Vektorologie & Experimentelle Gentherapie BMFZ



Regulation des Hepatitis B Virus *core*-Promotor/Enhancer II durch den Tumorsuppressor p73 und seine onkogenen Isoformen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock



vorgelegt von

Sven Buhlmann

geboren am 08.03.1975 in Rostock

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Brigitte M. Pützer Vektorologie und Experimentelle Gentherapie, BMFZ

> Prof. Dr. rer. nat. Birgit Piechulla Abteilung Biochemie, Institut für Biowissenschaften

April 2008

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00000400

V-VI

Inhaltsverzeichnis

A	bkür	zun	asv	erz	eic	hn	is
			90.	0	0.0		

Einleitung 1 1 1.1 Der Transkriptionsfaktor p73 1 1.1.1 TP73 - Domänenstruktur und Transkriptvariationen 1 1.1.2 Funktion von TAp73 als Tumorsuppressor 4 1.1.3 Onkogene Wirkungsweise der ∆TAp73-Isoformen 6 1.2 Das Hepatitis B Virus 9 1.2.1 Klassifikation, Struktur und Genomaufbau 9 1.2.2 Der HBV-Lebenszyklus 13 1.2.3 Transkriptionsregulation des HBV-Genoms 15 1.2.4 Regulation der HBV-Expression durch die p53-Familie 18 1.3 Das hepatozelluläre Karzinom 19 1.4 Zielsetzung der Arbeit 22 2 Materialien und Methoden 23 2.1 Materialien 23 23 2.1.1 Instrumente 2.1.2 Chemikalien, Puffer und Enzyme 25 2.1.3 Kits 25 2.1.4 Plasmide 26 2.1.5 Bakterienstämme 27 2.1.6 Zelllinien 27 2.1.7 Adenoviren 28

2.1.8	Antikörper	29
2.1.9	Oligonukleotide	30

2.2 Methoden		32
2.2.1 DNA-	Arbeitstechniken	32
2.2.1.1	DNA-Restriktion	32
2.2.1.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	32
2.2.1.3	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.1.4	Ligation	33
2.2.1.5	Transformation von E. coli durch Elektroporation	33
2.2.1.6	Transformation von E. coli durch Hitzeschock	34
2.2.1.7	Mini-Plasmidpräparation	34
2.2.1.8	Maxi-Plasmidpräparation	35
2.2.1.9	Herstellung von Glycerinkulturen	36
2.2.1.10	DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung	36
2.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.1.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder	
	Restriktion	38
2.2.1.13	DNA-Präparation	38
2.2.1.14	Quantitative real-time PCR	38
2.2.2 RNA-	Arbeitstechniken	40
2.2.2.1	RNA-Präparation	40
2.2.2.2	Reverse Transkription	40
2.2.3 Protei	in-Arbeitstechniken	41
2.2.3.1	Proteinextraktion aus Zelllysat	41
2.2.3.2	Extraktion der nukleären Proteinfraktion	41
2.2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.2.3.5	Western Blot und Immunodetektion	43
2.2.3.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	44
2.2.3.7	Immunpräzipitation (IP)	45
2.2.3.8	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	46
2.2.3.9	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	46
2.2.4 Zellku	Iturarbeiten und Transfektion	47
2.2.4.1	Allgemeine Zellkultur	47
2.2.4.2	Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung	48
2.2.4.3	Transiente Transfektion von Zellen	48

3	Ergebnisse		52
	2.2.5.3	Induzierung von konditionell aktivem ER-E2F1	51
	2.2.5.2	Transduktion	51
		Adshp73 für RNAi-Analyse	49
	2.2.5.1	Herstellung des adenoviralen Expressionsvektors	
	2.2.5 Aden	ovirale Arbeitstechniken	49
	2.2.4.5	Durchflusszytometrieanalyse	49
	2.2.4.4	Luciferase-Assay	48

3.1 Aktivierung und Hemmung der endogenen p73-Expression in				
p53	-negativen Tumorzellen	52		
3.1.1	p73-Induktion durch genotoxischen Stress	52		
3.1.2	Hemmung des endogenen p73-Levels durch adenovirale			
	Expression von p73-spezifischer shRNA	53		
3.2 Nach	weis der HBV-Replikation nach Transfektion linearisierter			
HB\	/-Monomere	55		
3.3 Unte	rschiedliche Regulation der transkriptionellen Aktivität			
des	cp/Ell durch p73-lsoformen	58		
3.3.1	Repression des cp/EII durch TAp73	58		
3.3.2	Aktivierung des cp/EII durch ∆TAp73	62		
3.4 Einfl	uss der p73-lsoformen auf die HBV-Replikation	66		
3.4.1	TAp73 inhibiert die HBV-Replikation im Gegensatz zu Δ TAp73	66		
3.4.2	Unterschiedliche Regulation des xp/EI durch TAp73 und			
	∆TAp73	69		
3.5 <i>In vi</i> t	tro und in vivo Interaktionsstudien der p73-lsoformen mit			
Sp1	und dem cp/Ell	70		
3.5.1	Direkte Interaktion der Transaktivierungs-kompetenten			
	TAp73-Isoform mit Sp1	70		
3.5.2	Direkte Interaktion von Transaktivierungs-defizientem $\Delta TAp73$			
	mit Sp1	72		
3.5.3	Direkte Interaktion von TAp73 mit Sp1 verhindert die Sp1-			
	Bindung an cp/EII im Gegensatz zu Δ TAp73	74		

	3.5.4	Direkte Bindung der p73-Isoformen an HBV xp/EI-Region <i>in vivo</i>	78
4	<u>Diskus</u>	sion	79
	4.1 Anta	gonistische Wirkung von TAp73 und ∆TAp73 auf die	
	tran	skriptionelle Aktivität des cp/Ell	80
	4.2 Inhib	ition der HBV-Replikation durch TAp73-vermittelte	
	Rep	ression beider Enhancer	83
	4.3 TAp7	73-Sp1-Interaktion interferiert mit Bindung von Sp1 an	
	den	cp/ll	85
	4.4 Mode	ell der p73-vermittelten Regulation der HBV cp/Ell-	
	Trai	nskription	87
	4.5 Aust	blick	93
5	Zusamı	nenfassung	94
6	<u>Literatu</u>	ırverzeichnis	95

Danksagung

Lebenslauf

Publikationen

Erklärungen

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
bp	Basenpaare
C	Carboxy-terminal
cDNA	mRNA komplementärer Strang (= <i>complementary DNA</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CMV	Cytomegalievirus
cp/EII	<i>core</i> -Promotor/Enhancer II
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
et al.	et alii
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
FACS	Durchflusszytometer (= <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fetales Kälberserum (= <i>fetal calf serum</i>)
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBC	Hepatitis B Virus <i>core</i> -Protein
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B Virus X-Protein
HRP	Meerrettich-Peroxidase (= <i>horseradish peroxidase</i>)
lg	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kB	Kilobase
kDA	Kilo-Dalton
Luc	Luciferase
MOI	Infektionsmultiplizität (= <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
min	Minute

Ν	Amino-terminal
OD	Optische Dichte sowie Oligomerisierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS ⁼	phosphate buffered saline ohne Magnesium und Calcium
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure (= <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (= <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit reverser Transkription
s	Sekunde
S9	<i>ribosomal protein S9</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SV40 T-Antigen	<i>Simian virus</i> 40 Tumor-Antigen
TA	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TP	Tumorprotein
U	Units (Enzymaktivität; 1U = 1 mol x min ⁻¹)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp
xp/El	X-Promotor/Enhancer I

1 Einleitung

1.1 Der Transkriptionsfaktor p73

1.1.1 TP73 - Domänenstruktur und Transkriptvariationen

Das in der Krebsforschung am intensivsten studierte Gen *TP53* hat sich seit seiner Entdeckung 1979 vom potentiellen Onkogen zum Prototyp eines Tumorsuppressors entwickelt. Aufgrund der zentralen Rolle bei der Balancierung der antagonistischen Prozesse Proliferation und Apoptose wurde p53 auch als "Wächter des Genoms" bezeichnet. So reguliert p53 in Folge von DNA-Schädigung oder zellulärem Stress die Expression von Genen, die Zellzyklus-Arrest und Apoptose induzieren (Chen et al., 1995; el-Deiry, 1998; Oren & Rotter, 1999; Prives & Hall, 1999). Da p53 als Tumorsuppressor entscheidende Bedeutung zukommt, ist es nicht verwunderlich, dass p53 das häufigste Ziel von Mutationen oder epigenetischer Inaktivierung bei humanen Tumoren ist (Hollstein et al., 1996; Hollstein et al., 1991).

	TA	````	→ PR	DBD	OD	SAM
p53					FL, β, γ	
∆40p53 ∆133p53			Δ40	Δ133	FL, β, γ	
	~25	%		~65%	~35%	
TAp73						α', β, γ, δ, ε, θ, ζ, η
∆Np73	[Δ2		Δ2/3		α, β, γ, δ, ε, θ, ζ, η
	~4	0%		~85%	~60%	~50%
TAp63						α, β, γ
∆Np63						α, β, γ

Abb. 1: Schematische Struktur der *TP53*-Familie. Die Domänen von p53, p63 und p73 sind wie folgt gekennzeichnet: N-terminale Transaktivierungsdomäne (TA), DNA-Bindungsdomäne (DBD) und eine C-terminale Oligomerisierungsdomäne (OD). p63 und p73 weisen eine zusätzliche für Protein-Protein Interaktionen *sterile alpha motif*-Domäne auf (SAM). Von jedem Gen werden mehrere Isoformen produziert, resultierend aus der Nutzung eines zweiten intronischen Promotors (Δ 133p53, Δ Np63 und Δ Np73), einer alternativen Initiation der Translation und durch alternative Spleißmechanismen (Δ 40p53, Δ Ex2p73, Δ Ex2/3p73 und Δ N'p73). Alternatives Spleißen des C-Terminus resultiert ebenfalls in unterschiedlichen Isoformen (α , β , γ , δ , ϵ , θ , ξ und η). Die Homologien innerhalb der einzelnen Domänen zwischen den Genen sind angezeigt. (Stiewe, 2007)

Das 1997 identifizierte *TP73*-Gen gehört zusammen mit *TP63* zur *TP53*-Familie (Kaghad et al., 1997), deren Genstruktur von den Mollusken bis hin zum Menschen sehr konserviert ist. Der höchste Grad an Sequenz-Homologie zwischen den drei Genen ist in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TA), der zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD) und der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (OD) zu finden (Abb. 1) (Stiewe, 2007). In der DNA-Bindungsdomäne, dem am höchsten konservierten Bereich, sind dabei mehr als 97% der Tumor-assoziierten p53-Mutationen lokalisiert. Alle drei Familienmitglieder fungieren als Transkriptionsfaktoren und regulieren die Expression gleichartiger Gengruppen anhand von direkter Bindung an p53-responsive Elemente in Promotoren (Harms & Chen, 2006).

Das auf dem Chromosom 1p36 lokalisierte *TP73* Gen kodiert multiple Protein-Isoformen durch differentielle mRNA-Spleißmechanismen (Pozniak et al., 2000; Yang & McKeon, 2000) und alternative Nutzung von Promotoren (Abb. 2) (Kaghad et al., 1997). Sämtliche C-terminale Isoformen (p73 α - η 1) entstehen über alternatives Spleißen der Exons 10-14. Dabei ist zu beachten, dass die kurzen Isoformen p73 θ , η und η 1 keine TA-Domäne und die durch Exon 10 kodierte OD-Domäne enthalten (Scaruffi et al., 2000).

Die N-terminalen p73-Isoformen werden in die Transaktivierungs-kompetente Variante TAp73 und Transaktivierungs-defiziente Δ TAp73-Formen (Δ Ex2p73, Δ Ex2/3p73, Δ N'p73 und Δ Np73) subklassifiziert. Alle Varianten außer Δ Np73 werden über den TA-Promotor (P1) in der 5' nicht-translatierten Region stromaufwärts des nicht-kodierenden Exons 1 transkribiert. Die Aktivität des P1-Promotors wird dabei durch die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors E2F1 an E2F1-Bindungsstellen reguliert (Irwin et al., 2000; Seelan et al., 2002; Stiewe & Putzer, 2000). Zusätzliches alternatives Spleißen der Exone 2 bzw. 2/3 aus den P1-Transkripten führt zur Bildung der Δ TAp73-Formen (Δ Ex2p73, $\Delta Ex2/3p73$ und ∆N'p73), denen die charakteristische N-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt. Durch additives Spleißen zwischen Exon 3 und 4 besitzt nur das Transkript der ∆N'p73 Isoform das aus intronischer Sequenz abgeleitete Exon 3B. Im Gegensatz zu P1 kontrolliert der alternative P2-Promotor im Intron 3 die Synthese der ANp73-Transkripte, die, obwohl ihnen die normale p73-Transaktivierungsdomäne fehlt, eine aus 13 Aminosäureresten des N-Terminus zusammen mit PXXP-Motiven alternative Transaktivierungsdomäne aufweisen (Slade et al., 2004). Damit können auch die ∆Np73-Proteine, wenngleich weniger effizient wie die TAp73-Formen, als Transkriptionsfaktoren wirken. Obwohl die ΔNp73- bzw. ΔN'p73-Isoformen über unterschiedliche Promotoren transkribiert werden, sind die translatierten Proteine identisch, da das Leseraster die jeweiligen Domänen funktionstüchtig erfassen muss (Murray-Zmijewski et al., 2006; Putzer et al., 2003). Durch die Identifizierung einer putativen internal ribosomal entry site in Exon 2 wurde ein Mechanismus gefunden. durch zusätzlicher den $\Delta Np73$ -Proteine von ursprünglichen P1-Transkripten generiert werden können (Muller et al., 2005).



mRNA		promoter	protein	transactivation
TAp73			TAp73	+ (TA)
∆Ex2p73	1 3 4 5		∆Ex2p73	
∆Ex2/3p73		IA	∆Ex2/3p73	- (ATA)
∆N'p73	1 2 3 3B 4 5		41-72	(217)
∆Np73	38 4 5	ΔΝ	Дир73	

Abb. 2: Genomische Organisation, Domänenstruktur und Transkriptvarianten von *TP73*. (A) Genomische Organisation des *TP73* Gen-Locus. Exons sind durch Boxen und farblich zur Kennzeichnung der folgenden Domänenstruktur dargestellt: *rot* Transaktivierungsdomäne:

Kennzeichnung der folgenden Domänenstruktur dargestellt: rot, Transaktivierungsdomäne; orange, Exon 3B-abgeleitete kodierende Seguenz; blau, DNA-Bindungsdomäne; grün, Oligomerisierungsdomäne; gelb, C-Terminus; weiß, nicht-kodierende Seguenzen. Einige bedeutende C-terminale Spleißvarianten (α , β , γ , δ , ϵ und ζ) sind angezeigt. Die transkriptionellen Startpunkte der zwei Promotoren (TA- und AN-Promotor) sind durch Pfeile dargestellt. Spleißvarianten reguliert durch den TA-Promotor sind als $\Delta 2$ ($\Delta Ex2p73$), $\Delta 2/3$ (Δ Ex2/3p73) und Δ N' (Δ N'p73) gekennzeichnet. Die Δ Np73-Isoform wird vom kryptischen Δ N-Promotor in Intron 3 transkribiert. (B) Domänenstruktur der TAp73α-Isoform (Volllänge). Die Farben markieren die entsprechenden Domänen wie in (A) bereits beschrieben. (C) Variationen von N-terminalen Transkripten. Angezeigt sind die Exonstruktur der individuellen mRNAs, der für die Transkription verantwortliche Promotor, das zu kodierende Protein und das Transaktivierungspotential. Transaktivierungs-kompetente p73-Proteine werden als TAp73, Transaktivierungs-defiziente N-terminale trunkierte p73-Proteine als

ΔTAp73 bezeichnet. Zwei differentiell requierte Transkripte ($\Delta N'p73$ und $\Delta Np73$) kodieren das gleiche $\Delta TAp73$ -Protein (ANp73). Die Position der in RT-PCR sowie real-time PCR genutzten Primerpaare ist durch Pfeile gekennzeichnet (Stiewe et al., 2004).

1.1.2 Funktion von TAp73 als Tumorsuppressor

p73 weist zusätzlich zur strukturellen Homologie auch funktionelle Ähnlichkeiten zu p53 auf und lässt somit eine vergleichbare Tumorsuppressor-Funktion in humanen Tumoren vermuten. So kann p73 an p53-abhängige Promotoren binden, p53-responsive Gene transaktivieren und Zellzyklus-Arrest sowie Apoptose in Säugerzellen induzieren (Kaghad et al., 1997). In Übereinstimmung dazu hemmt der Verlust der transkriptionellen Aktivität von p73 die Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose (Jost et al., 1997; Kaghad et al., 1997; Zhu et al., 1998). Allerdings kann p73 viele aber nicht alle p53-abhängigen Zielgene aktivieren. So wird das Gen 14-3-3 σ stärker durch p73 als durch p53 induziert, wobei es sich bei den Genen p21 und HDM2 umgekehrt verhält (Zhu et al., 1998). Hinsichtlich der transkriptionellen Aktivität gibt es guantitative Unterschiede zwischen den C-terminalen TAp73-Isoformen, wobei p73ß als potentester Aktivator betrachtet wird (De Laurenzi et al., 1998; Melino et al., 2002). So kann p73β im Vergleich zu p73α stärker Apoptose induzieren (Sasaki et al., 2001). Dies wird dem Fehlen der SAM-Domäne in der p73β-lsoform gegenüber p73a zugesprochen.

In Abb. 3 ist schematisch dargestellt, dass vorwiegend onkogene und virale Faktoren auf die Bildung von p73 (A) bzw. das aktive Protein (B) einwirken, während die Zielgene dieses Transkriptionsfaktors hauptsächlich in die Funktionskategorien Apoptose und Zellzyklus (C) einzuordnen sind.



Abb. 3: Molekulare Interaktionen des p73. (A) Transkriptionelle Regulatoren, **(B)** physische Partner, **(C)** regulierte Zielgene von p73. Proteine sind entsprechend ihrer funktionellen Klasse gruppiert: Zellzyklus (blau), Apoptose (braun), Onkogene (gelb), Degradation/Inhibition (beige), Differenzierung (hellgrün) und virale Gene (dunkelgrün) (Melino et al., 2002).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass p53 funktionelles p73 benötigt, um Apoptose zu induzieren, was eine sehr enge Beziehung beider Proteine und ihrer Signalwege andeutet (Flores et al., 2002).

Obwohl die molekularen Mechanismen der p73-vermittelten Apoptose noch nicht im Detail beschrieben wurden, wird angenommen, dass p73 fast identisch die bereits für p53 identifizierten Signalwege nutzt. So ist p73 in der Lage, die Transkription von verschiedenen apoptotischen Regulatoren, z. B. BAX, p53AIP1 (Costanzo et al., 2002; Zhu et al., 1998), PERP, NOXA (Flores et al., 2002), PUMA und CD95 (Muller et al., 2005) zu steuern, die auch durch p53 induziert werden. p73 kann auch indirekt durch Modulation der p53 Funktion zur Aktivierung von Apoptose beitragen. Die Bindung von p73 an MDM2 führt zur Ablösung von MDM2 und somit zur Hemmung der p53-Degradation durch MDM2, resultierend in verstärkter p53-Aktivität und letztendlich in der apoptotischen Funktion (Abb. 4).



Abb. 4: p73 Signalwege zur Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose nach Schädigung der DNA. Durch Cisplatin, UV- oder γ-Strahlung verursachte DNA-Schädigung löst einen durch MLH1 und c-ABL vermittelten p73 Signalweg aus. Dieser Signalweg ist unabhängig vom p53 Status und Aktivierung. Der Mechanismus zur Auslösung von Apoptose durch p73 umfasst die Transaktivierung verschiedener Gene, einschließlich Bcl2 Familienmitglieder - Unterklasse BH3 (z. B. *BAX, NOXA, PUMA*) – Todesrezeptoren (*CD95*), und andere Zielgene (z. B. *p53AIP1* und *PERP*). Zusätzlich führt die Bindung von p73 an MDM2 zur Hemmung der p53-Degradation durch MDM2, resultierend in verstärkter p53-Aktivität (Melino et al., 2002).

1.1.3 Onkogene Wirkungsweise der **ΔTAp73-Isoformen**

Besondere **TP73** differentielle Das an ist. dass durch mRNA-Spleißmechanismen und alternative Nutzung von Promotoren multiple TAp73und $\Delta TAp73$ -Isoformen entstehen, die antagonistische Funktionen aufweisen. Einerseits kann TAp73 p53-Zielgene anschalten und Zellzyklus-Arrest sowie Apoptose induzieren, andererseits inhibiert Δ TAp73 sowohl TAp73- als auch p53-induzierten Zellzyklus-Arrest und Apoptose (Ishimoto et al., 2002; Nakagawa et al., 2002; Zaika et al., 2002). Wie in Abb. 5 agiert Δ TAp73 als dominant-negativer Inhibitor durch direkte Kompetition der DNA-Bindung (A) und/oder durch Bildung von Heteroduplex-Strukturen mit TAp73 sowie p53 (B) (Slade et al., 2004; Stiewe et al., 2002a; Zaika et al., 2002). Da nur das TAp73-Homotetramer transkriptionell aktiv ist, ergibt die Konglomeration von TA- mit Δ TAp73-Formen inaktive Heterotetramere.

Die ∆Np73-Expression vom alternativen Promotor wird durch p53 und TAp73vermittelte Bindung des p53-spezifischen Elements in der P2-Region reguliert (Nakagawa et al., 2003), wodurch eine dominant-negative *feedback* Schleife kreiert wird, die analog dem p53-MDM2-Mechanismus p53- und p73-Funktionen reguliert (Grob et al., 2001; Kartasheva et al., 2002; Nakagawa et al., 2002).



Abb. 5: Modell des dominant-negativen Mechanismus von ΔTAp73. (A) Inhibition von p53 durch direkte Kompetition der Promotorbindung. **(B)** Inhibition von TAp73 durch Kompetition der Promotorbindung und/oder Bildung von Transaktivierungs-defizienten Heterotetrameren (Stiewe et al., 2002a).

Dies ist ein weiteres Indiz für die Hypothese, dass die gegensätzlichen Isoformen TAp73 und Δ TAp73 in funktioneller wie auch regulativer Hinsicht ineinander greifen.

Genetische Analysen in den meisten Tumorspezies schließen p73 als klassischen *Knudson-type* Tumorsuppressor aus, der per Definition Ziel von genetischen Modifikationen oder Antagonisten ist, um einen Verlust der Expression oder Funktion während der Tumorgenese zu erreichen. So ist das *TP73*-Gen im Gegensatz zu *TP53* ausgesprochen selten mutiert, obwohl diese Region einen in Tumoren häufig deletierten Bereich darstellt (Kaghad et al., 1997; Stiewe & Putzer, 2001). Zusätzlich wird das p73-Protein, verglichen mit p53, durch die meisten bedeutenden viralen Onkoproteine wie z. B. das *simian virus* 40 (SV40) T-Antigen (Reichelt et al., 1999) oder adenovirale E1B-Protein nicht inaktiviert (Wienzek et al., 2000). Während p53-defiziente Mäuse spontane Tumoren entwickeln, sind p73-defiziente Mäuse tumorfrei und weisen verschiedene Fehlentwicklungen wie Hydrocephalus, hippocampale Defekte, chronische Infektionen und Abnormalitäten der Sensorik für Pheromone auf (Yang et al., 2000). Die meisten der p73-defizienten Mäuse starben innerhalb von zwei Monaten nach der Geburt in Folge von Infektionen.

Aufgrund der antagonistischen Wirkungsweise gegenüber TAp73 wurde die Rolle von *ATAp73* als potentielles Onkogen in der Tumorgenese analysiert. So wurde beschrieben, dass die Überexpression von Δ TAp73 in NIH3T3-Zellen zur Transformation der Fibroblasten und nach Injektion in Nacktmäusen zur Entwicklung von Tumoren führt (Stiewe et al., 2002b). In MEFs (mouse embryo *fibroblasts*) induziert überexprimiertes ΔNp73 in Nacktmäusen nach subkutaner Injektion Fibrosarkome (Petrenko et al., 2003). Erst kürzlich wurde berichtet, dass transgene Mäuse, die Δ TAp73 in der Leber überexprimieren, gesteigerte Proliferation von Hepatozyten aufweisen, welche in prä-neoplastischen Läsionen und später in Entwicklung hepatozellulärer Karzinome resultiert (Tannapfel, Buhlmann et al., 2008). Alle diese Daten demonstrieren im Gegensatz zu TAp73 die Onkogenität der ∆TAp73-Isoformen, denen die für die Tumorsuppressor-Funktion notwendige TA-Domäne fehlt. Infolge umfangreicher Studien zur Analyse der Isoform-spezifischen p73-Expression in zahlreichen Zelllinien (Stiewe et al., 2002b) sowie primären Tumorsspezies (Becker et al., 2006; Casciano et al., 2002; Douc-Rasy et al., 2002; Muller et al.,

2005; Stiewe et al., 2004) wird vermutet, dass eher die dominant-negativen Δ TAp73 als TAp73-Isoformen die physiologisch relevanten Komponenten der Tumor-assoziierten p73-Überexpression darstellen, die oft einen gleichzeitigen Anstieg der TAp73-Expression außer Kraft setzen. In Übereinstimmung mit ihrer anti-apoptotischen und onkogenen Rolle stellen Δ TAp73-Formen einen adversen prognostischen Marker für eine Reihe von Tumorerkrankungen dar (Casciano et al., 2002; Guan & Chen, 2005; Stiewe et al., 2004; Tuve et al., 2004). Es ist daher anzunehmen, dass die Feinabstimmung des TA: Δ TA-Verhältnisses innerhalb des individuellen zellulären Kontextes die Funktionalität von p73 bestimmt. Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass eher eine erhöhte Expression von Δ TAp73 als inaktivierende Mutationen in *TP73* mit der Krebsentstehung assoziiert ist.

