of tissue samples derived from normal tissue, dysplasia, or tumor tissue revealed that HPV-positive lesions show high EZH2 expression levels.

Thus, the results of this study define *EZH2* as a novel target gene for HPV E7. Furthermore, the E7-specific inhibitors allow, for the first time, the targeted inhibition of endogenous E7 activity. They therefore should provide useful tools for further functional analyses of E7. Notably, the specific effect of these inhibitors on E7 may provide a novel basis for the development of therapeutic strategies for the treatment of HPV-positive preneoplastic and neoplastic lesions.

1. Einleitung

1.1. Humane Papillomviren (HPV)

Virusinfektionen können eine Ursache für die Entwicklung von Krebs sein. Schätzungsweise 15% der weltweiten Krebserkrankungen sind auf eine Infektion mit Tumoviren, wie zum Beispiel den humanen Papillomviren (HPV), zurückzuführen (Parkin *et al.*, 1984; Parkin *et al.*, 2005).

Es sind mehr als 100 HPV-Typen bekannt, von denen rund ein Drittel Epithelzellen des Genitaltraktes befallen (zur Hausen, 2002). Hierbei unterscheidet man so genannte „low-risk“ HPV-Typen, wie HPV6 und 11, die lediglich benigne Genitalwarzen verursachen, von so genannten „high-risk“ Typen, die die Bildung von malignen Läsionen und Tumoren induzieren können. Zu den high-risk Typen gehören: HPV16, 18, 31, 33, 35 (Laimins, 1993; de Villiers, 1994; zur Hausen und de Villiers, 1994).

Durch eine HPV-Infektion kann unter anderem das Zervixkarzinom, die zweithäufigste Krebsart bei Frauen weltweit, induziert werden (Pisani *et al.*, 2002; Parkin *et al.*, 2005). Rund 94% aller Zervixkarzinome enthalten DNA von high-risk HPV-Typen (Walboomers *et al.*, 1999).

Die Übertragung des Virus erfolgt durch sexuelle Kontakte, wobei nicht jede Infektion zur Entwicklung von Krebs führt. Die nach einer Infektion entstehenden Dysplasien bilden sich meist innerhalb von 6-12 Monaten zurück (Jenson *et al.*, 1991; Hopfl *et al.*, 2000).

1.1.1. Organisation der humanen Papillomviren

HPV sind kleine, nicht umhüllte DNA-Viren (Klug und Finch, 1965). Das virale Genom besteht aus einem circa 8000 bp langen, zirkulären, doppelsträngigen DNA-Molekül, das in drei Regionen eingeteilt werden kann (Abb. 1.1.1.)

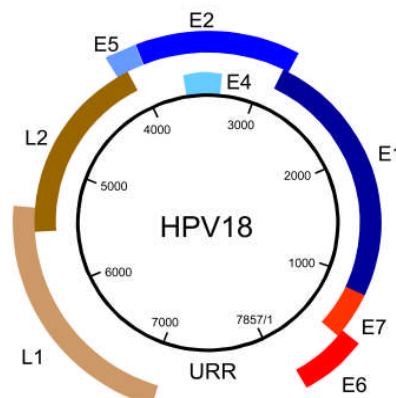


Abb. 1.1.1. Das Genom von HPV18. Die frühen Gene E1, E2, E4-E7 und die späten Gene L1 und L2 werden von einer gemeinsamen Kontrollregion (Upstream regulatory region, URR) reguliert (zur Hausen, 1996).

Die frühen Gene (E1, E2, E4-E7) kodieren für sechs Proteine, die die Replikation des Virusgenoms und die Zelltransformation steuern. Die späten Gene (L1 und L2) kodieren für die beiden Strukturproteine des Kapsids (Engel *et al.*, 1983). Die Expression aller viralen Gene sowie auch die virale Replikation werden von einer circa 1000 bp umfassenden Kontrollregion (Upstream Regulatory Region, URR) gesteuert.

1.1.2. Lebenszyklus humaner Papillomviren

Der Lebenszyklus humaner Papillomviren ist eng an den Differenzierungsgrad der befallenen Epithelzellen gekoppelt (Laimins, 1993). Die Infektion erfolgt in undifferenzierten Zellen der basalen Epithelschicht (*Stratum basale*), zu denen das Virus vermutlich durch Mikroläsionen vordringt (Chow und Broker, 1997). Hier wird das virale Genom zunächst nur in geringem Maße repliziert (Stubenrauch und Laimins, 1999) (Abb 1.1.2.).

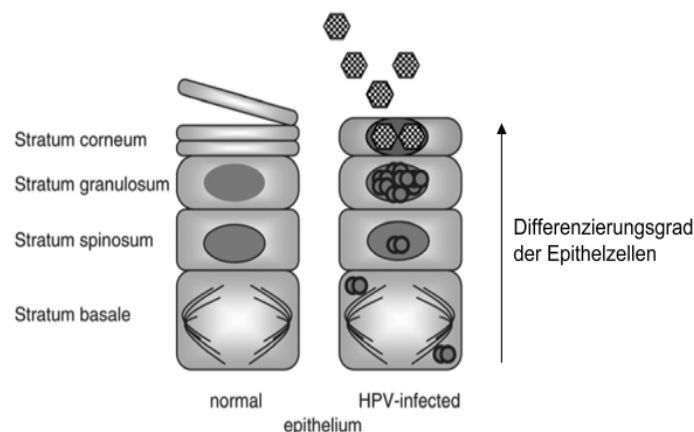


Abb. 1.1.2. Der Lebenszyklus humaner Papillomviren. Das Virus infiziert undifferenzierte Zellen des *Stratum basale* und nutzt die zelluläre DNA-Synthesemaschinerie zur Replikation. Nach der Zellteilung wandert eine Tochterzelle zum *Stratum granulosum*, wo weitere Virusreplikation, Synthese der Kapsidproteine und Zusammensetzung der Viruspartikel erfolgen. Diese werden in den obersten Gewebeschichten freigesetzt (Fehrmann und Laimins, 2003).

Nach der Zellteilung verbleibt eine Tochterzelle im *Stratum basale* und bildet somit ein Reservoir für weitere Zellteilungen. Da in diesem Gewebeabschnitt keine Viruspartikel gebildet werden, die zur Zellyse führen würden, können infizierte Zellen bis zu mehreren Jahren dort verbleiben (Stubenrauch und Laimins, 1999). Die andere Tochterzelle wandert zu den oberen Gewebeschichten des *Stratum granulosum*. Erst hier, in vollständig differenzierten Zellen, können die verstärkte Replikation des Virusgenoms und die Synthese der Kapsidproteine erfolgen (Lambert, 1991). Dies führt zur Bildung von Viruspartikeln in den obersten Schichten des *Stratum corneum* und schließlich zur Freisetzung der Viruspartikel (Durst *et al.*, 1991; Laimins, 1993).

1.2. HPV-assoziierte Karzinogenese

Eine dauerhafte Infektion mit high-risk HPV-Typen ist der wichtigste Faktor für die Entwicklung des Zervixkarzinoms (zur Hausen, 1996; Wallin *et al.*, 1999). Im Rahmen einer persistierenden HPV-Infektion integriert das Virus-Genom häufig in die Wirts-DNA (Schwarz *et al.*, 1985; Stoler *et al.*, 1992). Dabei erfolgt die Integration meist im offenen Leseraster des E2-Gens und führt dadurch letztlich auch zum Verlust des E2-Proteins (Schwarz *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 1987). Da das E2-Protein als Repressor auf den gemeinsamen Promotor der Onkogene E6 und E7 wirken kann, hat der Verlust des E2-Proteins eine verstärkte Expression der beiden Onkogene zur Folge. Dies begünstigt die Krebsentstehung (Smotkin und Wettstein, 1986; Androphy *et al.*, 1987; Bernard *et al.*, 1989; Jeon und Lambert, 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von E6 und E7 in primären humanen Keratinozyten zur Immortalisierung der Zellen führt (Durst *et al.*, 1987; Pirisi *et al.*, 1987; Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989a; Hudson *et al.*, 1990). Zwar können die Onkoproteine E6 und E7 auch unabhängig voneinander Zellen immortalisieren, die Effizienz ist hierbei aber geringer als bei ihrer Koexpression (Durst *et al.*, 1987; Munger *et al.*, 1989a; Halbert *et al.*, 1991; McDougall, 1994).

Für die Krebsentstehung ist die Expression der beiden Onkogene notwendig, aber nicht hinreichend. Durch E6 und E7 transformierte Zellen sind zunächst nicht tumorigen (Durst *et al.*, 1987; Woodworth *et al.*, 1989). Erst zusätzliche Ereignisse wie die Expression von aktiviertem *RAS*- oder *FOS*-Onkogen führen zur Immortalisierung der Zellen (DiPaolo *et al.*, 1989; Durst *et al.*, 1989).

1.3. Die viralen Onkoproteine E6 und E7

1.3.1. Das E6-Onkoprotein humaner high-risk Papillomviren

Das E6-Onkoprotein humaner Papillomviren besteht aus circa 150 Aminosäuren und besitzt 4 Cys-X-X-Cys-Motive, die sich zu zwei Zinkfingern zusammenlagern können (Grossman und Laimins, 1989).

Für das transformierende Potential des E6-Proteins sind Interaktionen mit verschiedenen zellulären Proteinen maßgeblich. Eine wichtige Funktion stellt die Bindung des p53-Proteins und die dadurch induzierte Degradation von p53 dar. Dies ist entscheidend im Rahmen der Transformation und Karzinogenese, weil das p53-Protein als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle und der Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung spielt (Maltzman und Czyzyk, 1984; Fritsche *et al.*, 1993). Hohe p53-Spiegel stellen ein Hindernis

für die Virusreplikation dar, da hierfür die zelluläre DNA-Synthesemaschinerie benötigt wird (Lepik *et al.*, 1998; Lepik und Ustav, 2000).

Der proteasomale Abbau von p53 wird induziert, indem das E6-Protein einen ternären Komplex mit dem p53-Protein und der Ubiquitinligase E6AP bildet (Huibregtse *et al.*, 1991). Anschließend erfolgt die E6AP-vermittelte Ubiquitinierung des p53-Proteins (Scheffner *et al.*, 1990; Hubbert *et al.*, 1992; Huibregtse *et al.*, 1993). Durch die Degradation von p53 interferiert E6 mit der p53/PUMA/Bax-Kaskade und übt anti-apoptotische Aktivität aus (Butz *et al.*, 2003; Vogt *et al.*, 2006). Darüber hinaus kann E6 die Degradation der Proteine c-Myc und BAK induzieren und hierdurch auch p53-unabhängige Apoptosemechanismen inhibieren (Gross-Mesilaty *et al.*, 1998; Thomas und Banks, 1998).

1.3.2. Das E7-Onkoprotein humaner high-risk Papillomviren

Beim E7-Protein humaner Papillomviren vom high-risk Typ handelt es sich um ein circa 100 Aminosäuren umfassendes Phosphoprotein, das zwei Cys-X-X-Cys-Zinkfinger motive enthält. Es besitzt ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften wie die Onkoproteine anderer DNA-Tumorviren, nämlich dem großen Tumor Antigen (TAg) der Polyomaviren und dem E1A-Protein der Adenoviren. Der N-terminale Bereich des E7-Proteins enthält zwei Domänen, die den konservierten Regionen CR1 und CR2 (conserved region 1 und 2) dieser Onkoproteine teilweise oder vollständig ähneln (Phelps *et al.*, 1989). Die CR2-Sequenz enthält die zentrale Bindungsstelle für das Retinoblastomprotein (pRb) (Phelps *et al.*, 1992) (Abb. 1.3.1.).

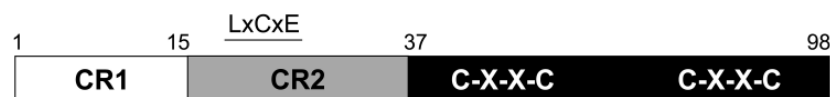


Abbildung 1.3.1. Die Struktur des E7-Proteins von HPV16. Die drei Domänen des HPV16 E7-Proteins sind schematisch dargestellt. Das pRb-Bindemotiv (LxCxE) und die Zinkfinger motive (C-X-X-C) sind eingezeichnet. Die Nummern repräsentieren die Aminosäurepositionen. CR1/2: Konsensusregion 1/2 (Munger *et al.*, 2001)

Eine wichtige Funktion des E7-Onkoproteins ist die Interaktion mit den Proteinen der Pocket-Protein-Familie, pRb, p107 und p130, wodurch die Degradation dieser Proteine induziert wird (Berezutskaya *et al.*, 1997; Classon und Dyson, 2001).

Das pRb-Protein spielt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation. Dabei wird die Progression des Zellzyklus durch die sukzessive Phosphorylierung von pRb reguliert. Initial wird pRb durch den Cyclin D/cdk4-Komplex phosphoryliert, wodurch die Bindung des pRb-Proteins an E2F-Transkriptionsfaktoren aufgehoben wird. Die Freisetzung von E2F-Faktoren führt zur transkriptionellen Aktivierung einer Reihe von Genen, die für den Zellzyklus

regulierende Proteine kodieren. Dadurch erfolgt der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Edmonds und Vousden, 1989; Weintraub *et al.*, 1995).

Durch die Bindung des E7-Proteins an pRb wird dessen Degradation über den Proteasom-Ubiquitin-Signalweg induziert. Dies hat zur Folge, dass die Menge an freiem E2F ansteigt und der Zellzyklus in E7-exprimierenden Zellen dereguliert wird (Edmonds und Vousden, 1989; Jewers *et al.*, 1992; Berezutskaya *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

Der Anstieg der Menge an freien E2F-Faktoren hat jedoch auch zur Folge, dass das E2F-regulierte p16-Protein vermehrt exprimiert wird. Beim diesem Protein handelt es sich um einen übergeordneten Inhibitor der Zellzyklus-promovierenden Cyclin/cdk-Komplexe. Eine vermehrte p16-Expression hätte somit einen Zellzyklusarrest zur Folge, allerdings wird dieser Kontrollpunkt in HPV-positiven Zellen umgangen, indem E7 die Cycline E und A direkt aktiviert (Dyson *et al.*, 1992; Arroyo *et al.*, 1993; Tommasino *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1996) (Abb. 1.3.2.).

Auch die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27 können ein Voranschreiten des Zellzyklus hemmen. Dies wird in HPV-positiven Karzinomzelllinien verhindert, indem das E7-Protein an p21 und p27 bindet, diese funktionell inhibiert, und so auch diese Kontrollpunkte außer Kraft setzt (Zerfass-Thome *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997).

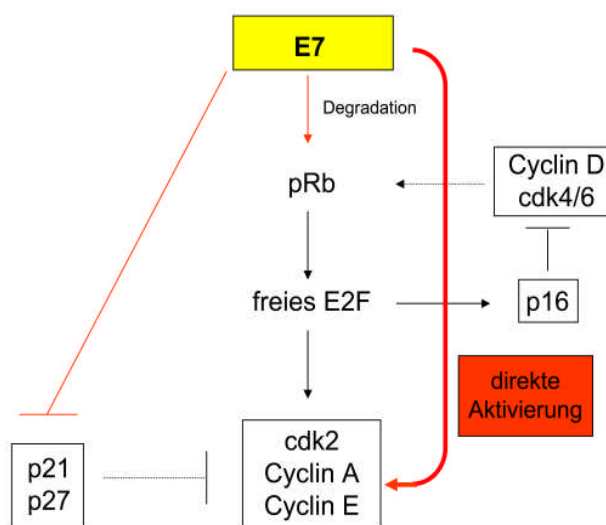


Abb. 1.3.2. Einfluss des E7-Onkoproteins auf Zellzyklusregulatoren. Das E7-Protein induziert die Degradation von pRb. Dies führt zur Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren, welche die Expression E2F-abhängiger Gene induzieren. Dadurch wird auch die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p16 induziert. Der hieraus resultierende Zellzyklusblock wird durch direkte Aktivierung der cdk2/Cyclin E/Cyclin A-Komplexe aufgehoben. Weiterhin inhibiert E7 auch die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das E7-Protein durch Interaktion mit unterschiedlichen Zellzyklusregulatoren eine Progression des Zellzyklus induziert und somit einen starken Wachstumsstimulus auf die Zellen ausübt.

1.3.3. Funktionelle Kooperation des E6- und E7-Onkoproteins

Wie bereits unter 1.2. erläutert, können das E6- und das E7-Protein gemeinsam Zellen mit höherer Effizienz transformieren als einzeln. Es wird vermutet, dass die beiden Proteine funktionell kooperieren. Hierzu kann das unten gezeigte Modell aufgestellt werden (Abb.1.3.3.) Demnach führt die Deregulation des Zellzyklus durch E7 und der daraus resultierende Wachstumsstimulus zur Apoptoseinduktion (Pan und Griep, 1994). Dies wird auch auf eine Stabilisierung von p53 in Gegenwart von E7 zurückgeführt (Demers *et al.*, 1994). Durch Degradierung von p53 kann das E6-Protein die Apoptoseinduktion inhibieren.

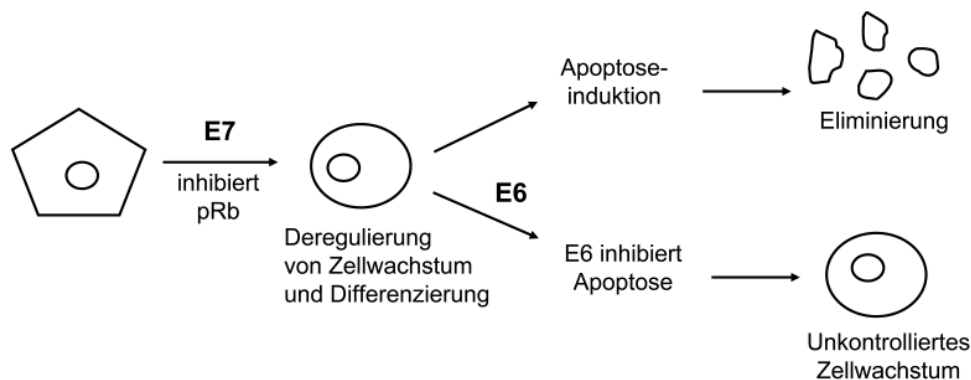


Abb. 1.3.3. Funktionelle Kooperation der E6- und E7-Onkoproteine. Durch die E7-induzierte Degradation von pRb werden Zellwachstum und Differenzierung dereguliert. Dies führt zur Apoptoseinduktion (oberer Pfeil). Das E6-Protein kann jedoch Apoptose inhibieren, wodurch es zu unkontrolliertem Zellwachstum kommt (unterer Pfeil).

Um die funktionelle Kooperation der beiden Onkoproteine weiter aufzuklären, sind Analysen nach gezielter Hemmung der E6- oder E7-Expression notwendig. Da gezeigt werden konnte, dass die Deregulierung des pRb- und p53-Signalwegs durch die viralen Onkoproteine reversibel ist, kann eine Hemmung der E6- und E7-Expression daneben auch eine nähere Analyse dieser Signalwege ermöglichen (Goodwin und DiMaio, 2000; Butz *et al.*, 2003).

1.4. Analyse der HPV-assoziierten Karzinogenese durch Transkriptomanalysen

Transkriptomanalysen sind ein möglicher Ansatz zur Aufklärung der Rolle von E6 und E7 in der HPV-assoziierten Karzinogenese. Das Verständnis der Karzinogeneseprozesse ist Voraussetzung, um neue Angriffspunkte für therapeutische Ansätze zu finden oder molekulare Marker für das Zervixkarzinom zu identifizieren.

In der Studie von Kuner *et al.* wurden die Effekte einer E6- und E6/E7-Hemmung auf endogener Ebene durch RNA-Interferenz (RNAi) analysiert. Dieser Ansatz führte zur Identifizierung von 648 Genen, die entweder negativ reguliert (360 Gene) oder positiv reguliert (288 Gene) waren (Kuner *et al.*, 2007). Viele dieser Gene waren in Karzinogenese-assoziierte Prozesse wie Apoptose- und Zellzykluskontrolle involviert. Eines der am

deutlichsten regulierten Gene war in diesem Ansatz das humane *Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)*-Gen. Daher wurde dieses Gen für weitere funktionelle Studien ausgewählt.

1.4.1. Das humane *Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)*-Gen

Das EZH2-Protein gehört zur Gruppe der Polycomb-Proteine, einer Gruppe transkriptioneller Inhibitoren, die epigenetische Genmodifikationen induzieren können. Diese spielen eine wichtige Rolle in der Embryogenese, in der Entwicklung und Differenzierung, aber auch in der Zellzyklusregulation. Polycomb-Proteine üben ihre Aktivität als Multiproteinkomplexe aus. Das EZH2-Protein ist unter anderem Bestandteil des „Polycomb Repressive Complex 2“ (PRC2) und bildet dessen katalytische Untereinheit. Es konnte gezeigt werden, dass EZH2 Histonmethyltransferase-Aktivität besitzt (Cao *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2005).

Verschiedene Studien geben Hinweis darauf, dass EZH2 eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielt. Während die EZH2-Expression im Normalgewebe meist ziemlich schwach ist, wurden in einer Reihe von Krebsarten wie Brustkrebs (Kleer *et al.*, 2003), Prostatakrebs (Varambally *et al.*, 2002; Saramaki *et al.*, 2006), Leberkrebs (Sudo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007), Lymphomen (Raaphorst, 2005), malignen Melanomen (McHugh *et al.*, 2007), Eierstockkrebs (Lu *et al.*, 2007), Magenkrebs (Matsukawa *et al.*, 2006) und Blasenkrebs (Raman *et al.*, 2005; Weikert *et al.*, 2005) deutlich erhöhte EZH2-Expressionsspiegel gefunden. Bei Brust- und Prostatakrebs korreliert eine vermehrte EZH2-Expression mit der Aggressivität der Erkrankung, daher haben EZH2-Proteinspiegel hier prognostisches Potential (Varambally *et al.*, 2002; Kleer *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2006; Ding und Kleer, 2006). Eine verstärkte EZH2-Expression kann aus einer Amplifikation des *EZH2*-Gens resultieren oder aus einer Deregulation des pRb-E2F-Signalwegs (Bracken *et al.*, 2003).

Die fortlaufende EZH2-Expression spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle für Proliferation und Zellzyklusderegulation verschiedener Krebszellen. So führte eine EZH2-Inhibition durch siRNAs oder Antisense-Oligonukleotide zur Hemmung der DNA-Synthese und inhibierte die Proliferation sowie die Progression des Zellzyklus in verschiedenen Krebszelllinien (Fukuyama *et al.*, 2000; Varambally *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004; Croonquist und Van Ness, 2005). Weiterhin führte die Expression von EZH2 in primären Zellen zu einem Wachstumsvorteil *in vitro* (Visser *et al.*, 2001; Bracken *et al.*, 2003; Kleer *et al.*, 2003) und nach Expression in NIH3T3-Zellen zur Bildung von Tumoren in Mäusen (Croonquist und Van Ness, 2005). Daher kann *EZH2* als *bona fide* Onkogen wirken.

Aufgrund dieser Eigenschaften könnte das *EZH2*-Gen einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt bei verschiedenen Krebserkrankungen darstellen und möglicherweise auch als prognostischer Marker genutzt werden. Ob *EZH2* eine Rolle bei der HPV-assoziierten Karzinogenese spielt, ist bislang nicht untersucht.

1.5. Therapeutische Strategien

In den letzten Jahren konnte die Inzidenz HPV-assoziiierter, maligner Tumore in den Industrieländern in erster Linie durch Prävention mittels zytologischer Analysen deutlich eingedämmt werden. Die erfolgreiche Anwendung solcher Analysen in flächendeckenden Vorsorgeprogrammen hat die Sterberate durch das Zervixkarzinom deutlich reduziert. Ein Beispiel hierfür sind Großbritannien und Nordirland, wo die Sterberate um bis zu 80% reduziert werden konnte (Peto *et al.*, 2004).

Durch die Einführung einer prophylaktischen Impfung gegen high-risk HPV-Typen könnte die Zahl der Neuerkrankungen in Zukunft weiter reduziert werden. Zwei Vakzine zeigten in ersten klinischen Studien fast 100%igen Schutz vor dauerhaften HPV-Infektionen und HPV-assoziierten Dysplasien (Harper *et al.*, 2004; Villa *et al.*, 2005) und sind mittlerweile von den Zulassungsbehörden FDA und EMEA freigegeben worden.

Dennoch sind momentan noch zwei Generationen von Frauen dauerhaft mit high-risk HPV-Typen infiziert. Ferner werden nicht alle high-risk HPV-Typen durch die Impfung abgedeckt. Außerdem sind diverse Probleme bei der Durchführung einer flächendeckenden Impfung zu erwarten. Zum einen treten 83% der Zervixkarzinomfälle in Entwicklungsländern auf (Parkin *et al.*, 2005). Hier sind die Impfmöglichkeiten und der Impferfolg durch fehlende finanzielle Mittel, das Fehlen einer medizinischen Infrastruktur und ungünstige Hygienebedingungen eingeschränkt. Zum anderen gibt es auch in den Industrieländern Gruppen sozialer, ethnischer und religiöser Minderheiten, die durch eine flächendeckende Impfung nicht erreicht werden oder diese eventuell ablehnen könnten. Es besteht demnach weiterhin Bedarf an neuen Therapieansätzen für HPV-induzierte Erkrankungen.

Bisherige Therapien gegen maligne Erkrankungen des Anogenitaltraktes, die durch eine Infektion mit humanen Papillomviren verursacht wurden, sind die operative Entfernung betroffener Regionen, die Applikation zytotoxischer Stoffe (Andrei *et al.*, 2000) oder die Verabreichung immunmodulatorischer Substanzen (Baker und Tyring, 1997). Diese Therapien sind jedoch nicht HPV-spezifisch und bringen eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen mit sich.

Da es zu dem E6- und dem E7-Onkoprotein keine homologen zellulären Proteine gibt, könnte durch eine Inhibition dieser zentralen Proteine der HPV-assoziierten Karzinogenese hingegen eine spezifische Schädigung HPV-positiver Zellen erfolgen. Denkbare Ansätze

hierfür sind die Hemmung der Onkogenexpression mittels RNAi (1.5.1. und 1.5.2.) oder die Hemmung der Onkoproteinaktivität durch Peptide-Inhibitoren und Peptid-Aptamere (1.5.3.)

1.5.1. RNA-Interferenz (RNAi)

Die Hemmung der Genexpression durch kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle (short interfering RNAs, siRNAs) wird als RNAi bezeichnet. Erstmals wurde dieses Phänomen von Fire und Kollegen 1998 für *C. elegans* beschrieben. Hier führte die Injektion doppelsträngiger RNA-Moleküle zu einer effizienten und sequenzspezifischen Hemmung der Genexpression (Fire *et al.*, 1998).

Mechanistisch werden dabei doppelsträngige RNA-Moleküle im Zytoplasma durch das Enzym Dicer, welches RNase III-Aktivität besitzt, in 19-25 nt lange siRNAs gespalten (Elbashir *et al.*, 2001a). Diese werden daraufhin in den „RNA Induced Silencing Complex“ (RISC), einen Multiproteinkomplex mit Endonukleaseaktivität, integriert. Die doppelsträngige RNA wird durch RISC-assoziierte ATP-abhängige Helikaseaktivität aufgewunden und der „Sense“-Strang wird degradiert. Der „Antisense“-Strang leitet den RISC-Komplex dann zum homologen Zieltranskript. Dieses wird durch die Endonuklease-Aktivität des RISC-Komplexes gespalten (Tuschl *et al.*, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001b) (Abb. 1.5.1.). Als Resultat wird die Genexpression durch RNAi auf Transkriptebene gehemmt.

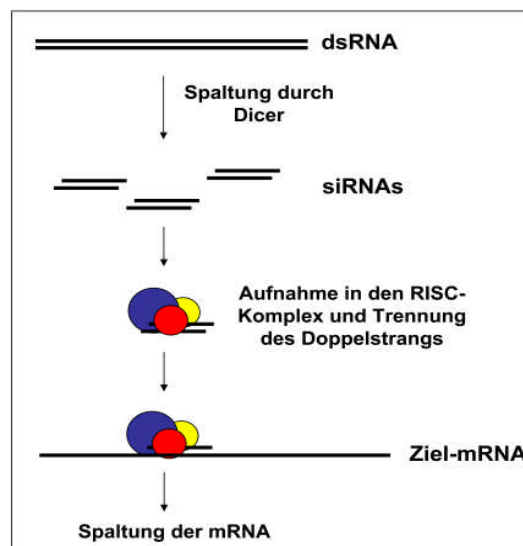


Abb. 1.5.1. Mechanismus der RNAi. Doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) werden durch das Enzym Dicer gespalten und die entstehenden siRNAs werden in den RISC-Komplex integriert. Nach Aufwinden der Duplex und Degradation des „Sense“-Stranges dirigiert der „Antisense“-Strang den RISC-Komplex zum Zieltranskript (Ziel-mRNA). Dieses wird durch die Endonuklease-Aktivität von RISC gespalten.

Durch Transfektion von synthetischen, kurzen doppelsträngigen RNA-Molekülen (siRNAs) oder Expression von RNA-Transkripten mit Haarnadel-Struktur (small hairpin RNAs,

shRNAs) kann der RNAi-Mechanismus zur effizienten Hemmung der Genexpression *in vitro* und *in vivo* genutzt werden (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Takeshita und Ochiya, 2006). Aufgrund ihrer Effizienz und Spezifität findet die RNAi inzwischen breite Anwendung in der Molekularbiologie (Hannon und Rossi, 2004; Meister und Tuschl, 2004; Novina und Sharp, 2004). Die Entwicklung von RNAi-basierten Therapeutika könnte außerdem in Zukunft für eine zielgerichtete Therapie genutzt werden.

Es wurden bereits verschiedene Versuche unternommen, die Genexpression des E6- und E7-Onkogens humaner Papillomviren mittels RNAi zu hemmen. Dabei führte die Hemmung der E6-Expression zur Induktion von Apoptose (Jiang und Milner, 2002; Butz *et al.*, 2003). Die gleichzeitige Hemmung der E6- und E7-Expression hatte hingegen die Induktion von Seneszenz zur Folge (Hall und Alexander, 2003). *In vivo*-Studien zeigten eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums und Apoptoseinduktion nach intratumoraler Injektion einer gegen E6 gerichteten siRNA in Mäusen (Niu *et al.*, 2006), sowie reduziertes Tumorwachstum nach Behandlung von Mäusen mit einem E6/E7-siRNA-Atelocollagen-Komplex (Fujii *et al.*, 2006).

Während E6 bereits als potentielles therapeutisches Zielprotein evaluiert worden ist, war es bis dato nicht möglich, eine E7-spezifische siRNA zu generieren. Eine Schwierigkeit resultiert dabei aus der komplexen Transkriptstruktur der HPV. Bicistronische mRNAs kodieren für das E6- und das E7-Protein der onkogenen HPV-Typen HPV16 und HPV18 (Doorbar *et al.*, 1990; Rohlfs *et al.*, 1991). Für HPV18 sind drei Transkriptklassen bekannt (Schneider-Gadicke und Schwarz, 1987; Rosl *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 2006) (Abb. 1.5.2.). Die Transkripte der Klasse 1 besitzen die vollständigen kodierenden Sequenzen für das E6- und das E7-Protein. Da die beiden kodierenden Sequenzen nur durch wenige Nukleotide getrennt sind, wird vermutet, dass eine effiziente Transkriptions-Reinitiation nicht möglich ist und die Transkripte der Klasse 1 daher vornehmlich für E6 kodieren. Die Transkripte der Klassen 2 und 3 werden in der kodierenden Sequenz für das E6-Protein gespleißt und kodieren für das E7-Protein (Smotkin und Wettstein, 1986; Smotkin und Wettstein, 1987; Sedman *et al.*, 1991).

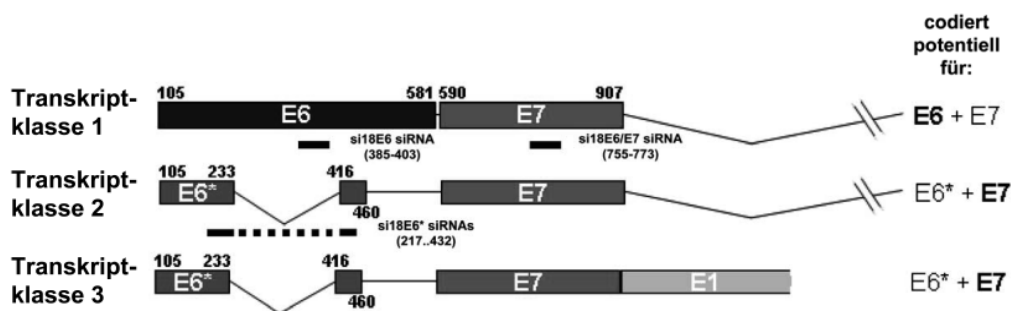


Abb. 1.5.2. HPV18 E6/E7-Transkripte mit siRNA-Zielsequenzen. Transkripte der Klasse 1 kodieren für E6, Transkripte der Klassen 2 und 3 kodieren für E7. siRNA-Zielsequenzen für eine E6-spezifische siRNA (si18E6), eine E6/E7-siRNA (si18E6/E7) und mögliche E7-spezifische siRNAs (si18E6*) sind eingezeichnet. Die Nukleotidpositionen der Zielsequenzen sind angegeben (Cole und Danos, 1987).

