

# Untersuchung der Bindung des humanen Papillomvirus HPV16 an Heparansulfate der Zelloberfläche

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

von  
Maren Knappe  
geboren in Koblenz

Mainz, August 2007

---

*Für Jan, ohne den diese Arbeit in vielerlei  
Hinsicht nicht möglich gewesen wäre. . .*

---

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

---

*Sir Isaac Newton*

---

## Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht oder auf nationalen und internationalen Kongressen vorgestellt:

### Publikationen

Knappe M., Bodevin, S., Selinka, H.-C., Spillmann, D., Streeck, R.E., Chen, X. S., Lindahl, U. und Sapp, M. (2007). „Surface-exposed Amino Acid Residues of HPV16 L1 Protein Mediating Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate”. J Biol Chem, in press

### Beiträge an Kongressen

Knappe M., Selinka H.-C., Lindahl U., Chen, X., Sapp, M. und Streeck, R.E. (2005) „Identification of Surface-exposed Amino Acids of HPV16 L1 Involved in Heparan Sulphate Binding”. Cell Biology of Viral Infection: 4th Workshop, Deidesheim.

Knappe M., Selinka H.-C., Bodevin, S., Lindahl U., von der Lieth, W., Streeck, R.E. und Sapp, M. (2005) „Identification of Surface-exposed Amino Acids of HPV16 L1 Essential For Cell Binding And Infection”. EMBO Workshop „Structural Basis of Papillomavirus Biology”, Siena.

Knappe M., Bodevin, S., Streeck, R.E., Chen, X., Lindahl U., Sapp, M. und Selinka H.-C. (2006) „Surface-exposed Amino Acids of HPV16 L1 Protein Mediating Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate”. Cell Biology of Viral Infection: 5th Workshop, Deidesheim.

Knappe M., Selinka H.-C., Bodevin, S., Streeck, R.E., Chen, X., Lindahl U. und M. Sapp (2006) „Surface-exposed Amino Acids of HPV16 L1 Protein Mediating Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate”. 3rd Annual Virology Colloquium, Center for Molecular and Tumor Virology LSUHSC, Ft. Worth, USA.

Selinka H.-C. Knappe M., Roth S., Florin L., Streeck, R.E., Bodevin, S., Spillmann D., Lindahl U., Chen, X. und Sapp, M. (2006) „Interaction of Human Papillomavirus Pseudovirions with Cell Surface Heparan Sulfate and Neutralizing Antibodies” Gesellschaft für Virologie Annual Meeting, München.

Knappe M., Selinka H.-C., Bodevin, S., Streeck, R.E., Chen, X., Lindahl U. und Sapp, M. (2006) „Surface-exposed Amino Acids of HPV16 L1 Protein Mediating Interaction With Cell Surface Heparan Sulfate”. 11<sup>th</sup> Ray A. Barlow Scientific Symposium on Viruses and Cancer, Shreveport, USA.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Papillomviren	1
1.2	Historie	2
1.3	Klassifizierung	2
1.4	Pathogenese und Epidemiologie der HPV-Infektion	3
1.5	Die viralen Proteine und ihre Funktion während der Infektion	6
1.5.1	E1 und E2	7
1.5.2	E4 und E5	7
1.5.3	E6 und E7	8
1.5.4	L1 und L2	9
1.6	Aufbau von Papillomviren	10
1.6.1	Die Kapsidstruktur	10
1.6.2	Struktur der L1-Monomere	11
1.6.3	Genomorganisation	11
1.7	Virus-ähnliche Partikel und Pseudovirionen	13
1.8	Bindung von Papillomviren	13
1.8.1	Primärrezeptoren für Papillomviren	13
1.8.2	Heparansulfatproteoglykane	14
1.8.3	Heparansulfat	15
1.8.4	Heparansulfat als Virusrezeptor	16
1.9	Ziele der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte und Labormaterialien	18
2.1.2	Chemikalien	20
2.1.3	Kits	20
2.1.4	Enzyme	20
2.1.5	Plasmidvektoren	21
2.1.6	Oligonukleotide	21
2.1.7	Protein- und DNA-Marker	23
2.1.8	Bakterienstämme	23
2.1.9	Bakterienkulturmedien und -zusätze	23

2.1.10	Eukaryotische Zelllinien . . . . .	24
2.1.11	Zellkulturmedien und -zusätze . . . . .	24
2.1.12	Primäre Antikörper und Antiseren . . . . .	25
2.1.13	Sekundäre Antikörper . . . . .	26
2.1.14	Häufig verwendete Puffer und Lösungen . . . . .	27
2.2	Mikrobiologische Methoden . . . . .	28
2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	28
2.2.2	Chemische Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	29
2.2.3	Anzucht und Lagerung von Bakterien . . . . .	29
2.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
2.3.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	29
2.3.2	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .	30
2.3.3	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen . . . . .	30
2.3.4	Ethanol-fällung von DNA . . . . .	31
2.3.5	DNA-Gelelektrophorese . . . . .	31
2.3.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	32
2.3.7	Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	32
2.3.8	Polymerase Kettenreaktion (PCR) . . . . .	32
2.3.9	Ortsspezifische Mutagenese ( <i>Site-directed Mutagenesis</i> ) . . . . .	33
2.3.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA . . . . .	35
2.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	36
2.4.1	Gelelektrophorese von Proteinen: SDS-PAGE . . . . .	36
2.4.2	Immunoblot („Western Blot“) . . . . .	37
2.5	Zellbiologische Methoden . . . . .	38
2.5.1	Kultivierung von Zellen . . . . .	38
2.5.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . . .	39
2.5.3	Transfektion von Zellen . . . . .	39
2.6	Virologische Methoden . . . . .	40
2.6.1	Herstellung von HPV16-Pseudovirionen . . . . .	40
2.6.2	Reinigung von HPV16-Pseudovirionen . . . . .	41
2.6.3	Infektionsassay . . . . .	42
2.6.4	Zellbindungsassay . . . . .	43
2.6.5	Denaturierender ELISA . . . . .	43
2.6.6	Nativer ELISA . . . . .	44
2.6.7	Heparin- bzw. Heparansulfat-ELISA . . . . .	44
2.7	Immunologische Methoden . . . . .	45
2.7.1	Herstellung monoklonaler Antikörper . . . . .	45

2.7.2	Herstellung von Fab-Fragmenten	46
2.8	Mikroskopische Methoden	47
2.8.1	Fluoreszenzmikroskopie	47
2.8.2	Reinigung der Pseudovirionen für Elektronenmikroskopie	47
2.8.3	Elektronenmikroskopie mit Negativ-Kontrastierung	47
2.9	Elektronische Datenverarbeitung	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Identifizierung basischer Aminosäuren auf der Oberfläche von HPV16	50
3.1.1	Allgemein	50
3.1.2	Phylogenetischer Vergleich	53
3.2	Herstellung und Analyse von Pseudovirionen mit mutanten L1-Proteinen	56
3.2.1	Durch Mutagenese generierte HPV16 L1-Mutanten	56
3.2.2	Überprüfung der mutanten Pseudovirionen	58
3.3	Analyse der Lysine auf der Spitze des Kapsomers	59
3.3.1	Mutation der Lysine zu Alaninen	59
3.3.2	Konservative Mutation der Lysine zu Argininen	66
3.4	Analyse basischer Aminosäuren in der Grube zwischen den Kapsomeren	66
3.5	Analyse der Threonine auf der Spitze des Kapsomers	68
3.6	Epitope neutralisierender Antikörper	69
3.6.1	Inhibition der Zellbindung durch den Antikörper H16.56E und dessen Fab-Fragmente	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1	Die Lysine auf der Spitze des Kapsomers	73
4.2	Basische Aminosäuren in der Grube zwischen den Kapsomeren	77
4.3	Die Threonine auf der Spitze des Kapsomers	80
4.4	Topologie der Heparansulfatbindestelle	80
4.5	Ausblick	89
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Referenzen</b>	<b>92</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>103</b>
A.1	IUPAC/IUB-Symbole	103
A.2	Abkürzungen	104
<b>B</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>106</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1	Laborgeräte . . . . .	18
2.2	Verwendete Labor-Kits . . . . .	20
2.3	Verwendete Mutageneseprimer . . . . .	21
2.4	Sequenzierprimer . . . . .	22
2.5	Zelllinien . . . . .	24
2.6	Zellkulturmedien und -zusätze . . . . .	24
2.7	Monoklonale und polyklonale HPV-Antikörper . . . . .	25
2.8	Sekundäre Antikörper . . . . .	26
2.9	Verwendete EDV-Programme . . . . .	49
3.1	Auflistung der HPV16 L1-Mutanten . . . . .	57
3.2	Hypervariable Regionen des L1-Proteins von HPV16 . . . . .	71
A.1	IUPAC/IUB-Symbole für Nukleinsäuren. . . . .	103
A.2	IUPAC/IUB-Symbole für Aminosäuren . . . . .	103



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Phylogenetischer Baum mit Sequenzen von 118 PV-Typen . . . . .	3
1.2	Kategorisierung von Alpha-PV und das Vorkommen div. Krebsarten . . . . .	5
1.3	Infektion kutaner und mukoser Epithelien mit Papillomviren . . . . .	6
1.4	Struktur des Kapsids, der L1-Pentamere und –Monomere . . . . .	10
1.5	Das PV-Genom am Beispiel von HPV16 . . . . .	12
1.6	Struktur von Proteoglykanen . . . . .	14
1.7	Darstellung von Heparansulfat und Chondroitinsulfat . . . . .	15
2.1	Prinzip der Mutagenese-PCR (ortsspezifische Mutagenese) . . . . .	34
2.2	Prinzip der „Magnet-unterstützten Transfektion“ . . . . .	40
2.3	Herstellung und Reinigung von Pseudovirionen . . . . .	42
2.4	Fab-Fragmenten: Mit Papain verdauter Antikörper . . . . .	47
3.1	Struktur des pentameren Kapsomers von HPV16 . . . . .	51
3.2	Aminosäuresequenz des Kapsidproteins L1 von HPV16 . . . . .	52
3.3	Basische Aminosäuren und Threonine auf dem Kapsomerplateau . . . . .	54
3.4	L1-Sequenzvergleich von HPV16 mit acht anderen HPV-Typen . . . . .	55
3.5	Immunoblotanalyse von Wildtyp- und mutanten Pseudovirionen . . . . .	58
3.6	EM-Aufnahmen von Wildtyp- und mutanten HPV16-Pseudovirionen . . . . .	59
3.7	Zellbindung mutanter HPV16-Pseudovirionen — Immunoblots . . . . .	60
3.8	Einfluss von Heparin auf die Zellbindung von Pseudovirionen . . . . .	61
3.9	Heparansulfatspezifische Zellbindung mutanter HPV16-Pseudovirionen . . . . .	62
3.10	Bindung von Pseudovirionen an Heparin und Heparansulfat . . . . .	63
3.11	Infektiosität mutanter HPV16-Pseudovirionen. . . . .	65
3.12	Infektiosität mutanter HPV16-Pseudovirionen. . . . .	65
3.13	Infektiosität der Lysin-zu-Arginin-Mutanten. . . . .	67
3.14	Zellbindung der Threonin-zu-Alanin-Mutanten . . . . .	68
3.15	Infektiosität der Threonin-zu-Arginin-Mutanten . . . . .	69
3.16	Epitope neutralisierender Antikörper . . . . .	70
3.17	Zellbindung von Pseudovirionen mit Antikörper und Fab-Fragmenten . . . . .	72
4.1	Vergleich verschiedener Kapsidregionen bei HPV16 und HRV14 . . . . .	82
4.2	Computersimulation der Heparin-Interaktion mit der Kapsomeroberfläche . . . . .	85
4.3	Bindung von Heparinoligosacchariden an HPV16-VLPs . . . . .	86
4.4	Interaktion von HPV16-VLPs mit modifizierten Heparinen . . . . .	88

*Wenn auch anzunehmen ist,  
alles sei bereits gesagt, so darf man doch keinesfalls folgern,  
dass auch alles gehört und verstanden ist.*

Franz Liszt

# 1

## Einleitung

Obwohl seit diesem Jahr zwei gegen humane Papillomviren (HPV) gerichtete Impfstoffe in Deutschland zugelassen sind, ist über die Infektion mit diesen potentiell karzinogenen Viren bisher immer noch relativ wenig bekannt. Eine spezifische Papillomvirus-Therapie gibt es gegenwärtig ebenfalls nicht. Vor allem über die ersten Schritte der Infektion, die Bindung der Viren an die Wirtszellen, die eine wichtige Ansatzstelle antiviraler Therapeutika darstellt, ist erst wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit hat daher das Ziel, einen Beitrag zur Charakterisierung der Bindestelle von HPV16 an Heparansulfatproteoglykane zu leisten, dem primären Rezeptor dieser Viren an der Zelloberfläche.

### 1.1 Papillomviren

In 99,7% aller Zervixkarzinome wurde die DNA humaner Papillomviren gefunden. Sie gelten daher als notwendiger, wenn auch nicht einziger Faktor für die Entstehung von Gebärmutterhalskarzinomen (Walboomers *et al.*, 1999). Das Zervixkarzinom ist, nach dem Mammakarzinom, der zweithäufigste bösartige Tumor bei Frauen, weltweit waren im Jahr 2002 fast 500.000 Frauen erkrankt, 274.000 starben (Parkin *et al.*, 2005).

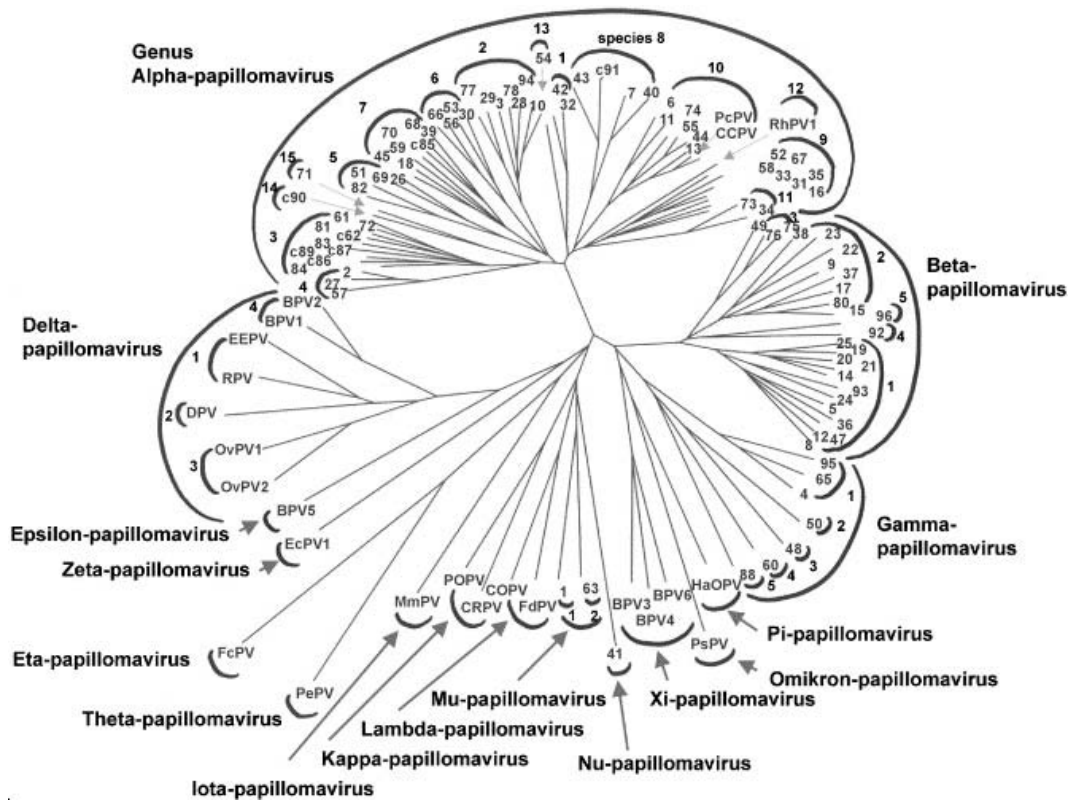
Papillomviren (PV) sind hüllenlose Viren mit einem Durchmesser von etwa 55 nm, die ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom von ca. 8000 Basenpaaren besitzen. Papillomviren gelten als streng spezies- und gewebsspezifisch. Sie verursachen beim Menschen, bei vielen anderen Säugetieren, u. a. Affen, Hunden, Rindern, Schafen, Kaninchen und Katzen, und bei Vögeln meist gutartige, lokal begrenzte Epithelwucherungen der Haut und Schleimhaut (Warzen), die zur spontanen Regression neigen. Bisher wurden 118 PV-Typen vollständig beschrieben, darunter über 100 humane Papillomviren, viele von ihnen sind ubiquitär und global verbreitet. Nur einige dieser zahlreichen PV-Typen sind mit der Entstehung maligner, meist anogenitaler, aber auch oraler Neoplasien assoziiert.

## 1.2 Historie

Die ersten wissenschaftlichen Beschreibungen von PV stammen aus dem Ende des 19. Jahrhunderts. Die infektiöse Genese von Hautwarzen wurde zunächst an Hunden nachgewiesen (McFadyean und Hobday, 1898) und 1907 von Giuseppe Ciuffo durch einen Selbstversuch mit zellfreiem Warzenextrakt bestätigt (Ciuffo, 1907). Einige Jahre später konnte Richard E. Shope einen Zusammenhang zwischen der Infektion mit dem Kaninchenpapillomvirus (*Cottontail Rabbit Papilloma Virus*, CRPV) und der Entstehung von Hauttumoren bei Kaninchen nachweisen (Shope, 1933). Er konnte das Virus sogar partiell charakterisieren und hob beispielsweise seine erstaunliche Hitzestabilität hervor. Dass die Infektion mit CRPV epitheliale Tumoren maligner Natur auslösen kann, wurde 1935 von Rous und Beard entdeckt (Rous und Beard, 1935). Francis Peyton Rous erhielt 1966 den Nobelpreis für Medizin „für seine Entdeckungen auf dem Gebiet der tumorerzeugenden Viren“. Der erste Virusnachweis gelang 1949 mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (Strauss und Shaw, 1949). Ito und Evans beschrieben 1960 die Karzinomentwicklung im Bereich der Schleimhäute bei Kaninchen nach Transfer gereinigter Virus-DNA und lieferten einen ersten Hinweis für eine karzinogene Wirkung der Papillomviren, die später auch für humane Papillomviren bestätigt wurde (zur Hausen *et al.*, 1974). Etwa zehn Jahre später gelang die Isolierung bestimmter HPV-Typen aus Zervixkarzinomen (Boshart *et al.*, 1984; Dürst *et al.*, 1983). Die Entwicklung neuer molekularbiologischer Techniken, allen voran die der Polymerase-Kettenreaktion, ebneten den Weg für detaillierte Untersuchungen von PV und ihrer Rolle bei der Kanzerogenese. Seit 1995 sind die humanen Papillomviren offiziell als Karzinogen für das Zervixkarzinom klassifiziert worden (IARC, 1995).

## 1.3 Klassifizierung

Ursprünglich wurden die Papillomviren zusammen mit den Polyomaviren in die Familie der *Papovaviridae* eingeordnet. Diese Einteilung beruhte jedoch nur auf dem gemeinsamen Vorhandensein ähnlicher, hüllenloser Kapside und eines zirkulären, doppelsträngigen DNA-Genoms. Da die Genome völlig unterschiedlich groß und zudem anders aufgebaut sind und es außerdem keine bedeutenden Aminosäuresequenzhomologien gibt, wurden sie in zwei verschiedene Familien klassifiziert, die *Polyomaviridae* und die *Papillomaviridae*. PV werden taxonomisch eingeteilt in „Genus“ (Gattung), „Spezies“, „Typ“, „Subtyp“ und „Variante“ (siehe Abbildung 1.1). Die Identifikation neuer PV-Typen und deren Klassifizierung erfolgt über Nukleotidsequenzhomologien des L1-Gens (siehe 1.6.3). Betragen diese weniger als 60%, so gehören die entsprechenden PV unterschiedlichen Gattungen an, Spezies weisen 60-70% Sequenzhomologie auf. Bei einer Übereinstimmung der Nu-



**Abbildung 1.1:** Phylogenetischer Baum mit Sequenzen von 118 PV-Typen. Die Nummern am Ende jedes Zweiges geben einen HPV-Typ an, die Nummern auf den inneren Halbkreisen benennen die Spezies, die äußeren Bezeichnungen den Genus (Abbildung aus de Villiers *et al.*, 2004).

kleotidsequenzen von 70-90% handelt es sich um einen neuen PV-Typ, 90-98% definieren einen Subtyp und mehr als 98% Homologie eine Variante (de Villiers *et al.*, 2004).

## 1.4 Pathogenese und Epidemiologie der HPV-Infektion

Eine HPV-Infektion ruft primär gutartige Zellwucherungen hervor, die sich in der Ausbildung von Warzen verschiedener Erscheinungsformen äußern. Die einzelnen HPV-Typen bevorzugen hierbei unterschiedliche Körperregionen (Gissmann *et al.*, 1977). Bestimmte HPV-Typen können aber auch bösartige Entartungen induzieren, beispielsweise maligne Läsionen und Karzinome des Anogenitaltraktes (Penis, Vulva, Anus, Zervix).

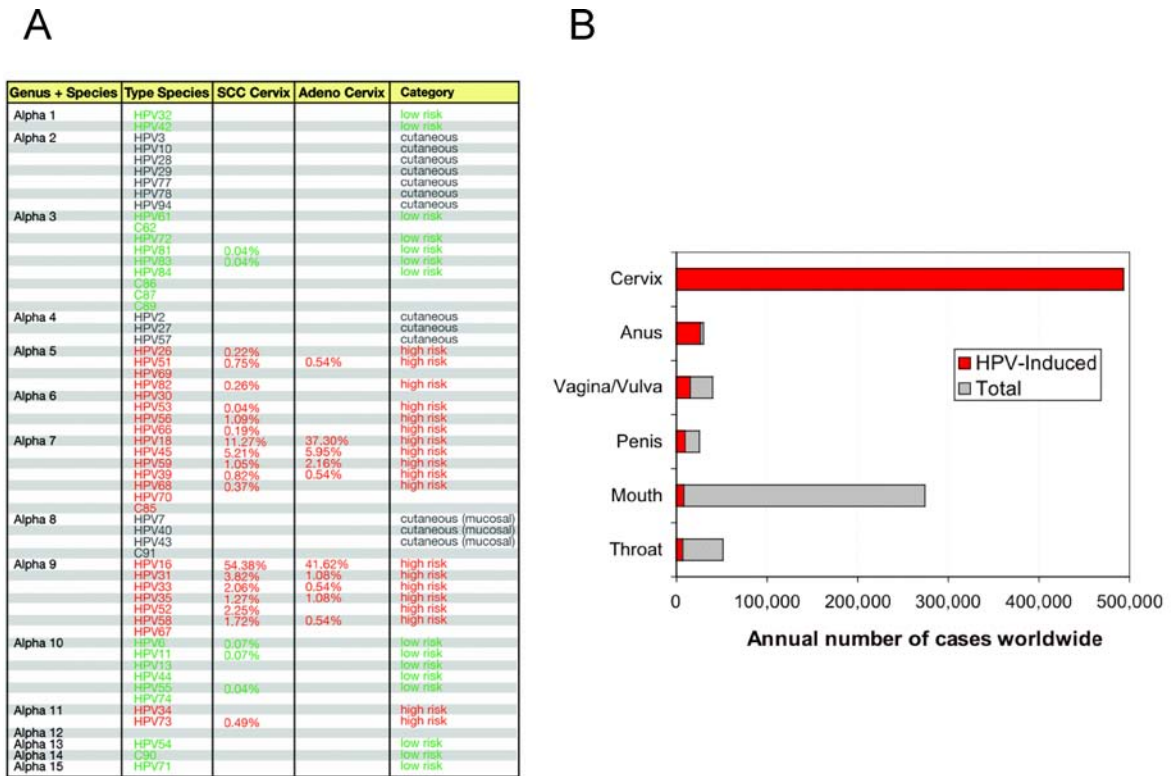
Die beiden größten HPV-Gattungen sind die Alpha- und Beta-Papillomviren, ca. 90% aller bisher charakterisierten HPV-Typen gehören in eine der beiden Gruppen (siehe Abbildung 1.1). Beta-PV werden normalerweise mit unscheinbaren kutanen Infektionen in Verbindung gebracht. Epidermodysplasia verruciformis (EV) ist eine autosomal rezessive Krankheit, die mit der Entwicklung großflächiger Läsionen am ganzen Körper einhergeht,

die durch zahlreiche HPV-Typen verursacht werden. Viele der HPV-Typen, z. B. HPV5 und HPV8, sind spezifisch für EV und werden in gesunden Individuen selten gefunden. Es wird vermutet, dass die Betroffenen keine korrekte Immunantwort gegen EV-assoziierte HPV-Typen entwickeln können. Bei etwa einem Drittel aller EV-Patienten entarten die primär gutartigen Läsionen zu invasiven, nicht-melanomen Hautkarzinomen, besonders an sonnenexponierten Stellen (Jablonska und Majewski, 1994; Pfister, 2003). In Läsionen von Psoriasis-Patienten konnte ebenfalls HPV5-DNA gefunden werden (Majewski *et al.*, 1998). Psoriasis oder Schuppenflechte zeichnet sich durch beschleunigte Proliferation der Epidermis aus, als Folge bilden sich schuppige Hautareale, verbunden mit Rötungen und Juckreiz. Die auslösenden Ursachen sind bislang nicht bekannt und die Beteiligung von HPV5 an der Pathogenese dieser Krankheit ist Gegenstand derzeitiger Forschung.

Alpha-PV stellen die größte Gruppe der HPV dar (siehe Abbildung 1.1). Entsprechend ihres Tropismus für Epithelien der Haut oder Schleimhaut unterscheidet man zwischen kutanen oder mukosen HPV-Typen (Chan *et al.*, 1995). Sie sind mit der Entwicklung gutartiger, aber auch maligner Läsionen der Haut und Schleimhaut im anogenitalen Bereich oder im Respirationstrakt assoziiert. Die besonders wichtige, in dieser Gattung vertretene Gruppe der genitalen, mukosen HPV wird, entsprechend ihres kanzerogenen Potentials, unterteilt in Hochrisiko („high risk“)- und Niedrigrisiko („low risk“)-Typen (zur Hausen, 2000). HPV16 und -18 sind die beiden häufigsten Hochrisikotypen und verantwortlich für etwa 50% (HPV16) und 30% (HPV18) aller Zervixkarzinome (siehe Abbildung 1.2). Niedrigrisikotypen sind nur sehr selten mit Zervixkarzinomen assoziiert, die häufigsten Typen, HPV6 und -11, rufen jedoch gutartige Entartungen der genitalen Schleimhäute, wie z. B. Feigwarzen oder Kondylome, hervor. Genitalwarzen sind in vielen Ländern die häufigste sexuell übertragene Krankheit und können 1-2% aller jungen Erwachsenen betreffen (Persson *et al.*, 1996).

In Ländern der Dritten Welt stellt das Zervixkarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen dar, weltweit immerhin die zweithäufigste. In Deutschland nahm im Jahr 2002 der Gebärmutterhalskrebs Platz 10 bei der Anzahl der Krebsneuerkrankungen und Platz 12 bei den Todesfällen durch Krebs ein (Bertz *et al.*, 2006). Nicht jede Infektion mit einem Hochrisiko-HPV-Typ führt zur Entstehung maligner Läsionen. Die Verbreitung zervikaler Infektionen mit einem Hochrisikotyp kann je nach geografischer Lage 20-40% aller jungen Frauen betreffen (Cuschieri *et al.*, 2004). Jedoch können bei 80% dieser infizierten Frauen nach 18 Monaten keine pathogenen Anzeichen des entsprechenden Typs gefunden werden.

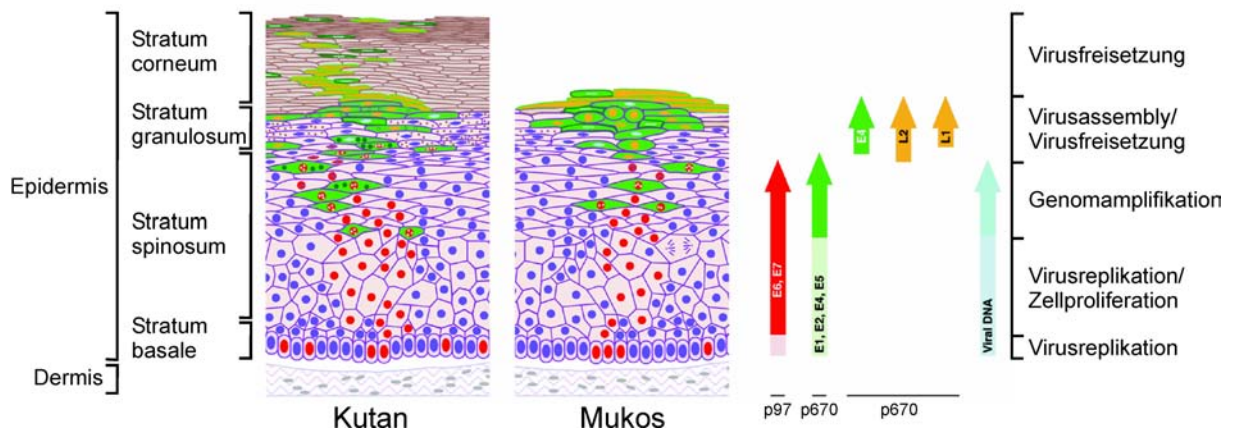
Die Entwicklung zervikaler Neoplasien durchläuft verschiedene Stadien, CIN (*Cervical Intraepithelial Neoplasia*) genannt, die histologisch bestimmt werden können. Schätzungsweise 20% der CIN1-Läsionen, milde Dysplasien, entwickeln sich zu CIN2, moderate Dysplasien, von denen wiederum 30% schwerere Läsionen ausbilden, wenn sie unbehandelt



**Abbildung 1.2:** Kategorisierung von Alpha-PV und das Vorkommen verschiedener Krebsarten. (A) Tabelle mit Alpha-PV und ihre Einordnung in die Kategorien Hochrisiko „high risk“-, Niedrigrisiko („low risk“)-, kutane oder mukose Typen (rechte Spalte). Die Häufigkeiten, mit denen bestimmte HPV-Typen in Zervixkarzinomen gefunden werden, sind in den mittleren Spalten angegeben. Dabei wird zwischen Plattenepithelkarzinomen (*Squamous Cell Carcinoma*, SSC) und Adenokarzinomen (*Adenocarcinoma*) unterschieden (Tabelle aus Doorbar, 2006). (B) Weltweite jährliche Neuerkrankungen und Vorkommen verschiedener Krebsarten, an deren Entstehung humane Papillomviren beteiligt sein können. Zervixkarzinome, die zu 99,7% durch HPV ausgelöst werden, treten mit 500.000 Fällen jährlich mit Abstand am häufigsten auf.

bleiben. Etwa 40% der CIN3-Läsionen entwickeln sich schließlich zum Karzinom (CIS, *Carcinoma in situ*). Die Entstehung eines Karzinoms ist ein Mehrstufenprozess, weitere Risikofaktoren wie Rauchen, Langzeiteinnahme oraler Verhütungsmittel und Mehrfachgeburten sind daran beteiligt (Castle, 2004; Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Hellberg und Stendahl, 2005). Die Endstufe dieser Entwicklung wird als invasives Karzinom bezeichnet, transformierte Zellen sind dann bereits ins Bindegewebe eingewandert. Von dort aus sind sie in der Lage über Blut- und Lymphkanäle zu metastasieren. Das Durchschnittsalter von Frauen mit invasiven Karzinomen liegt bei ca. 50 Jahren, wohingegen leichtere Läsionen durchschnittlich sehr viel früher auftreten.

Gemessen an der großen Verbreitung genitaler HPV-Typen in der Gesamtbevölkerung, mit einem lebenslangen Infektionsrisiko von annähernd 80%, ist die Häufigkeit von Zer-



**Abbildung 1.3:** Infektion kutaner und mukoser Epithelien mit Papillomviren. Epidermis in Farbe gezeigt, die darunterliegende Dermis in Grau. Die Beschreibung der einzelnen Zellschichten befindet sich links. Zellen der Epidermis, die Zellzyklusmarker exprimieren, was v. a. auf die Expression der viralen Onkogenen E6 und E7 zurückzuführen ist, tragen rote Kerne. Die Expression viraler Proteine, die für die Genomreplikation wichtig sind, findet in grün gezeichneten Zellen mit roten Kernen statt. L1 und L2 werden in Zellen der oberen Epithelschichten exprimiert, die amplifizierte virale DNA enthalten (gelb gezeichnete Zellen). Zellen, die infektiöse Partikel enthalten und sich schließlich von der epithelialen Oberfläche ablösen, sind grün mit gelben Kernen gekennzeichnet. Die Zeitpunkte und das Ausmaß der Expression viraler Gene sind in der rechten Hälfte als Pfeile dargestellt, die dadurch ausgelösten Vorgänge in der Leiste ganz rechts. Schwächer gefärbte Pfeile deuten einen niedrigen Expressionslevel, kräftig gefärbte Pfeile einen hohen Expressionslevel viraler Proteine an (Abbildung nach Doorbar, 2006).

vixkarzinomen mit etwa 0,03% relativ gering und bedeutet, dass die meisten Infektionen erfolgreich bekämpft werden (Parkin *et al.*, 2005).

## 1.5 Die viralen Proteine und ihre Funktion während der Infektion

Der Infektionszyklus von PV ist eng mit dem Differenzierungsgrad sich entwickelnder Keratinozyten gekoppelt (siehe Abbildung 1.3). Man geht davon aus, dass PV über offene Wunden oder Mikroläsionen in die Haut oder Schleimhaut vordringen und die undifferenzierten, noch teilungsfähigen Basalzellen der Epidermis infizieren (Chow und Broker, 1997). Nach Bindung an die Zelle (siehe 1.8) werden die Viren relativ langsam aufgenommen (Giroglou *et al.*, 2001; Selinka *et al.*, 2002) und über Endozytose internalisiert (Day *et al.*, 2003; Selinka *et al.*, 2002). Nach Disassembly in den späten Endosomen (Day *et al.*, 2004) vermittelt das minore Kapsidprotein L2 das Verlassen der Endosomen (Kämper *et al.*, 2006) und die virale DNA gelangt zusammen mit L2 in den Nukleus. Dort manifestiert sich das virale Genom episomal mit 50-100 Kopien. Teilt sich die infizierte Zelle, so wird

die virale DNA unter den Tochterzellen aufgeteilt. Ein Teil der Zellen migriert in höhere Zellschichten und beginnt zu differenzieren, während der andere Teil in der Basalschicht verbleibt und dort ein Reservoir an viraler DNA für zukünftige Zellteilungen bildet.

### 1.5.1 E1 und E2

E1 und E2 sind die ersten viralen Proteine, die nach der Infektion exprimiert werden. E2 ist unentbehrlich für die Initiation der Replikation der viralen DNA. Als DNA-bindendes Protein erkennt es ein palindromisches Motiv in der nicht-kodierenden Region des PV-Genoms. HPV16 besitzt vier dieser Motive, eines liegt nahe dem viralen Replikationsursprung. Die E2-Bindung an das Genom ist notwendig für die Rekrutierung von E1 zu diesem Replikationsursprung. Nachdem E2 sich wieder von der DNA abgelöst hat, lagern sich die rekrutierten E1-Proteine zu einem dihexameren Ring zusammen, der funktionell an die hexamere Ringstruktur erinnert, die an zellulären Replikationsursprüngen assembliert. Die Assoziation von E1 mit zellulären Hitzeschockproteinen, insbesondere Hsp40 und Hsp70, tragen zur Bildung dieses Komplexes bei (Lee *et al.*, 1999). Durch die Interaktion mit der zellulären DNA-Polymerase- $\alpha$ -Primase und dem Einzelstrang-DNA-Bindeprotein A (RPA) rekrutiert E1 die zelluläre Replikationsmaschinerie an den viralen Initiationskomplex (Park *et al.*, 1994). E2 ist neben seiner Funktion bei der Replikation ein wichtiger Modulator der viralen Transkription, da es durch Stimulation oder Inhibition des frühen Promotors (p97 bei HPV16) die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 kontrolliert (Demeret *et al.*, 1998).

Diese Verbindung zwischen Replikation und Transkription ermöglicht den Viren eine exakte zeitliche Regulierung der Genomamplifikation innerhalb der Zelldifferenzierungsvorgänge. Des Weiteren spielt E2 durch Verankerung der viralen Episomen an Chromosomen während der Mitose eine Rolle bei der korrekten Verteilung der replizierten Virusgenome auf die Tochterzellen (You *et al.*, 2004).

### 1.5.2 E4 und E5

Über die genauen Funktionen der viralen Proteine E4 und E5 ist bisher erst wenig bekannt. E4 akkumuliert in der Zelle in der Phase der Genomreplikation, sein Verlust stört aber vor allem die späteren Vorgänge der Infektion. Besonders die Fähigkeiten, den Zellzyklus zu unterbrechen, die Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase zu arretieren und der E7-vermittelten Zellproliferation entgegen zu wirken, sind charakteristisch für E4-Proteine verschiedener HPV-Typen (Davy *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2004; Nakahara *et al.*, 2002). Diese Effekte könnten damit zusammenhängen, dass einige HPV-Typen mit Cyclin B/Cdk2 assoziieren und diesen Komplex im Zytoplasma zurückhalten (Davy *et al.*, 2005). Immunhistochemi-



sche Untersuchungen zeigen, dass E4 mit Keratinen des Zytoskellets kolokalisiert. Eine Anlagerung an das Keratingerüst der Zelle könnte dessen Stabilität reduzieren, wodurch möglicherweise die Freisetzung der Virionen in der oberen Epithelschicht erleichtert wird (Doorbar *et al.*, 1991).