Das steigende Interesse an N-terminal trunkierten p73-Isoformen ist durch deren bedeutende Rolle als Regulatoren zellulärer Reaktionen auf die Tumorsuppressor-bedingte Kontrolle des Tumorwachstums begründet. Als Komponenten einer komplexen Interaktion mit anderen Mitgliedern der p53-Familie und weiteren Transkriptionsfaktoren (z. B. E2F) beeinträchtigen sie die entscheidenden Tumorsuppressor-Signalwege, die der Entstehung von genetisch veränderten Zellen vorbeugen und letztendlich in der Tumorentstehung resultieren (Abb. 6).





1.2 Das Hepatitis B Virus

Hepatitis B ist eine der am häufigsten auftretenden Krankheiten weltweit und verursacht somit ein ernsthaftes öffentliches Gesundheitsproblem. Trotz globaler Impfaktionen gegen das Hepatitis B Virus (HBV) seit Beginn der 80er Jahre in Regionen der Welt, in denen die chronische (lebenslange) Hepatitis endemisch ist (Kane, 1995), sterben weiterhin jährlich etwa 1 Mio. Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion (Zuckerman & Zuckerman, 2000). Bei bis zu 10% der Infizierten entwickelt sich eine chronische HBV-Infektion, die nach Jahrzehnten mit der Entwicklung einer Zirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom (HCC) enden kann. Dabei tragen chronische HBV-Träger ein über 100-fach höheres Risiko gegenüber nicht infizierten bzw. HBV-immunen Personen, an einem HCC zu erkranken (Beasley et al., 1981). Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) haben sich mehr als zwei Milliarden Menschen weltweit mit dem Hepatitis B Virus infiziert, wovon 350-400 Millionen chronische HBV-Träger sind (Zuckerman & Zuckerman, 2000).

1.2.1 Klassifikation, Struktur und Genomaufbau

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zu einer Familie von Viren, die aufgrund ihres Lebertropismus (*griechisch* = Hepar) und ihres DNS-Genoms (*englisch* = DNA) als Hepadnaviren bezeichnet werden. Die Vertreter der Familie *Hepadnaviridae* werden weiter in die Genera *Orthohepadnaviridae*, die Säugetiere als Wirte nutzen, und die *Avihepadnaviridae*, die Vögel infizieren, klassifiziert. HBV wird in acht Genotypen (A-H) sowie weitere Subgenotypen unterteilt. Die Tatsache, dass alle aufgeführten Hepadnaviren mittels reverser Transkription einer prägenomischen (pg) RNA replizieren, weist auf eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Retroviren hin und führte zu dem Beinamen der Pararetroviren.

Die infektiösen Viruspartikel haben eine sphärische Gestalt mit einem Durchmesser von 42-45 nm und werden nach ihrem Entdecker auch als Dane-Partikel bezeichnet (Dane et al., 1970) (Abb. 7A/B). Innerhalb der Hüllmembran befindet sich ein ikosaedrisches Nukleokapsid, das aus 180 bzw.

240 Untereinheiten des core-Proteins HBc besteht (Bottcher et al., 1997; Conway et al., 1997; Crowther et al., 1994) (Abb. 7C). Die Virion-DNA besteht aus einem zirkulären und partiell doppelsträngigen DNA-Molekül (Summers et al., 1975) von ca. 3,2 kBp Größe, das nicht kovalent geschlossen ist, sondern durch eine Überlappungsregion zwischen den als DR1 und DR2 (*direct repeat* 1) bzw. 2) bezeichneten Sequenzen zusammengehalten wird (Abb. 8). Das Genom beinhaltet vier offene Leserahmen, die sich teilweise überlappen und alle in einer Richtung abgelesen werden. Sie kodieren für vier Transkriptionsprodukte von 3,5; 2,4; 2,1 und 0,9 kB Länge (Abb. 8). Es existiert nur ein einzelnes Polyadenylierungs-Signal (poly A), so dass alle HBV-Transkripte das gleiche 3'-Ende besitzen. Der größte offene Leserahmen kodiert für die virale Polymerase, die mit ihren vier Domänen neben ihrer Funktion als DNA-abhängige DNA-Polymerase noch als terminales Protein (Primase), reverse Transkriptase und RNase H aktiv ist (Abb. 8). Der Primase-Anteil ist kovalent an das 5'-Ende des kodierenden DNA-Strangs im Partikel gebunden (Gerlich & Robinson, 1980), während die reverse Transkriptase mit dem 3'-Ende nicht kovalent assoziiert ist.



Abb. 7: Morphologie und schematische Darstellung des Hepatitis B Virus (HBV). (A/B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von aufgereinigten HBV-Partikeln (A) und HBs-Filamenten (B) aus dem Plasma eines hoch virulenten persistierenden HBV-Trägers. (C) Schematischer Aufbau des HBV-Partikels. SHBs, MHBs, LHBs: <u>Small, Middle und Large</u> <u>Hepatitis B</u> Virus <u>surface protein</u> (kleines, mittleres und großes HBV-Hüllprotein); S, PräS1 und PräS2: S-, PräS1- und PräS2-Domäne der HBV-Hüllproteine; HBc: Hepatitis B *core* Protein (HBV-Nukleokapsid-protein); RT, Pr: Reverse Transkriptase und Primase-Anteile der HBV-Polymerase; Hsc70: Heat shock cognate 70; PKC: Proteinkinase C (Schaefer & Gerlich, 2007).

Ein weiterer Leserahmen kodiert für die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs (Small, Middle und Large Hepatitis B Virus surface protein), die zusammen mit einer zellulären Lipidmembran des endoplasmatischen Retikulums die äußere virale Hülle bilden (Abb. 7C). Die drei Proteine weisen einen identischen Carboxyterminus auf, unterscheiden sich jedoch am Aminoterminus. So besteht das SHBs nur aus der S-Region, während das MHBs um die präS2-Domäne und das LHBs um die Domänen präS1 und präS2 verlängert ist (Abb. 7C). Die Topologie des LHBs ist variabel; die präS1-Domäne kann sowohl auf der viralen Hülle exponiert als auch nach innen gerichtet vorliegen (Bruss & Gerlich, 1988; Seitz et al., 2007), wo sie unter u. U. über das zelluläre HSC 70 Protein (heat shock cognate 70) mit dem Kapsid verbunden ist (Loffler-Mary et al., 1997). Der dritte Leserahmen mit seinen zwei Startcodons kodiert für das virale core-Protein (HBc) und durch die Benutzung des stromaufwärts der präC-Region gelegenen Translationsstartes für das HBe-Protein (HBeAg) (Abb. 8). Durch eine Aggregation der core-Proteine zu Kapsidpartikeln während der Replikation kommt es zur Verpackung der pgRNA zusammen mit der viruseigenen Polymerase (Hirsch et al., 1990) und zusätzlichen zellulären Faktoren wie einer Proteinkinase C (Albin & Robinson, 1980; Gerlich et al., 1982; Kann & Gerlich, 1994; Kann et al., 1993) und dem Hitzeschockprotein Hsp90 (Hu & Seeger, 1996; Hu et al., 1997). Der gleiche Leserahmen ist auch durch Benutzung eines zweiten, stromaufwärts der PräC-Region gelegenen Translationsstarts für die Bildung des HBe-Proteins (HBeAg) verantwortlich. Dieses wird nach amino- und carboxyterminaler Verkürzung (Bruss & Gerlich, 1988; Standring et al., 1988) von den infizierten Zellen sezerniert und ist im Serum nachweisbar (Magnius & Espmark, 1972). Die Herkunft des Buchstabens "e" zur Bezeichnung dieses HB-Antigens ist ungeklärt. Der vierte offene Leserahmen kodiert für das HBV-X-Protein (HBx), dessen Name sich daher ableitet, dass zum Zeitpunkt seiner Entdeckung keine homologen zellulären oder viralen Proteine bekannt waren, durch die sich die Funktion von HBx hätte einordnen lassen (Abb. 8). HBx ist ein regulatorisches Protein mit pleiotropen biochemischen Aktivitäten. So wird es für die Virusproduktion in vitro von transfizierten Zellen nicht benötigt (Blum et al., 1992). Im Gegensatz dazu findet in vivo ohne das Woodchuck Hepatitis X Protein keine Infektion im Waldmurmeltier statt (Chen et al., 1993; Zoulim et al.,

1994). Ähnlich wie die frühen Regulationsgene anderer Viren (z.B. das E1A-Gen der Adenoviren oder das SV40 Tumorantigen) ist das HBx in der Lage, neben den HBV-eigenen Promotoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Reihe viraler und zellulärer Promotoren zu transaktivieren (Balsano et al., 1994; Spandau & Lee, 1988; Twu & Schloemer, 1987). Diese Fähigkeit wird unter Umständen durch eine Protein-Protein Interaktion vermittelt, da HBx selbst keine DNA-bindenden Fähigkeiten aufweist.



Abb. 8: Genomorganisation des HBV. Die offenen Leserahmen (ORFs) des HBV-Genoms sind farblich unterschiedlich dargestellt: Leserahmen für die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs (*Small, Middle und Large Hepatitis B Virus Surface Protein*) (rot); Leserahmen für *core*-Protein (blau); Leserahmen für Polymerase (grün); Leserahmen für X-Protein (gelb). Zusätzlich sind die regulatorischen Elemente des Genoms gekennzeichnet. PpreS1: präS1-Promotor, PpreS2/S: S-Promotor, CP: prä-*core/core*-Promotor, Px: X-Promotor (grau). Enh I/II: Enhancer I und II, NRE Negativ-regulatorisches Element, GRE: Glucocorticoid-responsibles Element (schwarz). Außen sind die transkribierten HBV-RNA Produkte durch Linien gezeigt (*pregenomic* mRNA, e mRNA, LHBs mRNA, MHBs und SHBs mRNA, x mRNA). PRE: Post-transkriptionales-regulatorisches Element (grau), ε: Verpackungssignal (schwarz), poly A: Polyadenylierungsstelle, DR1/DR2: *Direct repeat* 1 und 2 (hellblau). Die schwarzen Dreiecke stellen die unterschiedlichen 5'-Enden der HBV-RNAs dar.

Verschiedene Befunde deuten auf eine tumorigene Wirkung des HBx hin. Es konnte gezeigt werden, dass HBx alleine unter der Kontrolle seines eigenen Promotors in der Lage ist, verschiedene Zelllinien zu transformieren (Koike et al., 1989; Seifer et al., 1991). Da der tumorigene Effekt von HBx schwach ist, benötigt es zusätzliche karzinogene Faktoren. In Gegenwart eines zweiten transformierenden Faktors, wie z. B. dem Onkogen c-myc, konnte in anderen HBx-transgenen Mauslinien ein erhöhtes Auftreten von Leberkarzinomen beobachtet werden (Slagle et al., 1996; Terradillos et al., 1997).

1.2.2 Der HBV-Lebenszyklus

Die Replikation des Virus erfolgt ausschließlich in Leberzellen und ähnelt aufgrund der Beteiligung eines reversen Transkriptionsschrittes der Replikation bei Retroviren. Wie schematisch in der Abb. 9 dargestellt, erfolgt der Eintritt von umhüllten Viren in ihre Zielzelle durch die Bindung der präS1-Domäne an einen unbekannten hoch affinen Rezeptor auf der Zellmembran (Engelke et al., 2006; Glebe et al., 2005), gefolgt von einer Fusion der viralen Hülle mit der zellulären Membran (Penetration). Die Aufnahme des Virus durch Endozytose und die Freilassung des Nukleokapsids nach Entfernung der Virushülle werden dabei durch die S-Domäne des LHBs vermittelt. Das Nukleokapsid wird durch Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Rabe et al., 2006) und gelangt durch Kernporen (nuclear pore complex, NPC) in den Zellkern, wo es schließlich das virale Genom in das Nukleoplasma entlässt (Schmitz und Kahn, unpublizierte zelluläre Daten). Durch ubiquitäre DNA-Reparaturenzyme wird der Einzelstrangbereich des Virusgenoms zum Doppelstrang komplettiert (Kock & Schlicht, 1993), so dass die ccc-Form (covalently closed circular) der viralen DNA als Minichromosom mit Nukleosomen assoziiert vorliegt (Bock et al., 1994). Die Anwesenheit von cccDNA in Hepatozyten zeigt eine erfolgreiche Initiation einer Infektion an (Ruiz-Opazo et al., 1982). Von der cccDNA ausgehend werden nun die mRNAs für die viralen Proteine und das RNA-Prägenom synthetisiert. Die für die Polymerase und HBc kodierende mRNA ist multifunktionell und fungiert auch als Vorläufer des viralen Genoms (pgRNA). Im Zuge des Nukleokapsidzusammenbaus durch HBc-Proteine wird die pgRNA

zusammen mit der viralen Polymerase in das Viruskapsid integriert (Seeger et al., 1986), wo die Replikation des Virus erfolgt. Nach der Vollendung der DNA-Synthese (*genome maturation*) können die neu gebildeten Nukleokapside zwei unterschiedliche Wege einschlagen: Zum einen können sie deassemblieren und nach dem Transport durch die Kernporen wieder die virale DNA in den Zellkern freisetzen (Tuttleman et al., 1986). In der frühen Phase der Infektion führt dieser Reimport des viralen Genoms zur Akkumulation von cccDNA, resultierend in der Etablierung einer persistenten Infektion der Zelle ohne stabile Integration der viralen DNA. Zum anderen können Nukleokapside mit den in der ER-Membran eingelagerten Oberflächenproteinen interagieren und bilden dann wahrscheinlich durch Knospung neue reife Viruspartikel, die dann über den Golgi-Apparat ohne lytischen Effekt von der Leberzelle aktiv ins Blut freigesetzt werden (Blum et al., 1989).



Abb. 9: Intrazellulärer Lebenszyklus von HBV. NPC, *nuclear pore complex*; pol, Polymerase; ER, endoplasmatisches Retikulum. Die mRNAs sind als Wellenlinien dargestellt (Schaefer & Gerlich, 2007).

1.2.3 Transkriptionsregulation des HBV-Genoms

Die Transkription des HBV-Genoms erfolgt von den vier Promotoren präcore/core-Promotor (cp), präS1-Promotor (PpreS1), S-Promotor (PpreS2/S auch präS2-Promotor genannt) und dem X-Promotor (Px) (Abb. 8). Der präS1-Promotor kontrolliert die Transkription der 2,4 kB mRNA, welche für das große Oberflächenprotein LHBs kodiert. Der S-Promotor kontrolliert die Transkription der 2,1 kB mRNA. Durch das Benutzen von zwei verschiedenen Startcodons werden hier die Oberflächenproteine SHBs und MHBs translatiert. Während der präS1-Promotor den Start der Transkription mittels einer klassischen TATA-Box vermittelt (Raney et al., 1994), reguliert der S-Promotor diese ohne ein TATA-Box Motiv mittels zweier Initiationssequenzen (Zhou & Yen, 1991). Der präcore/core-Promotor (nt 1702-1805) reguliert die Expression der 3,5 kB mRNA. Sie dient als Template für die reverse Transkription bei der Replikation und beinhaltet neben dem größten offenen Leserahmen, welcher für die virale Polymerase kodiert, noch den Leserahmen für das core-Antigen (HBcAg). Auch hier treten zwei verschiedene Startcodons auf, so dass neben HBc noch das e-Antigen (HBeAg) translatiert wird. Der X-Promotor (nt 1230-1376) reguliert die Transkription der X-mRNA. Die Aktivität der Promotoren wird durch die zwei Enhancer-Elemente reguliert. Der Enhancer I (EI) liegt an Position 1080-1234 und überlappt mit dem X-Promotor (Guo et al., 1991; Shaul et al., 1985), während der Enhancer II (EII) stromaufwärts des prä-core/core-Promotors an Position 1636-1741 lokalisiert ist (Yee, 1989). Enhancer bewirken eine Aktivierung der Genexpression, indem sie mittels intermediärer Faktoren Signale zwischen einem Aktivator am Enhancer und einem basalen Transkriptionsfaktor am Promotor übermitteln. Ihre Funktion ist in gewissen Grenzen positions- und orientierungsunabhängig. Sie können sowohl 5' als auch 3' von der Transkriptions-Initiationssequenz in Introns, Exons und sogar auf der transkribierten mRNA lokalisiert sein (Ogbourne & Antalis, 1998). Die Tatsache, dass beide HBV-Enhancer in der Lage sind, alle vier HBV-Promotoren die zu regulieren, verdeutlicht Bedeutung des engen Zusammenspiels beider Enhancer, um eine effiziente Expression bzw. Replikation zu gewährleisten (Su & Yee, 1991). Lebertropismus ist ein wesentliches Merkmal der HBV-Infektion. Während der Enhancer I sowohl in humanen Hepatomzelllinien als auch in anderen humanen Zellen aktiv ist (Ben-Levy et al., 1989; Shaul et al., 1985), scheint der Enhancer II für den strikten Lebertropismus verantwortlich zu sein (Shaul et al., 1985). Hierbei ist vor allem die Transkription der pgRNA und die virale Replikation von der Expression leberspezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig (Tang & McLachlan, 2001). Innerhalb der beiden Enhancer-Regionen wurden zahlreiche Bindungsstellen sowohl für leberspezifische als auch für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kosovsky et al., 1998) (Abb. 10). So konnte eine Bindung des Tumorsuppressors p53 (Ori et al., 1998) sowie weiterer Transkriptionsfaktoren wie z. B. NF1 (*nuclear factor 1*), AP1 (*activator protein 1*) oder C/EBP (CCAAT*enhancer binding protein*) an den Enhancer I gezeigt werden (Ben-Levy et al., 1989; Lopez-Cabrera et al., 1990). Die teilweise ubiquitäre Expression dieser Transkriptionsfaktoren könnte eine weitere Erklärung dafür sein, warum der Enhancer I nicht nur in Hepatomzelllinien, sondern auch in anderen Zelllinien Aktivität aufweist.



Abb. 10: Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Region des HBV Enhancer I. Dargestellt ist die Enhancer I Region (nt 1080-1234) mit ihren Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Bindungsstellen für ATF2 (*activating transcription factor 2*) (Choi et al., 1997) und CREB (cAMP *response element binding factor*) (Williams & Andrisani, 1995) sind ebenfalls angezeigt.

Für den Enhancer II konnten neben Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie (Raney et al., 1997) HNF4 (*hepatocyte nuclear factor*), RXR (*retinoid X receptor*), PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) und COUP-TF1 (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor*) (Yu & Mertz, 1997) noch weitere wie z. B. für Sp1 (SV40 *promoter protein 1*) (Yu & Mertz, 1996; Zhang et al., 1993), HNF3 (Johnson et al., 1995; Li et al., 1995), FTF (*fetoprotein transcription factor*) (Gilbert et al., 2000; Ishida et al., 2000),

C/EBP (CCAAT-*enhancer binding protein*) (Ben-Levy et al., 1989) und das TATA-*box-binding protein* (TBP) (Chen et al., 1995) beschrieben werden (Abb. 11). Dabei spielt der Transkriptionsfaktor Sp1 eine essentielle Rolle bei der Regulation der HBV-Genexpression. Wie in Abb. 11 dargestellt, hat Sp1 zwei Bindungsstellen im *core*-Promotor und eine im stromaufwärts liegenden Enhancer II (Yu & Mertz, 1996; Zhang & McLachlan, 1994; Zhang et al., 1993). Für beide Bindungsstellen im *core*-Promotor wurde gezeigt, dass sie bedeutend für die Transkription der prä-*core*- und *core*-RNA sind. Die Enhancer II-Bindungsstelle ist aber für die positive Regulation der Expression aller HBV-Gene verantwortlich, denn Eliminierung dieser Bindungsstelle durch Mutation führte zur Repression der gesamten HBV-Genexpression (Li & Ou, 2001).

Neben der Kontrolle durch die Bindung der beschriebenen zellulären Transkriptionsfaktoren verfügt das Hepatitis B Virus über weitere eigene *cis*und *trans*-wirkende Elemente zur Regulation seiner beiden Enhancer. Stromaufwärts des Enhancers II an Position 1613-1636 (Kernelement 1616-1621) befindet sich ein Negativ-regulatorisches Element (NRE) (Abb. 8), welches die Enhancer II Aktivität reprimiert (Lo & Ting, 1994). So führte z. B. eine Überexpression des NREBP (NRE *binding protein*) in transienten Transfektionsversuchen zu einer Repression der HBV-Genexpression und der Virusproduktion durch die direkte Bindung an NRE (Sun et al., 2001). Außerdem wurde ein Post-transkriptionales-regulatorisches Element (PRE) identifiziert (Abb. 8), welches durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit zellulären RNA Prozessierungs- bzw. Transportfaktoren den Export der HBVmRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma unterstützt (Huang & Liang, 1993; Huang & Yen, 1994; Huang & Yen, 1995).



Abb. 11: Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im HBV core-Promotor/Enhancer II (cp/EII). Dargestellt ist der HBV core-Promotor/Enhancer II (Enhancer II nt 1636-1741, präcore/core-Promotor nt 1702-1805) mit den Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Bindungsstellen für RFX1 (Siegrist et al., 1993) und NREBP (NRE *binding protein*) sind ebenfalls angezeigt (Sun et al., 2001).

Eine *trans*-Regulation der Expression des Hepatitis B Virus erfolgt über das viruseigene HBx-Protein, welches die HBV-eigenen Promotoren transaktiviert. Diese Transaktivierung wird u. a. über den Enhancer I vermittelt (Doria et al., 1995), indem HBx infolge einer Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren deren DNA-Bindungsspezifität positiv beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass HBx eine Bindung der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF2 an den Enhancer I fördert (Maguire et al., 1991). Außerdem wird dem großen Hüllprotein (LHBs) des Hepatitis B Virus neben seiner Aufgabe beim Assembly der viralen Partikel eine Funktion als Transaktivator viraler Promotoren zugesprochen (Hildt et al., 1996).

1.2.4 Regulation der HBV-Expression durch die p53-Familie

Neben der Bedeutung als Tumorsuppressor spielt p53 auch eine entscheidende Rolle in der Abwehr des sich ausbreitenden Virus in Wirtszellen. So ist die Inaktivierung der p53-Funktion eines der bedeutendsten Ereignisse in der viralen Transformation. Das adenovirale E1B-Protein (Sarnow et al., 1982; Yew & Berk, 1992), das große T-Antigen des SV40 (McCormick et al., 1981; Mietz et al., 1992) sowie das HBV X-Protein (Doitsh & Shaul, 1999; Lee & Rho, 2000; Truant et al., 1995) sind Beispiele von viralen Transaktivatoren, die p53 direkt binden und dessen Tumorsuppressor-Funktion inhibieren können. Auch für HBc konnte gezeigt werden, dass dieses virale Onkogen als Repressor der *TP53*-Promotoraktivität durch Reduktion der DNA-Bindung von E2F1 an den Promotor fungiert (Kwon & Rho, 2003). Somit können HBx und HBc synergistisch die Expression des *TP53*-Gens inhibieren.

Durch weitere Studien konnte eine Repression der HBV-Transkription sowie Replikation durch p53 beschrieben werden. So reprimiert p53 den Enhancer II indirekt über eine Protein-Protein-Interaktion (Lee et al., 1998; Lee et al., 1995). Uchida et al. berichtete ebenfalls über die Inhibition des HBV core-Promotors durch p53. um somit dem karzinogenen Prozess in der Leber entgegenzuwirken (Uchida et al., 1996). Außerdem konnte auch für den Enhancer I eine Repression durch p53 festgestellt werden. Hierbei bewirkt p53 jedoch über eine spezifische direkte Bindung an die 5'-Region innerhalb des Enhancers I eine Hemmung der Aktivität. Interessanterweise haben Mutationen innerhalb dieses Bereiches eine positive Stimulation des Enhancers zur Folge (Ori et al., 1998).

Auch für p73 wurde eine Inhibition der HBV-Transkription durch Repression des xp/EI beschrieben (Xu et al., 2002). Zusammengefasst führen offensichtlich Interaktionen der p53-Familie mit regulatorischen HBV-Elementen zur Hemmung der HBV-Transkription als Teil von Abwehrmechanismen gegen die Ausbreitung des Virus in der Wirtszelle.

1.3 Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) steht an fünfter Stelle der weltweit häufigsten Krebserkrankungen, ist aber aufgrund einer sehr schlechten Prognose die dritthäufigste durch Krebs verursachte Todesfolge (Parkin, 2004). Die Inzidenz dieser Tumorart zeigt eine starke geographische Variation und ist am höchsten in Südostasien sowie West- und Zentral-Afrika, wo Leberkrebs allein 25% der auftretenden Krebserkrankungen bei Männern darstellt. Global gesehen, treten 81% aller Erkrankungen in den Entwicklungsländern auf, wobei China mit 54% den größten Anteil aufweist. Deutschland zählt wie die meisten Industrieländer mit Japan als Ausnahme zu den Gebieten mit niedriger Prävalenz (Parkin, 2004). Die meisten Erkrankten sterben innerhalb relativ kurzer Zeit aufgrund einer oftmals späten Diagnose, nur 3% überleben fünf oder mehr Jahre (Feitelson & Duan, 1997).