Wie in Abbildung 1.5.2. gezeigt, liegen die Zielsequenzen von siRNAs, die sowohl gegen E6 als auch E7 gerichtet sind, in der E7 kodierenden Sequenz (Kuner *et al.*, 2007). Dadurch werden alle drei Transkriptklassen angegriffen. Zur Generierung gegen E6 gerichteter siRNAs wurden Zielsequenzen im Bereich des E6-Introns ausgewählt, das nur in den Transkripten der Klasse 1 enthalten ist (Jiang und Milner, 2002; Butz *et al.*, 2003). So konnte eine Spezifität für die Transkripte der Klasse 1 erreicht werden. Um hingegen eine E7-spezifische siRNA zu erhalten, müssen Sequenzen ausgewählt werden, die im Bereich des Spleißdonor-/ akzeptorüberganges der Transkripte 2 und 3 liegen, da dieser Bereich in den Transkripten der Klasse 1 nicht enthalten ist.

Verschiedene siRNAs gegen das gleiche Zielgen können die Genexpression mit unterschiedlicher Effizienz inhibieren. Tuschl und Kollegen stellten Richtlinien zur Konzeption wirksamer siRNAs auf (Elbashir *et al.*, 2002). Neuere Studien zeigen, dass die Effizienz der RNAi weiter erhöht werden kann indem 27-29mer shRNAs eingesetzt werden. Diese sind Substrate für das Dicer-Enzym und werden daher bereits stromaufwärts von Dicer in den RNAi-Mechanismus integriert. Die Vorstellung ist hierbei, dass Dicer effizienter an substratähnliche shRNAs binden kann, als an meist verwendete produktähnliche 19mer shRNAs. Vermutlich spielt das Dicer-Enzym eine Rolle bei der Integration der Spaltprodukte in den RISC-Komplex, ebenso wie bei der Bildung des RISC-Komplexes, so dass eine vorangehende Dicer-Integration der shRNA die Aufnahme in den RISC-Komplex verbessern kann (Lee *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2004; Tomari *et al.*, 2004). In den Studien von Kim *et al.* sowie Siolas *et al.* besaßen Dicer-Substrate mit einem 27-29 nt langen Stamm bei niedrigen Konzentrationen bis zu 100fach höhere Effizienz als die entsprechenden 19mer shRNAs (Kim *et al.*, 2005; Siolas *et al.*, 2005).

1.5.2. Transkriptionelle Hemmung der Genexpression durch siRNAs

Neben der klassischen RNAi ist in Pflanzen (Mette *et al.*, 2000), in Hefen (Schramke und Allshire, 2004) und in *Drosophila* (Pal-Bhadra *et al.*, 2002) ein weiterer Mechanismus zur Hemmung der Genexpression durch siRNAs beschrieben. In Pflanzen können doppelsträngige RNA-Moleküle, die komplementär zu Promotorsequenzen sind, die Genexpression durch *de novo* DNA-Methylierung inhibieren (RNA-dependent DNA-Methylation, RdDM). In der Hefe induzieren doppelsträngige RNA-Moleküle gegen repetitive Sequenzen der Zentromerregion Chromatinmodifikationen und dadurch letztlich die Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin (Volpe *et al.*, 2002).

Jüngere Studien geben Hinweis darauf, dass ein solcher transkriptioneller Mechanismus

auch in Säugerzellen existiert. Mehreren Arbeitsgruppen gelang die Hemmung der Genexpression verschiedener Gene durch siRNAs, die gegen Promotorregionen gerichtet waren. Die Hemmung der Genexpression war zum Teil mit *de novo* DNA-Methylierung verbunden (Kawasaki und Taira, 2004; Morris *et al.*, 2004), zum Teil mit Histonmodifikationen (Morris *et al.*, 2004; Ting *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Andere Studien beschreiben eine Hemmung der Genexpression auch unabhängig von DNA-Methylierung oder Histon-Modifikationen (Park *et al.*, 2004; Janowski und Corey, 2005). Der genaue Mechanismus der transkriptionellen Hemmung der Genexpression in Säugerzellen ist bislang ungeklärt. Wenn er aber, wie diskutiert, stabile epigenetische Veränderungen induziert, hätte dies weitreichende therapeutische Implikationen. Denn so könnte, im Gegensatz zur transienten Hemmung der Genexpression durch klassische RNAi, die Genexpression dauerhaft gehemmt werden und sogar an Tochterzellen vererbt werden (Egger *et al.*, 2004).

HPV könnten ein interessantes Modellsystem zur Evaluierung Promotor-gerichteter siRNAs darstellen. Die Expression der Onkogene E6 und E7 wird von einer 825 bp langen URR reguliert. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die Aktivität der URR durch DNA-Methylierung reguliert wird (Rosl *et al.*, 1993). In Tumorzelllinien oder Tumorbiopsien ist dieser Bereich außerdem häufig demethyliert (Badal *et al.*, 2004). Eine durch Promotor-gerichtete siRNAs induzierte *de novo* Methylierung der URR könnte somit die Expression der Onkogene möglicherweise dauerhaft und spezifisch hemmen.

1.5.3. Peptid-Inhibitoren und Peptid-Aptamere

Während durch RNAi und ähnliche nukleinsäurebasierte Ansätze, wie der Antisense- oder Ribozym-Technologie, die Genexpression bereits auf Transkriptionsebene gehemmt wird, können lineare Peptide oder auch Peptid-Aptamere zur spezifischen Inhibition der Proteinfunktion eingesetzt werden. Sie können spezifisch an ein Zielprotein binden und zum Beispiel die Wechselwirkung mit zellulären Interaktionspartnern blockieren. Hierin liegt auch ein Vorteil von Peptiden gegenüber siRNAs/shRNAs. Während durch Hemmung der Genexpression mittels RNAi alle Funktionen eines Proteins gleichzeitig blockiert werden, können durch Peptide selektiv einzelne Interaktionen blockiert werden (Cohen *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu linearen Peptiden sind Peptid-Aptamere per Definition in ein Matrixprotein integrierte Peptide. Sie sind daher in einer bestimmten Konformation fixiert und werden auf der Oberfläche des Fusionsproteins präsentiert. Dies verleiht dem Peptidanteil höhere proteolytische und konformelle Stabilität (Geyer und Brent, 2000). Auch können Peptid-Aptamere im Vergleich zu homologen linearen Peptiden höhere Affinitäten zu ihren

Zielproteinen besitzen (Cohen *et al.*, 1998; Fabrizio *et al.*, 1999). Andererseits kann das Matrixprotein jedoch prinzipiell auch die Löslichkeit herabsetzen, unerwünschte Wechselwirkungen mit dem Zielprotein eingehen, oder immunogen wirken.

Um Peptid-Aptamere oder lineare Peptide zu identifizieren, die an ein bestimmtes Zielprotein binden, wird häufig das Hefe Zwei-Hybrid-System (Yeast Two-Hybrid, Y2H) genutzt. Im Gegensatz zu reinen *in vitro*-Systemen, wie z.B. dem so genannten „Phage Display“, können hiermit Peptide identifiziert werden, die das Zielprotein unter intrazellulären Bedingungen in der Hefe binden. Das Y2H-System wurde ursprünglich von Fields und Song entwickelt und wurde seitdem weiter verbessert und modifiziert (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991; Uetz, 2002). Es besteht aus folgenden Komponenten:

- a) Einem Zielprotein, das als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors, wie z.B. Gal4 aus der Hefe, exprimiert wird (Köder-Protein).
- b) Dem potentiellen Bindungspartner, das können Proteine, Peptid-Aptamere oder Peptide sein. Diese werden in Fusion mit der DNA-Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors exprimiert (Beute-Protein).
- c) Einem Selektionsmarker, dessen Promotor Bindungsstellen für den entsprechenden Transkriptionsfaktor besitzt.

Kommt eine Bindung zwischen dem Zielprotein und dem Bindungspartner zustande, so werden dadurch DNA-Bindungsdomäne und DNA-Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe gebracht (Abb.1.5.3.). Dies führt zur Aktivierung der Transkription des Selektionsmarkers (Luban und Goff, 1995).

Als Selektionsmarker werden häufig Gene verwendet, die für Enzyme der Aminosäure- oder Nukleotidsynthese kodieren. Die Aktivierung der Selektionsmarker ermöglicht das Wachstum auf Selektionsnährböden, denen bestimmte Aminosäuren oder Basen fehlen. Das Fehlen dieser Komponenten kann durch die Aktivierung der Selektionsmarker kompensiert werden. Um falsch-positive Signale zu reduzieren, ist es sinnvoll, mehrere Selektionsmarker zu verwenden. Falsch-positive Signale können dadurch zustande kommen, dass Komponenten der Biosynthesewege, an denen die von den Selektionsmarkern kodierten Enzyme beteiligt sind, durch das Zielprotein oder die Peptide stabilisiert werden. Ein weiterer Grund für falsch-positive Signale kann die transkriptionelle Aktivierung der Expression eines der Selektionsmarker durch Zielprotein oder Peptide sein. Ein Vorteil des Systems ist, dass verschiedene Promotoren verwendet werden können, die unterschiedlich leicht aktiviert werden. Differentielle Aktivierungen der Markergene können in diesem Fall erste Hinweise über die Stärke der intrazellulären Wechselwirkung zwischen Zielprotein und Bindungspartner geben.

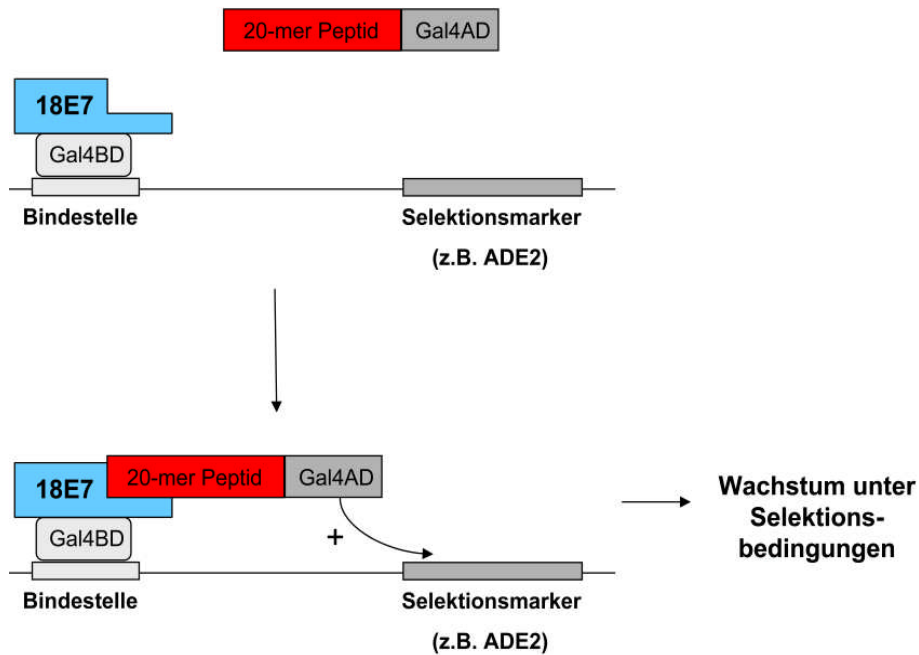


Abb. 1.5.3. Das Y2H-System. Das Zielprotein (Köderprotein), hier HPV 18E7, wird als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors exprimiert (Gal4BD). Die Beute-Peptide der Expressionsbank werden in Fusion mit der DNA-Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors (Gal4AD) exprimiert. Durch die Bindung eines Beute-Proteins an das Köder-Protein werden Aktivierungs- und Bindungsdomäne in räumliche Nähe gebracht und können so als Transkriptionsfaktor fungieren und die Expression eines Selektionsmarkers aktivieren.

Besonders interessante Zielproteine für den Angriff durch inhibierende Peptide oder Peptid-Aptamere sind virale Proteine. Zu diesen gibt es in der Regel keine homologen zellulären Proteine und sie werden auch nur in virusinfizierten Zellen exprimiert. Potentielle Inhibitoren sollten somit einen selektiven Effekt auf virushaltige Zellen ausüben können.

So konnten beispielsweise Peptid-Aptamere gegen das anti-apoptotische E6-Protein von HPV16 generiert werden, die spezifisch Apoptose in HPV-positiven Zellen induzierten (Butz *et al.*, 2000).

Peptid-Aptamere und Peptide stellen somit nicht nur wirksame Hilfsmittel für die Grundlagenforschung zur Charakterisierung von Zielproteinen durch Struktur- und Funktionsanalysen dar, sondern bieten darüber hinaus auch interessante Anwendungsperspektiven für zielgerichtete therapeutische Ansätze. Dabei können sie zur Validierung therapeutischer Zielproteine genutzt werden. Zudem ist denkbar, ihr intrinsisches therapeutisches Potential zu nutzen oder sie als Leitstrukturen für niedermolekulare Inhibitoren zu verwenden.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die bisher angewandten Methoden zur Therapie des Zervixkarzinoms sind nicht HPV-spezifisch und können daher unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen. Übergeordnetes Ziel dieser Arbeit ist es daher, eine Grundlage für die Entwicklung neuer, HPV-spezifischer Therapieansätze zu schaffen.

Prinzipiell kann eine zielgerichtete Therapie des HPV-induzierten Zervixkarzinoms durch Hemmung der viralen Onkogenexpression oder durch funktionelle Inhibition der Onkoproteine ermöglicht werden. Um den Beitrag des E7-Onkoproteins zur HPV-assoziierten Karzinogenese auf endogener Ebene untersuchen zu können, sollten daher E7-spezifische Inhibitoren entwickelt werden. Hierbei sollten zwei Strategien verfolgt werden: Erstens die Hemmung der Genexpression durch siRNAs und zweitens die funktionelle Inhibition des Onkoproteins durch Peptide. Die biochemischen und zellbiologischen Effekte einer E7-Hemmung sollten in funktionellen Analysen untersucht werden und das E7-Protein hierdurch als potentiell therapeutisches Zielprotein evaluiert werden. Außerdem sollte am Modellsystem der HPV18 URR untersucht werden, ob die Transkription der Onkogenexpression durch siRNAs gehemmt werden kann.

Schließlich ist es auch unter therapeutischen Gesichtspunkten wichtig, Einblicke in die genaue Funktionsweise der viralen Onkogene zu erhalten. Ergänzend sollte daher auch der Einfluss der Onkoproteine auf die Aktivität des *EZH2*-Gens, das in Transkriptomanalysen als potentiell HPV-Zielgen identifiziert wurde, untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1. EZH2 – Ein neues Zielgen onkogener humaner Papillomviren

Das *EZH2*-Gen wurde in Mikroarray-Analysen, in denen Genexpressionmuster von HeLa-Zellen nach Hemmung der E6/E7-Onkogenexpression durch RNAi untersucht wurden, als potentiell Zielgen für die HPV-Onkoproteine identifiziert (Kuner *et al.*, 2007). Dabei führte die Behandlung mit einer gegen E6/E7 gerichteten siRNA zu einer 2,2-fachen Hemmung des Signals für EZH2 im Mikroarray. Nach Behandlung mit einer E6-spezifischen siRNA blieb das EZH2-Signal jedoch unverändert.

2.1.1. Inhibition der E6/E7-Expression durch RNAi führt zur Hemmung der EZH2-Expression

Zunächst sollten die Ergebnisse aus dem Array durch Westernblot- und Northernblot-Analysen validiert werden. Hierzu wurden verschiedene HPV-positive Zellen, HeLa (HPV18-positiv) sowie CaSki und SiHa (HPV16-positiv), mit einer siRNA gegen E6 oder gegen E6/E7 transfiziert. Die EZH2-Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht. (Abb. 2.1.1. a, b). Dabei zeigte sich, dass die Hemmung der E6/E7-Expression zu einer deutlichen Reduktion der EZH2-Expression führt. Hingegen hatte die alleinige Inhibition der E6-Expression keinen Einfluss auf die EZH2-Expression.

Um weiterhin zu untersuchen, ob der Effekt spezifisch durch die Hemmung der viralen Onkogenexpression induziert wird, wurden parallel Analysen in HPV-negativen U2OS-Osteosarkom-Zellen und MCF-7-Mammakarzinom-Zellen durchgeführt (Abb. 2.1.1. c). Hier führte die Transfektion mit der E6- oder E6/E7-siRNA nicht zu einer Reduktion der EZH2-Expression. Der Hemmeffekt ist demnach spezifisch für HPV-positive Zellen.

In Northernblot-Analysen in HeLa-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Inhibition der E6/E7-Expression auch zu deutlich niedrigeren *EZH2*-mRNA-Spiegeln führte (Abb. 2.1.1. d).

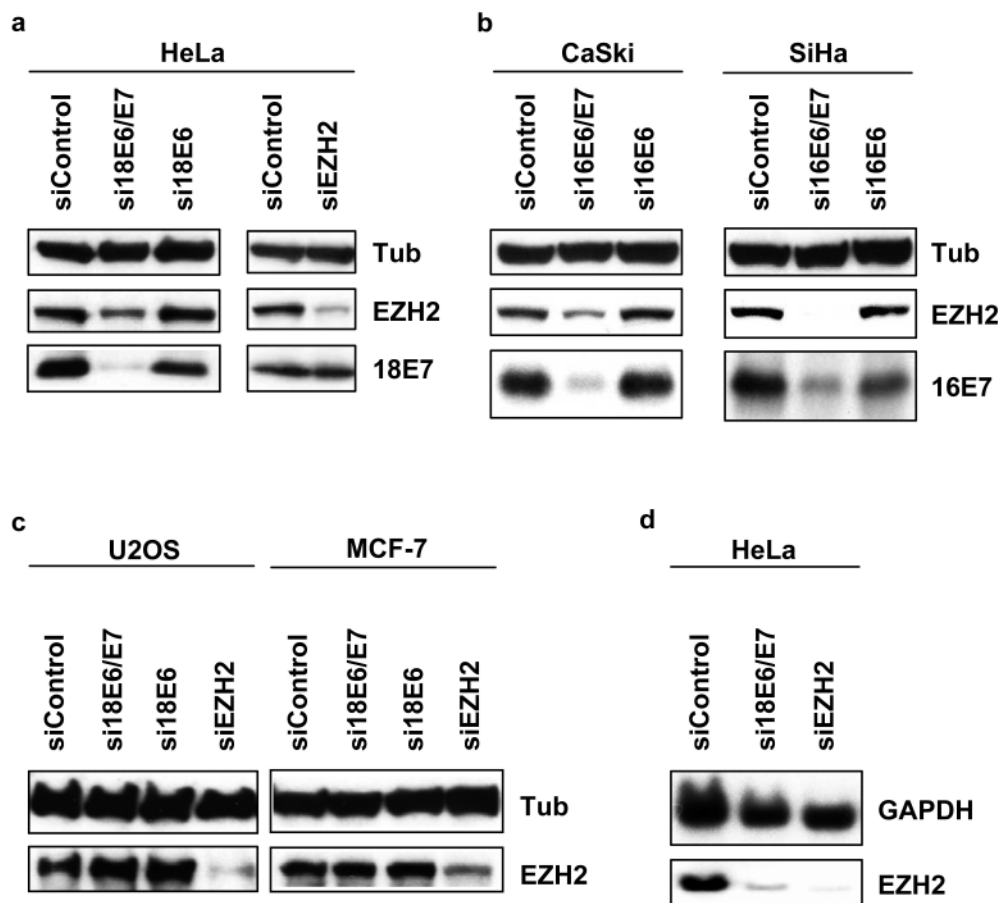


Abb. 2.1.1. Die Inhibition der E6/E7-Expression durch RNAi führt zur Hemmung der EZH2-Expression. (a-c) Westernblot-Analyse der EZH2-Proteinspiegel nach Behandlung von HeLa-Zellen (HPV18-positiv), CaSki- und SiHa-Zellen (beide HPV16-positiv) sowie U2OS- und MCF-7-Zellen (beide HPV-negativ) mit siRNAs gegen E6/E7 (si16E6/E7 oder si18E6/E7), E6 allein (si16E6 oder si18E6) und EZH2 (siEZH2). siControl: Negativkontrolle; Tub: Tubulin-Protein, Ladekontrolle (d) Northernblot-Analyse der *EZH2*-mRNA-Spiegel nach Transfektion von HeLa-Zellen mit si18E6/E7, siEZH2 oder siControl. GAPDH: *GAPDH*-mRNA, Ladekontrolle

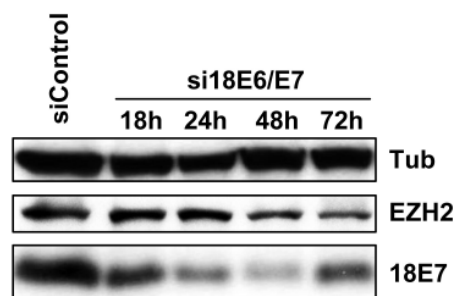


Abb. 2.1.2. Die Reduktion der EZH2-Proteinspiegel folgt zeitlich der E7-Hemmung. Westernblot-Analyse der EZH2- und HPV18 E7-Proteinspiegel nach Transfektion von HeLa-Zellen mit einer siRNA gegen E6/E7 (si18E6/E7). Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion geerntet. siControl: Negativkontrolle; Tub: Ladekontrolle

In Zeitkinetik-Analysen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Reduktion der EZH2-Expression deutlich nach der Inhibition der E7-Expression erfolgt (Abb. 2.1.2.). Diese

Beobachtung ist mit der Vorstellung vereinbar, dass die Aktivierung des *EZH2*-Gens Resultat der viralen Onkogenaktivität ist.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse die Resultate der Mikroarray-Analysen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der E6/E7-Expression zu einer deutlichen Hemmung der *EZH2*-Expression führt, eine Inhibition der E6-Expression allein jedoch nicht. Dies ergibt erste Hinweise darauf, dass das *EZH2*-Gen durch die HPV E7-Onkogenexpression aktiviert werden könnte.

2.1.2. Die Expression von E7 aktiviert den *EZH2*-Promotor über den pRb-E2F Signalweg

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von *EZH2* durch die viralen Onkogene auf Transkriptionsebene erfolgt, wurden Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden Reporterkonstrukte verwendet, in denen das *Luciferase*-Gen unter der Kontrolle des *EZH2*-Promotors steht.

Die ektopische Expression von E6 in MCF-7 Zellen hatte nur eine marginale Aktivierung des *EZH2*-Promotors zur Folge, während unter den gleichen Bedingungen die Aktivität des p21-Promotors, der durch p53 aktiviert wird, deutlich gehemmt wurde (Abb.2.1.3. a). Die schwache Induktion des *EZH2*-Promotors nach E6-Expression könnte dabei aus der durch E6-induzierten p53-Degradation resultieren, da p53 bereits als potentieller Inhibitor der *EZH2*-Promotoraktivität beschrieben wurde (Tang et al., 2004). In der Tat konnte eine leichte Aktivierung des *EZH2*-Promotors auch nach Hemmung der p53-Expression durch RNAi gezeigt werden (Abb. 2.1.3. b). Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wurde die Aktivität des p21-Promotors erwartungsgemäß deutlich gehemmt.

Im Gegensatz zu der nur marginalen Aktivierung des *EZH2*-Promotors nach E6-Expression führte eine E7-Expression zu einer deutlichen Aktivierung des *EZH2*-Promotors um einen Faktor fünf bis sechs (Abb. 2.1.3. c). Da das *EZH2*-Gen als potentielles E2F-Zielgen beschrieben wurde (Bracken et al., 2003), wurden Reporter-Gen-Analysen mit einem trunkierten *EZH2*-Promotorkonstrukt ohne E2F-Bindestellen durchgeführt. Dieses Konstrukt wurde nicht mehr durch E7 aktiviert, was darauf hindeutet, dass die Aktivierung des *EZH2*-Promotors durch E7 über E2F-Transkriptionsfaktoren vermittelt wird.

Die Aktivierung von E2F-Zielgenen durch E7 erfolgt vermutlich in erster Linie über die Bindung von E7 an die Pocket-Proteine pRb, p107 und p130, wodurch deren Degradation induziert wird (Munger et al., 1989b; Boyer et al., 1996). Dies führt zu einer Freisetzung von E2F-Faktoren aus Komplexen mit den Pocket-Proteinen und der transkriptionellen

Aktivierung von E2F-Zielgenen. Um zu überprüfen, ob das pRb-Protein eine Rolle in der transkriptionellen Aktivierung von EZH2 durch E7 spielt, wurden Reporteranalysen in C33a-Zellen durchgeführt. Diese HPV-negative Zervixkarzinomzelllinie exprimiert ein pRb-Protein, das durch Mutation inaktiviert wurde (Scheffner *et al.*, 1991), besitzt jedoch funktionelles p107 und p130 (Barbie *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu der deutlichen Aktivierung des EZH2-Promotors durch E7 in pRb-Wildtyp MCF-7-Zellen, konnte keine Aktivierung in C33a-Zellen nachgewiesen werden (Abb.2.1.3. d). Dies deutet darauf hin, dass funktionelles pRb für die Aktivierung des EZH2-Promotors durch E7 benötigt wird.

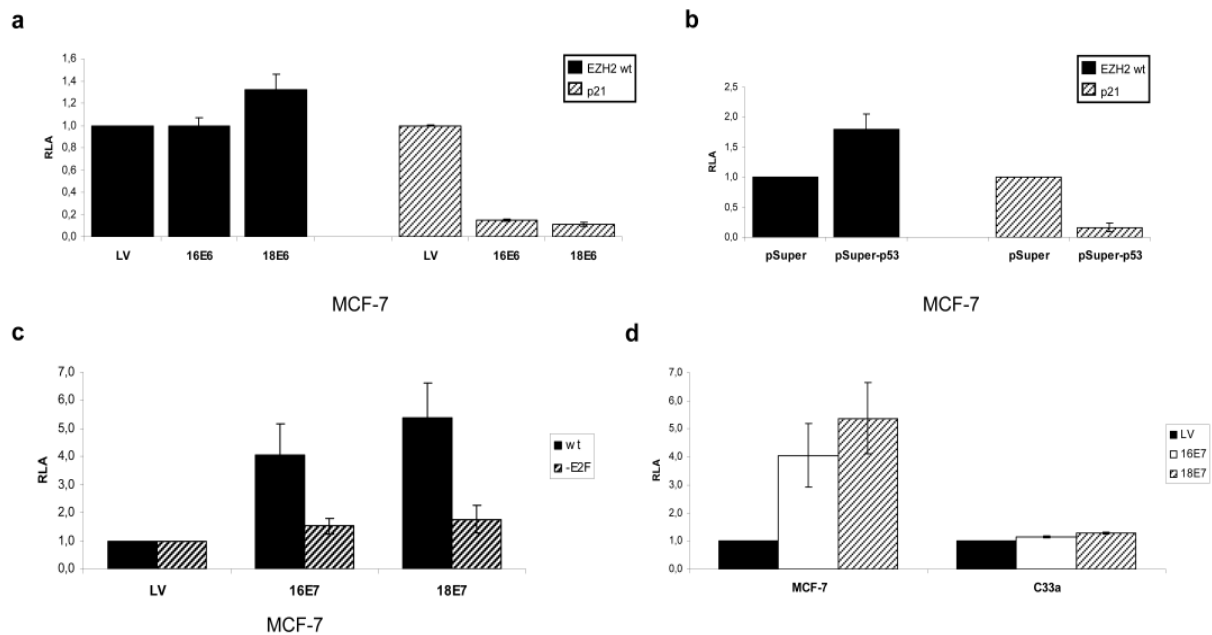


Abb. 2.1.3. Der EZH2-Promotor wird primär über den E7/pRb/E2F-Signalweg aktiviert. Reporter-Gen-Analysen des EZH2-Promotors (schwarze Säulen) und des p21-Promotors (gestreifte Säulen). (a) MCF-7-Zellen wurden mit Reporterkonstrukt und Leervektor RC/CMV (LV) bzw. Expressionsvektoren für das HPV16 E6- oder HPV18 E6-Protein transfiziert. (b) Alternativ wurde mit dem pSuper-Vektor oder pSuper-p53-Vektor, der für eine p53-shRNA kodiert, kotransfiziert. (c) MCF-7-Zellen (Wildtyp-pRb) wurden entweder mit Wildtyp-EZH2-Promotor (wt) oder mit einem trunkiertem EZH2-Promotorkonstrukt ohne E2F-Bindestellen (-E2F) transfiziert. Leervektor pCMXp11 (LV) oder Expressionsvektor für HPV16 E7 oder HPV18 E7 wurden kotransfiziert. (d) C33a-Zellen (pRb durch Mutation inaktiviert) wurden mit Wildtyp-EZH2-Promotor und Leervektor pCMXp11 (LV) oder Expressionsvektor für HPV16 E7 oder HPV18 E7 wurden kotransfiziert. Gezeigt ist die Luciferase-Aktivität relativ zur Aktivität des Promotorkonstruktes nach Transfektion mit Leervektor (gleich 1.0 gesetzt) (RLA). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, jeweils als Duplikate gemessen, \pm Standardabweichung.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Reporter-Gen-Analysen darauf hin, dass EZH2 durch den E7/pRb/E2F-Signalweg auf Transkriptionsebene aktiviert werden kann.

2.1.3. Die Hemmung der EZH2-Expression durch RNAi führt zum Zellzyklus-Arrest in G1 und vermindertem Zellwachstum in HPV-positiven Zellen

Im Folgenden sollte ermittelt werden, welche Rolle EZH2 in der HPV-assoziierten Karzinogenese spielt. Hierzu wurde der Einfluss der EZH2-Expression auf das Wachstum HPV-positiver Zellen mit Hilfe der RNAi untersucht. Zunächst wurde in Westernblot-Analysen überprüft, ob die EZH2-Expression durch die EZH2-siRNA spezifisch gehemmt wurde. Dies war 48 Stunden nach Transfektion in HPV-positiven HeLa-Zellen der Fall (Abb.2.1.4.a). Zellzyklus-Analysen, die zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurden, ergaben, dass die Hemmung der EZH2-Expression zu einem Arrest in der G1-Phase führte (Abb. 2.1.4.b). Für das korrekte Durchlaufen des Zellzyklus in HPV-positiven Zellen scheint die kontinuierliche EZH2-Expression somit essentiell zu sein.

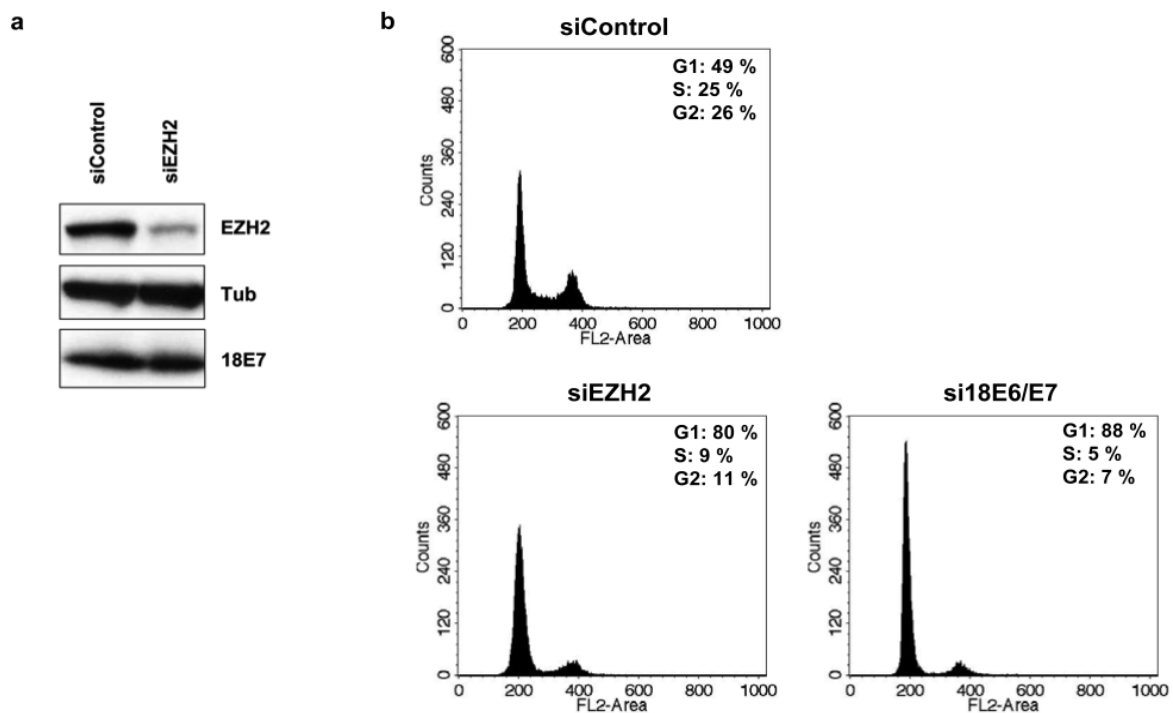


Abb. 2.1.4. Die Hemmung der EZH2-Expression führt zum Zellzyklus-Arrest in G1. (a) Westernblot-Analyse der EZH2- und 18E7-Proteinspiegel, 48 Stunden nach Transfektion mit einer EZH2-spezifischen siRNA in HeLa-Zellen. Tub: Ladekontrolle (b) Zellzyklus-Analyse von HeLa-Zellen nach Transfektion mit siRNAs gegen EZH2 (siEZH2), 18E6 und E7 (si18E6/E7) oder einer Kontroll-siRNA (siControl). Die Prozentanteile der Zellen in der G1-, S- oder G2-Phase sind angegeben.