HPV-E5 ist ein Transmembranprotein, das vorwiegend im ER lokalisiert ist, jedoch auch mit der Protonen-ATPase der Vakuolen assoziiert sein kann. Dies bewirkt eine Abnahme der endosomalen Ansäuerung und damit eine Störung des Recyclings von epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR). Eine Zunahme der EGF-vermittelten Rezeptor-Signaltransduktion hätte die Erhaltung einer für die Virusreplikation günstigen zellulären Umgebung in den oberen epithelialen Schichten zur Folge (Crusius *et al.*, 2000). Die Induktion der Proliferation der Zellen kann außerdem durch die Unterdrückung der Expression des Kinaseinhibitors p21 durch E5 erreicht werden (Bonnez und Reichmann, 2000).

### 1.5.3 E6 und E7

Die gesteigerte Zellproliferation der suprabasalen epithelialen Zellen zervikaler Läsionen wird vor allem der Expression der viralen Onkogene E6 und E7 zugeordnet. Dies erlaubt der anfangs geringen Anzahl infizierter Zellen zu expandieren und somit mehr Zellen hervorzubringen, die anschließend Viren produzieren. Zusätzlich fördern E6 und E7 den Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus, was wiederum die E1- und E2-vermittelte virale Replikation unterstützt. Damit wird aber auch der Übergang der suprabasalen Zellen in die terminale Differenzierung gehemmt, was eine Verdickung des *Stratum spinosum* und somit die charakteristische Ausbildung von Kondylomen, Warzen und Papillomen zur Folge hat.

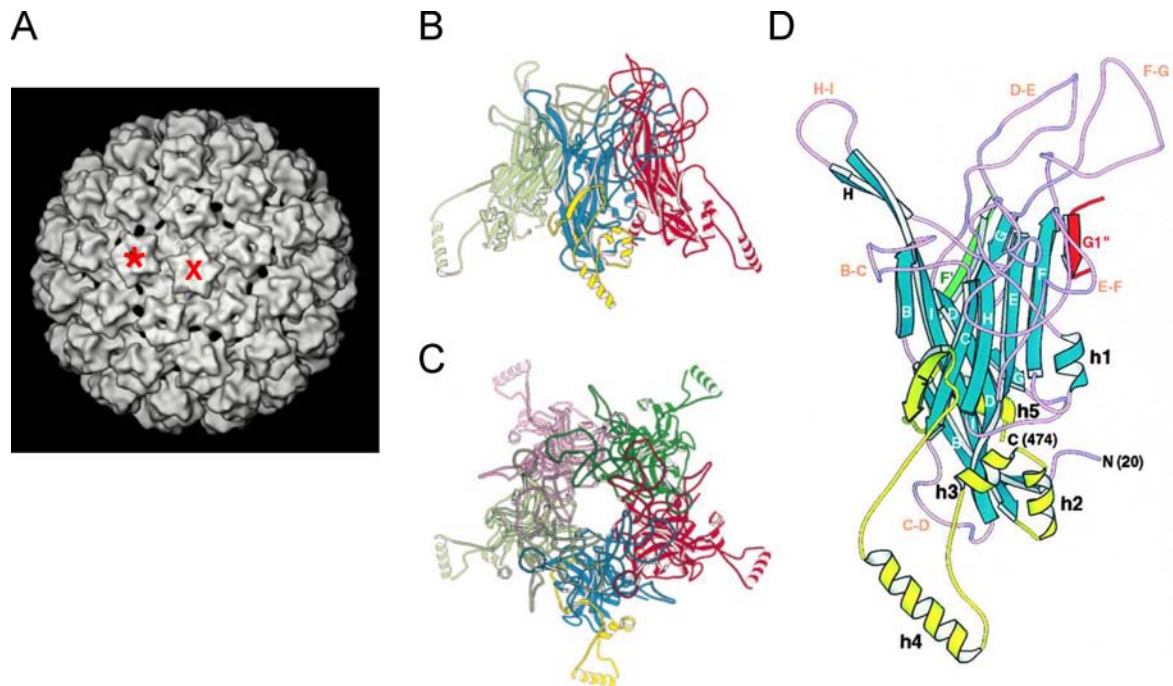
Der grundlegende Mechanismus, mit dem PV das Fortschreiten des Zellzyklus stimulieren, ist wohlbekannt und gleicht dem anderer Tumoviren. Das Protein E7 bindet an den Tumorsuppressor pRb (Retinoblastomprotein), wodurch dessen Interaktion mit dem natürlichen Bindungspartner, dem Transkriptionsfaktor E2F, verhindert wird. Daraufhin transaktiviert E2F die Expression zellulärer Proteine, die für die Replikation viraler DNA und die Zellteilung notwendig sind, z.B. Cycline A und E (Zerfass *et al.*, 1995). Dies bewirkt den Eintritt in die S-Phase und begünstigt somit unkontrollierte Zellvermehrung. E7 assoziiert noch mit weiteren Proteinen, die an der Zellproliferation beteiligt sind, darunter Histondeacetylasen (Brehm *et al.*, 1999), Komponenten des AP1-Transkriptionskomplexes (Antinore *et al.*, 1996) und die cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 (Funk *et al.*, 1997).

E6 übt seine transformierende Wirkung über die Inaktivierung von p53 aus, einem Tumorsuppressorprotein, das normalerweise das Teilungsverhalten der Zelle reguliert. Insbesondere verhindert es die Zellteilung beim Auftreten von DNA-Schäden. Durch den Ausfall dieses Tumorsuppressors unterbleibt die Aktivierung des CDK-Inhibitors p21, wodurch der Zellzyklus nicht in der G<sub>1</sub>-Phase arretiert bleibt. E6 hat außerdem eine antiapoptotische Wirkung. Es verhindert also sowohl Wachstumsstopp als auch Apoptose und damit zwei Reaktionen der Zelle auf E7-vermittelten Eintritt in den Zellzyklus in den oberen epithelialen Schichten. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Anhäufung von Mutationen und damit zur vermehrten Genominstabilität (Scheffner *et al.*, 1993).

### 1.5.4 L1 und L2

In den unteren epithelialen Schichten findet kaum Expression der Kapsidproteine L1 und L2 statt. Negative regulatorische Elemente im viralen Genom kontrollieren die RNA-Stabilität (McPhillips *et al.*, 2004) und ein Splicing-Silencer im L1 von HPV16 führt zur bevorzugten Synthese früher Transkripte in proliferierenden Zellen (Zhao *et al.*, 2004). Translationelle Kontrolle wird durch mRNA-Splicing, vor allem die Polyadenylierungsstellen betreffend, sowie das Vorkommen eher seltener Codons im L1- und L2-Gen von HPV16 erreicht (Leder *et al.*, 2001). Nach der Phase der Genomamplifikation kommt es in den oberen epithelialen Schichten zur Expression der Kapsidproteine L1 und L2. Dieses Umschalten von Genomamplifikation zu Kapsidproteinsynthese wird auf der Ebene der RNA-Prozessierung und der Proteinsynthese reguliert (Schwartz, 2000).

Die letzte Station des Reproduktionszyklus besteht in der Verpackung der replizierten Genome in virale Partikel. Das majore Kapsidprotein L1 bildet den Hauptbestandteil der Viruskapside (siehe 1.6.1). Nachdem L1-Proteine im Zytoplasma zu Kapsomeren assembliert sind, kommt es dank einer C-terminalen Kernlokalisationssequenz des L1 zur Lokalisation im Kern. Dort befindet sich das minore Kapsidprotein L2, das mit bestimmten Kernstrukturen, den ND10 (*nuclear domain 10*), assoziiert ist und L1 rekrutiert (Day *et al.*, 1998). In den ND10 finden der Zusammenbau der Kapside und die Verpackung des viralen Genoms statt. Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von L1 für DNA-Bindung und -Verpackung essentiell (Li *et al.*, 1997; Schäfer *et al.*, 2002) und alleine ausreichend ist (Kawana *et al.*, 1998; Unckell, 1997). Die Anwesenheit von L2 steigert jedoch die Effizienz und damit die Infektiosität erheblich (Roden *et al.*, 2001; Stauffer *et al.*, 1998). Die Freisetzung kompletter Virionen erfolgt durch die Abstreifung toter Hautschüppchen.



**Abbildung 1.4:** Struktur des Kapsids, der L1-Pentamere und -Monomere von Papillomviren. (A) Das hüllenlose, ca. 55 nm große Kapsid des Bovinen Papillomvirus Typ 1 (BPV1; Abbildung aus Trus *et al.*, 1997). X: pentavalentes Kapsomer; \*: hexavalentes Kapsomer. (B) Darstellung eines L1-Pentamers, von der Seite betrachtet. Die beiden hinteren Monomere sind, der besseren Übersicht wegen, entfernt. Der C-terminale Arm des zentralen, blauen Monomers ist gelb dargestellt (Abbildung aus Chen *et al.*, 2000). (C) Aufsicht auf ein L1-Pentamer, Beschreibung wie bei (B). (D) Darstellung eines L1-Monomers. Die  $\beta$ -Faltblätter sind blau gekennzeichnet, die Bezeichnung erfolgt durch Großbuchstaben, Helices sind gelb dargestellt und tragen neben dem „h“ eine entsprechende Nummer. Loops sind lila-grau markiert, die Bezeichnungen richten sich nach flankierenden  $\beta$ -Faltblättern (Bsp.: BC-Loop). Abweichungen: C-terminales  $\beta$ -Faltblatt gelbgrün, kurze Helix im EF-Loop blau. Die andersfarbigen Faltblätter F' (grün) und G1'' (rot markiert) stammen von im Kapsomer benachbarten L1-Molekülen (Abbildung aus Chen *et al.*, 2000).

## 1.6 Aufbau von Papillomviren

### 1.6.1 Die Kapsidstruktur

Das etwa 55 nm große unbehüllte Kapsid der PV besteht aus 72 pentameren Kapsomeren des majoren Kapsidproteins L1 (siehe Abbildung 1.4A), die eine ikosaedrische Symmetrie aufweisen (Triangulationszahl=7, Belnap *et al.*, 1996). Jedes Kapsid setzt sich aus 360 L1-Monomeren zusammen, ein Protein, das aus etwa 500 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 58 kDa aufweist. Aufgrund der Symmetrie eines Ikosaeders (Ecken:Flächen:Kanten = 5:3:2), besteht das Kapsid sowohl aus pentavalenten als auch hexavalenten Kapsomeren (siehe Abbildung 1.4A). Von den 72 Kapsomeren sind 60 hexavalent, d. h. von sechs Kapsomeren umgeben, während zwölf Kapsomere pentavalent sind,

also nur fünf benachbarte Kapsomere besitzen. Auch wenn die Proteinsequenzen keine signifikanten Gemeinsamkeiten aufweisen, ähnelt der Aufbau der L1-Pentamere (siehe Abbildung 1.4B und C) sehr stark dem der VP1-Pentamere von SV40 (Affen (*Simian*)-Virus 40) und murinen Polyomaviren.

Das minore Kapsidprotein L2 (siehe auch 1.5.4) mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa kommt in sehr viel geringerer, noch nicht genau definierter Kopienzahl im Kapsid vor (Becker *et al.*, 2004; Sapp *et al.*, 1995; Trus *et al.*, 1997). Die Interaktion zwischen L1 und L2 scheint nicht-kovalenter Natur zu sein (Sapp *et al.*, 1995) und man vermutet, dass L2 über eine C-terminale hydrophobe L1-Bindungsdomäne mit den pentavalenten Kapsomeren assoziiert ist (Finnen *et al.*, 2003; Trus *et al.*, 1997).

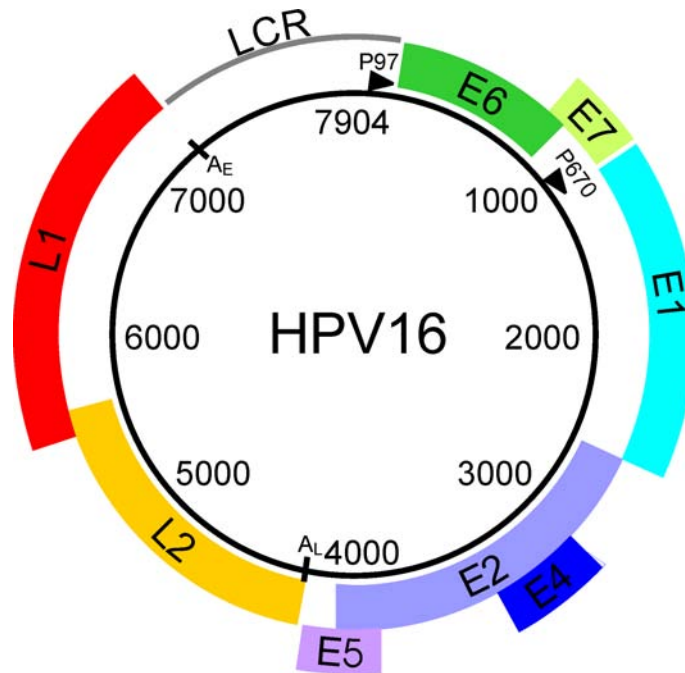
### 1.6.2 Struktur der L1-Monomere

Das L1-Monomer besteht wie viele Proteine nicht-umhüllter Viren, die an der Oberfläche exponiert sind, aus fünf sogenannten  $\beta$ -*jellyroll*-Domänen, die über Polypeptidschleifen (*Loops*) antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter miteinander verbunden sind und einen Ring bilden (Liddington *et al.*, 1991). Zum Aufbau dieser Struktur tragen die ersten 400 Aminosäuren des L1-Moleküls bei (siehe Abbildung 1.4D). Die Polypeptidschleifen wiederum sind im Kapsomer so orientiert, dass sie dessen Oberfläche bilden (Chen *et al.*, 2000). Die Aminosäuresequenz des L1-Proteins ist hoch konserviert innerhalb der HPV-Typen, Sequenzunterschiede treten jedoch in diesen Polypeptidschleifen auf (Carter *et al.*, 2003). Als oberflächenexponierte, hypervariable Regionen können sie die Bildung typspezifischer neutralisierender Antikörper induzieren (Ludmerer *et al.*, 1996). Die Variabilität dieser Loops ermöglicht den Viren im „evolutionären Wettlauf“ den Neutralisationsmechanismen des Wirts auszuweichen und sich eventuell an neue Rezeptoren zu adaptieren (Dimitrov, 2004).

Die flexiblen C-terminalen Bereiche bilden fünf  $\alpha$ -Helices, die Kontakt mit angrenzenden Pentameren und stabile interkapsomere Bindungen zu benachbarten L1-Monomeren herstellen („invading-arm“-Modell, Modis *et al.*, 2002). Intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen stabilisieren diese Interaktion zusätzlich (Sapp *et al.*, 1995; 1998).

### 1.6.3 Genomorganisation

Die Organisation des zirkulären, doppelsträngigen DNA-Genoms, das mit Histonen zu einem chromatinähnlichen Komplex assoziiert ist und als Minichromosom vorliegt (Howley und Lowy, 2001), ist bei PV sehr gut konserviert (siehe Abbildung 1.5). Der kodierende Strang des ca. 8000 bp langen Genoms enthält acht transkribierte Sequenzen in drei Leserahmen (Chen *et al.*, 1982). Entsprechend dem Zeitpunkt der Expression im Repli-



**Abbildung 1.5:** Das PV-Genom am Beispiel von HPV16. Das Genom (7904 bp) ist als schwarzer Kreis dargestellt, zusätzlich mit dem frühen (p97) und späten (p670) Promotor als schwarze Pfeile und den beiden Polyadenylierungsstellen ( $A_E/A_L$ : frühe/späte). Die sechs offenen Leseraster der frühen Gene (die Onkogene E6 und E7 in Grüntönen, E1, E2, E4 und E5 in Blautönen) und die zwei offenen Leseraster der späten Gene (L1 rot und L2 orange dargestellt) sind durch eine nicht-kodierende Region (*Long Control Region*, LCR) mit verschiedenen Kontrollelementen voneinander getrennt.

kationszyklus werden die kodierenden Sequenzen in eine frühe (*early*, E) und eine späte (*late*, L) Region unterteilt. Die sechs frühen Gene (E1, E2, E4-E7) werden unter dem Einfluss des Promotors p97 oder p670 während unterschiedlicher Stadien der epithelialen Zelldifferenzierung exprimiert und sind für Replikation, Transkription und die zelluläre Transformation notwendig. Auch die beiden späten Gene (L1 und L2), die für die KapSIDproteine kodieren, stehen unter dem Einfluss von p670. Ihre Expression ist auf das differenzierte Epithel beschränkt, wo auch der Zusammenbau der viralen Partikel stattfindet. Beide Regionen besitzen eine eigene Polyadenylierungsstelle ( $A_E$  und  $A_L$ , siehe Abbildung 1.5), außerdem spielen alternative Spleißverfahren eine große Rolle.

Innerhalb des ringförmigen Genoms ist die späte von der frühen Region durch eine etwa 1000 bp lange, nicht-kodierende Region getrennt. Diese Region beinhaltet regulatorische Motive wie Enhancer, Promotoren und den Replikationsursprung, sowie Bindungsstellen für virale und zelluläre Transkriptionsfaktoren. Sie ist für die Kontrolle der gewebsspezifischen und von der Zelldifferenzierung abhängigen Genexpression zuständig und wird daher als LCR-Region (*Long Control Region*) bezeichnet (Howley und Lowy, 2001).

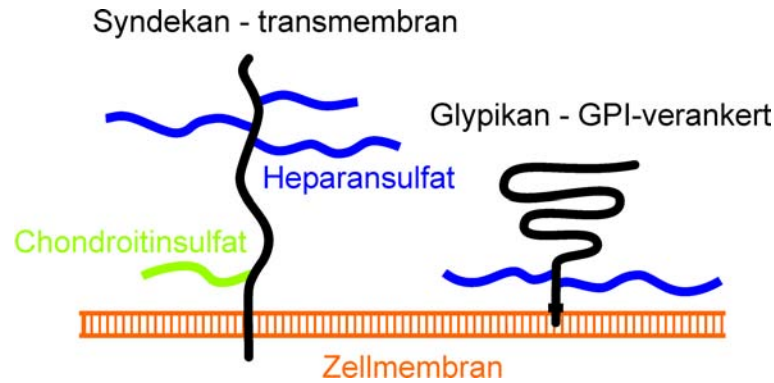
## 1.7 Virus-ähnliche Partikel und Pseudovirionen

Die Anzucht von Papillomviren in Zellkultursystemen ist aufgrund ihres Epitheltropismus und der Kopplung ihres Infektionszyklus an die Differenzierung der Keratinozyten sehr schwierig. Allein aufwendige Techniken wie die Maus-Xenograft-Methode, bei der immunsupprimierte Mäuse humanes Gewebe transplantiert bekommen, oder die Infektion organotypischer Zellkulturen (*Rafts*) ermöglichen ihre Reproduktion (Kreider *et al.*, 1985; Meyers *et al.*, 1992). Alternativ werden heute DNA-freie virusähnliche Partikel (*Virus-Like Particles*, VLP) (Kirnbauer *et al.*, 1992; Volpers *et al.*, 1994) und DNA-haltige Pseudovirionen (Buck *et al.*, 2004; 2005; Unckell, 1997) generiert. Die Herstellung kann durch alleinige Expression von L1-Proteinen erfolgen, die sich spontan zu Partikeln zusammenlagern und authentischen HPV-Virionen gleichen (Hagensee *et al.*, 1994). Bei einer Koexpression von L1 und L2 wird letzteres ebenfalls in das Kapsid integriert. Ist zusätzlich ein entsprechendes Reporterplasmid vorhanden, das beispielsweise ein GFP-Gen enthält, so wird es in das Virion verpackt.

## 1.8 Bindung von Papillomviren

### 1.8.1 Primärrezeptoren für Papillomviren

Rezeptoren für PV vermitteln zum einen das Andocken der Viren an die Zelle, zum anderen die Internalisierung der viralen Partikel über den Endozytoseweg (Smith und Helenius, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass es sich um einen hoch konservierten und, da PV an zahlreiche unterschiedliche Zelllinien binden können, ubiquitär exprimierten Zelloberflächenrezeptor handelt (Müller *et al.*, 1995; Qi *et al.*, 1996; Roden *et al.*, 1994; Volpers *et al.*, 1995). Zudem konkurrieren die Partikel verschiedener PV-Typen um die Bindung an die Zelloberfläche, sie besitzen also einen gemeinsamen Rezeptor (Roden *et al.*, 1994). 1997 wurde  $\alpha_6$ -Integrin als Rezeptor für HPV6b vorgeschlagen (Evander *et al.*, 1997), konnte jedoch nicht als allgemeingültiger Rezeptor für PV bestätigt werden. Weitere Versuche zeigten hingegen, dass Heparansulfatproteoglykane die Bindung von HPV11 an humane Keratinozyten vermitteln (Joyce *et al.*, 1999) und auch für die Infektion von HPV16 und -33 (Giroglou *et al.*, 2001), sowie -18, -31, -45, -58, -59 und -68 (Combata *et al.*, 2001) essentiell sind. Obwohl PV an viele Zelllinien unterschiedlichster Art- und Gewebsspezifität binden können, findet die erfolgreiche Reproduktion nativer Viruspartikel nur nach Bindung und Infektion sich differenzierender Basalzellen von Haut und Schleimhaut statt. Es müssen somit noch weitere Faktoren existieren, die diesen Tropismus bewirken, z. B. zellspezifische Sekundärrezeptoren oder intrazelluläre Signalkaskaden.



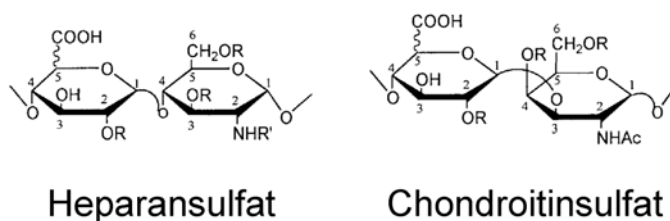
**Abbildung 1.6:** Struktur von Proteoglykanen. Links ist ein Syndekan dargestellt (schwarz), das transmembran in der Zellmembran verankert ist. Es trägt sowohl Heparansulfat-Seitenketten (blau), als auch Chondroitin-Seitenketten (grün). Die Syndekanfamilie hat vier Mitglieder. Glypikane (rechts) enthalten auch globuläre Abschnitte, die Verankerung mit der Zellmembran erfolgt über Glykosylphosphatidylinositol (GPI). Die Seitenketten, bei denen es sich ausschließlich um HS handelt, sind nahe der Membran angeheftet. Die Glypikanfamilie umfasst sechs Mitglieder.

Die primäre Bindung des Virus an Heparansulfate wird von L1 vermittelt, da auch Viruspartikel, die ausschließlich aus L1 bestehen an Zellen binden können (Giroglou *et al.*, 2001; Selinka *et al.*, 2003). Eine mögliche Interaktion von L2 mit einem potentiellen Sekundärrezeptor wird jedoch in Erwägung gezogen (Yang *et al.*, 2003)

### 1.8.2 Heparansulfatproteoglykane

Heparansulfatproteoglykane (HSPG) kommen auf der Oberfläche zahlreicher Zellen sowie in der extrazellulären Matrix (ECM) vor. Sie sind an vielen biologischen Prozessen, u. a. der Blutgerinnung, Wundheilung und embryonalen Entwicklung, aber auch Virusinfektionen, beteiligt. Sie bestehen aus einem Kernprotein, das über Serinreste Glykosaminoglykanketten kovalent gebunden hat (siehe Abbildung 1.6). Über Aminosäuresequenzhomologien lassen sich zwei große Subfamilien von Kernproteinen unterscheiden: Syndekane und Glypikane.

Syndekane weisen eine variable Ektodomäne auf, die in den extrazellulären Raum ragt und drei bis fünf Heparansulfat (HS)-Seitenketten trägt. In manchen Geweben kommen Syndekane vor, die neben HS- auch noch Chondroitinsulfat (CS)-Seitenketten enthalten. Eine kurze hydrophobe Transmembrandomäne verankert diese Proteoglykane in der Plasmamembran. Nahe der Ektodomäne befinden sich mehrere Proteaseschnittstellen. Proteolyse führt zur Ablösung der Syndekane von der Zelloberfläche und zur Lokalisation in der extrazellulären Matrix. Dieses sogenannte *Shedding* reguliert den Gehalt an HS auf der Zelle bzw. in der ECM.



**Abbildung 1.7:** Darstellung von Heparansulfat und Chondroitinsulfat. HS ist ein Kopolymer aus Glukuronsäure oder Iduronsäure und Glukosaminen mit verschiedenen Sulfatierungen (Abbildung nach Liu und Thorp, 2002). CS besteht ebenfalls aus Glukuronsäure oder Iduronsäure, verbunden mit N-acetyliertem Galaktosamin mit unterschiedlichen Sulfatierungen.

Glypikane unterscheiden sich von Syndekanen durch ihre cysteinreichen globulären Ektodomänen und das Vorhandensein von zwei oder drei HS-Seitenketten. Diese sind zwischen der globulären Ektodomäne und dem Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Membrananker nahe der Membran befestigt. CS-Seitenketten kommen nur sehr selten vor. Bei Glypikanen konnte bisher noch keine proteolytische Abspaltung von der Zellmembran nachgewiesen werden. Sowohl Syndekane als auch Glypikane können jedoch auch endosomolytisch oder lysosomal degradiert werden (Yanagishita und Hascall, 1992).

Neben Syndekanen und Glypikanen kommen noch andere membranständige Proteoglykane vor, die HS-Seitenketten tragen, z.B. Epikane oder Betaglykane. Diese spielen jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Zu den HSPGs, die von der Zelloberfläche sekretiert werden, gehören u. a. Perlekane und Agrine (Esko und Lindahl, 2001).

### 1.8.3 Heparansulfat

Glykosaminoglykane, die Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure umfassen, sind lineare Polysaccharide, die sich in den sich wiederholenden Disaccharideinheiten unterscheiden (siehe Abbildung 1.7). HS ist ein Polysaccharid aus alternierenden Sequenzen von Glukuronsäure oder Iduronsäure und Glukosamin. Dieses Grundgerüst durchläuft eine Reihe von Modifikationen. N-Deacetylierungen und N-Sulfatierungen können an den Glukosaminen und O-Sulfatierungen an der 2O-, 3O- und 6O-Position der Iduron- oder Glukuronsäure und an der 3O- und 6O-Position des Aminozuckers auftreten (Esko und Lindahl, 2001). Diese Modifikationen kommen nicht an allen Positionen gleichzeitig vor und sind außerdem streng reguliert. Dadurch entsteht eine große Anzahl unterschiedlicher HS-Spezies, die zell- bzw. gewebsspezifisch sein können. Heparin ist eine hoch sulfatierte Form von HS, die von Mastzellen und basophilen Granulozyten sezerniert wird. Heparin trägt durchschnittlich 2,7 Sulfatgruppen pro Disaccharid, HS hingegen 0,6-1 (Hileman *et al.*, 1998).



### 1.8.4 Heparansulfat als Virusrezeptor

HS ermöglichen es vielen Viren, einen ersten Kontakt mit der Zelle herzustellen (Liu und Thorp, 2002). Zu diesen Viren gehören neben vielen HPV-Typen auch Dengue Viren (Chen *et al.*, 1997; Hilgard und Stockert, 2000), Herpes Simplex Virus 1 und 2 (Lycke *et al.*, 1991; Shukla *et al.*, 1999), HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus*) (Saphire *et al.*, 2000), AAV-2 und -3 (*Adeno-associated Virus*) (Handa *et al.*, 2000; Summerford und Samulski, 1998), Coxsackievirus B3 (Zautner *et al.*, 2006) und humane Cytomegaloviren (HCMV) (Compton *et al.*, 1993). Für manche Viren vermitteln die zelloberflächenassoziierten Glykosaminoglykane die primären, für manche die sekundären Kontakte mit der Zelle. Herpes Simplex Viren (HSV) binden zuerst an HS, gefolgt von der Interaktion mit Mitgliedern der TNF (*Tumor Nekrose Factor*)-Rezeptorfamilie und der Immunglobulin-Superfamilie (Spear, 2004; WuDunn und Spear, 1989). Die Länge der HS-Seitenketten, die Anzahl der Sulfatgruppen und ihre Positionierung sind wichtige Faktoren für die Virusbindung. Dies konnte z. B. für Pseudorabies-Viren (Trybala *et al.*, 1996) und HSV1 (Feyzi *et al.*, 1997; Shukla *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2004) gezeigt werden.

Die Interaktion findet meist über elektrostatische Wechselwirkung zwischen positiv geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche der Viren und der hohen Anzahl negativer Ladungen der HS statt (Liu und Thorp, 2002). Heparinbindende Domänen von Proteinen enthalten oftmals eines der folgenden Konsensussequenzmotive: XBBBXXBX, XBBXBX oder TXXBXXTBXXXTB (B=basische Aminosäure; X=hydrophatische Aminosäure; T=*Turn*, Windung; Hileman *et al.*, 1998). Die Bindestelle der PV, also Aminosäuren auf der Oberfläche des HPV-Kapsids, die an einer Interaktion mit HS der Zelloberfläche beteiligt sind, konnte bisher noch nicht identifiziert und charakterisiert werden.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Mittlerweile konnte für zahlreiche HPV-Typen, darunter HPV16, gezeigt werden, dass Heparansulfatproteoglykane der Zelloberfläche die primäre Bindung der Viren vermitteln und für deren Infektion essentiell sind (Combata *et al.*, 2001; Giroglou *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 1999). Es wurden bereits einige Vermutungen angestellt, welche Kapsidregionen an der primären Interaktion mit der Zelloberfläche beteiligt sein könnten (Booy *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Day *et al.*, 2007; Joyce *et al.*, 1999). Allerdings wurden sowohl Regionen auf der Spitze des Kapsomers als auch in der Grube zwischen den Kapsomeren in Betracht gezogen. Da bisher aber keine experimentellen Analysen vorliegen, ist die tatsächliche Lage und Topologie der Heparansulfatbindestelle noch unbekannt. Auch HPV-Partikel, die nur aus dem majoren Kapsidprotein L1 bestehen, haben die Fähigkeit

an Heparansulfate zu binden (Joyce *et al.*, 1999). Daher muss die Rezeptorbindestelle von Aminosäuren des L1-Proteins gebildet werden. Aufgrund der von Chen *et al.*, (2000) veröffentlichten Kristallstruktur kann gezielt nach bestimmten Strukturen und Aminosäuren gesucht werden, die auf der Oberfläche des Kapsomers exponiert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nun verschiedene Aminosäuren hinsichtlich ihrer Beteiligung bei der Zellbindung untersucht werden, um dadurch die Identifikation der noch unbekanntes Heparansulfatbindestelle zu ermöglichen. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Aminosäuren in der interkapsomeren Grube und auf der Spitze des Kapsomers ausgetauscht und die so hergestellten mutierten Partikel hinsichtlich ihrer Bindungskapazitäten und Infektiosität analysiert werden. Ziel dieser Arbeit war somit die Identifikation und nähere Charakterisierung der Heparansulfatbindestelle von HPV16.

*Sobald entschieden ist,  
dass etwas gemacht werden kann und soll,  
werden wir auch einen Weg dazu finden.*

Abraham Lincoln

# 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Labormaterialien

Alle Plastikwaren wurden von den Firmen Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Heidelberg) bezogen. Glaswaren stammten von der Firma Schott (Mainz). Die verwendeten Laborgeräte kann man Tabelle 2.1 entnehmen.

**Tabelle 2.1:** Laborgeräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Kammer (Western Blot)	Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Brutschrank	Heraeus 6000	Heraeus
Elektronenmikroskop	EM 900 Tecnai 12	ZEISS Philips
Elektrophorese-Kammer, horizontal (DNA)		LMS GmbH Labortechnik (Dossenheim)
Elektrophorese-Kammer, vertikal (Protein)		BRL Life Technologies
ELISA-Reader	Multiscan RC Modell 351	Thermo Labsystems
ELISA-Washer	AM60 Multi-Reagent Washer	Dynex Technologies

**Tabelle 2.1:** Laborgeräte (Fortsetzung)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	ZEISS
Geldokumentation	Procida	Peacock
Heizblöcke	Blockthermostat BT 1303	HLC
Inkubationsschüttler	Certomat	Sartorius
Laborwaagen	BL 1500S Mettler AE 100	Sartorius Mettler
Magnetrührer	IKAMAG REC-G	Janke & Kunkel
Netzgeräte	PHERO-stab.500 Power Pack P25	Biotec-Fischer Biometra
pH-Meter	WTW pH Level 2	inoLab
Pipettierhilfe	P2, P20, P200, P1000	Gilson
Rotoren	Vti 65, Vti 55, SW 60 HB 4, GSA	Beckman Du Pont Instruments
Scanner	SnapScan 1236	AGFA
Sterile Werkbank	NU-440-400E (Class II)	NUAIRE
Thermocycler	T-Gradient	Biometra
Tischzentrifugen	Biofuge pico Biofuge fresco	Heraeus
Ultraschallgerät	Sonorex RK 156	Bandelin
Ultrazentrifuge	L8-70M UZ	Beckman
UV-Transilluminator	II-200 M, 302 nm	Bachofer
Wasserbäder	W12D	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH
H <sub>2</sub> O- Deionisierungsanlage	Milli-Q	Millipore
Zentrifugen	Labofuge 400R Sorvall RC-5B	Heraeus Du Pont Instruments

### 2.1.2 Chemikalien

Die hier verwendeten Chemikalien und Materialien waren von höchster erhaltlicher Reinheit. Wenn nicht anders angegeben wurden diese von einer der folgenden Firmen bezogen: AppliChem, Becton Dickinson, Bio-Rad, GE Healthcare, Invitrogen, Merck, Pharmacia-LKB Biotechnology, Roche, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich. Die verschiedenen Heparinderivate wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die verwendete Nitrocellulose (NC)-Membran stammte von der Firma Schleicher und Schüll.

### 2.1.3 Kits

**Tabelle 2.2:** Verwendete Labor-Kits.

Produkt	Hersteller	Anwendung
E.Z.N.A.-Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab	Plasmid-Isolation (Mini)
Jetsorp Gelextraction Kit 300	Genomed	DNA-Extraktion aus Agarosegelen
<i>Magnet Assisted Transfection</i> (MATra)	IBA	Transfektion von Zellen
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel	Plasmid-Isolation (Maxi)
Quick Ligation <sup>®</sup> Kit	New England BioLabs	DNA-Ligation
TMB ELISA Peroxidase Substrate	KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories)	ELISA-Detektion
TMB Membrane Peroxidase Substrate	KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories)	Western Blot-Detektion

### 2.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und DNA-Polymerasen wurden von der Firma New England BioLabs bezogen und in den mitgelieferten verdünnten Puffern nach Herstellerangabe eingesetzt.

### 2.1.5 Plasmidvektoren

**pUF3/hu16L1:** codonoptimiertes HPV16 L1-Gen über *NotI/HindIII* in pUF3-Vektor kloniert, Ampicillinresistenzgen (Leder *et al.*, 2001).

**pUF/hu16L2:** codonoptimiertes HPV16 L2-Gen über *NotI/HindIII* in pUF3-Vektor kloniert, Ampicillinresistenzgen (Leder *et al.*, 2001).

**pEGFP<sub>2</sub>-NLS:** in den pEGFP-C1-Vektor wurde ein weiteres GFP-Gen (*Green Fluorescent Protein*) und zusätzlich die Kernlokalisationssequenz von HPV33-L1 kloniert, Kanamycinresistenzgen (zur Verfügung gestellt von Luise Florin, Universitätsklinik Mainz).

### 2.1.6 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.3 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net (Ulm) bezogen. Die Mutageneseprimer wurden PAGE-gereinigt, die veränderten Nukleotide sind rot hervorgehoben. Zur Methode der Mutagenese siehe 2.3.9. Primer mit der Bezeichnung „forward“ haben die unten angegebene Leserichtung (5´-3´) der Zielsequenz, Primer mit der Bezeichnung „revers“ sind hingegen revers komplementiert zum zugehörigen „forward“-Primer, d. h. sie entsprechen der komplementären Zielsequenz. „16L1“ bezieht sich auf die L1-Sequenz von HPV16. Danach folgt die Angabe der Aminosäure, deren Position und die Aminosäure, die an ihre Stelle treten soll, z. B. „K54A“ bedeutet, dass das Lysin an Position 54 durch ein Alanin ersetzt werden soll.

Für DNA-Sequenzierungen über die Firma Genterprise (Mainz) wurden dort die in Tabelle 2.4 aufgeführten 5´- und 3´-Primer hinterlegt.