Die Entstehung eines HCC ist auf zellulärer Ebene eng damit verknüpft, dass Hepatozyten, von denen sich die meisten in der normalen Leber in einem teilungsinaktiven Ruhezustand (G0) befinden, durch verschiedene molekulare Faktoren zu einem Eintreten in den Zellzyklus und ständiger Proliferation gebracht werden (Abb. 12). Die Leberzellproliferation wird von der Anwesenheit verschiedener Überlebensfaktoren bestimmt, die sowohl exogen als auch – nach Mutationen – endogen auf die Zelle einwirken und sie zur Proliferation veranlassen können. Wenn diese Faktoren in einer ungeeigneten Kombination oder gar nicht vorhanden sind, kann dies zur Apoptose führen oder dazu, dass die Progression des Zellzyklus durch Tumorsuppressor-Proteine wie p53 oder Retinoblastom (RB) gehemmt wird. Die Anhäufung mehrerer Mutationen, die Überlebensfaktoren abnormal aktivieren oder Tumorsuppressor-Gene inaktivieren, kann zur Transformation, Progression und der Entwicklung eines HCCs führen.



Abb. 12: Leberzellproliferation und HCC. G1, S, G2, M stellen die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus dar. DNS-Rep.: DNS-Reparatur.

Auf der Ebene des gesamten Organs Leber geht der Entwicklung eines HCC in 80% der Fälle eine Leberzirrhose voraus, die auch die Folge einiger Hauptrisikofaktoren der HCC-Entwicklung ist. Dazu gehören neben dem Hepatitis C Virus (HCV), Alkohol, Aflatoxinen und erblichen Leberkrankheiten wie Hämochromatose, α₁-Antitrypsinmangel und Tyrosinämie auch die chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV). Sie ist mit einer Beteiligung von über 50% aller HCC-Fälle die Hauptursache für die Entwicklung dieses Karzinoms (Pisani et al., 1997). Die chronischen HBV-Träger haben gegenüber nicht infizierten oder HBV-immunen Personen ein über 100fach erhöhtes Risiko, an Leberkrebs zu erkranken (Beasley et al., 1981). Die Abb. 13 zeigt die epidemiologischen Zusammenhänge zwischen HBV-Infektion und HCC-Entwicklung genauer auf.



Abb. 13: HBV-Infektion in endemischen und nicht-endemischen Gebieten, Entwicklung von Chronizität und Leberkarzinomen. Modifiziert nach (Buendia, 1998).

Von den momentanen Behandlungsstrategien repräsentieren die chirurgische Tumorresektion sowie Lebertransplantation die effektivsten Methoden, wobei die Chemotherapie und perkutane Ethanol-Injektion nur zur Linderung der Krankheit beitragen (Colombo, 1997; Dusheiko et al., 1992; El-Serag & Mason, 1999). Potentiell vielversprechende therapeutische Ansätze zur Behandlung des HCCs beinhalten die Aktivierung von Tumorsuppressor-Genen, die Inhibition von abnormal überexprimierten Onkogenen, die spezifische Apoptose-Induktion von Krebszellen durch "Selbstmord"-Gentherapie, konditionelle replikative Adenovirus-Strategie sowie Immunmodulation oder Hemmung der Tumorangiogenese (Tran et al., 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus gilt als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). So weisen chronische HBV-Träger gegenüber nicht infizierten oder HBV-immunen Personen ein über 100fach erhöhtes Risiko auf, an HCC zu erkranken. Umfangreiche Studien zeigen, dass die erhöhte Akkumulation von p73, insbesondere der spezifischen N-terminal trunkierten ∆TAp73-Isoformen, in primären HCC-Tumoren eine bedeutende Rolle bei der Malignität spielen, einhergehend mit einer oftmals sehr schlechten Prognose für den Patienten.

Des Weiteren wurde über Interaktionen von p53/p73 mit regulatorischen HBV-Elementen als Teil einer Abwehrstrategie gegen die Ausbreitung des Virus in den Wirtszellen berichtet. Der core-Promotor/Enhancer II, als ein zentrales Element bei der Regulation der HBV-Replikation, wird durch p53 sowie Transaktivierungs-kompetentes TAp73 indirekt durch eine Protein-Protein-Interaktion reprimiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung des molekularen Mechanismus der p73-vermittelten Regulation der HBV cp/EII-Transkription. Aufgrund der potentiellen Onkogenität der N-terminalen Transaktivierungs-defizienten ∆TAp73-Spleißvarianten im Vergleich mit Transaktivierungs-kompetenten TAp73-Isoformen soll der Einfluss beider Antagonisten auf die cp/EII-Aktivität, HBc-Transkription sowie HBV-Replikation untersucht werden. Zusätzlich soll die indirekte Protein-Protein-Interaktion von p53/p73 als Ursache der cp/EII-Repression näher charakterisiert werden. Somit wird zum ersten Mal der Effekt von potentiell onkogenem ATAp73 auf die Regulation der HBV-Transkription sowie Replikation analysiert und erste Einblicke in die Rolle der divergenten p73-Isoformen bei der HBV-verursachten Leberkarzinogenese gewährt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente

Gerätename	Geräteart	Hersteller
Axiovert 25 Axiovert 40	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
Bakterieninkubator	Inkubator	Kendro (Langenselbold)
BioPhotometer	Fotometer	Eppendorf (Hamburg)
Celloshaker	Schüttler	Renner GmbH (Dannstadt)
Centrifuge 5415C	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5415R	Tischzentrifuge	
Curix 60	Filmentwicklungsmaschine	AGFA Health Care (Berlin)
DNA Engine	Fluoreszenz-Detektor	MJ Research Inc.
OPTICON®2	(real-time PCR)	(Waltham, USA)
E. coli Pulser™	Elektrotransformationsgerät	Bio-Rad (München)
FACSCalibur	Durchflusszytometer	BD (Heidelberg)
GenePulser Xcell	Elektroporationsgerät	Bio-Rad (München)
GS <i>Gene-linker</i> ™	UV-Kammer	
Hera Cell 240	CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Osterode)
Hera Safe	Sicherheitskabinett	Kendro (Langenselbold)
iCycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)

Lumat LB 9507	Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Mastercycler gradient	Thermozykler	Eppendorf (Hamburg)
MicroCam 3.3	Digitalkamera	dhs (Greifenstein- Beilstein)
Mini-PROTEAN 3	System für vertikale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
Multifuge 3L-R	Zentrifuge	Heraeus (Osterode)
MyCycler	Thermozykler	Bio-Rad (München)
S@feflow 1.2	Zellkultur-Werkbank	Nunc (Wiesbaden)
Shaker TH15	Inkubationsschüttler	Edmund Buehler (Tübingen)
Sonorex Super RK 100H	Ultraschallbad	Bandelin Electronics (Berlin)
Sonoplus Ultrasonic Homogenizer HD3100	Ultraschall-Homogenisator	
Sub-Cell GT System	System für horizontale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
Thermo mixer comfort	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
Trans-Blot SD System	Blot-Kammer	Bio-Rad (München)
UV-Dokumentation	UV-Dokumentationsgerät	ITF Labortechnik (Wasserburg)
UV-Tisch	UV-Transilluminator	Vilber Lourmat (Eberhardzell)

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München). Verwendete Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989). Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden von Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) erworben.

2.1.3 Kits

Name	Hersteller
BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector	Invitrogen (Karlsruhe)
Kit	
BrightStar BioDetect Kit	Ambion (Darmstadt)
ECL Plus Western Blotting	Amersham Biosciences (Freiburg)
Detection System	
Effectene Transfection Reagent	Qiagen (Hilden)
Omniscript RT Kit	
QIAamp DNA Mini Kit	
QIAEX II Gel Extraction Kit	
QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	
RNase-Free DNase Set	
RNeasy Mini Kit	

HotMasterMix 2.5x	Eppendorf (Hamburg) 5 Prime (Hamburg)
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad (München)
Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
Nuclear Extract Kit	Active Motif (Rixensart, Belgien)
Nucleo-Bond	Macherey-Nagel (Düren)
Rapid PCR Purification Kit	Marligen Biosciences (Ijamsville, USA)
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce (Bonn)

2.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung/Quelle
pcDNA3.1	Klonierungsvektor mit CMV-Promotor zur Herstellung von Expressionsvektoren
p53 pcDNA3.1	p53-wt Expressionsvektor (Stiewe et al., 2002a)
p73β pcDNA3.1	Expressionsvektor der C-terminalen Isoform p73β (Stiewe et al., 2002a)
∆Ex2/3p73β pcDNA3.1	Expressionsvektor der N-terminalen Isoform $\Delta Ex2/3p73\beta$ (Stiewe et al., 2002a)
pCMV-Sp1	Sp1 Expressionsvektor (Racek et al., 2005)
HBV-cp/EII-luc HBV-xp/EI-luc	Luciferase-Reporterplasmide, zur Verfügung gestellt von PD Dr. Schaefer, Universität Rostock
pCR-XL-TOPO-HBV-A	HBV-Expressionsvektor, zur Verfügung gestellt von PD Dr. Schaefer, Universität Rostock

2.1.5 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Δ (<i>mrc</i> A)183 Δ (<i>mcr</i> CB- <i>hsd</i> SMR- <i>mrr</i>)173 <i>end</i> A1 supE44 thi1 relA1 lac[F' proAB ⁺ lacl ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]
<i>E. coli</i> BJ5183	<i>end</i> A1 <i>sbc</i> BC <i>rec</i> BC <i>gal</i> K met <i>thi</i> 1 <i>bio</i> T <i>hsd</i> R (Str ^r)

Beide Bakterienstämme XL1-Blue und BJ5183 wurde von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen.

2.1.6 Zelllinien

Name	Beschreibung	Medium
Нер3В	Humane Leberkarzinom-Zelllinie,	DMEM + 10% FKS
	etabliert aus Tumorgewebe eines 8-	
	jährigen Jungen, Zellen enthalten	
	integriertes Hepatitis B Virusgenom,	
	p53-Status: Deletion;	
	ATCC HB-8064	
Huh7	Humane Leberkarzinom-Zelllinie,	DMEM + 10% FKS
	hoch-differenziert,	
	p53-Status: mutiert;	
	zur Verfügung gestellt von	
	PD Dr. Schaefer, Universität Rostock	
HepG2.2.15	Humane Leberkarzinom-Zelllinie,	DMEM/
(HepG2-	enthält integriertes replikationsfähiges	GlutaMAX [™] +
Derivat)	Hepatitis B Virusgenom,	Natriumpyruvat,
	p53-Status: Wildtyp;	10% FKS
	zur Verfügung gestellt von Dr. Dieter	
	Glebe (Institut für Virologie, Giessen)	

2.1.7 Adenoviren

Name	Beschreibung
AdGFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors (Putzer et al., 2000)
AdTAp73	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert als Fusionsprotein die C-terminale p73β Isoform und GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe et al., 2002a)
Ad∆TAp73	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert als Fusionsprotein die N-terminale Δ Ex2/3p73 β Isoform und GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe et al., 2002a)
AdER-E2F1	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das Fusionsprotein ER-E2F1 unter Kontrolle des CMV- Promotors (Putzer et al., 2000)
AdshGFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert shRNA zur Hemmung der GFP-Expression (RNAi), Negativkontrolle (Stanelle et al., 2005)
Adshp73	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert shRNA zur Hemmung der p73-Expression (RNAi), (Buhlmann et al., 2008)

2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper	Beschreibung	Quelle
p73 (ER-15)	monoklonaler Antikörper (Maus) reagiert mit Epitop (AS 367-380) humaner N- und C-terminaler p73α/β Isoformen	Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg)
p53 (DO-1)	monoklonaler Antikörper (Maus) reagiert mit Epitop (AS 1-45) von humanem Wildtyp und mutiertem p53	Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg)
Sp1	polyklonaler Antikörper (Kaninchen) reagiert mit humanem Sp1 (Volllänge)	Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA)
Aktin (C-11)	polyklonaler Antikörper (Ziege) reagiert mit C-Terminus verschiedener humaner Aktin Isoformen	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Sekundäre Antikörper	Beschreibung	Quelle
sheep anti-mouse	konjugiert an HRP	Amersham Biosciences (Freiburg)
donkey anti-rabbit	konjugiert an HRP	Amersham Biosciences (Freiburg)
bovine anti-goat	konjugiert an HRP	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide für RT-PCR		
Gen/Isoform	Sequenz	
p73-Wildtyp	SE 5'-GACGGAATTCACCACCATCCT-3'	
	AS 5'-CCAGGCTCTCTTTCAGCTTCA-3'	
ΤΑρ73 (ρ73β)	SE 5'-GGCTGCGACGGCTGCAGAGC-3'	
	AS 5'-GCTCAGCAGATTGAACTGGGCCATG-3'	
ΔTAp73 (ΔEx2/3p73β)	SE 5'-GGCTGCGACGGCTGCAGGCC-3'	
	AS 5'-CAGGCGCCGGCGACATGG-3'	
HBc	SE 5'-TATTCCTTGGACTCATAAGGTGGG-3'	
	AS 5'-GACTGTGAGTGGGCCTACAAATTG-3'	
S9	SE 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGT-3'	
	AS 5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGG-3'	

Oligonukleotidsequenzen für quantitative real-time PCR			
HBV DNA	SE 5'- TGCACTTCGCTTCACCT -3'		
	AS 5'- AGGGGCATTTGGTGGTC -3'		
HBV pgRNA	SE 5'-TATTCCTTGGACTCATAAGGTGGG-3'		
	AS 5'-GACTGTGAGTGGGCCTACAAATTG-3'		
S9	SE 5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGT-3'		
	AS 5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGG-3'		

Oligonukleotidsequenzen zur Herstellung von Adshp73

Oberstrang

5'-CACC<u>GCATGACTACATCTGTCATGG</u>CGAA<u>CCATGACAGATGTAGTCAT</u> <u>GC</u>-3' Unterstrang 5'-AAAA<u>GCATGACTACATCTGTCATGG</u>TTCG<u>CCATGACAGATGTAGTCAT</u> <u>GC</u>-3'

Oligonukleotide für EMSA		
Sp1-3 Bindungsstelle	Sequenz	
Wildtyp	5'-ACCACCGT <u>GAACGCCCAT</u> CAGATCCTG-3'	
	3'-TGGCA <u>CTTGCGGGTA</u> GTCTAGGACGGG-5'	
mutiert	5'- ACCACCGT <u>GAACGCACAT</u> CAGATCCTG -3'	
	3'- TGGCA <u>CTTGCGTGTA</u> GTCTAGGACGGG -5'	

Oligonukleotide für ChIP-Analyse		
Promotor	Sequenz	
xp/EI	SE 5'-ACGAATTGTGGGTCTTTTGGG-3'	
	AS 5'-AGGATCCAGTTGGCAGCACAG-3'	
cp/EII	SE 5'-ATCTGCCGGTCCGTGTGCACTT-3'	
	AS 5'-GCGCAGACCAATTTATGCCTACAG-3'	
p21WAF1	SE 5'-GCACTCTTGTCCCCCAG-3'	
	AS 5'-TCTATGCCAGAGCTCAACAT-3'	

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1 DNA-Restriktion

Zur Restriktion genomischer bzw. Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA mit 5-10 Enzymeinheiten der entsprechenden Restriktionsenzyme im geeigneten Reaktionspuffer bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsdauer (3-16 h) richtete sich nach den Angaben der Hersteller und die Verifizierung der DNA-Restriktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.1.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Restriktion sowie PCR erfolgte über Agarosegele. Dazu wurde die DNA mit Probenpuffer (Fermentas) gemischt und auf ein Gel aufgetragen, das aus 0,8-2% Agarose (w/v), gelöst in 1x TAE-Puffer und mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, bestand. Die Gele liefen unter einer Spannung von 90-125 V für 15-60 min in einer mit TAE-Puffer gefüllten, horizontalen Gelkammer. Nach dem Gellauf wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht detektiert.

50x TAE-Puffer: 2 M Tris/Acetat 150 mM EDTA pH 8,0

6x DNA-Probenpuffer:0,03% (w/v) Bromphenolblau0,03% (w/v) Xylencyanol FF60% (v/v) Glycerin60 mM EDTA10 mM Tris-HCl (pH 7,6)

2.2.1.3 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu eluierende DNA-Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell aus einem Agarosegel (0,8% w/v) ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte dann mittels QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.4 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden erfolgte in einem molaren Verhältnis 1:3 von Vektor (linearisierte Plasmid-DNA) zu Fragment, bei Ligationen von glatten Enden in einem Verhältnis von 1:5. Zur DNA wurden eine Enzymeinheit T4-DNA Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), zugehöriger Puffer sowie ddH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl dazugegeben und über Nacht bei 16°C inkubiert. Für die nachfolgende Transformation wurden dann 2-5 µl Ligationsansatz eingesetzt.

2.2.1.5 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Transformation von Ligationsansätzen sowie Plasmid-DNA erfolgte mit 40 µl elektro-kompetenter *E. coli*-Bakterien, denen nach dem Auftauen auf Eis 2-5 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA beigefügt wurden. Diese Suspension wurde dann in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) gegeben und bei 1,8 kV im Gene Pulser (Bio-Rad) elektroporiert. Die Zellen wurden in 500 µl SOC-Medium resuspendiert und 30-60 min bei 37 °C im Bakterienschüttler (250 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgebracht und bei 37 °C über Nacht bebrütet. LB-Agar: 1 I LB-Medium 15 g Agar <u>SOC-Medium</u>: 2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl₂ 10 mM MgSO₄ 20 mM Glukose

2.2.1.6 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Nach dem Auftauen chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien auf Eis wurden 2-5 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA dazugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt und die phänische Expression erfolgte wie unter 2.2.1.5.

2.2.1.7 Mini-Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der jeweilige *E. coli*-Stamm in 3 ml LB-Medium unter entsprechenden Selektionsbedingungen (50 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin) bei 37 °C und 225 rpm über Nacht vermehrt. 2 ml dieser Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation (12000 x g, 3 min, 4 °C) sedimentiert und das Bakteriensediment mit 300 µl S1-Puffer resuspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 300 µl S2-Puffer bei einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur (RT). Nach Zusatz von 300 µl gekühltem S3-Puffer und sorgfältiger Durchmischung wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die viskose Lösung wurde danach 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 630 µl Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei 12000 x g und 4 °C sedimentiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol für 10 min bei 12000 x g und 4 °C gewaschen und dann bei 37 °C im Inkubator getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 30 μ I ddH₂O resuspendiert und durch Restriktionsanalysen überprüft.

LB-Medium:	10 g Pepton
	5 g Hefeextrakt
	170 mM NaCl
	ad 1 I ddH ₂ O
	pH 7,5 (autoklaviert)
<u>S1-Puffer</u> :	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
S2-Puffer:	200 mM NaOH
	1% (w/v) SDS
S3-Puffer:	2,6 M Kaliumacetat pH 7,2

2.2.1.8 Maxi-Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte mittels Nucleo-Bond Kit (Macherey-Nagel, Düren). Dazu wurden Bakterienkulturen in 80 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und 225 rpm unter entsprechenden Selektionsbedingungen angezogen. Zur Sedimentation der Bakterien wurden die Ansätze für 10 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 12 ml S1-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 12 ml S2-Puffer sorgfältig durchmischt sowie für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde 12 ml S3-Puffer zu der Suspension gegeben und erneut gemischt. Nun wurde die Nucleo-Bond AX500 (Maxi) Säule mit 6 ml N2-Puffer equilibriert. Das Lysat wurde danach durch einen Filter, um gebildete Präzipitate zu entfernen, auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 15 ml N3-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 10 ml N5-Puffer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen eluiert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 7 ml Isopropanol präzipitiert und für 20 min bei 6000 x g und 4 $^{\circ}$ C zentrifugiert. Das gewonnene DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol für 5 min bei 6000 x g und 4 $^{\circ}$ C gewaschen, getrocknet und abschließend in 100 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.1.9 Herstellung von Glycerinkulturen

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen sowie Transformanten wurden Glycerinkulturen angefertigt. Von den über Nacht in LB-Medium (unter entsprechenden Selektionsbedingungen) gewachsenen Bakterienkulturen wurden jeweils 500 µl in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert, mit 500 µl einer sterilen 50%igen Glycerinlösung versetzt und nach guter Durchmischung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.10 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration an Nukleinsäure wurde durch spektrophotometrische Messung der UV-Strahlung, die durch die Basen absorbiert wird, bestimmt. Die DNA- bzw. RNA-Proben wurden mit Wasser in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt und anschließend in Quartzküvetten überführt. Die Optische Dichte wurde in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mit der von purem Wasser als Referenz verglichen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht annähernd einem DNA-Gehalt (doppelsträngig) von 50 μ g/mL bzw. RNA-Gehalt von 40 μ g/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, bestimmt das Verhältnis der Absorption von A260/A280 die Reinheit der Nukleinsäuren. So können DNA-Präparationen mit einem A260/A280-Wert von 1,6-2,0 als rein betrachtet werden, RNA mit einem Wert von 1,7-2,0.

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Mullis et al., 1992). Dafür wurde der HotMasterMix der Firma Eppendorf bzw. 5 Prime (Hamburg) verwendet, welcher, mit Ausnahme der Primer und der DNA, alle die für die PCR notwendigen Reagenzien enthält. Ein typischer Ansatz, wie er zur Amplifizierung von revers transkribierter cDNA (2.2.2.2) verwendet wurde, setzte sich wie folgt zusammen:

2,5x HotMasterMix	12 µl
SE-Primer (10 µM)	1 µl
AS-Primer (10 µM)	1 µl
cDNA	1 µl
ddH ₂ O	15 µl

Für eine touch-down-PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95℃	5 min	
2	95℃	15 s	$\langle \rangle$
3	Tm _{Primer} +3 °C (-0.5 °C/Zyklus)	30 s	10 Zyklen
4	72℃	1 min	
5	95℃	15 s	$\langle \rangle$
6	Tm _{Primer} -2 ℃	30 s	15-25 Zyklen
7	72℃	1 min	
8	72℃	7 min	
9	4℃	∞	

Die bei jeder PCR mitgeführte Kontrollreaktion, bestand aus einem PCR-Reaktionsgefäß mit all den oben beschriebenen Zusätzen mit Ausnahme von cDNA. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.1.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktion

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die durch Restriktion mit geeigneten Restriktionsenzymen erhalten oder mittels PCR amplifiziert wurden, erfolgte mit dem Rapid PCR Purification Kit (Marligen Biosciences, Ijamsville, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA konnte nun direkt für Transfektionen oder Ligationen eingesetzt werden.

2.2.1.13 DNA-Präparation

Um DNA aus freien Viruspartikeln im Kulturüberstand zu isolieren, wurde das QIAamp Blood and Body Fluid Spin Protocol (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dafür wurden 200 µl Kulturüberstand 96 h nach Transfektion des **HBV-Replikon** mit den entsprechenden genutzt. Die Quantität der Expressionsplasmiden neu synthetisierten verpackten HBV-DNA wurde dann durch real-time PCR bestimmt.

2.2.1.14 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR wurde mit dem DNA Engine OPTICON®2 Thermozykler (MJ Research Inc., USA) durchgeführt, wobei die Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green erfolgte. Durch Bindung des Farbstoffs an die DNA nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, wodurch somit eine Quantifizierung möglich wird.

Für die *real-time* PCR wurde das QuantiTect® SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Von jeder Probe wurden dabei drei technische Replikate erstellt, wobei ein typischer Ansatz sich wie folgt zusammensetzte:

	absolute	relative	
	Quantifizierung von	Quantifizierung der	
	HBV-DNA aus Virionen	Gene/Isoformen	
2x SYBR Green MasterMix	25 μl	25 μl	
SE-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	
AS-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	
Template	10 μΙ DNA	1-3 μl cDNA	
ddH ₂ O	13 μl	ad 50 µl	

Zur Durchführung einer quantitativen *real-time* PCR für das ribosomale S9-Gen (exemplarisch) wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95℃	15 min	
2	95 <i>°</i> C	1 min	$\langle $
3	66 <i>°</i> C	1 min	45 Zyklen
4	72°C	1 min	
5	72 ℃	10 min	
6	4 <i>°</i> C	ø	

Für die absolute Quantifizierung der HBV-DNA aus freien Viruspartikeln im Kulturüberstand wurde durch Verwendung einer Verdünnungsreihe eines HBV-DNA-Standards mit bekannter Kopienanzahl eine Kalibrierungskurve erstellt, wodurch die Kopienanzahl für jeden Ansatz berechnet werden konnte.

Bei der relativen Quantifizierung wurde die Änderung des Transkript-Niveaus relativ zu den Niveaus eines internen Kontroll-Transkripts (ribosomales S9-Gen) bestimmt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.2 RNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1 RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Genomische DNA-Kontaminationen wurden mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen, Hilden) unterbunden. Anschließend wurde die aufgereinigte RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und nach Zugabe von 20 Enzymeinheiten RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) bei -80 °C gelagert. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde, wie in 2.2.1.10 beschrieben, bestimmt. Zusätzlich wurde durch elektrophoretisches Auftrennen der ribosomalen RNA-Untereinheiten die Qualität überprüft.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Der RNA-Präparation folgte die reverse Transkription, bei der Gesamt-RNA in cDNA zur semiquantitativen Genexpressionsanalyse mit Hilfe des Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) transkribiert wurde.