Zur Analyse des Mechanismus, der dem G1-Arrest nach Hemmung der EZH2-Expression zu Grunde liegt, wurden in Westernblot-Analysen die Expressionsspiegel der Cycline D1 und E untersucht. Diese spielen eine wichtige Rolle am G1/S-Übergang (Dowdy *et al.*, 1993; De Luca *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass eine Hemmung der EZH2-Expression zu reduzierten Proteinspiegeln von Cyclin D1 und Cyclin E führte (Abb. 2.1.5.).

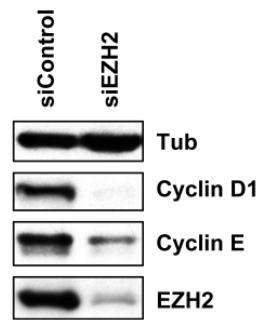


Abb. 2.1.5. Die Inhibition der EZH2-Expression führt zu reduzierten Cyclin D1- und Cyclin E-Proteinspiegeln. Westernblot-Analyse der Cyclin D1- und Cyclin E-Proteinspiegel 60 Stunden nach Transfektion mit einer EZH2-spezifischen siRNA in HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion für 24h durch Serumentzug synchronisiert. Tub: Ladekontrolle; siControl: Negativkontrolle; EZH2: EZH2-Proteinspiegel zur Kontrolle der Funktionalität der siRNA.

Weiterhin wurde der Effekt einer Langzeithemmung der EZH2-Expression in HPV-positiven Zellen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien stabil mit einem pSuper-Konstrukt transfiziert, das für eine EZH2-spezifische shRNA kodiert. Zur Kontrolle wurden HPV-negative U2OS-Osteosarkom-Zellen, die reduziertes Zellwachstum nach Hemmung der EZH2-Expression zeigen (Bracken *et al.*, 2003), unter den gleichen Bedingungen behandelt. In allen behandelten Zelllinien führte die Inhibition der EZH2-Expression zu deutlich reduziertem Zellwachstum (Abb. 2.1.6.)

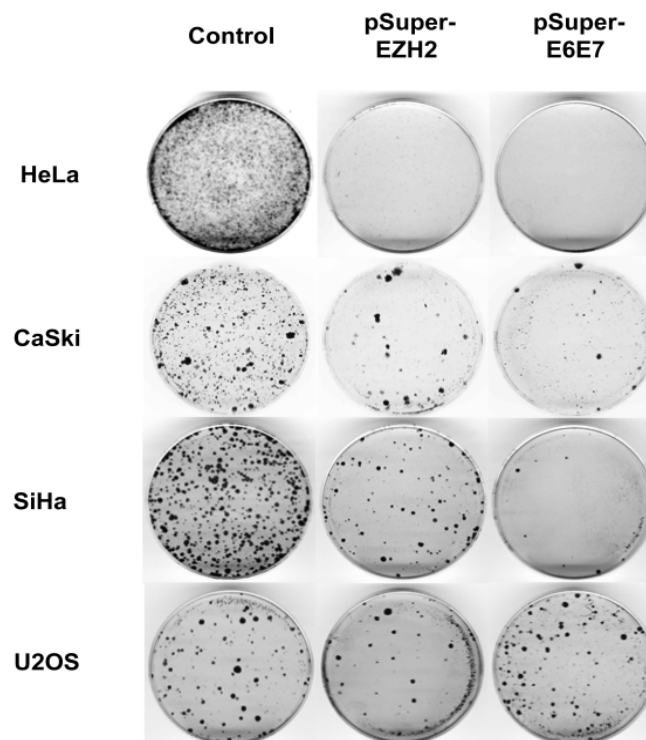


Abb. 2.1.6. Die Langzeithemmung der EZH2-Expression führt zur Hemmung des Zellwachstums. Wachstumsassay (Colony Formation Assay, CFA) in HPV18-positiven HeLa-Zellen, HPV16-positiven CaSki- und SiHa-Zellen sowie HPV-negativen U2OS-Zellen. Die Zellen wurden stabil mit pSuper-Vektor bzw. pSuper-Control-Vektor (Control), pSuper-EZH2 und pSuper-E6/E7 transfiziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die fortlaufende EZH2-Expression ein entscheidender Faktor für das Wachstum HPV-positiver Zellen ist.

2.1.4. Die Hemmung des Zellwachstums ist mit Apoptoseinduktion assoziiert, nicht aber mit Seneszenzinduktion

EZH2 scheint in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Funktionen für das Wachstum und Überleben der Zellen zu besitzen. So wurde nach EZH2-Hemmung sowohl Apoptose in MCF-7 Mammakarzinomzellen (Tan *et al.*, 2007) als auch Seneszenz in humanen Fibroblasten (Bracken *et al.*, 2007) beobachtet. Um den Mechanismus der Wachstumshemmung nach Inhibition der EZH2-Expression in HPV-positiven Zellen näher zu untersuchen, wurden Apoptose- und Seneszenz-Assays durchgeführt.

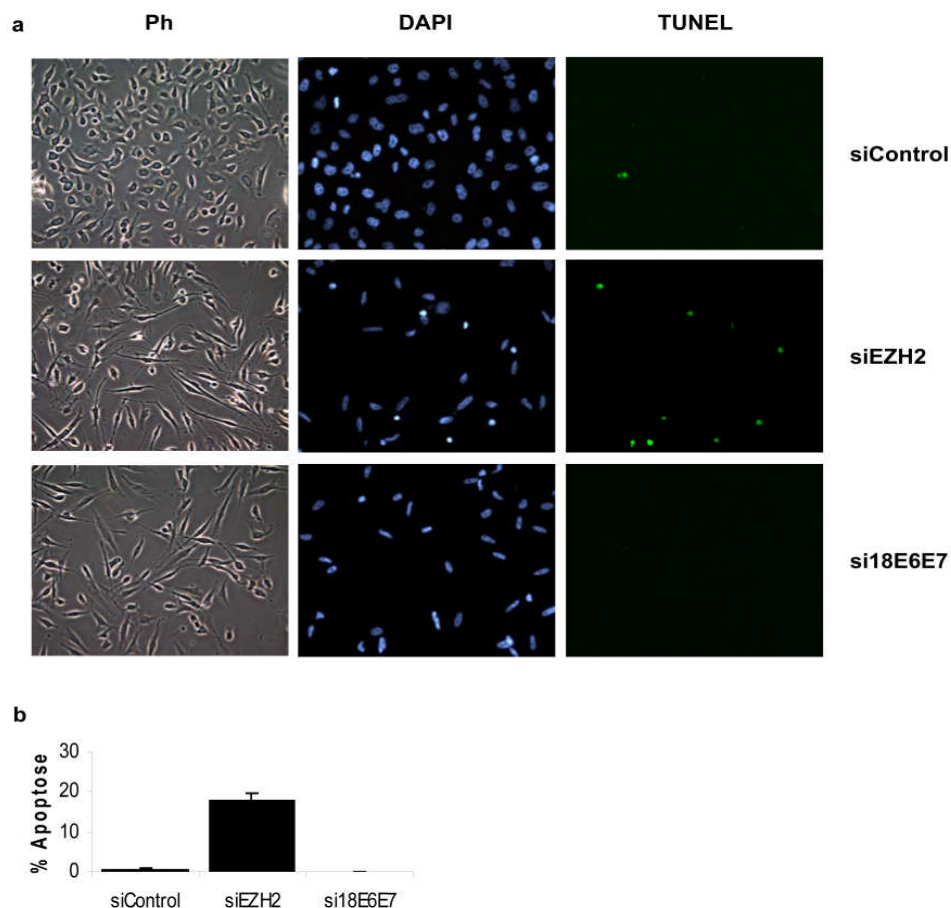


Abb. 2.1.7. Die Hemmung der EZH2-Expression führt zur Apoptoseinduktion in HeLa-Zellen. (a) HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen EZH2 (siEZH2), E6/E7 (si18E6/E7) oder mit einer Kontroll-siRNA (siControl) transfiziert, 72 h nach Transfektion fixiert und mittels Phasenkontrast-Mikroskopie sichtbar gemacht (Ph). Zellkerne wurden mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht (DAPI), apoptotische Zellen wurden durch TUNEL-Analyse bestimmt (TUNEL). (b) Quantitative Auswertung der TUNEL-Analysen. Gezeigt ist der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Zellen relativ zur Gesamtzellzahl. Hierzu wurden drei repräsentative Ausschnitte ausgewertet, \pm Standardabweichung.

Hierfür wurden HeLa-Zellen nach Hemmung der EZH2-Expression durch RNAi mittels TUNEL-Assays auf eine mögliche Apoptoseinduktion hin untersucht. Bei der TUNEL-Methode werden DNA-Einzelstrangbrüche, die im Rahmen der Apoptose vermehrt auftreten, durch Anfärben mit einem Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Um die Zellzahl zu bestimmen und die für Apoptose typische Chromatinkondensation sichtbar zu machen, wurden die Zellkerne außerdem mit dem Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt.

Die Hemmung der EZH2-Expression führte in HeLa-Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate auf 20% im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden (< 1%) oder mit einer gegen E6/E7 gerichteten siRNA (< 1%). Die Zellzahl war deutlich reduziert, die Kerne der verbleibenden Zellen waren zum Teil fragmentiert und zeigten eine deutliche Anfärbung im TUNEL-Assay (Abb. 2.1.7.).

Mit EZH2- oder E6/E7-siRNA behandelte Zellen zeigten eine langgestreckte, abgeflachte Morphologie, die typisch für seneszente Zellen ist (Dimri *et al.*, 1995) (Abb. 2.1.7.). Im Vergleich waren Zellen, die mit einer EZH2-siRNA behandelt wurden, jedoch etwas dünner und weniger abgeflacht. Besonders nach stabiler Transfektion mit pSuper-Konstrukten und Selektion über bis zu 10 Tage wurden die morphologischen Unterschiede deutlich (Abb. 2.1.8.).

Um die Zellen auf eine mögliche Seneszenzinduktion zu überprüfen, wurden HeLa-Zellen stabil mit pSuper-Konstrukten transfiziert, die entweder für eine Kontroll-shRNA, EZH2-shRNA oder E6/E7-shRNA kodierten. Bereits 8 Tage nach Transfektion konnte in Zellen, in denen die E6/E7-Expression inhibiert war, eine deutlich erhöhte Aktivität des Seneszenz-Markers SA- β -Galaktosidase (Dimri *et al.*, 1995) nachgewiesen werden. Noch deutlicher war dieser Effekt 10 Tage nach Transfektion zu beobachten (Abb. 2.1.8.). Die Hemmung der EZH2-Expression hingegen führte nicht zur Seneszenzinduktion. Die Zellzahl in den Ansätzen mit EZH2-Hemmung war im Vergleich zu Zellen, in denen E6/E7-Expression inhibiert war, deutlich reduziert. Daher ist anzunehmen, dass in diesen Ansätzen die meisten Zellen durch Apoptose eliminiert wurden.

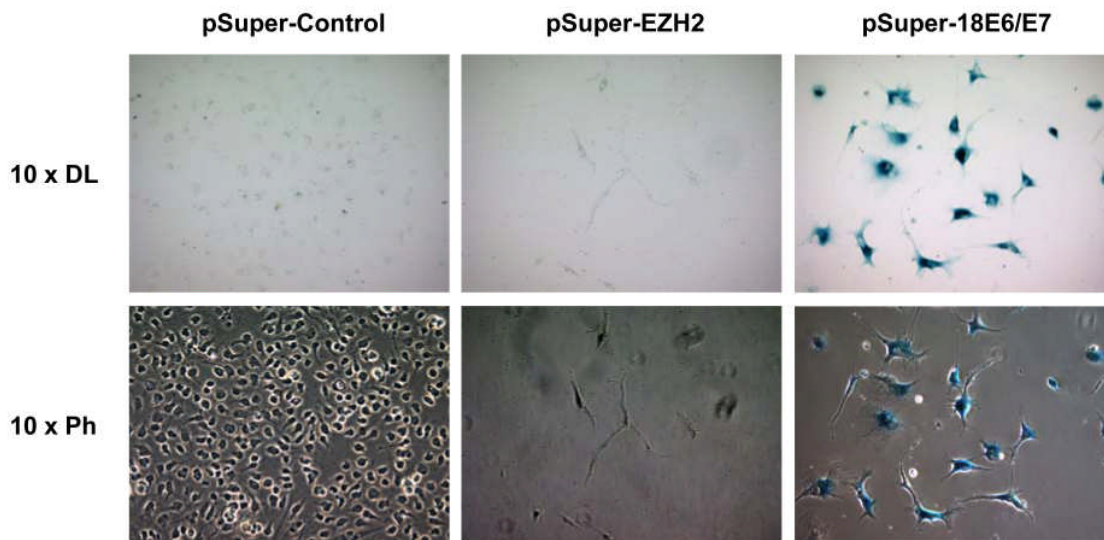


Abb. 2.1.8. Eine Hemmung der EZH2-Expression resultiert nicht in Seneszenz. HeLa-Zellen wurden stabil mit pSuper-Control, pSuper-EZH2 oder pSuper-18E6/E7 transfiziert. Zehn Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Aktivität des Seneszenz-Markers SA- β -Galaktosidase durch Blaufärbung sichtbar gemacht. Oben: Durchlicht-Mikroskopie Unten: Phasenkontrast-Mikroskopie

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der Apoptose- und Seneszenz-Analysen darauf hin, dass das verminderte Zellwachstum nach EZH2-Hemmung vorwiegend aus einem G1-Arrest und der Apoptoseinduktion resultiert. Somit scheint EZH2 das Wachstum HPV-positiver Zellen sowohl als Zellzyklusregulator als auch als Apoptose-Inhibitor zu begünstigen.

2.1.5. Differentielle Regulation von p21 und p53 nach Hemmung der EZH2-Expression

Die Kontrolle von Zellzyklus, Apoptose und Seneszenz kann entscheidend von der Regulation von p53 und p21 abhängen. So kann p53 verschiedene Apoptoseregulatoren, wie Bax und PUMA, induzieren (Vousden und Lu, 2002). Weiter führt eine p53-Induktion auch zur Aktivierung der p21-Expression (El-Deiry, 2003) und zum Zellzyklus-Arrest. Das p21-Protein spielt außerdem eine entscheidende Rolle bei der Seneszenzinduktion (Alcorta *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1999). Zur genaueren Analyse der Mechanismen der Apoptose- bzw. Seneszenzinduktion nach Hemmung der EZH2- oder E6/E7-Expression wurde daher die Expression der Proteine p53 und p21 untersucht.

Die Inhibition der E6/E7-Expression führte in HeLa-Zellen zu einer deutlichen Induktion der p53- und p21-Expression. Im Gegensatz dazu beeinflusste eine Hemmung der EZH2-Expression die p53- und p21-Proteinspiegel nur marginal (Abb 2.1.9.). Auch wurde nach

Hemmung der EZH2-Expression in HeLa-Zellen keine Induktion der Expression des p16-Proteins, das in vielen Zelllinien durch EZH2 negativ reguliert wird, beobachtet.

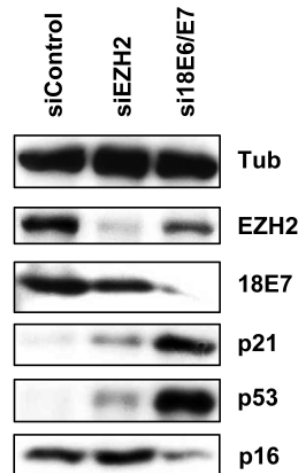


Abb. 2.1.9. Die Hemmung der EZH2-Expression führt nicht zur Induktion der p53-, p21- und p16-Expression. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen EZH2 (siEZH2) oder E6/E7 (si18E6/E7) transfiziert und die p53-, p21- und p16-Proteinspiegel mittels Westernblot-Analyse untersucht. EZH2- und 18E7-Proteinspiegel wurden zur Kontrolle der RNAi-Effizienz analysiert. Tub: Ladekontrolle; siControl: Negativkontrolle

Die Diskrepanz im Phänotyp nach EZH2- oder E6/E7-Hemmung könnte daher auf der differentiellen Regulierung von p53, p21 und p16 in An- oder Abwesenheit der viralen Onkoproteine beruhen.

2.1.6. Die EZH2-Expressionsspiegel sind in HPV-positiven Läsionen deutlich erhöht.

In den vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass das E7-Protein die Expression von EZH2 *in vitro* aktivieren kann. Um zu überprüfen, ob auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen HPV und EZH2 besteht, wurden, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Dürst in Jena, immunhistochemische Gewebeanalysen durchgeführt. Die Expressionsmuster des EZH2-Proteins wurden in 20 Proben aus Normalgewebe, Dysplasien und Tumorgewebe untersucht und mit dem Expressionsmuster der HPV-Onkogene, des etablierten HPV-Markers p16 und des Proliferationsmarkers Ki67 verglichen.

Im Einklang mit der Hypothese, dass E7 zu einer Aktivierung der EZH2-Expression führen kann, zeigten HPV-positiv gefärbte Gewebeabschnitte deutlich erhöhte EZH2-Expressionsspiegel (Abb. 2.1.10.).

Außerdem wurden auch in Bereichen des Normalgewebes, insbesondere in den parabasalen Gewebeschichten, erhöhte Expressionsspiegel von EZH2 gefunden. Diese

korrelierten mit erhöhten Expressionsspiegeln des Proliferationsmarkers Ki67. Die parabasalen Gewebeschichten zeichnen sich allgemein durch eine erhöhte Proliferationsrate aus (Payne *et al.*, 1996). Dies weist darauf hin, dass das *EZH2*-Gen auch über HPV-unabhängige Mechanismen induziert werden kann.

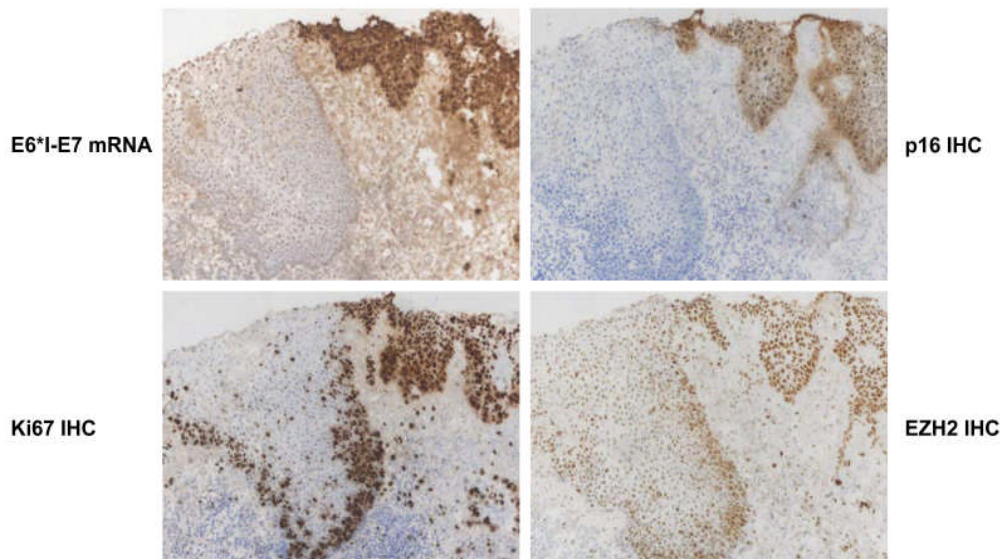


Abb. 2.1.10. Die *EZH2*-Expressionsspiegel sind in HPV-positiven Läsionen deutlich erhöht. Immunhistochemische Färbung einer zervikalen Läsion (Cervical intraepithelial lesions grade III, CIN III) für HPV16 E6/E7, p16, Ki67 und *EZH2*.

Es konnten somit erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Expression der E6/E7-Onkogene und erhöhten *EZH2*-Proteinspiegeln *in vivo* gefunden werden. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit der Hypothese einer Aktivierung von *EZH2* durch das HPV E7-Protein. Die Resultate der Funktions- und Expressionsstudien weisen darauf hin, dass *EZH2* möglicherweise als neues therapeutisches Zielgen in HPV-induzierten Tumoren dienen könnte. Weiterführende Studien an größeren Patientenkollektiven sind notwendig, um zu beurteilen, ob *EZH2* - ähnlich wie für das Prostata- und Mammakarzinom beschrieben (Varambally *et al.*, 2002; Kleer *et al.*, 2003; Bachmann *et al.*, 2006) - auch als prognostischer Marker dienen kann.

2.2. Spezifische Hemmung der HPV18 E7-Expression durch RNAi

Die Studien zum E7-Zielgen *EZH2* unterstreichen die zentrale Rolle des E7-Onkoproteins in der HPV-assoziierten Karzinogenese. Für weitere funktionelle Analysen und auch für mögliche HPV-spezifische Therapien sollten E7-spezifische Inhibitoren von großer Bedeutung sein.

Eine effiziente und spezifische Methode zur Hemmung der Genexpression ist die RNAi, mittels derer die Genexpression auf Transkriptebene blockiert wird. Daher sollte im Folgenden zunächst eine Strategie entwickelt werden, um mittels RNAi die E7-Expression spezifisch zu inhibieren.

2.2.1. HPV18 E7-spezifische shRNAs

Wie bereits unter Punkt 1.5.1. erläutert, muss die Zielsequenz einer HPV18 E7-spezifischen siRNA den Spleißdonor/-akzeptorübergang der Transkripte 2 und 3 einschließen, um einen selektiven Angriff auf die E7-kodierenden Transkripte zu ermöglichen. Nur dieser Bereich unterscheidet die verschiedenen Transkriptklassen für E6 und E7. Es wurden verschiedene Zielsequenzen ausgewählt, die den Spleißdonor/-akzeptorübergang überspannen (Abb. 2.2.1.).

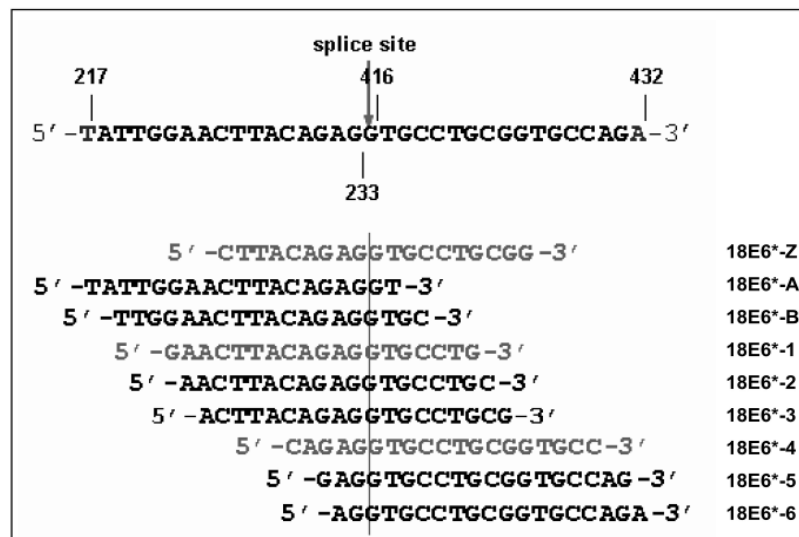


Abb. 2.2.1. Zielsequenzen der HPV18 E7-spezifischen siRNAs. Gezeigt ist die Sequenz des Spleißdonor/-akzeptor-Übergangs und darunter die Zielsequenzen der neun möglichen HPV18 E7-spezifischen siRNAs. Die Namen der siRNAs sind rechts angegeben.

2.2.2. 19mer shRNAs hemmen die HPV18 E7-Expression nicht

Für alle neun Zielsequenzen wurden pSuper-Konstrukte generiert, die für 19mer RNA-Moleküle mit Haarnadelstruktur (short hairpin RNAs, shRNAs) kodieren. Diese werden durch das Enzym Dicer zu siRNAs prozessiert und können somit in den RNAi-Mechanismus integriert werden. Jedoch inhibierte keine der shRNAs die E7-Expression (Abb. 2.2.2).

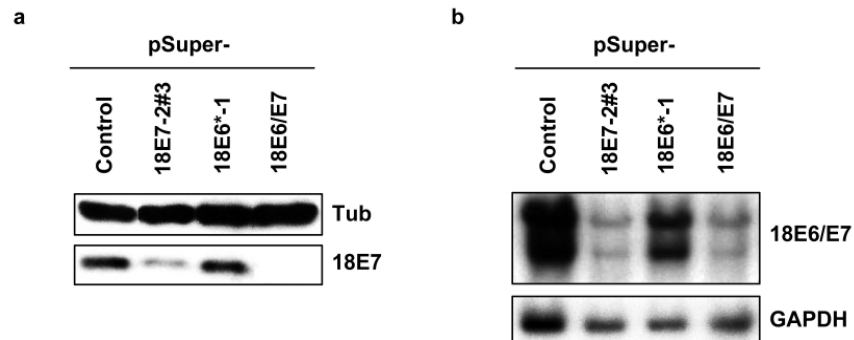


Abb. 2.2.4. Die 29mer shRNA pSuper-18E7-2#3 hemmt die E7-Expression. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Konstrukten gegen E7 (pSuper-18E6*-1: 19mer; pSuper-18E7-2#3: 29mer), gegen E6/E7 (pSuper-18E6/E7) oder pSuper-Control (Negativkontrolle) transfiziert. (a) In Westernblot-Analysen wurde der Effekt auf die endogenen HPV18 E7-Proteinspiegel untersucht. Tub: Ladekontrolle (b) In Northernblot-Analysen wurde der Effekt auf die endogenen HPV18 E6/E7-mRNA-Spiegel untersucht. GAPDH: Ladekontrolle

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Prozessierung durch Dicer ein entscheidender Faktor zur Effizienzsteigerung der RNAi ist. Hierzu wurde eine synthetische siRNA mit der gleichen Zielsequenz wie die 29mer shRNA pSuper-18E7-2#3 generiert. Diese synthetische siRNA wird - im Gegensatz zu pSuper-kodierten shRNAs - nicht durch Dicer prozessiert, sondern direkt in den RISC-Komplex aufgenommen.

Westernblot-Analysen ergaben, dass die Expression des E7-Proteins durch Transfektion mit der synthetischen siRNA si18E7-2 nicht gehemmt wird (Abb. 2.2.5.). Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass eine effiziente Prozessierung durch das Enzym Dicer die Effizienz der Hemmung durch RNAi deutlich erhöht.

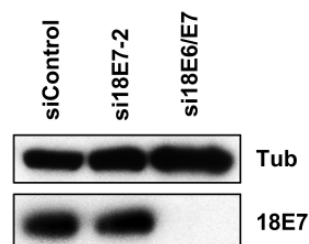


Abb. 2.2.5. Eine synthetische 19mer siRNA hemmt die E7-Expression nicht. Eine synthetische siRNA mit der Zielsequenz des 29mers pSuper-18E7-2#3 (si18E7-2) wurde in HeLa-Zellen transfiziert und die Expression des HPV18 E7-Proteins wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine siRNA gegen 18E6/E7 transfiziert (si18E6/E7). siControl: Negativkontrolle; Tub: Ladekontrolle

Um die Effekte einer Hemmung der E7-Expression im Vergleich zur Inhibition der E6- oder E6/E7-Expression vergleichend untersuchen zu können, sollte zunächst die Spezifität der E7-Hemmung nachgewiesen werden. In Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass das gegen HPV18 E7 gerichtete Konstrukt pSuper-18E7-2#3 zu einer deutlichen Hemmung der endogenen E7-Expression führt, nicht aber zu einer Hemmung der Expression des E6-Proteins. Da die endogenen Expressionsspiegel des E6-Proteins in HeLa-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze liegen, konnte in Westernblot-Analysen nur der Einfluss auf die

ektopisch exprimierten E6-Proteinspiegel analysiert werden. Hiernach hemmt die HPV18 E7-shRNA spezifisch die E7-Expression und führt somit nur zum Abbau der Transkripte, die in der E6-kodierenden Sequenz gespleißt wurden (Abb. 2.2.6.).

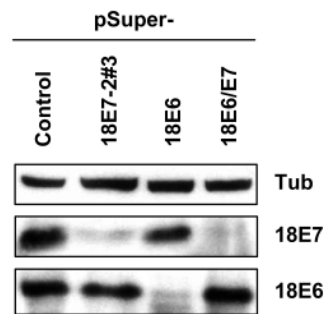


Abb. 2.2.6. Die Hemmung der E7-Expression führt zu einer spezifischen Reduktion der E7-Proteinspiegel, beeinflusst aber nicht die ektopische Expression von E6. Westernblot-Analyse der endogenen HPV18 E7-Proteinspiegel und der ektopisch exprimierten HPV18 E6-Proteinspiegel in HeLa-Zellen, nach Transfektion mit einer shRNA gegen E7 (pSuper-18E7-2#3), E6 (pSuper-18E6) oder E6/E7 (pSuper-18E6/E7). pSuper-Control: Kontroll-shRNA; Tub: Ladekontrolle

Um die Spezifität auch auf endogener Ebene zu überprüfen, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde zunächst die Hemmung der E6/E7-Expression in Northernblot-Analysen verifiziert (Abb. 2.2.7. a). In den entsprechenden RT-PCR-Analysen wurde erwartungsgemäß durch die Behandlung mit der HPV18 E7-spezifischen shRNA die Expression der E7-Transkripte (T2/3) gehemmt (Abb. 2.2.7 b). Allerdings waren auch die Expressionsspiegel der E6-Transkripte (T1) im Vergleich zur Behandlung mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA reduziert. Bei dem beobachteten Effekt auf die E6-Transkripte kann es sich nicht um einen spezifischen siRNA-Effekt handeln, da die Zielsequenz der E7-spezifischen shRNA in den E6-Transkripten nicht zu finden ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine E7-Hemmung die Proliferation HPV-positiver Zellen deutlich negativ reguliert und dadurch ebenfalls die E6-Expression gehemmt wird.

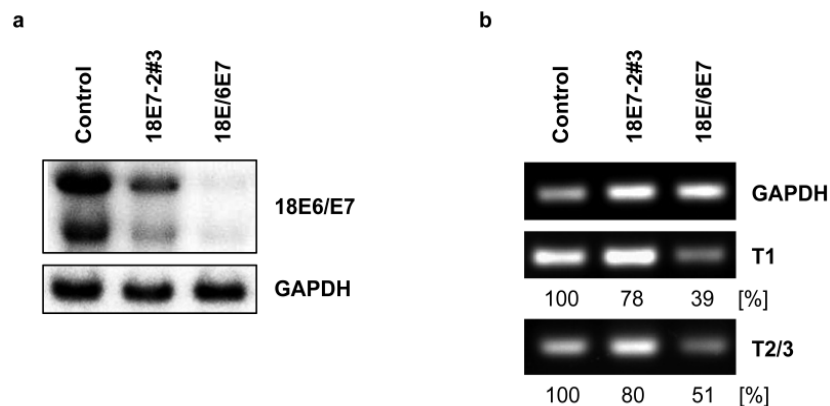


Abb. 2.2.7. Analyse der endogenen E7-Expression nach Behandlung mit der HPV18 E7-shRNA in Northernblot- und RT-PCR-Analysen. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Konstrukten gegen E7 (pSuper18E7-2#3) oder gegen E6/E7 (pSuper-18E6/E7) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde eine Gesamt-RNA-Extraktion durchgeführt. Die HPV-Transkriptspiegel wurden (a) mittels Northernblot-Analyse oder (b) mittels RT-PCR-Analyse mit Primern für E6-kodierende Transkripte (T1) oder E7-kodierende Transkripte (T2/3) untersucht. HPV Transkriptspiegel wurden relativ zu GAPDH Transkriptspiegeln quantifiziert und sind in % angegeben. GAPDH: Ladekontrolle

Zusammenfassend geben diese Analysen deutlichen Hinweis darauf, dass das Konstrukt pSuper-18E7-2#3 spezifisch E7-kodierende Transkripte angreift.

2.2.4. Die Hemmung der HPV18 E7-Expression durch RNAi führt zu Zellzyklus-Arrest in G1 und Stabilisierung der pRb-Proteinspiegel

Im Folgenden sollten die zellbiologischen Effekte einer E7-Hemmung auf HPV-positive Zellen näher untersucht werden. Hierzu wurden zunächst Zellzyklusanalysen durchgeführt. Die Hemmung der E7-Expression durch die 29mer shRNA führte in HeLa-Zellen zu einem deutlichen Arrest in G1, vergleichbar mit dem Effekt der gleichzeitigen Hemmung der E6/E7-Expression (Abb. 2.2.8.).