**Tabelle 2.3:** Verwendete Mutageneseprimer. Die veränderten Nukleotide sind rot hervorgehoben.

R = A oder G; Y = C oder T; M = A oder C; K = G oder T

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
16L1-K54A-forward	5´-CCT ACT TCC CCA TCA AGG CCC CCA ACA ACA ACA AGA TCC-3´
16L1-K54A-revers	5´-GGA TCT TGT TGT TGT TGG GGG CCT TGA TGG GGA AGT AGG-3´
16L1-R74A-forward	5´-GCA GTA CAG GGT GTT CGC CAT CCA CCT GCC CGA CC-3´
16L1-R74A-revers	5´-GGT CGG GCA GGT GGA TGG CGA ACA CCC TGT ACT GC-3´
16L1-K82A-5´	5´-CCT GCC CGA CCC CAA CGC GTT CGG CTT CCC CGA CAC C-3´

**Tabelle 2.3:** Verwendete Mutageneseprimer. (Fortsetzung)

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
16L1-K82A-3´	5´-GGT GTC GGG GAA GCC GAA <b>CGC</b> GTT GGG GTC GGG CAG G-3´
16L1-R97A-5´	5´-CCC CGA CAC CCA <b>GGC</b> <b>GCT</b> GGT GTG GGC C-3´
16L1-R97A-3´	5´-GGC CCA CAC CAG <b>CGC</b> CTG GGT GTC GGG G-3´
16L1-K278A-forward	5´-CCG ACG ACC TGT ACA <b>TCG</b> <b>CCG</b> GCA GCG GCA GCA CCG-3´
16L1-K278A-revers	5´-CGG TGC TGC CGC TGC <b>CGG</b> <b>CGA</b> TGT ACA GGT CGT CGG-3´
16L1-K365A-forward	5´-CCA GCG AGA CCA CCT <b>ACG</b> <b>CCA</b> ACA CCA ACT TCA AGG-3´
16L1-K356A-revers	5´-CCT TGA AGT TGG TGT <b>TGG</b> <b>CGT</b> AGG TGG TCT CGC TGG-3´
16L1-K361A-forward	5´-CCT ACA AGA ACA CCA ACT <b>TCG</b> <b>CCG</b> AGT ACC TGA GGC ACG GCG-3´
16L1-K361A-revers	5´-CGC CGT GCC TCA GGT ACT <b>CGG</b> <b>CGA</b> AGT TGG TGT TCT TGT AGG-3´
16L1-K356/361A-forward	5´-CCA GCG AGA CCA CCT <b>ACG</b> <b>CCA</b> ACA CCA ACT <b>TCG</b> -3´
16L1-K356/361A-revers	5´- <b>CGA</b> AGT TGG TGT <b>TGG</b> <b>CGT</b> AGG TGG TCT CGC TGG-3´
16L1-K443A-5´	5´-GGA GGG ACC CCC TGA <b>AGG</b> <b>CGT</b> ACA CCT TCT GGG AGG-3´
16L1-K443A-3´	5´-CCT CCC AGA AGG TGT <b>ACG</b> <b>CCT</b> TCA GGG GGT CCC TCC-3´
16L1-K278R-5´	5´-CGA CCT GTA CAT <b>CCG</b> GGG CAG CGG CAG C-3´
16L1-K278R-3´	5´-GCT GCC GCT GCC <b>CCG</b> GAT GTA CAG GTC G-3´
16L1-K356/361R-5´	5´-CCA GCG AGA CCA CCT ACM <b>RGA</b> ACA CCA ACT TCM <b>RGG</b> AGT ACC TGA GGC ACG G-3´
16L1-K356/361R-3´	5´-CCG TGC CTC AGG TAC TCC <b>YKG</b> AAG TTG GTG TTC <b>YKG</b> TAG GTG GTC TCG CTG G-3´
16L1-T353/354/358A-5´	5´-CCA TCA GCA CCA GCG <b>AGR</b> <b>CCR</b> CCT ACA AGA <b>ACR</b> CCA ACT TCA AGG AGT ACC TGA GGC-3´
16L1-T353/354/358A-3´	5´-GCC TCA GGT ACT CCT TGA AGT TGG <b>YGT</b> TCT TGT AGG <b>YGG</b> <b>YCT</b> CGC TGG TGC TGA TGG-3´

**Tabelle 2.4:** Für DNA-Sequenzierung verwendete Primer.

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
16L1-933-5´ (= pMK1)	5´-AAG CTG GCG GAA TTG TAC CCG CGG CCG C-3´
pUF3hu16L1-3´ (= pSR3)	5´-CTA GAA GGC ACA GTC GAG G-3´

### 2.1.7 Protein- und DNA-Marker

#### DNA-Marker:

*1 kb DNA Ladder* New England BioLabs

*100 bp DNA Ladder* New England BioLabs

#### Protein-Marker:

*LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* GE Healthcare

*Precision Plus Protein® All Blue Standards* Bio-Rad (München)

### 2.1.8 Bakterienstämme

#### *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (ATCC: 53868):

*supE44 lacU 169 ( $\Phi$ 80lacZM15) hsdR17 recA endA1 gyrA1 gyrA96 thi-1 relA1*

(Hanahan, 1983)

#### *Escherichia coli* MC1061:

*$\Delta$ lacX74 araD193  $\Delta$ (*ara, leu*) 7697 galU galK hsr hsmStrA*

#### *Escherichia coli* Top10 / Top10F':

*F<sup>-</sup> / F' lacI<sup>q</sup> Tn10(Tet<sup>R</sup>), mcrA  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 galU galK rpsL(Str<sup>r</sup>) endA1 nupG*

(One Shot® TOP10 Competent Cells, Invitrogen)

### 2.1.9 Bakterienkulturmedien und -zusätze

Die verwendeten Nährmedien für Bakterien werden unten aufgeführt. Der pH-Wert der Medien wurde jeweils bei Bedarf mit HCl bzw. NaOH eingestellt. Alle Medien wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert. Bei den Medien oder festen Nährböden für Bakterien wurden den jeweiligen Ansätzen nach Abkühlen auf ca. 55°C Antibiotika beigemischt. Das Antibiotikum für die Bakterienselektion wurde nach dem Resistenzgen des jeweiligen Vektors ausgesucht (siehe 2.1.5). Für feste Nährböden wurde dem jeweiligen Medium noch 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt und dieses nach dem Autoklavieren in Petrischalen (100 mm) gegossen, bis diese ungefähr halb gefüllt waren.

#### LB (Luria-Bertani)-Medium:

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Trypton

1% (w/v) NaCl

pH 7.0



Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration (pro ml Medium)
Ampicillin	100 mg/ml in <i>dd</i> H <sub>2</sub> O	100 µg
Kanamycin	50 mg/ml in <i>dd</i> H <sub>2</sub> O	50 µg

### 2.1.10 Eukaryotische Zelllinien

**Tabelle 2.5:** Verwendete Zelllinien.

Name	Beschreibung	Referenz
Cos-7	<i>African Green Monkey</i> -Nierenzelllinie ( <i>fibroblast-like</i> ), Derivat der Zelllinie CV-1, die mit T-Antigen stabil transfiziert wurde	Gluzman, 1981 ATCC: CRL-1651
293TT	Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, enthält zusätzlich zweimal das große T-Antigen von SV40	Pear <i>et al.</i> , 1993 Buck <i>et al.</i> , 2004
Hybridomzellen	Antikörperproduzierende B-Zellen, die mit Zellen einer Myelomzelllinie fusioniert wurden (siehe auch 2.7.11)	Köhler und Milstein, 1975

### 2.1.11 Zellkulturmedien und -zusätze

**Tabelle 2.6:** Zellkulturmedien und -zusätze.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA Laboratories	standardisiertes Zellkulturmedium
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen	
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	Invitrogen	Zellkulturmedium für Hybridomazellen

**Tabelle 2.6:** Zellkulturmedien und -zusätze. (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Nichtessentielle Aminosäuren (100×)	PAA Laboratories	
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen	Antibiotikum
L-Glutamin 200 mM (100×)	PAA Laboratories	
OptiMEM	Invitrogen	Medium für Transfektionen
Ciprobay® (Ciprofloxacin)	Bayer	Antibiotikum, gegen Mycoplasmen
Hygromycin	Roth	Selektion von 293TT-Zellen

### 2.1.12 Primäre Antikörper und Antiseren

**Tabelle 2.7:** Monoklonale und polyklonale HPV-Antikörper. Angegeben sind sowohl in dieser Arbeit verwendete, als auch im Abschnitt Diskussion erwähnte Antikörper.

Name	Spezifität/Epitop	Herkunft	Verdünnung	Quelle/Referenz
16L1-312F	HPV16L1; AS 125?, linear	Maus monoklonal	WB 1:200 ELISA 1:1000	
16L1-56E/-58C	HPV16L1; AS 260-270, FGa-Loop, konformationell	Maus monoklonal	ELISA 1:1000	Bergsdorf <i>et al.</i> , 2003
H16.E70	HPV16L1; DE- und FG-loop, konformationell	Maus monoklonal		Carter <i>et al.</i> , 2003
H16.U4	HPV16L1; AS 427-445, konformationell	Maus monoklonal		Carter <i>et al.</i> , 2003
H16.V5	HPV16L1; FG-loop, konformationell	Maus monoklonal		Carter <i>et al.</i> , 2003

**Tabelle 2.7:** Monoklonale und polyklonale HPV-Antikörper. (Fortsetzung)

Name	Spezifität/Epitop	Herkunft	Verdünnung	Quelle/Referenz
33L1-7	HPV16, -18 und -33 L1; AS 303-313, linear	Maus monoklonal	WB 1:200 ELISA 1:1000	Sapp <i>et al.</i> , 1994
H33.B6	HPV33L1; AS 132-140 und 282-291, DE- und FGb-Loop konformationell	Maus monoklonal		N. D. Christensen; Roth <i>et al.</i> , 2006
H33.E12	HPV33L1; AS 260-270, FGa-, DE- und FGb-Loop	Maus monoklonal		N. D. Christensen; Roth <i>et al.</i> , 2006
H33.J3	HPV33L1; AS 51-58, BC-Loop konformationell	Maus monoklonal		N. D. Christensen; Roth <i>et al.</i> , 2006
33L2-1	HPV16 & 33L2	Maus monoklonal	WB 1:200	Volpers <i>et al.</i> , 1995
K53	HPV33L1	Kaninchen polyklonal	WB 1:5000 ELISA 1:5000	Unckell <i>et al.</i> , 1997
K75	HPV16L1	Kaninchen polyklonal	WB 1:5000 ELISA 1:5000	Bergsdorf <i>et al.</i> , 2003

### 2.1.13 Sekundäre Antikörper

**Tabelle 2.8:** Sekundäre Antikörper.

Bezeichnung	Konjugat	aus Spezies	Bezugsquelle
$\alpha$ -Maus IgG (H+L)	Peroxidase	Ziege	Dianova (Hamburg)
$\alpha$ -Kaninchen IgG (H+L)	Peroxidase	Ziege	Dianova (Hamburg)

### 2.1.14 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

#### DNA-Probenpuffer, 6×:

- 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- 0,25% (w/v) Xylene Cyanol
- 15% (w/v) Ficoll Type 400

#### DPBS/9,5 mM MgCl<sub>2</sub>:

- 1 × PBS (siehe unten)
- 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>
- 9,5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### DPBS/9,5 mM MgCl<sub>2</sub>/0,8 M NaCl:

- 1 × PBS (siehe unten)
- 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>
- 9,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2,1 mM KCl
- 663 mM NaCl

#### Lämmli-Probenpuffer, 1×:

- 50 mM Tris (pH 6,8)
- 2% (w/v) SDS
- 20% (w/v) Glycerin
- 0,1% (w/v) Bromphenol-blau
- 5% (w/v) β-Mercaptoethanol

#### Lämmli-Laufpuffer, 5×:

- 1,5% (w/v) Tris
- 0,5% (w/v) SDS
- 7,2% (w/v) Glycin

#### PBS, 10×, pH 7,4:

- 1,37 M NaCl
- 2,7 mM KCl
- 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ×2 *dd*H<sub>2</sub>O

#### TAE-Puffer, 10×, pH 8,0:

- 400 mM Tris
- 200 mM Natriumacetat
- 10 mM EDTA

**Western Blot-Transferpuffer:**

- 25 mM Tris
- 192 mM Glycin
- 20% (v/v) Methanol

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

**SOB-Medium:**

- 2% (w/v) Trypton
- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 0,05% (w/v) NaCl
- 0,02% (w/v) KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>

**RF1:**

- 100 mM RbCl
- 30 mM KAc
- 15% (w/v) Glycerin
- pH 5,8 mit HCl
- 5 mM MnCl<sub>2</sub>

**RF2:**

- 10 mM MOPS
- 10 mM RbCl
- 75 mM CaCl<sub>2</sub>
- 15% (w/v) Glycerin
- pH 6,8 mit NaOH

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$  oder MC1061) wurde zunächst eine Vorkultur in 3 ml SOB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und bei 37°C und 150 rpm im Rotationsschüttler über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vorkultur in 200 ml SOB-Medium ohne Antibiotikum überführt und bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600nm</sub> von 0,3–0,4 bei 37°C und 150 rpm im Rotationsschüttler wachsen gelassen. Nach Erreichen der gewünschten OD wurden die Bakterien 15 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4°C und 3.000  $\times$  g pelletiert. Die weiteren Arbeiten erfolgten auf Eis. Das Pellet wurde in 16,6 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 2.500  $\times$  g.

Das erhaltene Pellet wurde in 16 ml eiskaltem RF2-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert, in 300  $\mu$ l-Portionen in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Überprüfung der Kompetenz wurden die Bakterien, wie unter 2.2.2 beschrieben, mit 50 ng Plasmid-DNA transformiert.

### 2.2.2 Chemische Transformation von *E. coli*-Zellen

Die chemische Transformation von Zellen wurde wie bei Hanahan (1983) beschrieben durchgeführt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 150  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 sec bei  $42^{\circ}\text{C}$  mit anschließender Inkubation für 1 min auf Eis. Danach wurde dem Ansatz 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und dieser eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 150 rpm geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 3 min bei  $1.200 \times g$  zentrifugiert und das Pellet in 250  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert. 50  $\mu$ l- und 200  $\mu$ l-Aliquots wurden auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert.

### 2.2.3 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  oder MC1061 wurden zur Vermehrung von Bakterien in LB-Medium kultiviert. Zum Anlegen einer Übernachtskultur wurden einzelne Kolonien von Agarplatten gepickt und in Kulturgefäße mit LB-Medium überführt. Verfügten die Bakterien zu Selektionszwecken über eine Antibiotikaresistenz (siehe 2.1.5), wurde dem Kulturmedium das entsprechende Antibiotikum (siehe 2.1.9) zugesetzt. Die Kulturen wurden je nach Verwendungszweck im Erlenmeyerkolben oder im Reagenzglas bei  $37^{\circ}\text{C}$  und zur optimalen Belüftung bei 150 rpm in einem Inkubationsschüttler über Nacht angezogen. Für die längerfristige Lagerung von *E. coli*-Klonen wurden Übernachtskulturen mit 35% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dafür wurden die so genannten „Mini-, Midi- oder Maxi-Prep Kits“ von verschiedenen Herstellern (Peqlab, Sigma-Aldrich und Macherey-Nagel) verwendet. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen nur in dem eingesetzten Volumen der Bakterienkultur und den Bezeichnungen der mitgelieferten Puffer. Die Durchführung

erfolgte nach den jeweiligen Herstellerangaben. Dafür wurde das Pellet einer Flüssigkultur im Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von Lysispuffer (200 mM NaOH, 1% SDS) wurden die Zellen aufgebrochen und die Plasmid-DNA ging in Lösung. Durch Zugabe des Neutralisationspuffers (in der Regel 3 M Kaliumacetat, pH 5,5) präzipitieren denaturierte Proteine, membrangebundene chromosomale DNA sowie Zelltrümmer und können so mittels Zentrifugation oder Filtration von der weiterhin gelösten Plasmid-DNA getrennt werden. Die Plasmidlösung wurde auf eine Silicamembran-Säule aufgetragen. Nach mehreren Waschschritten mit dem ethanolhaltigen Waschpuffer wurde die DNA in sterilem Wasser von der Säule eluiert (50  $\mu$ l bis 1,5 ml Volumen mit einer Konzentration von ca. 100–300  $\mu$ g/ml) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Aufgrund der aromatischen Ringe der Basen liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von ca. 260 nm. Somit kann die genaue Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung photometrisch anhand ihrer Extinktionswerte gemessen werden. Die optische Dichte ( $OD_{260}$ ) mit einem Wert von 1 entspricht 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA. Mit diesen Werten als Umrechnungsfaktor kann die Konzentration der DNA berechnet werden. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

Zusätzlich lässt sich aus dem Quotienten der ermittelten Extinktionen bei 260 nm sowie 280 nm der Reinheitsgrad der jeweiligen Nukleinsäure messen. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen aufgrund der aromatischen Aminosäurereste. Bei einer reinen DNA-Präparation liegt der Quotient der gemessenen Werte bei 260 und 280 nm zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte deuten auf eine Protein-, höhere Werte auf eine RNA-Verunreinigung hin.

### 2.3.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakteriellen Ursprungs, die zum Schneiden von DNA dienen. Restriktionsendonukleasen vom Typ II spalten doppelsträngige DNA nur in bestimmten palindromischen Sequenzabschnitten, die meist vier bis acht Basenpaare umfassen, wobei die entstehenden Enden doppelsträngig (*blunt ends*) oder einzelsträngig überhängend (*sticky ends*) sein können. Verwendet wurden in dieser Arbeit jedoch nur Restriktionsenzyme, die „sticky ends“ erzeugen. Die Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) in den entsprechenden mitgelieferten Puffern verwendet. Pro  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden 1–3 U Enzym eingesetzt und

der Reaktionsansatz 1–3 h bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Klonierungen wurden diese meist nur mit einem Restriktionsenzym, welches je nach Vektor auf beiden Seiten des Inserts schnitt, in einem kleineren Volumen (10–20 µl) inkubiert. Die Größe des Inserts wurde nach erfolgter Restriktion mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.3.5). Bei Restriktionen zum Zwecke der Klonierung wurden Vektor und Insert mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaut, um gerichtet in Vektoren ligieren zu können. Der Vektor besaß jeweils Schnittstellen für beide Restriktionsendonukleasen in der *Multiple Cloning Site*. Das Insert wurde so konstruiert, dass es auf beiden Seiten von den unterschiedlichen Schnittstellen und zusätzlich von vier beliebigen Basen an jedem Ende flankiert wurde, um die Restriktionsreaktion zu optimieren. Nach Ablauf der Restriktion wurden der Vektor und das Insert aufgereinigt und für die Ligation verwendet. Reste der aufgereinigten Restriktionen wurden bei –20°C gelagert.

### 2.3.4 Ethanolfällung von DNA

Durch Fällung mit organischen Lösungsmitteln können Proteine, Pufferbestandteile usw. abgetrennt, aber auch Nukleinsäuren konzentriert und für weitere Reaktionen vorbereitet werden. Bei kleineren Volumina konnte die Fällungsreaktion in 1,5 ml- oder 2,0 ml-Gefäßen unter Verwendung von Ethanol ablaufen. Dazu wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit 1/10 ihres Volumens 3 M NaAc (pH 5,2) sowie dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol versetzt und mindestens 30 min bei –20°C gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 13.000 × g, 4°C) wurde der Überstand dekantiert. Zur Entfernung mitgefällter Salze wurde das Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, anschließend 10 min bei 50°C im Heizblock getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Bei der elektrophoretischen Auftrennung wandert in einem Agarosegel die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Größere DNA-Fragmente bewegen sich langsamer durch das Gel als kleine. So werden durch diese Molekularsiebwirkung der Agarose die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen, die mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt worden waren. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes, interkalierendes Molekül, welches sich zwischen die Basenpaarstapel der DNA einlagert und so das Molekül im UV-Durchlicht bei 254 nm oder 366 nm Wellenlänge sichtbar macht. Aufgrund der karzinogenen Wirkung von Ethidiumbromid wurden EtBr-haltige Lösungen und Gele stets mit großer Vorsicht gehandhabt; dabei wurden Nitril-Einmalhandschuhe getragen, um jeden Hautkontakt mit EtBr-haltigen Ansätzen zu vermeiden. Zur Herstel-



lung des Agarosegels wurde 0,8-1,5% (w/v) Agarose durch Aufkochen in 1× TAE-Puffer (siehe 2.1.14) gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit EtBr versetzt und anschließend in einen abgedichteten Gelschlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach Verfestigung der Agarose wurde der Gelschlitten in die Elektrophoresekammer gesetzt und die Kammer soweit mit 1× TAE-Puffer befüllt, bis das Gel mit Puffer bedeckt war. Danach wurde der Kamm entfernt. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 6× Probenpuffer versetzt (siehe 2.1.14) und in die Taschen des Gels pipettiert. Um die jeweilige Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente nach Beendigung des Gellaufs abschätzen zu können, wurde eine der Taschen mit einem Marker (siehe 2.1.7) befüllt. Während des Gellaufs wurden die einzelnen Fragmente mit einer konstanten Spannung von 80–120 V aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde nach ausreichender Auftrennung beendet (in der Regel nach max. 45 min). Die aufgetrennten Fragmente konnten nach beendetem Gellauf zur Dokumentation mit Hilfe eines Geldokumentationssystem festgehalten werden.

### 2.3.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JetSorb Kit der Firma Genomed (Bad Oeynhausen) verwendet. Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden nach der Auftrennung im Agarosegel aus dem Gel ausgeschnitten, nach Herstellerangaben gereinigt und in 15-20  $\mu\text{l}$   $dd\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

### 2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten mit Hilfe einer Ligase. Diese katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylende. Dadurch lassen sich beispielsweise DNA-Fragmente in lineare Plasmid-DNA einfügen. Mittels des Quick Ligation Kits (New England BioLabs) kann die Ligation von DNA-Fragmenten mit kohesiven oder glatten Enden innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur erfolgen. Um das Volumen des Ligationsansatzes gemäß Protokoll auf insgesamt 20  $\mu\text{l}$  zu beschränken, wurden große Volumina an DNA zuvor durch Ethanol-fällung aufkonzentriert. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und für die Transformation von *E. coli*-Zellen eingesetzt (siehe 2.2.2).

### 2.3.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt (Mullis *et al.*, 1986) und ermöglicht, spezifische Abschnitte von DNA se-

lektiv zu amplifizieren. Diese Technik basiert auf den spezifischen Eigenschaften von thermostabilen DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterienstämmen und besteht aus drei Schritten, die einen Zyklus bilden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Matrizen-DNA bei  $>92^{\circ}\text{C}$  zu einzelsträngiger DNA denaturiert. Im folgenden Schritt (*Annealing*) lagern sich spezifische Oligonukleotide, so genannte *Primer*, bei einer Temperatur zwischen  $50^{\circ}$  und  $62^{\circ}\text{C}$  an ihre komplementären Sequenzen. Die optimale Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer und wurde entweder experimentell mittels eines Temperaturgradienten im Thermocycler ermittelt oder aber theoretisch berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 \times (A + T) + 4 \times (C + G)$$

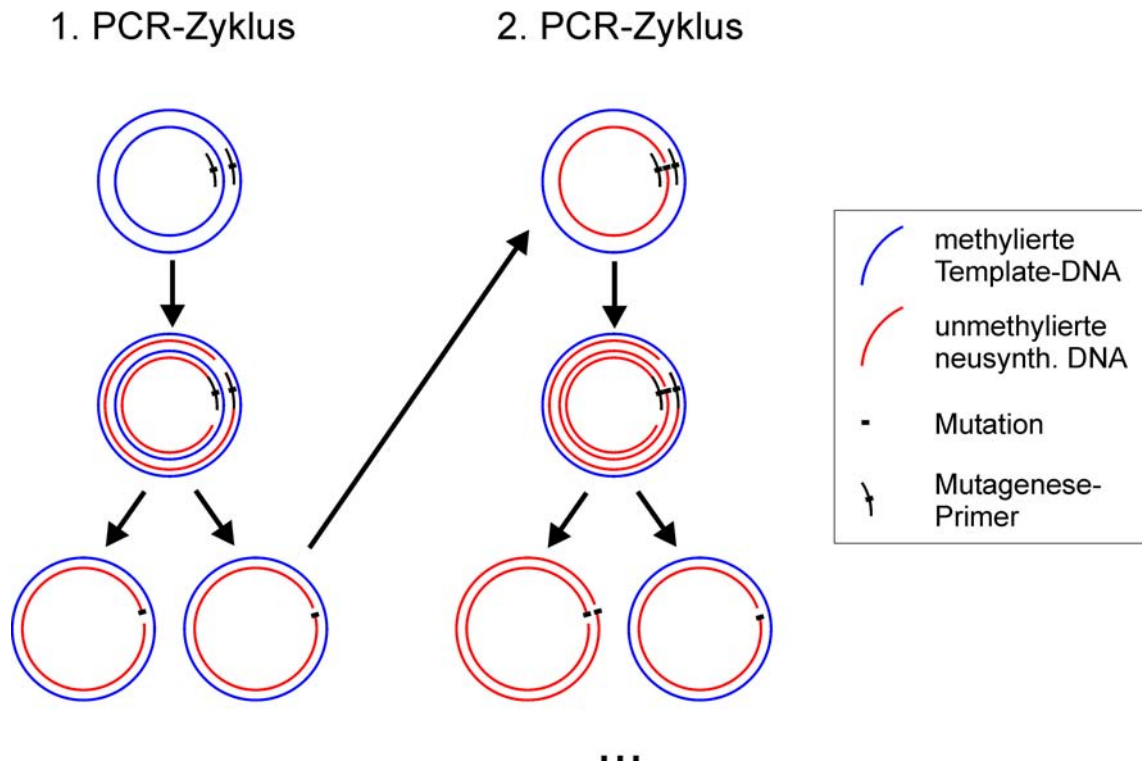
Diese Primer flankieren die zu amplifizierende Zielsequenz, wobei der Primer, der an der Zielsequenz am 5'-Ende sitzt, in dieser Arbeit als „5“- oder „Forward“-Primer bezeichnet wurde. Der Primer am 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz dagegen ist revers-komplementär zu dieser und wurde hier als „3“- oder „Reverse“-Primer bezeichnet. Im letzten Schritt dieses Zyklus, der Elongation, werden bei  $72^{\circ}\text{C}$  die komplementären Stränge ausgehend von den Primern mit Hilfe der bakteriellen DNA-Polymerase von 5' nach 3' synthetisiert. Dieser Zyklus wird 30- bis 35-mal wiederholt, wobei die bei der Elongation entstandenen Doppelstränge nach der Denaturierung ebenfalls als Matrizen-DNA zur Verfügung stehen. Auf diese Weise wird die DNA zwischen den spezifischen Primern exponentiell vervielfältigt. Als DNA-Polymerase in der PCR wurde meistens *Taq*-Polymerase verwendet, die aus dem in heißen Quellen lebenden thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Die für die PCR benötigten Primer (siehe 2.1.6) wurden in  $dd\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Folgender Ansatz einer PCR wurde normalerweise in dieser Arbeit verwendet:

### Standardansatz für PCR:

- 10-200 ng Plasmid-DNA
- 100 ng Forward-Primer
- 100 ng Reverse-Primer
- 200  $\mu\text{M}$  dNTP-Mix
- 1 $\times$  PCR-Puffer (10-fach konzentriert)
- 2,5-5 Units DNA-Polymerase

### 2.3.9 Ortsspezifische Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*)

Um spezifisch einzelne Basen eines Plasmids zu mutieren und damit Aminosäuren auszutauschen, wurde die Methode der ortsspezifischen Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*) angewendet (siehe Abbildung 2.1). Dabei werden zwei relativ lange (25-45 Basen), ex-



**Abbildung 2.1:** Prinzip der Mutagenese-PCR (ortsspezifische Mutagenese). Blau dargestellt ist methylierte Template-DNA, rot dargestellt ist unmethylierte, neusynthetisierte DNA. Die methylierte DNA ohne die Mutation wird nach der Mutagenese-PCR mit *DpnI* verdaut.

akt komplementäre Primer, die die entsprechenden Basenaustausche im Idealfall mittig enthalten, zur Amplifikation des gesamten Plasmids benutzt. Die Schmelztemperatur der Mutageneseprimer sollte größer als  $78^{\circ}\text{C}$  sein und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Basenaustausche$$

(*N* entspricht der Anzahl der Basen des Primers, %GC und %Basenaustausche sind ganze Zahlen).

Der minimale GC-Gehalt sollte 40% betragen und jeder Primer mit einem oder mehreren G oder C enden, des Weiteren wurden die Primer nach der Synthese PAGE-gereinigt. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Mutageneseprimer findet sich in Abschnitt 2.1.6. Die Amplifikation vollständiger Plasmide von mehreren Kilobasen Länge macht die Verwendung spezieller Polymerasen während der Mutagenese-PCR notwendig. Da *Taq*-Polymerasen keine Fehlerkorrektur besitzen und überdies unspezifisch überhängende Adeninbasen an die 3'-Enden des PCR-Produktes anhängen, wurden für die Mutagenese-PCRs so genannte „*Proof-reading*“-Polymerasen eingesetzt. Verwendet wurde die *Pwo*-Polymerase des in der Tiefsee lebenden Archaeobakteriums *Pyrococcus woesei* der Firma Peqlab, die eine Fehlerkorrektur mittels einer 3'-5'-Exonuclease besitzt. Um zusätzlich

die Vervielfältigung ungewollter Basenaustausche zu minimieren, wurden relativ hohe Mengen an Template-DNA mit gleichzeitiger Verringerung der Zyklenzahl eingesetzt. Die Mutagenese-PCRs in dieser Arbeit wurden folgendermaßen konzipiert:

**Standardansatz Mutagenese-PCR:**

- 1–16 ng Plasmid-DNA
- 100 ng Forward-Primer
- 100 ng Reverse-Primer
- 200  $\mu$ M dNTP-Mix
- 1 $\times$  PCR-Puffer, enthält MgSO<sub>4</sub>
- 1 Unit DNA-Polymerase

Für jede Mutante wurden in der Regel vier Reaktionen mit je 1 ng, 4 ng, 8 ng und 16 ng Template-DNA angesetzt. Dann folgten nachstehende Schritte:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Denaturierung	95°C	2 min	1
2. Denaturierung	95°C	30 sec	} 18 $\times$
3. Annealing	50°C	1 min	
4. Elongation	72°C	2 min/kb DNA	
5. Finale Elongation	72°C	2 min/kb DNA + 3 min	1

Da der PCR-Ansatz danach sowohl Template-DNA ohne Mutation, als auch neu synthetisierte DNA mit entsprechender Mutation enthielt, wurde ein Restriktionsverdau mit *DpnI* durchgeführt. Diese Endonuklease (Erkennungssequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') verdaut spezifisch methylierte DNA und kann daher verwendet werden, die unmutierte methylierte Template-DNA abzubauen. Bei Plasmiden, die aus *dam*-positiven *E. coli*-Stämmen isoliert werden, trägt das N<sup>6</sup> des Adenins der Sequenz 5'-GATC-3' eine Methylgruppe, so dass die aus Bakterien isolierte Template-DNA methyliert ist, die während der PCR neu synthetisierte DNA jedoch unmethyliert. Nach dem *DpnI*-Verdau wurde die verbleibende DNA in Bakterien transformiert (siehe 2.2.2) und die Mutationen in den isolierten Plasmiden durch Sequenzierung (siehe 2.3.10) bestätigt. Doppel- und Trippelmutanten wurden, wenn die zu mutierenden Aminosäuren zu weit auseinander lagen, in einer zweiten Mutageneserunde hergestellt.

**2.3.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Mutagenesen sowie zur Endkontrolle von DNA-Konstrukten wurden die jeweiligen Plasmide sequenziert. Alle Sequenzierungen wurden

von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt und erfolgten über die angegebenen Sequenzierungsprimer (siehe 2.1.6). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit den unter Abschnitt 2.9 aufgeführten Programmen bearbeitet und analysiert.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.4.1 Gelelektrophorese von Proteinen: SDS-PAGE

#### Acrylamid-Stammlösung für Trenngele:

(Acrylamid \ N,N-Methylenbisacrylamid  
im Verhältnis 37,5:1 (w/w))

10% (w/v) Acrylamid in 375 mM Tris-HCl  
1% (w/v) SDS  
1% (v/v) APS  
0,5‰ (v/v) TEMED  
pH 8,8

#### Acrylamid-Stammlösung für Sammelgele:

(Acrylamid \ N,N-Methylenbisacrylamid  
im Verhältnis 37,5:1 (w/w))

5% (w/v) Acrylamid in 375 mM Tris-HCl  
0,1% (w/v) SDS  
0,8% (v/v) APS  
0,4‰ (v/v) TEMED  
pH 6,8

Zur Bestimmung ihres Molekulargewichts wurden Proteine mit der so genannten SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gelelektrophoresis*) nach Lämmli aufgetrennt (Lämmli, 1970). Dabei werden die Proben mit einem denaturierenden Probenpuffer gemischt, der diese Proteine auf ihre Primärstruktur reduziert. Weiterhin bilden sich durch das Vorhandensein von SDS in Proben- und Elektrophoresepuffer negativ geladene Protein-SDS-Komplexe. Diese können somit, unabhängig von der natürlichen Ladung der Proteine, in einem elektrischen Feld durch eine poröse Acrylamidmatrix wandern. Kleinere Proteine wandern schneller durch diese Matrix als größere, wodurch die Proteine so nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Ein zusätzlich aufgetragener Proteinstandard mit bekannten Massen ermöglicht die Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen Proteine. Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, d. h. das Gel wurde unterteilt in ein großporiges Sammel- und ein kleinporiges Trenngel. Am Übergang kommt es aufgrund eines pH-Sprungs zu einer Fokussierung der Proteine (*Stacking Effect*), so dass die Auflösung gesteigert werden kann. Es wurden Trenngele mit einer 10% (w/v) Acrylamid-Stammlösung, sowie Sammelgele mit einer 5% (w/v) Acrylamid-Stammlösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zur Polymerisation wurden unmittelbar vor dem Gießen Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben. Die Proben wurden mit einem Überschuss von SDS (in 1× Lämmli-Puffer mit Bromphenolblau, siehe 2.1.14) auf 100°C erhitzt

und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle denaturiert. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen konnten durch Zugabe der Thiolverbindung, Mercaptoethanol reduziert werden. Dadurch wurde zusätzlich gewährleistet, dass nur die molare Masse des Proteins als Trennkriterium wirkt. Die Elektrophorese erfolgte mit Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA (Sammelgel) bzw. 25 mA (Trenngel) pro Gel. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mittels Immunoblot auf Membranen übertragen und spezifische Proteine mittels Antikörper detektiert.

### 2.4.2 Immunoblot („Western Blot“)

Der Immunoblot bezeichnet den elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran, welche anschließend über Antikörperreaktionen nachgewiesen werden (Towbin *et al.*, 1979). Für diesen Transfer werden Proteine zunächst über eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.4.1). Beim anschließenden „Blotten“ wandern die Proteine im elektrischen Feld auf eine geeignete Membran zu und bleiben, dort angelangt, aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften. Die Anordnung der Proteinbanden im Gel bleibt dabei erhalten und die Identität der Proteine kann mit Hilfe einer Immunodetektion bestimmt werden. Dabei bindet ein antigenspezifischer Primärantikörper an Epitope des gesuchten Proteins. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper, der dann detektiert werden kann. Diese Detektion erfolgte in dieser Arbeit über Chemilumineszenz.

Das Gel wurde in einer „Sandwich“-Apparatur luftblasenfrei angeordnet (Reihenfolge: Lappen → 1 Lage Whatman 3MM-Papier → Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schüll) → Gel → 3MM-Papier → Lappen), wobei alle Schichten in Transferpuffer getränkt wurden. Dieses Sandwich wurde in der mit Transfer-Puffer gefüllten Kammer so ausgerichtet, dass das Gel der Kathode und die Membran der Anode zugewandt waren. Es folgte ein einstündiger Transfer bei 400 mA. Bei Bedarf wurde die Membran anschließend kurz mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um den Proteinmarker einzuzeichnen. Die Entfernung der Ponceau-S-Färbung erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit 1× PBS. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulose mit 5% (w/v) Magermilch in 1× PBS abgesättigt. Nach 5 min wurde der spezifische primäre Antikörper (siehe 2.7) auf die Membran gegeben und auf dem Schüttler über Nacht bei Raumtemperatur oder 4°C inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundener Antikörper wurde die Membran für 15 min gewaschen. Anschließend wurde nach zweiminütigem Blocken in 5% (w/v) Magermilch eine Stunde mit einem se-

kundärem Antikörper (siehe 2.8) inkubiert. Wiederum wurden ungebundene Antikörper durch Waschen für mindestens 1 Stunde mit 1× PBS entfernt.

Der primäre Antikörper bindet an seinem Ziel-Antigen, welches auf einer Membran fixiert ist. An diesen wiederum bindet der mit dem Enzym HRP (*Horse Radish Peroxidase*, also eine Peroxidase aus dem Meerrettich) gekoppelte sekundäre Antikörper. Diese HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol, einem zyklischen Dihydrizid, durch Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einen angeregten Zustand, bei der bei 440 nm Wellenlänge eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Reaktion wurde unter Verwendung der Reagenzien 1 und 2 (1:1) des ECL Westernblotting Detection Kits (Pharmacia) durchgeführt. Die Nitrocellulose-Membran wurde mit dem Gemisch benetzt und eine Minute inkubiert. Die Lichtemission wurde durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. In der Dunkelkammer wurde ein Film (Hyperfilm ECL<sup>®</sup>, Pharmacia) auf die sich zwischen Klarsichtfolien befindende Membran gelegt und je nach Stärke des Signals wenige Sekunden bis Minuten belichtet, entwickelt und fixiert. Durch Überlagerung des Films mit der Membran konnte der Proteinmarker eingezeichnet und die molare Masse nachgewiesener Proteine abgeschätzt werden. Um Proteinmengen, z. B. bei Zellbindungsassays (siehe 2.6.4), zu vergleichen, wurden die entsprechenden Western-Blots eingescannt, die Proteinbanden quantifiziert (siehe 2.9) und die ermittelten Daten zueinander ins Verhältnis gesetzt.

## 2.5 Zellbiologische Methoden

Zur Vermeidung einer Kontamination der Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen erfolgten sämtliche Arbeiten in einer Sterilbank mit sterilen Lösungen und Verbrauchsmaterialien. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (siehe 2.1.10) wurden als Einschicht-Kulturen („*Monolayer*“-Kulturen) in Plastik-Gewebekulturflaschen in einem auf 37°C temperierten Brutschrank bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% kultiviert.