Ein Reaktionsansatz von wurde wie folgt angesetzt:

10x RT-Puffer	2,0 µl
dNTP mix (5 mM pro dNTP)	2,0 µl
Oligo(dT) ₁₈ Primer (2,5 µM)	0,5 μl
RNase-Inhibitor (20 U)	0,5 μl
Omniscript reverse	0.5
Transkriptase	0,5 μι
RNA	1,0 µg
RNase freies H_2O (add 20 µl)	

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37 ℃ in einem Thermozykler inkubiert und nach Inaktivierung (5 min, 95 ℃) konnte die cDNA in der PCR (2.2.1.11) zur Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche eingesetzt werden.

2.2.3 Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Zelllysat

Adhärent wachsende Zellen wurden mittels Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst und anschließend für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Je nach Zellzahl wurde das Zellpellet dann in 50-200 µl kaltem RIPA-Puffer, der zusätzlich einen 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) enthielt, resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 16.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

 RIPA-Puffer:
 50 mM Tris/HCl pH 7,2

 150 mM NaCl
 0,1% (w/v) SDS

 1% Na-Desoxycholat
 1% Triton X-100

2.2.3.2 Extraktion der nukleären Proteinfraktion

Proteine aus dem Zellkern wurden mit dem Nuclear Extract Kit (Active Motif, Belgien) laut Herstellerangaben extrahiert.

Dazu wurden die Zellen mit einer Lösung aus PBS und Phosphataseinhibitoren gewaschen, anschließend von der Zellkulturplatte abgeschabt und zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in hypotonischen Puffer aufgenommen, um den Zellinnendruck zu erhöhen sowie die Zellmembran anschwellen und zerbrechlich werden zu lassen. Durch Zugabe von Detergenzien wurde dann die Zellmembran perforiert. Während der folgenden Zentrifugation wurden die Proteine der zytoplasmatischen Fraktion im Überstand angereichert und dekantiert. Das verbliebene Pellet (enthält Zellkerne mit intakter Membran) wurde dann lysiert und zentrifugiert. Letztendlich wurde der Überstand mit den Proteinen, die sich im Zellkern befinden (z. B. Transkriptionsfaktoren), abgenommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung (2.2.3.8) bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des aus dem Zelllysats gewonnenen Proteins wurde mit Hilfe des Bradford-*Assay* (Bio-Rad, München) bestimmt. Hierzu wurde 1 µl Proteinextrakt in 700 µl ddH₂O, 99 µl PBS und 200 µl Bradford-Reagenz verdünnt. Nach 10 min Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm im Eppendorf BioPhotometer (Hamburg) gemessen. Durch die Verwendung einer BSA-Eichkurve wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gesamtproteine wurden über SDS-Polyacrylamidgele unter reduzierenden Bedingungen im diskontinuierlichen System (Laemmli, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Protein-Proben (100-200 µg) wurden mit 1x Lane Marker Non-Reducing Sample buffer (Pierce, Bonn) sowie mit 1x DTT gemischt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf ein Zweiphasen-SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden zunächst in der ersten Phase (Sammelgel) aufkonzentriert, um dann in der zweiten Phase (Trenngel) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt zu werden. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels lag je nach Proteingröße zwischen 8-12%. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Mini-Protean 3-System (Bio-Rad, München) in 1x SDS-Laufpuffer bei 100 V für 2 h.

12%

5x SDS-Laufpuffer: 125 mM Tris		
	125 mM Glycin	
	0,5% (w/v) SDS	
<u>Sammelgel</u> :		
H ₂ O	6,4 ml	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	3 2,5 ml	
10% SDS	100 μl	
Acrylamid (40%)	1,0 ml	
TEMED	11 µl	
30% Ammoniumpers	ulfat 17 µl	
<u>Trenngel</u> :		
	8%	10%
H ₂ O	5,4 ml	4,9 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3 2,5 ml	2,5 ml

H ₂ O	5,4 ml	4,9 ml	4,4 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	100 μl	100 µl	100 µl
Acrylamid (40%)	2,0 ml	2,5 ml	3,0 ml
TEMED	6 μl	6 µl	6 µl
30% Ammoniumpersulfat	17 μl	17 µl	17 μl

2.2.3.5 Western Blot und Immunodetektion

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) zu transferieren, wurde das *semi-dry blotting*-Verfahren mit Hilfe der Trans Blot SD-Zelle (Bio-Rad, München). Nachdem die Membran sowie weitere Bestandteile in 1x Transferpuffer äquilibriert wurden, erfolgte der Transfer je nach Größe der Proteine für 60-90 min bei 70-140 mA. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen des Antikörpers wurden die Membran anschließend in 5%iger Blockierlösung (5% (w/v) Milchpulver gelöst in 1x TBS mit 0,1% Tween-20) 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Membran mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert, der in 5%iger Blockierlösung 1:100-

1:1000 verdünnt wurde. Nach drei Waschschritten je 5 min mit TBST 0,1% erfolgte die Inkubation mit dem in 5%iger Blockierlösung verdünnten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper nach Herstellerangaben.

Anschließend wurde die Membran zweimal in TBST 0,1%, zweimal in TBST 0,2% und einmal in TBS-Puffer zu je 5 min gewaschen. Die Detektion spezifisch markierter Proteine erfolgte mit Hilfe der Chemolumineszenzreaktion des Sekundärantikörpers, die mit dem ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) oder SuperSignal Dura Extended Kit (Pierce, Bonn) entsprechend den Angaben des Herstellers ausgeführt wurde. Die Chemolumineszenz wurde mit einem Chemolumineszenzfilm (Amersham Biosciences) detektiert und im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland) entwickelt.

5x Transferpuffer: 970 mM Glycin 125 mM Tris/HCl pH 8,3

<u>10x TBS-Puffer:</u> 200 mM Tris 1,35 M NaCl pH 7,6

2.2.3.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum Nachweis der HBV-Infektion bzw. Replikation in Zellen wurde der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durch die diagnostische Abteilung der Virologie (Universität Rostock) durchgeführt. Hierbei erfolgte der qualitative Nachweis des Hepatitis-B-Surface-Antigens (HBsAg) bzw. Hepatitis-B-e-Antigens (HBeAg) mittels AxSYM®-Mikropartikel-Enzymimmunoassay (Abbott, Wiesbaden), bei dem mit monoklonalen anti-HBs bzw. anti-HBe beschichtete Mikropartikel verwendet werden.

Nach Transfektion der Zellen mit dem HBV-Replikon pSMART-HBV-A und entsprechenden Expressionsplasmiden wurde je Ansatz und Zeitpunkt 1 ml Überstand (Doppelbestimmung) abgenommen und bei -20 °C gelagert. Zur

Vorbereitung für die Analyse wurden die Proben aufgetaut und zweimal für 10 min bei 9.300 x g und 4°C zentrifugiert, um überflüssiges Zellmaterial zu entfernen. Der Überstand wurde dann im ELISA verwendet.

2.2.3.7 Immunpräzipitation (IP)

Immunpräzipitation Die Nachweis Protein-Proteinwurde zum von Wechselwirkungen in vitro genutzt. Dazu wurden die vermeintlichen Interaktionspartner transient überexprimiert und nach 48 h die Proteine aus den Zellen extrahiert (siehe 2.2.3.1). Nach Konzentrationsbestimmung wurden 400 μg Protein je Ansatz auf 250 μl Volumen mit RIPA-Puffer aufgefüllt und durch Zugabe von 20 µl Protein A/G-Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für 1 h bei konstanter Rotation (25 rpm, 4°C) gereinigt. Nach 30 s Zentrifugation bei 1500 x g wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und 500 µl RIPA-Puffer dazu pipettiert. Nach Zugabe von 4 µg Antikörper erfolgte über Nacht bei konstanter Rotation (25 rpm, 4°C) die Bindung des Antikörper an das Zielprotein, das am nächsten Tag durch 20 µl Protein A/G-Plus Agarose präzipitiert wurde (1 h, 25 rpm, 4℃). Der an das Zielprotein gebundene Interaktionspartner wurde somit kopräzipitiert. Die Agaroseteilchen wurden für 30 s bei 1500 x g pelletiert und viermal mit jeweils 500 µl RIPA-Puffer gewaschen, um unspezifische Proteine zu entfernen. Danach wurde das Agarose-Pellet in 40 µl Laemmli-Puffer resuspendiert und die Proteine durch Denaturierung (3 min, 95 ℃) von den Agaroseteilchen gelöst. Nach kurzer Sedimentierung der Agarose wurde der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und durch Western Blot der kopräzipitierte Interaktionspartner des Zielproteins mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.2.3.8 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zum Nachweis der Bindung von Transkriptionsfaktoren (z. B. Sp1) an regulatorische DNA-Seguenzen (Promotor/Enhancer) wurde der EMSA durchgeführt. Dazu wurden nukleäre Extrakte (siehe 2.2.3.2) von mit adenoviralen Vektoren transduzierten Hep3B-Zellen verwendet, die GFP (Kontrolle), TAp73 oder ΔTAp73 exprimieren. 4 µg dieser nukleären Proteinfraktion wurden mit einem Biotin-markierten Doppelstrang-Oligonukleotid (2,5 pmol), welches einer Sp1-Bindungsstelle (Sp1-3) im HBV core-Promotor/Enhancer II entspricht, in entsprechendem Bindungspuffer für 30 min bei RT inkubiert. Zur Kompetition der Sp1-Bindung wurde ein nicht-markiertes selbst-Oligonukleotid (s) in 50-fachem Überschuss 10 min vor Zugabe des markierten Oligonukleotids hinzugegeben. Die verschiedenen Ansätze wurden nach der Bindungsreaktion mittels EMSA-Ladepuffer auf ein natives 8%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und die DNA-Protein-Komplexe von der freien DNA entsprechend ihrer Größe bei 10 mA für 120 min getrennt. Anschließend erfolgte die Überführung der DNA im Gel auf eine positiv-geladene Nylon-Transfermembran (Amersham Biosciences) bei 200 mA für 60 min. Zur Fixierung der DNA auf die Membran wurde UV cross-linking (150 mJoule) durchgeführt und mit Hilfe des BrightStar BioDetect Kit (Ambion) die DNA-Protein-Komplexe entsprechend den Herstellerangaben nachgewiesen. Die Visualisierung der Komplexe erfolgte mit einem Chemolumineszenzfilm (Amersham Biosciences).

2.2.3.9 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Um spezifisch Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) nach dem Protokoll von (Nelson et al., 2006) durchgeführt. Dazu wurden HepG2.2.15 Zellen mit den entsprechenden Ad-Vektoren transduziert. 36 h nach der Transduktion wurden die Protein-DNA-Komplexe durch *cross-linking* mit Formaldehyd (Endkonzentration 1,42%) fixiert und das Chromatin durch Ultraschall (Sonifizierung, 4x 15 s Impulse) in DNA-Fragmente mit einer Größe von 200-1000 bp zerschnitten. Die Protein-DNA-

Komplexe, die den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor enthielten, wurden mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen dieses Protein präzipitiert. Vom isolierten Chromatin wurde die DNA aufgereinigt und durch PCR (2.2.1.11) mittels spezifischer Primer die genomischen Promotorsequenzen detektiert.

2.2.4 Zellkulturarbeiten und Transfektion

2.2.4.1 Allgemeine Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden nach Lagerung im Flüssigstickstoff bei 37°C aufgetaut und in 20 ml Medium (2.1.6) in Zellkulturschalen aufgenommen und bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde durch 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 1x MEM non-essential amino acids (PAA, Pasching, Österreich), 100 μ g/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin und 1,25 μ g/mL Amphotericin B ergänzt.

Zum Passagieren wurden die Zellen nach Aspiration des Mediums mit PBS gewaschen, mit 1-2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung für 10-15 min bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert und von der Zellkulturschale gelöst. Die gelösten Zellen wurden in neues Medium (add 10 ml) aufgenommen und anschließend Aliquots in neue Zellkulturplatten mit frischem Medium überführt.

Zur Lagerung in Flüssigstickstoff wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA gelöst und in dem für jede Zelllinie geeigneten Medium, ergänzt mit 10% DMSO, resuspendiert.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämatozytometers (nach Neubauer) bestimmt. Dabei wurden 20 µl einer 10 ml Zellsuspension mit 70 µl PBS und 10 µl Trypanblau gemischt. Davon wurden 10 µl auf ein Hämatozytometer aufgetragen. Die vitalen Zellen, die den Farbstoff Trypanblau nicht aufnehmen, wurden in der Zählkammer gezählt und die Anzahl der Zellen pro ml mit folgender Formel berechnet:

Durchschnittliche Zellzahl x VD 5 x 10^4 = Zellen pro ml

2.2.4.3 Transiente Transfektion von Zellen

Je nach Experiment und Größe der Zellkulturschale wurden vor der Transfektion 1,5 x 10^5 bis 2 x 10^6 Zellen im entsprechendem Volumen an Medium aufgenommen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem Effectene Transfection Reagent Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben transfiziert.

2.2.4.4 Luciferase-Assay

Zur Quantifizierung der Promotor-Aktivität wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase bestimmt, die einen außerordentlich sensitiven und etablierten Reporter darstellt. Dazu wurden 1,5-3 x 10^5 Zellen je Ansatz in 6-Loch Zellkulturplatten überführt und mit einem Luciferase-Reporterplasmid sowie entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. 48 h nach Transfektion erfolgte die Vorbereitung der Zellen für die Messung der Luciferaseaktivität. Dazu wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst, die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 10 min bei 300 x g und 4°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde dann in 150 µl 1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Mannheim) resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C wurden je Ansatz dreimal 25 µl vom Überstand in Messröhrchen überführt (Triplikat). 50 µl Luciferase-Substrat (Promega, Mannheim) wurde automatisch durch das Lumineszenzmessgerät (Berthold Technologies, Bad Wildbad) je Messung auf die Proben injiziert. Hierbei katalysiert Luciferase die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin, unter gleichzeitiger Lichtemission bei einer Wellenlänge von 562 nm. Der Messwert wurde in RLU (relative luciferase unit) angegeben.

2.2.4.5 Durchflusszytometrieanalyse

Um die Effizienz bestimmter Transfektionsmethoden in verschiedenen Zelllinien zu überprüfen, wurden die Zellen nach Transfektion mit einem GFP-Expressionsplasmid mittels Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting) analysiert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst, in PBS aufgenommen und für 10 min bei 300 x g und 4 ℃ zentrifugiert. Das Pellet wurde dann nochmals mit PBS gewaschen, zentrifugiert, in 500 µl PBS resuspendiert und abschließend durch FACS analysiert.

2.2.5 Adenovirale Arbeitstechniken

2.2.5.1 Herstellung des adenoviralen Expressionsvektors Adshp73 für RNAi-Analyse

Zur Herstellung eines p73 shRNA exprimierenden Vektors wurde das BLOCKiT[™] U6 RNAi Entry Vector Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurde mit p73-spezifischen Oligonukleotiden (Ober- und Unterstrang, siehe 2.1.9) ein Doppelstrang hybridisiert, der die gewünschte p73 shRNA-Zielsequenz kodiert, und in eine RNA-Polymerase IIIangetriebene Expressionskassette (pENTR[™]/U6 *Entry Construct*, RNAi-Kassette) zur Nutzung in RNAi-Experimenten kloniert. Durch homologe Rekombination mit dem Plasmid pAd/BLOCK-iT[™]-DEST in *E. coli* BJ5183 Bakterien wurde der adenovirale Expressionsvektor pAd/BLOCK-iT[™] hergestellt. Ein durch Sequenzierung positiv getesteter Klon wurde nach Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *Pac*I linearisiert und durch Transfektion in 293 Zellen der entsprechende p73 shRNA exprimierende Adenovirus generiert.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren wurden durch Standardmethoden propagiert, gereinigt und titriert (Stanelle et al., 2005).



Abb. 14: Strategie zur Herstellung adenoviraler Expressionsvektoren für RNAi-Analyse (www.invitrogen.com)

2.2.5.2 Transduktion

Die Transduktion von verschiedenen Zelllinien mit Ad- bzw. Adsh-Vektoren wurde für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Hierzu wurde das Medium von den Zellen aspiriert und die Vektoren unter Berücksichtigung der Zellzahl sowie Virustiter in 1-1,5 ml Medium aufgenommen, auf die Zellen gegeben und nach Inkubation mit Medium wieder aufgefüllt. Die Transduktion erfolgte für jede Zelllinie mit der entsprechenden Infektionsmultiplizität (MOI - *multiplicity of infection*), mit der eine 100%ige Transduktion der Zellen erreicht wurde.

2.2.5.3 Induzierung von konditionell aktivem ER-E2F1

Durch Transduktion der Zelllinie Hep3B mit AdCMV-ER-E2F1 wurde das Fusionsprotein ER-E2F1 überexprimiert. Dabei handelt es sich um humanes Wildtyp-E2F1, das an eine modifizierte, 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) bindende Version der Ligandenbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors fusioniert wurde. Das Fusionsprotein ER-E2F1 ist ohne das Steroid 4-OHT transkriptionell nicht aktiv, denn erst durch Zugabe von 1 μ M 4-OHT in das Zellkulturmedium erfolgt die Translokation in den Zellkern (Putzer et al., 2000).

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung und Hemmung der endogenen p73-Expression in p53-negativen Tumorzellen

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die p73-Proteinexpression auf einem sehr niedrigen Niveau aufrechterhalten. Genotoxischer Stress durch die Anwendung von Zytostatika oder γ-Bestrahlung führt zur Schädigung der DNA und stimuliert die Akkumulation und somit die Aktivität von p73 (Irwin et al., 2003). Die Aktivität von p73 wird vorwiegend auf post-translationaler Ebene reguliert und dessen Stabilisierung resultiert entweder im G1/S Zellzyklus-Arrest oder Zelltod durch Apoptose.

Der Effekt verschiedener p73-Isoformen auf den HBV *core*-Promotor/Enhancer II, unabhängig von der Funktion von p53, wurde in p53-negativen Hep3B-Zellen analysiert. Um den Einfluss der endogenen p73-Expression auf Transkriptionssowie Translationsebene zu untersuchen, wurden Hep3B-Zellen mit dem Zytostatikum Cisplatin behandelt. Anschließend wurde die Effizienz der Hemmung der p73-Expression durch spezifische shRNA bestimmt.

3.1.1 p73-Induktion durch genotoxischen Stress

Zur Induktion von p73 durch Schädigung der DNA wurde 15 μM Cisplatin (cDDP) in das Medium von Hep3B-Zellen zugegeben, die Zellen nach Inkubation zu bestimmten Zeitpunkten geerntet und Gesamt-RNA sowie Protein isoliert. Durch semiquantitative RT-PCR mit spezifischen p73-Primern wurde das Transkriptniveau von p73 analysiert. Die Zugabe von cDDP führte zur signifikanten Zunahme der p73 mRNA im Vergleich zur unbehandelten Probe, wobei nach 16 h die höchsten p73-Expressionslevel erreicht wurden (Abb. 15A). Als interne Kontrolle wurde das ribosomale S9-Gen (*housekeeping gene*) zur Gewährleistung einer gleichmäßigen cDNA-Beladung amplifiziert. Anschließend wurde 24 bzw. 48 h nach der Cisplatin-Behandlung die p73-

Proteinexpression gemessen (Abb. 15B). Dabei wurde schon nach 24 h eine signifikante Zunahme der Expression im Vergleich zur unbehandelten Probe nachgewiesen. Nach 48 h wurde nur noch ein der Kontrolle ähnliches p73-Expressionsniveau detektiert, was darauf hindeutet, dass nach 24 h die p73-Akkumulation ihren höchsten Stand erreicht. Somit wurde gezeigt, dass Cisplatin-vermittelter genotoxischer Stress zur Induktion der p73-Expression in Hep3B-Zellen führt, wobei die Expression auf transkriptioneller Ebene nach 16 h und auf translationeller Ebene nach 24 h das höchste Niveau erreicht.



Abb. 15: Endogener p73-Level nach der Behandlung mit Cisplatin.

(A) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der endogenen p73-Expression in Hep3B-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung mit 15 μ M Cisplatin (cDDP). Das ribosomale S9-Gen diente als Ladekontrolle. (B) Die Proteinexpression von p73 und Aktin (Kontrolle) wurde 24 h bzw. 48 h nach genotoxischem Stress durch *Western Blot* Analyse gemessen.

3.1.2 Hemmung des endogenen p73-Levels durch adenovirale Expression von p73-spezifischer shRNA

Für den spezifischen *knock-down* des *TP73* Gens wurde im Rahmen dieser Arbeit ein adenoviraler Expressionsvektor hergestellt (siehe 2.2.5.1), der shRNA gegen p73 nach Transduktion der Zielzellen exprimiert (Buhlmann et al., 2008). Zur Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi) wurde dabei die shRNA gewählt, da das in einen viralen Vektor inserierte rekombinante Gen für die shRNA durch Transduktion effizient in bis zu 99% der Zielzellen eingebracht und exprimiert werden kann (Scherr et al., 2003). Zuerst wurde die Effizienz der spezifischen p73-Hemmung durch Adshp73 überprüft. Dazu wurden Hep3B-Zellen mit einer MOI von 20, was einer nahezu 100% igen Infektion der Zellen entspricht, mit Adshp73 und AdshGFP transduziert. Das Virus AdshGFP, welches GFP gerichtete shRNA eine gegen exprimiert, wurde als Negativkontrolle zur Bestimmung unspezifischer Virus-bedingter Einflüsse auf die Ziel-Transkripte verwendet (Stanelle et al., 2005). 24 bzw. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und semiguantitative RT-PCR mit p73-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 16A). Dabei wurde festgestellt, dass die endogene p73-Expression durch p73 spezifische shRNA im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen (mock) und zur Negativkontrolle (AdshGFP) nach 24 h und im stärkeren Maße nach 48 h gehemmt wird. Um den Effekt der RNA-Interferenz auf die endogene p73-Proteinexpression zu analysieren, wurde mit den zu gleichen Zeitpunkten geernteten Proben Western Blots durchgeführt (Abb. 16B). Auch hier konnte eine deutliche Verringerung des p73-Proteinlevels nach der Adenovirus-vermittelten shRNA-Expression erzielt werden. Als Voraussetzung für weitere Funktionsanalysen zeigen die Daten, dass endogenes p73 durch spezifische shp73 sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene gehemmt werden kann.



Abb. 16: Hemmung des endogenen p73-Levels nach Transduktion mit Adshp73.

Analyse der endogenen p73-Expression durch semiquantitative RT-PCR (A) und *Western Blot* (B) in Hep3B-Zellen 24 bzw. 48 h nach Transduktion mit Adshp73 bzw. AdshGFP (Kontrolle) im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen (mock). Das ribosomale S9-Gen (bei PCR) sowie Aktin (beim *Western Blot*) dienten dabei als interne Ladekontrollen.

3.2 Nachweis der HBV-Replikation nach Transfektion linearisierter HBV-Monomere

Um den Einfluss der p73-Isoformen auf die HBV Transkription bzw. Replikation in Hep3B-Zellen analysieren zu können, wurde ein in anderen Arbeitsgruppen bereits etabliertes Modell zur Herstellung replikationskompetenter HBV-Monomere angewendet (Gunther et al., 1995). Dazu wurde das HBV-Genom (Volllänge 3,2 kbp; Genotyp A) aus dem Serum einen chronischen HBV-Patienten amplifiziert und in den Vektor pCR-XL-TOPO kloniert, um das Plasmid pCR-XL-TOPO-HBV-A (HBV-Replikon) zu konstruieren (Abteilung für Virologie, Universität Rostock). Das Prinzip der Methode (Abb. 17) beruht auf der *Sap*I-Restriktion des Plasmids pCR-XL-TOPO-HBV-A, wodurch das HBV-Genom linearisiert und nach Aufreinigung direkt in die Zielzellen transfiziert wird. Die linearisierten HBV-Monomere sind in der Lage selbst zu ligieren, das wiederum nach erfolgter Transfektion zur Produktion von zirkularisierter HBV-DNA und somit zur Replikation des Virus in den Zellen führt.





Das HBV-Replikon pCR-XL-TOPO-HBV-A wurde nach *Sap*I-Restriktion durch Gelelektrophorese überprüft. Infolge der Restriktion wurde der Vektor in fünf DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe geschnitten, wobei das größte Fragment (3,2 kbp) das linearisierte HBV-Genom darstellte (Abb. 18). Bei den anderen Fragmenten handelte es sich um verdaute Vektorabschnitte.



Abb. 18: *Sapl*-Restriktion des HBV-Replikons pCR-XL-TOPO-HBV-A. (1) DNA-Marker mit angezeigter Größe einzelner Fragmente. (2) DNA-Fragmente des Vektors pCR-XL-TOPO-HBV-A nach *Sapl*-Restriktion und Aufreinigung.