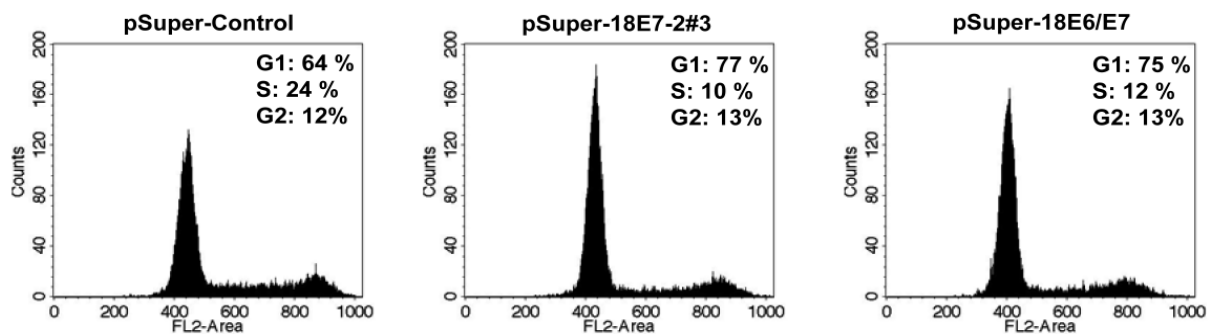


Abb. 2.2.8. Die Hemmung der E7-Expression führt zum Zellzyklus-Arrest in G1. Zellzyklus-Analyse von HeLa-Zellen nach Transfektion mit pSuper-Konstrukten, die für shRNAs gegen E7 allein (pSuper-18E7-2#3) oder E6/E7 gemeinsam (pSuper-18E6/E7) kodieren. Die Prozentanteile der Zellen in der G1-, S- oder G2-Phase sind angegeben. pSuper-Control: Negativkontrolle

Weiterhin hatte die Hemmung der E7-Expression einen Anstieg der endogenen pRb-Proteinspiegel zur Folge (Abb. 2.2.9.). Auch eine Transfektion mit einer E6/E7-shRNA führte zu erhöhten pRb-Proteinspiegeln.

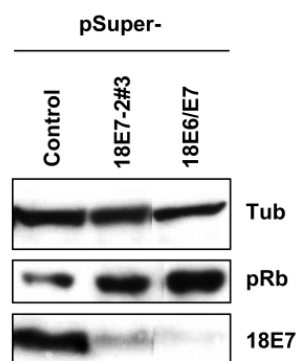


Abb. 2.2.9. Die Hemmung der HPV18 E7-Expression führt zu einer Stabilisierung der endogenen pRb-Spiegel. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Konstrukten gegen E7 (pSuper-18E7-2#3) oder E6/E7 (pSuper-18E6/E7) transfiziert und die HPV18 E7- und pRb-Proteinspiegel mittels Westernblot-Analyse untersucht. pSuper-Control: Negativkontrolle; Tub: Ladekontrolle

Dies lässt darauf schließen, dass der Arrest in der G1-Phase nach Hemmung der E7-Expression aus der Stabilisierung der endogenen pRb-Spiegel resultiert. Die Ergebnisse stimmen mit Analysen überein, darauf hinweisen dass der pRb-Signalweg in HPV-positiven Zellen nach Hemmung der E6/E7-Expression wieder vollständig rekonstituiert werden kann (Goodwin und DiMaio, 2000).

2.2.5. Eine Langzeitinhibition der E7-Expression in HPV18-positiven Zellen führt zu vermindertem Zellwachstum und Seneszenz

Um die Folgen einer Langzeitinhibition der E7-Expression zu untersuchen, wurden „Colony Formation Assays“ (CFA) durchgeführt. Die stabile Transfektion von HPV18-positiven HeLa-Zellen mit dem pSuper-Konstrukt gegen E7 führte zu einer deutlichen Reduktion der Kolonienzahl (Abb. 2.2.10.). Unter den gleichen Bedingungen wurde das Wachstum HPV-negativer H1299-Bronchialkarzinom-Zellen oder U2OS-Osteosarkom-Zellen nicht beeinflusst. Die Hemmung der E7-Expression führt demnach zu einer spezifischen Hemmung des Zellwachstums in HPV-positiven Zellen.

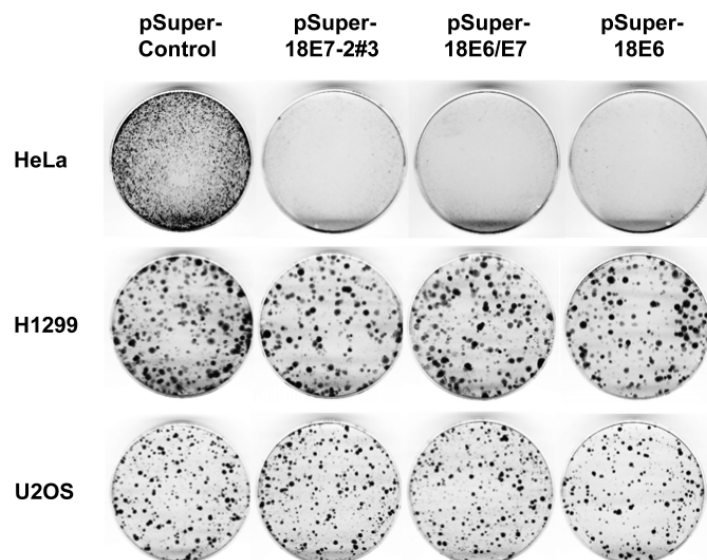


Abb. 2.2.10. Eine Langzeithemmung der E7-Expression führt zur spezifischen Hemmung des Zellwachstums in HPV-positiven Zellen. CFA von HPV-positiven HeLa-Zellen sowie von HPV-negativen H1299- und U2OS-Zellen. Die Zellen wurden stabil mit pSuper-Konstrukten transfiziert, die gegen E7 allein (pSuper-18E7-2#3), E6 allein (pSuper-18E6) oder E6 und E7 (pSuper-18E6/E7) gerichtet waren. pSuper-Control: Negativkontrolle

Die beobachtete Reduktion der Kolonienzahl nach Hemmung der E6- oder E6/E7-Expression ist vermutlich auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen. Während eine spezifische Inhibition der E6-Expression die Induktion von Apoptose zur Folge hat (Butz *et al.*, 2003), führt das gleichzeitige Blockieren der E6/E7-Expression zu Seneszenz (Kuner *et al.*, 2007).

Aus diesem Grunde wurde der Mechanismus der Wachstumshemmung nach alleiniger Inhibition der HPV18 E7-Expression in Seneszenz-Assays näher untersucht.

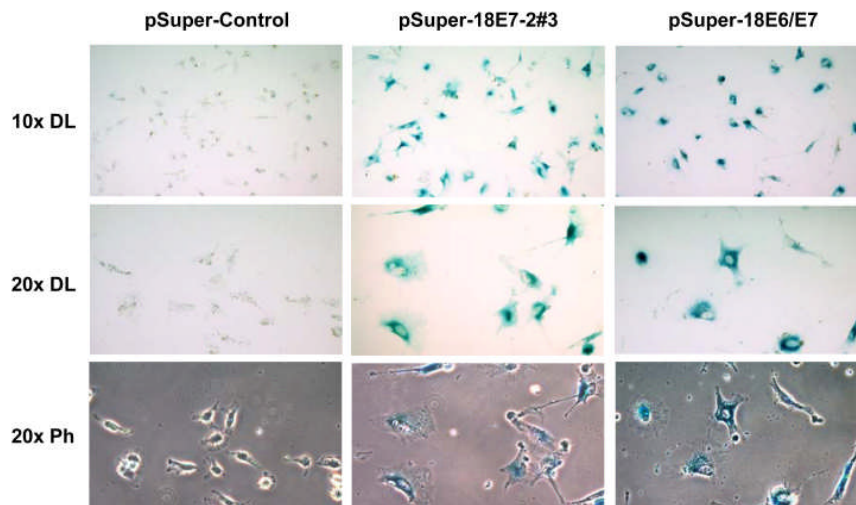


Abb. 2.2.11. Hemmung der HPV18 E7-Expression führt zu Seneszenz. HeLa-Zellen wurden stabil mit pSuper-Control, pSuper-18E7-2#3 oder pSuper-18E6/E7 transfiziert. Zehn Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Aktivität des Seneszenz-Markers SA-β-Galaktosidase durch Blaufärbung sichtbar gemacht. 10x/20x DL: Durchlicht-Mikroskopie; 20x Ph: Phasenkontrast-Mikroskopie

Die Hemmung der E7-Expression führte 8-10 Tage nach Transfektion zu einer deutlich erhöhten Aktivität des Seneszenz-Markers SA-β-Galaktosidase. Dies war ebenso nach einer gleichzeitigen Hemmung der E6/E7-Expression zu beobachten (Abb. 2.2.11.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Hemmung der E7-Expression in HPV-positiven Zellen spezifisch Seneszenz induziert wird. Da dieser Prozess irreversibel ist, könnten E7-hemmende Agenzien zu einer stabilen Blockade des Wachstums HPV-positiver Tumorzellen führen.

2.3. Hemmung der Expression der Onkogene E6 und E7 durch TGS

Eine weitere Strategie zur Hemmung der viralen Onkogenexpression könnte die Blockade der Genexpression auf Promotorebene durch sogenanntes „Transcriptional Gene Silencing“ (TGS) sein. Im Gegensatz zur transienten Hemmung der Genexpression durch RNAi bietet das TGS theoretisch die Möglichkeit, die Expression eines Zielgens dauerhaft zu inhibieren (siehe 1.5.2.). Diese Möglichkeit sollte im Modellsystem HPV18 untersucht werden. Da im Genom humaner Papillomviren das E6- und das E7-Onkogen der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors unterstehen, sollte mit diesem Ansatz eine gleichzeitige Hemmung der Expression beider Onkogene erfolgen.

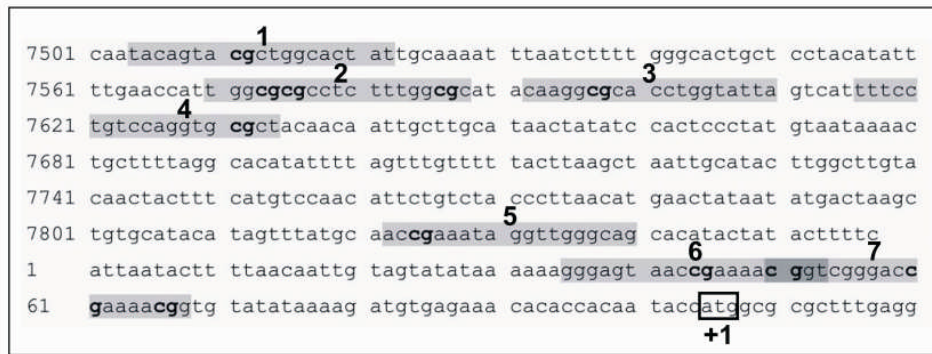


Abb. 2.3.1. Zielsequenzen der Promotor-spezifischen siRNAs. Gezeigt ist die URR von HPV18 mit den Zielsequenzen der Promotor-spezifischen siRNAs (1-7), CG-Motive sind hervorgehoben. Das E6-Startkodon ist umrandet (+1).

Zur Generierung Promotor-spezifischer siRNAs wurden sieben Zielregionen in der URR von HPV18 ausgewählt. Da die Studie von Kawasaki *et al.* impliziert, dass TGS in Säugerzellen durch *de novo* DNA-Methylierung von CpG-Motiven erfolgen kann (Kawasaki und Taira, 2004), schlossen die ausgewählten Zielsequenzen alle in der URR vorkommenden CpG-Motive ein (Abb.2.3.1.).

2.3.1. Promotor-spezifische siRNAs können die HPV18 E6/E7-Expression hemmen

Zunächst wurden pSuper-Konstrukte für die Expression von Promotor-spezifischen siRNAs generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. Dabei wurde jedoch kein signifikanter Einfluss auf die E7-Expression beobachtet (Abb. 2.3.2.).

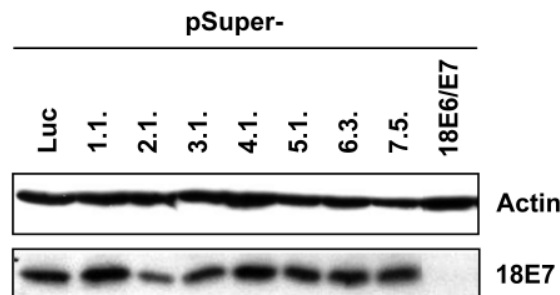


Abb. 2.3.2. Vektorbasierte Promotor-spezifische shRNAs hemmen die HPV18 E7-Expression nicht. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-Konstrukten transfiziert, die für Promotor-spezifische shRNAs (1.1-7.5) kodieren, sowie mit einer 18E6/E7-shRNA, die gegen die HPV18 E6/E7-Transkripte gerichtet ist (Positivkontrolle). Actin: β -Actin-Protein als Ladekontrolle; pSuper-Luc: Negativkontrolle (gegen die mRNA des *Luciferase*-Gens gerichtet)

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Wirksamkeit der siRNAs ist die Tatsache, dass sie, um an den Promotor binden zu können und um DNA- oder Chromatinmodifikation induzieren zu können, in den Zellkern gelangen müssen. pSuper-Konstrukte kodieren jedoch für shRNAs, die im Zellkern exprimiert werden und dann ins Zytoplasma exportiert werden, um dort vom Dicer-Enzym zu siRNAs prozessiert zu werden. Vermutlich erfolgt ein Reimport der funktionellen siRNAs in den Kern danach nur in geringem Maße. Synthetische siRNAs

hingegen, die mittels Lipofektion transfiziert werden, können vermutlich direkt nach der Transfektion in den Zellkern gelangen (Morris *et al.*, 2004).

Deswegen wurden synthetische siRNAs gegen die in Abb. 2.3.1. dargestellten Zielsequenzen generiert. Nach Transfektion wurde in HeLa-Zellen für die siRNAs 4s, 6s und 7s eine Hemmung der E7-Expression in Westernblot-Analysen beobachtet (Abb. 2.3.3. a). Weiterhin konnte ein Anstieg der p53- und p21-Spiegel in Korrelation mit verminderten E7-Spiegeln gefunden werden. Die Stabilisierung der p53-Spiegel resultiert vermutlich aus einer Hemmung der E6-Expression und führt zur Induktion der p21-Expression (Abb.2.3.3. a). Im Einklang mit den Westernblot-Analysen führte die Transfektion mit den siRNAs 4s, 6s und 7s auch zu einer deutlichen Reduktion der E6/E7-Transkripte in Northernblot-Analysen (Abb. 2.3.3. b).

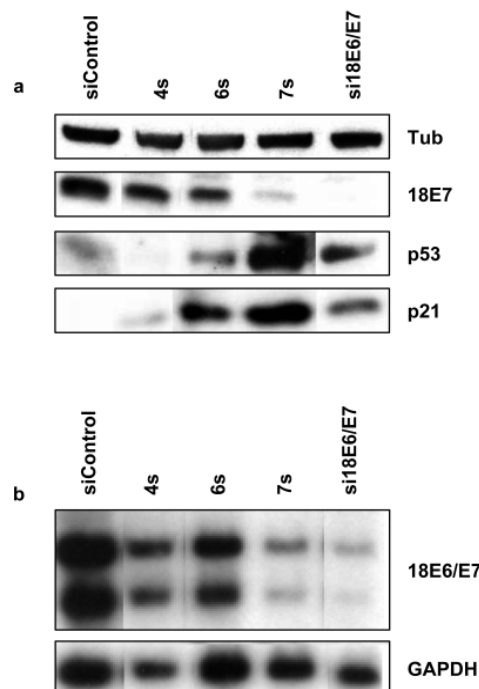


Abb. 2.3.3. Promotor-spezifische synthetische siRNAs können die HPV18 E6/E7-Expression hemmen. HeLa-Zellen wurden mit Promotor-spezifischen siRNAs (1s-7s), sowie mit einer E6/E7-siRNA, die gegen die HPV18 E6/E7-Transkripte gerichtet ist, transfiziert. a) Westernblot-Analyse der HPV18 E7-, p53- und p21-Proteinspiegel. Tub: Ladekontrolle b) Northernblot-Analyse der HPV18 E6/E7-Transkripte. GAPDH: Ladekontrolle; siControl: Negativkontrolle

Zusammenfassend geben diese Analysen erste Hinweise darauf, dass Promotor-spezifische siRNAs die E6/E7-Expression inhibieren können.

2.3.2. Der Effekt ist Promotor-spezifisch

Um zu untersuchen, ob der Effekt der siRNAs auf die E6/E7-Expression spezifisch für den HPV18-Promotor ist, wurden Reporter-gen-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst H1299-Bronchialkarzinom-Zellen generiert, die stabil das *Luciferase*-Reporter-gen unter der Kontrolle der HPV18 URR exprimieren. Als Negativkontrolle wurden H1299-Zellen generiert, die das *Luciferase*-Gen unter der Kontrolle des Actin-Promotors exprimieren. HPV-negative H1299-Zellen wurden ausgewählt, da so eine Beeinflussung der Analysen durch Effekte auf die endogene E6/E7-Expression und somit auf die Proliferation der Zellen ausgeschlossen werden kann.

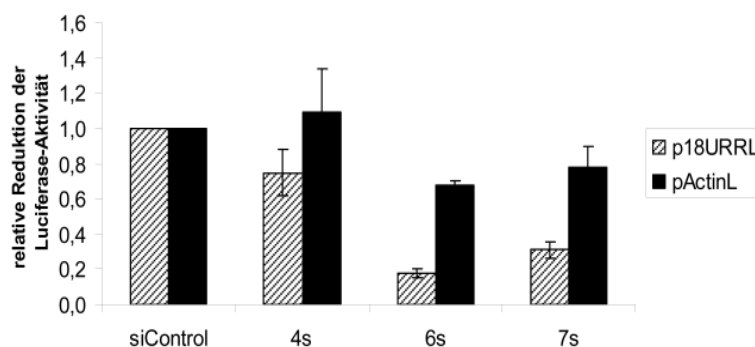


Abb. 2.3.4. Spezifische Hemmung der HPV18 URR durch die siRNAs 4s, 6s, 7s. H1299-Zellen die stabil das *Luciferase*-Gen unter der Kontrolle der HPV18 URR exprimieren (p18URRL) wurden mit den Promotor-spezifischen siRNAs 4s, 6s und 7s transfiziert. Als Kontrolle wurde der Effekt auf H1299-Zellen untersucht, die das *Luciferase*-Gen und der Kontrolle des Actin-Promotors exprimieren (pActinL). Die Luciferase-Aktivität wurde 72 Stunden nach Transfektion bestimmt. Gezeigt ist die relative Reduktion der Luciferase-Aktivität bezogen auf die Aktivität nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA (siControl), die gleich 1.0 gesetzt wurde. Die Mittelwerte ergeben sich aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils im Duplikat durchgeführt wurden, \pm Standardabweichung.

Die beiden Zelllinien wurden mit den Promotor-spezifischen siRNAs 4s, 6s und 7s transfiziert und im Anschluss der Einfluss auf die HPV18 URR untersucht. Hierbei führte die Transfektion mit den siRNAs 6s und 7s zu einer deutlichen Hemmung der Promotoraktivität für die HPV18 URR, jedoch nicht für den Actin-Promotor (Abb. 2.3.4.). Dies lässt darauf schließen, dass diese siRNAs spezifisch die Aktivität der HPV18 URR reprimieren.

2.3.3. Die Behandlung mit Promotor-spezifischen siRNAs führt nicht zu *de novo* Methylierung der HPV18 URR

In den Studien von Kawasaki *et al.* wurde als Mechanismus für die Hemmung der Genexpression durch Promotor-spezifische siRNAs eine *de novo* DNA-Methylierung der Promotorregion an CpG-Motiven diskutiert (Kawasaki und Taira, 2004). Um zu überprüfen, ob die Hemmung der E6/E7-Expression in HeLa-Zellen auch mit DNA-Methylierung

einhergeht, wurden Methylierungsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde, nach Behandlung mit den Promotor-spezifischen siRNAs, genomische DNA von HeLa-Zellen mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen behandelt und in einer anschließenden PCR-Reaktion auf die Methylierung von CpG-Motiven in der HPV18 URR getestet (Abb. 2.3.5.). Das Restriktionsenzym HhaI schneidet innerhalb des PCR-Amplikons in der Zielregion der 4s-siRNA, das Restriktionsenzym Sau96I schneidet in der Zielregion der 7s-siRNA. Nur wenn die entsprechenden CpG-Motive durch Methylierung vor den Restriktionsenzymen geschützt sind, bleibt die Region in der Analyse intakt und es wird ein PCR-Produkt erhalten. Zur Kontrolle wurde genomische DNA aus HeLa-Zellen mittels der bakteriellen Methylase SssI behandelt.

In diesen Analysen konnte nach Behandlung mit den Promotor-spezifischen siRNAs in keinem Fall DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse liefern daher keinen Anhalt dafür, dass die Methylierung von CpG-Motiven nach Behandlung mit Promotor-spezifischen siRNAs im Falle der HPV18 URR der Mechanismus ist, der zur Hemmung der Genexpression führt.

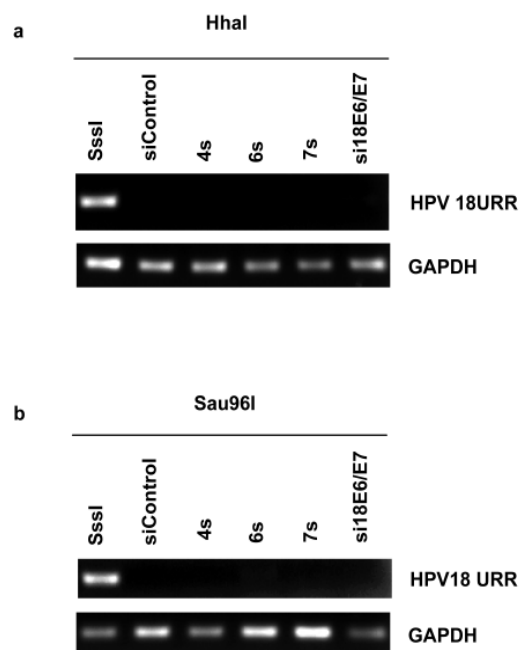


Abb. 2.3.5. Die Behandlung mit Promotor-spezifischen siRNAs führt nicht zur *de novo* Methylierung der HPV18 URR. Nach Behandlung von HeLa-Zellen mit Promotor-spezifischen siRNAs (4s, 6s, 7s) für 72 Stunden wurde eine Extraktion der genomischen DNA durchgeführt. Diese wurde nach Verdau mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen HhaI (a) und Sau96I (b) einer PCR-Analyse unterzogen, in der ein Fragment der HPV18 URR amplifiziert wurde, das die Zielsequenzen der siRNAs einschließt (HPV18 URR). SssI: genomische DNA, die mit der bakteriellen Methylase SssI methyliert wurde. siControl und si18E6/E7: Negativkontrollen; GAPDH: Ladekontrolle

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 3 siRNAs identifiziert werden konnten, die die E6/E7-Expression auf Promotorebene inhibieren. Der Effekt ist spezifisch für die HPV18

URR, aber er ist ersten Analysen zufolge vermutlich nicht mit *de novo* DNA-Methylierung assoziiert.

2.4. Spezifische Hemmung des HPV18 E7-Proteins durch Peptid-Inhibitoren

Auch wenn siRNA-basierte Therapieansätze sehr effizient und spezifisch scheinen, so bleibt das größte Problem der Transport der siRNAs ins Zielgewebe. Systemische Anwendungen von siRNAs scheitern an der Degradation der siRNAs durch Serumnukleasen oder am Abfangen der siRNAs durch Leber und Nieren. Bei lokaler Anwendung von siRNAs ist der Membrantransfer problematisch. Eine Alternative bieten Peptid-basierte Therapieansätze. Im Fall HPV-assoziierten Erkrankungen ist dabei eine topische Applikation mit Hilfe von Proteintransduktionsdomänen (Derossi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1997; Schwarze *et al.*, 1999) denkbar.

Um eine Basis für die Entwicklung Peptid-basierter Therapeutika zu schaffen, sollten Peptid-Inhibitoren gefunden werden, die spezifisch das E7-Onkoprotein von HPV18 binden und dieses funktionell inhibieren können.

2.4.1. Y2H Screen nach HPV18 E7-bindenden Peptiden

Um Peptid-Inhibitoren zu finden, die spezifisch an das E7-Protein von HPV18 binden, wurde ein Hefe Zwei-Hybrid-Screen durchgeführt (Yeast Two-Hybrid, Y2H). Die hierbei verwendete Bibliothek umfasste 1×10^6 randomisierte 60mer cDNA-Sequenzen, die für 20mer-Peptide in Fusion mit der Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne kodierten. Für den Screen wurden KF1-Hefen, die das Köder-Plasmid pPc97-18E7 enthielten, mit der Peptid-Expressionbank (Beute-Plasmid) transformiert. Es wurden $2,7 \times 10^6$ Hefetransformanten getestet, die Bibliothek wurde somit 2,7mal abgedeckt. Positive Klone wurden danach in einer Replikaplattierung daraufhin untersucht, ob sie verschiedene Selektionsmarker der Testhefe aktivieren können (Abb. 2.4.1.).

Insgesamt konnten 69 Hefetransformanten den *ADE2*-Marker aktivieren, der bereits durch sehr schwache Protein-Protein-Interaktionen induziert wird (Butz *et al.*, 2000). Diese Transformanten wurden mittels Re-Screen erneut auf die Aktivierung von *ADE2*, sowie zusätzlich von *HIS3* nach Zusatz von 40 mM 3-AT, oder von *URA3* getestet. Hier aktivierten 30 Hefetransformanten den *His3*-Marker, 18 Hefetransformanten auch den *URA3*-Marker, dessen Promotor ein negativ regulatorisches Element besitzt. Deshalb wird letzterer Marker nur durch relativ starke Wechselwirkungen aktiviert.

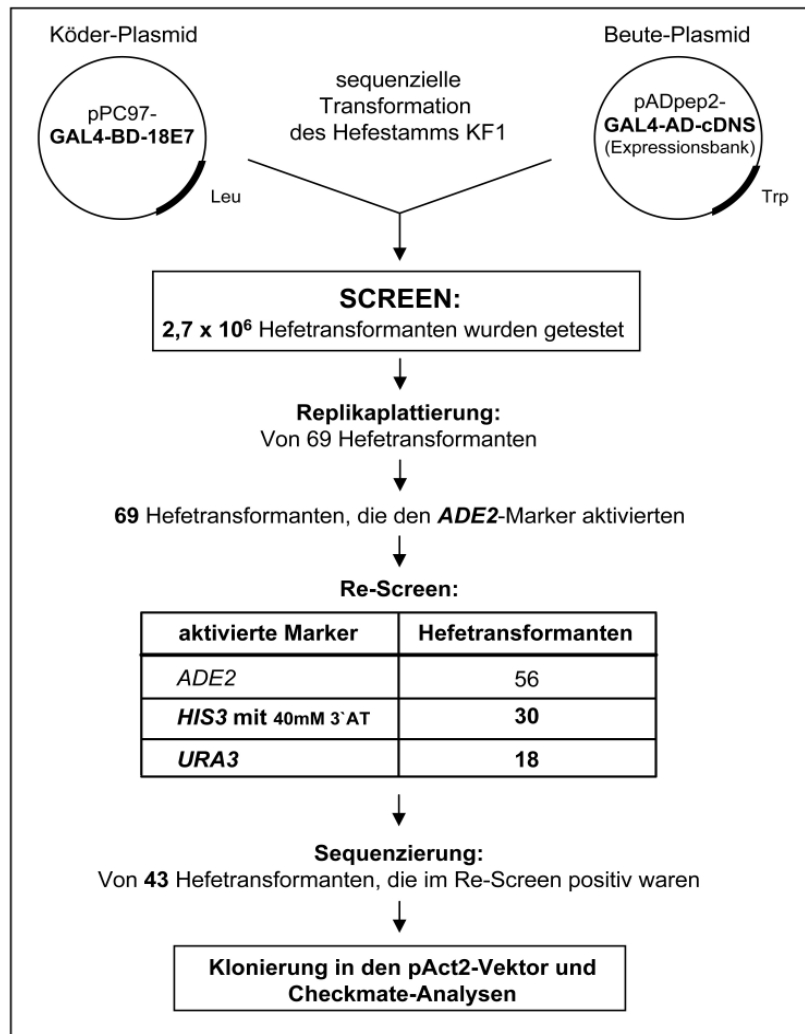


Abb. 2.4.1. Durch einen Y2H Screen wurden 43 Peptide identifiziert, die in der Hefe an das HPV18 E7-Protein binden. Das Köder-Plasmid pPC97-18E7 und die Peptid-Expressionsbank pADpep2 (Beute-Plasmid) wurden in KF1-Hefen sequenziell transformiert. Es wurden $2,7 \times 10^6$ Hefetransformanten im Screen getestet, davon aktivierten 69 den *ADE2*-Marker. Diese wurden im Re-Screen auf die Aktivierung weiterer Marker getestet. Hier aktivierten 56 Hefetransformanten den *ADE2*-Marker, 30 Hefetransformanten den *HIS3*-Marker und 18 Hefetransformanten aktivierten auch den *URA3*-Marker. Transformanten, die mindestens 2 Markergene aktivierten, wurden sequenziert und für Checkmate-Analysen in den pAct2-Vektor kloniert (siehe Abb. 2.4.2.).

Insgesamt zeigten 48 Hefetransformanten eine moderate bis starke Protein-Protein-Wechselwirkung. Die in ihnen enthaltenen Plasmide wurden isoliert und durch DNA-Sequenzierung analysiert. Zwei Hefetransformanten waren doppelt vertreten, für drei Klone ließ sich die Sequenz aufgrund von Sequenzierproblemen nicht aufschlüsseln.

2.4.2. Einige der identifizierten Proteine binden HPV18 E7 auch in Säugerzellen

Um zu testen, ob die im Hefe-Screen identifizierten HPV18 E7-bindenden Peptide auch in Säugerzellen an das E7-Protein binden, wurden Checkmate-Analysen durchgeführt. Das

Checkmate-System ist ein dem Y2H-System analoges System für Bindungsanalysen in Säugerzellen.

Zunächst wurden alle 43 Peptide auf ihre Bindung an das E7-Protein in HeLa-Zellen untersucht (Abb.2.4.2.a). Peptide, die zu einer mindestens dreifachen Aktivierung der Luciferase-Aktivität führten, wurden außerdem in HPV-negativen H1299-Bronchialkarzinom-Zellen getestet, um mögliche Nebeneffekte der Peptide auf endogenes HPV18 E7-Protein auszuschließen. In den H1299-Zellen führte die Bindung von 6 Peptiden ebenfalls zu einer deutlichen Induktion der Luciferase-Aktivität (Abb. 2.4.2.b). Diese Peptide wurden für weitere funktionelle Analysen ausgewählt.