### 2.5.1 Kultivierung von Zellen

Cos-7-Zellen (siehe 2.1.10) wurden in DMEM mit 10% (v/v) FCS und den Antibiotika Penicillin/Streptomycin (1% (v/v)) bzw. Ciprofloxacin (5 µg/ml) kultiviert. Ciprofloxacin wirkt sehr gut gegen Mykoplasmen. Nach dem Auftauen (siehe 2.5.2) wurden die Zellen erstmal für zwei Wochen mit Plasmocin (25 µg/ml) (amaxa, Köln) behandelt, um eine mögliche Infektion mit Mykoplasmen zu beseitigen, danach wurde die Kultivierung der Zellen mit 5 µg/ml Ciprofloxacin fortgesetzt.

293TT-Zellen wurden in DMEM kultiviert, dem 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) L-Glutamin, 1% (v/v) nichtessentielle Aminosäuren und ebenfalls Penicillin/Streptomycin (1% (v/v))

bzw. Ciprofloxacin ( $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt wurde. Einmal in der Woche wurde das Medium zusätzlich mit Hygromycin ( $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Roth) angereichert, dies diente der Selektion von Zellen mit beiden stabil transfizierten T-Antigenen.

Sobald sich eine konfluente Zellschicht gebildet hatte wurden die Zellen abgelöst, um diese entweder weiter zu vermehren, Aliquots für längerfristige Lagerung herzustellen oder aber um für eine Transfektion der Zellen oder Infektionsassays verwendet zu werden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit PBS mit  $2,5\ \text{mM}$  EDTA vom Gefäßboden gelöst, im entsprechenden Medium aufgenommen und abhängig vom jeweiligen Versuchsansatz verdünnt und weiter kultiviert.

#### **293TT-Kulturmedium: DMEM**

10% (v/v) FCS

1% (v/v) L-Glutamin

1% (v/v) nichtessentielle Aminosäuren

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin oder  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  Ciprofloxacin

### **2.5.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

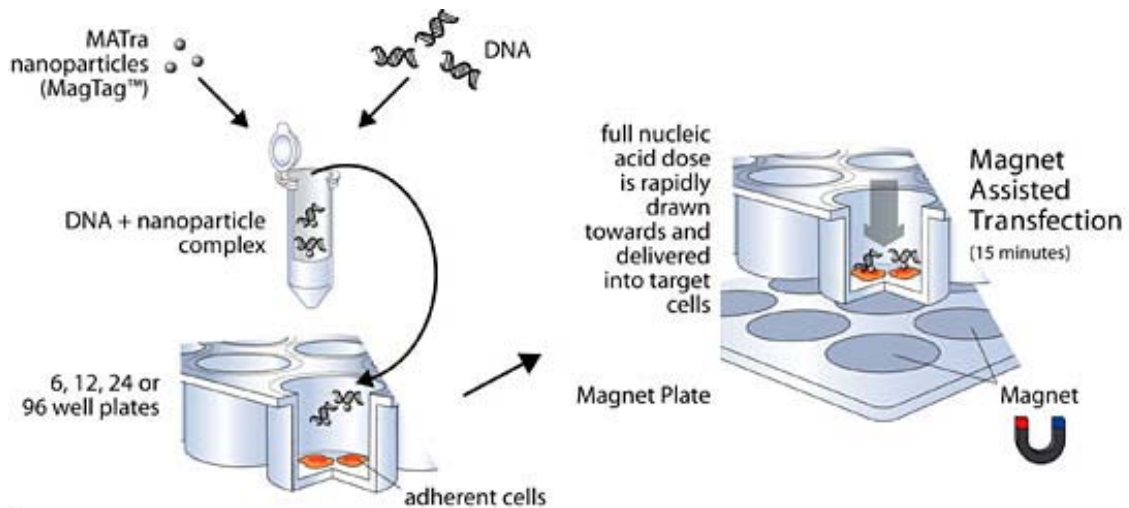
Die Qualität vieler Zelllinien nimmt mit zunehmender Anzahl durchlaufener Passagen ab. Daher wurden von frisch aufgetauten Zelllinien einige Aliquots erneut weggefroren, um den Bestand zu sichern. Die Zellen einer großen Zellkulturflasche ( $175\ \text{cm}^2$ ) wurden mit PBS mit  $2,5\ \text{mM}$  EDTA-Lösung abgelöst und die Zellsuspension in ein konisches Röhrchen ( $50\ \text{ml}$ ) überführt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei  $1200\ \text{rpm}$  wurde das Pellet in  $2\ \text{ml}$  Gefriermedium ( $90\%$  (v/v) FCS mit  $10\%$  (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in zwei Kryoröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Nach einer Woche wurden die Zellen zur längerfristigen Aufbewahrung in einen mit Flüssigstickstoff gekühlten Tank überführt.

Zum Auftauen wurden die Aliquots bei  $37^\circ\text{C}$  erwärmt und in  $9\ \text{ml}$  Kulturmedium (siehe [2.5.1](#)) aufgenommen. Die Zellen wurden für  $3\ \text{min}$  bei  $1200\ \text{rpm}$  zentrifugiert, das entstandene Pellet in  $10\ \text{ml}$  Kulturmedium Medium resuspendiert und mit weiteren  $20\ \text{ml}$  Medium in Kulturgefäße überführt.

### **2.5.3 Transfektion von Zellen**

Transfektion ist das Einbringen fremder DNA in eine eukaryotische Zelle zum Zwecke der Proteinexpression. Die für diese Arbeit vorgenommenen Transfektionen wurden mittels „Magnet-unterstützter Transfektion“ (*Magnet Assisted Transfection*) mit dem MATra-A-Reagenz (IBA) durchgeführt. Das Prinzip dieser Transfektionsmethode ist in Abbildung





**Abbildung 2.2:** Prinzip der „Magnet-unterstützten Transfektion“ (*Magnet Assisted Transfection*, MATra, Abbildung von IBA GmbH).

2.2 dargestellt. 293TT-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in entsprechenden Zellkulturgefäßen ausgesät, so dass sie am nächsten Tag 60–80% konfluent waren. Eine bestimmte Menge Plasmid-DNA, abhängig von der Bodenfläche des Zellkulturgefäßes, wurde in OptiMEM-Medium ohne Zusätze verdünnt und für 15 min bei Raumtemperatur mit MATra-A-Reagenz (Verhältnis  $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l MATra-A}$  1:1) inkubiert. Diese speziellen magnetischen Nanopartikel assoziieren mit der DNA und bilden Komplexe, die dann zu den Zellen, deren Medium zuvor gewechselt worden war, gegeben wurden. Die Platzierung des Zellkulturgefäßes über einer Magnetplatte für 15 min bewirkte das Einschleusen der DNA in die Zellen. Die Zellen wurden danach für die entsprechende Expressionsdauer im Brutschrank inkubiert.

## 2.6 Virologische Methoden

### 2.6.1 Herstellung von HPV16-Pseudovirionen

Pseudovirionen von HPV16 wurden nach Buck *et al.* (2004; 2005) hergestellt, die Methode ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt. Dieses Protokoll ermöglicht die Generierung hoher Titer an Pseudovirionen, also HPV L1L2-Kapside, die ein Markerplasmid verpackt haben. Dafür wurden 293TT-Zellen (siehe 2.1.10) mit den beiden codonoptimierten HPV16 Kapsidgenen L1 und L2 und dem Markerplasmid pEGFP<sub>2</sub> (siehe 2.1.5) kotransfiziert (siehe 2.5.3). Aufgrund stabiler Transfektion exprimieren 293TT-Zellen in hohem Maße das große T-Antigen von SV40 und ermöglichen daher eine sehr gute Replikation von Plasmiden mit dem SV40 *Origin of Replication*, der Bindestelle des großen

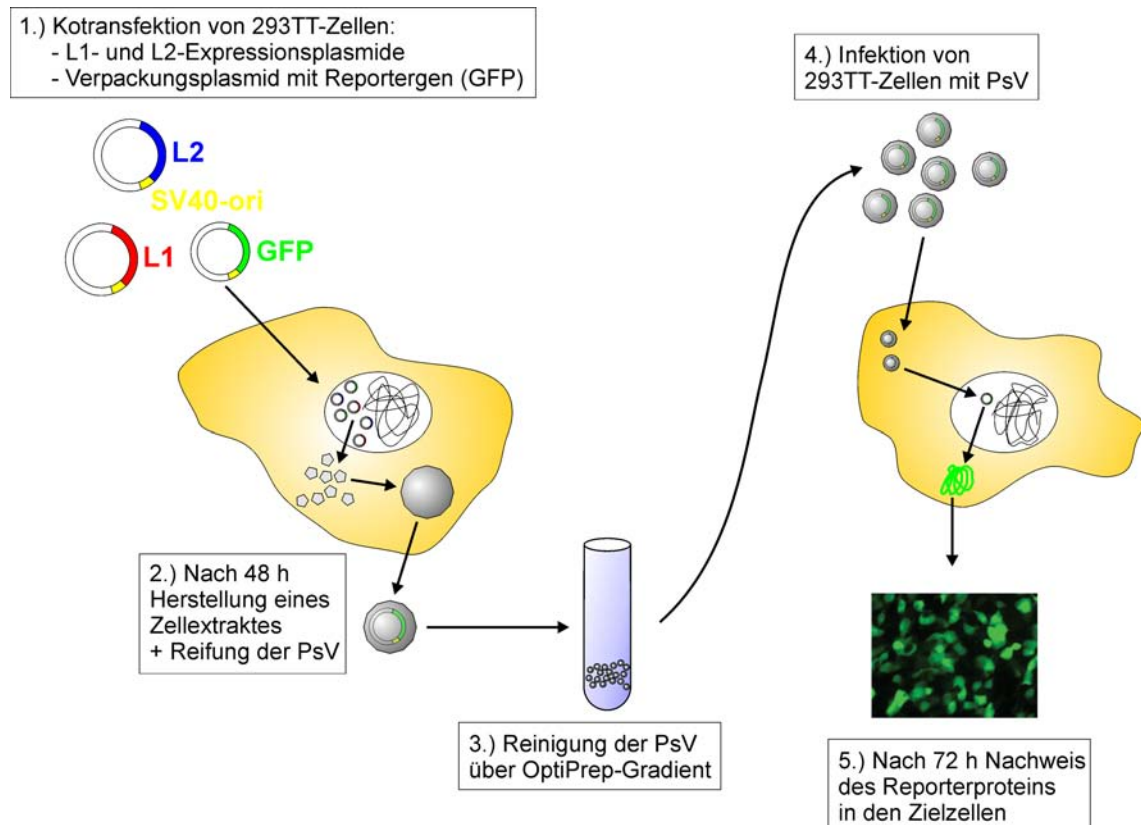
T-Antigens. Die Codonoptimierung von L1 und L2 für humane Zelllinien steigert die Expression noch zusätzlich.

Eine 175 cm<sup>2</sup>-Flasche mit 293TT-Zellen wurde mit insgesamt 36–54 µg DNA (L1, L2 und pEGFP<sub>2</sub>) und der entsprechenden Menge MATra-A transfiziert, die Expression der Proteine erfolgte dann für 48 h. Danach wurde die Effizienz der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft (siehe 2.8.1). Zellen, die erfolgreich das Plasmid pEGFP<sub>2</sub> aufgenommen hatten und das GFP exprimierten, wiesen grüne Kernfluoreszenz auf. Die Zellen wurden abgelöst, mit DPBS mit 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> (siehe 2.1.14) gewaschen, abzentrifugiert, das Zellpellet in 400 µl DPBS mit 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 0,5% (v/v) Brij58 und 344 U Benzonase zugegeben und die Proben für 20–24 h bei 37°C inkubiert. Durch das Detergenz Brij58 werden die Zellmembranen aufgelöst und die Benzonase kann die noch freie, nicht verpackte oder außen an den Kapsiden hängende DNA abbauen. Außerdem kommt es zu einer sogenannten Reifung der Pseudovirionen (Buck *et al.*, 2005), während der sich zwischen L1-Proteinen Disulfidbrücken bilden, die die Kapside stabilisieren und resistent gegen proteolytischen Verdau machen. Nach dieser Reifung wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt, NaCl bis zu einer Endkonzentration von 850 mM zugegeben und nach weiteren 10 min auf Eis für 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Pseudovirionen enthielt, wurde vom Zellpellet getrennt und in ein neues silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt. Dieses Zelllysate wurde sofort auf einen OptiPrep-Gradienten gegeben oder bei 4°C gelagert.

### 2.6.2 Reinigung von HPV16-Pseudovirionen

OptiPrep ist eine 60% (w/v) Iodixanollösung in Wasser, die sich sehr gut zur Herstellung von Stufengradienten und anschließender Ultrazentrifugation eignet. Unter den gewählten Bedingungen wird eine gute Trennung der Pseudovirionen von Zellkomponenten und immerhin eine partielle Trennung von leeren Kapsiden erreicht. Im Gegensatz zu Cäsiumchlorid, das oft für Stufengradienten zur Reinigung viraler Partikel verwendet wird, ist OptiPrep wenig osmotisch und deshalb nicht toxisch für Zellen. Außerdem zerfallen HPV16-Pseudovirionen, die nach Buck *et al.* (2005) hergestellt wurden, in Cäsiumchlorid-Stufengradienten sehr schnell.

Aus der 60%igen OptiPrep-Lösung wurden mit PBS mit 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,8 M NaCl (siehe 2.1.14) Lösungen von 27%, 33% und 39% OptiPrep hergestellt und in SW60-Röhrchen aufgeschichtet (1,2 ml 39% → 1,2 ml 33% → 1,2 ml 27%). Dieser Stufengradienten diffundierten dann noch für 2 h bei RT, um eine bessere Auftrennung zu erzielen.



**Abbildung 2.3:** Herstellung von Pseudovirionen (siehe 2.6.1), Reinigung über OptiPrep-Gradient (siehe 2.6.2) und Infektionsassay (siehe 2.6.3)

Etwa 400–600  $\mu\text{l}$  des geklärten Pseudovirionenlysats wurden auf den Gradienten aufgetragen und 3,5 h im SW60-Rotor bei 48.000 rpm und 16°C zentrifugiert. Die Fraktionierung des Gradienten erfolgte durch vorsichtiges Abpipettieren der Fraktionen von oben her mit umgekehrter Beschriftung, Fraktion 1 war also die unterste Fraktion. Es wurden immer 13 Fraktionen von jeweils ca. 330  $\mu\text{l}$  in silikonisierte Reaktionsgefäßen überführt und von den Fraktionen 3–6, erwartungsgemäß die Fraktionen mit den höchsten Pseudovirionenkonzentrationen, jeweils drei Aliquots gemacht. Bis zu ihrer ersten Verwendung wurden die Fraktionen bei –20°C gelagert, nach dem Auftauen dann bei 4°C. Pseudovirionen in OptiPrep-Fraktionen wurden für Infektionsassays (siehe 2.6.3), Zellbindungsassays (siehe 2.6.4) und ELISAs (siehe 2.6.5, 2.6.6 und 2.6.7) verwendet.

### 2.6.3 Infektionsassay

Zum Testen der Infektiosität der generierten Pseudovirionen wurden in Kulturplatten („24well“) 293TT-Zellen ausgesät ( $2 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in 1 ml Vollmedium). Nach Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  der ersten sechs Fraktionen infiziert. Bei Bedarf wurden auch die restlichen Fraktionen getestet. Nach 72 h

Inkubation bei 37°C wurde die Zahl der Infektionseinheiten unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe 2.8.1) anhand der Zellen mit grüner Kernfluoreszenz manuell ausgezählt. Die Infektiosität der HPV-Pseudovirionen wurde immer unter Berücksichtigung der L1-Menge im Western Blot (siehe 2.4.2) und im nativen ELISA (siehe 2.6.6) ausgewertet. Wildtyp (wt)-Pseudovirionen, die in jeder Präparation von mutanten Pseudovirionen mitgeneriert wurden, dienten immer als Bezugswert, sowohl bei der Infektion, als auch der L1-Normierung. Für weitere Versuche wurden die beiden Fraktionen mit den meisten Infektionseinheiten gepoolt.

### 2.6.4 Zellbindungsassay

Cos-7-Zellen (siehe 2.1.10) wurden bis zur Konfluenz in Kulturplatten („6well“) gezogen und dann mit Pseudovirionen aus OptiPrep-Fraktionen in insgesamt 500 µl DMEM-Medium ohne Zusätze inkubiert. Zellbindung der Pseudovirionen erfolgte auf einem Kippeschüttler für 2 h bei 4°C, was die Aufnahme der Virionen in die Zellen verhindern sollte. Für bestimmte Versuche wurden die Pseudovirionen vor der Zellbindung für 30 min bei Raumtemperatur mit Antikörpern, Antikörper-Fab-Fragmenten (siehe 2.7.2) oder Heparinderivaten (siehe 2.1.2) präinkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Nach der Zellbindung wurden die Zellen mehrmals mit 1× PBS gewaschen, um ungebundene Pseudovirionen zu entfernen, die Zellen abgelöst und abzentrifugiert und das Zellpellet in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und dadurch lysiert. Nach Inkubation bei 100°C für 5 min wurde das Zelllysate auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 2.4.1) und das an der Zelloberfläche gebundene Kapsidprotein L1 über Immunoblot (siehe 2.4.2) nachgewiesen und quantifiziert. Die Normalisierung der gemessenen Werte wurde über Immunoblotanalyse mit L1-spezifischen Antikörpern und ELISA mit konformationellen L1-Antikörpern vorgenommen.

### 2.6.5 Denaturierender ELISA

Um L1-Protein-Verhältnisse von Mutanten und Wt-Pseudovirionen vergleichen zu können, wurden die Proteine vor Kopplung an die unbeschichtete ELISA-Platte („96well“) denaturiert. Diese Denaturierung wurde für 1 h bei Raumtemperatur in einer 1:50 oder 1:100 Verdünnung in 50 mM Natrium-Carbonatpuffer (pH 9,7) und 20 mM DTT durchgeführt. Je 50 µl denaturierte Pseudovirionen in Carbonatpuffer wurden pro Vertiefung in der Feuchtkammer für 1 h bei 37°C an die Platte gekoppelt, Negativkontrolle waren 50 µl 50 mM Natrium-Carbonatpuffer. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,2% (v/v) Tween (PBST) wurde jede Vertiefung mit 350 µl PBST mit 0,02% (v/v) BSA abgesättigt. Dies erfolgte ebenfalls für 1 h bei 37°C. Die Platte wurde erneut dreimal

gewaschen und dann 50  $\mu\text{l}$  des primären Antikörpers, 16L1-312F, 33L1-7 oder K75 (siehe 2.7), in entsprechender Verdünnung in PBST pro Vertiefung zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und dreimaligem Waschen wurden zur Detektion gebundener Antikörper pro Vertiefung 50  $\mu\text{l}$  des sekundären Antikörpers (siehe 2.8), an den Peroxidase gekoppelt ist (siehe 2.4.2), zugegeben (Verdünnung 1:5000 in PBST). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C, dann wurde der Antikörper durch Waschen entfernt und je 50  $\mu\text{l}$  des Peroxidase-Substrats Tetramethylbenzidine (TMB) in jede Vertiefung gegeben. Die Färbereaktion wurde je nach Intensität nach 10–30-minütiger Inkubation bei RT durch jeweils 50  $\mu\text{l}$  1 N HCl abgestoppt. Die Extinktionen jeder einzelnen Vertiefung wurden anschließend im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet und die Werte der Negativkontrolle, in diesem Fall Carbonatpuffer ohne Pseudovirionen, von den anderen gemessenen Werten abgezogen.

### 2.6.6 Nativer ELISA

Im Gegensatz zum denaturierenden ELISA gibt der native ELISA Auskunft über die Menge intakter HPV-Kapside bzw. -Kapsomere. Die Pseudovirionenpräparationen wurden ohne vorherigen Präinkubationsschritt in 1× PBS verdünnt (1:50 bis 1:3200, 50  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) und direkt an die unbeschichtete ELISA-Platte gekoppelt (1 h, 37°C in der Feuchtkammer). PBS wurde zusätzlich als Negativkontrolle verwendet. Die Platte wurde danach dreimal mit PBS mit 0,2% (v/v) Tween (PBST) gewaschen und mit 350  $\mu\text{l}$  PBST mit 0,02% (v/v) BSA pro Vertiefung für 1 h bei 37°C blockiert. Die weiteren Schritte, Zugabe der primären und sekundären Antikörper, sowie Detektion, wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden diesmal natürlich solche verwendet, die konformationelle Epitope erkennen (16L1-56E bzw. 16L1-58C oder K51 bzw. K75 (siehe 2.7)).

### 2.6.7 Heparin- bzw. Heparansulfat-ELISA

Um zu untersuchen, ob die Fähigkeit zur Heparin- bzw. Heparansulfat-Bindung auch noch bei Pseudovirionen mit mutierten L1-Proteinen vorhanden ist, wurden ELISA-Experimente mit Heparin- und Heparansulfat-beschichteten Platten durchgeführt.

ELISA-Platten („96well“) wurden mit 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Heparin (H4784) oder Heparansulfat (H9902) über Nacht bei RT beschichtet (50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ). Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBST gewaschen und freie Bindestellen jeder Vertiefung mit 350  $\mu\text{l}$  PBST mit 2% (w/v) Milch abgesättigt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C in einer Feuchtkammer wurde die Platte erneut dreimal gewaschen. Pseudovirionen wurden in 1× PBS verdünnt (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und mit oder ohne 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Heparin (H4784) für 30 min bei RT

präinkubiert. Als Negativkontrolle diente  $1\times$  PBS. Ein Volumen von  $50\mu\text{l}$  wurde pro well zugegeben, die Bindung der Pseudovirionen erfolgte für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$ . Dann wurden ungebundene Pseudovirionen durch Waschen mit PBST entfernt. Als Primärantikörper wurde das polyklonale Kaninchenserum K75 eingesetzt, das konformationelle Epitope von HPV16 erkennt. Es wurden je  $50\mu\text{l}$ /Vertiefung in den entsprechenden Verdünnungen (siehe 2.7) in PBST zugegeben und die Platte 1 h in einer feuchten Kammer bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden zur Detektion gebundener Antikörper pro Vertiefung  $50\mu\text{l}$  des sekundären Antikörpers pipettiert (Verdünnung 1:2000 in PBST). Nach 30minütiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurde der Antikörper entfernt und  $50\mu\text{l}$  TMB in jede Vertiefung zugegeben. Die Färbereaktion wurde je nach Intensität nach 10–30 min Inkubation bei RT durch jeweils  $50\mu\text{l}$  1 N HCl abgestoppt. Die Extinktionen jeder einzelnen Vertiefung wurden anschließend im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet und die Werte der Negativkontrolle von den anderen gemessenen Werten abgezogen. Die Normalisierung wurde mittels eines nativen ELISAs (siehe 2.6.6), der stets parallel mit denselben Pseudovirionemengen und Antikörperverdünnungen durchgeführt wurde, vorgenommen.

## 2.7 Immunologische Methoden

### 2.7.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Das Prinzip der Herstellung monoklonaler Antikörper geht auf César Milstein und Georges Köhler zurück (Köhler und Milstein, 1975), die dafür im Jahr 1984 den Nobelpreis für Medizin erhalten haben. Die Technik beruht auf der Verschmelzung von Antikörperproduzierenden B-Zellen mit Zellen einer Myelomzelllinie, wodurch hybride Zellen entstehen, die unbegrenzt Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren (Hybridom-Technik).

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen wird zunächst eine Maus mit diesem Antigen immunisiert. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Bildung von B-Lymphozyten, die Antikörper bilden, welche mit dem Antigen reagieren und die sich in der Milz anreichern. Aus der entnommenen Milz werden die B-Lymphozyten isoliert und mit Zellen (Plasmazellen) einer aus einem Myelom (Plasmozytom) gewonnenen Zelllinie fusioniert, es entstehen sogenannte Hybridomzelllinien. Diese Hybridomzellen vereinigen Eigenschaften ihrer Ursprungszellen: vom B-Lymphozyt die Eigenschaft einen bestimmten Antikörper zu produzieren, von der Myelomzelle die Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum im Zellkulturgefäß. Die unsterbliche Zelllinie wird aufbewahrt und der Zellüberstand wird regelmäßig bei Bedarf geerntet. Die Antikörper

heißen monoklonal, weil sie aus einer einzigen Ursprungs-B-Zelle stammen und daher alle identisch sind. Außerdem erkennen sie spezifisch ein Epitop des zuvor eingesetzten Antigens.

Die für die Herstellung der monoklonalen Antikörperüberstände verwendeten Hybridomzellen waren zuvor in der Arbeitsgruppe von Cornelia Sapp hergestellt worden. Die Immunisierung fand mit HPV16 oder -33 Virus-ähnlichen Partikeln statt, so dass sich, teilweise typspezifische, Antikörper gegen einen dieser Typen bildeten (siehe 2.7). Für die Anzucht eingefrorener Hybridomzellen wurde eine Mäusemilz präpariert und mehrfach durch ein Sieb gedrückt, bis eine Einzelzellsuspension entstanden war. Die Milzzellen wurden zweimal in IMDM gewaschen, zwischendurch kurz abzentrifugiert und dann in 50 ml IMDM/10% (v/v) FCS/1% (v/v) Penicillin/Streptomycin/0,02‰ (v/v) IL6/0,1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen. Diese Zellen wurden für einige Tage im Brutschrank inkubiert und dann für die Anzucht der Hybridomzellen verwendet.

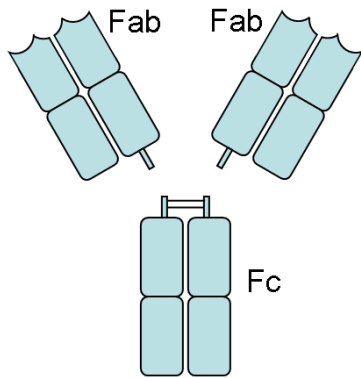
### **Hybridommedium:**

- IMDM
- 10% (v/v) FCS
- 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
- 0,04‰ (v/v) IL6
- 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol
- ca. 5% (v/v) kultivierte Milzzellen

Das Auftauen und Einfrieren der Hybridomzellen wurde wie in Abschnitt 2.5.2 vorgenommen. Da die Zellen je nach Klon unterschiedlich Adhärenz aufwiesen, wurden sie, falls erforderlich, zum Passagieren aus dem Überstand für 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und die adherenten Zellen in der Kulturflasche mit PBS/2,5 mM EDTA abgelöst, dann die Zellen vereinigt und nach Bedarf auf mehrere Zellkulturflaschen aufgeteilt. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden die Zellkulturüberstände mit den monoklonalen Antikörpern gesammelt, zur Konservierung mit 0,02% (w/v) Natrium-Azid versetzt und in Versuchen verwendet.

### **2.7.2 Herstellung von Fab-Fragmenten**

Die Protease Papain spaltet Antikörper oberhalb der Disulfidbrücken beider schwerer Ketten. Man erhält zwei Fab-Fragmente und ein vollständiges Fragment Fc (siehe Abbildung 2.4). Von den Zellkulturüberständen mit monoklonalen Antikörpern wurden 50  $\mu$ l mit 10 mM Cystein, 0,02 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1  $\mu$ g/ml Papain bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde einem identischen Ansatz statt Papain dasselbe Volumen 1× PBS



**Abbildung 2.4:** Mit Papain verdauter Antikörper (zwei 50 kDa Fab-Fragmente und ein 50 kDa Fc-Fragment).

zugegeben. Die Zugabe von 1,8 mM Iodacetamid nach 90 min stoppte den Papain-Verdau ab, die Ansätze wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und in Zellbindungsassays eingesetzt.

## 2.8 Mikroskopische Methoden

### 2.8.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Infektionsassays (siehe 2.6.3), d.h. die Expression von GFP, wurde am Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt. GFP hat den Vorteil, dass kein indirekter Nachweis über Antikörper benötigt wird, da es eine direkt sichtbare Fluoreszenz mit einer Emission bei 508 nm zeigt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Zellen mit grünfluoreszierendem Kern bei 20facher Vergrößerung. Für die Dokumentation und Bildverarbeitung wurde die hochempfindliche schwarz/weiß-CCD-Kamera AxioCam der Fa. Zeiss unter Zuhilfenahme der Axiovision 4.4 Software verwendet.

### 2.8.2 Reinigung der Pseudovirionen für Elektronenmikroskopie

Da Iodixanol in den OptiPrep-Fractionen unter dem Elektronenmikroskop als Verunreinigung störte, wurden die Proben zuvor über Sephadex G-50 Quick Spin Columns (Roche) gereinigt. Die Sepharosesäulchen wurden für 1 min bei  $2000 \times g$  leer zentrifugiert, um überschüssigen Puffer zu beseitigen, der die Proben verdünnt hätte. Dann wurden  $25 \mu\text{l}$  der OptiPrep-Fraktion auf die Säule aufgetragen, erneut für 1 min bei  $2000 \times g$  zentrifugiert und der Durchfluss mit den gereinigten Pseudovirionen für die Elektronenmikroskopie verwendet.

### 2.8.3 Elektronenmikroskopie mit Negativ-Kontrastierung

Von den zuvor gereinigten Pseudovirionen wurden  $5 \mu\text{l}$  auf kohlebeschichtete Kupfernetzchen aufgebracht, dreimal mit Wasser gewaschen und für die Negativ-Kontrastierung mit



2% (v/v) Phosphowolframsäure behandelt. Phosphowolfram ist ein Schwermetall, das sich an die Proteine anlagert, sie leitfähig und somit im Elektronenmikroskop sichtbar macht. Deshalb wird diese Methode auch als Negativ-Kontrastierungsverfahren bezeichnet, da eigentlich nicht das Protein, sondern das Schwermetall zu sehen ist. Die Aufnahmen erfolgten an einem ZEISS EM900 Transmissionselektronenmikroskop oder einem Philips Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop bei 50.000facher Vergrößerung. Die Arbeiten wurden unter Anleitung von W. Gebauer im Labor von Prof. J. Markl durchgeführt. Abzüge wurden auf Agfa-Fotopapier mit einer Vergrößerung von 1:2,5 gemacht und danach eingescannt. Die Aufnahmen des Philips Tecnai 12 Transmissionselektronenmikroskop lagen bereits in digitaler Form vor. Die Bilder wurden mit den Programmen Image Analyzer und Photoshop CS2 bearbeitet und hinsichtlich Tonwert und Kontrast korrigiert.

## **2.9 Elektronische Datenverarbeitung**

Die durch die oben aufgelisteten Methoden gewonnenen Daten mussten entsprechend am Rechner aufgearbeitet werden. Die mit Immunoblot und Elektronenmikroskopie erhaltenen Bilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS2 bearbeitet und hinsichtlich Tonwert und Kontrast korrigiert. Die Veränderungen am Bildmaterial wurden jedoch bei allen Bildern, auch den Negativkontrollen, im selben Maßstab ausgeführt und dienten nur einer verbesserten drucktechnischen Darstellung. Arrangiert wurden die Bilder mit Corel Draw (Version 11, Corel). Quantifizierung von Western Blot-Banden wurde mittels des Programms ImageJ (Version 1.29, National Institutes of Health, Bethesda, USA) durchgeführt. Die statistische Absicherung der Infektionsdaten erfolgte mit WinSTAT (Version 2003.1; R. Fitch Software). Sequenzen aus den Datenbanken bzw. aus der Sequenzierung der Plasmid-DNA wurden mit einer Vielzahl von Programmen bearbeitet, die im Folgenden aufgelistet sind.

**Tabelle 2.9:** Verwendete EDV-Programme.

Programm [Version]	Quelle	Verwendung
Blast 2 Sequences	National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA; <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi</a>	Alignment zweier DNA-Sequenzen
Chromas [1.45]	Conor McCarthy, Fa. Technelysium, AU; <a href="http://www.technelysium.com.au">http://www.technelysium.com.au</a>	Auswertung von Chromatogrammen
ClustalW [1.83]	European Bioinformatics Institute (EBI), GB; <a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a>	Alignment von Sequenzen und Erstellung von Phylogrammen
Rasmol [2.7.2.1]	Bernstein + Sons, Information Systems Consultants <a href="http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/">http://www.bernstein-plus-sons.com/software/rasmol/</a>	Grafikprogramm zur Betrachtung molekularer Strukturen
TreeView [1.66]	Roderic Page, University of Glasgow, GB; <a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview</a>	Darstellung von Phylogrammen
Image Analyzer [1.20]	Meesoft, Dänemark <a href="http://meesoft.logicnet.dk/Analyzer/">http://meesoft.logicnet.dk/Analyzer/</a>	Bildbearbeitung und Dekonvolution

*Ergründe, wie die Dinge selber sind,  
indem du sie zerlegst in Stoff, Ursache, Zweck.*

Marc Aurel

# 3

## Ergebnisse

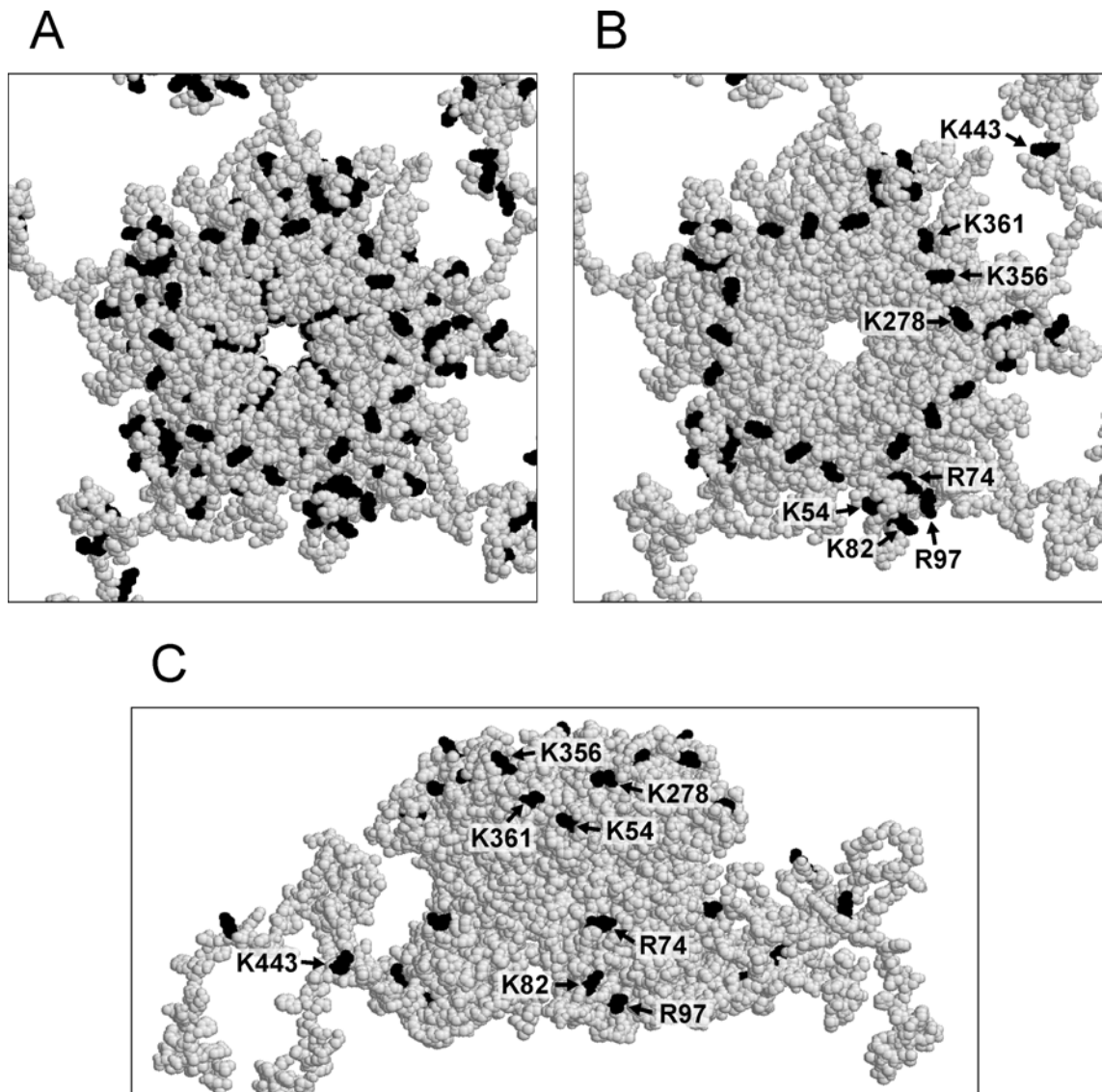
Mit der vorliegenden Arbeit soll, durch die Charakterisierung der Bindestelle von HPV16 an Heparansulfatproteoglykane der Zelloberfläche, ein Beitrag zur Klärung der ersten Schritte der Infektion mit diesen karzinogenen Viren geleistet werden. Zur Realisierung dessen wurden umfassende molekularbiologische, biochemische und virologische Methoden, sowie fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Verfahren eingesetzt. Auf den folgenden Seiten werden nun die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

### **3.1 Identifizierung basischer Aminosäuren auf der Oberfläche von HPV16**

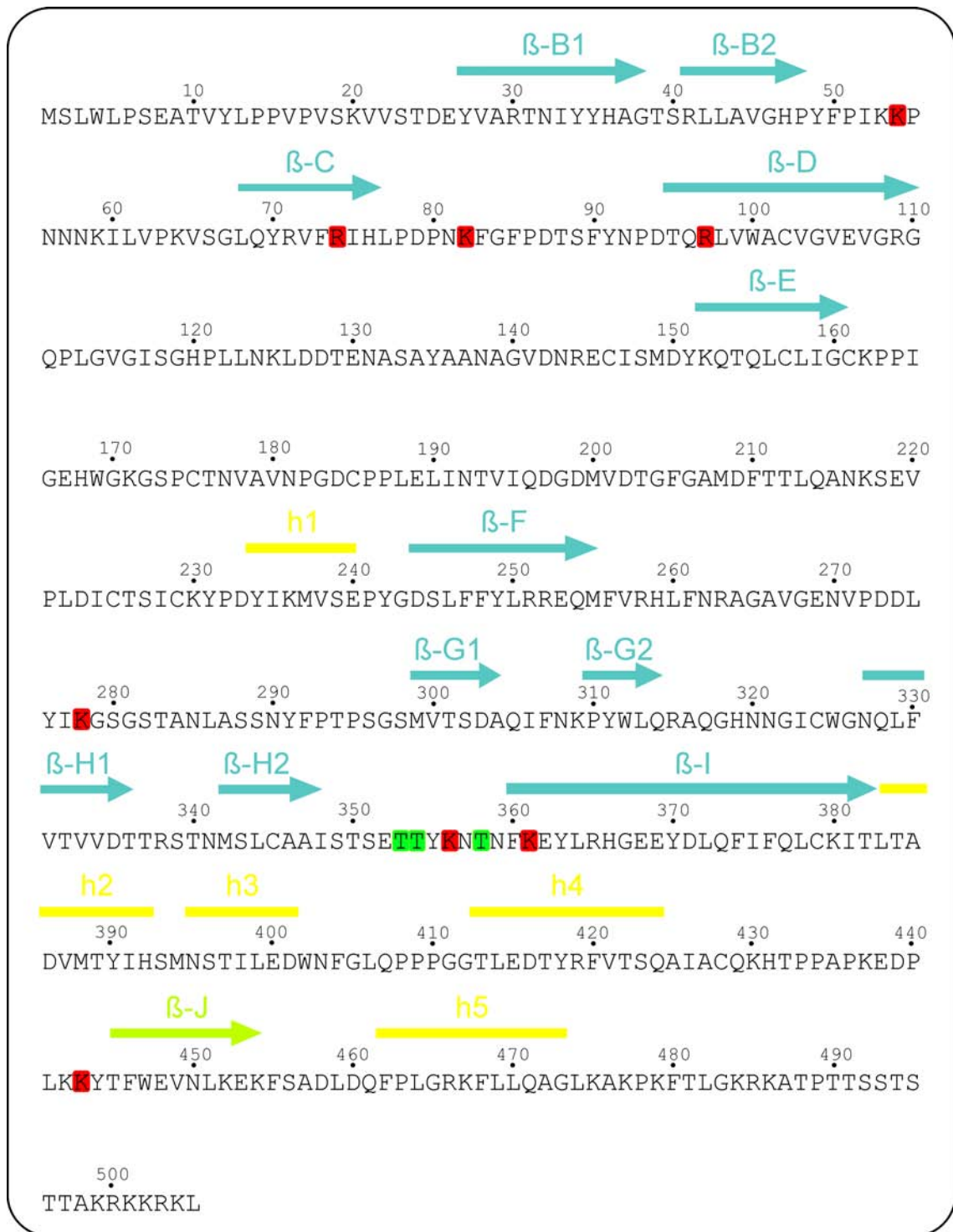
#### **3.1.1 Allgemein**

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass Partikel von HPV, die nur aus dem majoren Kapsidprotein L1 bestehen, die Fähigkeit haben, an Heparansulfate zu binden (Joyce *et al.*, 1999). Auch in Virionen, die aus beiden Kapsidproteinen bestehen, ist nur L1 an der primären Interaktion mit der Zelle beteiligt. N-terminale Sequenzen von L2, denen zellbindende Eigenschaften zugeordnet wurden (Kawana *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003), sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht an der Oberfläche zugänglich (Selinka und Sapp, 2003). Da für die Bindung an Heparin eine intakte äußere Virusoberfläche notwendig ist (Rommel *et al.*, 2005), kann das Cluster basischer Aminosäuren, das normalerweise eine HS-Bindestelle kennzeichnet und elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Sulfatgruppen der HS eingeht, nicht linear, sondern muss konformativer Natur sein. Zur Identifizierung dieser Bindestelle wurde daher nach basischen, also positiv geladenen, Aminosäuren auf der Oberfläche der aus L1-Pentameren gebildeten Kapsomere

gesucht, die diese elektrostatischen Interaktionen vermitteln könnten. Zu diesem Zweck wurde eine eingehende Analyse der basischen Aminosäuren auf der Kapsomeroberfläche von HPV16 mit Hilfe des Programms „RasMol“ und der Kristallstruktur von HPV16 L1-Partikeln (Chen *et al.*, 2000) durchgeführt. Diese ist in Abbildung 1.1 dargestellt, die L1-Aminosäuresequenz von HPV16 mit den von Chen *et al.* (2000) identifizierten Sekundärstrukturen in Abbildung 1.2.