Zur Überprüfung der HBV-Replikation in Hep3B-Zellen wurde die aufgereinigte DNA (1 µg) in die Zellen transfiziert. Die Zellen wurden für mehrere Tage bei 37 ℃ inkubiert und je nach Zeitpunkt der Zellüberstand zur Messung des Virustiters geerntet. Durch ELISA wurde der HBsAg- bzw. HBeAg-Titer im Überstand als Nachweis einer HBV-Replikation in den transfizierten Zellen gemessen. Als Negativkontrolle wurden nicht-transfizierte Hep3B-Zellen (mock) mitgeführt und der geerntete Überstand ebenfalls einer Titerbestimmung unterzogen. Wie in Abb. 19A sichtbar, wurde für die mit dem HBV-Replikon tranzfizierten Zellen ein stetig zunehmender HBsAg-Titer nach 48 h, 72 h und 96 h im Vergleich zur mock-Kontrolle gemessen. Der Schwellenwert (Ct) dieses ELISA-Meßverfahrens für eine positive HBsAg-Reaktion beträgt 1,8; d. h., es wurde kein HBsAg im Überstand der mock-Kontrolle detektiert. Ein ebenfalls signifikant zunehmender HBeAg-Titer wurde im Überstand der transfizierten Zellen im Vergleich zu mock gemessen (Abb. 19B). Der Ct-Wert einer positiven

HBeAg-Reaktion beläuft sich hierbei auf 0,2. Zusammengefasst führte die Transfektion linearisierter HBV-Monomere in Hep3B-Zellen zu einer HBV-Replikation und anschließenden Herstellung des HB-Virus, was durch Messung der Virusantigene im Überstand nachgewiesen wurde.



Abb. 19: Nachweis der HBV-Replikation in Hep3B-Zellen. ELISA des HBsAg-Titers (A) bzw. HBeAg-Titers (B) im Überstand von Hep3B-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion von 1 μg pCR-XL-TOPO-HBV-A (Replikon). Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen.

3.3 Unterschiedliche Regulation der transkriptionellen Aktivität des cp/Ell durch p73-lsoformen

Der Tumorsuppressor p53 ist ein wichtiger Bestandteil der Abwehrstrategie der Wirtszellen gegen eine Ausbreitung der Hepatitis B Virusinfektion, in dem p53 die Regulation des HBV-Lebenszyklusses stört. So ist durch frühere Studien bekannt, dass p53 auf transkriptioneller Ebene den cp/EII indirekt durch die Interaktion mit cp/EII-regulierenden Transkriptionsfaktoren inhibiert (Lee et al., 1998; Xu et al., 2002). Aufgrund der strukturellen und funktionellen Homologie von p53 und p73 wurde die Beeinflussung der cp/EII-Aktivität durch unterschiedliche p73-Isoformen untersucht. So wurde der Effekt der Transaktivierungs-kompetenten p73 β -Isoform (im Folgenden als TAp73 bezeichnet) und der potentiell onkogenen $\Delta Ex2/3p73\beta$ Isoform (Δ TAp73), die keine N-terminale Transaktivierungsdomäne enthält, analysiert.

3.3.1 Repression des cp/Ell durch TAp73

Zuerst wurde der Einfluss von TAp73 auf die cp/EII-Aktivität mittels Luciferase-Reporterexperimente analysiert. Dabei wurde der Konstrukt HBV-cp/EII-luc verwendet, das den Enhancer II und die *core*-Promotorregion (nt 1400-1900) enthält. Die Kotransfektion dieses Konstrukts zusammen mit einem TAp73exprimierenden Plasmid in p53-negativen Hep3B-Zellen resultierte in einer signifikanten Inhibition der cp/EII-Aktivität, die sogar stärker als die Hemmung durch p53 ausfiel (Abb. 20A). Die Proteinexpression von TAp73 und p53 nach transienter Transfektion sowie Aktin als interne Ladekontrolle wurden durch *Western Blot* Analyse nachgewiesen (Abb. 20B). Dabei wurde p53-Protein in der p53-negativen Hep3B-Zelllinie nur nach Transfektion, p73-Protein sowohl überexprimiert als auch endogen detektiert.



Abb. 20: Repression der HBV core-Promotor/Enhancer II-Aktivität (cp/EII) durch TAp73. (A) Luciferase assay von p53-negativen Hep3B-Zellen kotransfiziert mit 0,5 µg core-Promoter/Enhancer II-Luciferase-Reporterplasmid (HBV-cp/EII-luc) und den angezeigten Konzentrationen von p53-wt sowie TAp73-Expressionsplasmiden. Die Messung der Luciferase-Aktivität (relative luciferase units, RLU) erfolgte 48 h nach Transfektion, wobei die Zellen Aktivität in den mock-transfizierten gleich 100% gesetzt wurde. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. **(B)** Die Proteinexpression von p53 und TAp73 in Hep3B-Zellen wurde durch Western Blot Analyse nachgewiesen. Das Haushaltsgen Aktin diente dabei als Ladekontrolle.

Die Suppression der Promotoraktivität durch TAp73 war Dosis-abhängig, d. h., mit zunehmender TAp73-Konzentration wurde die Inhibition der cp/EII-Aktivität verstärkt (Abb. 21A). Da der cp/EII die Expression der 3,5 kB mRNA reguliert, die u. a. den Leserahmen für das *core*-Antigen (HBcAg) beinhaltet, wurde nach Transfektion des HBV-Replikons pCR-XL-TOPO-HBV-A mit ansteigenden Konzentrationen des TAp73-Expressions-plasmids die Expression des HBV-Transkripts *core* (HBc) mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Dabei wurde die Transkription der HBc-mRNA inhibiert (Abb. 21B). Zur Kontrolle der Transfektion der unterschiedlichen TAp73-Plasmidkonzentrationen wurde der mRNA-Level der TAp73-Isoform sowie des ribosomalen S9-Gens gemessen. Diese TAp73-abhängige Inhibition der HBc-Transkription wurde auch mit quantitativer *real-time* PCR bestätigt (Abb. 21C). Mit Zunahme der TAp73-Expression wurde eine stärker werdende Abnahme des HBc-Transkripts beobachtet als ein weiterer Hinweis dafür, dass die HBc-Expression auf transkriptioneller Ebene durch p73 kontrolliert wird.



Abb. 21: Dosis-abhängige Repression der cp/EII-Aktivität und HBc-Expression durch TAp73. (A) Luciferase *assay* von Hep3B-Zellen kotransfiziert mit 0,5 μ g HBV-cp/EII-luc Reporterplasmid und ansteigenden TAp73-Konzentrationen. Der mock-Ansatz wurde gleich 100% gesetzt. (B) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der HBc-Expression in Hep3B-Zellen 48 h nach Kotransfektion von 1 μ g pCR-XL-TOPO-HBV-A und ansteigenden TAp73-Konzentrationen. Das Haushaltsgen S9 diente als interne Kontrolle. (C) Quantitative *real-time* PCR Analyse der HBc- und TAp73-Expression. Die Transkript-Niveaus wurden mit dem ribosomalen Haushaltsgen S9 normalisiert.

Bisher konnte eine Inhibition der HBc-Expression nur durch Überexpression von p73 gezeigt werden. Daher war es notwendig, den Einfluss von endogeninduziertem p73 auf die HBc-Expression zu untersuchen. Zur Induktion der endogenen p73-Expression wurden Hep3B-Zellen mit AdER-E2F1 infiziert, welches das Fusionsprotein ER-E2F1 exprimiert. Dieses Protein ist ohne den Estrogen-Rezeptor-Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) transkriptionell nicht aktiv, erst durch Zugabe von 1 μ M 4-OHT in das Zellkulturmedium erfolgt die Translokation von ER-E2F1 in den Zellkern, wodurch es zur Aktivierung responsiver E2F-Gene kommt (Putzer et al., 2000). Da *TP73* ein direktes Zielgen von E2F1 ist, kann die endogene p73-Expression durch Bindung des transkriptionell aktiven E2F1 an den p73-Promotor angeschaltet werden (Seelan et al., 2002; Stiewe & Putzer, 2000).



Abb. 22: Repression der HBc-Expression durch endogenen p73-Level nach Induktion. (A) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der HBc Expression in Hep3B-Zellen nach Transfektion von 1 μ g pCR-XL-TOPO-HBV-A und Infektion mit adenoviralen Vektoren, die ER-E2F1, shp73 und shGFP (Kontrolle) exprimieren. Die endogenen p73-Transkriptniveaus sind angezeigt. Die Zellen wurden 12 h nach E2F1-Aktivierung durch 1 μ M 4-OHT analysiert. Das Gen S9 wurde als interne Kontrolle genutzt. (B) Quantitative *real-time* PCR Analyse der HBc- und p73-Expression. Die Transkript-Niveaus wurden mit dem Gen S9 relativiert, der mock-Ansatz gleich 100% gesetzt.

Nach Transfektion des HBV-Replikons erfolgte die Transduktion der Zellen mit AdER-E2F1 sowie AdshGFP (Kontrolle) oder Adshp73 zur Hemmung des induzierten endogenen p73. 12 h nach Zugabe von 4-OHT wurde die Expression von HBc, p73 und S9 (Kontrolle) durch semiquantitative RT-PCR analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die HBc-Expression signifikant durch E2F1-Aktivierung reprimiert wurde, wobei die Hemmung durch die Expression von p73-spezifischer shRNA aufgehoben wurde (Abb. 22A). Damit wurde nachgewiesen, dass die Induktion von endogenem p73 zu einer signifikanten Repression der HBc-Expression führt. Dieses Ergebnis wurde auch durch quantitative *real-time* PCR bestätigt (Abb. 22B).

3.3.2 Aktivierung des cp/Ell durch ∆TAp73

Aufgrund der dominant-negativen und potentiell onkogenen Wirkungsweise von Δ TAp73 im Vergleich zur typischen Tumorsuppressor-Funktion von TAp73 wurde der Effekt von Δ TAp73 auf die cp/EII-Aktivität analysiert. Da Δ TAp73 die Funktion von TAp73 durch direkte Kompetition der DNA-Bindung und/oder durch Bildung von Heteroduplex-Strukturen mit TAp73 inhibieren kann (Stiewe et al., 2002a; Zaika et al., 2002), wurde das TAp73-Plasmid gleichzeitig mit ansteigenden Konzentrationen des Δ TAp73-Expressionsplasmids kotransfiziert und ein Luciferase *assay* durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die TAp73-vermittelte Repression der cp/EII-Aktivität durch Δ TAp73 aufgehoben werden kann (Abb. 23).



Abb. 23: Aufhebung der TAp73-vermittelten Repression der cp/Ell-Aktivität durch Δ TAp73. Luciferase *assay* von Hep3B-Zellen 48 h nach Kotransfektion von 0,5 µg HBV-cp/Ellluc Reporterplasmid; 0,25 µg TAp73 und ansteigenden Konzentrationen (0,25; 0,5; 0,75 µg) des Δ TAp73-Expressionsplasmids.

Um den direkten Effekt von onkogenem Δ TAp73 auf die Aktivität des cp/EII zu untersuchen, wurden steigende Konzentrationen des Δ TAp73-Plasmids mit dem cp/EII-Reporterplasmid kotransfiziert. Im Gegensatz zu TAp73 wurde die cp/EII-Aktivität durch Δ TAp73 um das 5-7fache verstärkt (Abb. 24).



Abb. 24: Aktivierung der cp/EII-Aktivität durch Δ TAp73. Luciferase-Aktivität in Hep3B-Zellen 48 h nach Kotransfektion mit 0,5 µg HBV-cp/EII-luc Reporterplasmid; 0,1 und 0,5 µg Δ TAp73-Expressionsplasmid. Die Aktivität in den mock-transfizierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt.

Um diese Δ TAp73-vermittelte Aktivierung des cp/EII weiter zu untersuchen, wurden semiquantitative RT-PCR-Experimente nach Kotransfektion des HBV-Replikons mit dem Δ TAp73-Expressionsplasmid durchgeführt. Wie in Abb. 25A ersichtlich, wurden steigende HBc mRNA-Level durch Δ TAp73-Expression nach 48 h bzw. 72 h nachgewiesen, was auch durch Messungen mittels quantitativer *real-time* PCR bestätigt werden konnte (Abb. 25B). Die Verstärkung der HBc-Expression durch Δ TAp73 betrug \leq 50%.



Abb. 25: Aktivierung der HBc-Expression durch Δ TAp73. (A) Semiquantitative RT-PCR-Analyse der HBc-Expression in Hep3B-Zellen 48 bzw. 72 h nach Kotransfektion von 1 µg pCR-XL-TOPO-HBV-A und 1 µg Δ TAp73-Expressionsplasmid. (B) Quantitative *real-time* PCR Analyse des HBc-Expression nach Normalisierung mit dem S9-Expressionslevel. Der mock-Ansatz wurde gleich 100% gesetzt.

Der Einfluss von TAp73 sowie ∆TAp73 auf die cp/EII-Aktivität wurde bisher nur in p53-negativen Hep3B-Zellen untersucht. Um diese bisher erzielten Ergebnisse in einem weiteren Zellsystem zu verifizieren, wurde die p53-mutierte Huh7-Leberkarzinom-Zelllinie zur Analyse der cp/EII-Aktivität verwendet. Dabei konnten vergleichbare Effekte der p73-Isoformen auf die cp/EII-Aktivität wie in Hep3B-Zellen beobachtet werden (Abb. 26). Sowohl TAp73 als auch die Kontrolle p53 führten im Gegensatz zur ∆TAp73-vermittelten Aktivierung zur Repression des cp/EII.



Abb. 26: Einfluss der p73-Isoformen auf die cp/EII-Aktivität in Huh7-Zellen. Luciferase assay von Huh7-Zellen 48 h nach Kotransfektion mit 0,5 μ g HBV-cp/EII-luc Reporterplasmid und 0,5 μ g p53-wt, TAp73 sowie Δ TAp73-Expressionsplasmid.
3.4 Einfluss der p73-Isoformen auf die HBV-Replikation

3.4.1 TAp73 inhibiert die HBV-Replikation im Gegensatz zu Δ TAp73

Nach Etablierung der HBV-Replikation durch Transfektion linearisierter HBV-Monomere in Zellen und Nachweis der TAp73-vermittelten Repression bzw. ∆TAp73-vermittelten Aktivierung der HBc-Expression, erfolgte die Verifizierung des Effekts beider p73-Isoformen auf die Virusreplikation.



Abb. 27: Reduktion des HBs- bzw. HBeAg-Titers durch TAp73. ELISA des HBsAg-Titers (A) und HBeAg-Titers (B) im Überstand von Hep3B-Zellen 72 h nach Kotransfektion von 1 μ g pCR-XL-TOPO-HBV-A mit 1 μ g p53-wt, TAp73 oder Δ TAp73-Expressionsplasmid. Der Schwellenwert (Ct) für eine positive Reaktion ist für beide Abbildungen angezeigt.

Dazu wurde das replikationskompetente HBV-Monomer zusammen mit p53 (Kontrolle), TAp73 bzw. Δ TAp73-Expressionsplasmiden in Hep3B-Zellen kotransfiziert und für 72 h inkubiert. Nach Ernte der Überstände wurde der Virustiter durch ELISA bestimmt. Dabei wurden die Konzentrationen des HBsund HBe-Antigens als direkte Indikatoren des Virustiters genutzt. Sowohl die HBsAg- (Abb. 27A) als auch der HBeAg-Expression (Abb. 27B) wurden durch p53 und TAp73 inhibiert, wobei die Inhibition durch p53 stärker war. Im Gegensatz dazu führte die Expression von Δ TAp73 nicht zu einer Reduktion des Virustiters.

Des Weiteren wurde die Viruspartikel-assoziierte HBV-DNA im Überstand von transfizierten Hep3B-Zellen durch quantitative *real-time* PCR gemessen. Für die nachfolgenden Replikationsstudien wurde das bisher verwendete lineare HBV-Monomer (nt 1820-1819) mit den Expressionsplasmiden, wie bereits oben beschrieben, in Hep3B-Zellen kotransfiziert. Um die *de novo* synthetisierte entkapsidierte HBV-DNA zu detektieren, wurden spezifische Primer genutzt, die die natürliche Lücke (nt 1820) im durch überlappenden Plus- und Minusstrang zirkulär gehaltenen teilweise doppelsträngigen HBV-Genom überbrücken.



Abb. 28: Inhibition der Synthese von Viruspartikel assoziierter HBV-DNA durch TAp73. Quantitative *real-time* PCR Analyse von HBV-DNA im Überstand von Hep3B-Zellen 96 h nach Kotransfektion von 1 µg pCR-XL-TOPO-HBV-A mit 1 µg p53-wt, TAp73 oder Δ TAp73-Expressionsplasmid. Jede Säule repräsentiert die absolute Kopienanzahl ± STABW von drei unabhängigen Messungen. Signifikante Unterschiede in der HBV Kopienanzahl zwischen mock und p53 (*P*<0,05) oder TAp73 (*P*<0,001) transfizierten Zellen sind gekennzeichnet mit *; n.s., nicht-signifikant; *t*-Test.

Dadurch wird die Detektion von HBV-DNA ermöglicht, nachdem die Replikation von intrazellulärer cccDNA stattgefunden hat. Wie in Abb. 28 gezeigt, wurde eine deutliche Reduktion der HBV-Kopienanzahl durch p53 (MW 3,74 x 10⁶ ± STABW 5,72 x 10⁵) und noch stärker durch TAp73 (MW 2,14 x 10⁶ ± STABW 9,42 x 10⁴) im Vergleich zur Kontrolle (MW 5,57E x 10⁶ ± STABW 5,30 x 10⁵) erzielt, wobei die Produktion von HBV-Viruspartikeln durch Δ TAp73 nicht signifikant beinträchtigt wurde (MW 5,15 x 10⁶ ± STABW 2,95 x 10⁵). Bei der Analyse des pgRNA-Transkripts in transfizierten Hep3B-Zellen durch quantitative *real-time* PCR wurden grundlegend die gleichen Resultate wie bei der Verifizierung der *de novo* synthetisierten entkapsidierten HBV-DNA erzielt. So wurden signifikante Unterschiede zwischen mock und p53 von 53,7% (*P*<0.05) und TAp73 von 84.8% (*P*<0.001) gemessen. Der pgBNA-I evel wurde

(P<0,05) und TAp73 von 84,8% (P<0,001) gemessen. Der pgRNA-Level wurde im Gegensatz dazu durch die Δ TAp73-Variante nicht signifikant verändert (Abb. 29).



Abb. 29: Repression der HBV pgRNA durch TAp73. Quantitative *real-time* PCR Analyse von HBV pgRNA aus Gesamt-RNA extrahiert von Hep3B-Zellen 72 h nach Kotransfektion von 1 μ g pCR-XL-TOPO-HBV-A mit 1 μ g p53-wt, TAp73 oder Δ TAp73-Expressionsplasmid. HBV pgRNA-Level wurde mit dem ribosomalen Haushaltsgen S9 relativiert, der mock-Ansatz wurde gleich 100% gesetzt.

3.4.2 Unterschiedliche Regulation des xp/El durch TAp73 und Δ TAp73

Aufgrund der Dominanz des HBV Enhancer I in der Virusreplikation gegenüber dem Enhancer II (Doitsh & Shaul, 2004), wurde auch der Effekt von p73-Isoformen auf die Aktivität des Enhancer I untersucht. Dazu wurden das xp/EI-Reporterplasmid, welches den HBV Enhancer I und X-Promotor enthält, zusammen mit p53, TAp73- und Δ TAp73-Expressionsplasmiden in Hep3B-Zellen kotransfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität ergab eine deutliche Repression von xp/EI durch p53 und noch stärker durch TAp73. Ein Effekt der Δ TAp73-Isoform auf die xp/EI-Aktivität konnte aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 30).



Abb. 30: Repression der xp/El-Aktivität durch TAp73 im Gegensatz zu Δ TAp73. Luciferase *assay* von Hep3B-Zellen 48 h nach Kotransfektion mit 0,5 µg HBV-xp/El-luc Reporterplasmid und 0,2 µg p53-wt, TAp73 oder Δ TAp73-Expressionsplasmid.

Zusammengefasst wurde durch diese Replikationsstudien gezeigt, dass die Transaktivierungs-kompetente TAp73-Isoform die HBV-Replikation im Vergleich zur N-terminal trunkierten Δ TAp73-Isoform inhibiert. Ein positiver Effekt der potentiell onkogenen p73-Variante auf die Virusproduktion konnte aber nicht festgestellt werden.

3.5 *In vitro* und *in vivo* Interaktionsstudien der p73-Isoformen mit Sp1 und dem cp/Ell

Die Expression der HBV Gene wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert. Einer dieser Faktoren, Sp1, hat zwei Bindungsstellen im *core*-Promotor und eine im stromaufwärts liegenden regulatorischen Element Enhancer II (Yu & Mertz, 1996; Zhang & McLachlan, 1994; Zhang et al., 1993). Die Position dieser Bindungsstellen ist in der Abb. 31 im HBV Genom dargestellt. Für beide Sp1-Bindungsstellen im *core*-Promotor wurde gezeigt, dass sie für die Transkription der prä-*core*- sowie *core*-RNA bedeutend sind, wobei die Bindungsstelle im Enhancer II die Expression aller HBV Gene positiv reguliert (Li & Ou, 2001).



Abb. 31: Sp1-Bindungsstellen im cp/Ell. Die Positionen der Bindungsstellen im *core*-Promotor (Sp1-1, Sp1-2) sowie Enhancer II (Sp1-3) sind durch Unterstreichung der Nukleotide und Nummerierung im HBV Genom dargestellt. Die Transkriptionsstartpunkte für die prä-*core*-RNA (PC) und *core*-RNA (C) sind angezeigt.

3.5.1 Direkte Interaktion der Transaktivierungs-kompetenten TAp73-Isoform mit Sp1

Aufgrund der Bedeutung von Sp1 für die Transkription der *core*-RNA und der Tatsache, dass p53 und p73 direkte Protein-Protein-Interaktionen mit Sp1 eingehen können (Racek et al., 2005), wurde eine mögliche Interaktion der p73-Isoformen mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 zur Aufklärung des Mechanismus der p73-vermittelten cp/EII-Regulation analysiert.

Zuerst wurden Hep3B-Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid HBV-cp/EIIluc und ansteigenden Sp1-Konzentrationen in Abwesenheit sowie Anwesenheit von TAp73 kotransfiziert und die cp/EII-Promotor-Aktivität gemessen. Dabei wurde in Abwesenheit von überexprimiertem TAp73 eine Aktivierung des cp/EII festgestellt, die mit zunehmender Sp1-Konzentration verstärkt wurde (Abb. 32). Aber bei Kotransfektion des TAp73-Expressionsplasmids wurde die Sp1vermittelte cp/EII-Aktivierung vollständig inhibiert. Selbst hohe Sp1-Konzentrationen konnten die Repression des cp/EII nicht aufheben.



Abb. 32: Inhibition der Sp1-vermittelten Aktivierung des cp/Ell durch TAp73. Luciferase *assay* von Hep3B-Zellen kotransfiziert mit 0,5 μg HBV-cp/Ell-luc Reporterplasmid und ansteigenden Sp1-Konzentrationen mit und ohne 0,25 μg TAp73-Expressionsplasmid. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen, die Säulen zeigen durchschnittliche RLU-Werte ± STABW von drei unabhängigen Messungen an.

Danach wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt, um eine mögliche direkte Interaktion von TAp73 mit Sp1 zu verifizieren. Hep3B-Zellen wurden mit TAp73-Expressionsplasmiden kotransfiziert Sp1und und Koimmunpräzipitationen mit Proteinlysat von nicht-transfizierten (mock) und transfizierten Zellen ausgeführt. Wie Abb. 33 zeigt, wurde die Expression von TAp73 und Sp1 nach Transfektion durch Western Blot nachgewiesen. Dabei konnte Sp1-Protein nicht nur in den tranzfizierten Zellen im Gegensatz zu TAp73 detektiert werden, sondern auch in den mock-Zellen. Als interne Kontrolle wurde die Proteinexpression von Aktin bestimmt. Weiterhin wurde durch dieses Experiment eine direkte Interaktion von TAp73 mit Sp1 nachgewiesen, denn nach Immunpräzipitation mit Sp1-Antikörper konnte kopräzipitiertes TAp73-Protein detektiert werden.



Abb. 33: Nachweis einer direkten Interaktion zwischen TAp73 und Sp1. Die Proteinexpression von Sp1, TAp73 und Aktin (Kontrolle) wurde in nicht-transfizierten und transfizierten Hep3B-Zellen durch *Western Blot* Analyse bestimmt. Für Immunpräzipitation wurde 400 µg Proteinextrakt von transfizierten Hep3B-Zellen mit Sp1-Antikörper präzipitiert, und kopräzipitiertes TAp73 Protein mit p73-Antikörper detektiert.

Die Experimente zeigen, dass TAp73 und Sp1 in Leberkarzinomzellen zur Bildung von Protein-Protein-Komplexen führen.

3.5.2 Direkte Interaktion von Transaktivierungs-defizientem ∆TAp73 mit Sp1

Aufgrund des Nachweises einer direkten Interaktion zwischen TAp73 und Sp1 wurde auch eine Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen der potentiell onkogenen ∆TAp73-Isoform und Sp1 vermutet, da beide p73-Isoformen sich nicht in der Oligomerisierungsdomäne unterscheiden, die, wie vermutet wird, für die Protein-Protein-Wechselwirkung verantwortlich ist (Jeong et al., 2006; Kim et al., 2003). Daher wurden Hep3B-Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid HBV-cp/EII-luc und steigenden Sp1-Konzentrationen in Ab- bzw. Anwesenheit von ∆TAp73 transfiziert und die Promotor-Aktivität bestimmt. Dabei wurde die Sp1-vermittelte Aktivierung des cp/EII durch Überexpression von ∆TAp73 signifikant verstärkt (Abb. 34).