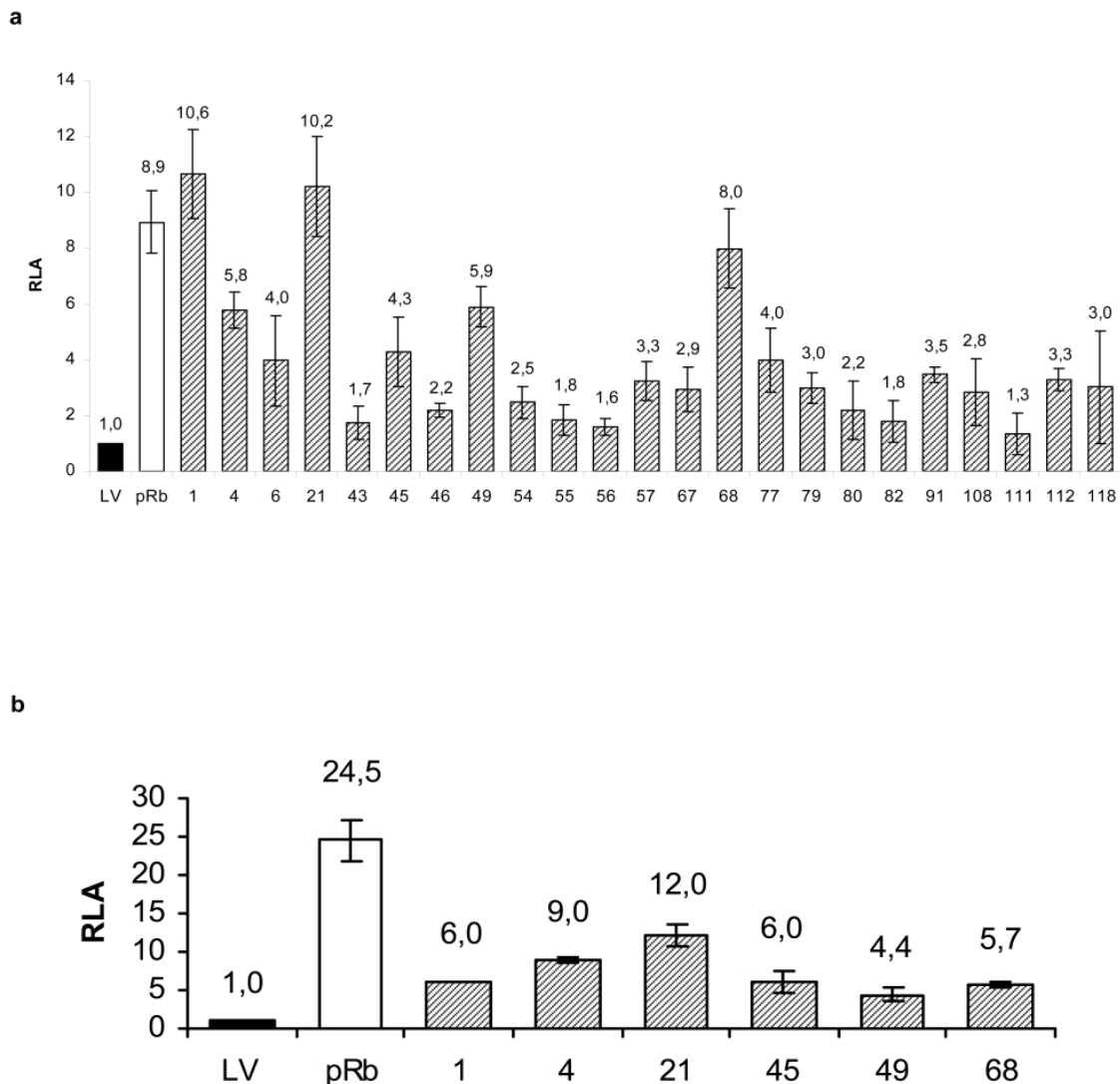


Abb. 2.4.2. Peptid-E7-Interaktionen in Säugerzellen. Checkmate-Analysen der Bindung HPV18 E7-spezifischer Peptide an HPV18 E7 (a) in HeLa-Zellen und (b) in HPV-negativen H1299-Zellen. Die Zellen wurden mit Checkmate-Expressionsvektoren für die Peptide und das HPV18 E7-Protein, sowie Reporterplasmid pG5Luc kotransfiziert. Gezeigt ist die relative Luciferase-Aktivität als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Duplikate durchgeführt wurden. Als Positivkontrolle (pRb) diente die Bindung zwischen dem pRb-Protein und HPV18 E7, als Basiswert (1,0) wurde die Luciferase-Aktivität nach Kotransfektion von HPV18 E7 mit pAct2-Leervektor verwendet (LV).

2.4.3. Die Bindung der Peptide an das HPV18 E7-Protein ist hochspezifisch

Sowohl für funktionelle Analysen als auch für einen möglichen therapeutischen Einsatz ist es wichtig, die Spezifität der Bindung zwischen den Peptiden und dem HPV18 E7-Protein zu testen. Hierzu wurden die Interaktionen zwischen den Peptiden und dem E7-Protein von HPV18, HPV16, HPV1, HPV6 und HPV11, dem E6-Protein von HPV16 und dem pRb-Protein getestet. Bis auf eine schwache Bindung zwischen dem Peptid Pep68 und dem HPV16 E7-Protein war die Bindung der Peptide hochspezifisch und nur für das HPV18 E7-Protein nachweisbar (Abb.2.4.3.).

Peptid	18E7	16E7	16E6	1E7	6E7	11E7	pRb
1	+++	-	-	-	-	-	-
4	+++	-	-	-	-	-	-
21	++	-	-	-	-	-	-
45	+++	-	-	-	-	-	-
49	++	-	-	-	-	-	-
68	+++	+	-	-	-	-	-

Aktivierung

- +++ *HIS3, ADE2, URA3* – starke Bindung
- ++ *HIS3, ADE2* – mittelstarke Bindung
- + *HIS3* – schwache Bindung
- keine Bindung

Abb. 2.4.3. Die Bindung der Peptide ist hochspezifisch für das E7-Protein von HPV18. Y2H-Analyse der HPV18 E7-bindenden Peptide (Pep 1, 4, 21, 45, 49, 68) und der Proteiner HPV18 E7, HPV16 E7, HPV16 E6, HPV1 E7, HPV6 E7, HPV11 E7, pRb. Es wurde auf die Aktivierung der Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *URA3* getestet.

2.4.4. Die HPV18 E7-bindenden Peptide Pep21, Pep45 und Pep49 interferieren mit der Bindung zwischen E7 und pRb

Inhibitorische Peptide können auf verschiedene Arten mit der Funktion ihres Zielproteins interferieren. Eine Möglichkeit ist die Blockierung der Bindung des Zielproteins an einen zellulären Interaktionspartner. Im Falle des HPV18 E7-Proteins war eine Interferenz mit der pRb-Bindung von besonderem Interesse, da diese entscheidend für das transformierende Potential von high-risk E7-Proteinen ist (Jones und Munger, 1997).

Die HPV18 E7-bindenden Peptide wurden daher daraufhin untersucht, ob sie mit der E7-pRb-Bindung interferieren können. Hierzu wurde die Bindung zwischen HPV18 E7 und pRb im Checkmate-System bei Koexpression der Peptide untersucht. Drei Peptide, Pep45, Pep49 und Pep68, führten zu einer deutlichen Reduktion der Luciferase-Aktivitäten, was darauf hindeutet, dass sie mit der Bindung zwischen E7 und pRb interferieren können (Abb. 2.4.4.). Die Expression eines Kontrollpeptids (C1/1), das an das Core-Protein des Hepatitis B-Virus (HBV) bindet, hatte keinen Einfluss auf die HPV18 E7-pRb-Bindung.

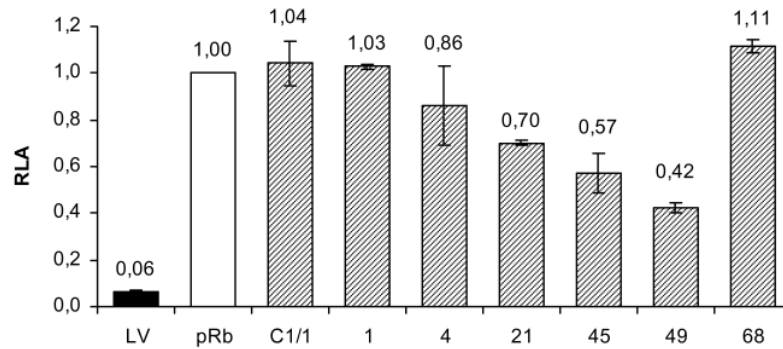


Abb. 2.4.4. Die Peptide Pep21, Pep45 und Pep49 interferieren mit der HPV18 E7-pRb-Interaktion. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für das HPV18 E7-Protein, das pRb-Protein und die HPV18 E7-bindenden Peptide Pep1, 4, 21, 45, 49 und 68 transfiziert und die relative Luciferase-Aktivität (RLA) bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils als Duplikate durchgeführt wurden. pRb: Bindung zwischen pRb und HPV18 E7 gleich 1.0 gesetzt. C1/1: Kontrollpeptid, das an das HBV-Core-Protein bindet; LV: Basiswert nach Koexpression von HPV18 E7 mit dem pAct2-Leervektor

2.4.5. Die HPV18 E7-bindenden Peptide Pep1, Pep21 und Pep68 hemmen spezifisch das Wachstum HPV-positiver Zellen

Die zellbiologischen Effekte der HPV18 E7-bindenden Peptide auf HPV-positive Zellen wurden in einem Wachstumsassay (CFA) untersucht. Das Peptid Pep1 hemmte deutlich das Wachstum HPV-positiver HeLa-Zellen, die Peptide Pep21 und Pep 68 führten ebenfalls zu einer geringeren Kolonienzahl, wenn auch in geringerem Maße (Abb. 2.4.5.). Keines der Peptide beeinflusste das Wachstum HPV-negativer H1299- oder U2OS-Zellen. Die wachstumshemmenden Effekte der Peptide sind somit spezifisch für HPV-positive Zellen.

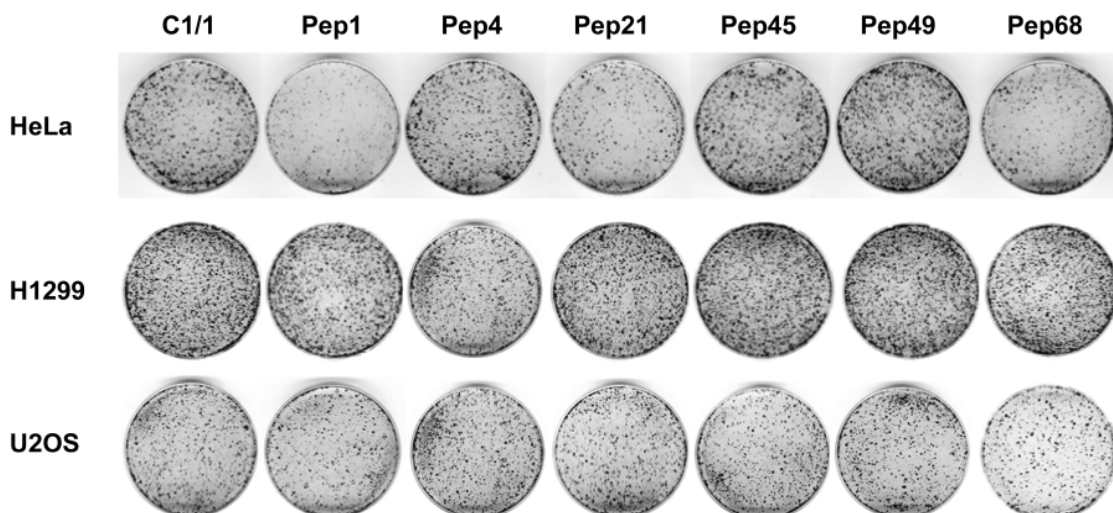


Abb. 2.4.5. Die HPV18 E7-bindenden Peptide Pep1, Pep21, und Pep68 hemmen spezifisch das Wachstum HPV-positiver Zellen. CFA in HPV-positiven HeLa-Zellen sowie HPV-negativen H1299- und U2OS-Zellen. Die Zellen wurden stabil mit Expressionsvektoren für die aufgeführten HPV18 E7-bindenden Peptide transfiziert. C1/1: Kontrollpeptid, das an das HBV-Core-Protein bindet

Zusammenfassend wurden sechs Peptide identifiziert, die selektiv an das HPV18 E7-Protein binden. Die Bindung konnte in Hefe und Säugerkellen nachgewiesen werden. Spezifische Peptide beeinflussten die Bindung zwischen HPV18 E7 und pRb und/oder hemmten selektiv das Wachstum HPV-positiver Zellen. Diese Peptide sollten eine Grundlage für weitere Funktionsanalysen des E7-Proteins bieten und eine Basis für neue E7-spezifische Therapieansätze darstellen.

3. Diskussion

Das HPV-induzierte Zervixkarzinom ist weltweit die zweithäufigste Krebsart bei Frauen (Pisani *et al.*, 2002; Parkin *et al.*, 2005). Die bisher in der Klinik eingesetzten Therapiestrategien sind nicht HPV-spezifisch und bringen daher unerwünschte Nebenwirkungen mit sich (Baker und Tyring, 1997). Prinzipiell ist es vorstellbar, zielgerichtete Therapieansätze zu entwickeln, die sich entweder gegen die viralen Onkogene richten oder aber an den zellulären Regulationsmechanismen angreifen, die durch onkogene HPVs dereguliert werden. Letzterer Gesichtspunkt macht es notwendig, die Mechanismen der HPV-assoziierten Karzinogenese im Detail aufzuklären und die intrazellulären Angriffspunkte der viralen Onkogene zu identifizieren.

Transkriptomanalysen identifizierten das *Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2)*-Gen als ein mögliches neues HPV-Zielgen (Kuner *et al.*, 2007). Das *EZH2*-Gen wurde in den vorliegenden Untersuchungen für weitere funktionelle Analysen ausgewählt, da es bereits mit der Entstehung von verschiedenen Krebsarten, die nicht mit Viren assoziiert sind, in Verbindung gebracht wird. So wurden erhöhte *EZH2*-Expressionsspiegel bei Brustkrebs (Kleer *et al.*, 2003), Prostatakrebs (Varambally *et al.*, 2002; Saramaki *et al.*, 2006) Leberkrebs (Sudo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007), Lymphomen (Raaphorst, 2005), malignen Melanomen (McHugh *et al.*, 2007), Eierstockkrebs (Lu *et al.*, 2007), Magenkrebs (Matsukawa *et al.*, 2006) und Blasenkrebs (Raman *et al.*, 2005; Weikert *et al.*, 2005) gefunden. Dabei korrelierten erhöhte *EZH2*-Proteinspiegel bei Brust- und Prostatakrebs mit der Aggressivität der Erkrankung (Varambally *et al.*, 2002; Kleer *et al.*, 2003; Bachmann *et al.*, 2006). Bei Patientinnen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko wiederum kann eine verstärkte *EZH2*-Expression bereits in nicht malignen Vorläuferzellen gefunden werden (Ding *et al.*, 2006; Ding und Kleer, 2006). *EZH2* könnte so als neuer diagnostischer und/oder prognostischer Marker bei Tumorerkrankungen dienen.

Die vorliegende Arbeit ergibt erstmals einen direkten Hinweis, dass *EZH2* auch eine wichtige Rolle bei der HPV-assoziierten Karzinogenese spielt. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der E6/E7-Expression zu einer Reduktion von *EZH2* Transkript- und Proteinspiegeln führt. Dies weist darauf hin, dass die *EZH2*-Expression durch die viralen Onkogene aktiviert wird. Diese Hypothese konnte durch die Ergebnisse aus Reporteranalysen gefestigt werden. Sie zeigten, dass das E7-Onkoprotein den *EZH2*-Promotor aktivieren kann. Vergleichende Analysen in Zellen mit unterschiedlichem pRb-Status zeigten zudem, dass der Effekt von E7 vermutlich primär über den pRb/E2F-Signalweg vermittelt wird. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Analysen von

Bracken und Kollegen, nach denen EZH2 über den pRb/E2F-Signalweg aktiviert werden kann (Bracken *et al.*, 2003). Da in der HPV-assoziierten Karzinogenese abnormes Zellwachstum aus der Deregulierung des pRb/E2F-Signalwegs resultiert, ist es möglich, dass die Aktivierung von EZH2 in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle für das Zellwachstum spielt.

Weiterhin ist auch eine Aktivierung der EZH2-Expression durch das E6-Onkoprotein vorstellbar. In einer Studie wurde gezeigt, dass ektopisch exprimiertem p53-Protein einen hemmenden Effekt auf den EZH2-Promotor ausübt (Tang *et al.*, 2004). Da die Expression von E6 zur Degradierung von p53 führt, könnte dies eine Aktivierung des EZH2-Promotors zur Folge haben. In Reporteranalysen konnte jedoch nur eine marginale Aktivierung des EZH2-Promotors nach Expression von E6 gefunden werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zu oben genannter Publikation wäre die Tatsache, dass in den vorliegenden Arbeiten endogene p53-Proteinspiegel an Stelle von stark überexprimiertem p53-Protein analysiert wurden. Um die Beiträge des E6- und E7-Onkogens genauer zu untersuchen, könnte in zukünftigen Experimenten auch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HPV18 E7-spezifische shRNA Anwendung finden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der EZH2-Promotor in HPV-positiven Zellen vorwiegend über den E7/pRb/E2F-Signalweg aktiviert wird. Es stellte sich daher die Frage, welche Rolle die Aktivierung von EZH2 durch die E7/pRb/E2F-Kaskade im Rahmen der HPV-assoziierten Karzinogenese spielt. Untersuchungen für andere Tumorformen zeigten, dass die Proliferation von Krebszelllinien von der fortlaufenden Expression des EZH2-Proteins abhängen kann (Varambally *et al.*, 2002; Bracken *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004). Zellzyklus- und Zellwachstumsassays nach Inhibition der EZH2-Expression durch RNAi zeigten, dass eine fortlaufende Expression des EZH2-Proteins auch essentiell für das Wachstum HPV-positiver Zellen ist.

In Zellzyklus-Analysen war ein G1-Arrest nach Hemmung der EZH2-Expression in HeLa-Zellen zu beobachten. Ähnlich wurde in MCF-7-Mammakarzinomzellen ein deutlicher G1-Arrest nach EZH2-Hemmung nachgewiesen (Shi *et al.*, 2007). Auch in eigenen Experimenten wurde in Nierenzellkarzinomzellen ein G1-Arrest nach gezielter Hemmung der EZH2-Expression beobachtet (Wagener, Holland *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Der Beitrag von EZH2 zum Voranschreiten des Zellzyklus scheint jedoch zelltypspezifisch zu sein. So wurde für U2OS-Osteosarkomzellen (Bracken *et al.*, 2003), RWPE- und PC3-Prostatakarzinomzellen sowie humane embryonale Fibroblasten (WI-38) - nach Hemmung der EZH2-Expression - auch ein G2/M-Arrest beschrieben (Varambally *et al.*, 2002; Tang *et*

al., 2004). Da der pRb/E2F-Signalweg in vielen Krebszelllinien auf unterschiedliche Weise dereguliert ist (Classon und Harlow, 2002), und EZH2 über den pRb/E2F-Signalweg reguliert wird, ist denkbar, dass dies der Grund für die unterschiedlichen Effekte auf die Zellzyklusregulation ist.

Um den G1-Arrest und die daraus resultierende Wachstumshemmung näher zu charakterisieren, muss die Frage untersucht werden, ob EZH2 Zellzyklusregulatoren modulieren kann. Hierzu ist bislang noch wenig bekannt. Im Allgemeinen wird EZH2 als transkriptioneller Repressor beschrieben, der z.B. im PRC2 Histon- und DNA-Methylierung induziert und hierdurch die Genexpression hemmen kann (Cao *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2005). Allerdings ergaben die Studien von Bracken und Kollegen, dass die Expression E2F-regulierter Gene, insbesondere der Cycline D1, E1, A2 und B2, nach Hemmung der EZH2-Expression durch RNAi deutlich inhibiert wird. (Bracken *et al.*, 2003). Hiernach müsste EZH2 auch als Aktivator dieser Gene wirken können. Kürzlich wurde zum ersten Mal ein möglicher Mechanismus zur Aktivierung der Genexpression durch EZH2 beschrieben. In MCF-7-Mammakarzinomzellen interagiert EZH2 mit Komponenten des Östrogenrezeptor-Signalwegs und des Wnt-Signalwegs und konnte hierdurch die Expression von Cyclin D1 und c-Myc induzieren (Shi *et al.*, 2007). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise auf eine mögliche Aktivierung der Genexpression durch EZH2 gefunden. So war die Expression der beim G1/S-Übergang aktiven Cycline D1 und E nach Inhibition der EZH2-Expression in HeLa-Zellen gehemmt, im Einklang mit den Studien von Shi *et al.* und Bracken *et al.* (Bracken *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2007). Dies weist darauf hin, dass EZH2 die G1/S-Progression HPV-positiver Zellen durch eine Aktivierung von Cyclin D1 und Cyclin E stimuliert.

Die in Wachstumsassays beobachtete deutliche Hemmung der Kolonienzahl nach EZH2-Hemmung resultiert jedoch nicht allein aus dem G1-Arrest der HPV-positiven Zervixkarzinomzellen. So konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Hemmung der EZH2-Expression außerdem auch zu einer deutlichen Apoptoseinduktion in HPV-positiven Zellen führt. Dies deutet auf eine anti-apoptotische Aktivität des EZH2-Proteins hin. Bislang liegen nur sehr wenige Daten über eine mögliche Rolle von EZH2 für die Apoptose-Regulation vor, die zudem in der Literatur kontrovers diskutiert werden. So konnten in einer Studie in humanen embryonalen Fibroblasten keine Anzeichen für Apoptose nach Hemmung der EZH2-Expression durch RNAi gefunden werden (Tang *et al.*, 2004). Ebenso führte eine Transfektion nicht-tumorigener Brustepithelzellen (MCF-10A) mit einer EZH2-spezifischen siRNA nicht zur Induktion von Apoptose, wohingegen unter gleichen Bedingungen in Mammakarzinomzellen (MCF-7) Apoptose induziert werden konnte. Möglicherweise ist die

Apoptoseinduktion nach Hemmung der EZH2-Expression ein spezifischer Effekt in Tumorzellen (Tan *et al.*, 2007). Ähnlich wurde auch in Nierenzellkarzinomzellen eine erhöhte Apoptoserate nach Hemmung der EZH2-Expression beobachtet (Wagener, Holland *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Allerdings beeinflusste die Hemmung der EZH2-Expression das Wachstum von Prostatakarzinom-Vorläuferzellen nicht (Berezovska *et al.*, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen unterstützen die Hypothese, dass die Hemmung der EZH2-Expression einen Anstieg der Apoptoserate zur Folge haben kann.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der zu einer Reduktion der Zellzahl in Wachstumsassays führen kann, ist die Induktion von Seneszenz. So konnte von Bracken und Kollegen nach Hemmung der EZH2-Expression in humanen Fibroblasten Seneszenz beobachtet werden. Die Hemmung der E6/E7-Expression führt in HPV-positiven Zellen ebenfalls zu Seneszenz (Johung *et al.*, 2007; Kuner *et al.*, 2007). Im Unterschied zur Situation nach Inhibition der E6/E7-Expression ergaben die vorliegenden Arbeiten nach Hemmung der EZH2-Expression jedoch keinen Anhalt für eine Seneszenzinduktion HPV-positiver Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die differentielle Regulierung der p21-Expression nach Hemmung der E6/E7- oder EZH2-Expression, da die Stimulation von p21 als wesentlicher Faktor für die Seneszenzinduktion in HPV-positiven Karzinomzellen diskutiert wird (Wells *et al.*, 2000). Während nach einer Hemmung der E6/E7-Expression die p21-Spiegel deutlich anstiegen und Seneszenz induziert wurde, hatte die Hemmung der EZH2-Expression nur einen marginalen Steigerungseffekt auf die p21-Proteinspiegel.

Auch die p16-Proteinspiegel blieben nach Hemmung der EZH2-Expression in HeLa-Zellen unverändert. Interessanterweise wurde EZH2 als Repressor des *p16*-Gens beschrieben (Kotake *et al.*, 2007), so dass eine Hemmung der EZH2-Expression eigentlich eine erhöhte p16-Expression zur Folge haben sollte. Allerdings muss für eine Modulation der p16-Expression durch EZH2 der pRb-Signalweg intakt sein, da das pRb-Protein den PRC2 zum *p16*-Genlokus rekrutiert, wodurch erst die Hemmung der Genexpression ermöglicht wird. Da der pRb-Signalweg in HPV-positiven Zellen jedoch durch das E7-Onkogen dereguliert ist, besteht die Möglichkeit, dass das E7-Onkogen die Regulierung der p16-Expression durch EZH2 aufhebt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Expression von E7 in humanen Fibroblasten zu einem deutlichen Anstieg der p16-Expression führte (Kotake *et al.*, 2007).

Auch die in *in vivo*-Studien erhaltenen Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen der viralen Onkogenexpression und der EZH2-Expression hin. So ergaben immunhisto-

chemische Analysen, dass HPV-positive Läsionen typischerweise deutlich erhöhte EZH2-Expressionsspiegel zeigen. Dies ist kompatibel mit der Vorstellung, dass onkogene HPVs zur Aktivierung der EZH2-Expression beitragen können. Es muss aber an diesem Punkt betont werden, dass diese Beobachtung keinen endgültigen Beweis für einen direkten kausalen Zusammenhang darstellt. Denn auch die parabasalen Gewebeschichten der normalen Zervix-Mukosa wiesen eine erhöhte EZH2-Expression auf. Die vermehrte EZH2-Expression in diesen Bereichen kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Proliferationsrate in diesen Gewebeschichten erhöht ist (Barbie *et al.*, 2003) und somit große Mengen an freien E2F-Faktoren vorliegen, die die EZH2-Expression induzieren können. Mit dem gemeinsamen Nenner einer erhöhten EZH2-Expression könnten HPVs daher in den Tumoraläsionen ähnliche Mechanismen aktivieren, wie sie auch für die (physiologische) Proliferation der Parabasalzellen genutzt werden.

Die erhöhte Expression von EZH2 in den Tumorgeweben stellt zudem die Frage, ob EZH2 - wie für andere Tumorformen beschrieben (s.o.) - möglicherweise auch beim Zervixkarzinom als diagnostischer/prognostischer Marker nutzbar ist. Derartige Untersuchungen müssten an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden, um statistisch solide Daten zu erhalten.

Insgesamt konnte in diesen Untersuchungsabschnitten *EZH2* erstmalig als Zielgen für das HPV E7-Onkoprotein identifiziert werden. Da die kontinuierliche EZH2-Expression essentiell für die Proliferation HPV-positiver Zellen ist und gleichzeitig anti-apoptotisch wirkt, besitzt *EZH2* das Potential, als neues therapeutisches Zielgen beim Zervixkarzinom zu dienen. Neben Ansätzen, die direkt die EZH2-Funktion hemmen könnten, wie beispielsweise die Anwendung von 3-Deazaneplanozin A, das die proteasomale Degradation von EZH2 induziert (Tan *et al.*, 2007), sollten auch Inhibitoren des E7-Proteins großes therapeutisches Potential besitzen.

Ein Vorteil von E7-Inhibitoren ist es, dass E7 - im Gegensatz zu EZH2 - ausschließlich in HPV-infizierten Zellen exprimiert wird und es keine zellulären homologen Gene oder Proteine gibt (Munger *et al.*, 2001). Konzeptionell sollte dies einen spezifischen Angriff auf HPV-positive Dysplasien oder Karzinome ermöglichen. Über diese therapeutischen Aspekte hinaus könnten solche spezifischen E7-Inhibitoren außerdem wirkungsvolle Werkzeuge sein, um die molekularen Mechanismen der HPV-assoziierten Karzinogenese weiter aufzuklären.

Untersuchungen über die Rolle von E7 in HPV-positiven Karzinomzellen standen bislang vor dem Problem, dass keine geeigneten E7-spezifischen Inhibitoren verfügbar sind. Eine Hemmung der E7-Expression oder Funktion ist prinzipiell auf verschiedene Arten denkbar,

zum einen auf Transkriptebene durch RNAi, zum anderen auf Proteinebene durch Peptid-Inhibitoren. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmalig eine HVP18 E7-spezifische shRNA sowie neue HPV18 E7-spezifische Peptid-Inhibitoren generiert werden.

Da das HPV E6- und E7-Protein von teilweise gemeinsamen bicistronischen mRNAs translatiert werden, kann eine spezifische Hemmung von E7 nicht über den simplen Einsatz von siRNAs, die gegen E7-Sequenzen gerichtet sind, erreicht werden. Aufgrund des bicistronischen Charakters der mRNAs würden sie gleichzeitig auch Transkripte angreifen, die für E6 kodieren. Vielmehr war es notwendig, selektiv Transkripte der Klassen 2 und 3 anzugreifen, die für E7 kodieren (Abb. 1.5.2.). Hierfür konnten nur Zielsequenzen in deren spezifischem Spleißdonor/-akzeptorübergang dienen. Allerdings bewirkte zunächst keine der untersuchten neun verschiedenen vektorkodierten shRNAs gegen die Spleißdonor/-akzeptorzielregion eine Hemmung der E7-Expression. Dies könnte durch eine geringe Effizienz der verwendeten shRNAs erklärt werden. Wichtige Faktoren, die zur RNAi-Effizienz beitragen, sind die Zugänglichkeit der Zielsequenz und die thermodynamischen Eigenschaften der siRNA-Duplex, die sich ebenfalls aus der siRNA-Sequenz ergeben (Schwarz *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2004; Heale *et al.*, 2005). Für die Auswahl der HVP18 E7-spezifischen shRNA gab es jedoch nur eine begrenzte Zahl möglicher Zielsequenzen im Bereich des relativ kurzen Spleißdonor/-akzeptorübergangs. Daher erfüllten die generierten 19mer shRNAs nur zum Teil die Kriterien zur Generierung effizienter siRNAs nach Tuschl (Elbashir *et al.*, 2002). Auch ist nicht bekannt, wie gut die Zugänglichkeit der Zielsequenzen im Transkript ist. So wurde bei Studien mit Antisense-Oligonukleotiden gegen E6/E7-Transkripte häufig eine geringe Hemmeffizienz beobachtet, was auf eine mangelnde Zugänglichkeit des Transkripts zurückgeführt wurde (Venturini *et al.*, 1999).

Interessanterweise konnte jedoch mit einer 29mer shRNA die HPV18 E7-Expression auf mRNA- und Proteinebene gehemmt werden. Eine korrespondierende synthetische siRNA, die nicht durch Dicer prozessiert wird, führte hingegen nicht zu einer Hemmung der E7-Expression. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass tatsächliche Dicer-Substrate effizienter die Genexpression hemmen können als korrespondierende 21mer siRNAs (Kim *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2005; Siolas *et al.*, 2005). Letztere, chemisch synthetisiert, besitzt den Charakter von Dicer-Produkten, und wird daher in der Zelle nicht mehr durch Dicer prozessiert. Möglicherweise könnte die Effizienz der E7-shRNA sogar noch weiter gesteigert werden, wenn stattdessen eine asymmetrische 25/27-mer siRNA verwendet würde. So konnte für eine Reihe von siRNAs gezeigt werden, dass solche Konstrukte noch effizienter in den Dicer-Komplex aufgenommen werden (Rose *et al.*, 2005). Durch eine Steigerung der

siRNA-Effizienz kann außerdem die Spezifität der Hemmeffekte weiter erhöht werden, da geringere siRNA-Mengen eingesetzt werden müssen (Jackson und Linsley, 2004).

Die hier generierte bioaktive HPV18 E7-shRNA sollte erstmalig die Möglichkeit einer Analyse der endogenen E7-Funktion in HPV-positiven Zervixkarzinomzelllinien bieten, unabhängig von E6. Allerdings muss hierfür die Spezifität der shRNA gewährleistet sein. Westernblot-Analysen ergaben erwartungsgemäß, dass durch die HPV18 E7-shRNA spezifisch die Transkripte der Klasse 2/3 angegriffen werden, nicht aber die der Klasse 1. Jedoch wurde in diesen Analysen E6 ektopisch exprimiert. Bei den Spezifitätsanalysen mittels RT-PCR ergab sich das Problem, dass auch die Expression der endogenen E6-Transkripte durch die E7-shRNA gehemmt wurde. Da die Zielsequenz der HPV18 E7-spezifischen shRNA in den E6-Transkripten nicht enthalten ist, kann es sich dabei nur um einen sekundären Effekt handeln. Eine mögliche Erklärung wäre eine Abhängigkeit der HPV-Genexpression von der Proliferationsrate der Zelle. Die starke Wachstumshemmung nach Inhibition der E7-Expression könnte dann die Aktivität der HPV18 URR reprimieren und demnach auch eine verminderte E6-Expression zur Folge haben. In der Tat zeigten zwei Studien, dass eine Überexpression des pRb-Proteins die HPV18 URR transkriptionell reprimiert (Salcedo *et al.*, 1995; Darnell *et al.*, 2005). Da sich nach Hemmung der E7-Expression die endogenen pRb-Spiegel stabilisieren, könnte dies mit einer verminderten Aktivität der endogenen HPV18 URR in Zervixkarzinomzellen verbunden sein. Dies würde auch erklären, warum die ektopische Expression von E6 durch eine Hemmung der E7-Expression nicht beeinflusst wird, da das E6-Gen hier unter der Kontrolle eines anderen Promotors als der HPV 18URR steht.

Eine weitere mögliche Erklärung ergibt sich theoretisch aus der Arbeit von Tang und Kollegen, die nach stabiler Transfektion HPV-positiver Zellen mit einer E6-spezifischen siRNA (gegen Transkriptklasse 1) auch eine Reduktion der für E7 kodierenden Transkripte (Transkriptklassen 2 und 3) beobachteten (Tang *et al.*, 2006). Auch dies ist nicht durch eine spezifische siRNA-Aktivität zu erklären, da die Zielsequenz der E6-siRNA in den Transkriptklassen 2 und 3 durch Spleißen entfernt wird. Die Autoren vermuten jedoch, dass die siRNA eine nukleäre, so genannte pre-mRNA angreifen könnte. Selbst wenn so ein Mechanismus existieren sollte, ist es im Falle der hier vorliegenden Studie unwahrscheinlich, dass hieraus die Hemmung der E6-Expression resultiert, da mit vektorbasierten shRNAs gearbeitet wurde. Diese werden im Kern exprimiert, ins Zytoplasma exportiert und dort von Dicer prozessiert (Brummelkamp *et al.*, 2002; Dykxhoorn *et al.*, 2003). Ein Reimport in den Kern ist unwahrscheinlich. Widersprüchlich ist an der Studie von Tang *et al.* ebenfalls, dass eine stabile Transfektion mit einer E6-spezifischen siRNA möglich war, wohingegen eine E6-

spezifische siRNA mit einer anderen Zielsequenz in der Studie von Butz *et al.* effizient Apoptose auslöste (Butz *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006). Dies spricht für die Möglichkeit, dass die Effizienz der in der Studie von Tang *et al.* verwendeten siRNA nicht optimal ist.