**Abbildung 3.1:** Struktur des pentameren Kapsomers von HPV16. (A) Aufsicht auf das Kapsomer. Schwarz dargestellt sind alle vorkommenden basischen Aminosäuren. (B) Schwarz gekennzeichnet sind alle basischen Aminosäuren, die für eine Mutationsanalyse ausgewählt wurden. Die Buchstaben und Zahlen bezeichnen die entsprechenden Aminosäuren nach IUPAC-Nomenklatur (IUPAC-IUB, 1968) und deren Positionen in der L1-Proteinsequenz. (C) Seitenansicht des Kapsomers mit den in dieser Arbeit untersuchten basischen Aminosäuren.



**Abbildung 3.2:** Aminosäuresequenz des Kapsidproteins L1 von HPV16 (Seedorf et al., 1985). Lage der für die Mutationsanalyse ausgewählten Aminosäuren: die in dieser Arbeit mutierten basischen Aminosäuren sind rot unterlegt, die Threonine grün. Die Sekundärstrukturen wurden von der HPV16-Kristallstruktur abgeleitet (Chen *et al.*, 2000), die Farben entsprechen den im Strukturmodell in Abbildung 1.4 verwendeten ( $\alpha$ -Helices gelb;  $\beta$ -Faltblätter blau,  $\beta$ -J hellgrün).

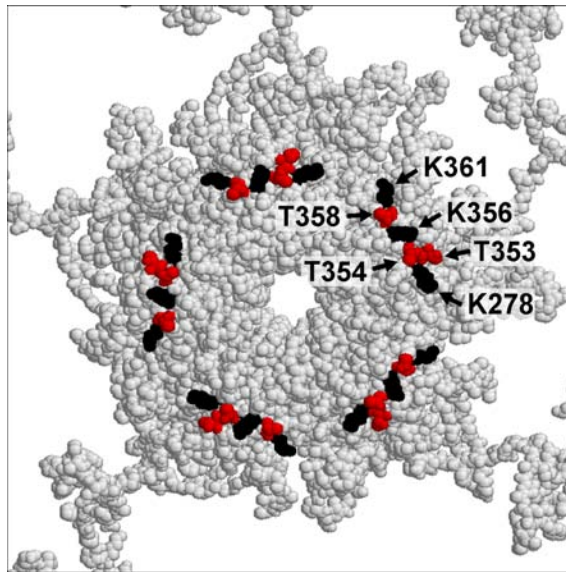
Eine in Kollaboration durchgeführte, vorangegangene Analyse des elektrostatischen Potentials der Kapsomeroberfläche von HPV16 (zur Verfügung gestellt von W. von der Lieth, DKFZ, Heidelberg) offenbarte bereits die Präsenz 15 stark positiver Aminosäuren auf dem Plateau des Kapsomers. Diese konnten als drei Lysine identifiziert werden, K278, K356 und K361, die von jedem der fünf L1-Moleküle zur Verfügung gestellt werden (siehe Abbildung 3.1 B). Aufgrund der pentameren Symmetrie des Kapsomers sind sie kreisförmig angeordnet und bilden einen Ring basischer Aminosäuren und somit positiver Ladungen auf der Spitze des Kapsomers. Wie in Abbildung 3.1 C erkennbar ist, befinden sie sich innerhalb einer flachen Grube auf der Oberfläche. Diese erstreckt sich von Lysin K356, das am weitesten exponiert liegt, über Lysin K361, das am tiefsten in der Grube liegt, zu Lysin K278, das von einem anderen L1-Molekül als die beiden zuvor genannten beigesteuert wird.

Wie aus Abbildung 3.1 A ersichtlich, ist die Anzahl oberflächenexponierter Aminosäuren auf dem Kapsomerplateau begrenzt, obwohl das L1-Protein generell natürlich eine höhere Anzahl basischer Aminosäuren enthält (siehe Abbildung 3.2). Außer den drei bereits genannten Lysinen befinden sich nur noch zwei weitere Lysine in dieser gut zugänglichen Region, K53 und K54. Sie liegen jedoch weniger prominent angeordnet am äußersten Rand, zusammen mit einem weiteren Lysin, K59, das aber bereits in der Spalte zwischen den Kapsomeren lokalisiert ist. Dort finden sich weitere Lysine und Arginine, die im Folgenden beschrieben werden. K443, das im C-terminalen Arm des L1-Proteins liegt, ist nach dem sogenannten „Invading-Arm“-Model von Modis *et al.* (2002) etwa auf halbem Weg zwischen dem Grund der Grube und der Kapsomerspitze lokalisiert. K82 und R74 befinden sich noch tiefer in diesem Canyon und R97 ist an der tiefsten Stelle des Spaltes zwischen den Kapsomeren positioniert. Insgesamt acht Lysine und Arginine wurden aufgrund ihrer Lage für eine Mutationsanalyse ausgewählt (siehe Abbildung 3.1 B und C): K54, R74, K82, R97, K278, K356, K361 und K443.

Eine sehr prominente Position nehmen weiterhin drei Threonine, T353, T354 und T358, auf der Kapsomeroberfläche ein (siehe Abbildung 3.3). Sie befinden sich genau zwischen den drei Lysinen K278, K356 und K361. Da bekannte Heparinbindestellen neben basischen oft auch polare Aminosäuren enthalten, die die Bindung an Heparin durch Bildung von Wasserstoffbrücken unterstützen bzw. stabilisieren können (Hileman *et al.*, 1998), wurden diese drei Threonine ebenfalls für eine Mutationsanalyse ausgewählt.

#### 3.1.2 Phylogenetischer Vergleich

Mittels eines phylogenetischen Vergleichs der L1-Aminosäuresequenzen von HPV16 und verschiedenen anderen HPV-Typen sollte überprüft werden, ob die ausgewählten Amino-



**Abbildung 3.3:** Basische Aminosäuren und Threonine auf dem Kapsomerplateau von HPV16. Aufsicht auf das Kapsomer von HPV16 mit den drei Lysinen (schwarz) und den drei dazwischen liegenden Threoninen (rot) auf dem Plateau des Kapsomers.

säuren konserviert sind. Zu diesem Zweck wurden Alignments durchgeführt (Alignment der HPV-Spezies 9-Typen siehe Abbildung 3.4). Der Vergleich mit HPV-Typen derselben Spezies zeigte, dass die Arginine an Position 74 und 97, sowie die Lysine an den Positionen 82, 356 und 361 in allen sieben Typen der Spezies 9 (de Villiers *et al.*, 2004), der auch HPV16 angehört, homolog vorkommen, also zu 100% konserviert sind. Das Lysin an Position 278 weist 85% Konservierung auf, die Lysine an Position 443 und 54 jedoch nur 57% bzw. 43%. Ein Alignment mit HPV16 und 48 anderen HPV-Typen der Gattung der Alpha-Papillomviren offenbarte die homologe Präsenz des Lysins an Position 82 und des Arginins an Position 97 in jedem dieser Typen, Lysin K361 kommt in 96% dieser Typen vor. In 61% ist an Position 54 eine basische Aminosäure vorhanden, an Position 74 trifft dies auf 94% der Alpha-PV-Typen zu, an Position 278 auf 90%. Nur 35% dieser Typen tragen an Position 356 eine basische Aminosäure und 59% an Position 443.

Die drei Threonine an den Positionen 353, 354 und 358 weisen sehr unterschiedliche Konservierung auf. An Position 354 kommt in allen Spezies 9-Typen ein Threonin vor (100% Konservierung), an Position 353 nur in 29% der Fälle, in 43% der Typen liegt an dieser Stelle jedoch ein Serin. Das Threonin an Position 358 findet sich ausschließlich in HPV16. In der Gattung der Alpha-Papillomviren befinden sich an Position 353 bei insgesamt 29% der HPV-Typen Threonine und bei 27% der Typen Serine, an Position 354 finden sich bei 59% Threonine und nur bei 2% ein Serin und an Position 358 tragen 31% der Typen ein Threonin und 41% ein Serin.

CLUSTAL X (1.8) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT  
File: \netapp2\knappe\Sequenzen\Alignments\1-SequenzenSpecies9.ps Date: Thu Oct 27 11:33:33 2005  
Page 1 of 1

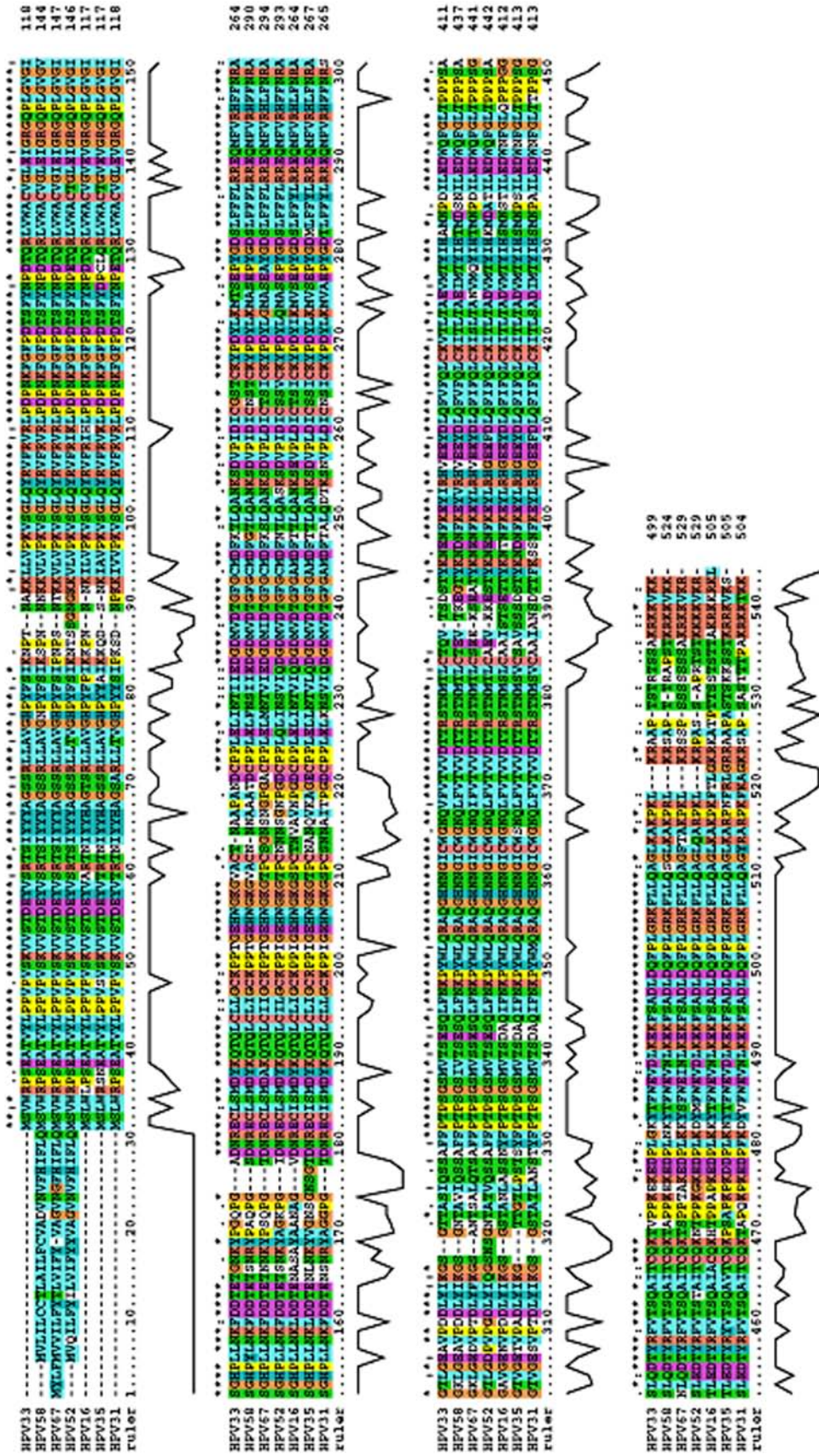


Abbildung 3.4: L1-Sequenzvergleich von HPV16, -31, -33, -35, -52, -58 und -67. Das Alignment der Spezies 9-Typen (de Villiers *et al.*, 2004) wurde mit dem Programm Clustal X erzeugt. Die Aminosäuresequenzen stammen aus der Genbank des NCBI.



Der phylogenetische Vergleich zeigte, dass besonders die Aminosäuren K82, R97 und K361 in der Gattung der Alpha-Papillomviren hoch konserviert sind (>90% Homologie). Dasselbe trifft zu für die basischen Ladungen an den Positionen 74 und 278. Dies weist auf eine besondere Bedeutung dieser Aminosäuren hin.

## **3.2 Herstellung und Analyse von HPV16-Pseudovirionen mit mutanten L1-Proteinen**

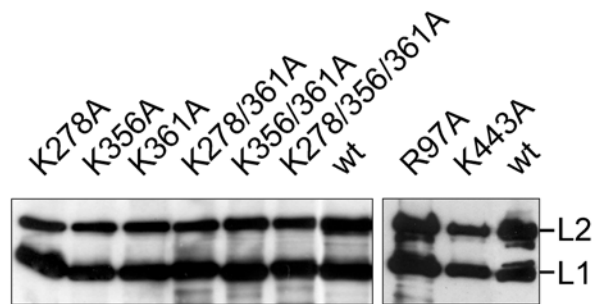
Zur Identifizierung und Charakterisierung der Heparansulfatbindestelle von HPV16 wurden verschiedene oberflächenexponierte Aminosäuren des Kapsidproteins L1 ausgetauscht. Diese L1-Mutanten wurden zur Herstellung von Pseudovirionen zusammen mit Wildtyp (wt) -L2 und einem Reporterplasmid in eukaryotischen Zellen exprimiert. Um anschließend zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Mutationen im HPV16 L1-Protein Auswirkungen auf die Proteinexpression, den Einbau von L2 in das Kapsid und den richtige Zusammenbau des Kapsids hatten, wurden diesbezüglich entsprechende Kontrollen durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden gezeigt werden.

### **3.2.1 Durch Mutagenese generierte HPV16 L1-Mutanten**

Um die Rolle positiv geladener Aminosäuren bei der Zellbindung und Infektion von HPV16 untersuchen zu können, wurden Lysine und Arginine des L1-Proteins durch Alanine bzw. Arginine ausgetauscht. Weiterhin sollte die Funktion der drei Threonine auf der Spitze des Kapsomers überprüft werden. Diese drei Aminosäuren wurden ebenfalls durch Alanine ersetzt. In Tabelle 3.1 sind alle hergestellten Konstrukte zusammengefasst und beschrieben. Zur Lage der Aminosäuren in der L1-Aminosäuresequenz siehe Abbildung 3.2, ihre Positionierung im Kapsomer ist in Abbildung 3.1 B und C und Abbildung 3.3 dargestellt. Diese durch Basenaustausche hergestellten L1-Konstrukte wurden dann, mittels Koexpression mit wt-HPV16 L2 und pEGFP<sub>2</sub>-NLS, zur Herstellung mutanter Pseudovirionen verwendet.

**Tabelle 3.1:** Durch Basenaustausch hergestellte HPV16 L1-Mutanten. Linke Spalte: Name der Mutante; Mittlere Spalte: Art der Mutante; Rechte Spalte: ursprüngliche Aminosäure, deren Position in der L1-Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 3.2) und die ausgetauschte Aminosäure.

Bezeichnung	Art der Mutante	Beschreibung
K54A	Einzelmutante	Lysin an Position 54 durch Alanin ersetzt
R74A	Einzelmutante	Arginin an Position 74 durch Alanin ersetzt
K82A	Einzelmutante	Lysin an Position 82 durch Alanin ersetzt
R97A	Einzelmutante	Arginin an Position 97 durch Alanin ersetzt
K278A	Einzelmutante	Lysin an Position 278 durch Alanin ersetzt
K356A	Einzelmutante	Lysin an Position 356 durch Alanin ersetzt
K361A	Einzelmutante	Lysin an Position 361 durch Alanin ersetzt
K278/361A	Doppelmutante	Lysine an Positionen 278 und 361 durch Alanine ersetzt
K355/361A	Doppelmutante	Lysine an Positionen 356 und 361 durch Alanine ersetzt
K278/356/361A	Trippelmutante	Lysine an Positionen 278, 356 und 361 durch Alanine ersetzt
K443A	Einzelmutante	Lysin an Position 443 durch Alanin ersetzt
K278R	Einzelmutante	Lysin an Position 278 durch Arginin ersetzt
K278/356R	Doppelmutante	Lysine an Positionen 278 und 356 durch Arginine ersetzt
K278/356/361R	Trippelmutante	Lysine an Positionen 278, 356 und 361 durch Arginine ersetzt
T353A	Einzelmutante	Threonin an Position 353 durch Alanin ersetzt
T353/354A	Doppelmutante	Threonine an Position 353 und 354 durch Alanine ersetzt
T353/354/358A	Trippelmutante	Threonine an Position 353, 354 und 358 durch Alanine ersetzt



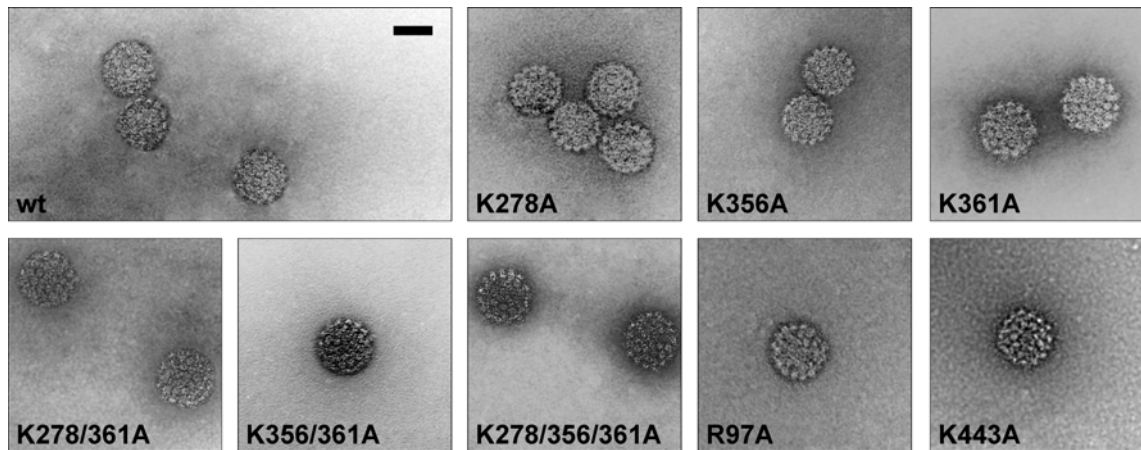
**Abbildung 3.5:** Immunoblotanalyse von Wildtyp (wt)- und mutanten HPV16-Pseudovirionen. Gleiche Volumina von Pseudoviruspräparationen, die zuvor über OptiPrep-Gradienten gereinigt worden waren, wurden auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und die Kapsidproteine L1 und L2 mit spezifischen monoklonalen Antikörpern detektiert (L1: 16L1-312F; L2: 33L2-1). Aufgrund der Komigration von L1 und L2 in denselben Fraktionen kann man schließen, dass L2-Proteine in die Kapside mit eingebaut wurden. Außerdem enthielten alle mutanten und wt-Pseudovirionen L1 und L2 in vergleichbaren Mengen.

### 3.2.2 Überprüfung der mutanten Pseudovirionen

Nachdem Plasmide mit mutierten bzw. wt-L1-Genen zusammen mit Plasmiden mit dem wt-L2-Gen und dem GFP-Reporterplasmid in 293TT-Zellen exprimiert worden waren, wurden die viralen Partikel, die sich unter diesen Bedingungen normalerweise von selbst zusammenlagern, aus den Zellen extrahiert, über einen OptiPrep-Gradienten aufgereinigt und die Fraktionen mittels Immunoblot auf die Anwesenheit von L1 und L2 überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die L1-Mutanten K54A, R74A und K82A keine intakten Partikel bildeten. In den OptiPrep-Fraktionen, die normalerweise Pseudovirionen enthalten, fanden sich keine Kapsidproteine, obwohl sowohl L1 als auch L2 nach der Transfektion exprimiert worden waren.

Wie in Abbildung 3.5 zu erkennen ist, bildeten alle übrigen L1-Mutanten Pseudovirionen. Beide Kapsidproteine wurden bei den Mutanten und dem L1-wt im vergleichbaren Maße exprimiert, auch wenn leichte Schwankungen in der Ausbeute der Pseudovirionen auftraten. Diese wurden später bei den entsprechenden Versuchen durch die Normierung berücksichtigt. Die Komigration von L2 zusammen mit L1 in denselben OptiPrep-Fraktionen zeigte, dass L2 in die Kapside mit eingebaut wurde. Auch die Menge der eingebauten L2-Proteine entsprach der des Wildtyps.

Zusätzlich zu der Immunoblotanalyse wurde mittels ELISA das Vorhandensein konformationeller Antikörperepitope auf der Oberfläche der Kapsomere überprüft und so die Bildung intakter Partikel ebenfalls nachgewiesen. Die drei OptiPrep-Fraktionen jeder Mutante bzw. des Wildtyps mit dem höchsten Proteingehalt und den meisten Infektions-



**Abbildung 3.6:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp (wt)- und mutanten HPV16-Pseudovirionen. Die Proben wurden über einen OptiPrep-Gradienten gereinigt und dann mittels Negativkontrastierung bei 50.000facher Vergrößerung mit einem Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Die Abbildungen zeigen HPV16-Partikel aus wt- bzw. mutanten L1-Proteinen, die wt-L2 ins Kapsid integriert haben. Die Partikel haben alle dieselbe Größe und die charakteristischen Merkmale des HPV16-Kapsids. Der Größenbalken entspricht 50 nm.

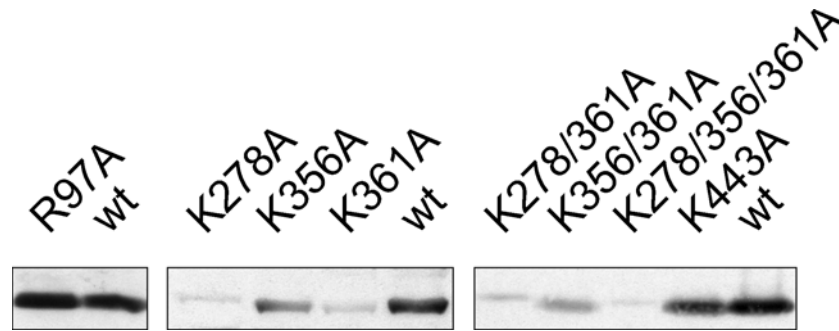
einheiten wurden gepoolt und alle folgenden Versuche wurden mit diesem Pseudovirionen-Pool durchgeführt.

Die Frage, ob mutante L1-Proteine zusammen mit wt-L2 intakte HPV-Partikel bilden, wurde weiterhin mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen analysiert. Auch mit dieser Methode konnten bei den Mutanten K54A, R74A und K82A keinerlei virale Partikel gefunden werden. Aufgrund der Ergebnisse der Immunoblotanalysen und dem Fehlen von Pseudovirionen unter dem Elektronenmikroskop, konnten diese L1-Mutanten nicht für weitere Analysen verwendet werden. Alle anderen L1-Proteine, die entweder Einzel-, Doppel- oder Trippelmutationen enthielten, bildeten zusammen mit wt-L2 Pseudovirionen, die sowohl in ihrer Größe als auch ihrer Topologie dem ikosaedrischen Kapsid der HPV16-wt-Partikel entsprechen (siehe Abbildung 3.6).

### 3.3 Analyse der Lysine auf der Spitze des Kapsomers

#### 3.3.1 Mutation der Lysine zu Alaninen

Wie in Abbildung 3.1 deutlich wird, nehmen die Lysine an den Positionen 278, 356 und 361 eine besonders prominente Stellung ein. Durch ihre ringförmige Anordnung und ihre räumliche Nähe bilden sie ein Cluster basischer AS und somit hoher positiver Ladungsdichte auf dem Plateau des Kapsomers von HPV16. Außerdem sind es beinahe die einzigen basischen Aminosäuren, die so gut zugänglich auf der Spitze des Kapsomers liegen, was



**Abbildung 3.7:** Zellbindung mutanter HPV16-Pseudovirionen am Beispiel repräsentativer Immunoblots. Cos-7-Zellen wurden für 2 h bei 4°C mit wt- und mutanten Pseudovirionen inkubiert, das Zelllysate auf einem SDS-Gel aufgetrennt und der Immunoblot mit dem L1-spezifischen Antikörper H16L1-312F detektiert. Auf die unterschiedlichen Mutanten wird in den entsprechenden Kapiteln eingegangen.

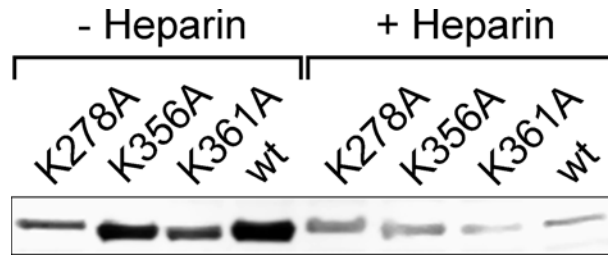
sie zusätzlich zu idealen Kandidaten für eine Heparansulfatbindestelle macht. Der hohe Konservierungsstatus der Lysine K278 und K361 (siehe Abschnitt 3.1.2) spricht zudem für die besondere Wichtigkeit dieser Aminosäuren. Ein weiteres Lysin auf der Spitze des Kapsomers, K54, wurde ebenfalls für eine Mutagenese ausgewählt. Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde, führte die entsprechende Mutation jedoch nicht zur Bildung von HPV16-Partikeln und konnte deshalb nicht weiter untersucht werden.

Nachdem die Intaktheit von HPV16-Partikeln mit Mutationen der Lysine K278, K356 und K361 nachgewiesen werden konnte, sollte deren Fähigkeit zur Zellbindung überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Cos-7-Zellen mit Pseudovirionen inkubiert, die Zelllysate auf SDS-Gelen aufgetrennt und dann über Immunoblotanalyse mit L1-spezifischen Antikörpern die Menge der gebundenen Viren quantifiziert.

Charakteristische Zellbindungsassays der in dieser Arbeit analysierten Lysin- und Arginin-zu-Alanin-Mutanten sind in Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 dargestellt, die Quantifizierung verschiedener Zellbindungsassays in Abbildung 3.9.

Die stärkste Zellbindung wurde mit wt-Pseudovirionen beobachtet (Abbildung 3.7). Die Mutation der drei Lysine auf der Spitze des Kapsomers zu Alaninen hatte eine drastisch reduzierte Zellbindung zur Folge (Abbildung 3.7 Mitte). Von den drei Einzelmutanten war die Bindung von K356A am wenigsten beeinträchtigt, K361A hingegen band am schwächsten an Zellen. Die Mutation von zwei (K278/361A, K356/361A) oder allen drei Lysinen (K278/356/361A) gleichzeitig reduzierte die Zellbindung zusätzlich, die Trippelmutante zeigte dabei die stärkste Inhibition (Abbildung 3.7 rechts).

Die Präinkubation der Pseudovirionen mit Heparin bewirkte eine starke Verminderung der Zellbindung aller Mutanten und des Wildtyps, exemplarisch dargestellt in Abbildung 3.8. Dies ist zu erwarten für eine Interaktion der Viren mit Heparansulfatproteoglykanen der Zelloberfläche, da deren Bindestellen auf der Kapsomeroberfläche durch das zugege-

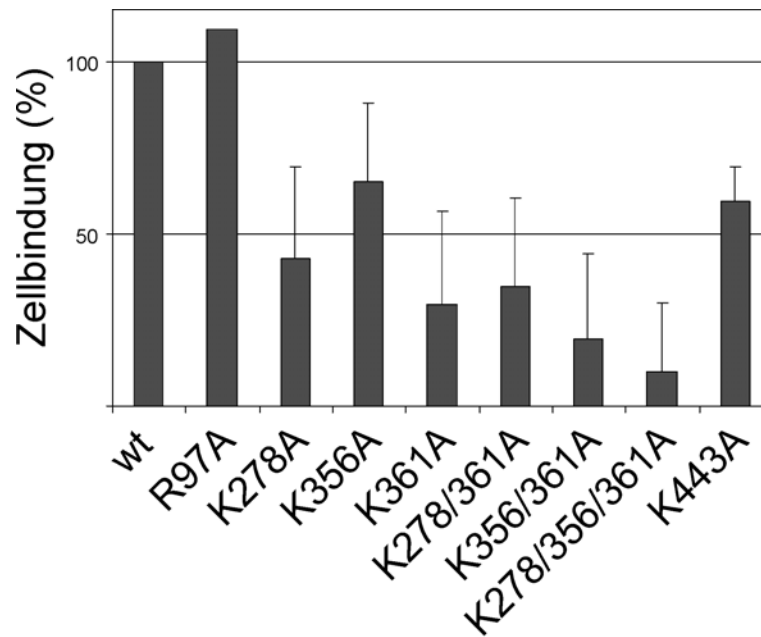


**Abbildung 3.8:** Einfluss von Heparin auf die Zellbindung mutanter und wt-Pseudovirionen. Zellbindung der Lysin-Einzelmutanten und wt-Pseudovirionen ohne Präinkubation und präinkubiert mit  $250 \mu\text{g/ml}$  Heparin für 30 min bei Raumtemperatur. Danach wurden die präinkubierten (+Heparin, rechte Seite) oder nicht präinkubierten Pseudovirionen (-Heparin, linke Seite) für 2 h bei  $4^\circ\text{C}$  an Cos-7-Zellen gebunden, das Zelllysate auf einem SDS-Gel aufgetrennt und der Immunoblot mit dem L1-spezifischen Antikörper H16L1-312F detektiert.

bene Heparin blockiert werden (Selinka *et al.*, 2003). Eine niedrige Restbindung, die für alle Mutanten und wt etwa gleich war, ließ sich jedoch auch in Anwesenheit von Heparin beobachten. Diese heparansulfatunabhängige Bindung an die Zelloberfläche von durchschnittlich 15,5% ist vermutlich unspezifisch und führt nicht zur Infektion, da unter den gewählten Bedingungen die Infektiosität von Pseudovirionen normalerweise vollständig inhibiert ist (Giroglou *et al.*, 2001).

Die Quantifizierung verschiedener Zellbindungsassays nach Abzug der gemessenen Restbindung und somit die heparansulfatspezifische Zellbindung aller in dieser Arbeit besprochenen Lysin- oder Arginin-zu-Alanin-Mutanten sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Signifikante Unterschiede dieser Verteilung in neun Gruppen (fünf Einzelmutanten, zwei Doppelmutanten, eine Trippelmutante und wt-Pseudovirionen) sind mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) abgesichert ( $P < 0,001$ ). Für multiple Vergleiche („*post-hoc*“) wurde die „Student-Newman-Keuls“ (S-N-K)-Methode verwendet, um die in der Varianzanalyse aufgedeckten signifikanten Mittelwertunterschiede den einzelnen gebildeten Gruppen zuzuordnen. Diese ergab, dass sich alle Pseudovirionen mit Einzel-, Doppel- oder Trippelmutationen der Lysine K278, K356 oder K361 signifikant von wt-Pseudovirionen unterschieden ( $P < 0,05$ ).