Abb. 34: Verstärkung der Sp1-vermittelten Aktivierung des cp/EII durch Δ TAp73. Luciferase *assay* von Hep3B-Zellen kotransfiziert mit 0,5 µg HBV-cp/EII-luc Reporterplasmid und ansteigenden Sp1-Konzentrationen mit und ohne 0,25 µg Δ TAp73-Expressionsplasmid.

Für den Nachweis einer möglichen direkten Interaktion wurden Hep3B-Zellen mit Sp1- und Δ TAp73-Expressionsplasmiden kotransfiziert und Koimmunpräzipitationen mit Proteinlysat von nicht-transfizierten (mock) und transfizierten Zellen durchgeführt. Die Expression von Δ TAp73 und Sp1 nach Transfektion wurde ebenfalls durch Western Blot verifiziert (Abb. 35). Überexprimiertes △TAp73 Protein wurde im Gegensatz zu Sp1-Protein nur in den transfizierten Zellen detektiert. Darüber hinaus wurde eine direkte Interaktion von *ATAp73* mit Sp1 Nachweis kopräzipitiertem ∆TAp73-Protein durch von nach Immunpräzipitation mit Sp1-Antikörper in den transfizierten Hep3B-Zellen bestätigt (Abb. 35).



Abb. 35: Nachweis einer direkten Interaktion zwischen ΔTAp73 und Sp1. Die Proteinexpression von Sp1, ΔTAp73 und Aktin (Kontrolle) wurde in nicht-transfizierten und transfizierten Hep3B-Zellen durch *Western Blot* Analyse bestimmt. Für Immunpräzipitation wurde 400 μg Proteinextrakt von transfizierten Hep3B-Zellen mit Sp1-Antikörper präzipitiert, und kopräzipitiertes TAp73-Protein mit p73-Antikörper detektiert.

Unabhängig von der antagonistischen Funktion von TAp73 und ΔTAp73 auf die cp/EII-Aktivität konnte somit ebenfalls eine direkte Interaktion zwischen ΔTAp73 und Sp1 nachgewiesen werden.

3.5.3 Direkte Interaktion von TAp73 mit Sp1 verhindert die Sp1-Bindung an cp/EII im Gegensatz zu ∆TAp73

Um die Interaktion der p73-Isoformen mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 und dem HBV cp/EII näher zu charakterisieren, wurde *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) mit einem synthetischen Biotin-markierten Doppelstrang-Oligonukleotid durchgeführt, das der Sp1-3 Bindungsstelle im cp/EII entspricht (siehe Abb. 31). Dabei wurden für die Bindungsreaktion nukleäre Proteinfraktionen von p53-negativen Hep3B-Zellen genutzt, die mit GFP (Kontrolle), TAp73 oder Δ TAp73 transduziert wurden. Wie in Abb. 36 ersichtlich, war eine Bindung des nukleären Extrakts von Hep3B-Zellen an das Oligonukleotid nachweisbar (Spur 1). Diese Bindung wurde in Spur 2 durch 50-fachen Überschuss eines nicht-markierten selbst-Oligonukleotids (s), aber nicht durch das Oligonukleotid mit mutierter Sp1-Bindungsstelle (ms, Spur 6) kompetitiert. Diese Kompetitionsreaktion weist auf eine spezifische Bindung des

Transkriptionsfaktors Sp1 an den HBV cp/EII hin. Hervorzuheben ist, dass die Bindung von Sp1 an seine Konsensus-Sequenz durch TAp73-Protein ebenfalls kompetitiert wird (Spur 3), d. h., die TAp73-Bindung an Sp1 interferiert mit der Sp1-DNA-Interaktion. Im Gegensatz dazu wurde durch ΔTAp73-Proteinenthaltenen nukleären Extrakt eine Zunahme der Bande erreicht, mit gleichzeitigem *shift* des DNA-Protein-Komplexes (Spur 4). Als Negativkontrolle in Spur 5 wurde nur das Oligonukleotid ohne Zusatz des nukleären Extraktes aufgetragen. Dabei wurde keine Bindung der DNA gezeigt.

Dieser Resultate lassen vermuten, dass durch die Bindung von TAp73 an Sp1 die Sp1-DNA-Interaktion verhindert wird. Zusätzlich zur bisher nachgewiesenen antagonistischen Funktion von Δ TAp73 auf den cp/EII führt die Δ TAp73-Sp1-Interaktion hingegen zur Verstärkung der Sp1-Bindung an das regulatorische HBV Element.



Abb. 36: Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) einer Sp1-Bindungsstelle. EMSA mit nukleärem Extrakt von mit Ad Vektoren infizierten Hep3B-Zellen, die GFP (Spur 1-2), TAp73 (Spur 3) oder ∆TAp73 (Spur 4) exprimieren, unter Nutzung eines Biotin-markierten Doppelstrang-Oligonukleotids, welches der Sp1-Bindungsstelle im cp/EII (Sp1-3) entspricht. Spur 5 zeigt die Bindung ohne nukleären Extrakt. Der Pfeil kennzeichnet die Sp1-spezifische Bande, die durch 50-fachen Überschuss von nicht-markiertem selbst-Oligonukleotid (s, Spur 2) und in Gegenwart von TAp73-Protein (Spur 3), aber nicht durch das Oligonukleotid mit mutierter Sp1-Bindungsstelle (ms, Spur 6) kompetitiert wurde. Der Stern markiert einen stabilen shifted DNA-Protein-Komplex in Gegenwart von ∆TAp73-Protein (Spur 4). Darüber hinaus wurde der Effekt der p73-Isoformen auf die in vivo Bindung von Sp1 an den endogenen cp/EII unter Berücksichtigung des gesamten HBV Genoms durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) analysiert. Dazu wurden HBV stabil exprimierende HepG2.2.15-Zellen genutzt, die zur Verifizierung der Funktion der p73-Isoformen mit GFP- (Kontrolle), TAp73- oder Δ TAp73exprimierenden adenoviralen Vektoren transduziert wurden. Nach dem cross-DNA-gebundenen linking der Proteine durch Formaldehvd sowie anschließender Sonifizierung wurden die endogenen Sp1-DNA Komplexe im HepG2.2.15-Zelllysat mit einem Sp1-Antikörper immunpräzipitiert und durch PCR mittels spezifischer Primer zum Nachweis von cp/EII analysiert.



Abb. 37: Einfluss von TAp73 bzw. ∆TAp73 auf die Bindung von Sp1 an die cp/EII-Region *in vivo*. (A) *ChIP* von HBV stabil exprimierenden HepG2.2.15-Zellen 48 h nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren, die GFP (Negativ-Kontrolle), TAp73 oder ∆TAp73 exprimieren. Nach *crosslinking* der Proteine an die DNA mittels Formaldehyd wurden endogenes Sp1 and p73 der sonifizierten Lysate mit den geeigneten Antikörpern immunpräzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde durch PCR mit Hilfe spezifischer cp/EII-Primer amplifiziert. Vor Zugabe der Antikörper wurde von jeder Probe Input-DNA entnommen. IP mit Kontroll-IgG diente als Negativ-Kontrolle, wobei der p21WAF1-Promoter als Positiv-Kontrolle genutzt wurde. Die cp/EII PCR-Produkte wurden in relative *Software*-Einheiten, normalisiert zu den Input-Werten, quantifiziert. Die AdGFP-infizierte Kontrolle wurde dabei gleich 1 gesetzt. (B) Die Proteinexpressionen von p73, Sp1 und Aktin (Kontrolle) wurden durch *Western Blot* analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an den endogenen cp/EII durch TAp73 signifikant gehemmt wird (Abb. 37A). Im Vergleich zur AdGFP-transduzierten Probe erfolgte eine Abnahme der Sp1-Bindung an den cp/EII um 47%. Als interne Kontrolle wurde ein Teil des Zelllysats vor der Immunopräzipitation aufgereinigt und ebenfalls zur Amplifikation des cp/EII genutzt (*input* DNA). Im Gegensatz zu TAp73 wurde nach der Expression von Δ TAp73 keine signifikante Veränderung der Bindung von Sp1 an das HBV-Element festgestellt. Als weitere Kontrolle diente die IP mit einem Kontroll-IgG (Negativkontrolle), wo keine spezifischen Protein-DNA-Komplexe präzipitiert wurden und wie erwartet auch kein cp/EII-Produkt amplifiziert wurde (Abb. 37A).

Abschließend wurde die potenzielle DNA-Bindung von TAp73 sowie Δ TAp73 an die cp/EII-Region überprüft. Dafür wurde eine *ChIP*-Analyse mit Hilfe eines p73-Antikörpers durchgeführt. TAp73 zeigte dabei keine direkte Bindung an den cp/EII (Abb. 37A). Demgegenüber resultierte die Infektion der HepG2.2.15-Zellen mit Ad Δ TAp73 in einer vierfachen Verstärkung der cp/EII-Bande. Als Positivkontrolle diente der p53-abhängige p21WAF1-Promotor, der im Vergleich zu AdGFP-infizierten Zellen durch beide p73-Isoformen aufgrund der identischen DNA-Bindungsdomäne gebunden wurde (Abb. 37A). Die entsprechenden Proteinexpressionen von TAp73, Δ TAp73 und Sp1 wurden durch *Western Blot* analysiert (Abb. 37B).

3.5.4 Direkte Bindung der p73-Isoformen an HBV xp/EI-Region in vivo

Infolge der dominierenden Funktion des HBV Enhancer I in der Virusreplikation gegenüber dem Enhancer II wurde bereits der Effekt von TAp73 sowie Δ TAp73 auf die Aktivität des Enhancer I untersucht (siehe 3.4.2). Dabei wurde festgestellt, dass TAp73 wie p53-wt den xp/EI reprimiert, während die potentiell onkogene Δ TAp73-Isoform keinen Einfluss auf die xp/EI-Aktivität hatte. Da der Mechanismus der p53-abhängigen transkriptionellen Repression des Enhancer I durch direkte Bindung des p53 Proteins an das Enhancer-Element beschrieben wurde (Ori et al., 1998), erfolgte deshalb die Überprüfung einer möglichen DNA-Bindung von TAp73 an die xp/EI-Region als Ursache für dessen Repression. Dafür wurde die bereits isolierte DNA der ChIP-Proben (aus Abb. 37) zur Durchführung einer semiguantitativen PCR zum Nachweis der xp/EI-Region mittels spezifischer Primer genutzt. Wie in Abb. 38 zu sehen, wurde für alle drei Proben ein PCR-Produkt amplifiziert, wobei das Signal der Bande bei den mit AdTAp73 sowie Ad∆TAp73 infizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (AdGFP) wesentlich stärker war. Durch diese signifikante Zunahme des PCR-Produkts im ChIP-assay wurde somit die Bindung des xp/EI durch beide p73-Isoformen nachgewiesen. Obwohl TAp73 und ∆TAp73 den xp/EI binden können, ist nur die Transaktivierungs-kompetente TAp73 Isoform in der Lage, den Enhancer I zu reprimieren, als mögliche Ursache für die Inhibition der HBV-Replikation.



Abb. 38: Bindung der p73-Isoformen an die xp/EI-Region *in vivo. ChIP* von HBV stabil exprimierenden HepG2.2.15-Zellen 48 h nach Transduktion mit adenoviralen Vektoren, die GFP (Negativ-Kontrolle), TAp73 oder Δ TAp73 exprimieren. Die präzipitierte DNA wurde durch PCR mit Hilfe spezifischer xp/EI-Primer amplifiziert.

4 Diskussion

Neoplasien sind das Ergebnis eines mehrstufigen komplexen Prozesses und repräsentieren die unkontrollierte Proliferation eines Zelltyps, initiiert durch Mutationen in ein oder mehreren Genen. Zwei Klassen von Genen, die sog. Proto-Onkogene und Tumorsuppressor-Gene, regulieren die Zellteilung und sind für die Entstehung eines Tumors von großer Bedeutung. So ist die Akkumulation von aktivierenden Mutationen in Proto-Onkogenen (gain of function) und inaktivierenden Mutationen in Tumorsuppressor-Genen (loss of function) oder sogar deren Deletionen häufig in diesen Prozess involviert. Nach Hanahan & Weinberg kennzeichnen sechs Hauptmerkmale den Phänotyp einer Tumorzelle: die Vernachlässigung von Signalen, die Proliferation zu arretieren bzw. von Signalen zu differenzieren; eine fortwährende Proliferation; die Umgehung von Apoptose; invasives Wachstum sowie Angiogenese (Hanahan & Weinberg, 2000). Allgemein werden Neoplasien durch eine Vielzahl von genetischen und epigenetischen Faktoren, systemischen und parakrinen Effekten sowie durch bestimmte Umweltfaktoren verursacht oder beeinflusst (Ponder, 2001). Einer dieser äußeren Faktoren, die chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus, repräsentiert den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) mit einer Beteiligung von über 50% aller HCC-Fälle (Pisani et al., 1997).

Als Bestandteil der Abwehrstrategie gegen die HBV-Ausbreitung in der Wirtszelle führen offensichtlich Interaktionen der Proteine der p53-Familie mit regulatorischen HBV-Elementen zur Hemmung der HBV-Transkription (Lee et al., 1998; Ori et al., 1998; Uchida et al., 1996; Xu et al., 2002). Da die Tumorsuppressor-Funktion von p53 durch die HBV-Proteine HBx und HBc inhibiert werden kann (Doitsh & Shaul, 1999; Kwon & Rho, 2003; Lee & Rho, 2000; Truant et al., 1995), hat das mit p53 strukturell und funktionell übereinstimmende Protein p73 in HBV-infizierten Zellen eine besondere Bedeutung. Dabei ist sowohl der Effekt der als Tumorsuppressor wirkenden TAp73-Isoformen als auch der potentiell onkogenen Δ TAp73-Isoformen auf die HBV-Transkription und Replikation durch spezifische Interaktionen mit HBV-Regulatoren von großem Interesse.

4.1 Antagonistische Wirkung von TAp73 und ∆TAp73 auf die transkriptionelle Aktivität des cp/Ell

Der HBV cp/EII steuert die Transkription der pgRNA und scheint auch ein zentrales Element in der Regulation der viralen Replikation zu sein (Moolla et al., 2002). Durch mehrere Studien belegt, wird der cp/Ell durch den Tumorsuppressor p53 negativ reguliert (Lee et al., 1998; Lee et al., 1995; Uchida et al., 1996; Xu et al., 2002). Dabei wird der cp/Ell durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren auf cp/EII-regulierenden transkriptioneller Ebene inhibiert. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Homologie von p53 und p73 wurde die Beeinflussung der cp/EII-Aktivität durch unterschiedliche p73-Isoformen, speziell durch Transaktivierungs-kompetentes TAp73 und Transaktivierungs-defizientes $\Delta TAp73$, analysiert. Zur Repräsentation der TAp73-Funktion wurde die C-terminale p73β-Isoform als potentester transkriptioneller Aktivator ausgewählt, die den p21WAF1-Promotor stärker transaktiviert (De Laurenzi et al., 1998; Melino et al., 2002) und stärker Apoptose induziert (Sasaki et al., 2001) als p73a. Weiterhin wurde gezeigt, dass p73 β *in vivo* der Tumorbildung entgegenwirkt (Rodicker & Putzer, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass TAp73 in seiner Funktion als Tumorsuppressor nach Überexpression die cp/EII-Aktivität signifikant inhibiert. Eine Inhibition der Promotor-Aktivität konnte auch für p53 gezeigt werden, die aber schwächer als die Inhibition durch TAp73 ausfiel. Da der cp/EII die Expression der 3,5 kB mRNA reguliert, die u. a. den Leserahmen für das HBc-Protein beinhaltet, wurde die HBc-Transkription untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass TAp73 auch die Transkription der HBc-mRNA inhibiert, wobei mit Zunahme der TAp73-Expression eine deutlichere Abnahme des HBc-Transkripts beobachtet wurde - ein weiterer Hinweis dafür, dass die HBc-Expression auf transkriptioneller Ebene durch p73 kontrolliert wird. Zusätzlich wurde der Einfluss von endogen-induziertem p73 auf die HBc-Expression nach Transduktion mit dem AdER-E2F1-Virus untersucht, welches das Fusionsprotein ER-E2F1 exprimiert. Dieses Protein ist ohne den Estrogen-Rezeptor-Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) transkriptionell nicht aktiv, erst durch Zugabe von 4-OHT in das Zellkulturmedium erfolgt die Translokation des Transkriptionsfaktors E2F1 in den Zellkern und damit die Aktivierung E2F1responsiver Gene (Putzer et al., 2000). Da TP73 ein direktes Zielgen von E2F1 ist, wird die p73-Expression durch Bindung des transkriptionell aktiven E2F1 an den p73-Promotor angeschaltet (Seelan et al., 2002; Stiewe & Putzer, 2000). Dabei wurde festgestellt, dass die HBc-Expression signifikant durch E2F1-Aktivierung reprimiert wird, während die Promotor-Hemmung durch die Expression von p73-spezifischer shRNA aufgehoben werden kann. Hieraus ergibt sich im Ergebnis, dass die HBc-Expression sowohl nach p73-Überexpression als auch durch Induktion des endogenen p73 signifikant inhibiert werden kann. Neben der klassischen Funktion, Zellzyklus-Arrest sowie Apoptose zu induzieren (Kaghad et al., 1997), kann der Tumorsuppressor TAp73 somit auch Promotoren von Onkogenen (HBc) effizient reprimieren. Übereinstimmend dazu wurde bereits gezeigt, dass TAp73 auch die transkriptionelle Aktivität des HBV xp/EI inhibiert, der die Expression des Onkogens HBx reguliert (Xu et al., 2002). Ein weiteres Beispiel für die reprimierende Funktion des Tumorsuppressors TAp73 ist die Inhibition des Promotors der humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTERT), die aufgrund erhöhter Expression in den meisten malignen Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe ein mit der Tumorgenese eng verknüpftes Enzym darstellt (Beitzinger et al., 2006; Racek et al., 2005). Mit dieser TAp73vermittelten Funktionsweise korrelierend haben Studien mit p53 gezeigt, dass das p73-homologe Protein zahlreiche virale Promotoren, wie z. B. SV40-Promotor-Enhancer, Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase und UL9-Promotor oder humanen CMV-Promotor-Enhancer hemmt (Subler et al., 1992). Aufgrund der potentiell onkogenen Wirkungsweise von $\Delta TAp73$ (Petrenko et al., 2003; Stiewe et al., 2002b; Tannapfel, Buhlmann et al., 2008) im Vergleich zur typischen Tumorsuppressor-Funktion von TAp73 wurde auch der Effekt von ΔTAp73 auf die cp/EII-Aktivität analysiert. Dazu wurde die ΔEx2/3p73β-Isoform verwendet, die im Vergleich zu den anderen N-terminal trunkierten Varianten durch ein hohes onkogenes Potential charakterisiert ist. Unsere Arbeitsgruppe hat in den letzten Jahren gezeigt, dass die ektope Expression dieser p73-Isoform zur malignen Transformation von NIH3T3-Fibroblasten und zum

Tumorwachstum in Nacktmäusen führt (Stiewe et al., 2002b). Unseren neuesten Ergebnissen zufolge bewirkt die Expression von Δ Ex2/3p73 β unter Kontrolle des Leber-spezifischen Albumin-Promotors in Δ Ex2/3p73 β -

transgenen Mäusen eine Steigerung der Proliferation von Hepatozyten, die in prä-neoplastischen Läsionen (Leberzelladenomen) und der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome resultiert (Tannapfel, Buhlmann et al., 2008). Darüber hinaus ist die onkogene $\Delta Ex2/3p73\beta$ -Isoform neben anderen Nterminalen p73-Transkriptvarianten in einer Reihe humaner Neoplasien (Becker et al., 2006; Casciano et al., 2002; Douc-Rasy et al., 2002; Tuve et al., 2004), u. a. auch bei hepatozellulären Karzinomen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, verstärkt exprimiert (Muller et al., 2005; Stiewe et al., 2004).

Die Analyse der Wirkung von Δ TAp73 auf den cp/EII ergab, dass die TAp73vermittelte Repression der cp/EII-Aktivität durch Δ TAp73 aufgehoben werden kann. Diese Beobachtung ist per se mit der dominant-negativen Funktion von Δ TAp73 zu erklären, wodurch die Tumorsuppressor-Funktion von TAp73 bei p53-abhängigen Genen durch direkte Kompetition der DNA-Bindung und/oder durch Bildung von Heteroduplex-Strukturen mit TAp73 inhibiert wird (Stiewe et al., 2002a; Zaika et al., 2002). Da der cp/EII aufgrund keiner vorhandenen p53-Bindungsstelle nicht direkt durch p53-Bindung reprimiert wird (Lee et al., 1998), kann vermutlich TAp73 den cp/EII auch nicht durch Promotorbindung hemmen. Daher kommt die Δ TAp73-vermittelte Kompetition der DNA-Bindung hier nicht zum Tragen.

Weiterhin wurde die Promotor-Aktivität durch Δ TAp73 im Gegensatz zu TAp73 signifikant verstärkt. Diese Δ TAp73-vermittelte Aktivierung des cp/EII bewirkte auch eine Erhöhung des HBc-Expression. Obwohl Δ TAp73 keine N-terminale Transaktivierungsdomäne aufweist, ist diese Variante in der Lage, den Promotor zu aktivieren. Damit übereinstimmend wurde für die vom intronischen P2-Promotor transkribierte Δ Np73-Isoform eine alternative Transaktivierungsdomäne beschrieben, so dass die Δ Np73-Proteine, wenngleich weniger effizient wie die TAp73-Formen, auch als Transaktivierungsdomäne wurde aber bisher nicht für die durch den P1-Promotor regulierten Δ TAp73-Isoformen beschrieben. Somit scheint ein anderer Mechanismus für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Zusammengefasst hebt Δ TAp73 nicht nur die TAp73-vermittelte Repression des cp/EII durch Blockierung der Tumorsuppressor-

Funktion von TAp73 auf, sondern bewirkt auch eine Aktivierung des Promotors, die zur Erhöhung der HBc-Transkription führt.

Die vorgestellten Ergebnisse unterstützen die potentiell onkogene Funktion von Δ TAp73 durch positive Stimulierung der HBc-Transkription, um dadurch möglicherweise dem natürlichen Abwehrmechanismus von p53/TAp73 gegen die Ausbreitung des Virus in der Wirtszelle entgegenzuwirken. Die Analyse des SV40-Promotor-Enhancer ergab bereits vergleichbare Resultate, wobei auch dessen Aktivität durch TAp73 signifikant gehemmt und durch onkogenes Δ TAp73 induziert wurde (Stiewe et al., 2002a). Dadurch wird die Hypothese bestärkt, dass die nur bei TAp73 vorhandene Transaktivierungsdomäne für diesen hemmenden Effekt auf die Promotor-Aktivität im Vergleich zu Δ TAp73 vorantwortlich ist.

4.2 Inhibition der HBV-Replikation durch TAp73-vermittelte Repression beider Enhancer

Aufgrund der antagonistischen Wirkungsweise der p73-Isoformen auf die transkriptionelle Aktivität des cp/EII wurde die Beeinflussung der Virusreplikation näher untersucht. Als erste Indikatoren einer HBV-Replikation wurden dabei die zweier HBV-Antigene Expression verifiziert. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Xu et al. (2002) wurde sowohl die HBsAg- als auch die HBeAg-Expression durch p53 und TAp73 inhibiert. Im Gegensatz dazu konnte die ATAp73-Expression nicht zu einer Reduktion des Virustiters führen. Da die HBs- und HBeAg-Expression nicht immer mit der replizierenden Virusmenge korreliert (Glebe et al., 2001) wurden in weiteren Replikationsstudien *de novo* synthetisierte entkapsidierte HBV-DNA gemessen, die nach Replikation von intrazellulärer cccDNA gebildet wird. Dabei wurde eine deutliche Reduktion der HBV-DNA durch p53 und noch stärker durch TAp73 erzielt, wobei die Produktion von HBV-Viruspartikeln durch Δ TAp73-Expression nicht signifikant beeinträchtigt wurde. Ein wichtiges Merkmal des Hepatitis B Virus ist, dass die pgRNA als Vorläufer des viralen Genoms fungiert und die Replikation mittels reverser Transkription dieser pgRNA erfolgt. Die Analyse des pgRNA-Levels ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion durch p53 und TAp73 im Gegensatz zu Δ TAp73, dessen Expression keine Veränderung verursachte. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die Virus-Replikation nur durch die p53/p73-Wildtyp Proteine beeinflusst wird, die beide zu einer Inhibition führen. Obwohl die potentiell onkogene Δ TAp73-Isoform die cp/EII-Aktivität verstärkte, war die Virusproduktion nicht erhöht.

Um eine effiziente HBV-Genexpression bzw. Replikation zu gewährleisten, ist ein enges Zusammenspiel von Enhancer I und II von Bedeutung. So sind beide HBV-Enhancer in der Lage, alle vier HBV-Promotoren zu regulieren (Su & Yee, 1991). Bei der Analyse des Enhancers I wurde interessanterweise festgestellt, dass dieses regulatorische Element neben dem X-Promotor (Fukai et al., 1997) auch die anderen HBV-Promotoren allein regulieren kann (Antonucci & Rutter, 1989; Doitsh & Shaul, 1999; Honigwachs et al., 1989; Hu & Siddiqui, 1991). Weiterhin wurde auf die große Bedeutung des Enhancers I für die Virusreplikation schon von Guidotti et al. hingewiesen, da Enhancer I-defiziente HBV-transgene Mäuse keine Virionen produzieren und die Leber-spezifische HBV-Expression nur spärlich unterstützen (Guidotti et al., 1995). Letztendlich wurde die Dominanz des Enhancers I gegenüber dem Enhancer II in der HBV-Replikation bestätigt (Doitsh & Shaul, 2004).