Da es bislang nicht möglich war, gezielt die E7-kodierenden Transkripte in Zervixkarzinomzellen zu blockieren, entwickelte die Arbeitsgruppe von DiMaio einen indirekten experimentellen Ansatz, um die endogene E7-Funktion zu untersuchen. Dabei wird die endogene E6/E7-Expression in den Zervixkarzinomzellen durch Einbringen des transkriptionellen Repressors E2 blockiert. Anschließend wird E6 oder E7 ektopisch exprimiert. So resultierte die alleinige Expression von E6, in Abwesenheit von E7, in Seneszenz (DeFilippis *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2003; Johung *et al.*, 2007). Diese Situation entspricht in den vorliegenden Arbeiten einer Hemmung der E7-Expression und resultierte ebenfalls in der Induktion von Seneszenz. Auch dies unterstreicht die Spezifität der HPV18 E7-shRNA. Der Vorteil gegenüber dem System von DiMaio ist, dass in der hier verfolgten Strategie endogene E6 und E7-Spiegel analysiert werden, nicht aber ektopisch exprimierte Proteine. Im Gegensatz zur Seneszenzinduktion nach E7-Hemmung führte eine alleinige E6-Hemmung zur Induktion von Apoptose (Butz *et al.*, 2003; DeFilippis *et al.*, 2003; Yamato *et al.*, 2006). Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Studie das Modell der funktionellen Kooperation der beiden Onkogene, demzufolge E7 das Wachstum HPV-positiver Zellen stimuliert und mit Seneszenz interferiert, wohingegen E6 die durch den Wachstumsstimulus induzierte Apoptose hemmt (Mantovani und Banks, 2001; Munger *et al.*, 2001). Da sowohl die durch E6-Hemmung induzierte Apoptose als auch die durch E7-Hemmung induzierte Seneszenz irreversible Prozesse sind, bietet die Inhibition jedes der beiden Onkogene gleichermaßen die Möglichkeit einer HPV-spezifischen Therapie.

Auch die in den vorliegenden Untersuchungen identifizierten Peptide, die spezifisch an HPV18 E7 binden, könnten eine neue Grundlage für die Entwicklung therapeutischer E7-Inhibitoren bieten. Sie wurden mittels des Hefe Zwei-Hybrid Systems (Yeast Two-Hybrid, Y2H) unter intrazellulären Bedingungen isoliert. Im Gegensatz zu *in vitro* Screening-Methoden, wie dem „Phage Display“, weist das Y2H-Verfahren dabei wichtige Vorteile auf. Als Screening-Methode in Hefen selektioniert es bereits auf Peptide, die ihr Zielprotein in eukaryontischen Zellen binden können, was bedeutet, dass diese unter intrazellulären Bedingungen stabil und korrekt gefaltet sind. In Bindungsstudien mit dem Checkmate-System, einem Zwei-Hybrid-System in Säugerzellen, konnten Peptide identifiziert werden, die auch in humanen Zellen nachweisbar mit dem HPV18 E7-Protein interagierten. Weitere Analysen von sechs Peptiden, die auf dieser Basis ausgewählt wurden, zeigten, dass die

Bindung dieser Peptide hochspezifisch für HVP18 E7 ist. Selbst eng verwandte Proteine, wie die E7-Proteine anderer HPV-Typen, wurden durch die Peptide nicht gebunden.

In den Untersuchungen wurde eine Reihe von Peptiden isoliert, die - auf der Basis der Aktivierung des *URA3*-Markers - mittelstarke bis starke Wechselwirkungen mit dem E7-Protein eingehen. Dies ist hinsichtlich der weit verbreiteten Ansicht interessant, dass lineare Peptide, im Vergleich zu Peptid-Aptameren, typischerweise niedrigere Bindungsaffinitäten aufweisen. Die starke Bindungsaffinität der Peptid-Aptamere liegt dabei vermutlich darin begründet, dass diese durch das Rückgrat in einer Konformation fixiert sind und dadurch effizienter an ihr Zielprotein binden können (Cohen *et al.*, 1998). Allerdings wurde beispielsweise in einer Studie von Fabrizio *et al.* lediglich eine 10-fach höhere Konzentration eines linearen Peptids, das an E2F bindet, benötigt, um die gleiche inhibitorische Aktivität wie ein korrespondierendes Peptid-Aptamer zu erreichen. Die Autoren vermuteten daher, dass das lineare Peptid eine ausgeprägte konformelle Stabilität besitzt (Fabrizio *et al.*, 1999). Auch konnten in unserer Arbeitsgruppe HVP16 E6-bindende lineare Peptide identifiziert werden, die deutliche Bioaktivität aufwiesen (Apoptoseinduktion in HPV-positiven Karzinomzellen; K. Hoppe-Seyler, S. Dymalla *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Dies weist auf die Möglichkeit hin, dass zumindest bestimmte Zielproteine auch effektiv durch Peptide gehemmt werden können, ohne dass diese in einem stabilisierenden Matrixprotein präsentiert werden müssen.

Bislang existiert nur eine Studie, die inhibitorische Peptid-Aptamere gegen das E7-Onkoprotein beschrieb (Nauenburg *et al.*, 2001). Diese induzierten überraschenderweise Apoptose in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen, im Widerspruch zu einer Vielzahl von Studien, die darauf hinweisen, dass E7 pro-apoptotisch wirkt (Demers *et al.*, 1994; Pan und Griep, 1994). Auch für die in der vorliegenden Arbeit isolierten Peptide konnte kein Anhalt für eine pro-apoptotische Aktivität erhalten werden. Vielmehr hemmten drei HPV18 E7-bindende Peptide, Pep1, Pep21 und Pep68 die Proliferation HPV-positiver Zellen. Der genaue Mechanismus dieser Wachstumshemmung muss noch geklärt werden. Checkmate-Analysen ergaben erste Hinweise darauf, dass der Wachstumsarrest durch Pep21 aus einer Interferenz mit der E7-pRb-Bindung resultiert. Zwei weitere Peptide, Pep45 und Pep49, interferierten ebenfalls mit der E7-pRb Bindung, führten jedoch nicht zu einer Hemmung des Wachstums HPV-positiver Zellen. Möglicherweise ist die Interferenz der beiden Peptide mit der E7-pRb-Bindung weniger stark ausgeprägt, obwohl sie im Checkmate-Assay das Signal der E7-pRb-Interaktion stärker reduzierten als Pep21. Analysen im Checkmate-System lassen jedoch keine quantitative Aussage über Bindungsstärken zu, die durch verschiedene Parameter beeinflusst werden können (Expressionsspiegel, Effizienz des Kerntransports, Faltung in Verbindung mit unterschiedlichen Fusionsanteilen etc.). Möglicherweise

interferieren Pep45 und Pep49 mit der E7-pRb-Bindung aber auch über einen anderen Mechanismus als Pep21. Durch weitere *in vitro*-Studien könnte geklärt werden, ob es sich um eine kompetitive Bindung der Peptide an das pRb-Bindemotiv oder um eine allosterische Hemmung der pRb-E7-Bindung handelt.

Umgekehrt führten Pep1 und Pep68 zur Wachstumshemmung HPV-positiver Karzinomzellen, ohne dass im Checkmate-System Hinweis auf eine Interferenz mit der E7-pRb-Bindung gefunden wurde. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass sie im Checkmate-System weniger effizient mit der E7-pRb-Interaktion interferieren können als mit der endogenen E7-pRb-Bindung in HPV-positiven Karzinomzellen. Alternativ könnten sie aber auch eine der weiteren Interaktionen von E7 mit Zellzyklusregulatoren hemmen. Zum Beispiel würde ein Aufheben der p21- oder p27-Inhibition durch E7 zum Wachstumsarrest führen, da p21 und p27 übergeordnete Inhibitoren der Cyclin D, E-, A-abhängigen Kinasen sind (Sherr und Roberts, 1999). Um tieferen Einblick in Peptid-E7-Interaktionen zu bekommen, sollten in zukünftigen Analysen weitere Bindungsstudien mit verschiedenen E7-Mutanten durchgeführt werden. In Struktur-/Funktionsanalysen könnten die Peptid-Bindungsstellen am E7-Protein eingegrenzt werden und mit den biologischen Effekten der Peptide in Bezug gesetzt werden.

Die hier identifizierten Peptide könnten zukünftig als neue Leitstrukturen bei der Entwicklung niedermolekularer E7-Inhibitoren dienen oder selbst in Protein-Therapeutika weiterentwickelt werden (Baines und Colas, 2006). Ein Vorteil der hier isolierten linearen Peptide gegenüber den komplexeren Peptid-Aptameren liegt darin, dass mögliche unerwünschte Wechselwirkungen oder immunogene Effekte durch das Matrixprotein umgangen werden können. Darüber hinaus ist die Synthese kurzer Peptide einfacher und kostengünstiger.

Sowohl der therapeutische Einsatz von Peptiden als auch von siRNAs ist derzeit allerdings noch mit einigen technischen Problemen verbunden. Da sie *in vivo* recht instabil sind, wird durch chemische Modifikationen versucht, die Stabilität zu erhöhen (Fischer, 2003; Behlke, 2006). Auch das effiziente Einbringen in die Zielzellen stellt eine hohe technische Hürde dar. Im Fall der Peptide könnte ein Transmembrantransport durch Fusion an so genannte Proteintransduktionsdomänen (PTD) erfolgen (Derossi *et al.*, 1996; Vives *et al.*, 1997; Schwarze *et al.*, 1999). Hier sind wiederum lineare Peptide durch ihre geringere Größe geeigneter als Peptide-Aptamere, da sie als kleinere Moleküle die Membran leichter passieren sollten. Interessanterweise ist es möglich, in Fusion mit PTDs Moleküle in alle Zellschichten der intakten Haut einschleusen (Rothbard *et al.*, 2000). Dies ist eine Beobachtung, die insbesondere für HPV-assoziierte Läsionen, welche typischerweise Haut

und Schleimhäute betreffen und somit einer topischen Behandlung in der Regel gut zugänglich sind, bedeutsam werden könnte.

Da auch siRNAs aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung *per se* nicht die Zellmembran passieren können, werden zum Einbringen in Säugerzellen ebenfalls Transportsysteme genutzt. Weit verbreitet sind die Transfektion von siRNAs mittels Lipofektion sowie die Anwendung von shRNAs, die von lentiviralen Vektoren exprimiert werden (Sioud und Sorensen, 2003; Sorensen *et al.*, 2003; Bartosch und Cosset, 2004; Amarguoui *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2006). In verschiedenen Mausmodellen konnte für *EZH2* oder E6 als Zielgene gezeigt werden, dass eine intratumorale oder intraperitoneale Injektion von siRNA-Liposomenkomplexen oder lentiviralen Vektoren, die für eine shRNA kodieren, zur Reduktion des Tumorwachstums führen kann (Berezovska *et al.*, 2006; Niu *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass siRNA-Liposomenkomplexe in das Epithel der Vagina und der Ektozervix der Maus gelangen können und bis zu neun Tage die Expression ihrer Zielgene hemmen können (Palliser *et al.*, 2006). Somit ist die Lipofektion von Epithelzellen *in vivo* prinzipiell möglich. Ein alternativer Transfektionsansatz wurde für ein Xenograftmodell mit HPV-positiven SKGII-Zellen getestet. Hier wurde eine E6/E7-siRNA im Komplex mit Atelokollagen angewandt und führte zu reduziertem Tumorwachstum (Fujii *et al.*, 2006). Bei Atelocollagen handelt es sich um ein Spaltprodukt von Collagen, das als eines der ersten Gentransportsysteme genutzt wurde und sich durch eine geringe Immunogenität auszeichnet (Ochiya *et al.*, 2001). Insgesamt konnte mit diesen Ansätzen gezeigt werden, dass eine Anwendung von siRNAs gegen *EZH2* oder die viralen Onkogene *in vivo* prinzipiell möglich ist. Im Vergleich zu Peptid-basierten Therapeutika sind siRNAs wesentlich kostengünstiger in der Synthese.

Klassischerweise führt die Anwendung von siRNAs nur zu einer transienten Hemmung der Genexpression. Ein weiterer, RNA-basierter, neu entdeckter transkriptioneller Mechanismus zur Hemmung der Expression in Säugerzellen ermöglicht unter Umständen eine stabile Hemmung der Genexpression. Das so genannte „Transcriptional Gene Silencing“ (TGS) durch Promotor-spezifische siRNAs kann in Säugerzellen zur Hemmung der Promotoraktivität durch epigenetische Modifikationen führen (Kawasaki und Taira, 2004; Morris *et al.*, 2004; Ting *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006). Solch epigenetische Modifikationen können sogar an Tochterzellen weitergegeben werden (Egger *et al.*, 2004). In den vorliegenden Arbeiten konnten zum ersten Mal Hinweise auf die Existenz eines solchen Mechanismus in HPV-positiven Zellen gefunden werden. So konnten drei Promotor-spezifische siRNAs identifiziert werden, die die Aktivität der HPV18 URR spezifisch reprimierten und somit zu einer Inhibition der E6/E7-Genexpression führten. Der genaue

Mechanismus ist bislang unklar, in ersten Analysen konnte kein Hinweis auf DNA-Methylierung gefunden werden, auch wenn die generierten siRNAs, in Anlehnung an die Studie von Kawasaki und Taira, Zielsequenzen im Bereich von CpG-Motiven besaßen (Kawasaki und Taira, 2004). Die durchgeführte Analyse der DNA-Methylierung durch Restriktionsverdau mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen erlaubt jedoch nur die Analyse einzelner CpG-Motive. Da in der Studie von Kawasaki *et al.* auch eine DNA-Methylierung über die siRNA-Zielsequenz hinaus gefunden wurde (Kawasaki und Taira, 2004), müßte für eine genauere Analyse des Methylierungsstatus der HPV18 URR eine DNA-Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung (Frommer *et al.*, 1992) durchgeführt werden. Auch sind Analysen des Methylierungsstatus der Histone im Bereich der HPV18 URR notwendig, da in zwei Studien die Hemmung der Genexpression mit Histonmodifikationen verbunden war (Morris *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). DNA-Methylierung und Histon-Methylierung können sich vermutlich auch gegenseitig bedingen (Lehnertz *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten identifizierten *EZH2* als ein neues Zielgen für das HPV E7-Onkoprotein und bieten damit neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der HPV-assoziierten Karzinogenese. Zudem sollten die hier generierten HPV18 E7-spezifischen Inhibitoren, die auf Transkript- oder Proteinebene wirksam sind, als neue molekulare Werkzeuge für weitere Funktionsstudien des E7-Proteins nützlich sein. Ihre Fortentwicklung in eine Anwendungsperspektive könnte zukünftig erstmals eine spezifische Therapie HPV-positiver präneoplastischer und neoplastischer Läsionen erlauben.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Geräte

Cerenkow-Counter	Dupont NEN (Bad Homburg)
ELISA-Reader	Thermo Elektron (Karlsruhe)
Fluoreszenzmikroskop Olympus Vanox-T mit Kamera F-View	Olympus (Hamburg)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen)
Horizontale Gelkammer für Agarosegele	Peqlab (Erlangen)
Hybridisierungssofen (Hybrid 2000)	Saur Laborbedarf (Reutlingen)
Kühlzentrifuge Sorvall RC5B	DuPont (Bad Nauenheim)
Luminometer (Lucy1)	Anthos (Krefeld)
Multifuge 3 S-R	Heraeus (Osterode)
NanoDrop	Peqlab (Erlangen)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym (Hess. Oldendorf)
pH-Meter, 761 Calimatic	Knick (Berlin)
Spektralphotometer (GeneQuant)	GE Healthcare Biosciences (München)
Thermoblock	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge (5415R)	Eppendorf (Hamburg)
Transferkammer für Proteine	cti (Idstein)
UV-Bestrahler (Stratalink 2400)	Stratagene (Heidelberg)
Ultrazentrifuge Sorvall OTD 75B	DuPont (Bad Nauenheim)
Vertikale Plattengelapparatur für Acryamidgele	Gibco BRL (Erlangen)
Zellhomogenisator FastPrep 120	MP Biomedicals, Irvine (Kanada)

4.1.2. Materialien

Biogel P30	Bio-Rad (München)
Deckgläschen	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Faltenfilter	Schleicher und Schüll (Dassel)

Glaswolle, silanisiert	Serva (Heidelberg)
Injektionskanülen	Rose (Trier)
Mikrotiter-(96-well)-Platten	BD Clontech (Heidelberg)
Petrischalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Steinbrenner (Wiesenbach)
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Greiner Bio-One, Falcon, BD Clontech
Spitzen	BD Clontech (Heidelberg)
Sterilfilter (0,2 µm)	Milipore (Schwalbach)
Trockenblock	Schleicher und Schüll (Dassel)
Ultrazentrifugenröhrchen (Quickseal)	Beckmann (München)
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein (Bruchsal)
Zellkulturflaschen	Renner (Dannstadt)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zentrifugenbecher (250 ml)	Herolab (Wiesloch)

4.1.3. Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in höchster Reinheits- und Qualitätsstufe von den Firmen Amersham-Bioscience (Freiburg), Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biorad (München), Boehringer Ingelheim (Mannheim), Difco (Detroit, USA), Epicentre (Madison, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Fresenius (Bad Homburg), GERBU (Gaiberg), GibcoBRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

4.1.4. Puffer und Lösungen

CIA 24 Teile Chloroform : 1 Teil Isoamylalkohol

Phenol/CIA 1 Teil Phenol : 1 Teil CIA

10x PBS 1,37 mM NaCl
 27 mM KCl
 43 mM Na₂HPO₄* 7 H₂O
 14 mM KH₂PO₄

1x TE	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	<hr/> pH 8,0	
20x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
	<hr/> pH 7,0	
LB-Medium	1,0%	Bacto-Trypton
	0,5%	Hefe-Extrakt
	1,0%	NaCl
	<hr/> autoklavieren	

4.1.5. Kits

Zur Aufarbeitung und Reinigung von DNA wurden folgende Kits nach Angaben des Herstellers verwendet:

QIAGEN Plasmid Mini, Midi Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick® Gel Extraktions Kit (Qiagen, Hilden)

4.1.6. Enzyme

Verwendete Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: MBI Fermentas (St. Leon-Roth), New England Biolabs (Schwalbach).

Weitere Enzyme:

Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNase A	Roche (Mannheim)
RNase H	Invitrogen (Karlsruhe)
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-Polynukleotidkinase	Invitrogen (Karlsruhe)
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

4.1.7. Standards

SmartLadder (Eurogentec, Seraing, Belgien)

peqGOLD (Peqlab, Erlangen)

4.1.8. Plasmide

p18URRLuc	(Hoppe-Seyler <i>et al.</i> , 1991)
pAct	Promega (Mannheim)
pActin-Gal	Enthält ein 4,3 kb EcoRI-AluI Fragment des humanen β -Actin-Promotors aus dem Klon p14T β -A (Leavitt <i>et al.</i> , 1984) 5' vor dem <i>E. coli</i> β -Galaktosidase-Gen
pActin-Luc	Das gleiche β -Actin Promotorfragment wie Actin-Gal 5' vor dem <i>P. pyralis</i> Luciferase-Gen
pADpep2	Hefeexpressionsbibliothek, die für randomisierte lineare Peptide in Fusion mit der Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne kodiert.
pBind	Promega (Mannheim)
pBluescript II	Stratagene (Heidelberg)
pcDNA3	Invitrogen (Karlsruhe)
pCEP4	Invitrogen (Karlsruhe)
pCL1	BD Clontech (Heidelberg)
pCMV-Gal	(Butz und Hoppe-Seyler, 1993)
pCMVHA-EZH2	(Bracken <i>et al.</i> , 2003)
pCMXpl1	(Umesono <i>et al.</i> , 1991)
pG5Luc	Promega (Mannheim)
pGL3bprhEZH2 (-1095/+448)	(Bracken <i>et al.</i> , 2003)
pGL3bprhEZH2 (-151/+448)	(Bracken <i>et al.</i> , 2003)
pIRESneo	BD Clontech (Heidelberg)
pPC86	(Chevray und Nathans, 1992)
pPC97	(Chevray und Nathans, 1992)
pSEAP	BD Clontech (Heidelberg)
pSuper	(Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002)
pSV2Neo	(Southern und Berg, 1982)
pWPSLuc	(el-Deiry <i>et al.</i> , 1993)
RC/CMV	Invitrogen (Karlsruhe)

4.1.9. Oligonukleotide

Primer	Sequenz	T _m
18E6*for2	5´- AGA CAG TAT ACC CCA TGC TGC -3´	64°C
18E6*rev1	5´- GCA CTG GCC TCT ATA GTG CC -3´	64°C
18E7for4	5´- TAT TGG AAC TTA CAG AGG TGC C -3´	64°C
GAPDH for	5´- GAA GGT GAA GGT CGG AGT -3´	56°C
GAPDH rev	5´- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3´	58°C
P105for	5´- CCT GGT ATT AGT CAT TTT CCT -3´	58°C
P105rev	5´- TAT TGT GGT GTG TTT CTC ACA T -3´	60°C

4.1.10. siRNAs

Name	Zielsequenz	
si16E6	5´-UACAACAAACCGUUGUGUG-3´	(Butz <i>et al.</i> , 2003)
si16E6/E7	5´-UACAACAAACCGUUGUGUG -3´	(Kuner <i>et al.</i> , 2007)
si18E6	5´-CUAACUAACACUGGGUUAU-3´	(Butz <i>et al.</i> , 2003)
si18E6/E7	5´-CCACAACGUCACACAAUGU-3´	(Kuner <i>et al.</i> , 2007)
siControl	5´-UAGCGACUAAACACAUCAA-3´	Dharmacon (Lafayette)
siEZH2	5´-AAGACTCTGAATGCAGTTGCT-3´	(Bracken <i>et al.</i> , 2003)

4.1.11. Hybridisierungssonden

GAPDH	1,4 kb Fragment der GAPDH cDNA (Fort <i>et al.</i> , 1985)
HPV18 E6/E7	Nukleotide 416-611 HPV18 E6/E7 cDNA

4.1.12. Antikörper

anti-16E7	Dr. Martin Müller (DKFZ, Heidelberg)
anti-18E6	Prof. Dr. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg)
anti-18E7 (C)	Prof. Dr. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg)
anti-Cyclin D1 (DCS6)	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-Cyclin E (HE12)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-EZH2 (AC-22)	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-p105Rb (G3-245)	BD Pharmingen (San Diego, USA)

anti-p16-INK4a (DCS50.2)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
anti-p21 ^{WAF-1} (OP64)	Calbiochem (Schwalbach)
anti-p53 (DO-1)	BD Pharmingen (San Diego, USA)
anti-Tubulin (CP06)	Calbiochem (Schwalbach)
anti-Huhn	Promega (Mannheim)
anti-Kaninchen	Promega (Mannheim)
anti-Maus	Promega (Mannheim)
anti-Ziege	Promega (Mannheim)

4.1.13. Bakterienstamm

E. coli TG2

Hefestamm

KF1 (MATa trp1-901leu2-3,112 his3-200 gal4D gal80D LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ SPAL10-URA3) (Butz *et al.*, 2000)

4.1.14. Zelllinien

CaSki	Zervixkarzinom, HPV16-positiv
SiHa	Zervixkarzinom, HPV16-positiv
HeLa	Zervixkarzinom, HPV18-positiv
C33a	Zervixkarzinom, HPV-negativ
H1299	Bronchialkarzinom
MCF-7	Mammakarzinom
U2OS	Osteosarkom

4.1.15. Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
OptiMEM Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA	Gibco BRL (Eggenstein)

4.2. Methoden

4.2.1. Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1. *Transformation*

Die Bakterien-Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 20-100 ng DNA zu 100 µl kompetenten Bakterien gegeben. Es wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 45 Sekunden bei 42°C und wiederum kurz auf Eis. Nach Zugabe von 800 µl LB Medium wurde für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss wurden 100 µl des Transformationansatzes auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.1.2. *Aufarbeitung von Plasmid-DNA*

Die Aufarbeitung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Kleine DNA-Mengen wurden unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Miniprep oder Midiprep Kits nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

Die Aufarbeitung größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse mit anschließender CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation. Hierzu wurden Transformationsansätze über Nacht in 250 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C wurde die pelletierten Bakterien in 10 ml kalter Lösung I resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 20 ml Lösung II, im Anschluss wurde durch Zugabe von 15 ml Lösung III neutralisiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 4500 rpm und 4°C wurde mit 20 ml Isopropanol für 30 Minuten auf Eis gefällt und erneut für 25 Minuten bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml TE-Puffer aufgenommen. Die enthaltene RNA wurde durch Zugabe von 4 ml 5 M LiCl, Inkubation für 30 Minuten auf Eis und anschließendes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4500 rpm und 4°C gefällt. Die DNA im Überstand wurde mit 16 ml Ethanol für 1 Stunde bei 4°C und Zentrifugation für 25 Minuten bei 4500 rpm und 4°C gefällt und im Anschluss in 4 ml 1x TE-Puffer aufgenommen.

Für die Dichtegradienten-Zentrifugation wurden 4,4 g CsCl und 100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugefügt, die Lösung in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte für 16 h bei 48.000 rpm und 20°C unter Vakuum. Zur weiteren Reinigung erfolgte eine zweite Zentrifugation der Plasmid-DNA unter denselben Bedingungen. Im Anschluss wurde das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit wassergesättigtem Butanol entfernt und die DNA durch Zugabe von ca. 30 ml Ethanol, Inkubation für 1 Stunde bei 4°C und Zentrifugation für 25 Minuten bei 4500 rpm und 4°C gefällt. Die DNA wurde in 4 ml TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe

von 160 µl einer 5 M NaCl-Lösung und 8 ml Ethanol erneut gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 200 – 500 µl 1x TE-Puffer aufgenommen.

Lösung I	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	10 mM	EDTA
Lösung II	1%	SDS
	0,2 M	NaOH
Lösung III	3 M	Kaliumacetat
	11,5%	Eisessig
CsCl-Lösung	44 g	CsCl
	41 ml	TE
	1 ml	Ethidiumbromid (10 mg/ml)

4.2.1.3. Klonierung von *pSuper*-Konstrukten zur Expression von *shRNAs*

Der Vektor *pSuper* exprimiert *shRNAs* unter Kontrolle des H1 RNA-pol III-Promotors (Brummelkamp *et al.*, 2002). Diese können nach Export ins Zytoplasma von dem Enzym Dicer zu funktionellen *siRNAs* prozessiert werden.

Es wurden Oligonukleotide folgender Struktur synthetisiert:

sense:

5'- GATCCCC – Zielsequenz – TTCAAGAGA – Zielsequenz (invers) – TTTTGGAAA – 3'

antisense:

5'-AGCTTTTCCA AAAA – Zielsequenz – TCTCTTGAA – Zielsequenz (invers) – GGG-3'

Zur Hybridisierung der „sense“- und „antisense“-Oligonukleotide wurden jeweils 5 µg DNA und 10 µl 5x Annealing-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl H₂O bei 95°C für 4 Minuten erhitzt. Dann wurde für weitere 10 Minuten bei 70°C inkubiert und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Phosphorylierung erfolgte nach folgendem Ansatz für 30 Minuten bei 37°C:

hybridisierte Oligonukleotide	2 µl
T4-Polynukleotidkinase PNK (10 U/µL)	1 µl
10x T4-PNK-Puffer	1 µl
1 mM ATP	1 µl
ad 10 µl H ₂ O	

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde im Anschluss für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Oligonukleotide wurden über die Schnittstellen Bgl III und Hind III in die „Multiple Cloning Site“ des pSuper-Vektors kloniert.

Annealing-Puffer 500 mM Kaliumacetat
 150 mM HEPES-KOH, pH 7,4
 10 mM Magnesiumacetat

4.2.1.4. DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen

Zur Extraktion von DNA aus eukaryotischen Zellen wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS/2mM EDTA gewaschen und in 1x Lysepuffer in PBS/2 mM EDTA lysiert. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 20 mg/ml wurde über Nacht bei 55°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 1 Volumen Phenol/CIA versetzt, für 30 Minuten auf einem Drehschüttler (Scientific Industries, Bohemia, USA) rotiert und für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen CIA versetzt und erneut gemischt und zentrifugiert. Zur wässrigen Phase wurden 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung und zwei Volumen Ethanol gegeben und für 30 Minuten bei 5000 rpm und 4°C gefällt. Im Anschluss wurde das Pellet nochmals mit etwas Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 40-400 µl TE aufgenommen.

3x Lysepuffer 2 mM EDTA
 20 mM Tris, pH 8,5
 3% (v/v) Sarkosyl

4.2.1.5. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte nach der „Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform“ (AGPC)-Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987). Die Zellen wurden in 6 cm/10 cm Kulturschalen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml/2 ml Lösung D lysiert. Das Lysat wurde in ein Falcon-Gefäß überführt, mit 1/10 Volumen einer 2 M Natriumacetatlösung (pH 4,0),

1 Volumen Tris-gepuffertem Phenol und 2/10 Volumen CIA versetzt und gut vermischt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurde für 30 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zur Phasentrennung zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation wurde die gefällte RNA sedimentiert, in 600 µl Lösung D resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Isopropanol wurde erneut für 1 Stunde bei -20°C inkubiert und für 25 Minuten bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, durch Zentrifugation sedimentiert und dann in 20-50 µl sterilem H₂O aufgenommen.

Lösung D 4,0 M Guanidinium-Thiocyanat
25 mM Natriumcitrat
0,5% Sarkosyl
0,1 M 2-Mercaptoethanol

4.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Es wurden 1-2,5%ige Agarosegele hergestellt, indem Agarose in Elektrophorese-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt wurde. Die Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die DNA-Fragmente wurden bei 70-100 V in Elektrophorese-Puffer aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid und Geldokumentationssystem sichtbar gemacht und dokumentiert.

6x-DNA-Ladepuffer 0,25% (w/v) Bromphenolblau
0,25% (w/v) Xylencyanol
30% (w/v) Glyzerol

Elektrophorese-Puffer 40 mM Tris
5 mM Natriumacetat
1 mM EDTA, pH 7,8

4.2.1.7. Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Es wurden 1%ige denaturierende Agarosegele hergestellt, indem Agarose in 1x MOPS-Puffer durch Erhitzen gelöst wurde und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt wurde. Die Proben wurden mit RNA-Ladepuffer versetzt und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Die RNA wurden bei 50-60 V in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid und Geldokumentationssystem sichtbar gemacht und dokumentiert.

10x MOPS	200 mM	MOPS
	10 mM	EDTA
	50 mM	Natriumacetat
	pH 7,0 mit NaOH eingestellt, dunkel lagern	
RNA-Ladepuffer	50% (v/v)	Formamid
	2,2 M	Formaldehyd
	1% (v/v)	Ficoll 400
	0,2% (w/v)	Bromphenolblau
	in 1x MOPS-Puffer	

4.2.1.8. RNA-Transfer auf eine Nylon-Membran (Northernblot)

Der Transfer von RNA wurde mittels der Kapillarmethode nach Southern durchgeführt (Southern, 1975). Hierzu wurde das Agarose-Gel für 10 Minuten in 10x SSC inkubiert. Eine Nylonmembran (HybondN+, Amersham Biosciences) wurde kurz in H₂O getaucht und dann ebenfalls in 10x SSC gelegt. Für den Transfer wurden ein Stapel Papiertücher, ein trockenes Whatman-Papier, ein in 10x SSC-Puffer getränktes Whatman-Papier, die Nylon-Membran und das Gel luftblasenfrei übereinander geschichtet. Der Aufbau wurde mit Frischhaltefolie umhüllt, mit einer Glasplatte bedeckt und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran zum Entsalzen in 2x SSC geschwenkt und die RNA nach dem Trocknen durch Bestrahlen mit UV-Licht (254 nm, UV-Bestrahler Stratalink 2400, Stratagene) fixiert. Abschließend wurde die Membran bei 80°C für 2 Stunden inkubiert.

4.2.1.9. Radioaktive Markierung und Reinigung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte nach der „Random-Priming“-Methode unter Verwendung des Megaprime™ DNA Labelling Systems (GE Healthcare Biosciences, München). Hierbei hybridisieren randomisierte Primer an ein denaturiertes DNA-Template. Die Primer-Template-Komplexe sind Substrat für das Klenow-Fragment der DNA Polymerase I. Durch Zugabe radioaktiv markierter Nukleotide kann die DNA während der Polymerase-Reaktion radioaktiv markiert werden.