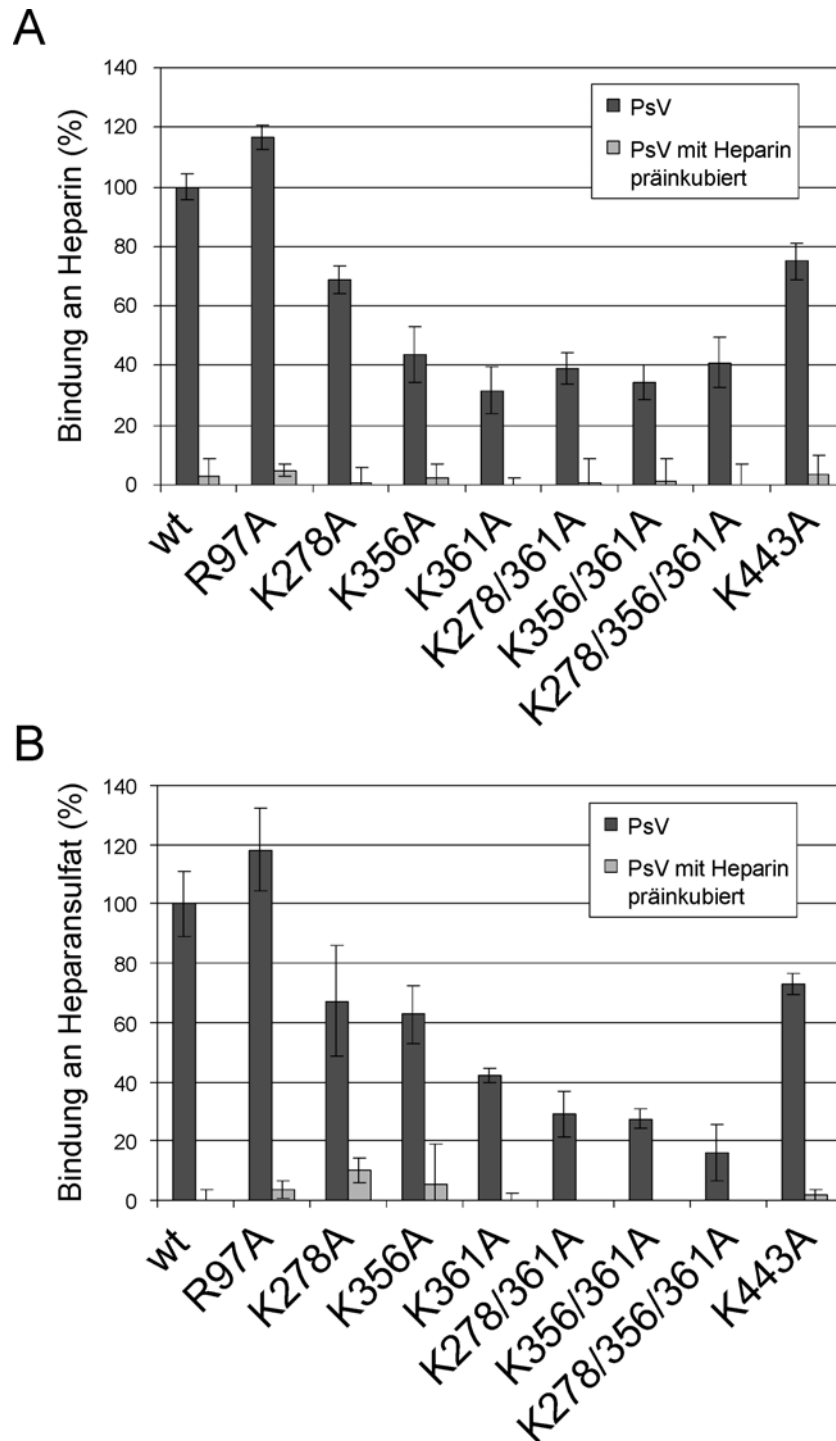
Die Mutation des Lysins an Position 361 hatte mit einer verbliebenen Zellbindung von 30%, verglichen mit den Mutationen der anderen beiden Lysinen K278A und K356A (43% bzw 65%), die größte Auswirkung auf die Fähigkeit der Viren zur Zellbindung und scheint somit eine zentrale Rolle zu spielen. Auffällig ist aber auch die stark inhibierte Bindung der Trippelmutante K278/356/361A von nur 10%. Dies deutet darauf hin, dass die drei eng benachbarten Lysine auf der Spitze des Kapsomers die Bindestelle für Heparansulfate in Kooperation miteinander bilden.



**Abbildung 3.9:** Heparansulfatspezifische Zellbindung mutanter HPV16-Pseudovirionen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten wie bei Abbildung 3.7 beschrieben. Die Western Blot-Banden wurden quantifiziert, dann wurde die heparansulfatunabhängige Restbindung abgezogen und die verbliebene Zellbindung normalisiert auf den L1-Gehalt der Pseudovirionen. Zellbindung der wt-Partikel wurde als 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede in neun Gruppen sind mit einer einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA) abgesichert ( $P < 0,001$ ). Für multiple Vergleiche („posthoc“) wurde die „Student-Newman-Keuls“ (S-N-K)-Methode verwendet. Die Besprechung der einzelnen Mutanten wird in den jeweiligen Kapiteln vorgenommen.

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen Mutationen verschiedener basischer Aminosäuren in HPV16-Partikeln auf die Bindung an Heparin und Heparansulfat haben, wurden ELISA-Platten mit Heparin oder Heparansulfat beschichtet und anschließend mit mutanten und wt-Pseudovirionen inkubiert (siehe Abbildung 3.10). Um die Spezifität der Bindung zu überprüfen, wurden auch hier Pseudovirionen verwendet, die zuvor mit Heparin präinkubiert worden waren. Die Detektion gebundener Virionen erfolgte durch Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchenserum K75, das konformationelle Epitope auf der Oberfläche des Kapsomers erkennt. In Abbildung 3.10 A ist die Heparinbindung aller in dieser Arbeit beschriebenen Lysin- und Arginin-zu-Alanin-Mutanten dargestellt, in Abbildung 3.10 B die Heparansulfatbindung.

Ähnlich wie bei der Zellbindung (siehe Abbildung 3.9) bewirkten auch hier alle Einzel-, Doppel- oder Trippelmutationen der Lysine K278, K356 oder K361 auf der Kapsomer Spitze eine Verminderung der Bindung an Heparin (siehe Abbildung 3.10 A). Von den drei Einzelmutanten war die Heparinbindung der K361A-Mutante mit 32% wiederum am meisten reduziert, die der K278A-Mutante mit 69% am geringsten. Zusätzlich zu der Bindung



**Abbildung 3.10:** Bindung mutanter HPV16-Pseudovirionen an Heparin und Heparansulfat. Gleiche Mengen an Pseudovirionen wurden an mit Heparin oder Heparansulfat beschichtete Platten gebunden und durch Inkubation mit dem polyklonalen Kaninchenserum K75, das konformationelle Epitope auf der Oberfläche des Kapsomers erkennt, detektiert (dunkelgraue Balken). Zusätzlich wurden Pseudovirionen mit  $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  Heparin für 30 min bei RT präinkubiert und ebenfalls an die heparinbeschichteten Platten gebunden (hellgraue Balken). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung eines Experiments mit Vierfachbestimmungen. Wt-Bindung an Heparin wurde als 100% gesetzt. Die Besprechung der einzelnen Mutanten wird in den jeweiligen Kapiteln vorgenommen. **(A)** Bindung mutanter HPV16-Pseudovirionen an Heparin. **(B)** Bindung mutanter HPV16-Pseudovirionen an Heparansulfat.



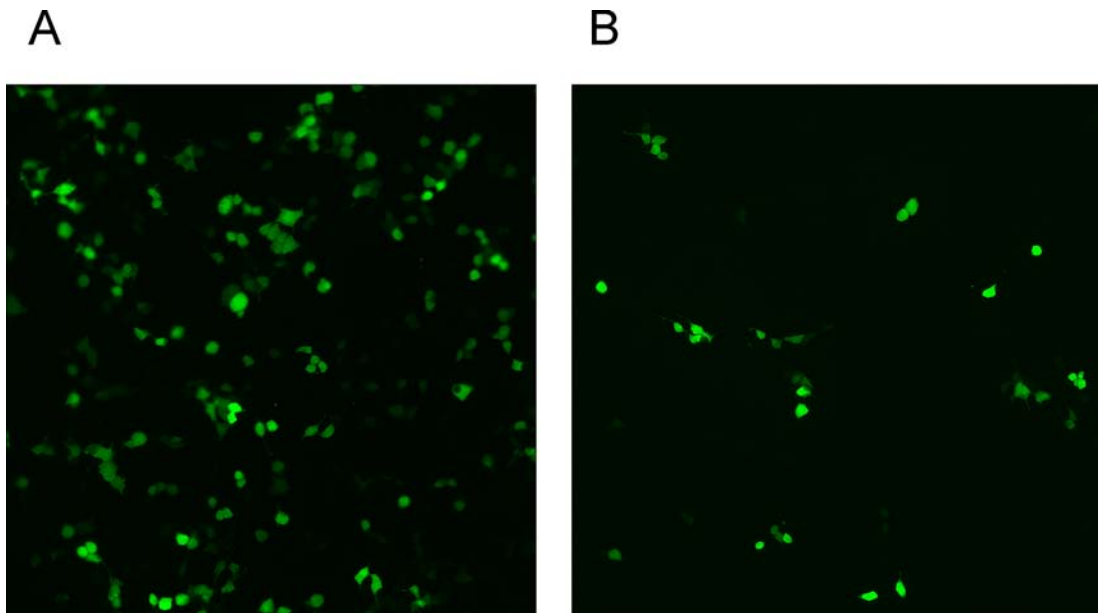
der mutanten und wt-Pseudovirionen wurde auch die Bindung von HPV16-Partikeln nach Präinkubation mit Heparin untersucht. Diese bewirkte, wie schon bei der Zellbindung beobachtet (siehe Abbildung 3.8), eine drastische Verminderung der Heparinbindung sowohl der mutanten als auch der wt-Pseudovirionen, was wiederum die Spezifität der Bindung an Heparin demonstrierte.

Auch die Bindung der HPV16-Pseudovirionen an Heparansulfat, dem eigentlichen Rezeptor der Papillomviren auf der Zelloberfläche, wurde im ELISA untersucht (siehe Abbildung 3.10 B). Diese war durch die verschiedenen Mutationen der drei Lysine K278, K356 und K361 auf der Spitze des Kapsomers ebenfalls stark beeinträchtigt. Vor allem die Einzelmutante K361A (42% Bindung an Heparansulfat), die Doppelmutanten K278/361A und K356/361A (29% und 28%) und besonders die Trippelmutante K278/256/261A waren stark inhibiert. Die Bindung der Trippelmutante an Heparansulfat war bis auf 16% reduziert, was wiederum dafür spricht, dass die Heparansulfatbindestelle von den drei Lysinen auf der Spitze des Kapsomers gemeinsam gebildet wird. Auch die Bindung der Viren an Heparansulfat konnte durch die Präinkubation mit Heparin beinahe vollständig verhindert werden, was die Spezifität der Bindung demonstriert.

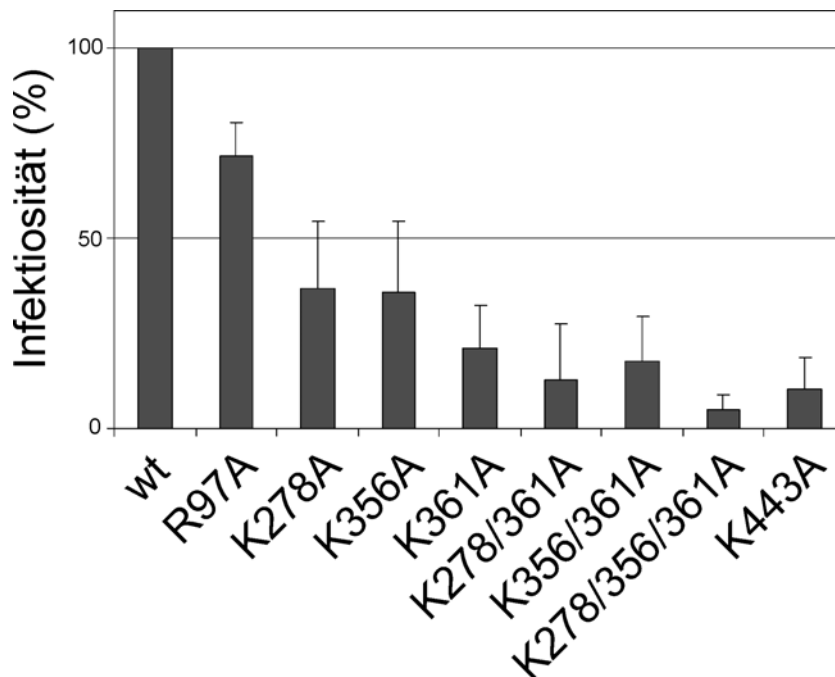
Die Infektiosität mutanter Pseudovirionen wurde mit Hilfe von Infektionsassays bestimmt. 293TT-Zellen wurden mit Viruspartikeln, die ein GFP-Reporterplasmid verpackt hatten, infiziert. Nach 72 h konnten die infizierten Zellen, die GFP exprimiert hatten, gezählt werden. Beispiele für einen solchen Infektionsassay sind in Abbildung 3.11 gezeigt. Die gezählten Infektionseinheiten wurden dann auf den L1-Gehalt der mutanten und wt-Pseudovirionen normalisiert, der für jede Präparation im nativen ELISA mit konformationellen Antikörpern bestimmt wurde.

In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse der Infektionsassays der in dieser Arbeit beschriebenen Lysin- und Arginin-zu-Alanin-Mutanten zusammengefasst. Signifikante Unterschiede dieser Verteilung in neun Gruppe sind mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) abgesichert ( $P < 0,001$ ). Die S-N-K-Methode wurde für multiple Vergleiche („*posthoc*“) verwendet, um die in der Varianzanalyse aufgedeckten signifikanten Mittelwertunterschiede den einzelnen gebildeten Gruppen zuzuordnen. Diese ergaben, dass die Infektiosität von Partikeln mit Einzel-, Doppel- oder Trippelmutationen der Lysine K278, K356 oder K361 im Vergleich zu wt-Pseudovirionen signifikant reduziert waren ( $P < 0,001$ ).

Die verringerte Infektiosität der Einzelmutanten K278A, K356A und K361A korrelierte dabei mit ihrer verminderten Fähigkeit zur Zellbindung (siehe Abbildung 3.9). Die Mutation des Lysins an Position 361 bewirkte eine Reduktion der Infektiosität auf 21%, bei den Mutanten K278A und K356A betrug diese noch 36%. Wie bereits bei der Zellbindung beobachtet, nahm auch die Infektiosität der Doppelmutanten K278/361A und K356/361A weiter ab (13% bzw. 18%). Die Trippelmutante K278/356/361A wies nur



**Abbildung 3.11:** Infektionsassay mit 293TT-Zellen in der Immunfluoreszenz. Infizierte Zellen, die GFP exprimierten, wurden bei 10facher Vergrößerung gezählt. Zwei Beispiele: **(A)** Infektionsassay mit HPV16-wt-Pseudovirionen. **(B)** Infektionsassay mit einer HPV16-L1-Mutante.



**Abbildung 3.12:** Infektiosität mutanter HPV16-Pseudovirionen. 293TT-Zellen wurden mit Lysin- und Arginin-zu-Alanin-Mutanten und wt-Pseudovirionen infiziert und nach 72 h Zellen mit grüner Kernfluoreszenz gezählt. Infektiosität der wt-Pseudovirionen wurde als 100% gesetzt. Besprechung der einzelnen Mutanten in den jeweiligen Kapiteln.

noch 5% Infektiosität im Vergleich zu wt-Pseudovirionen auf, was erneut darauf hindeutet, dass diese drei Lysine auf der Spitze des Kapsomers gemeinsam zu der Interaktion mit Glykosaminoglykanen der Zelloberfläche beitragen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die drei Lysine K278, K356 und K361, die sich auf der Spitze des Kapsomers befinden, eine wichtige Rolle bei der Zellbindung und Infektion von HPV16 spielen. Lysin-zu-Arginin-Mutation jeweils eines der Lysine führte zu verminderter Zell- (siehe Abbildung 3.9), Heparin- und Heparansulfatbindung (siehe Abbildung 3.10), die noch weiter reduziert wurde, wenn zwei oder alle drei der Lysine gleichzeitig mutiert waren. Diese Beobachtungen korrelierten sehr gut mit den Daten der Infektionsassays (siehe Abbildung 3.12). Die Infektiosität der Trippelmutante war nahezu vollständig inhibiert.

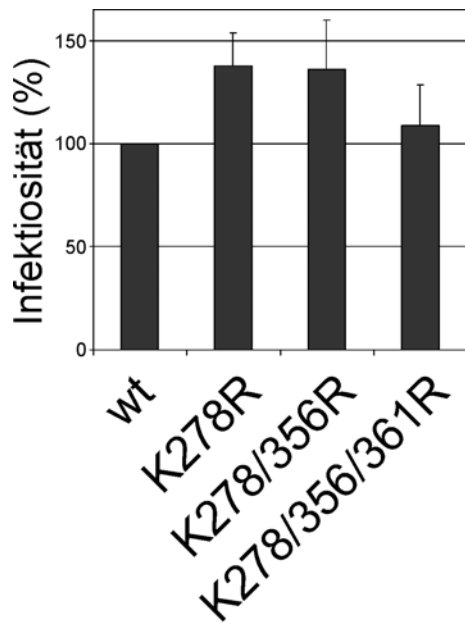
### 3.3.2 Konservative Mutation der Lysine zu Argininen

Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, dass die drei Lysine auf der Spitze des Kapsomers, K278, K356 und K361, wichtig für die Interaktion der Viren mit der Zelloberfläche sind. Um nun zu überprüfen, ob die Folgen eines Austauschs einer Aminosäure auf ladungsspezifischen oder sequenzspezifischen Unterschieden beruhen wurden diese nicht nur durch Alanine ausgetauscht, sondern auch zu Argininen mutiert. Dabei handelt es sich um sogenannte konservative Mutationen, da eine basische Aminosäure mit positiver Ladung gegen eine andere basische ausgetauscht wird. Dadurch ändert sich die Ladungsdichte an dieser Position nur minimal.

Abbildung 3.13 fasst die Ergebnisse von Infektionsassays nach Austausch eines Lysins (K278R), zweier Lysine (K278/356R) oder aller drei Lysine zu Argininen (K278/356/361R) zusammen. Keine der Mutanten zeigte reduzierte Infektiosität. Dies bestätigt, dass die Bindung an Glykosaminoglykane der Zelloberfläche über elektrostatische Wechselwirkungen stattfindet und keine sequenzspezifische Interaktion darstellt.

## 3.4 Analyse basischer Aminosäuren in der Grube zwischen den Kapsomeren

Da die Bindung der HPV16-Pseudovirionen an Heparansulfatproteoglykane der Zelloberfläche auch über basische Aminosäuren stattfinden könnte, die in der Grube zwischen den Kapsomeren lokalisiert sind, wurden aus dieser Region ebenfalls einige Aminosäuren für eine Mutagenese ausgewählt (siehe Tabelle 3.1). Nur der Austausch des Arginins an Position 97 und des Lysins an Position 443 zu Alanin führte jedoch zur Bildung intakter Pseudovirionen (siehe Abschnitt 3.2.2), im Gegensatz zu Mutationen des Arginins R74



**Abbildung 3.13:** Infektiosität der Lysin-zu-Arginin-Mutanten. 293TT-Zellen wurden mit mutanten und wt-Pseudovirionen infiziert und nach 72 h Zellen, die GFP exprimierten, gezählt. Infektiosität des wt wurde als 100% gesetzt.

und des Lysins K82. Die beiden letztgenannten Aminosäuren konnten daher nicht weiter untersucht werden.

In Abbildung 3.1 ist erkennbar, dass sich R97 an der tiefsten Stelle in der Grube zwischen den Kapsomeren befindet und daher vom Kapsomerplateau aus relativ schlecht zugänglich ist. K443 jedoch liegt nach dem „Invading-Arm“-Modell von Modis *et al.* (2002) etwa auf halber Höhe zwischen dem Grund der Grube und der Kapsomerspitze und hat somit eine bessere Zugänglichkeit. Die Partikel mit Mutanten dieser Aminosäuren im HPV16-L1 (R97A und K443A) wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Zellbindung überprüft (Abbildung 3.7). Die stärkste Zellbindung wurde dabei mit wt-Pseudovirionen und der Mutante R97A beobachtet, die vergleichbar war (Abbildung 3.7 links). Die Mutante K443A zeigte lediglich eine schwach reduzierte Bindung an die Zellen (Abbildung 3.7 recht). Abbildung 3.9 zeigt die Quantifizierung verschiedener Zellbindungsassays. Nachdem mittels ANOVA-Analyse die Signifikanz der neun Gruppen untereinander gezeigt werden konnte, ergab der multiple Vergleich mit der S-N-K-Methode, dass sowohl R97A als auch K443A sich nicht signifikant von wt-Pseudovirionen unterschieden, im Gegensatz zu allen andern Lysin-zu-Alanin-Mutanten ( $P < 0,05$ ). Die Zellbindung der R97A-Mutanten lag mit 109% nahe der von wt-Partikeln. Die Mutation des Lysins an Position 443 resultierte in HPV-Partikeln, die noch 60% Zellbindung aufwiesen. Die primäre Interaktion mit Heparansulfaten der Zelloberfläche scheint also hauptsächlich über die basischen Aminosäuren auf der Spitze des Kapsomers statt zu finden.

Dies wurde bestätigt durch Bindungsassays mit immobilisiertem Heparin und Heparansulfat im ELISA, wo die Bindung von wt- und R97A-Pseudovirionen wiederum vergleichbar war (Abbildung 3.10). K443A zeigte mit 75% Heparinbindung (Abbildung 3.10 A),

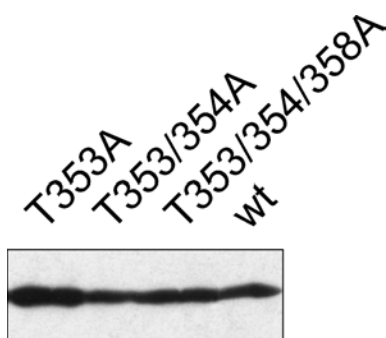
bzw. 73% Heparansulfatbindung (Abbildung 3.10 B) ebenfalls abermals eine relativ gute Bindung.

Auch die Infektiosität dieser mutanter Pseudovirionen wurde mit Hilfe von Infektionsassays bestimmt (Abbildung 3.13). Der multiple Vergleich mittels S-N-K-Methode ergab dabei, dass alle Lysin-zu-Arginin-Mutanten sich signifikant von wt-Pseudovirionen unterschieden ( $P < 0,001$ ), Partikel, die das Arginin an Position 97 zu Alanin mutiert hatten jedoch nicht. Diese Partikel, die auch normale Zellbindung gezeigt hatten, waren mit durchschnittlich 72% Infektiosität nur wenig inhibiert. Interessanterweise führte jedoch die Mutation des Lysins an Position 443 zu einer verminderten Infektiosität von nur noch 10%, obwohl die Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung dieser Mutante nur leicht reduziert war. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Lysin an Position 443 wichtig für die Infektiosität von HPV16 zu sein scheint, aber, aufgrund des Fehlens einer klaren Korrelation zwischen Zellbindung und Infektiosität, nicht zu der primären Interaktion mit Heparansulfaten beiträgt.

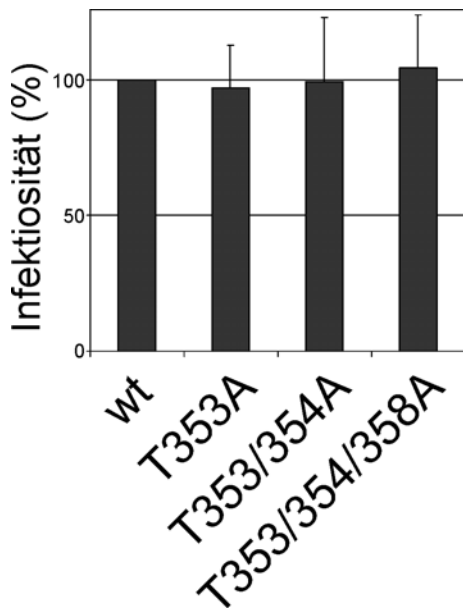
Die verschiedenen Bindungsassays demonstrierten, dass die Mutation des Arginins an Position 97 keine Inhibition der Zell-, Heparin- oder Heparansulfatbindung bewirkte und auch die Infektiosität dieser Partikel vergleichbar mit der des Wildtyps war. R97 ist somit nicht relevant für die primäre Zellbindung und Infektion von HPV16. K443 befindet sich in geringerer Tiefe in der Spalte zwischen den Kapsomeren. Dennoch scheint auch dieses Lysin nur eine untergeordnete Rolle bei der Heparansulfatbindung zu spielen, da die Mutante K443A lediglich leicht verminderte Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung aufwies. Die Infektiosität dieser Mutante war jedoch stark reduziert, dieses Lysin scheint also für spätere Infektionsprozesse essentiell zu sein.

### 3.5 Analyse der Threonine auf der Spitze des Kapsomers

Wie in Abbildung 3.3 deutlich erkennbar ist, liegen die Threonine T353, T354 und T358 genau zwischen den Lysinen K278, K356 und K361 auf der Spitze des Kapsomers. Bekannte Heparinbindestellen enthalten oftmals polare Aminosäuren, die Wasserstoffbrücken mit



**Abbildung 3.14:** Zellbindung der Threonin-zu-Alanin-Mutanten. Zellbindung der Pseudovirionen für 2 h bei 4°C an Cos-7-Zellen, dann Auftrennung des Zellysats auf einem SDS-Gel und L1-Detektion im Immunoblot über den L1-spezifischen Antikörper H16L1-312F.



**Abbildung 3.15:** Infektiosität der Threonin-zu-Arginin-Mutanten. 293TT-Zellen wurden mit mutanten und wt-Pseudovirionen infiziert und nach 72 h Zellen mit grüner Kernfluoreszenz gezählt. Infektiosität des wt wurde als 100% gesetzt.

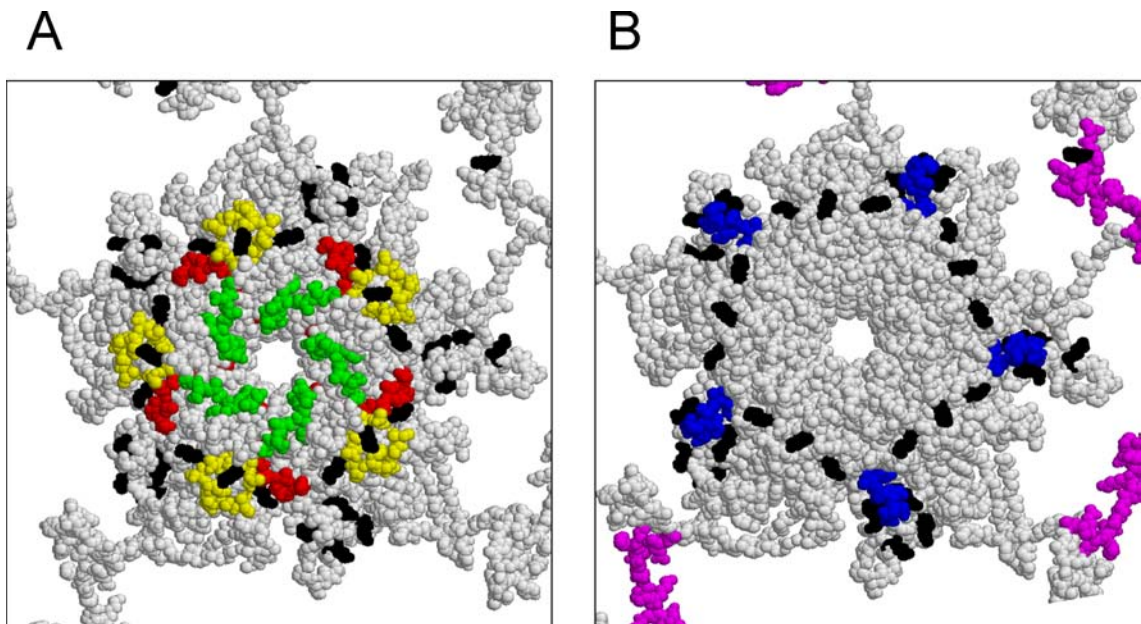
den Heparansulfatketten bilden können und so die Bindung unterstützen bzw. stabilisieren können (Caldwell *et al.*, 1996). Auch die Lage zwischen den Lysinien wäre typisch, da in linearen Heparinbindedomänen die basischen Aminosäuren oft nur durch eine oder zwei, meist polare Aminosäuren voneinander getrennt sind (Hileman *et al.*, 1998).

Zellbindungsassays mit einer Threonin-zu-Alanin-Einzelmutante (T353A), einer Doppelmutante (T353/354A) und der entsprechenden Trippelmutante (T353/354/358A) ergaben jedoch, dass deren Fähigkeit zur Zellbindung durch die Mutationen nicht reduziert war (Abbildung 3.14). An der primären Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen scheinen sie somit nicht direkt beteiligt zu sein.

Infektionsassays mit der Einzelmutante T353A, der Doppelmutante T353/354A und der Trippelmutante T353/354/358A zeigten nun, dass auch die Infektiosität durch die Mutation der Threonine zu Alaninen nicht beeinflusst wurde (siehe Abbildung 3.15). Sie scheinen somit weder bei der Zellbindung noch bei der Infektion von HPV16-Partikeln eine bedeutende Rolle zu spielen.

### 3.6 Epitope neutralisierender Antikörper

Aminosäuresequenzvergleiche haben gezeigt, dass die  $\beta$ -Faltblattregionen des L1-Proteins innerhalb der HPV-Typen hoch konserviert sind, die dazwischen liegenden Polypeptidschleifen jedoch hohe Sequenzvariabilität aufweisen (Carter *et al.*, 2003). Diese hypervariablen Regionen sind immundominant und induzieren die Bildung neutralisierender, meist typspezifischer Antikörper (Christensen *et al.*, 2001; Ludmerer *et al.*, 1996). Strukturelle Studien an *Virus-like Particles* (VLPs) zeigten, dass diese Regionen oberflächen-



**Abbildung 3.16:** Epitope neutralisierender Antikörper. Aufsicht auf das Kapsomer von HPV16. (A) Dargestellt sind die in dieser Arbeit untersuchten basischen Aminosäuren (schwarz) und in der Literatur erwähnte Epitope neutralisierender Antikörper, die die Bindung der Viren an die Zelle inhibieren und HPV-Pseudovirionen sehr effizient neutralisieren (Carter *et al.*, 2006; Culp *et al.*, 2007; Roden *et al.*, 1996; Selinka *et al.*, 2003): Aminosäuren 131-138 (grün), 260-270 (rot) und 346-358 (gelb) (Carpentier *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2006; Christensen *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2006; White, 1999). (B) Untersuchte basische Aminosäuren (schwarz) und in der Literatur erwähnte Epitope von neutralisierenden Antikörpern, die die Bindung der Viren an Zellen nicht verhindern und nur sehr schwache Neutralisation bewirken (Booy *et al.*, 1998; Culp *et al.*, 2007; Roden *et al.*, 1996; Selinka *et al.*, 2003): Aminosäuren 51-58 (blau) und 427-445 (magenta) (Carter *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2006; Sadeyen *et al.*, 2003).

exponierte *Loops* bilden, die für Antikörper gut zugänglich sind (Chen *et al.*, 2000). Zahlreiche Epitope neutralisierender Antikörper konnten bereits identifiziert werden. Ein Vergleich der Lage der mutierten Aminosäuren mit Epitopen neutralisierender Antikörper könnte zusätzlich Aufschluss über die Funktion der basischen Aminosäuren bei der Infektion geben. Ein solcher Vergleich mit zahlreichen in der Literatur erwähnten Antikörperepitopen ist in Abbildung 3.16 dargestellt, die Benennung und Lage der *Loops* in Tabelle 3.2. Dabei wird deutlich, dass sich einige der Lysine und Arginine in der Nähe von Epitopen von Antikörpern befinden, die mit hoher Effizienz eine HPV-Infektion inhibieren können (siehe Abbildung 3.16 A). Vor allem die drei Lysine K278, K356 und K361 liegen in direkter Nachbarschaft des FG- und HI-*Loops*, zwei Bereiche auf der Oberfläche von HPV16, die besonders immundominant sind (Christensen *et al.*, 2001). Für einige Antikörper, die in diesen Regionen binden, konnte nachgewiesen werden, dass sie die Zellbindung der Viren blockieren (Roden *et al.*, 1996; Selinka *et al.*, 2003). Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass sich die Heparansulfatbindestelle in der Nähe dieser Epitope, und somit der drei Lysine K278, K356 und K361, befindet.

Das Lysin an Position 54 hingegen ist im BC-*Loop* lokalisiert, der Bindestelle für Antikörper ist, die nicht sehr effizient neutralisieren und die Bindung von HPV an Zellen nicht verhindern (Culp *et al.*, 2007; Selinka *et al.*, 2003). Dasselbe gilt für den carboxy-terminalen Arm des L1-Proteins, wo sich das Lysin an Position 443 befindet (Booy *et al.*, 1998; Culp *et al.*, 2007; Roden *et al.*, 1996).

Einer der Antikörper, der im FG-*Loop* bindet, ist H16.56E (Roth *et al.*, 2006). Sein Epitop liegt in direkter Nachbarschaft zum Lysin K361. Versuche mit diesem Antikörper und seinen Fab-Fragmenten sollten nun zeigen, ob er die Zellbindung der Pseudovirionen beeinflusst und auf diese Weise neutralisiert.

**Tabelle 3.2:** Hypervariable Regionen des L1-Proteins von HPV16. Linke Spalte: Bezeichnung des jeweiligen *Loops* bzw. der Region, die Farben entsprechen den in Abbildung 3.16 verwendeten. Mittlere Spalte: Position der Aminosäuren des *Loops* bzw. der Region im L1-Protein von HPV16. Rechte Spalte: Aminosäuresequenz des *Loops* bzw. der Region von HPV16.

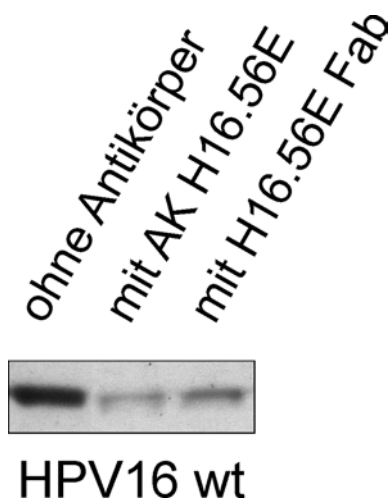
Loops bzw. Region	Aminosäuren	Sequenz HPV16-L1
BC- <i>Loop</i>	51-58	PIKKPNNN
DE- <i>Loop</i>	131-139	NASAYAANA
EF- <i>Loop</i>	175-185	CTNAVAVNPGDC
FG- <i>Loop</i>	260-291	LFNRAGAVGENVPDDLYIKGSGSTANLASSNY
HI- <i>Loop</i>	346-358	AAISTSETTYKNT
C-terminaler Arm	427-445	ACQKHTPPAPKEDPLKKYT



### 3.6.1 Inhibition der Zellbindung durch den Antikörper H16.56E und dessen Fab-Fragmente

Blockierung der Zellbindung ist ein häufiger und effizienter Neutralisationsmechanismus von Antikörpern (Klasse und Sattentau, 2002). Um zu überprüfen, ob der monoklonale Antikörper H16.56E die Zellbindung von Pseudovirionen blockiert, wurden wt-Pseudovirionen mit dem Antikörper oder dessen Fab-Fragmenten präinkubiert und danach Zellbindungsassays durchgeführt. Bekanntermaßen neutralisieren sowohl der vollständige Antikörper als auch dessen Fab-Fragmente die Infektion von Pseudovirionen mit ähnlicher Effizienz noch bis zu einer hohen Verdünnung (unveröffentlichte Arbeit von H.-C. Selinka, Universität Mainz). Die Präinkubation mit Fab-Fragmenten, also dem kurzen antigenbindenden Teil des Antikörpers, und anschließend durchgeführte Zellbindungsassays sollten nun zeigen, ob eine eventuelle Blockade der Zellbindung aufgrund sterischer Hinderung oder aufgrund direkter Interaktion mit der Rezeptorbindestelle zustande kommt.

Wie in Abbildung 3.17 erkennbar ist, wurde die Zellbindung von HPV16-Partikeln sowohl durch den vollständigen Antikörper H16.56E, als auch durch dessen Fab-Fragment stark reduziert. Diese Inhibition der Zellbindung beruhte somit nicht auf einer sterischen Hinderung, da diese durch die Verwendung der sehr kleinen Fab-Fragmente minimiert sein sollte. Daraus kann man schließen, dass die Fab-Fragmente direkt mit der Bindestelle der Pseudovirionen interagierten und Aminosäuren, die an der Zellbindung der Virionen beteiligt sind, somit nahe dem H16.56E-Epitop auf der Spitze des Kapsomers lokalisiert sind. Fab-Fragmente inhibierten die Bindung zu einem etwas geringeren Maße. Dies ist vermutlich auf eine geringere Bindungsaffinität des Fab-Fragment gegenüber dem vollständigen Antikörper zurück zu führen.



**Abbildung 3.17:** Zellbindung von HPV16-Pseudovirionen in Anwesenheit des monoklonalen Antikörpers H16.56E und dessen Fab-Fragmenten. Nach Präinkubation erfolgte die Zellbindung an Cos-7-Zellen, dann wurde das Zelllysate auf einem SDS-Gel aufgetrennt und L1 Proteine im Immunoblot über den L1-spezifischen Antikörper H16L1-312F detektiert.

*Ein Bad erfrischt,  
eine Diskussion verjüngt*

Aus Russland

# 4

## Diskussion

Für HPV16 und -33 (Giroglou *et al.*, 2001), sowie -11, -18, -31, -45, -58, -59 und -68 (Combita *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 1999) konnte bisher gezeigt werden, dass die Bindung an Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche essentiell für die Infektion mit diesen Viren ist. Die vorliegende Dissertation hatte die Identifizierung und Charakterisierung der Heparansulfatbindestelle von HPV16 zum Ziel. Dazu wurde eine Vielzahl an molekularbiologischen, biochemischen und virologischen Methoden eingesetzt, um die Fähigkeiten verschiedener Mutanten zur Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung und Infektiosität zu überprüfen. Die im vorherigen Kapitel gezeigten Ergebnisse und ihre Bedeutung sollen nun hier diskutiert werden.