Aus diesem Grund wurde auch der Effekt der p73-Isoformen auf die Aktivität des xp/EI untersucht. In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Ori et al., 1998; Xu et al., 2002) wurde eine deutliche Repression des xp/EI durch p53 und TAp73 gezeigt. Ein aktivierender Effekt der Δ TAp73-Isoform auf die xp/EI-Aktivität konnte aber nicht nachgewiesen werden. Der beobachtete Unterschied des inhibitorischen Effekts zwischen TAp73 und p53 auf die HBV-Transkription ist im Vergleich mit den Ergebnissen von Xu et al. (2002) leicht kontrovers. Da HBx die p53-vermittelte Repression der cp/EII-Aktivität aufheben kann (Lee et al., 1998; Xu et al., 2002), wurde in deren Studien ein HBx-defizientes HBV-Replikon verwendet. Aufgrund dieses Replikons wurde in Leberkarzinomzellen die Virus-Replikation ohne Generation des X-Proteins gewährleistet. Durch die Nutzung des Wildtyp HBV-Genoms in unserem System, durch das HBx exprimiert wurde, kann die stärkere reprimierende Aktivität von TAp73 auf die HBV-Replikation im Vergleich zu p53 erklärt werden. Diese Resultate führen daher zu der Annahme, dass die TAp73-vermittelte Repression des cp/EII durch die Funktion von HBx im Gegensatz zu p53 nicht beeinflusst wird.

Durch *in vivo* Interaktionstudien wurde, wie auch schon für p53 beschrieben (Ori et al., 1998), eine direkte Bindung sowohl von TAp73 als auch ∆TAp73 an den xp/EI nachgewiesen. Schon durch Zhu et al. konnte gezeigt werden, dass p73 mit der gleichen Sequenzspezifität wie p53 DNA binden kann (Zhu et al., 1998). Obwohl beide p73-Isoformen den xp/EI vermutlich über die identifizierte p53-Bindungsstelle aufgrund der eigenen DNA-Bindungs-domäne binden können, übt nur Transaktivierungs-kompetentes TAp73 einen Einfluss auf den xp/EI aus, was in der Repression der Promotor-Aktivität resultiert. Daher ist anzunehmen, dass mit Hilfe der TA-Domäne der reprimierende Effekt vermittelt wird.

Wie bereits erwähnt, führt ∆TAp73 nur zur Stimulierung des cp/EII im Gegensatz zum xp/EI, die keine Erhöhung der Virusreplikation verursacht. Daher könnte die dominierende Stellung des HBV Enhancers I gegenüber dem Enhancer II in der Virusreplikation (Doitsh & Shaul, 2004) eine mögliche Erklärung dafür geben, warum die ∆TAp73-Expression die HBV-Replikation letztendlich nicht positiv beeinflusst. Nur der kombinierte reprimierende Effekt von p53 oder TAp73 auf beide regulatorischen Elemente (xp/EI und cp/EII) resultiert in einer Hemmung der Virus-Replikation.

4.3 TAp73-Sp1-Interaktion interferiert mit Bindung von Sp1 an den cp/EII

Im Gegensatz zum Enhancer I scheint der Enhancer II für den strikten Lebertropismus, einem wesentlichen Merkmal der HBV-Infektion, verantwortlich zu sein (Shaul et al., 1985). Neben leberspezifischen sind auch ubiquitäre Transkriptionsfaktoren für die Regulation der HBV-Genexpression von großer Bedeutung. Für einen dieser Faktoren, Sp1, wurden zwei Bindungsstellen im *core*-Promotor und eine im stromaufwärts liegenden regulatorischen Element Enhancer II identifiziert (Yu & Mertz, 1996; Zhang & McLachlan, 1994; Zhang et al., 1993). Durch Li und Ou wurde gezeigt, dass beide Sp1-Bindungsstellen im *core*-Promotor für die Transkription der prä-*core*- sowie *core*-RNA bedeutend sind, wobei die Bindungsstelle im Enhancer II die Expression aller HBV Gene positiv reguliert (Li & Ou, 2001).

Erst kürzlich wurde berichtet, dass p53 und p73 die Promotor-Aktivität des humanen Telomerase Reverse Transkriptase-Gens (hTERT) durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit Sp1 reprimieren kann (Beitzinger et al., 2006; Racek et al., 2005). Insbesondere wurde für p53 eine Region von 101 Aminosäuren im C-Terminus, welche die Oligomerisierungs- und regulatorische Domänen des Proteins enthält, für diese physische Interaktion mit Sp1 identifiziert (Koutsodontis et al., 2005). Aufgrund der Sp1-vermittelten Regulation der core-RNA-Transkription durch Bindung von Sp1 an den cp/EII wurde eine mögliche Interaktion der p73-Isoformen mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 zur Aufklärung des Mechanismus der p73-vermittelten cp/Ell-Regulation genauer untersucht. Dabei wurde in Abwesenheit von überexprimiertem TAp73 eine Dosis-abhängige Aktivierung des cp/EII durch Sp1 nachgewiesen. Diese Sp1-vermittelte cp/EII-Aktivierung wurde aber nach Überexpression von TAp73 vollständig inhibiert. Selbst hohe Sp1-Konzentrationen konnten die Repression des cp/EII nicht aufheben. Weiterhin wurde in Übereinstimmung mit früheren Studien gezeigt, dass TAp73 und Sp1 auch in Leberkarzinomzellen zur Bildung von Protein-Protein-Komplexen führen (Beitzinger et al., 2006; Racek et al., 2005).

Im Gegensatz zu TAp73 wurde die Sp1-vermittelte Aktivierung des cp/EII durch Überexpression von Δ TAp73 signifikant verstärkt. Unabhängig von der antagonistischen Funktion von TAp73 und Δ TAp73 auf die cp/EII-Aktivität konnte auch eine direkte Interaktion zwischen Δ TAp73 und Sp1 nachgewiesen werden. Diese für beide p73-Isoformen gezeigte direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 könnte auf der bei TAp73 und Δ TAp73 vorhandenen Oligomerisierungsdomäne basieren, die vermutlich für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist (Jeong et al., 2006; Kim et al., 2003).

Um die Interaktion der p73-Isoformen mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 und dem HBV cp/EII näher zu charakterisieren, wurden *in vitro* und *in vivo* Interaktionstudien durchgeführt. Dabei wurde nachgewiesen, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an den cp/EII durch TAp73 signifikant gehemmt wird. Zusätzlich zur cp/EII-Aktivierung durch Δ TAp73 im Vergleich mit TAp73 wurde die Sp1-Bindung an das regulatorische HBV-Element durch die Δ TAp73-Sp1-Interaktion verstärkt. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass Transaktivierungs-kompetentes TAp73 den cp/EII reprimiert, in dem durch Bildung des TAp73-Sp1-Komplexes die Bindung von Sp1 an das regulatorische HBV-Element verhindert wird. Das Vorhandensein der Transaktivierungsdomäne von TAp73 scheint für die Dissoziation von Sp1 vom Promotor von essentieller Bedeutung zu sein, da dieser Effekt mit der ∆TAp73-Isoform ohne TA-Domäne nicht beobachtet werden konnte.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien weisen daraufhin, dass p53 als transkriptioneller Aktivator einen generell hemmenden Effekt auf Promotoren hat, die keine spezifische p53-Bindungsstelle aufweisen, so dass die Repression wahrscheinlich indirekt durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit basalen Transkriptionsfaktoren erfolgt (Liu et al., 1993; Ragimov et al., 1993; Thut et al., 1995). Diese Wirkungsweise wird auch für p73 vermutet, da auch die p73-vermittelte Transaktivierung von p53-responsiven Genen über die Bindung von p73 an den jeweiligen Promotor realisiert wird (Kaghad et al., 1997). Um den Mechanismus der cp/EII-Regulation näher zu charakterisieren, wurde die Möglichkeit einer potenziellen direkten DNA-Bindung der p73-Isoformen an die cp/EII-Region überprüft. Wie bereits für p53 gezeigt (Lee et al., 1998) wurde auch für TAp73 sowie ∆TAp73 keine direkte Bindung an den cp/EII nachgewiesen. Die Zunahme der cp/EII-DNA nach ∆TAp73-△TAp73-Sp1-Komplexes am cp/EII persistiert und dadurch die HBc-Expression positiv reguliert.

4.4 Modell der p73-vermittelten Regulation der HBV cp/Ell-Transkription

Zusammengefasst bestätigen die erhaltenen Ergebnisse die direkte Interaktion der entsprechenden p73-Isoform (TA-Domäne im Vergleich zu Δ TA) mit dem Transaktivator Sp1 als ursächlichen Mechanismus der unterschiedlichen Beeinflussung der HBc-Expression. So wurde nachgewiesen, dass TAp73 die Expression des HBc-Gens aufgrund der direkten Interaktion mit Sp1 und der daraus resultierenden Dissoziation von Sp1 vom cp/EII effizient reprimiert. Dem gegenüber verstärkt die Δ TAp73-Isoform die HBc-Expression durch Aktivierung des cp/EII infolge der Interaktion mit Sp1, aber offenbar ohne einen relevanten Effekt auf die xp/EI-Aktivität sowie letztlich auch auf die Virus-Replikation zu haben.

Daraus ergibt sich das nachfolgende Modell der p73-vermittelten Regulation der HBV cp/EII-Transkription (Buhlmann et al., 2008), in dem die DNA-Bindung des transkriptionellen Aktivators Sp1 in Gegenwart der TA-Domäne von p73 vollständig aufgehoben wird. So führt die direkte Interaktion von TAp73 mit Sp1 zur Ablösung von Sp1 vom cp/EII (Abb. 39A), wobei der ΔTAp73-Sp1 enthaltene Komplex DNA-gebunden bleibt (Abb. 39B).



Abb. 39: Modell der p73-vermittelten Regulation der HBV *core*-Promotor/Enhancer II Transkription. TAp73 und sein onkogener Gegenpart Δ TAp73 interagieren direkt mit dem DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor Sp1. (A) Während die Interaktion von TAp73 mit Sp1 die Bindung von Sp1 an cp/EII inhibiert, (B) bleibt der Δ TAp73-Sp1-Komplex an die DNA gebunden.

Diese Ergebnisse lassen einen weiteren neuen Mechanismus zu den bereits bekannten vermuten, durch den Δ TAp73 den karzinogenen Prozess in den Hepatozyten verstärken kann. Bisher wurde gezeigt, dass Δ TAp73 als Sequenz-spezifischer DNA-Bindungsfaktor einen direkten dominant-negativen inhibitorischen Effekt auf die Tumorsuppressor-Aktivität von p53 und TAp73 ausübt. Zum Anderen beeinträchtigt Δ TAp73 unabhängig von p53 den Retinoblastom (RB) Tumorsuppressor-Signalweg, in dem Δ TAp73 das Retinoblastomprotein durch erhöhte Phosphorylierung inaktiviert, wodurch es zur verstärkten Aktivität des zellulären Transkriptionsfaktors E2F1 am Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus kommt und mit einer verstärkten Proliferation von Fibroblasten einhergeht. Somit wird durch die gesteigerte RB-Phosphorylierung die Fähigkeit von RB, den Ablauf des Zellzyklusses zu blockieren, entscheidend aufgehoben (Stiewe et al., 2003). Durch die Inaktivierung dieser zwei bedeutenden Tumorsuppressor-Signalwege agiert Δ TAp73 funktionell analog zu mehreren viralen Onkoproteinen.

Zusätzlich zur ATAp73-vermittelten Hemmung von p53 wird p53 durch die HBV-Onkogene HBx und HBc funktionell inaktiviert. So reduziert HBc beispielsweise DNA-Bindung des transkriptionellen Aktivators die E2F1 an dessen Bindungsstelle im p53-Promotor (Kwon & Rho, 2003). Weiterhin kann die Funktion von p53 zu transaktivieren bzw. Apoptose zu induzieren durch Bindung von HBx inhibiert werden (Wang et al., 1994; Wang et al., 1995). Daher wird vermutet, dass beide HBV-Proteine wie die Produkte anderer onkogener DNA-Viren (z. B das SV40 T-Antigen (McCormick et al., 1981; Mietz et al., 1992), das adenovirale E1B-Protein (Sarnow et al., 1982; Yew & Berk, 1992) oder das humane Papillomavirus E6-Protein (Lechner et al., 1992; Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990)) die Tumorsuppressor-Funktion von p53 durch direkte Bindung inhibieren. Hypothetisch wird der karzinogene Effekt dieser Viren dadurch vermittelt, dass die p53-Inaktivierung zur Inhibition Transaktivierung und Apoptose und dadurch letztendlich von zur Transformation führt, da die Zellen unkontrolliert weitere Mutationen akkumulieren können. Dem gegenüber wurde berichtet, dass die p53-Mutation ein relativ spätes Ereignis in der Entwicklung eines Leberkarzinoms darstellt (Teramoto et al., 1994).

89

Durch diese Hinweise könnte die nachgewiesene Aktivierung des HBV cp/EII und Verstärkung der HBc-Expression durch die onkogene ∆TAp73-Variante infolge der Interaktion mit dem DNA-gebundenen Transaktivator Sp1 einen zweiten neuen Mechanismus der ∆TAp73-abhängigen Inhibition von p53 darstellen (Abb. 40).



Abb. 40: Modell der Interaktionen der p53-Familie mit dem HBV-Onkoprotein HBc. Als Teil einer komplexen Interaktion führen ΔTAp73-Isoformen neben der Blockierung der p53/TAp73-vermittelten Apoptose/Zellzyklus-Arrest sowie RB-Aktivierung zur Verstärkung der HBc-Expression, die ebenfalls in einer Hemmung der Funktionen von p53/TAp73 resultiert. Im Gegensatz zu ΔTAp73 inhibieren die Tumorsuppressoren p53/TAp73 die HBc-Expression.

Lowe und Ruley vermuteten, dass infolge der viralen Infektion die p53-Expression zur Abwehr des sich ausbreitenden Virus ansteigt. Nach der initialen Infektion oder im Prozess der Fluktuation der Replikation, der in chronischen Hepatitis-Patienten beobachtet wurde, könnte das Verhältnis von p53 zu HBx die Aktivität des Enhancers II bestimmen. (Lowe & Ruley, 1993). Obwohl p53 durch HBx während der Karzinogenese inhibiert werden kann, scheint wiederum die p53-abhängige Inhibition des HBV *core*-Promotors der universellere Mechanismus zu sein, durch den p53 die Leber gegen den karzinogenen Prozess schützt (Lee et al., 1998; Lee et al., 1995; Uchida et al., 1996). Deshalb kann spekuliert werden, dass eine koordinierte Regulation der HBc-Expression (anstatt von HBx) entweder durch TAp73 oder seinen onkogenen Antagonisten Δ TAp73 zur Hepatokarzinogenese beiträgt. Hierbei scheint die Feinabstimmung des TA: ΔTA-Verhältnisses die Funktionalität von p73 bezüglich des vermittelten Effekts auf den cp/EII zu bestimmen. Die Aktivität des für die Transkription der TAp73/ Δ TAp73-Isoformen verantwortliche P1-Promotor wird durch die direkte Bindung von E2F1 an dessen Bindungsstellen im Promotor gesteuert (Irwin et al., 2000; Seelan et al., 2002; Stiewe & Putzer, 2000). Zusätzlich können die ATAp73-Isoformen die Aktivität von E2F1 durch Hyperphosphorylierung von RB induzieren (Stiewe et al., 2003). Das führt wiederum zu der Annahme, dass die E2F1-Expression die Ursache der erhöhten Expression der p73-Isoformen darstellt. Dennoch weisen einige Studien daraufhin, dass infolge einer erhöhten P1-Promotoraktivität nicht alle P1-abhängigen p73-Transkripte in Tumorzellen hochreguliert sein müssen (Guan & Chen, 2005; Tuve et al., 2004). Somit kann eine unterschiedliche Regulation der verschiedenen TAp73/ATAp73-Spleißvarianten vermutet werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die erhöhte ATAp73-Expression in fortgeschrittenen Melanomen mit einem hohen Level von TAp73 und E2F1 korreliert (Tuve et al., 2004). Schließlich konnte neben der erhöhten ΔTAp73-Expression auch eine Aktivierung der E2F1-Zielgene Cyclin D1 und Cyclin E in Maus- und humanen Lebertumoren nachgewiesen werden (Joo et al., 2001; Sayan et al., 2001; Tannapfel, Buhlmann et al., 2008).

Unabhängig von E2F1 werden aber noch weitere Faktoren vermutet, die in die Regulation der p73-Isoform-spezifischen Expression involviert sind. So reprimiert der Transkriptionsfaktor *zinc finger E-box binding homeobox 1* (ZEB1) die p73-Transkription durch Bindung an ein neu identifiziertes negatives regulatorisches Element im ersten Intron stromaufwärts des Exons 2 des *TP73*-Gens (Fontemaggi et al., 2001). Interessanterweise wird durch eine 73 bp intronische Deletion in diesem Repressor-Element, die die ZEB1-vermittelte p73-Repression verringert und das Verhältnis von TAp73 zu Δ TAp73 durch Favorisierung dominant-negativer p73-Varianten verändert (Dominguez et al., 2006). Dieses Übergewicht der onkogenen Δ TAp73-Isoformen könnte nun zur Tumorentstehung beitragen. Ferner können wertvolle Erkenntnisse aus Untersuchungen zur Isoformen-spezifischen Proteinstabilität von Bedeutung sein, da diese ebenfalls maßgeblich für das Expressionsniveau des jeweiligen Proteins in der Zelle ist. So wurde bereits durch verschiedene Studien über eine höhere Stabilität der Δ TAp73-Isoformen berichtet (Grob et al., 2001; Stiewe et al., 2002a). Es erscheint als überaus sinnvoll, weitere verantwortliche Mechanismen und Faktoren für die Entstehung der aberrierenden Spleißmuster des p73 in Tumoren zu identifizieren.

Die Vermutung, dass $\Delta TAp73$ ursächlich mit der Induktion eines HCCs assoziiert ist, wurde durch gezielte Studien unterstützt, die eine erhöhte △TAp73-Expression sowohl in HCC-Zelllinien als auch in primären Lebertumoren, verglichen mit umgebendem normalen Lebergewebe von Patienten, nachweisen konnten (Muller et al., 2005; Stiewe et al., 2004). In Übereinstimmung mit ihrer anti-apoptotischen und onkogenen Rolle stellen Δ TAp73-Formen außerdem einen adversen prognostischen Marker dar. So hatten Patienten mit erhöhter Δ TAp73-Expression in HCCs eine signifikant kürzere Überlebenszeit als solche, deren Tumoren keine Δ TAp73-Expression aufwiesen (Muller et al., 2005). Weiterhin zeigen unsere neuesten Ergebnisse erstmals, dass die Δ TAp73-Expression nicht nur eine Konsequenz der malignen Transformation darstellt, sondern auch aktiv die Transformation der Hepatozyten und die Entwicklung eines tumorigenen Phänotyps durch Beeinträchtigung der RB-Aktivität unterstützt (Tannapfel, Buhlmann et al., 2008).

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte der molekulare Mechanismus der p73vermittelten Regulation der HBV cp/EII-Transkription aufgeklärt werden. Dabei ubiguitären Transaktivator Sp1 als Ursache des jeweiligen Effekts auf die HBc-Expression nachgewiesen. Wie bereits bekannt, kann HBx die Funktion von p53 durch direkte Bindung inhibieren. Da p73 auch wie p53 die HBV-Transkription und Replikation regulieren kann, bleibt offen, inwieweit die HBx-Expression die Funktion von p73 beeinflusst. Wie schon für p53 und HBx gezeigt, kann somit auch eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen p73 und HBx vermutet werden. Da das regulatorische Protein HBx zahlreiche zelluläre sowie virale Promotoren transaktiviert und sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken kann, ist auch die Analyse einer synergistischen oder antagonistischen Beeinflussung der p73-vermittelten Apoptose von großem Interesse. Weiterhin sollte in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, ob die potentiell onkogene Δ TAp73-Variante den Prozess der Karzinogenese zusammen mit dem Onkogen HBx verstärken kann.

5 Zusammenfassung

Die chronische Infektion mit dem Hepatitis B Virus gilt als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). Durch den Nachweis einer erhöhten p73-Expression, insbesondere der N-terminal trunkierten ∆TAp73-Isoformen in primären Lebertumoren im Vergleich mit gesundem Gewebe, wird eine entscheidende Rolle von p73 in der Karzinogenese vermutet. Als Abwehrmechanismus gegen die Virusausbreitung in der Wirtszelle führen Interaktionen der p53-Familie mit regulatorischen HBV-Elementen zur Hemmung der HBV-Transkription. In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der p73-vermittelten Regulation der HBV cp/EII-Transkription aufgeklärt. Die ektope und endogene Expression des Tumorsuppressors TAp73 führt zur signifikanten Repression der cp/EII-Aktivität und HBc-Expression in p53-negativen Leberkarzinom-Zelllinien. Im Gegensatz dazu resultierte die Überexpression von $\Delta TAp73$ in der Aktivierung des cp/EII und einer erhöhten HBc-Expression. Die TAp73-vermittelte Repression der cp/EII-Aktivität wurde durch potentiell onkogenes ∆TAp73 vollständig aufgehoben. Sowohl für die Transaktivierungs-kompetente TAp73- als auch die Transaktivierungs-defiziente Δ TAp73-Isoform wurde eine direkte Interaktion mit Sp1, einem wichtigen Regulator der HBV-Genexpression, nachgewiesen. Nur TAp73 unterbindet die Bindung von Sp1 an den cp/EII, wobei der Δ TAp73-Sp1 enthaltene Komplex weiter DNA-gebunden bleibt. Weiterhin ist der hemmende Effekt von p53/p73 auf die HBc-Expression mit der Inhibition der viralen Replikation assoziiert, während die *ATAp73-vermittelte cp/EII-Aktivierung* sowie Erhöhung der HBc-Expression nicht zur Beeinflussung der Replikation führt. Zusätzlich wurde auch der xp/EI durch direkte Bindung der p73-Isoformen Zusammengefasst bestätigen diese reprimiert. Ergebnisse die direkte Interaktion der entsprechenden p73-Isoform (TA-Domäne im Vergleich zu ΔTA) mit Sp1 als ursächlichen Mechanismus der unterschiedlichen Beeinflussung der HBc-Expression und lassen einen neuen Mechanismus vermuten, durch den onkogenes *ATAp73* den karzinogenen Prozess in Hepatozyten verstärken kann (Buhlmann et al., 2008).

6 Literaturverzeichnis

- Albin C and Robinson WS. (1980). Protein kinase activity in hepatitis B virus. *J Virol*, 34, 297-302.
- Antonucci TK and Rutter WJ. (1989). Hepatitis B virus (HBV) promoters are regulated by the HBV enhancer in a tissue-specific manner. *J Virol*, 63, 579-83.
- Balsano C, Billet O, Bennoun M, Cavard C, Zider A, Grimber G, Natoli G, Briand P and Levrero M. (1994). Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator in vivo. *J Hepatol*, 21, 103-9.
- Beasley RP, Hwang LY, Lin CC and Chien CS. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*, **2**, 1129-33.
- Becker K, Pancoska P, Concin N, Vanden Heuvel K, Slade N, Fischer M, Chalas E and Moll UM. (2006). Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *Int J Oncol*, **29**, 889-902.
- Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R and Stiewe T. (2006). Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. *Oncogene*, **25**, 813-26.
- Ben-Levy R, Faktor O, Berger I and Shaul Y. (1989). Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol*, **9**, 1804-9.
- Blum HE, Gerok W and Vyas GN. (1989). The molecular biology of hepatitis B virus. *Trends Genet*, **5**, 154-8.
- Blum HE, Zhang ZS, Galun E, von Weizsacker F, Garner B, Liang TJ and Wands JR. (1992). Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J Virol*, 66, 1223-7.
- Bock CT, Schranz P, Schroder CH and Zentgraf H. (1994). Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes*, **8**, 215-29.
- Bottcher B, Wynne SA and Crowther RA. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, 386, 88-91.
- Bruss V and Gerlich WH. (1988). Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein. *Virology*, 163, 268-75.
- Buendia MA. (1998). Hepatitis B viruses and cancerogenesis. *Biomed Pharmacother*, 52, 34-43.
- Buhlmann S and Putzer BM. (2008). DNp73 a matter of cancer: Mechanisms and clinical implications *Biochim Biophys Acta*, **1785**, 207-216.
- Buhlmann S, Racek T, Schwarz A, Schaefer S and Putzer BM. (2008). Molecular mechanism of p73-mediated regulation of hepatitis B virus core promoter/enhancer II: implications for hepatocarcinogenesis. *J Mol Biol*, **378**, 20-30.
- Casciano I, Mazzocco K, Boni L, Pagnan G, Banelli B, Allemanni G, Ponzoni M, Tonini GP and Romani M. (2002). Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ*, **9**, 246-51.

- Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, Cote PJ, Gerin JL, Purcell RH and Miller RH. (1993). The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J Virol*, 67, 1218-26.
- Chen IH, Huang CJ and Ting LP. (1995). Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus. *J Virol*, 69, 3647-57.
- Choi CY, Choi BH, Park GT and Rho HM. (1997). Activating transcription factor 2 (ATF2) down-regulates hepatitis B virus X promoter activity by the competition for the activating protein 1 binding site and the formation of the ATF2-Jun heterodimer. *J Biol Chem*, **272**, 16934-9.
- Colombo M. (1997). Treatment of hepatocellular carcinoma. J Viral Hepat, 4 Suppl 1, 125-30.
- Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield PT, Stahl SJ and Steven AC. (1997). Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*, **386**, 91-4.
- Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C and Levrero M. (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*, **9**, 175-86.
- Crowther RA, Kiselev NA, Bottcher B, Berriman JA, Borisova GP, Ose V and Pumpens P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*, **77**, 943-50.
- Dane DS, Cameron CH and Briggs M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, 1, 695-8.
- De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M and Melino G. (1998). Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. J Exp Med, 188, 1763-8.
- **Doitsh G and Shaul Y. (1999).** HBV transcription repression in response to genotoxic stress is p53-dependent and abrogated by pX. *Oncogene*, **18**, 7506-13.
- Doitsh G and Shaul Y. (2004). Enhancer I predominance in hepatitis B virus gene expression. *Mol Cell Biol*, 24, 1799-808.
- Dominguez G, Pena C, Silva J, Garcia JM, Garcia V, Rodriguez R, Cantos B, Citores MJ, Espana P and Bonilla F. (2006). The presence of an intronic deletion in p73 and high levels of ZEB1 alter the TAp73/DeltaTAp73 ratio in colorectal carcinomas. *J Pathol*, 210, 390-7.
- **Doria M, Klein N, Lucito R and Schneider RJ. (1995).** The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors. *Embo J*, **14**, 4747-57.
- Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, Kaghad M, Blanc E, Raguenez G, Goldschneider D, Terrier-Lacombe MJ, Hartmann O, Moll U, Caput D and Benard J. (2002). DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol*, 160, 631-9.
- Dusheiko GM, Hobbs KE, Dick R and Burroughs AK. (1992). Treatment of small hepatocellular carcinomas. *Lancet*, 340, 285-8.
- el-Deiry WS. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, **8**, 345-57.
- El-Serag HB and Mason AC. (1999). Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, **340**, 745-50.

- Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnolzer M and Urban S. (2006). Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology*, **43**, 750-60.
- Feitelson MA and Duan LX. (1997). Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, 150, 1141-57.
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F and Jacks T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, 416, 560-4.
- Fontemaggi G, Gurtner A, Strano S, Higashi Y, Sacchi A, Piaggio G and Blandino G. (2001). The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol*, **21**, 8461-70.
- Fukai K, Takada S, Yokosuka O, Saisho H, Omata M and Koike K. (1997). Characterization of a specific region in the hepatitis B virus enhancer I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. *Virology*, 236, 279-87.
- Gerlich WH, Goldmann U, Muller R, Stibbe W and Wolff W. (1982). Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase. *J Virol*, 42, 761-6.
- Gerlich WH and Robinson WS. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*, 21, 801-9.
- Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, Roy S and Belanger L. (2000). The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. *J Virol*, **74**, 5032-9.
- Glebe D, Berting A, Broehl S, Naumann H, Schuster R, Fiedler N, Tolle TK, Nitsche S, Seifer M, Gerlich WH and Schaefer S. (2001). Optimised conditions for the production of hepatitis B virus from cell culture. *Intervirology*, 44, 370-8.
- Glebe D, Urban S, Knoop EV, Cag N, Krass P, Grun S, Bulavaite A, Sasnauskas K and Gerlich WH. (2005). Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*, **129**, 234-45.
- Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, Hugli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G and Tobler A. (2001). Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*, **8**, 1213-23.
- Guan M and Chen Y. (2005). Aberrant expression of DeltaNp73 in benign and malignant tumours of the prostate: correlation with Gleason score. *J Clin Pathol*, **58**, 1175-9.
- Guidotti LG, Matzke B, Schaller H and Chisari FV. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol*, 69, 6158-69.
- Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H and Will H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*, **69**, 5437-44.
- Guo WT, Bell KD and Ou JH. (1991). Characterization of the hepatitis B virus Enhl enhancer and X promoter complex. *J Virol*, **65**, 6686-92.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

- Harms KL and Chen X. (2006). The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ*, **13**, 890-7.
- Hildt E, Saher G, Bruss V and Hofschneider PH. (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology*, **225**, 235-9.
- Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE and Ganem D. (1990). Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as wel as for reverse transcription. *Nature*, **344**, 552-5.
- Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R and Harris CC. (1996). Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res*, 24, 141-6.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Honigwachs J, Faktor O, Dikstein R, Shaul Y and Laub O. (1989). Liverspecific expression of hepatitis B virus is determined by the combined action of the core gene promoter and the enhancer. *J Virol*, **63**, 919-24.
- Hu J and Seeger C. (1996). Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1060-4.
- Hu J, Toft DO and Seeger C. (1997). Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *Embo J*, 16, 59-68.
- Hu KQ and Siddiqui A. (1991). Regulation of the hepatitis B virus gene expression by the enhancer element I. *Virology*, 181, 721-6.
- Huang J and Liang TJ. (1993). A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol*, **13**, 7476-86.
- Huang ZM and Yen TS. (1994). Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. J Virol, 68, 3193-9.
- Huang ZM and Yen TS. (1995). Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol*, 15, 3864-9.
- Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W, Flores ER, Tsai KY, Jacks T, Vousden KH and Kaelin WG, Jr. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature*, **407**, 645-8.
- Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC and Kaelin WG, Jr. (2003). Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, **3**, 403-10.
- Ishida H, Ueda K, Ohkawa K, Kanazawa Y, Hosui A, Nakanishi F, Mita E, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M and Hayashi N. (2000). Identification of multiple transcription factors, HLF, FTF, and E4BP4, controlling hepatitis B virus enhancer II. J Virol, 74, 1241-51.
- Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T and Ikawa S. (2002). Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res*, 62, 636-41.
- Jeong MH, Bae J, Kim WH, Yoo SM, Kim JW, Song PI and Choi KH. (2006). p19ras interacts with and activates p73 by involving the MDM2 protein. J Biol Chem, 281, 8707-15.
- Johnson JL, Raney AK and McLachlan A. (1995). Characterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *Virology*, **208**, 147-58.

- Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK and Jang JJ. (2001). Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver*, **21**, 89-95.
- Jost CA, Marin MC and Kaelin WG, Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, **389**, 191-4.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90, 809-19.
- Kane M. (1995). Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine*, 13 Suppl 1, S47-9.
- Kann M and Gerlich WH. (1994). Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus. *J Virol*, 68, 7993-8000.
- Kann M, Thomssen R, Kochel HG and Gerlich WH. (1993). Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus. *Arch Virol Suppl*, **8**, 53-62.
- Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stoppler C, Roth J and Dobbelstein M. (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene*, **21**, 4715-27.
- Kim EJ, Park JS and Um SJ. (2003). Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5356-67.
- Kock J and Schlicht HJ. (1993). Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol*, **67**, 4867-74.
- Koike K, Shirakata Y, Yaginuma K, Arii M, Takada S, Nakamura I, Hayashi Y, Kawada M and Kobayashi M. (1989). Oncogenic potential of hepatitis B virus. *Mol Biol Med*, 6, 151-60.
- Kosovsky MJ, Quadri I and Siddiqui A. (1998). *Hepatitis B Virus: Molecular Mechanism in Disease and Novel Strategies of Therapy*. Koshy R and Caselmann Wh (eds). Imperial College Press: London, pp 21-50.
- Koutsodontis G, Vasilaki E, Chou WC, Papakosta P and Kardassis D. (2005). Physical and functional interactions between members of the tumour suppressor p53 and the Sp families of transcription factors: importance for the regulation of genes involved in cell-cycle arrest and apoptosis. *Biochem J*, 389, 443-55.
- Kwon JA and Rho HM. (2003). Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem*, 384, 203-12.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH and Laimins LA. (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J*, **11**, 3045-52.
- Lee H, Kim HT and Yun Y. (1998). Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression. *J Biol Chem*, 273, 19786-91.

- Lee H, Lee YH, Huh YS, Moon H and Yun Y. (1995). X-gene product antagonizes the p53-mediated inhibition of hepatitis B virus replication through regulation of the pregenomic/core promoter. *J Biol Chem*, 270, 31405-12.
- Lee SG and Rho HM. (2000). Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral X protein. *Oncogene*, **19**, 468-71.
- Li J and Ou JH. (2001). Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol*, **75**, 8400-6.
- Li M, Xie Y, Wu X, Kong Y and Wang Y. (1995). HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus. *Virology*, 214, 371-8.
- Liu X, Miller CW, Koeffler PH and Berk AJ. (1993). The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in Holo-TFIID, and a neighboring p53 domain inhibits transcription. *Mol Cell Biol*, **13**, 3291-300.
- Lo WY and Ting LP. (1994). Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome. *J Virol*, **68**, 1758-64.
- Loffler-Mary H, Werr M and Prange R. (1997). Sequence-specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology*, **235**, 144-52.
- Lopez-Cabrera M, Letovsky J, Hu KQ and Siddiqui A. (1990). Multiple liverspecific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promoter: trans-activation and repression by CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5069-73.
- Lowe SW and Ruley HE. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*, 7, 535-45.
- Magnius LO and Espmark JA. (1972). New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J Immunol*, 109, 1017-21.
- Maguire HF, Hoeffler JP and Siddiqui A. (1991). HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions. *Science*, 252, 842-4.
- McCormick F, Clark R, Harlow E and Tjian R. (1981). SV40 T antigen binds specifically to a cellular 53 K protein in vitro. *Nature*, **292**, 63-5.
- Melino G, De Laurenzi V and Vousden KH. (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. Nat Rev Cancer, 2, 605-15.
- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM and Howley PM. (1992). The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *Embo J*, **11**, 5013-20.
- Moolla N, Kew M and Arbuthnot P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. J Viral Hepat, 9, 323-31.
- Muller M, Schilling T, Sayan AE, Kairat A, Lorenz K, Schulze-Bergkamen H, Oren M, Koch A, Tannapfel A, Stremmel W, Melino G and Krammer PH. (2005). TAp73/DeltaNp73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ.*
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17-27.

- Murray-Zmijewski F, Lane DP and Bourdon JC. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, **13**, 962-72.
- Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe K, Hayashi S, Hosoda M, Todo S and Nakagawara A. (2003). Negative autoregulation of p73 and p53 by DeltaNp73 in regulating differentiation and survival of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett*, **197**, 105-9.
- Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe Ki K, Todo S, Mizuguchi H, Hayakawa T and Nakagawara A. (2002). Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol Cell Biol*, 22, 2575-85.
- Nelson JD, Denisenko O, Sova P and Bomsztyk K. (2006). Fast chromatin immunoprecipitation assay. *Nucleic Acids Res*, **34**, e2.
- Ogbourne S and Antalis TM. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*, 331 (Pt 1), 1-14.
- Oren M and Rotter V. (1999). Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci*, 55, 9-11.
- Ori A, Zauberman A, Doitsh G, Paran N, Oren M and Shaul Y. (1998). p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *Embo J*, **17**, 544-53.
- Parkin DM. (2004). International variation. Oncogene, 23, 6329-40.
- Petrenko O, Zaika A and Moll UM. (2003). deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol*, 23, 5540-55.
- Pisani P, Parkin DM, Munoz N and Ferlay J. (1997). Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 387-400.
- Ponder BA. (2001). Cancer genetics. Nature, 411, 336-41.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR and Miller FD. (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*, 289, 304-6.
- Prives C and Hall PA. (1999). The p53 pathway. J Pathol, 187, 112-26.
- Putzer BM, Stiewe T, Crespo F and Esche H. (2000). Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther*, **7**, 1317-25.
- Putzer BM, Tuve S, Tannapfel A and Stiewe T. (2003). Increased DeltaN-p73 expression in tumors by upregulation of the E2F1-regulated, TA-promoter-derived DeltaN'-p73 transcript. *Cell Death Differ*, **10**, 612-4.
- Rabe B, Glebe D and Kann M. (2006). Lipid-mediated introduction of hepatitis B virus capsids into nonsusceptible cells allows highly efficient replication and facilitates the study of early infection events. *J Virol*, **80**, 5465-73.
- Racek T, Mise N, Li Z, Stoll A and Putzer BM. (2005). C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. *J Biol Chem*, 280, 40402-5.
- Ragimov N, Krauskopf A, Navot N, Rotter V, Oren M and Aloni Y. (1993). Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation in vitro by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. *Oncogene*, **8**, 1183-93.
- Raney AK, Easton AJ and McLachlan A. (1994). Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus large surface antigen promoter. *J Gen Virol*, 75 (Pt 10), 2671-9.
- Raney AK, Johnson JL, Palmer CN and McLachlan A. (1997). Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, **71**, 1058-71.
- Reichelt M, Zang KD, Seifert M, Welter C and Ruffing T. (1999). The yeast two-hybrid system reveals no interaction between p73 alpha and SV40 large T-antigen. *Arch Virol*, 144, 621-6.
- Rodicker F and Putzer BM. (2003). p73 is effective in p53-null pancreatic cancer cells resistant to wild-type TP53 gene replacement. *Cancer Res*, 63, 2737-41.
- Ruiz-Opazo N, Chakraborty PR and Shafritz DA. (1982). Evidence for supercoiled hepatitis B virus DNA in chimpanzee liver and serum Dane particles: possible implications in persistent HBV infection. *Cell*, **29**, 129-36.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (USA).
- Sandelin A, Alkema W, Engstrom P, Wasserman WW and Lenhard B. (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, **32**, D91-4.
- Sarnow P, Ho YS, Williams J and Levine AJ. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell*, 28, 387-94.
- Sasaki Y, Morimoto I, Ishida S, Yamashita T, Imai K and Tokino T. (2001). Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther*, **8**, 1401-8.
- Sayan AE, Sayan BS, Findikli N and Ozturk M. (2001). Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells. Oncogene, 20, 5111-7.
- Scaruffi P, Casciano I, Masiero L, Basso G, Romani M and Tonini GP. (2000). Lack of p73 expression in mature B-ALL and identification of three new splicing variants restricted to pre B and C-ALL indicate a role of p73 in B cell ALL differentiation. *Leukemia*, 14, 518-9.
- Schaefer S and Gerlich WH. (2007). The Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice 3e. Rodes J, Benhamou Jp, Rizetto M, Reich J and Blei A (eds). Blackwell Publishing: Oxford, pp 823-848.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ and Howley PM. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63, 1129-36.
- Scherr M, Battmer K, Ganser A and Eder M. (2003). Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle*, **2**, 251-7.
- Seeger C, Ganem D and Varmus HE. (1986). Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, 232, 477-84.

- Seelan RS, Irwin M, van der Stoop P, Qian C, Kaelin WG, Jr. and Liu W. (2002). The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. *Neoplasia*, **4**, 195-203.
- Seifer M, Hohne M, Schaefer S and Gerlich WH. (1991). In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein. *J Hepatol*, 13 Suppl 4, S61-5.
- Seitz S, Urban S, Antoni C and Bottcher B. (2007). Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *Embo J*, 26, 4160-7.
- Shaul Y, Rutter WJ and Laub O. (1985). A human hepatitis B viral enhancer element. *Embo J*, 4, 427-30.
- Siegrist CA, Durand B, Emery P, David E, Hearing P, Mach B and Reith W. (1993). RFX1 is identical to enhancer factor C and functions as a transactivator of the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol*, **13**, 6375-84.
- Slade N, Zaika AI, Erster S and Moll UM. (2004). DeltaNp73 stabilises TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. *Cell Death Differ*, **11**, 357-60.
- Slagle BL, Lee TH, Medina D, Finegold MJ and Butel JS. (1996). Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene. *Mol Carcinog*, **15**, 261-9.
- Spandau DF and Lee CH. (1988). trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. J Virol, 62, 427-34.
- Standring DN, Ou JH, Masiarz FR and Rutter WJ. (1988). A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in Xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 8405-9.
- Stanelle J, Tu-Rapp H and Putzer BM. (2005). A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ*, 12, 347-57.
- Stiewe T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. Nat Rev Cancer, 7, 165-8.
- Stiewe T and Putzer BM. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1induced apoptosis. *Nat Genet*, 26, 464-9.
- Stiewe T and Putzer BM. (2001). p73 in apoptosis. Apoptosis, 6, 447-52.
- Stiewe T, Stanelle J, Theseling CC, Pollmeier B, Beitzinger M and Putzer BM. (2003). Inactivation of retinoblastoma (RB) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. J Biol Chem, 278, 14230-6.
- Stiewe T, Theseling CC and Putzer BM. (2002a). Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem*, 277, 14177-85.
- Stiewe T, Tuve S, Peter M, Tannapfel A, Elmaagacli AH and Putzer BM. (2004). Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*, **10**, 626-33.
- Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H and Putzer BM. (2002b). Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res*, 62, 3598-602.
- Su H and Yee J. (1991). Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2708-2712.

- Subler MA, Martin DW and Deb S. (1992). Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol*, 66, 4757-62.
- Summers J, O'Connell A and Millman I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 4597-601.
- Sun CT, Lo WY, Wang IH, Lo YH, Shiou SR, Lai CK and Ting LP. (2001). Transcription repression of human hepatitis B virus genes by negative regulatory element-binding protein/SON. *J Biol Chem*, **276**, 24059-67.
- Tang H and McLachlan A. (2001). Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1841-6.
- Tannapfel A, John K, Mise N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM and Putzer BM. (2008). Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis*, **29**, 211-8.
- Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, Fujimori T, Hayashi K and Maeda S. (1994). p53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 54, 231-5.
- Terradillos O, Billet O, Renard CA, Levy R, Molina T, Briand P and Buendia MA. (1997). The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene*, 14, 395-404.
- Thut CJ, Chen JL, Klemm R and Tjian R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, 267, 100-4.
- Tran PL, Vigneron JP, Pericat D, Dubois S, Cazals D, Hervy M, DeClerck YA, Degott C and Auclair C. (2003). Gene therapy for hepatocellular carcinoma using non-viral vectors composed of bis guanidinium-trencholesterol and plasmids encoding the tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-2 and TIMP-3. Cancer Gene Ther, 10, 435-44.
- Truant R, Antunovic J, Greenblatt J, Prives C and Cromlish JA. (1995). Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. J Virol, 69, 1851-9.
- Tuttleman JS, Pourcel C and Summers J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, 47, 451-60.
- Tuve S, Wagner SN, Schittek B and Putzer BM. (2004). Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int J Cancer*, **108**, 162-6.
- Twu JS and Schloemer RH. (1987). Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus. *J Virol*, 61, 3448-53.
- Uchida T, Takahashi K, Tatsuno K, Dhingra U and Eliason JF. (1996). Inhibition of hepatitis-B-virus core promoter by p53: implications for carcinogenesis in hepatocytes. *Int J Cancer*, **67**, 892-7.
- Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR and Harris CC. (1994). Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2230-4.

- Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Hoeijmakers JH and Harris CC. (1995). Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res*, **55**, 6012-6.
- Werness BA, Levine AJ and Howley PM. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248, 76-9.
- Wienzek S, Roth J and Dobbelstein M. (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol*, **74**, 193-202.
- Williams JS and Andrisani OM. (1995). The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3819-23.
- Xu ZH, Zhao MJ and Li TP. (2002). p73beta inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73alpha. *World J Gastroenterol*, **8**, 1094-7.
- Yang A and McKeon F. (2000). P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 199-207.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, McKeon F and Caput D. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404, 99-103.
- Yee JK. (1989). A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science*, 246, 658-61.
- Yew PR and Berk AJ. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, **357**, 82-5.
- Yu X and Mertz JE. (1996). Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated. *J Virol*, **70**, 8719-26.
- Yu X and Mertz JE. (1997). Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily. *J Virol*, **71**, 9366-74.
- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E and Moll UM. (2002). DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wildtype p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*, **196**, 765-80.
- Zhang P and McLachlan A. (1994). Differentiation-specific transcriptional regulation of the hepatitis B virus nucleocapsid gene in human hepatoma cell lines. *Virology*, 202, 430-40.
- Zhang P, Raney AK and McLachlan A. (1993). Characterization of functional Sp1 transcription factor binding sites in the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, 67, 1472-81.
- **Zhou DX and Yen TS. (1991).** The hepatitis B virus S promoter comprises A CCAAT motif and two initiation regions. *J Biol Chem*, **266**, 23416-21.
- Zhu J, Jiang J, Zhou W and Chen X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, 58, 5061-5.
- Zoulim F, Saputelli J and Seeger C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol*, 68, 2026-30.
- Zuckerman JN and Zuckerman AJ. (2000). Current topics in hepatitis B. J Infect, 41, 130-6.

Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Pützer für die Möglichkeit der Anfertigung dieser interessanten Arbeit in ihrer Abteilung, für die stete sachliche Diskussionsbereitschaft, guten Hinweise sowie Korrektur der Arbeit danken.

Ich bedanke mich besonders bei Tomas Racek für die äußerst kompetente Betreuung während meiner Doktorarbeit. Die zahlreichen Anregungen und sein fachkundiger Rat haben mir sehr geholfen, dass Projekt erfolgreich in die richtige Richtung zu lenken.

Ein sehr großes Dankeschön geht an die gesamte Arbeitsgruppe. Anke Schmidt danke ich für die vielen praktischen sowie theoretischen Ratschläge und die aufmerksame Korrektur meiner Arbeit. Besonders möchte ich mich bei Anja Stoll für ihre große Unterstützung im Laboralltag bedanken, ohne sie wäre ein so effektives Arbeiten kaum möglich gewesen. David Engelmann danke ich für seine kritischen Anmerkungen sowie hilfreichen Diskussionen auch außerhalb der Wissenschaft. Weiterhin bedanke ich mich bei Katja John, Annett Niemetz, Ingrid Winkler, Julia Schulz, Vijay Alla, Zhengpeng Li und allen anderen Mitarbeitern der VEGT für ihre Unterstützung und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Stephan Schaefer und seiner Arbeitsgruppe für die erfolgreiche Kooperation in diesem Projekt. Dabei gebührt Monika Radke besonderer Dank bei der Durchführung von virologischen Arbeiten und Saijo Thomas für anregende Hilfestellungen und Ratschläge.

Weiterhin möchte ich mich bei Alexandra Schwarz für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Jutta und Bernhard Buhlmann, meiner Schwester Anja und meiner Lebensgefährtin Melanie Köster für ihre grenzenlose moralische Unterstützung.

Publikationen

Buhlmann S, Susanne Knoll, Racek T and Putzer BM. **(2008)**. Interaction between the Hepatitis B Virus regulatory protein X and the cellular Tumorsuppressor p73. (in preparation)

Buhlmann S, Racek T, Franziska Rüst, Susanne Knoll, Vijay Alla and Putzer BM. (2008). Transcriptional repression of the prosurvival ER chaperone GRP78/BIP by E2F1. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 34305-14.

Buhlmann S and Putzer BM. **(2008)**. DNp73 a matter of cancer: Mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*, **1785**, 207-216.

Buhlmann S, Racek T, Schwarz A, Schaefer S and Putzer BM. (2008). Molecular mechanism of p73-mediated regulation of Hepatitis B virus core promoter/enhancer II: implications for hepatocarcinogenesis. *Journal of Molecular Biology*, **378**, 20-30.

Tannapfel A, John K, Mise N, Schmidt A, **Buhlmann S**, Ibrahim SM, and Putzer BM. **(2008)**. Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. *Carcinogenesis*, **29**, 211-218.

Konferenzbeiträge (Poster/Vorträge)

Buhlmann S, Racek T, Schaefer S and Pützer BM. Molecular mechanism of p73-mediated repression of HBV Enhancer II transcription. Molecular Targets for Cancer (X3), Keystone Conference, Whistler Resort, British Columbia, Canada, March (2007).

John K, Tannapfel A, Miše N, Schmidt A, **Buhlmann S**, Ibrahim SM, Pützer BM. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in DNp73-transgenic mice: Significance of N-terminally truncated p73 species for liver cancer therapy. Hong Kong – Shanghai International Liver Congress (ILC) 2008, Hong Kong (2008).

Buhlmann S, Racek T, John K, Schaefer S, Pützer BM. Differential regulation of hepatitis B virus core promoter/enhancer II by TAp73 and its oncogenic counterpart DNp73: Implications for hepatocarcinogenesis. Hong Kong – Shanghai International Liver Congress (ILC) 2008, Hong Kong (2008).

Schmidt A, Alla V, **Buhlmann S**, John K, Niemetz A, Engelmann D, Emmrich S, Rimpler U, Knoll S, Stoll A, Pützer BM. Krebstherapie kennt kein Einheitsprinzip: Molekulare Tumordiagnostik als Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Krebstherapeutika. LNdW, Rostock, Germany (2008).

1. Erklärung:

Ich beantrage hiermit unwiderruflich, gem. §12 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock, die mündliche Prüfung in Form eines öffentlichen wissenschaftlichen Kolloquiums abzulegen.

Rostock, 24.04.2008

Sven Buhlmann

2. Erklärung:

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 24.04.2008

Sven Buhlmann

3. Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 4 Abs. 1 (k) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Rostock, 24.04.2008

Sven Buhlmann