Es wurden 50-100 ng des gereinigten DNA-Fragmentes oder des EZH2-Expressionsvektors pCMVHA-EZH2 in einem Endvolumen von 28 µl H₂O mit 5 µl „Random-Prime“ Mischung versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 10 µl 5x „Labelling Puffer“ mit dATP, dGTP und dTTP sowie 5 µl [α -³²P]-dCTP (GE Healthcare Biosciences, München)

und 2 µl DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 75 µl 1x TNE und 20 µl 2x TNE/BPB beendet und die radioaktiv markierte Sonde über eine Biogel P30-Säule gereinigt. Diese wurde hergestellt, indem Biogel P30 zunächst mit 1x TNE äquilibriert wurde. Das Reaktionsgemisch wurde auf die Säule aufgetragen und die markierte DNA durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 1200 rpm eluiert. Die Aktivität der radioaktiv markierten Sonde wurde durch Vermessen eines 2 µl Aliquots im Cerenkow-Counters bestimmt.

1x TNE	10 mM	EDTA, pH 8,0
	100 mM	NaCl
	0,2% (w/v)	SDS
	<hr/>	
	in 1x TE-Puffer, pH 8,0	

2x TNE/BPB	2x	TNE
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau (BPB)

Biogel P30-Puffer	5 mM	NaCl
	0,2% (w/v)	SDS
	<hr/>	
	in 1x TE-Puffer, pH 8,0	

4.2.1.10. Hybridisierung von RNA-Filtern mit DNA-Sonden

Zur Hybridisierung von RNA-Filtern mit radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden die Filter zunächst kurz mit H₂O benetzt und dann zur Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 5-10 ml Hybridisierungslösung für mindestens 30 Minuten bei 68°C inkubiert (Vorhybridisierung). Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde durch Zugabe von NaOH in einer Endkonzentration von 0,2 M für 10 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert und dann zu der Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Membran wurde im Anschluss dreimal für 15 Minuten in 2x SSC/0,1% SDS bei 68°C unter Schütteln gewaschen, auf Whatman-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt. Zur Exposition wurden Röntgenfilme aufgelegt.

Hybridisierungslösung	50 mM	Natriumphosphat
	1%	SDS
	1x	Denhardts-Lösung
	5x	SSC
	0,1 mg/ml	tRNA

50x Denhardts-Lösung	1%	BSA
	1%	Ficoll 400
	1%	Polyvinylpyrrolidon 25
<hr/>		
	Lagerung bei -20°C	

4.2.1.11. Reverse Transkription

Zur Synthese von cDNA aus RNA wurde die „Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction“ (RT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde das SuperScriptTMIII First Strand Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zunächst wurden 1-3 µg RNA in einem Endvolumen von 8 µl mit 1 µl Oligo-dT-Primer und 1 µl dNTPs (40 mM) versetzt und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, dann für mindestens 1 Minute auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl 10x RT-Puffer, 2 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl SuperScriptTMIII Reverse Transkriptase (200 U/µl) erfolgte die Reaktion für eine Stunde bei 50°C. Im Anschluss wurde für 10 Minuten bei 85°C denaturiert. Zum Abbau verbleibender RNA wurde für 10 Minuten bei 37°C mit 1 µl RNase H (2 U/µL) inkubiert. Für die anschließende PCR-Reaktion wurde 1 µl der Reaktionsmischung eingesetzt.

4.2.1.12. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Amplifikation von cDNA im Anschluss an die Reverse Transkription und die PCR-Reaktion zur Methylierungsanalyse der HPV18 URR erfolgten nach folgendem Ansatz:

Template aus RT-Reaktion	1 µl
oder genomische DNA	1 µg
Sense-Primer (25 pmol/µl)	1 µl
Antisense-Primer (25 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (40mM)	0,5 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
	<hr/>
	ad 25 µl H ₂ O

PCR-Programm

1. Primärdenaturierung	1-3 min	94-95°C
2. Denaturierung	30-60 sek	94-95°C
3. Hybridisierung	30-60 sek	T _m – 2°C
4. Elongation	30-60 sek	72°C
Punkt 2 -4 für 18-28 Zyklen		
5. Terminale Elongation	5 Minuten	72°C

4.2.2. Proteinbiochemische Methoden

4.2.2.1. *Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen*

Zur Extraktion von Proteinen aus humanen Zellen wurden die Zellen entweder in 10 cm Kulturschalen (Calciumphosphat-Transfektion) oder in 6 cm Kulturschalen (Oligofectamin-Transfektion) ausplattiert. Die Proteinextraktion erfolgte 48-96 h nach Transfektion. Um eine Degradation der Proteine während der Aufarbeitung zu verhindern, wurden dem Lysepuffer Proteinase-Inhibitoren zugefügt und während der gesamten Extraktion auf Eis gearbeitet.

Je nach Zelldichte und Zelllinie wurden die Zellen durch Schaben oder Trypsinierung geerntet. Vor dem Schaben wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30 Sekunden bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 20-150 µl kaltem Lysepuffer resuspendiert. Im Anschluss wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit 6x Probenpuffer versetzt. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

Lysepuffer 1 ml RIPA-Puffer
 10 µl Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
 25 µl Pefablock (Biomol, Hamburg)

RIPA-Puffer 10 mM Tris, pH 7,5
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1% NP-40
 0,5% Na-Deoxycholat
 0,1% SDS

4.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Diese Methode basiert auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie-Blau-Lösung durch Bildung von Farbstoff-Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschiebt.

Zur Messung wurde Bio-Rad-Reagenz (Bio-Rad Laboratories, München) mit Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt, jeweils 1 µl Proteinextrakt zu 1 ml Reagenzlösung in einer 1 cm Plastikkuvette gegeben und durch Vortexen gemischt. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Referenz wurde die gleiche Menge des Lysepuffers vermessen.

4.2.2.3. SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Die Zusammensetzung der verwendeten Gele war wie folgt (für jeweils 2 Minigele):

	Trenngel 8%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%	Sammelgel 5%
30% Polyacrylamid	2,7 ml	4,2 ml	5 ml	830 µl
Trenngelpuffer	1,2 ml	1,2 ml	1,2 ml	–
Sammelgelpuffer	-	-	-	620 µl
H ₂ O	6 ml	4,5 ml	3,6 ml	3,47 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	100 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	5 µl

Mit Ethanol gereinigte Glasplatten (8 x 12 cm) wurden mit Abstandhaltern und Halteklammern zusammengesetzt und mit 1%iger Agaroselösung abgedichtet. Zunächst wurde das Trenngel wie oben angegeben gegossen und mit 500 µl Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation für 15-20 Minuten wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel wie oben angegeben gegossen. Hierzu wurde die Sammelgellösung bis zum oberen Glasrand luftblasenfrei eingegossen und ein Kamm eingesetzt. Die Polymerisation erfolgte für 10-15 Minuten. Proteinproben wurden mit 6x Probenpuffer für 5 Minuten zur Denaturierung bei 95°C aufgekocht und in die Taschen des Polyacrylamidgeles eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 60-80 V in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer.

Trenngelpuffer	3 M	Tris, pH 8,8
	0,4%	SDS
Sammelgelpuffer	0,47 M	Tris, pH 6,7
10x Elektrophoresepuffer (EP)	250 mM	Tris-Base, pH 8,6
	1,92 M	Glycin
Laufpuffer	70 ml	10x EP
	7 ml	10% SDS
	<hr/> ad 700 ml H ₂ O	
6x Probenpuffer	7,5 ml	Sammelgelpuffer
	0,2 g	SDS
	600 µl	Mercaptoethanol
	36 mg	Bromphenolblau
	1,6 ml	Glycerin
	<hr/> ad 10 ml H ₂ O	

4.2.2.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Westernblot)

Proteine wurden nach SDS-PAGE im Halbtrocken-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Milipore) transferiert. Hierzu wurden das Trenngel und 2 x 4 Whatmann-Papiere pro Gel für 10 Minuten in EMBL-Puffer äquilibriert. Die Membran wurde kurz durch Methanol gezogen, für einige Minuten in Wasser geschwenkt und dann ebenfalls für einige Minuten in EMBL-Puffer äquilibriert.

Der Aufbau in der Transferkammer erfolgte nach folgender Anordnung (von der Anode zur Kathode):

- 4 Whatmann-Papiere
- PVDF-Membran
- SDS-Polyacrylamidgel
- 4 Whatman-Papiere

Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 90-180 mA und maximaler Spannung.

EMBL-Puffer	40 mM	Tris, pH 9,2
	39 mM	Glycin
	1,3 mM	SDS
	20% (v/v)	Methanol

4.2.2.5. Antikörperbehandlung des Westernblots

Auf einer Membran fixierte Proteine wurden nach dem Westernblot durch Antikörperbehandlung detektiert. Die Membran wurde nach dem Transfer über Nacht bei 4°C in Blocklösung geschwenkt. Im Anschluss wurde zweimal mit PBST gewaschen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper in PBST inkubiert. Es wurde für 10 Minuten mit Blocklösung blockiert und 4 x 5 Minuten mit PBST gewaschen. Danach wurde eine Stunde mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Wiederum wurde für 10 Minuten mit Blocklösung blockiert und 4 x 5 Minuten mit PBST gewaschen. Der Proteinnachweis wurde mittels „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) durchgeführt.

Blocklösung	1x	PBS
	0,2% (v/v)	Tween
	5% (w/v)	Magermilchpulver

PBST	1x	PBS
	0,2% (v/v)	Tween

4.2.2.6. Nachweis durch „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL)

Beim Nachweis von Proteinen durch ECL führt die Oxidation von Luminol durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase HRP) in Anwesenheit von H₂O₂ unter alkalischen Bedingungen zur Emission von Licht. Die Reaktion wird in Anwesenheit von chemischen Verstärkern durchgeführt.

Für die Reaktion wurde die Membran nach Immunprinting und Waschen kurz auf Whatman-Papier getrocknet und dann mit einer 1:1 Mischung der ECL-Lösungen 1 und 2 (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) benetzt und für eine Minute inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran auf Whatman-Papier getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und Röntgenfilme zur Exposition aufgelegt.

4.2.2.7. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten aus Normalgewebe, Dysplasien und Tumorgewebe der Zervix wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Dürst in Jena durchgeführt. Hierzu wurde der monoklonale Antikörper anti-EZH2-11 (BD Biosciences, Heidelberg) aus der Maus verwendet.

4.2.3. Zellbiologische Methoden

4.2.3.1. Kultivierung adhäsiv wachsender permanenter Zelllinien

Humane adhäsiv wachsende Zelllinien wurden im Inkubator (Heraeus Instruments Begasungsbrutschrank 6000) in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Sobald die Zellen konfluent in Gewebekulturflaschen (75 cm² bzw. 175 cm²) gewachsen waren, wurden sie in neue Kulturflaschen umgesetzt. Hierzu wurden das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit einigen Millilitern Trypsin/EDTA gewaschen, danach 1-2 ml Trypsin/EDTA zugegeben und für 5 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Kulturmedium abgebrochen, die Zellen wurden resuspendiert und ein Teil der Zellen wurde weiterkultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage passagiert.

Kulturmedium 10% fötales Kälberserum (FKS)
50 U/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin
in DMEM-Medium (Sigma-Aldrich)

4.2.3.2. Kryokonservieren und Auftauen von Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden humane Zellen kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert und für 3 Minuten bei 1250 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und die Suspension à 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden zunächst in einem Einfriergefäß mit Isopropanol (Nalgene 1°C Freezing Container) für einige Tage bei -70°C aufbewahrt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 5-10 ml Kulturmedium aufgenommen und für 3 Minuten bei 1250 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

Einfriermedium 10% DMSO in Kulturmedium

4.2.3.3. *Transfektion humaner Zellen mit synthetischen siRNAs*

Die Transfektion humaner Zellen mit synthetischen siRNAs erfolgte durch Lipofektion mit dem Oligofectamin ReagenzTM (Invitrogen). Die zu transfizierenden Zellen wurden mit 30-50%iger Konfluenz ausgesät. Die Transfektion erfolgte in serumfreiem Opti-MEM Medium. Zur Ausbildung der Lipidvesikel wurden je nach Zelllinie 6-8 µl Oligofectamin mit Opti-MEM Medium auf 30 µl Endvolumen verdünnt und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Synthetische siRNAs mit einer Endkonzentration von 50-200 nM wurden mit Opti-MEM Medium auf ein Endvolumen von 370 µl verdünnt. Die siRNA-Lösung wurde mit der Oligofectaminlösung vermischt, für weitere 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das Gemisch im Anschluss auf die Zellen gegeben. Vier Stunden nach der Transfektion wurde der FKS-Gehalt durch Zugabe von 1 ml DMEM Medium mit 30% FKS supplementiert. Zur Erfassung des 96-Stunden Phänotyps in Westernblot-Analysen nach siRNA-Behandlung wurde 72 Stunden nach der ersten Transfektion erneut unter denselben Bedingungen transfiziert.

4.2.3.4. *Calciumphosphat-Transfektion*

Die Transfektion humaner Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte durch Calciumphosphat-Präzipitation nach der Methode von Chen und Okayama (Chen und Okayama, 1987). Die zu transfizierenden Zellen wurden mit 20-30%iger Konfluenz ausgesät. Bei der Transfektion von Zellen in 6 cm Kulturschalen wurden 6 µg DNA transfiziert, bei der Transfektion von Zellen in 10 cm Schalen 20 µg DNA. Die DNA wurde mit 150 µl (6 cm Schalen) bzw. 500 µL (10 cm Schalen) einer 0,25 M CaCl₂-Lösung vermischt, dann wurden 150 µL bzw. entsprechend 500 µL 2x BES zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung direkt ins Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden für 16-18 Stunden bei 35°C und 3% CO₂ kultiviert, dann wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit zusatzfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5-3 ml Kulturmedium für weitere 24-48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2x BES 50 mM BES [N,N'-bis(Hydroxyethyl)-2-Aminoethan-Sulfonsäure
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
pH 6,95 mit NaOH eingestellt, sterilfiltriert

4.2.3.5. *Generierung stabil transfizierter Zellen*

Zur Generierung stabil transfizierter Zellen wurden Expressionsplasmide mit dem pSV2neo-Resistenzplasmid kotransfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Transfektion passagiert, und ab dem dritten Tag nach Transfektion unter Zugabe von 1000-1200 µg/ml G418 kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen, die kein Resistenzplasmid enthielten, mit G418 selektioniert (Sterbekontrolle). Sobald in der Sterbekontrolle alle Zellen abgestorben waren, wurden die stabilen Zellen vereint und kryokonserviert.

4.2.3.6. *Zellzyklus-Analyse mittels Durchflußzytometrie*

Zur Zellzyklus-Analyse wurde der DNA-Gehalt von Zellen mit Hilfe eines FACS-Gerätes (Fluorescence Activated Cell Sorter) gemessen. Hierzu werden Zellen mit dem DNA-interkalierendem, fluoreszierenden Farbstoff Propidiumiodid gefärbt. Passieren diese Zellen in Lösung einen oder mehrere Laserstrahlen, wird der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenz wird mittels eines Photomultipliers gemessen. Da die Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist, kann durch die Messung bestimmt werden, in welcher Phase des Zellzyklus die Zelle sich zum Zeitpunkt der Fixierung befand oder ob das Kernmaterial bereits durch Apoptose fragmentiert wurde.

Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Zellen in 6 cm Kulturschalen entweder mit Calciumphosphat- oder Oligofectamin-Methode transfiziert. Die Zellen wurden 48-72 Stunden nach Transfektion trypsinisiert und dann fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Alternativ wurde nach Trypsinierung eine Zelllyse durchgeführt und die Kerne mit Propidiumiodid gefärbt.

Methode A: Fixieren und Färben

Zum Fixieren wurden die Zellen nach dem Trypsinieren zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert und unter leichtem Vortexen 5 ml kaltes, absolutes Ethanol zugegeben. Die Fixierung erfolgte über Nacht, dann wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation sedimentiert, das Ethanol entfernt und zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 870 µl PBS aufgenommen mit 30 µl PI-Stocklösung und 100 µl RNase A-Stocklösung versetzt. Die Färbung der Zellen erfolgt für 30 Minuten bei 37°C.

Methode B: Zelllyse und Kernfärbung:

Für die Kernfärbung wurden die Zellen ebenfalls wie oben beschrieben trypsinisiert und nach der Zentrifugation in 200 µl kaltem Citratpuffer aufgenommen. Es wurden 800 µl kalte DNA Farbe-/Lyse-Lösung und 20 µl RNase A-Stocklösung zugegeben.

Die gefärbten Zellen wurden zur Vereinzelnung der Zellen durch Gaze filtriert und dann bis zur Messung auf Eis und mit Alufolie abgedunkelt aufbewahrt.

Die Messung folgte mit einem FACS Calibur Gerät (BD Biosciences, Heidelberg). Es wurden pro Ansatz 15.000 Zellen vermessen. Zur Analyse wurde die CellQuest Pro Software verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels der FlowJo Software (Tree Star Inc., Ashland, USA) nach dem Dean-Jett-Fox Model.

PI-Stocklösung	7 mg/ml Propidiumiodid in 0,18 M Tris, pH 7,5	
RNase A-Stocklösung	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl vor dem ersten Verwenden für 15 Minuten auf 99°C erhitzt	
Citratpuffer	0,25 M	Saccharose
	40 mM	Natriumcitrat
	<hr/> pH 7,6	
DNA Färbe-/Lyse-Lösung	20 µg/ml	Propidiumiodid
	0,5%	NP-40
	0,5 mM	EDTA
	<hr/> in PBS, pH 7,2	

4.2.3.7. Wachstums-Assay (Colony Formation Assay)

Im „Colony Formation Assay“ (CFA) wurde der Einfluss von Peptiden oder shRNAs auf das Wachstum stabil transfizierter Zellen untersucht (Gorman *et al.*, 1983). Dazu wurden pSuper-Konstrukte mit dem pSV2neo Plasmid kotransfiziert und eine Selektion der Zellen auf Neomycin-Resistenz durchgeführt. Zur Expression der HPV18 E7-bindenden Peptide wurden pCEP4-Vektoren, die das Hygromycin B-Resistenzgen tragen, als Expressionsvektoren eingesetzt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde das pSEAP-Plasmid kotransfiziert, das für das humane Protein „Sekernierte Alkalische Phosphatase (SEAP)“ kodiert.

Für den CFA wurden Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät und mittels Calciumphosphat-Methode transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mittels SEAP-Assay bestimmt. Bei vergleichbarer Transfektionseffizienz wurden die Zellen trypsiniert und in unterschiedlichen Verdünnungen in neue Zellkulturschalen überführt. Drei Tage nach Transfektion wurde dem Kulturmedium G418 bzw. Hygromycin B zugefügt. Die optimale Konzentration an Antibiotikum wurde zuvor für die entsprechenden Zelllinien

bestimmt. Die Zellen wurden bis zu 14 Tage unter Selektionsbedingungen kultiviert. Eine Kontrolle, die kein Resistenzplasmid enthielt (Sterbekontrolle), wurde kultiviert, um zu prüfen, ob tatsächlich nur stabil transfizierte Zellen wachsen. Sobald in der Sterbekontrolle alle Zellen durch die Zugabe des Antibiotikums abgestorben waren, wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und mit Kristallviolettlösung für 5-10 Minuten fixiert und gefärbt.

Kristallviolett-Lösung	12 mM	Kristallviolett
	29 mM	NaCl
	3,7% (v/v)	Formaldehyd
	22,3% (v/v)	Ethanol

4.2.3.8. SEAP-Assay

Die Konzentration des Enzyms SEAP wird indirekt über dessen Phosphatase-Aktivität gemessen, indem der Umsatz von para-Nitrophenolphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol (pNP) photometrisch bestimmt wird.

Für den SEAP-Assay wurden an Tag 2 nach Transfektion 500 µl Zellkulturüberstand pro Schale abgenommen und für 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. In einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden 30-100 µl des Überstandes mit 2x SEAP-Puffer auf 200 µl aufgefüllt und jeweils 20 µl SEAP-Substratmix zugegeben. Die Proben wurden bis zum Farbumschlag inkubiert und dann im ELISA-Reader bei 405 nm vermessen. Als Basiswert wurde der Zellkulturüberstand der Sterbekontrolle vermessen, die nur mit dem Vektor pBluescript transfiziert worden war.

2x SEAP-Puffer	2 M	Diethanolamin, pH 9,8
	1 mM	MgCl ₂
	20 mM	L-Homoarginin
10x SEAP-Substrat	1 g Sigma 104 Phosphatasesubstrat in 3,2 ml 1x SEAP-Puffer	
SEAP-Substratmix	900 µl	2x SEAP-Puffer
	200 µl	SEAP-Substrat
	900 µl	H ₂ O

4.2.3.9. Reporter-Gen-Analysen

Durch Reporter-Gen-Analysen kann die Aktivität transkriptioneller Kontrollregionen *in vivo* bestimmt werden. Hierfür wird die Aktivität eines Reportergens, das der transkriptionellen Kontrollregion untersteht, gemessen. Die Reporter-Gen-Aktivität korreliert mit der Transkriptionsaktivität der regulatorischen Sequenz. Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte enthielten das *Luciferase*-Reporter-Gen aus *P. pyralis* (de Wet *et al.*, 1987). Weiterhin kann der Einfluss von Faktoren, die die Aktivität der Kontrollregion beeinflussen, untersucht werden.

Um den Einfluss des E6- und E7-Proteins auf die Aktivität des EZH2-Promotors zu bestimmen wurden die Reporter-Gen-Konstrukte pGI3bprhEZH2 (-1095/+448) und pGI3bprhEZH2 (-151/+448) verwendet (Bracken *et al.*, 2003). Weiterhin wurde der Einfluss von siRNAs auf die Aktivität der HPV18 URR untersucht.

Für Reporter-Gen-Analysen wurden Zellen entweder mittels Calciumphosphat- oder Oligofectamin-Methode transfiziert. Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurde ein β -Galaktosidase-Referenzplasmid kotransfiziert. Bei Transfektion mit synthetischen siRNAs wurde eine Proteinbestimmung zum Abgleich durchgeführt. Die Zellen wurden 48-72 Stunden nach Transfektion lysiert und die *Luciferase*-Aktivitäten sowie ggf. die β -Galaktosidase-Aktivitäten bestimmt.

4.2.3.10. CheckMate-Bindungsassay

Die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen erfolgte mittels des „CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid“-Systems (Promega, Mannheim). Hier wird das Prinzip des Hefe Zwei-Hybrid-Systems angewendet und die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (pBind-Vektor) oder der DNA-Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus Typ 1 VP16 Proteins exprimiert (pAct-Vektor). Durch eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine kann das pG5Luc-Reporterplasmid aktiviert werden, welches das *Luciferase*-Gen unter der Kontrolle eines Promotors mit 5 GAL4-Bindungsstellen besitzt. Die Checkmate-Analysen wurden nach dem gleichen Schema wie die Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Die Messung der *Luciferase*-Aktivität erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

4.2.3.11. Messung der *Luciferase*-Aktivität in eukaryotischen Zellextrakten

Die Herstellung von Zellextrakten zur Messung der *Luciferase*-Aktivität erfolgte nach der Methode von Brasier (Brasier *et al.*, 1989). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit

kaltem PBS wurden diese mit 200 µl kaltem Triton-Lysepuffer lysiert und mit einem Gummischaber abgeschabt. Das Lysat wurde für 3 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden 30 µl des Lysats in eine 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben.

Bei der Luciferase-Reaktion katalysiert die Luciferase die ATP-abhängige Oxidation des Substrates Luciferin. Hierbei wird Licht der Wellenlänge 562 nm emittiert, dessen Menge bei Substrat-Überschuss proportional zur Luciferase-Konzentration im Ansatz ist. Die Messungen der Enzymaktivität wurden im linearen Bereich durchgeführt.

Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität erfolgte in einem Luminometer. Dieses injiziert automatisch 150 µl Luciferase-Reaktionspuffer und 50 µl Luciferin-Lösung pro Ansatz und misst die emittierten Photonen über 10 Sekunden.

Triton-Lysepuffer	1%	TritonX-100
	25 mM	Glycylglycin, pH 7,8
	15 mM	MgSO ₄
	4 mM	EGTA
	10%	Glycerin
	1 mM	DTT

Luciferase-

Reaktionspuffer	25 mM	Glycylglycin, pH 7,8
	15 mM	MgSO ₄
	5 mM	ATP

Luciferin-Lösung	0,25 M	Luciferin in Reaktionspuffer (ohne ATP)
-------------------------	--------	---

4.2.3.12. Messung der β -Galactosidase-Aktivität in eukaryotischen Zellextrakten

Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz in Reporteragen-Analysen auszugleichen, wurde das *Luciferase*-Reporteragen mit dem Plasmid pCMV- β -Gal kotransfiziert. Zur Messung der β -Galaktosidaseaktivität wurden 10-50 µl des Zelllysats in einer 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben. Es wurden jeweils 200 µl Reaktionspuffer zugegeben und bis zur leichten Gelbfärbung bei 37°C inkubiert. In einem ELISA-Reader wurde die optische Dichte der Proben bei 405 nm gegen die entsprechende Menge Lysepuffer als Referenzwert gemessen. Um die unspezifische Absorption zu korrigieren, wurden die Proben zusätzlich bei 620 nm vermessen und die erhaltenen Werte von den Werten bei 405 nm abgezogen.

Zur Ermittlung der relativen Luciferase-Aktivität (RLA) in Reporter-Gen-Analysen wurde der Quotient aus dem gemessenen Luciferase-Wert und dem zugehörigen β -Galaktosidase-Wert gebildet.

β -Galaktosidase-

Reaktionspuffer	100 mM	Natriumphosphat, pH 7,5
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	50 mM	2-Mercaptoethanol
	1x	ONPG

100 mM Natriumphosphat

pH 7,5	200 mM	Na ₂ HPO ₄
	200 mM	NaH ₂ PO ₄

ONPG-Stocklösung	4 mg/ml	2-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) in 100 mM Natriumphosphat, pH 7,5
-------------------------	---------	--

4.2.3.13. TUNEL-Assay

Mittels TUNEL-Methode (**T**erminal transferase d**U**TP **n**ick **e**nd **l**abelling) können DNA-Einzelstrangbrüche detektiert werden, die während der Apoptose entstehen.

Der TUNEL-Assay wurde mittels des „*In situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 48-72 Stunden nach Transfektion mit synthetischen siRNAs in 4% PFA für 30-60 Minuten fixiert und im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen für 2 Minuten bei 4°C in 0,1% Triton/ 0,1% Natriumcitrat permeabilisiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 25 μ l TUNEL-Reaktionsmix (Lösung I und II im Verhältnis 1:10) benetzt und für 1 Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläschen wurden 3x mit PBS gewaschen und zum Anfärben der Zellkerne für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 25 μ l DAPI-Lösung inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde durch 5x Waschen mit PBS und 1x mit H₂O entfernt und die Deckgläschen zum Abschluss in 100% Ethanol getaucht und getrocknet. Die trockenen Deckgläschen wurden in Vectashield-Lösung (Vector Laboratories, Kanada) auf Objektträgern eingebettet.

4% PFA 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS, pH 7-7,5

4.2.3.14. Seneszenz-Assay

Der Nachweis des seneszenten Phänotyps in Zellen nach Behandlung mit verschiedenen siRNAs erfolgte durch SA- β -Galaktosidase-Färbung nach der Methode von Dimri (Dimri *et al.*, 1995). Das von seneszenten Zellen exprimierte Enzym SA- β -Galaktosidase kann bei pH 6 detektiert werden.

Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 3 Minuten mit 2% Formaldehyd/0,2% Glutaraldehyd fixiert. Im Anschluss wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Seneszenz-Puffer pro 6 cm Schale über Nacht bei 37°C inkubiert.

Seneszenz-Puffer	5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]
	5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆]
	1 mg/ml	X-Gal-Stocklösung
	<hr/> in Citratpuffer	
Citrat-Phosphat-Puffer	40 mM	Zitronensäure
	150 mM	NaCl
	2 mM	MgSO ₄ * 6 H ₂ O
	<hr/> pH 6,0 mit Na ₂ HPO ₄ eingestellt	
X-Gal-Stocklösung	20 mg/ml	5-Brom-4Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal, Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen)
	<hr/> in DMF	

4.2.4. Hefe Zwei-Hybrid-Assay und verwandte Methoden

4.2.4.1. Das Hefe Zwei-Hybrid-System

Der Y2H Screen für HPV18 E7-bindende Peptide wurde im *S. cerevisiae* Stamm KF1 durchgeführt. Dieser enthält die Selektionsmarker *ADE2*, *HIS3*, *URA3* welche unter der Kontrolle unterschiedlicher GAL4-responsiver Promotoren stehen. Während der *HIS3*-Marker bereits durch schwache und der *ADE2*-Marker durch mittelstarke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden, besitzt der SPO13-Promotor des *URA3*-Markers ein negativ-regulatorisches Element und wird nur durch relativ starke Protein-Protein-Wechselwirkungen aktiviert (Vidal *et al.*, 1996).

4.2.4.2. Transformation von Hefezellen

Die KF1-Hefe wurde auf YPDA⁺⁺-Platten für zwei Tage bei 30°C kultiviert, dann wurden einige Kolonien in 300 µl Lösung I suspendiert, kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Hefe in 300 µl Lösung I aufgenommen. Zu 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden 50 µg Carrier-DNA, 50 µl Hefesuspension und 300 µl Lösung II gegeben, durch Vortexen gemischt und für 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C, die Hefen wurden kurz abzentrifugiert und in 50-100 µl H₂O aufgenommen. Die transformierte Hefe wurde auf Selektionsplatten ausgestrichen und für 3-5 Tage bei 30°C kultiviert.

YPDA⁺⁺-Agarplatten	10 g	Yeast Extract
	20 g	Peptone
	25 g	Bacto Agar
	ad 950 ml H ₂ O, autoklavieren	
	nach Abkühlen auf 50°C	
	40 ml	0,5% Adenin
	50 ml	40% Glukose
	zugeben	
Lösung I	1 ml	10x LiOAc
	1 ml	10x TE
	8 ml	H ₂ O
Lösung II	1 ml	10x LiOAc
	1 ml	10x TE
	8 ml	50% PEG
10x TE	100 mM	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
10x LiOAc	1 M	Lithiumacetat, pH 7,5
50% PEG	50 g Polyethylenglykol MG 4000 in 100 ml H ₂ O	
Carrier-DNA	Lachssperma-DNA (10 µg/µl), denaturiert	

E7-cDNA im Vektor pPC97 enthielten wurden über Nacht in 100 ml SC-Trp-Medium bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 800 ml YPDA⁺⁺-Medium mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm ($OD_{600} = 0,4$) kultiviert. Die Hefen wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 3500 rpm und 4°C pelletiert und zunächst mit 50 ml sterilem H₂O dann mit 40 ml Lösung I gewaschen und schließlich in 4 ml Lösung I aufgenommen.

Es wurden 20 Ansätze mit je 2 µg DNA der Expressionsbank, 180 µl Carrier-DNA, 200 µl Hefesuspension und 1,2 ml Lösung II zusammengegeben und durch Vortexen gut durchmischt. Dann wurde für 30 Minuten bei 30°C unter Schütteln inkubiert und für weitere 15 Minuten bei 42°C. Die Hefen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, in sterilem H₂O aufgenommen und in einem Endvolumen von 13 ml vereint. Jeweils 500 µl wurden auf Selektionsplatten mit Sc-Trp-Leu-Ade ausplattiert und bei 30°C kultiviert. Zur Ermittlung der Transformationseffizienz wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) des Transformationsansatzes auf SC-Trp-Leu-Platten ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Kolonien ausgezählt.

4.2.4.5. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen

Selektionsmedium wurde mit einigen Hefekolonien angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Hefen wurden durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 Minuten pelletiert, mit 450 µl Puffer I gewaschen und in 200 µl Puffer II aufgenommen. Die Suspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß mit Glasperlen überführt und im Zellhomogenisator für 20 Sekunden geschüttelt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit Phenol/CIA extrahiert. Dann wurden 2 µl des Überstandes in *E. coli* transformiert und ausplattiert. Im Anschluss wurde eine DNA-Mini-Präparation durchgeführt. Die Ansätze, die das pADpep2-Plasmid enthielten wurden über einen Restriktionsverdau identifiziert.

Puffer I	100 mM	Tris, pH 8,0
	100 mM	EDTA, pH 8,0

Puffer II	2%	Triton-X-100
	1%	SDS
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA

4.2.4.6. *Replikplattierung*

Um Aufschluss über die Stärke der Protein-Protein-Interaktion zwischen dem HPV18 E7-Protein und E7-bindenden Peptide aus dem Y2H Screen zu bekommen, wurde eine Replikplattierung auf Platten mit verschiedenen Selektionsmedien durchgeführt.

Hierzu wurden die Hefen auf SC-Trp-Leu Platten ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Diese wurden dann auf Platten mit SC-Leu-Trp-His mit 40 mM 3-AT, SC-Leu-Trp-Ade, SC-Leu-Trp-Ura replikplattiert und für 1-4 Tage kultiviert.