### 4.1 Die Lysine auf der Spitze des Kapsomers

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse der drei Lysine K278, K356 und K361 auf der Spitze des Kapsomers lassen darauf schließen, dass diese basischen Aminosäuren die Bindestelle für Heparansulfat der Zelloberfläche bilden. Ihr Austausch zu Alaninen als Einzel-, Doppel- und Trippelmutanten hatte keinen Einfluss auf die Bildung intakter HPV16-Partikel, wie die umfassenden Analysen in Abschnitt 3.2.2 zeigten. Wie in Abschnitt 3.3.1 dargestellt, spielen diese drei basischen Aminosäuren aber eine wichtige Rolle bei der Zellbindung und Infektion von HPV16-Pseudovirionen. Der Austausch jeweils eines der Lysine führte zu signifikant verminderter Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung, die noch weiter reduziert wurde, wenn zwei oder drei Lysine gleichzeitig ausgetauscht wurden. Besonders die Trippelmutante zeigte in allen Fällen eine um mehr als 80% reduzierte Bindung. Diese Beobachtungen korrelierten gut mit den Daten der Infektionsassays. Pseudovirionen, die aus den Einzelmutanten gebildet wurden, hatten eine stark verringerte Infektiosität. Der Austausch zweier Lysine führte zu Viruspartikeln mit einer

noch weiter reduzierten Infektiosität, während der Austausch von drei Lysinen einen fast vollständigen Verlust der Infektiosität zur Folge hatte. Diese gute Korrelation zwischen Bindung und Infektiosität zeigt, dass die reduzierte Infektiosität auf eine Störung der Zellbindung zurück zu führen ist und somit die drei Lysine K278, K356 und K361 maßgeblich an der primären Interaktion mit der Zelle beteiligt sind. Bei dieser Interaktion handelt es sich um die Bindung an Heparansulfate, da sich sowohl wt-Virionen als auch Mutanten durch Präinkubation mit Heparin inhibieren lassen (siehe Abbildung 3.8).

Durch die stärkere Reduzierung der Bindung und Infektiosität bei den Doppelmutanten und der Trippelmutante wird deutlich, dass die drei Lysine die Bindestelle für Heparansulfate in Kooperation bilden. Dies ist zu erwarten, wenn die Bindung an Heparansulfat über elektrostatische Wechselwirkungen anstatt über sequenzspezifische Interaktionen stattfindet. Das konnte durch konservative Mutation der Lysine zu Argininen gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.3.2). Da der Austausch der Lysine zu einer anderen basischen Aminosäure als Einzel-, Doppel- und Trippelmutante keinen Einfluss auf die Infektiosität der Virionen und somit auch nicht auf die Zellbindung hatte, ist die drastische Inhibition der Lysin-zu-Alanin-Mutanten auf die Veränderung der Ladungsdichte zurückzuführen. Die negativ geladenen Sulfatgruppen der Heparansulfatketten interagieren somit mit dem Cluster positiver Ladung, das die drei Lysine auf der Oberfläche bilden. Leicht erhöhte Infektiosität der Lysin-zu-Arginin-Mutanten lässt sich daher vermutlich darauf zurückführen, dass Arginine aufgrund ihrer höheren Ladung eine höhere Affinität zu Heparin und Heparansulfaten besitzen als Lysine (Fromm *et al.*, 1995). Folglich ist die positive Ladungsdichte und nicht die spezifische Aminosäuresequenz für die primäre Bindung an Heparansulfate verantwortlich. Dies bestätigt den in der Literatur postulierten Mechanismus, der besagt, dass die Interaktion heparinbindender Proteine mit Glykosaminoglykanen hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkungen stattfindet (Hileman *et al.*, 1998). Proteine interagieren auch über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Es wird jedoch vermutet, dass diese Interaktionen vor allem der Spezifität der Bindung dienen (Hileman *et al.*, 1998).

Besonders hervorzuheben ist die Rolle des Lysins an Position 361. Die Einzelmutante zeigte jeweils die schwächste Bindung und Infektiosität. Das Epitop von H16.56E liegt zudem in direkter Nachbarschaft zum Lysin K361. Die hohe Konservierung dieser Aminosäure von 96% im Genus der Alpha-Papillomviren spricht ebenfalls für deren besondere Bedeutung (siehe 3.1.2). Diese Aminosäure wird später in Abschnitt 1.4 noch ausführlicher diskutiert. Auch das Lysin K278 ist im Genus der Alpha-Papillomviren hoch konserviert (90% Homologie), K356 jedoch nur zu 35%. Es ist noch unklar, warum die Lysine an diesen Positionen nicht zu hundert Prozent konserviert sind, obwohl es zur Zeit so aussieht, dass die meisten, wenn nicht alle, Papillomviren, Heparansulfate als Rezeptor verwenden.

Eine mögliche plausible Erklärung ist, dass die in dieser Arbeit untersuchten Lysine in anderen Papillomvirustypen funktionell von benachbarten basischen Aminosäuren ersetzt werden könnten. BPV1 und -2 tragen beispielsweise ein Asparagin an der Position, die in HPV16 K361 entspricht. Sie haben jedoch ein zusätzliches Lysin an der Position, die der Aminosäure 359 entspricht und auf der Oberfläche in direkter Nachbarschaft zu K361 liegt. Dies stünde im Einklang mit der Beobachtung, dass die Interaktion von HPV mit Heparansulfat nicht peptidsequenzspezifisch ist, sondern von einer positiven Ladungsverteilung auf der Oberfläche abhängt. Dass die Bindung von HPV16 an Heparansulfate eine intakte Kapsidkonformation voraussetzt, wurde bereits früher nachgewiesen (Rommel *et al.*, 2005). Bei HPV16 wird dieses basische „Cluster“ durch die Lysine K278, K356 und K361 gebildet, die nur bei intakter Konformation benachbart sind, und deren Funktion bei anderen Papillomvirustypen von in der Nähe positionierten Lysinen oder Argininen übernommen werden könnte. Die Anordnung der drei Lysine K278, K356 und K361 entspricht daher auch keiner der in der Literatur publizierten Konsensussequenzen für Heparinbindungsstellen (Cardin und Weintraub, 1989; Hileman *et al.*, 1998). Dies trifft jedoch auch auf viele andere heparinbindende Proteine zu (Liu und Thorp, 2002). Selbst Heparansulfat-Sulfotransferasen, die während der Biosynthese die Sulfatierung der Glykosaminoglykanketten vermitteln, enthalten keine dieser Konsensussequenzen, was auf die Komplexität der Interaktion von Proteinen und Heparansulfat hindeutet.

Neben diesen Ergebnissen gibt es weitere publizierte Hinweise darauf, dass die primäre Interaktion von Papillomvirus-Partikeln mit Zellen über die Spitze des Kapsomers vermittelt wird. Der BPV1-spezifische Antikörper #9 blockiert die Bindung der Viren an Zellen (Roden *et al.*, 1994; 1995). Mit Hilfe von Cryoelektronenmikroskopie und 3D-Rekonstruktion fanden Booy *et al.* (1998) heraus, dass dieser Antikörper ein Epitop auf der Spitze des Kapsomers erkennt. Im Gegensatz dazu inhibiert der neutralisierende Antikörper 5B6 die Zellbindung von BPV1 nicht (Roden *et al.*, 1994; 1995). Für diesen Antikörper konnte ein Epitop identifiziert werden, das sich zwischen den Kapsomeren befindet. Auch wenn dies nicht ausschließt, dass die primäre Interaktion mit Heparansulfaten auch in der Grube zwischen den Kapsomeren stattfindet, so scheint es doch sehr unwahrscheinlich. Die Vergleiche von Epitopen verschiedener Antikörper (siehe Abschnitt 3.6) sprechen nun dafür, dass die Bindestelle für Heparansulfate auf der Spitze des Kapsomers liegt. Erstens konnte bisher gezeigt werden, dass Antikörper, die Epitope im BC-Loop oder dem C-terminalen Arm von L1 erkennen (siehe Abbildung 3.16), die Bindung an Zellen nicht blockieren und die Infektion schlecht oder gar nicht neutralisieren (Culp *et al.*, 2007; Roden *et al.*, 1996; Selinka *et al.*, 2003). Zweitens beeinträchtigen jedoch viele Antikörper, die Epitope im DE-, FG- oder HI-Loop auf der Spitze des Kapsomers erkennen (siehe Abbildung 3.6), die primäre Interaktion mit Heparin oder der

Zelle und neutralisieren effizient (Culp *et al.*, 2007; Roden *et al.*, 1996; Selinka *et al.*, 2003). Für Influenzaviren konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Neutralisationseffizienz des Antikörpers und dem Abstand seines Epitops zur Rezeptorbindestelle gezeigt werden (Fleury *et al.*, 1999). Drittens inhibieren auch Fab-Fragmente des Antikörpers H16.56E die Bindung der Viren an Zellen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.6.1). In Bindungsassays hat die Verwendung von Fab-Fragmenten gegenüber den vollständigen IgGs den Vorteil, dass eine Inhibition der Bindung aufgrund sterischer Hinderung minimiert wird, da Fab-Fragmente (ca. 50.000  $M_r$ ) dreimal kleiner sind als IgGs (ca. 150.000  $M_r$ ). Die Inhibition der Zellbindung durch Fab-Fragmente legt daher nahe, dass die Antikörperbindungsstelle in der Nähe der Heparansulfatbindestelle liegt. Durch die monovalente Bindung der Fab-Fragmente wird außerdem ausgeschlossen, dass die Neutralisation durch *Cross-linking* von Kapsomeren oder Aggregation von Virionen herbeigeführt wird. Die Fab-Fragmente von H16.56E reduzieren die Zellbindung der Viren drastisch, jedoch in geringerem Maße als die vollständigen IgGs. Da Fab-Fragmente auf Grund der monovalenten Bindung in der Regel eine geringere Affinität als IgGs aufweisen (Schofield *et al.*, 1997), war dies zu erwarten. Entsprechende Beobachtungen wurden beispielsweise auch für bindungsneutralisierende Fab-Fragmente von Influenza A-spezifischen Antikörpern gemacht (Edwards und Dimmock, 2000). Das Epitop des Antikörpers H16.56E ist im FG-Loop auf der Spitze des Kapsomers lokalisiert (Roth *et al.*, 2006) und liegt in unmittelbarer räumlicher Nähe zu K361, was die Mutationsanalyse eindrucksvoll unterstützt.

Ein weiteres Lysin auf der Spitze des Kapsomeres, das Lysin an Position 54, wurde zwar ebenfalls mittels Mutagenese zu Alanin ausgetauscht, musste dann aber von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden, da L1-Proteine, die die entsprechende Mutation enthielten, keine intakten HPV16-Partikel bildeten. K54 befindet sich distal vom C-terminalen Ende von L1, wo Regionen identifiziert wurden, die für L1-Faltung, Zusammensetzung der Pentamere und Kapsidassembly unentbehrlich sind (Bishop *et al.*, 2007). Daher dürfte die Mutation dieses Lysins eigentlich keinen Einfluss auf die Bildung intakter Partikel haben. Es ist jedoch möglich, dass der Austausch eines positiv geladenen Lysins gegen ein ungeladenes Alanin tiefgreifende Veränderungen der Struktur oder der Funktionalität hervorrufen kann. Vielleicht führten auch Defizite bei der Expression dazu, dass die Mutante in zu geringer Menge exprimiert wurde, die unzureichend für Partikelbildung war. Weitere Defekte während der Virusmorphogenese oder ein Einfluss auf die Stabilität der eventuell gebildeten Kapsomere oder Kapside wären denkbar. Über eine Beteiligung des Lysins K54 bei der Bindung an Heparansulfat kann deshalb nur spekuliert werden. Der BC-Loop, der K54 enthält, ist Bindestelle für Antikörper, für die gegensätzliche Neutralisationsmechanismen beschrieben wurden. Während der HPV33-spezifische Antikörper

H33.J3 die Bindung von HPV-Partikeln nicht blockiert (Selinka *et al.*, 2003), sprechen Culp *et al.* (2007) von unveröffentlichten Ergebnissen, die belegen sollen, dass H16.7E, der ebenfalls im BC-Loop bindet, das Attachment von VLPs an Zellen mit hoher Effizienz inhibiert. Es wäre daher theoretisch möglich, dass auch Aminosäuren im BC-Loop, wie K54, zu primären oder sekundären Interaktionsmechanismen mit der Zelloberfläche beitragen.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass die Bindestelle für die primäre Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen von den drei Lysin K278, K356 und K361 auf der Spitze des HPV16-Kapsomers gebildet wird.

## 4.2 Basische Aminosäuren in der Grube zwischen den Kapsomeren

Die Beteiligung basischer Aminosäuren in der Grube zwischen den Kapsomeren bei der primären Interaktion mit Zellen ist umstritten. Wie bereits in Abschnitt 1.1 beschrieben, wurden zwischen den Kapsomeren Epitope neutralisierender Antikörper identifiziert, die die Zellbindung der Viren nicht blockieren (Booy *et al.*, 1998; Roden *et al.*, 1996). Bei einem dieser Antikörper handelt es sich um den HPV16-spezifischen H16.U4 (Roden *et al.*, 1996), dessen Epitop dem C-terminalen Arm des L1-Proteins zugeordnet werden konnte (Carter *et al.*, 2003). Für eben diesen Antikörper wurde jedoch kürzlich veröffentlicht, dass er sehr wohl die Bindung der Viren an die Zelloberfläche verhindert (Day *et al.*, 2007). Somit existieren konträre Meinungen, was die Fähigkeit dieses Antikörpers betrifft, die Zellbindung zu blockieren. Die Beteiligung basischer Aminosäuren in der Grube zwischen Kapsomeren, wo sich nach dem „Invading-Arm“-Modell von Modis *et al.* (2002) auch der C-terminale Arm von L1 befindet, kann daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch zwei basische Aminosäuren untersucht, die sich in der interkapsomeren Grube befinden (Arginin R97 und Lysin K443). Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4 demonstrieren, dass das Arginin an Position 97 nicht zu der primären Interaktion mit der Zelle beiträgt. Wahrscheinlich bewirkt die Lage dieser Aminosäure tief in der Spalte zwischen den Kapsomeren, dass die positive Ladung für elektrostatische Wechselwirkungen mit Heparansulfaten nicht gut zugänglich ist. Interessanterweise ist dieses Arginin bei Alpha-Papillomviren zu 100 % konserviert, was für eine hohe funktionelle Bedeutung der Aminosäure spricht. Die R97A-Mutante zeigte aber nicht nur normale Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung, sondern auch Infektiosität, die vergleichbar mit wt-Pseudovirionen war. Aufgrund der hohen Konservierung von 100% kommt diesem Arginin in authentischen Virionen wahrscheinlich eine besondere

Funktion zu, die für Pseudovirionen nicht von Bedeutung ist. Das verwendete Modellsystem stößt hier offensichtlich an seine Grenzen. Da mit Hilfe der Pseudovirionen nur bestimmte Aspekte des viralen Infektionszyklus untersucht werden können, kann über die Funktion des Arginins R97 für die authentische HPV-Infektion oder -Morphogenese nur spekuliert werden. Die Lage in einem der  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ -D, siehe Abbildung 3.2), die ohnehin relativ hohe Sequenzhomologie aufweisen, gibt darüber keinen Aufschluss. Denkbar wären beispielweise Modifikationen, die einen Einfluss auf Replikation, Transkription, Translation oder Lokalisation viraler DNA oder Proteine hätten.

Der Phänotyp der zweiten untersuchten Mutante K443A ist ebenfalls interessant. Die Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung von K443A ist nur wenig reduziert (siehe Abschnitt 3.4). Dieses Lysin scheint jedoch eine wichtige Rolle bei der Infektion der Pseudovirionen zu spielen, was durch die Reduktion der Infektiosität der Mutante um 90% bezeugt wird. Keine der anderen Einzelmutanten zeigte so drastisch reduzierte Infektiosität, obwohl K443 mit 59% Sequenzhomologie bei den Alpha-Papillomviren über keinen sehr hohen Konservierungsgrad verfügt. Die fehlende Korrelation zwischen Bindung der Mutante und Infektiosität macht deutlich, dass K443 nicht an der primären Interaktion mit Heparansulfaten der Zelloberfläche beteiligt ist. Defizite bei der Infektion müssen auf andere Defekte zurückzuführen sein. Die Beobachtung, dass K443A nur leicht reduzierte Zellbindung aufweist, ist bemerkenswert im Hinblick darauf, dass sich die Aminosäure im Epitop des bereits erwähnten, kontrovers diskutierten Antikörpers H16.U4 befindet, dem die Aminosäuren 427-445 zugeordnet werden konnten (Carter *et al.*, 2003). Day *et al.* (2007) haben erst kürzlich gezeigt, dass H16.U4 in Immunfluoreszenzen die Zellbindung von HPV16-Pseudovirionen verhindert, auch wenn die Affinität von H16.U4 sehr gering ist und für Inhibition der Zellbindung und Neutralisation der Infektion hohe Konzentrationen dieses Antikörpers eingesetzt werden müssen. Die Diskrepanz der hier beschriebenen mit denen von Day *et al.* (2007) publizierten Ergebnisse lässt sich im Hinblick auf neueste Beobachtungen folgendermaßen erklären: Es wird immer klarer, dass HPV zuerst an Komponenten der Keratinozyten-spezifischen extrazellulären Matrix (ECM) bindet (Culp *et al.*, 2006a; Culp *et al.*, 2006b; Day *et al.*, 2007; Selinka *et al.*, 2007). Dabei scheint die Affinität zur ECM höher zu sein als zur Zelloberfläche (Culp *et al.*, 2006b), obwohl sowohl in der ECM als auch auf der Zelloberfläche Heparansulfate eine entscheidende Rolle bei der Bindung von Viren zukommt (Selinka *et al.*, 2007). Es wurde außerdem gezeigt, dass einer Bindung an Heparansulfate der Zelloberfläche ein Transfer zu einem Nicht-Heparansulfat-Rezeptor folgt (Selinka *et al.*, 2007). Eine Inhibition der Interaktion mit diesem sekundären Nicht-Heparansulfat-Rezeptor durch H16.U4 könnte auf Grund der höheren Affinität für Heparansulfate in der ECM zu einem Transfer der Viren von der Zelloberfläche zur ECM führen und damit zu einem vermeintlichen Block der primären

Interaktion mit der Zelloberfläche. Eine Durchführung der Experimente in Abwesenheit von ECM könnte diese Hypothese erhärten. Es wurde bereits beschrieben, dass H16.U4 die Bindung von HPV16-VLPs an Maus-Erythrozyten nicht blockiert, was diese Interpretation der Ergebnisse unterstützt (Roden *et al.*, 1996). Berichte, dass H16.U4 weder die Fähigkeit hat, an Pseudovirionen zu binden (Culp *et al.*, 2007), noch die Infektion mit authentischen HPV16-Virionen oder Pseudovirionen zu neutralisieren (Culp *et al.*, 2007; White, 1999), lassen sich wahrscheinlich auf die geringe Affinität dieses Antikörpers zurückführen (Culp *et al.*, 2007).

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann jedenfalls nicht davon ausgegangen werden, dass K443 an der primären Interaktion mit Heparansulfaten beteiligt ist. Möglicherweise spielt es bei der sekundären Bindung eine Rolle (siehe dazu auch Abschnitt 1.4). Wie bereits vermutet wurde (Selinka *et al.*, 2007), könnten weitere Heparansulfatmoleküle an einer sekundären Interaktion beteiligt sein (siehe auch Abschnitt 1.4). Kandidaten für einen heparansulfatunabhängigen Sekundärrezeptor wären hingegen Laminin-5 und  $\alpha 6$ -Integrin, die beide schon mit der Bindung von HPV in Verbindung gebracht wurden (Culp *et al.*, 2006b; Evander *et al.*, 1997). K443 ist im C-terminalen Arm des L1-Proteins lokalisiert. Wie aus dem Atommodell von HPV16 ersichtlich (Modis *et al.*, 2002), ragt dieser in das benachbarte Kapsomer hinein, K443 liegt in dieser Konformation zwischen den Kapsomeren ungefähr auf halber Höhe in der Grube. Durch Konformationsänderung des Kapsomers, wie sie nach der primären Zellbindung von HPV33 beobachtet wurde (Giroglou *et al.*, 2001; Selinka *et al.*, 2003), könnte es zu einer besseren Zugänglichkeit der interkapsomeren Grube und somit zu Interaktionen mit sekundären Zelloberflächenmolekülen kommen. Diese Vermutung wurde aufgrund der Ergebnisse mit den Antikörpern #9 und 5B6 (siehe Abschnitt 1.1) bereits für BPV1 angestellt (Booy *et al.*, 1998). Für die K443A-Mutante wäre demnach denkbar, dass nach der primären Interaktion mit Heparansulfaten der Zelloberfläche über die drei Lysine K278, K356 und K361 auf der Kapsomerspitze die Weitergabe an ein sekundäres Rezeptormolekül blockiert ist und die Viruspartikel in einen alternativen Aufnahmeweg geleitet werden, der zum Abbau der Partikel statt zur Infektion führt. Dass die Verhinderung eines Transfers vom Heparansulfat-Rezeptor zu einem Nicht-Heparansulfat-Rezeptor zu einer nicht-infektiösen Aufnahme von Partikeln führt, konnte kürzlich unter Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren und Antikörpern bewiesen werden (Selinka *et al.*, 2007).

Zwei weitere Aminosäuren in der Grube zwischen den Kapsomeren, Arginin R74 und Lysin K82, wurden zu Alaninen mutiert, konnten aber ebenfalls nicht weiter analysiert werden. Wie zuvor bei dem Lysin K54 auf der Spitze des Kapsomers (siehe Abschnitt 1.1) führte die Mutation offensichtlich zu Defekten, die die Partikelbildung beeinflussten. Auch diese beiden Aminosäuren befanden sich in keinem der für die Formation von Kapsomeren



oder Kapsiden wichtigen Regionen (Bishop *et al.*, 2007). Ihr hoher Konservierungsgrad von 100% für das Lysin an der Position 82 bzw. 94% basische Aminosäuren an Position 74 bei den Alpha-Papillomviren spricht jedoch für ihre funktionelle Bedeutung. Über ihre Beteiligung bei der Zellbindung herrscht deshalb keine Klarheit.

### 4.3 Die Threonine auf der Spitze des Kapsomers

Die Threonine T353, T354 und T358, die auf der Spitze des Kapsomers genau zwischen den Lysinen K278, K356 und K361 lokalisiert sind, nehmen eine prominente Position ein, die überaus charakteristisch für eine Heparinbindestelle wäre (Caldwell *et al.*, 1996; Hileman *et al.*, 1998). Typischerweise sind in linearen Heparinbindedomänen die basischen Aminosäuren durch eine oder zwei, meist polare Aminosäuren voneinander getrennt (Hileman *et al.*, 1998). Wie die Ergebnisse in Abschnitt 3.5 jedoch zeigten, führte ihr Austausch zu Alaninen als Einzel-, Doppel- oder Trippelmutanten weder zu verminderter Zellbindung, noch zu reduzierter Infektiosität. Da auch keine der Aminosäuren über eine besonders hohe Sequenzhomologie verfügt (siehe Abschnitt 3.1.2), scheinen sie bei der Infektion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es wäre jedoch vorstellbar, dass sie zwar nicht direkt an der primären Interaktion mit Heparansulfaten beteiligt sind, diese aber durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisieren könnten. Es wird auch vermutet, dass die Interaktion von polaren Aminosäuren mit Heparansulfat unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken weniger der Bindung als deren Spezifität dient (Hileman *et al.*, 1998). Außer den drei Threoninen befinden sich noch einige weitere polare Aminosäuren, darunter ein Threonin, in direkter Nachbarschaft zu den drei Lysinen. Vielleicht müssten zusätzlich zu den drei Threoninen weitere Aminosäuren mutiert werden, um Defekte bei der Stabilisierung oder Spezifität der Bindung beobachten zu können, die sich auf Zellbindung und Infektiosität auswirken.

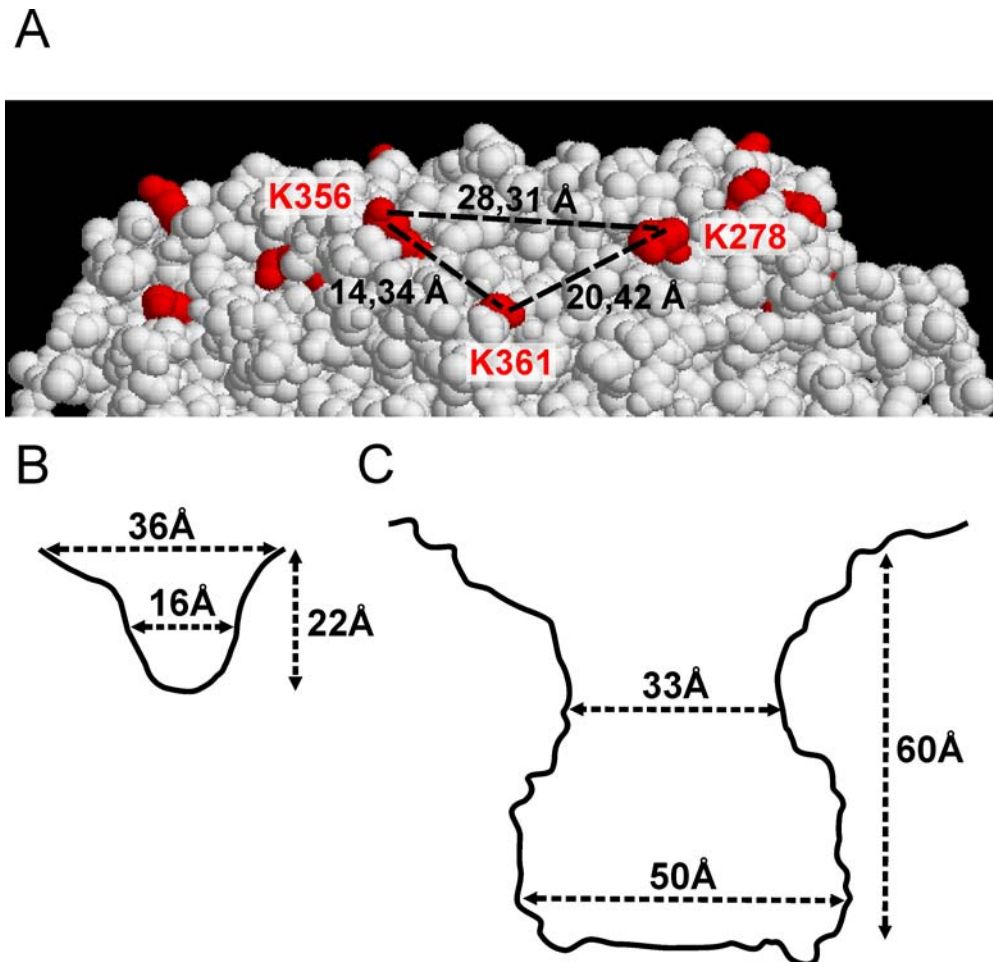
Neben basischen Aminosäuren konnten auch in der Heparansulfatbindestelle von AAV2 zahlreiche Threonine identifiziert werden, die vermutlich an der Interaktion mit Heparansulfat beteiligt sind (Kern *et al.*, 2003). Bei HPV16 bleibt daher die Lage der Threonine T353, T354 und T358 zwischen den drei Lysinen besonders charakteristisch und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Bindung an Heparansulfate auf der Spitze des Kapsomers stattfindet.

### 4.4 Topologie der Heparansulfatbindestelle

Die drei Lysine K278, K356 und K361, deren Bedeutung für Zell-, Heparin-, Heparansulfatbindung und Infektiosität der viralen Partikel in dieser Arbeit gezeigt werden konnte,

bilden ein Cluster basischer Aminosäuren auf der Oberfläche des Papillomvirkapsomers. K361 liegt auf dem Grund einer flachen Tasche, flankiert von den anderen beiden Lysininen, so dass ein kleiner positiv geladener Canyon auf der Kapsomeroberfläche entsteht. Bereits Chen *et al.* (2000) haben aufgrund ihrer Struktur diese Region auf der Kapsomerspitze als mögliche Rezeptorbindestelle vorgeschlagen. Zahlreiche Viren binden an Heparansulfatproteoglykane und viele von ihnen besitzen Bindungsdomänen, die aus in einer solchen flachen Tasche auf der Oberfläche liegenden, benachbarten basischen Aminosäuren bestehen (Fry *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2003; Mardberg *et al.*, 2001). Dies scheint ein charakteristisches Merkmal für die Interaktion von Viren mit Zuckerresten der Zelloberfläche zu sein. Auch Polyomaviren, die strukturell eng verwandt mit Papillomviren sind, weisen ein ähnliches Muster an Rezeptorbindungsstellen für Sialinsäure auf (Stehle *et al.*, 1994). Bei beiden Viren tragen benachbarte L1-, bzw. VP1-Monomere bei Polyomaviren, basische Aminosäuren zu der Rezeptorbindungsstelle bei, die sich in einer flachen Grube befindet. Zur näheren Charakterisierung der potentiellen Heparansulfatbindestelle wurden die Distanzen zwischen den drei Lysininen K278, K356 und K361 von HPV16 mit Hilfe des Programms Rasmol gemessen. Sie sind in Abbildung 4.1 A wiedergegeben. Die flache Tasche der möglichen Heparansulfatbindestelle hat somit eine Länge von 28,3 Å (K356–K278), K361 liegt von den beiden benachbarten Lysininen jeweils 14,3 Å und 20,4 Å entfernt, die Tiefe der Tasche beträgt schätzungsweise 10 Å. Margalit *et al.* (1993) untersuchten zahlreiche heparinbindende Proteine und ermittelten einen für die Bindung an Heparin idealen Abstand von 20 Å zwischen den basischen Aminosäuren. Dies entspricht genau der Distanz zwischen K361 und K278.

Wie bereits erwähnt, besitzen auch viele andere Viren flache, positiv geladene Canyons für die Interaktion mit Zuckerresten der Zelloberfläche. Besonders gut untersucht sind die Rezeptorbindestellen von Picornaviren, z. B. Poliovirus (Belnap *et al.*, 2000), humane Rhinoviren (HRV) -14 und -16 (Colonno *et al.*, 1988; Olson *et al.*, 1993), Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV) (Fry *et al.*, 1999) und Coxsackieviren A21 und B (He *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Diese Viren binden an Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie und bilden strukturell ähnliche kleine Canyons auf der Oberfläche. In Abbildung 4.1 B ist der für HRV14 identifizierte Canyon schematisch dargestellt. Es handelt sich um eine 36 Å breite und 22 Å tiefe Mulde, die sich nach unten hin verengt. Die Identifizierung dieses Canyons auf der Kapsomeroberfläche von HRV14 (Rossmann *et al.*, 1985) veranlassten Luo *et al.* (1987) zur Veröffentlichung der „Canyon-Hypothese“, nachdem sie bei Mengoviren eine ähnliche Struktur entdeckt hatten. Demnach versuchen Picornaviren einer Immunantwort zu entgehen, dadurch dass ihre Rezeptorbindungsstellen in schmalen Vertiefungen auf der Oberfläche liegen. Diese Canyons sind zu schmal, um von Antikörpern erkannt zu werden, aber groß genug, um die Bindung kleinerer zellulärer



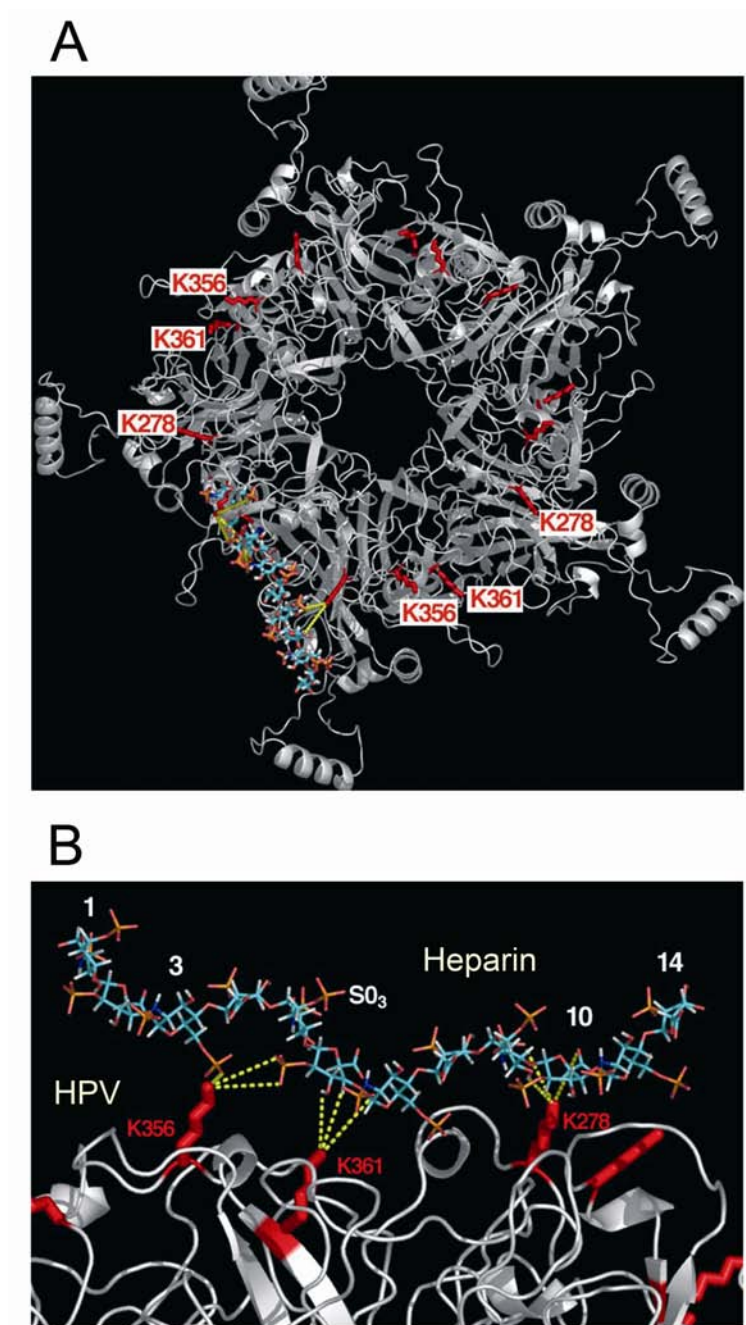
**Abbildung 4.1:** Vergleich der Dimensionen verschiedener Kapsidregionen bei HPV16 und HRV14. (A) Bestimmung der Abstände zwischen den drei in dieser Arbeit untersuchten Lysinen auf der Kapsidoberfläche von HPV16. Für die Messungen wurde das Programm Rasmol verwendet. (B) Schematische Darstellung der Rezeptorbindestelle von HRV14. Abbildung nach Colonno *et al.* (1988). (C) Schematische Darstellung der interkapsomeren Grube von HPV16. Die Messungen sind mit dem Programm Rasmol durchgeführt worden und aufgrund der dreidimensionalen Struktur des Kapsids nur Annäherungen.

Rezeptormoleküle zu ermöglichen. Daher können Aminosäuren auf dem Grund der Tasche einen höheren Konservierungsstatus beibehalten, was für die Wirtszellerkennung und -spezifität wichtig ist. Day *et al.* (2007) griffen diese Hypothese auf und postulierten, dass für Papillomviren die Grube zwischen den Kapsomeren die Heparansulfatbindestelle sein könnte, da es sich ebenfalls um einen Canyon handelt. Wie allerdings in Abbildung 4.1 B und C deutlich erkennbar ist, unterscheiden sich die Dimensionen erheblich. Außerdem wurden bereits Antikörper isoliert, die Strukturen in dieser Grube erkennen, u. a. H16.U4. Die interkapsomere Grube von HPV ist beinahe dreimal so tief und sehr viel breiter als der HRV14-Canyon. Weiterhin tragen basische Aminosäuren in dieser Region, wie bereits in Abschnitt 1.2 diskutiert, kaum zu der Bindung an Heparansulfate bei. Die von den Lysin K278, K356 und K361 gebildete Tasche auf der Spitze des Kapsomers entspricht jedoch ziemlich genau den oben genannten Proportionen, zumal auch bei HRV16 die Rezeptorbindestelle etwas schmaler und nur etwa 12 Å tief ist (Olson *et al.*, 1993). Darüber hinaus weist K361, das auf dem Grund der Vertiefung liegt, einen Konservierungsgrad von 96% auf und zeigte als Einzelmutante jeweils die schwächste Bindung und Infektiosität. Es scheint somit aufgrund der Lage und des Abstands zu den anderen beiden Lysin die zentrale Aminosäure bei der Interaktion mit Heparansulfaten zu sein. Der kleine Canyon auf der HPV16-Oberfläche mit dem darin liegenden Lysin K361 könnte also ebenso einen Schutz der Heparansulfatbindestelle vor einer Immunantwort bewirken.