5. Literatur

- Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach und J. C. Barrett (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13742-7.
- Amarzguioui, M., J. J. Rossi und D. Kim (2005). "Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi." FEBS Lett **579**(26): 5974-81.
- Andrei, G., R. Snoeck, D. Schols und E. De Clercq (2000). "Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV)-positive cells." Oncol Res **12**(9-10): 397-408.
- Androphy, E. J., D. R. Lowy und J. T. Schiller (1987). "Bovine papillomavirus E2 transactivating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA." Nature **325**(6099): 70-3.
- Arroyo, M., S. Bagchi und P. Raychaudhuri (1993). "Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex." Mol Cell Biol **13**(10): 6537-46.
- Bachmann, I. M., O. J. Halvorsen, K. Collett, I. M. Stefansson, O. Straume, S. A. Haukaas, H. B. Salvesen, A. P. Otte und L. A. Akslen (2006). "EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast." J Clin Oncol **24**(2): 268-73.
- Badal, S., V. Badal, I. E. Calleja-Macias, M. Kalantari, L. S. Chuang, B. F. Li und H. U. Bernard (2004). "The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation." Virology **324**(2): 483-92.
- Bailey, S. N., S. M. Ali, A. E. Carpenter, C. O. Higgins und D. M. Sabatini (2006). "Microarrays of lentiviruses for gene function screens in immortalized and primary cells." Nat Methods **3**(2): 117-22.
- Baines, I. C. und P. Colas (2006). "Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery." Drug Discov Today **11**(7-8): 334-41.
- Baker, C. C., W. C. Phelps, V. Lindgren, M. J. Braun, M. A. Gonda und P. M. Howley (1987). "Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines." J Virol **61**(4): 962-71.
- Baker, G. E. und S. K. Tyring (1997). "Therapeutic approaches to papillomavirus infections." Dermatol Clin **15**(2): 331-40.
- Barbie, T. U., D. A. Barbie, D. T. MacLaughlin, S. Maheswaran und P. K. Donahoe (2003). "Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15601-6.
- Bartosch, B. und F. L. Cosset (2004). "Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses." Curr Gene Ther **4**(4): 427-43.
- Behlke, M. A. (2006). "Progress towards in vivo use of siRNAs." Mol Ther **13**(4): 644-70.
- Berezovska, O. P., A. B. Glinskii, Z. Yang, X. M. Li, R. M. Hoffman und G. V. Glinsky (2006). "Essential role for activation of the Polycomb group (PcG) protein chromatin silencing pathway in metastatic prostate cancer." Cell Cycle **5**(16): 1886-901.
- Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri und S. Bagchi (1997). "Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein." Cell Growth Differ **8**(12): 1277-86.
- Bernard, B. A., C. Bailly, M. C. Lenoir, M. Darmon, F. Thierry und M. Yaniv (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): 4317-24.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Boyer, S. N., D. E. Wazer und V. Band (1996). "E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway." Cancer Res **56**(20): 4620-4.
- Bracken, A. P., D. Kleine-Kohlbrecher, N. Dietrich, D. Pasini, G. Gargiulo, C. Beekman, K. Theilgaard-Monch, S. Minucci, B. T. Porse, J. C. Marine, K. H. Hansen und K. Helin

- (2007). "The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells." *Genes Dev* **21**(5): 525-30.
- Bracken, A. P., D. Pasini, M. Capra, E. Prosperini, E. Colli und K. Helin (2003). "EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer." *Embo J* **22**(20): 5323-35.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brasier, A. R., J. E. Tate und J. F. Habener (1989). "Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines." *Biotechniques* **7**(10): 1116-22.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards und R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* **296**(5567): 550-3.
- Butz, K., C. Denk, A. Ullmann, M. Scheffner und F. Hoppe-Seyler (2000). "Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6693-7.
- Butz, K. und F. Hoppe-Seyler (1993). "Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region." *J Virol* **67**(11): 6476-86.
- Butz, K., T. Ristriani, A. Hengstermann, C. Denk, M. Scheffner und F. Hoppe-Seyler (2003). "siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells." *Oncogene* **22**(38): 5938-45.
- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. S. Jones und Y. Zhang (2002). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing." *Science* **298**(5595): 1039-43.
- Chen, C. und H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol* **7**(8): 2745-52.
- Chen, Y., M. C. Lin, H. Yao, H. Wang, A. Q. Zhang, J. Yu, C. K. Hui, G. K. Lau, M. L. He, J. Sung und H. F. Kung (2007). "Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin." *Hepatology* **46**(1): 200-8.
- Chevray, P. M. und D. Nathans (1992). "Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 5789-93.
- Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz und S. Fields (1991). "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(21): 9578-82.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Chow, L. T. und T. R. Broker (1997). "In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences." *Clin Dermatol* **15**(2): 217-27.
- Classon, M. und N. Dyson (2001). "p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets." *Exp Cell Res* **264**(1): 135-47.
- Classon, M. und E. Harlow (2002). "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer." *Nat Rev Cancer* **2**(12): 910-7.
- Cohen, B. A., P. Colas und R. Brent (1998). "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14272-7.
- Cole, S. T. und O. Danos (1987). "Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products." *J Mol Biol* **193**(4): 599-608.
- Croonquist, P. A. und B. Van Ness (2005). "The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype." *Oncogene* **24**(41): 6269-80.
- Darnell, G. A., T. M. Antalis, B. R. Rose und A. Suhrbier (2005). "Silencing of integrated human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cells expressing SerpinB2." *J Virol* **79**(7): 4246-56.

- De Luca, A., T. K. MacLachlan, L. Bagella, C. Dean, C. M. Howard, P. P. Claudio, A. Baldi, K. Khalili und A. Giordano (1997). "A unique domain of pRb2/p130 acts as an inhibitor of Cdk2 kinase activity." *J Biol Chem* **272**(34): 20971-4.
- de Villiers, E. M. (1994). "Human pathogenic papillomavirus types: an update." *Curr Top Microbiol Immunol* **186**: 1-12.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski und S. Subramani (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **7**(2): 725-37.
- DeFilippis, R. A., E. C. Goodwin, L. Wu und D. DiMaio (2003). "Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells." *J Virol* **77**(2): 1551-63.
- Demers, G. W., S. A. Foster, C. L. Halbert und D. A. Galloway (1994). "Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10): 4382-6.
- Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing und A. Prochiantz (1996). "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent." *J Biol Chem* **271**(30): 18188-93.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith und et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-7.
- Ding, L., C. Erdmann, A. M. Chinnaiyan, S. D. Merajver und C. G. Kleer (2006). "Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues." *Cancer Res* **66**(8): 4095-9.
- Ding, L. und C. G. Kleer (2006). "Enhancer of zeste 2 as a marker of preneoplastic progression in the breast." *Cancer Res* **66**(19): 9352-5.
- DiPaolo, J. A., C. D. Woodworth, N. C. Popescu, V. Notario und J. Doniger (1989). "Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras." *Oncogene* **4**(4): 395-9.
- Doorbar, J., A. Parton, K. Hartley, L. Banks, T. Crook, M. Stanley und L. Crawford (1990). "Detection of novel splicing patterns in a HPV16-containing keratinocyte cell line." *Virology* **178**(1): 254-62.
- Dowdy, S. F., P. W. Hinds, K. Louie, S. I. Reed, A. Arnold und R. A. Weinberg (1993). "Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins." *Cell* **73**(3): 499-511.
- Durst, M., F. X. Bosch, D. Glitz, A. Schneider und H. zur Hausen (1991). "Inverse relationship between human papillomavirus (HPV) type 16 early gene expression and cell differentiation in nude mouse epithelial cysts and tumors induced by HPV-positive human cell lines." *J Virol* **65**(2): 796-804.
- Durst, M., R. T. Dzarlieva-Petrusevska, P. Boukamp, N. E. Fusenig und L. Gissmann (1987). "Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA." *Oncogene* **1**(3): 251-6.
- Durst, M., D. Gallahan, G. Jay und J. S. Rhim (1989). "Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene." *Virology* **173**(2): 767-71.
- Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina und P. A. Sharp (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 457-67.
- Dyson, N., P. Guida, K. Munger und E. Harlow (1992). "Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins." *J Virol* **66**(12): 6893-902.
- Edmonds, C. und K. H. Vousden (1989). "A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein." *J Virol* **63**(6): 2650-6.
- Egger, G., G. Liang, A. Aparicio und P. A. Jones (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* **429**(6990): 457-63.

- El-Deiry, W. S. (2003). "The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity." Oncogene **22**(47): 7486-95.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler und B. Vogelstein (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-25.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber und T. Tuschl (2002). "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." Methods **26**(2): 199-213.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel und T. Tuschl (2001a). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel und T. Tuschl (2001b). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate." Embo J **20**(23): 6877-88.
- Engel, L. W., C. A. Heilman und P. M. Howley (1983). "Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1." J Virol **47**(3): 516-28.
- Fabbrizio, E., L. Le Cam, J. Polanowska, M. Kaczorek, N. Lamb, R. Brent und C. Sardet (1999). "Inhibition of mammalian cell proliferation by genetically selected peptide aptamers that functionally antagonize E2F activity." Oncogene **18**(30): 4357-63.
- Fang, L., M. Igarashi, J. Leung, M. M. Sugrue, S. W. Lee und S. A. Aaronson (1999). "p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53." Oncogene **18**(18): 2789-97.
- Fehrmann, F. und L. A. Laimins (2003). "Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation." Oncogene **22**(33): 5201-7.
- Fields, S. und O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver und C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Fischer, P. M. (2003). "The design, synthesis and application of stereochemical and directional peptide isomers: a critical review." Curr Protein Pept Sci **4**(5): 339-56.
- Fort, P., L. Marty, M. Piechaczyk, S. el Sabrouty, C. Dani, P. Jeanteur und J. M. Blanchard (1985). "Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family." Nucleic Acids Res **13**(5): 1431-42.
- Fritsche, M., C. Haessler und G. Brandner (1993). "Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents." Oncogene **8**(2): 307-18.
- Frommer, M., L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy und C. L. Paul (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1827-31.
- Fujii, T., M. Saito, E. Iwasaki, T. Ochiya, Y. Takei, S. Hayashi, A. Ono, N. Hirao, M. Nakamura, K. Kubushiro, K. Tsukazaki und D. Aoki (2006). "Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer." Int J Oncol **29**(3): 541-8.
- Fukuyama, T., T. Otsuka, H. Shigematsu, N. Uchida, F. Arima, Y. Ohno, H. Iwasaki, T. Fukuda und Y. Niho (2000). "Proliferative involvement of ENX-1, a putative human polycomb group gene, in haematopoietic cells." Br J Haematol **108**(4): 842-7.
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman und D. A. Galloway (1997). "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." Genes Dev **11**(16): 2090-100.
- Geyer, C. R. und R. Brent (2000). "Selection of genetic agents from random peptide aptamer expression libraries." Methods Enzymol **328**: 171-208.
- Gietz, R. D. und R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Goodwin, E. C. und D. DiMaio (2000). "Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12513-8.

- Gorman, C., R. Padmanabhan und B. H. Howard (1983). "High efficiency DNA-mediated transformation of primate cells." Science **221**(4610): 551-3.
- Gross-Mesilaty, S., E. Reinstein, B. Bercovich, K. E. Tobias, A. L. Schwartz, C. Kahana und A. Ciechanover (1998). "Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 8058-63.
- Grossman, S. R. und L. A. Laimins (1989). "E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc." Oncogene **4**(9): 1089-93.
- Halbert, C. L., G. W. Demers und D. A. Galloway (1991). "The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells." J Virol **65**(1): 473-8.
- Hall, A. H. und K. A. Alexander (2003). "RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells." J Virol **77**(10): 6066-9.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hannon, G. J. und J. J. Rossi (2004). "Unlocking the potential of the human genome with RNA interference." Nature **431**(7006): 371-8.
- Harper, D. M., E. L. Franco, C. Wheeler, D. G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N. S. De Carvalho, C. M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M. M. Blatter, A. P. Korn, W. Quint und G. Dubin (2004). "Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial." Lancet **364**(9447): 1757-65.
- Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy und J. T. Schiller (1989). "HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes." Embo J **8**(12): 3905-10.
- Heale, B. S., H. S. Soifer, C. Bowers und J. J. Rossi (2005). "siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures." Nucleic Acids Res **33**(3): e30.
- Hopfl, R., K. Heim, N. Christensen, K. Zumbach, U. Wieland, B. Volgger, A. Widschwendter, S. Haimbuchner, E. Muller-Holzner, M. Pawlita, H. Pfister und P. Fritsch (2000). "Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7." Lancet **356**(9246): 1985-6.
- Hoppe-Seyler, F., K. Butz und H. zur Hausen (1991). "Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1." J Virol **65**(10): 5613-8.
- Hubbert, N. L., S. A. Sedman und J. T. Schiller (1992). "Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes." J Virol **66**(10): 6237-41.
- Hudson, J. B., M. A. Bedell, D. J. McCance und L. A. Laiminis (1990). "Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18." J Virol **64**(2): 519-26.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner und P. M. Howley (1991). "A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18." Embo J **10**(13): 4129-35.
- Huibregtse, J. M., M. Scheffner und P. M. Howley (1993). "Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins." Mol Cell Biol **13**(8): 4918-27.
- Jackson, A. L. und P. S. Linsley (2004). "Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs?" Trends Genet **20**(11): 521-4.
- Janowski, B. A. und D. R. Corey (2005). "Inhibiting transcription of chromosomal DNA using antigene RNAs." Nucleic Acids Symp Ser (Oxf) **49**: 367-8.
- Jenson, A. B., R. J. Kurman und W. D. Lancaster (1991). "Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection." Dermatol Clin **9**(2): 203-9.
- Jeon, S. und P. F. Lambert (1995). "Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1654-8.

- Jewers, R. J., P. Hildebrandt, J. W. Ludlow, B. Kell und D. J. McCance (1992). "Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes." J Virol **66**(3): 1329-35.
- Jiang, M. und J. Milner (2002). "Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference." Oncogene **21**(39): 6041-8.
- Johung, K., E. C. Goodwin und D. DiMaio (2007). "Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence." J Virol **81**(5): 2102-16.
- Jones, D. L., R. M. Alani und K. Munger (1997). "The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2." Genes Dev **11**(16): 2101-11.
- Jones, D. L. und K. Munger (1997). "Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." J Virol **71**(4): 2905-12.
- Kawasaki, H. und K. Taira (2004). "Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells." Nature **431**(7005): 211-7.
- Kim, D. H., M. A. Behlke, S. D. Rose, M. S. Chang, S. Choi und J. J. Rossi (2005). "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy." Nat Biotechnol **23**(2): 222-6.
- Kim, D. H., L. M. Villeneuve, K. V. Morris und J. J. Rossi (2006). "Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 793-7.
- Kleer, C. G., Q. Cao, S. Varambally, R. Shen, I. Ota, S. A. Tomlins, D. Ghosh, R. G. Sewalt, A. P. Otte, D. F. Hayes, M. S. Sabel, D. Livant, S. J. Weiss, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan (2003). "EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11606-11.
- Klug, A. und J. T. Finch (1965). "Structure of Viruses of the Papilloma-Polyoma Type. I. Human Wart Virus." J Mol Biol **11**: 403-23.
- Kotake, Y., R. Cao, P. Viatour, J. Sage, Y. Zhang und Y. Xiong (2007). "pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene." Genes Dev **21**(1): 49-54.
- Kuner, R., M. Vogt, H. Sultmann, A. Bunes, S. Dymalla, J. Bulkescher, M. Fellmann, K. Butz, A. Poustka und F. Hoppe-Seyler (2007). "Identification of cellular targets for the human papillomavirus E6 and E7 oncogenes by RNA interference and transcriptome analyses." J Mol Med.
- Kuzmichev, A., R. Margueron, A. Vaquero, T. S. Preissner, M. Scher, A. Kirmizis, X. Ouyang, N. Brockdorff, C. Abate-Shen, P. Farnham und D. Reinberg (2005). "Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 1859-64.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst und D. Reinberg (2002). "Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein." Genes Dev **16**(22): 2893-905.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laimins, L. A. (1993). "The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer." Infect Agents Dis **2**(2): 74-86.
- Lambert, P. F. (1991). "Papillomavirus DNA replication." J Virol **65**(7): 3417-20.
- Leavitt, J., P. Gunning, P. Porreca, S. Y. Ng, C. S. Lin und L. Kedes (1984). "Molecular cloning and characterization of mutant and wild-type human beta-actin genes." Mol Cell Biol **4**(10): 1961-9.
- Lee, Y. S., K. Nakahara, J. W. Pham, K. Kim, Z. He, E. J. Sontheimer und R. W. Carthew (2004). "Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways." Cell **117**(1): 69-81.

- Lehnertz, B., Y. Ueda, A. A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T. Chen, E. Li, T. Jenuwein und A. H. Peters (2003). "Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin." *Curr Biol* **13**(14): 1192-200.
- Lepik, D., I. Ilves, A. Kristjuhan, T. Maimets und M. Ustav (1998). "p53 protein is a suppressor of papillomavirus DNA amplificational replication." *J Virol* **72**(8): 6822-31.
- Lepik, D. und M. Ustav (2000). "Cell-specific modulation of papovavirus replication by tumor suppressor protein p53." *J Virol* **74**(10): 4688-97.
- Lu, C., T. Bonome, Y. Li, A. A. Kamat, L. Y. Han, R. Schmandt, R. L. Coleman, D. M. Gershenson, R. B. Jaffe, M. J. Birrer und A. K. Sood (2007). "Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma." *Cancer Res* **67**(4): 1757-68.
- Luban, J. und S. P. Goff (1995). "The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions." *Curr Opin Biotechnol* **6**(1): 59-64.
- Maltzman, W. und L. Czyzyk (1984). "UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells." *Mol Cell Biol* **4**(9): 1689-94.
- Mantovani, F. und L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." *Oncogene* **20**(54): 7874-87.
- Matsukawa, Y., S. Semba, H. Kato, A. Ito, K. Yanagihara und H. Yokozaki (2006). "Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer." *Cancer Sci* **97**(6): 484-91.
- McDougall, J. K. (1994). "Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus." *Curr Top Microbiol Immunol* **186**: 101-19.
- McHugh, J. B., D. R. Fullen, L. Ma, C. G. Kleer und L. D. Su (2007). "Expression of polycomb group protein EZH2 in nevi and melanoma." *J Cutan Pathol* **34**(8): 597-600.
- McIntyre, M. C., M. N. Ruesch und L. A. Laimins (1996). "Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107." *Virology* **215**(1): 73-82.
- Meister, G. und T. Tuschl (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." *Nature* **431**(7006): 343-9.
- Mette, M. F., W. Aufsatz, J. van der Winden, M. A. Matzke und A. J. Matzke (2000). "Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA." *Embo J* **19**(19): 5194-201.
- Morris, K. V., S. W. Chan, S. E. Jacobsen und D. J. Looney (2004). "Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells." *Science* **305**(5688): 1289-92.
- Munger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace und V. L. Zacny (2001). "Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein." *Oncogene* **20**(54): 7888-98.
- Munger, K., W. C. Phelps, V. Bubba, P. M. Howley und R. Schlegel (1989a). "The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes." *J Virol* **63**(10): 4417-21.
- Munger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow und P. M. Howley (1989b). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." *Embo J* **8**(13): 4099-105.
- Nauenburg, S., W. Zwerschke und P. Jansen-Durr (2001). "Induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by peptide aptamers that bind to the HPV-16 E7 oncoprotein." *Faseb J* **15**(3): 592-4.
- Niu, X. Y., Z. L. Peng, W. Q. Duan, H. Wang und P. Wang (2006). "Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo." *Int J Gynecol Cancer* **16**(2): 743-51.
- Novina, C. D. und P. A. Sharp (2004). "The RNAi revolution." *Nature* **430**(6996): 161-4.
- Ochiya, T., S. Nagahara, A. Sano, H. Itoh und M. Terada (2001). "Biomaterials for gene delivery: atelocollagen-mediated controlled release of molecular medicines." *Curr Gene Ther* **1**(1): 31-52.

- Pal-Bhadra, M., U. Bhadra und J. A. Birchler (2002). "RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*." Mol Cell **9**(2): 315-27.
- Palliser, D., D. Chowdhury, Q. Y. Wang, S. J. Lee, R. T. Bronson, D. M. Knipe und J. Lieberman (2006). "An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection." Nature **439**(7072): 89-94.
- Pan, H. und A. E. Griep (1994). "Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice: implications for tumor suppressor gene function in development." Genes Dev **8**(11): 1285-99.
- Park, C. W., Z. Chen, B. T. Kren und C. J. Steer (2004). "Double-stranded siRNA targeted to the huntingtin gene does not induce DNA methylation." Biochem Biophys Res Commun **323**(1): 275-80.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay und P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Parkin, D. M., J. Stjernsward und C. S. Muir (1984). "Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers." Bull World Health Organ **62**(2): 163-82.
- Payne, S., N. M. Kernohan und F. Walker (1996). "Proliferation in the normal cervix and in preinvasive cervical lesions." J Clin Pathol **49**(8): 667-71.
- Peto, J., C. Gilham, J. Deacon, C. Taylor, C. Evans, W. Binns, M. Haywood, N. Elanko, D. Coleman, R. Yule und M. Desai (2004). "Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort." Br J Cancer **91**(5): 942-53.
- Pham, J. W., J. L. Pellino, Y. S. Lee, R. W. Carthew und E. J. Sontheimer (2004). "A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*." Cell **117**(1): 83-94.
- Phelps, W. C., K. Munger, C. L. Yee, J. A. Barnes und P. M. Howley (1992). "Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." J Virol **66**(4): 2418-27.
- Phelps, W. C., C. L. Yee, K. Munger und P. M. Howley (1989). "Functional and sequence similarities between HPV16 E7 and adenovirus E1A." Curr Top Microbiol Immunol **144**: 153-66.
- Pirisi, L., S. Yasumoto, M. Feller, J. Doniger und J. A. DiPaolo (1987). "Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA." J Virol **61**(4): 1061-6.
- Pisani, P., F. Bray und D. M. Parkin (2002). "Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population." Int J Cancer **97**(1): 72-81.
- Raaphorst, F. M. (2005). "Deregulated expression of Polycomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epithelial tumors." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R93-R100.
- Raman, J. D., N. P. Mongan, S. K. Tickoo, S. A. Boorjian, D. S. Scherr und L. J. Gudas (2005). "Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder." Clin Cancer Res **11**(24 Pt 1): 8570-6.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall und A. Khvorova (2004). "Rational siRNA design for RNA interference." Nat Biotechnol **22**(3): 326-30.
- Rohlf, M., S. Winkenbach, S. Meyer, T. Rupp und M. Durst (1991). "Viral transcription in human keratinocyte cell lines immortalized by human papillomavirus type-16." Virology **183**(1): 331-42.
- Rose, S. D., D. H. Kim, M. Amarguioui, J. D. Heidel, M. A. Collingwood, M. E. Davis, J. J. Rossi und M. A. Behlke (2005). "Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs." Nucleic Acids Res **33**(13): 4140-56.
- Rosl, F., A. Arab, B. Klevenz und H. zur Hausen (1993). "The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses." J Gen Virol **74 (Pt 5)**: 791-801.
- Rosl, F., E. M. Westphal und H. zur Hausen (1989). "Chromatin structure and transcriptional regulation of human papillomavirus type 18 DNA in HeLa cells." Mol Carcinog **2**(2): 72-80.

- Rothbard, J. B., S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P. L. McGrane, P. A. Wender und P. A. Khavari (2000). "Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation." Nat Med **6**(11): 1253-7.
- Salcedo, M., E. Garrido, L. Taja und P. Gariglio (1995). "The retinoblastoma gene product negatively regulates cellular or viral oncogene promoters in vivo." Arch Med Res **26 Spec No**: S157-62.
- Saramaki, O. R., T. L. Tammela, P. M. Martikainen, R. L. Vessella und T. Visakorpi (2006). "The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer." Genes Chromosomes Cancer **45**(7): 639-45.
- Scheffner, M., K. Munger, J. C. Byrne und P. M. Howley (1991). "The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5523-7.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine und P. M. Howley (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." Cell **63**(6): 1129-36.
- Schneider-Gadicke, A. und E. Schwarz (1987). "Transcription of human papillomavirus type-18 DNA in human cervical carcinoma cell lines." Haematol Blood Transfus **31**: 380-1.
- Schramke, V. und R. Allshire (2004). "Those interfering little RNAs! Silencing and eliminating chromatin." Curr Opin Genet Dev **14**(2): 174-80.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin und P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Schwarz, E., U. K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau und H. zur Hausen (1985). "Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells." Nature **314**(6006): 111-4.
- Schwarze, S. R., A. Ho, A. Vocero-Akbani und S. F. Dowdy (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." Science **285**(5433): 1569-72.
- Sedman, S. A., M. S. Barbosa, W. C. Vass, N. L. Hubbert, J. A. Haas, D. R. Lowy und J. T. Schiller (1991). "The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture." J Virol **65**(9): 4860-6.
- Sherr, C. J. und J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-12.
- Shi, B., J. Liang, X. Yang, Y. Wang, Y. Zhao, H. Wu, L. Sun, Y. Zhang, Y. Chen, R. Li, Y. Zhang, M. Hong und Y. Shang (2007). "Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells." Mol Cell Biol **27**(14): 5105-19.
- Siolas, D., C. Lerner, J. Burchard, W. Ge, P. S. Linsley, P. J. Paddison, G. J. Hannon und M. A. Cleary (2005). "Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers." Nat Biotechnol **23**(2): 227-31.
- Sioud, M. und D. R. Sorensen (2003). "Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1220-5.
- Smotkin, D. und F. O. Wettstein (1986). "Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4680-4.
- Smotkin, D. und F. O. Wettstein (1987). "The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein." J Virol **61**(5): 1686-9.
- Sorensen, D. R., M. Leirdal und M. Sioud (2003). "Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice." J Mol Biol **327**(4): 761-6.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Southern, P. J. und P. Berg (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): 327-41.

- Stoler, M. H., C. R. Rhodes, A. Whitbeck, S. M. Wolinsky, L. T. Chow und T. R. Broker (1992). "Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias." *Hum Pathol* **23**(2): 117-28.
- Stubenrauch, F. und L. A. Laimins (1999). "Human papillomavirus life cycle: active and latent phases." *Semin Cancer Biol* **9**(6): 379-86.
- Sudo, T., T. Utsunomiya, K. Mimori, H. Nagahara, K. Ogawa, H. Inoue, S. Wakiyama, H. Fujita, K. Shirouzu und M. Mori (2005). "Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma." *Br J Cancer* **92**(9): 1754-8.
- Takeshita, F. und T. Ochiya (2006). "Therapeutic potential of RNA interference against cancer." *Cancer Sci* **97**(8): 689-96.
- Tan, J., X. Yang, L. Zhuang, X. Jiang, W. Chen, P. L. Lee, R. K. Karuturi, P. B. Tan, E. T. Liu und Q. Yu (2007). "Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells." *Genes Dev* **21**(9): 1050-63.
- Tang, S., M. Tao, J. P. McCoy, Jr. und Z. M. Zheng (2006). "The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*1 transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation." *J Virol* **80**(9): 4249-63.
- Tang, X., M. Milyavsky, I. Shats, N. Erez, N. Goldfinger und V. Rotter (2004). "Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene." *Oncogene* **23**(34): 5759-69.
- Thomas, M. und L. Banks (1998). "Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6." *Oncogene* **17**(23): 2943-54.
- Ting, A. H., K. E. Schuebel, J. G. Herman und S. B. Baylin (2005). "Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation." *Nat Genet* **37**(8): 906-10.
- Tomari, Y., C. Matranga, B. Haley, N. Martinez und P. D. Zamore (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." *Science* **306**(5700): 1377-80.
- Tommasino, M., J. P. Adamczewski, F. Carlotti, C. F. Barth, R. Manetti, M. Contorni, F. Cavalieri, T. Hunt und L. Crawford (1993). "HPV16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A." *Oncogene* **8**(1): 195-202.
- Tuschl, T., P. D. Zamore, R. Lehmann, D. P. Bartel und P. A. Sharp (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." *Genes Dev* **13**(24): 3191-7.
- Uetz, P. (2002). "Two-hybrid arrays." *Curr Opin Chem Biol* **6**(1): 57-62.
- Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson und R. M. Evans (1991). "Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors." *Cell* **65**(7): 1255-66.
- Varambally, S., S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin und A. M. Chinnaiyan (2002). "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer." *Nature* **419**(6907): 624-9.
- Venturini, F., J. Braspenning, M. Homann, L. Gissmann und G. Sczakiel (1999). "Kinetic selection of HPV 16 E6/E7-directed antisense nucleic acids: anti-proliferative effects on HPV 16-transformed cells." *Nucleic Acids Res* **27**(7): 1585-92.
- Vidal, M., R. K. Brachmann, A. Fattaey, E. Harlow und J. D. Boeke (1996). "Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19): 10315-20.
- Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, K. A. Ault, A. R. Giuliano, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, C. Malm, M. Lehtinen, F. E. Skjeldestad, S. E. Olsson, M. Steinwall, D. R. Brown, R. J. Kurman, B. M. Ronnett, M. H. Stoler, A. Ferenczy, D. M. Harper, G. M. Tamms, J. Yu, L. Lupinacci, R. Railkar, F. J. Taddeo, K. U. Jansen, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah und E. Barr (2005). "Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial." *Lancet Oncol* **6**(5): 271-8.
- Visser, H. P., M. J. Gunster, H. C. Kluin-Nelemans, E. M. Manders, F. M. Raaphorst, C. J. Meijer, R. Willemze und A. P. Otte (2001). "The Polycomb group protein EZH2 is

- upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma." Br J Haematol **112**(4): 950-8.
- Vives, E., P. Brodin und B. Lebleu (1997). "A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus." J Biol Chem **272**(25): 16010-7.
- Vogt, M., K. Butz, S. Dymalla, J. Semzow und F. Hoppe-Seyler (2006). "Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein." Oncogene **25**(29): 4009-15.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal und R. A. Martienssen (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." Science **297**(5588): 1833-7.
- Vousden, K. H. und X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer und N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-9.
- Wallin, K. L., F. Wiklund, T. Angstrom, F. Bergman, U. Stendahl, G. Wadell, G. Hallmans und J. Dillner (1999). "Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer." N Engl J Med **341**(22): 1633-8.
- Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri und S. Bagchi (2001). "Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells." Oncogene **20**(34): 4740-9.
- Weikert, S., F. Christoph, J. Kollermann, M. Muller, M. Schrader, K. Miller und H. Krause (2005). "Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas." Int J Mol Med **16**(2): 349-53.
- Weintraub, S. J., K. N. Chow, R. X. Luo, S. H. Zhang, S. He und D. C. Dean (1995). "Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein." Nature **375**(6534): 812-5.
- Wells, S. I., B. J. Aronow, T. M. Wise, S. S. Williams, J. A. Couget und P. M. Howley (2003). "Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7093-8.
- Wells, S. I., D. A. Francis, A. Y. Karpova, J. J. Dowhanick, J. D. Benson und P. M. Howley (2000). "Papillomavirus E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21(CIP)-dependent pathways." Embo J **19**(21): 5762-71.
- Woodworth, C. D., J. Doniger und J. A. DiPaolo (1989). "Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma." J Virol **63**(1): 159-64.
- Yamato, K., J. Fen, H. Kobuchi, Y. Nasu, T. Yamada, T. Nishihara, Y. Ikeda, M. Kizaki und M. Yoshinouchi (2006). "Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA." Cancer Gene Ther **13**(3): 234-41.
- Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp und D. P. Bartel (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell **101**(1): 25-33.
- Zerfass-Thome, K., W. Zwerschke, B. Mannhardt, R. Tindle, J. W. Botz und P. Jansen-Durr (1996). "Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Oncogene **13**(11): 2323-30.
- zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections--a major cause of human cancers." Biochim Biophys Acta **1288**(2): F55-78.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.
- zur Hausen, H. und E. M. de Villiers (1994). "Human papillomaviruses." Annu Rev Microbiol **48**: 427-47.

6. Abkürzungen

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindungsdomäne
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	„complementary DNA“
CFA	„Colony Formation Assay“
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CMV	Cytomegalovirus
CR1/2	„Consensus Region 1/2“
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	„Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium“
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EMA	„European Medicines Agency“
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FDA	„Food and Drug Administration“
FKS	fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPV	Humane Papillomviren
kb	Kilobasen
LB	„lysogeny broth“
MOPS	3- (N-Morpholino) Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA

nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ONPG	O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
<i>P. pyralis</i>	<i>Photinus pyralis</i>
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PNK	Polynukleotidkinase
pNP	para-Nitrophenol
pNPP	para-Nitrophenolphosphat
PRC2	„Polycomb Repressive Complex 2“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RdDM	„RNA-directed DNA Methylation“
RISC	„RNA Induced Silencing Complex“
RLA	Relative Luciferase Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	„rounds per minute“
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase Chain Reaction
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SC	„Synthetic Complete“
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“
SDS-PAGE	„Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis“
SEAP	Sezernierte Alkalische Phosphatase
shRNA	„short hairpin RNA“
siRNA	„short interfering RNA“
SSC	„Standard Saline Citrate“
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	„transfer-RNA“
TUNEL	„Terminal transferase dUTP nick end labelling“
URR	Upstream Regulatory Region
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
Y2H	Yeast Two-Hybrid