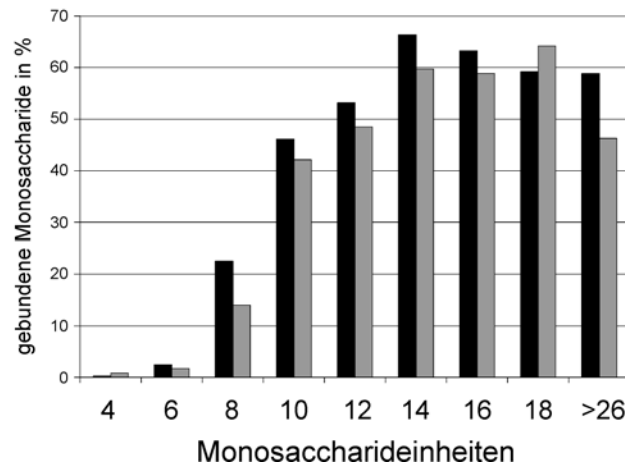
Vergleicht man die in dieser Arbeit untersuchte mögliche Heparansulfatbindestelle mit in der Literatur veröffentlichten Heparin- oder Heparansulfatbindestellen, so wird deutlich, dass viele der in der flachen Tasche auf der HPV16-Kapsomeroberfläche vorkommenden Aminosäuren typisch sind. Da die Interaktion mit Glykosaminoglykanen meist über elektrostatische Wechselwirkungen stattfindet, sind Arginine und Lysine, nicht jedoch Histidine, die häufigsten Aminosäuren. Während in Heparinbindestellen Arginine am häufigsten vertreten sind, überwiegen in Heparansulfatbindestellen Lysine (Caldwell *et al.*, 1996; Fromm *et al.*, 1997). In den meisten Fällen bilden ein, zwei oder drei Lysine oder Arginine ein basisches Cluster. Bis zu fünf andere Aminosäuren können zwischen ihnen liegen, gewöhnlich werden sie jedoch nur von einer oder zwei nicht-basischen, meist polaren Aminosäuren unterbrochen (Fromm *et al.*, 1997). Auf der Kapsomeroberfläche sind zwischen K356 und K361 zwei weitere Aminosäuren lokalisiert, zwischen K361 und K278 liegen vier Aminosäuren und zwischen K278 und K356 befinden sich wiederum zwei Aminosäuren. Aufgrund der niedrigeren Ladungsdichte von Heparansulfat (durchschnittlich 0,6-1 Sulfatrest pro Heparansulfatdisaccharid gegenüber 2,7 Sulfatresten pro Heparindisaccharid) liegen die basischen Aminosäuren in Heparansulfatbindestellen in der Regel weiter auseinander als in Heparinbindestellen (Fromm *et al.*, 1997). Von den insgesamt acht Aminosäuren, die zwischen den Lysin liegen, sind vier Threonine (an den Positionen

266, 353, 354 und 358), von denen die drei am nächsten liegenden ebenfalls in dieser Arbeit untersucht und diskutiert wurden (siehe Abschnitt 1.3). Bei einer weiteren Aminosäure handelt es sich um ein Leucin, das ebenfalls bevorzugt in bekannten Heparinbindestellen vorkommt (Caldwell *et al.*, 1996). Ein weiteres ist ein Asparagin, dem Thompson *et al.* (1994) eine besondere Bedeutung bei der Interaktion mit Heparin zuschreiben. Auffälligerweise befindet sich direkt unter oder neben jedem der drei Lysine ein Tyrosin (Positionen 276, 355 und 363). Neben Lysinen und Argininen sind Tyrosine die am häufigsten vorkommenden Aminosäuren in Heparinbindestellen. Auch wenn nicht alle dieser in der Nähe der drei Lysine vorkommenden Tyrosine direkt oberflächenexponiert zu sein scheinen, kann man spekulieren, dass sie eventuell über ihre phenolische Hydroxylgruppe Wasserstoffbrücken mit dem Glykosaminoglykanmolekül ausbilden könnten (Hileman *et al.*, 1998). Eine andere Vermutung ist, dass Tyrosine hydrophobe Wechselwirkungen mit den N-Acetylgruppen der Glukosamine des Heparansulfats vermitteln und deshalb so häufig in Heparinbindestellen vorkommen (Bae *et al.*, 1994). Diese Eigenschaft wird auch Leucinen zugeordnet, von denen sich, wie oben bereits erwähnt, ebenfalls eins zwischen K361 und K278 befindet. Schließlich ist direkt neben K356 ein Glutaminsäurerest lokalisiert (Position 352) und in der Nähe von K278 zwei Asparaginsäurereste (Positionen 273 und 274). Diese sauren Aminosäuren könnten wiederum eine Ladungsneutralisation der basischen Aminosäuren in Abwesenheit gebundener Glykosaminoglykanmoleküle bewirken. Ein solcher Mechanismus wird für die Heparansulfatbindestelle von AAV2 vermutet (Kern *et al.*, 2003). Da diese Ladungsneutralisation nach der Interaktion des Kapsids mit Heparansulfat nicht mehr benötigt wird, könnte es nach der Bindung zu einer Konformationsänderung innerhalb des Kapsids kommen, die verhindert, dass die sauren Aminosäuren die Heparinbindung beeinträchtigen. Eine Konformationsänderung wurde auch für das Kapsid von HPV33 beobachtet, was sich dadurch zeigt, dass es nach Zellbindung zu dem Übergang von einem heparinsensitiven in einen heparinresistenten Zustand kommt (Selinka *et al.*, 2003). Allerdings ist bislang nicht bekannt, welche Regionen des Kapsids in diese Konformationsänderung involviert sind.

Um die Topologie der Interaktion von Heparin mit der möglichen Heparansulfatbindestelle eingehender zu untersuchen, wurde in Kooperation mit X. Chen (University of Southern California, Los Angeles) auf der Grundlage der Kristallstruktur des HPV16-Kapsomers (Chen *et al.*, 2000; Modis *et al.*, 2002) eine Computersimulation der Bindung eines Heparinmoleküls an die drei Lysine K278, K356 und K361 erstellt (Abbildung 4.2 AB). Dieses Computermodell zeigt nun, dass ein enger Kontakt zwischen dem Heparinmolekül und den Lysinen strukturell möglich ist. Das Heparin ist zudem in der Lage, mit allen drei Lysinen gleichzeitig zu interagieren. Das Computermodell unterstützt somit die



**Abbildung 4.2:** Computersimulation der Interaktion eines Heparinmoleküls mit der HPV16-Kapsomeroberfläche. Das Computermodell wurde von X. Chen (University of Southern California, Los Angeles) zur Verfügung gestellt. (A) Aufsicht auf ein L1-Pentamer mit einem angelagerten, aus 14 Oligosacchariden bestehenden Heparin. (B) Seitenansicht mit Details der Interaktion. Das Modell zeigt, dass ein enger Kontakt mit Heparin und den Lysin K278, K356 und K361 möglich ist.



**Abbildung 4.3:** Bindung von Heparinoligosacchariden unterschiedlicher Länge an HPV16-VLPs.  $^3\text{H}$ -markierte Heparinoligosaccharide wurden mit HPV16-VLPs inkubiert, danach wurden die Proteine an Nitrocellulosefilter fixiert und die gebundene Radioaktivität detektiert. Ein Minimum von acht Monosaccharideinheiten wird für die HPV-Bindung benötigt. Mit längeren Fragmenten nahm die Bindung weiter zu, bei Heparinoligomeren aus 14 Einheiten war ein Bindungsmaximum erreicht. Mit 18 und mehr Monosaccharideinheiten begann die Bindung wieder abzunehmen. Die schwarzen und grauen Balken entsprechen zwei separat durchgeführten Versuchen. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von U. Lindahl (Uppsala University).

Hypothese, dass die primäre Heparansulfatbindestelle von den Lysinen K278, K356 und K361 gebildet wird.

Wie man weiterhin erkennen kann, ist ein aus acht Monosacchariden bestehendes Heparinmolekül in der Lage, die Distanz zwischen K356 und K278 zu überspannen. Ein längeres Molekül könnte an den drei Lysinen entlang gleiten, was die Wahrscheinlichkeit der Bindung in der Tasche zusätzlich erhöhen würde. Wenn das Heparinmolekül jedoch noch länger wäre, würde die Entropie der Bindung durch die losen Enden ansteigen. Dies könnte die bessere Bindungsfähigkeit längerer Heparinmoleküle wieder aufheben und die Wahrscheinlichkeit der Bindung sogar reduzieren, wenn das Heparinmolekül aus 16 Monomeren oder mehr besteht.

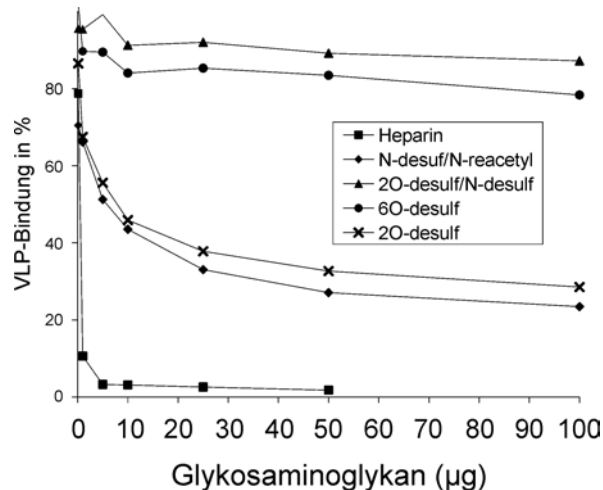
Um diese Erkenntnis weitergehend zu untersuchen, wurden in Kooperation mit S. Bodevin und U. Lindahl (Uppsala University) diesbezüglich zusätzliche Versuche durchgeführt.  $^3\text{H}$ -markierte Heparinoligosaccharide definierter Länge wurden mit HPV16-VLPs inkubiert, im Anschluss konnte gemessen werden, welche Oligosaccharide an die Viruspartikel gebunden hatten (siehe Abbildung 4.3). Diese Ergebnisse stimmten sehr gut mit denen des Computermodells überein (siehe Abbildung 4.2 B). Das kürzeste Heparinfragment, das die Fähigkeit hatte an VLPs zu binden, war ein Oktamer. Der Anteil gebundener Oligosaccharide nahm durch die Verwendung längerer Heparinoligomere schrittweise zu, ein Bindungsmaximum wurde mit 14 Einheiten erreicht. Mit 18 oder mehr Monosaccha-

rideinheiten begann die Bindung, wahrscheinlich aufgrund der zusätzlichen Entropie an beiden Enden des gebundenen Heparinmoleküls, wieder abzunehmen. Ähnliche Bedingungen für die Bindung von Heparinoligomeren wurden bereits für Herpes Simplex Virus Typ1 (HSV1) und Pseudorabies-Viren gefunden (Trybala *et al.*, 1996; WuDunn und Spear, 1989)

Nicht nur die Länge der Heparinmoleküle ist für die Bindung wichtig, auch die Beteiligung von Sulfatgruppen an unterschiedlichen Positionen im Glykosaminoglykanmolekül ist entscheidend. Für die Bindung von HSV1 beispielsweise sind 2O- und 6O-Sulfatierungen ausschlaggebend (Feyzi *et al.*, 1997), wohingegen Internalisierung und Infektion von 3O-sulfatierten Glukosaminresten vorangetrieben werden (Shukla *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 2004). Der Bedarf bestimmter Kombinationen von Sulfatgruppen an unterschiedlichen Positionen im Heparansulfat konnte ebenfalls für das Glycoprotein C von Pseudorabies-Viren ermittelt werden (Trybala *et al.*, 1996). Auch anhand der Computersimulation der Bindung (Abbildung 4.2 B) ist die Beteiligung verschiedener Sulfatgruppen des Heparinmoleküls an der Interaktion mit der Kapsomeroberfläche erkennbar. Es zeigt die Zugänglichkeit von 2O-, 6O- und N-Sulfaten. Um spezifische Anforderungen verschiedener Sulfatgruppen bei der Interaktion von VLPs und Heparin zu untersuchen, wurden von S. Bodevin und U. Lindahl (Uppsala University) wiederum entsprechende Versuche durchgeführt. Dafür wurde die Bindung von VLPs an radioaktiv markiertes Heparin in Anwesenheit verschiedener unmarkierter Heparinderivate gemessen. Wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, war vollsulfatiertes Heparin am besten in der Lage, die Bindung der VLPs an das markierte Heparin zu inhibieren. Auch N- und 2O-desulfatiertes Heparin zeigte noch relativ gute Inhibition. Heparinderivate, denen entweder 6O-Sulfate oder sowohl 2O- als auch N-Sulfate fehlten, konnten dagegen nicht mit unmodifiziertem Heparin um die Bindung konkurrieren. Diese Ergebnisse deuten an, dass Sulfatgruppen an den 2O-, N- und vor allem den 6O-Positionen des Heparansulfats für die Interaktion mit HPV verantwortlich sind und bestätigen somit frühere Vermutungen, dass unterschiedlich sulfatierte Domänen innerhalb der Heparansulfatketten primäre Rezeptoren für HPV darstellen (Giroglou *et al.*, 2001; Selinka *et al.*, 2003).

Die drei Lysine, die in der flachen Tasche auf der Spitze des Kapsomers liegen, bilden eine ideale Bindedomäne für diese Rezeptormoleküle. Die Tatsache, dass die Entfernung von 2O- oder N-Sulfatgruppen die Bindung an Heparin nur teilweise unterdrückt, könnte aber dafür sprechen, dass eine weitere Heparansulfatbindestelle existiert. Dies würde mit neuesten Erkenntnissen übereinstimmen, die besagen, dass für eine erfolgreiche Infektion die primäre Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen, gefolgt von der sekundären Interaktion mit zusätzlichen Heparansulfatseitenketten und möglicherweise dem Transfer an einen heparansulfatunabhängigen Rezeptor essentiell ist (Selinka *et al.*, 2007). Wie be-





**Abbildung 4.4:** Interaktion von HPV16-VLPs mit modifizierten Heparinen. Verschiedene unmarkierte, selektiv desulfatierte Heparinderivate (natives Heparin (■), N- (◆), 2O- (×), 6O- (●) und 2O-/N-desulfatiertes Heparin (▲)) wurden zusammen mit nativem  $^3\text{H}$ -markiertem Heparin und HPV16-Partikeln inkubiert. Danach wurden die Proteine an Nitrocellulosefilter fixiert und die gebundene Radioaktivität detektiert. Maximale Reduktion der Bindung wurde mit 6O-desulfatiertem oder 2O-/N-desulfatiertem Heparin erreicht. Die Abbildung wurde zur Verfügung gestellt von U. Lindahl (Uppsala University).

reits in Abschnitt 4.2 diskutiert, könnten sekundäre Interaktionen über Aminosäuren des C-terminalen Arms in der interkapsomeren Grube stattfinden. Die Ergebnisse der computersimulierten Heparinbindung (Abbildung 4.2) und des Bindungsassays mit unterschiedlich sulfatierten Heparinfragmenten (Abbildung 4.4) sollten jedoch mit Vorsicht interpretiert werden. Der Heparansulfatrezeptor auf der Zelloberfläche hat eine viel variabelere und heterogene Struktur als Heparin. Einheiten von vier oder mehr aufeinanderfolgenden, vollständig N- und O-sulfatierten Disacchariden sind in Heparansulfaten sehr selten. Stattdessen könnten zusammengesetzte Interaktionsstellen von kurzen N-sulfatierten Domänen, die von N-acetylierten Sequenzen unterbrochen sind („SAS“-Domänen (Kreuger *et al.*, 2002)), gebildet werden. Die dreidimensionale Struktur dieser Domänen ist noch unbekannt und wird durch die helikale Form eines Heparinmoleküls (Mulloy *et al.*, 1993), welches für das Computermodell verwendet wurde, nur unzureichend dargestellt. Tatsächlich sprechen auch die Interaktionen von HPV mit anderen sulfatierten Polysacchariden, z. B. Carrageenan (Buck *et al.*, 2006) oder Chondroitinsulfat E (unveröffentlichte Ergebnisse von U. Lindahl), gegen den strikten Bedarf einer definierten Saccharidsequenz. Stattdessen würde die Rolle der Heparansulfate auf der Zelloberfläche als Interaktionsstelle für HPV stark von der Organisation N-sulfatierter Domänen entlang der Polysaccharidkette abhängen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die von den Lysinen K278, K356 und K361 auf der Kapsomeroberfläche gebildete flache Tasche strukturell viele Merkmale ei-

ner Heparin- oder Heparansulfatbindestelle aufweist und der Rezeptorbindestelle vieler, auch verwandter Viren entspricht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindungsassays, sowie Infektionsassays unterstreichen die Bedeutung dieser Lysine bei der primären Interaktion von HPV16 mit Heparansulfaten. Dies konnte durch die Computersimulation der Interaktion der Virusoberfläche mit einem Heparinmolekül bestätigt werden. Des Weiteren konnten Anforderungen ermittelt werden, die eine solche Interaktion an das Heparinmolekül stellt. Basische Aminosäuren in der interkapsomeren Grube scheinen hingegen an der primären Zellbindung an Heparansulfate nicht beteiligt zu sein, könnten aber eine Rolle bei sekundären Interaktionen mit der Zelloberfläche spielen.

## 4.5 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei Lysine auf der Spitze des Kapsomers die Bindestelle für die primäre Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen der Zelloberfläche bilden. Dennoch sind einige Aspekte offen geblieben oder werfen neue Fragen auf. Da im Rahmen dieser Arbeit nur für HPV16 die Heparansulfatbindestelle identifiziert werden konnte, wäre die Analyse homologer basischer Aminosäuren in anderen Papillomvirustypen aufschlussreich. So könnte überprüft werden, ob die für HPV16 gefundenen Lysine die universelle Heparansulfatbindestelle von Papillomviren bilden oder ob bei anderen Typen andere Kapsidregionen involviert sind. In dieser Hinsicht wäre es auch interessant, inwieweit sich die mit dem Pseudovirionensystem gewonnenen Erkenntnisse auf authentische Virionen bzw. andere Modellsysteme übertragen lassen. Mutationsanalysen mit Tiermodellen, wie z. B. Kaninchen oder Hunden, können zukünftig neue Ergebnisse liefern.

Wie sich ebenfalls gezeigt hat, ist das Lysin K443 in der interkapsomeren Grube zwar nicht an der Zellbindung der Pseudovirionen beteiligt, die Mutation bewirkte jedoch drastisch reduzierte Infektiosität der Partikel. Diese Aminosäure spielt somit auf jeden Fall eine wichtige Rolle im Infektionszyklus der Viren und sollte deshalb weiter untersucht werden. Es wird vermutet, dass sie in die Interaktion mit heparansulfatabhängigen oder -unabhängigen sekundären Bindungspartnern involviert sein könnte. Da die Zellbindung einer der ersten Schritte der Interaktion von Viren mit ihrem Wirtsorganismus ist, könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die primäre Heparansulfatbindestelle natürlich auch hilfreich bei der Entwicklung und Untersuchung antiviraler Therapien, wie z. B. Attachment-Inhibitoren, sein. Somit ist mit den Ergebnissen dieser Dissertation die Grundlage für ein besseres Verständnis der Infektion von humanen Papillomviren auf zellbiologischer Ebene geschaffen.

*Finis coronat opus.  
Das Ende krönt das Werk.*

Ovid

# 5

## Zusammenfassung

In 99,7% aller Zervixkarzinome kann die DNA humaner Papillomviren (HPV) nachgewiesen werden, die somit den Hauptauslöser für eine der häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen weltweit darstellen. HPV16 ist verantwortlich für etwa 50% aller Zervixkarzinome. Für die Infektion von Zellen mit HPV16 ist die Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen der Zelloberfläche essentiell. Um Aminosäuren auf der Oberfläche des majoren Kapsidproteins L1 von HPV16 zu identifizieren, die zu dieser Interaktion beitragen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Punktmutanten hergestellt und analysiert. Der Austausch der drei Lysine K278, K356 und K361 zu Alaninen führte zu signifikant verminderter Zell-, Heparin- und Heparansulfatbindung, die noch weiter reduziert wurde, wenn zwei oder drei der Lysine gleichzeitig mutiert waren. Auch die Infektiosität der mutanten Pseudovirionen war stark beeinträchtigt, die Trippelmutante zeigte nur noch 5% Infektiosität. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die drei Lysine gemeinsam die Bindestelle für Heparansulfate bilden. Ihr Austausch zu Argininen beeinflusste die Infektiosität der Partikel hingegen nicht, was bestätigt, dass die Interaktion mit Heparansulfaten von der positiven Ladungsdichte abhängt und nicht sequenzspezifisch ist. Die drei Lysine befinden sich auf der Spitze des HPV16-Kapsomers in einer flachen Tasche, die aufgrund ihrer Struktur bereits früher als potentielle Rezeptorbindestelle vorgeschlagen wurde. Fab-Fragmente des bindungsneutralisierenden Antikörpers H16.56E, dessen Epitop in direkter Nachbarschaft der Lysine liegt, inhibierten die heparansulfatvermittelte Zellbindung viraler Partikel. Auch Epitope anderer bindungsneutralisierender Antikörper befinden sich in der Nähe. Dies untermauert die Hypothese, dass die Lysine K278, K356 und K361 die Heparansulfatbindestelle von HPV16 bilden. Der Austausch von Threoninen, die genau zwischen den Lysinen liegen, hatte keine Auswirkung auf Bindung der Partikel und Infektiosität. Sie könnten jedoch durch die Bildung von Wasserstoffbrücken die Bindung an Heparansulfat stabilisieren. Die Bedeutung der Lysine K278, K356 und K361 bei der

primären Interaktion von HPV16 mit Heparansulfaten konnte durch die Computersimulation der Interaktion der Virusoberfläche mit einem Heparinmolekül bestätigt werden. Des Weiteren konnten Anforderungen ermittelt werden, die eine solche Interaktion an das Heparinmolekül stellt. Weiterhin zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass basische Aminosäuren in der interkapsomeren Grube nicht an der primären Zellbindung an Heparansulfate beteiligt zu sein scheinen, aber eine Rolle bei sekundären Interaktionen mit der Zelloberfläche spielen könnten.

*Wir sind wie Zwerge,  
die auf den Schultern  
von Riesen sitzen.*

Bernhard von Chartres

# 6

## Referenzen

- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L., und McCance, D. J. (1996), 'The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors', *EMBO J*, 15 (8), 1950-60.
- Bae, J., Desai, U. R., Pervin, A., Caldwell, E. E., Weiler, J. M., und Linhardt, R. J. (1994), 'Interaction of heparin with synthetic antithrombin III peptide analogues', *Biochem J*, 301 ( Pt 1), 121-29.
- Becker, Katrin A., Florin, Luise, Sapp, Cornelia, Maul, Gerd G., und Sapp, Martin (2004), 'Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles', *J Virol*, 78 (3), 1121-28.
- Belnap, D. M., Olson, N. H., Cladel, N. M., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Kreider, J. W., Christensen, N. D., und Baker, T. S. (1996), 'Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids', *J Mol Biol*, 259 (2), 249-63.
- Belnap, D. M., McDermott, B. M., Filman, D. J., Cheng, N., Trus, B. L., Zuccola, H. J., Racaniello, V. R., Hogle, J. M., und Steven, A. C. (2000), 'Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (1), 73-78.
- Bergsdorf, Christian, Beyer, Carsten, Umansky, Viktor, Werr, Margaret, und Sapp, Martin (2003), 'Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles', *FEBS Lett*, 536 (1-3), 120-24.
- Bertz, Joachim, Giersiepen, Klaus, Haberland, Jörg, Hentschel, Stefan, Kaatsch, Peter, Katalinic, Alexander, Stabenow, Roland, Stegmaier, Christa, und Ziegler, Hartwig (2006), *Krebs in Deutschland* (5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe edn.; Saarbrücken: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), Robert Koch-Institut (RKI)).
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979), 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Res*, 7 (6), 1513-23.
- Bishop, Brooke, Dasgupta, Jhimli, und Chen, Xiaojiang S. (2007), 'Structure-based engineering of papillomavirus major capsid II: controlling particle assembly', *Virol J*, 4, 3-3.
- Bonnez, W. und Reichmann, R.C. (2000), 'Papillomaviruses', in G.L. Mandell, J.E. Bennet, und R. Dolin (eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (New York: Churchill Livingstone), 1630-44.

- Booy, F. P., Roden, R. B., Greenstone, H. L., Schiller, J. T., und Trus, B. L. (1998), 'Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution', *J Mol Biol*, 281 (1), 95-106.
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., und zur Hausen, H. (1984), 'A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer', *EMBO J*, 3 (5), 1151-57.
- Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., und Kouzarides, T. (1999), 'The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth', *EMBO J*, 18 (9), 2449-58.
- Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (2004), 'Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors', *J Virol*, 78 (2), 751-57.
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y. Y. S., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (2005), 'Maturation of papillomavirus capsids', *Journal of Virology*, 79 (5), 2839-46.
- Buck, Christopher B., Thompson, Cynthia D., Roberts, Jeffrey N., Muller, Martin, Lowy, Douglas R., und Schiller, John T. (2006), 'Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection', *PLoS Pathog*, 2 (7).
- Caldwell, E. E., Nadkarni, V. D., Fromm, J. R., Linhardt, R. J., und Weiler, J. M. (1996), 'Importance of specific amino acids in protein binding sites for heparin and heparan sulfate', *Int J Biochem Cell Biol*, 28 (2), 203-16.
- Cardin, A. D. und Weintraub, H. J. (1989), 'Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions', *Arteriosclerosis*, 9 (1), 21-32.
- Carpentier, Guillaume S., Fleury, Maxime J. J., Touze, Antoine, Sadeyen, Jean-Remy, Tourne, Sylvie, Sizaret, Pierre-Yves, und Coursaget, Pierre (2005), 'Mutations on the FG surface loop of human papillomavirus type 16 major capsid protein affect recognition by both type-specific neutralizing antibodies and cross-reactive antibodies', *J Med Virol*, 77 (4), 558-65.
- Carter, Joseph J., Wipf, Greg C., Benki, Sarah F., Christensen, Neil D., und Galloway, Denise A. (2003), 'Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1', *J Virol*, 77 (21), 11625-32.
- Carter, Joseph J., Wipf, Greg C., Madeleine, Margaret M., Schwartz, Stephen M., Koutsky, Laura A., und Galloway, Denise A. (2006), 'Identification of human papillomavirus type 16 L1 surface loops required for neutralization by human sera', *J Virol*, 80 (10), 4664-72.
- Castle, Philip E. (2004), 'Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer', *J Low Genit Tract Dis*, 8 (3), 224-30.
- Chan, S. Y., Delius, H., Halpern, A. L., und Bernard, H. U. (1995), 'Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy', *J Virol*, 69 (5), 3074-83.
- Chen, E. Y., Howley, P. M., Levinson, A. D., und Seeburg, P. H. (1982), 'The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome', *Nature*, 299 (5883), 529-34.
- Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., und Harrison, S. C. (2000), 'Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16', *Mol Cell*, 5 (3), 557-67.

- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. E., Fromm, J. R., Esko, J. D., Linhardt, R. J., und Marks, R. M. (1997), 'Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate', *Nat Med*, 3 (8), 866-71.
- Chow, L. T. und Broker, T. R. (1997), 'In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences', *Clin Dermatol*, 15 (2), 217-27.
- Christensen, N. D., Cladel, N. M., Reed, C. A., Budgeon, L. R., Embers, M. E., Skulsky, D. M., McClements, W. L., Ludmerer, S. W., und Jansen, K. U. (2001), 'Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types', *Virology*, 291 (2), 324-34.
- Ciuffo, G. (1907), 'Innesto positivo con filtrato di verruca vulgare (Cell-free transmission of warts in humans).' *G. Ital. Mal. Venereol.*, 48, 12-17.
- Colonna, R. J., Condra, J. H., Mizutani, S., Callahan, P. L., Davies, M. E., und Murcko, M. A. (1988), 'Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (15), 5449-53.
- Combata, A. L., Touze, A., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y., Munoz, N., und Coursaget, P. (2001), 'Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate', *FEMS Microbiol Lett*, 204 (1), 183-88.
- Compton, T., Nowlin, D.M., und Cooper, N.R. (1993), 'Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.' *Virology*, 193 (2), 834-41.
- Crusius, K., Rodriguez, I., und Alonso, A. (2000), 'The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes', *Virus Genes*, 20 (1), 65-69.
- Culp, T. D., Budgeon, L. R., und Christensen, N. D. (2006a), 'Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor', *Virology*, 347 (1), 147-59.
- Culp, T. D., Spatz, C. M., Reed, C. A., und Christensen, N. D. (2007), 'Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragments, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles', *Virology*.
- Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G., und Christensen, N. D. (2006b), 'Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells', *Journal of Virology*, 80 (18), 8940-50.
- Cuschieri, K. S., Cubie, H. A., Whitley, M. W., Seagar, A. L., Arends, M. J., Moore, C., Gilkisson, G., und McGoogan, E. (2004), 'Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population', *J Clin Pathol*, 57 (1), 68-72.
- Davy, Clare E., Jackson, Deborah J., Wang, Qian, Raj, Kenneth, Masterson, Phillip J., Fenner, Nicola F., Southern, Shirley, Cuthill, Scott, Millar, Jonathan B. A., und Doorbar, John (2002), 'Identification of a G(2) arrest domain in the E1E4 protein of human papillomavirus type 16', *J Virol*, 76 (19), 9806-18.
- Davy, Clare E., Jackson, Deborah J., Raj, Kenneth, Peh, Woei Ling, Southern, Shirley A., Das, Papia, Sorathia, Rina, Laskey, Peter, Middleton, Kate, Nakahara, Tomomi, Wang, Qian, Masterson, Phillip J., Lambert, Paul F., Cuthill, Scott, Millar, Jonathan B. A.,

- und Doorbar, John (2005), 'Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes', *J Virol*, 79 (7), 3998-4011.
- Day, Roden, R. B., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1998), 'The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains', *J Virol*, 72 (1), 142-50.
- Day, P. M., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (2003), 'Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway', *Virology*, 307 (1), 1-11.
- Day, Patricia M., Baker, Carl C., Lowy, Douglas R., und Schiller, John T. (2004), 'Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (39), 14252-57.
- Day, Patricia M., Thompson, Cynthia D., Buck, Christopher B., Pang, Yuk-Ying S., Lowy, Douglas R., und Schiller, John T. (2007), 'Neutralization of human papillomavirus with monoclonal antibodies reveals different mechanisms of inhibition', *J Virol*.
- de Villiers, Ethel-Michele, Fauquet, Claude, Broker, Thomas R., Bernard, Hans-Ulrich, und zur Hausen, Harald (2004), 'Classification of papillomaviruses.' *Virology*, 324 (1), 17-27.
- Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., und Thierry, F. (1998), 'The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2', *Virology*, 242 (2), 378-86.
- Dimitrov, Dimiter S. (2004), 'Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications.' *Nat Rev Microbiol*, 2 (2), 109-22.
- Doorbar, J. (2006), 'Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer', *Clin Sci (Lond)*, 110 (5), 525-41.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., und Crawford, L. (1991), 'Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network', *Nature*, 352 (6338), 824-27.
- Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., und zur Hausen, H. (1983), 'A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (12), 3812-15.
- Edwards, M. J. und Dimmock, N. J. (2000), 'Two influenza A virus-specific Fabs neutralize by inhibiting virus attachment to target cells, while neutralization by their IgGs is complex and occurs simultaneously through fusion inhibition and attachment inhibition', *Virology*, 278 (2), 423-35.
- Esko, J.D. und Lindahl, U. (2001), 'Molecular diversity of heparan sulfate.' *J Clin Invest*, 108 (2), 169-73.
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., und McMillan, N. A. (1997), 'Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses', *J Virol*, 71 (3), 2449-56.
- Feyzi, E., Trybala, E., Bergstrom, T., Lindahl, U., und Spillmann, D. (1997), 'Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C.' *J Biol Chem*, 272 (40), 24850-57.
- Finnen, Renee L., Erickson, Kimberly D., Chen, Xiaojiang S., und Garcea, Robert L. (2003), 'Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins', *J Virol*, 77 (8), 4818-26.



- Fleury, D., Barrere, B., Bizebard, T., Daniels, R. S., Skehel, J. J., und Knossow, M. (1999), 'A complex of influenza hemagglutinin with a neutralizing antibody that binds outside the virus receptor binding site', *Nat Struct Biol*, 6 (6), 530-34.
- Fromm, J. R., Hileman, R. E., Caldwell, E. E., Weiler, J. M., und Linhardt, R. J. (1995), 'Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor', *Arch Biochem Biophys*, 323 (2), 279-87.
- Fromm, J. R., Hileman, R. E., Caldwell, E. E., Weiler, J. M., und Linhardt, R. J. (1997), 'Pattern and spacing of basic amino acids in heparin binding sites', *Arch Biochem Biophys*, 343 (1), 92-9100.
- Fry, E.E., Lea, S.M., Jackson, T., Newman, J.W., Ellard, F.M., Blakemore, W.E., Abu-Ghazaleh, R., Samuel, A., King, A.M., und Stuart, D.I. (1999), 'The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex.' *EMBO J*, 18 (3), 543-54.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., und Galloway, D. A. (1997), 'Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein', *Genes Dev*, 11 (16), 2090-100.
- Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., und Sapp, M. (2001), 'Human papilloma-virus infection requires cell surface heparan sulfate', *J Virol*, 75 (3), 1565-70.
- Gissmann, L., Pfister, H., und Zur Hausen, H. (1977), 'Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates', *Virology*, 76 (2), 569-80.
- Gluzman, Y. (1981), 'SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants', *Cell*, 23 (1), 175-82.
- Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S., und Galloway, D. A. (1994), 'Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids', *J Virol*, 68 (7), 4503-05.
- Hanahan, D. (1983), 'Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids', *J Mol Biol*, 166 (4), 557-80.
- Handa, A., Muramatsu, S., Qiu, J., Mizukami, H., und Brown, K. E. (2000), 'Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors', *J Gen Virol*, 81 (Pt 8), 2077-84.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1989), 'HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes', *EMBO J*, 8 (12), 3905-10.
- He, Y., Chipman, P. R., Howitt, J., Bator, C. M., Whitt, M. A., Baker, T. S., Kuhn, R. J., Anderson, C. W., Freimuth, P., und Rossmann, M. G. (2001), 'Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor', *Nat Struct Biol*, 8 (10), 874-78.
- Hellberg, Dan und Stendahl, Ulf (2005), 'The biological role of smoking, oral contraceptive use and endogenous sexual steroid hormones in invasive squamous epithelial cervical cancer', *Anticancer Res*, 25 (4), 3041-46.
- Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M., und Linhardt, R.J. (1998), 'Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins.' *Bioessays*, 20 (2), 156-67.
- Hilgard, P. und Stockert, R. (2000), 'Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes.' *Hepatology*, 32 (5), 1069-77.

- Howley, P.M. und Lowy, D. R. (2001), 'Papillomaviruses and their replication', in B. N. Fields, D. M. Knipe, und P. M. Howley (eds.), *Virology* (4 edn., 2; Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), 2197-229.
- IARC (1995), *IARC Monograph* (64).
- IUPAC-IUB (1968), 'IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Tentative rules. A one-letter notation for amino acid sequences', *Biochim Biophys Acta*, 168 (1), 6-10.
- Jablonska, S. und Majewski, S. (1994), 'Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects', *Curr Top Microbiol Immunol*, 186, 157-75.
- Jackson, Terry, King, Andrew M.Q., Stuart, Dave I., und Fry, Elizabeth (2003), 'Structure and receptor binding.' *Virus Res*, 91 (1), 33-46.
- Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U., und Keller, P. M. (1999), 'The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes', *J Biol Chem*, 274 (9), 5810-22.
- Kämper, Nadine, Day, Patricia M., Nowak, Thorsten, Selinka, Hans-Christoph, Florin, Luise, Bolscher, Jan, Hilbig, Lydia, Schiller, John T., und Sapp, Martin (2006), 'A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes', *J Virol*, 80 (2), 759-68.
- Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshiike, K., und Kanda, T. (1998), 'A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2', *Virology*, 245 (2), 353-59.
- Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., und Kanda, T. (2001), 'Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm', *J Virol*, 75 (5), 2331-36.
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.W., King, J.A., und Kleinschmidt, J.A. (2003), 'Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids.' *J Virol*, 77 (20), 11072-81.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1992), 'Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (24), 12180-84.
- Klasse, P.J. und Sattentau, Q.J. (2002), 'Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses.' *J Gen Virol*, 83 (Pt 9), 2091-108.
- Knight, Gillian L., Grainger, John R., Gallimore, Phillip H., und Roberts, Sally (2004), 'Cooperation between different forms of the human papillomavirus type 1 E4 protein to block cell cycle progression and cellular DNA synthesis', *J Virol*, 78 (24), 13920-33.
- Köhler, G. und Milstein, C. (1975), 'Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity', *Nature*, 256 (5517), 495-97.
- Kreider, J. W., Howett, M. K., Wolfe, S. A., Bartlett, G. L., Zaino, R. J., Sedlacek, T., und Mortel, R. (1985), 'Morphological transformation in vivo of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata', *Nature*, 317 (6038), 639-41.
- Kreuger, Johan, Matsumoto, Taro, Vanwildemeersch, Maarten, Sasaki, Takako, Timpl, Rupert, Claesson-Welsh, Lena, Spillmann, Dorothe, und Lindahl, Ulf (2002), 'Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function', *EMBO J*, 21 (23), 6303-11.

- Lämmli, U. K. (1970), 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227 (5259), 680-85.
- Leder, C., Kleinschmidt, J.A., Wiethe, C., und Muller, M. (2001), 'Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes.' *J Virol*, 75 (19), 9201-09.
- Lee, D., Sohn, H., Kalpana, G. V., und Choe, J. (1999), 'Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA', *Nature*, 399 (6735), 487-91.
- Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C., und Garcea, R. L. (1997), 'Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly', *J Virol*, 71 (4), 2988-95.
- Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., und Harrison, S. C. (1991), 'Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution', *Nature*, 354 (6351), 278-84.
- Liu, Jian und Thorp, Suzanne C. (2002), 'Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections.' *Med Res Rev*, 22 (1), 1-25.
- Ludmerer, S. W., Benincasa, D., und Mark, G. E. (1996), 'Two amino acid residues confer type specificity to a neutralizing, conformationally dependent epitope on human papillomavirus type 11', *J Virol*, 70 (7), 4791-94.
- Luo, M., Vriend, G., Kamer, G., Minor, I., Arnold, E., Rossmann, M. G., Boege, U., Scraba, D. G., Duke, G. M., und Palmenberg, A. C. (1987), 'The atomic structure of Mengo virus at 3.0 Å resolution', *Science*, 235 (4785), 182-91.
- Lycke, E., Johansson, M., Svennerholm, B., und Lindahl, U. (1991), 'Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process', *J Gen Virol*, 72 (Pt 5), 1131-37.
- Majewski, S., Favre, M., Orth, G., und Jablonska, S. (1998), 'Is human papillomavirus type 5 the putative autoantigen involved in psoriasis?' *J Invest Dermatol*, 111 (3), 541-42.
- Mardberg, K., Trybala, E., Glorioso, J.C., und Bergstrom, T. (2001), 'Mutational analysis of the major heparan sulfate-binding domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein C.' *J Gen Virol*, 82 (Pt 8), 1941-50.
- Margalit, H., Fischer, N., und Ben-Sasson, S. A. (1993), 'Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues', *J Biol Chem*, 268 (26), 19228-31.
- McFadyean, J. und Hobday, F. (1898), 'Note on the experimental transmission of warts in dogs.' *J. Comp. Pathol. Ther.*, 11, 341.
- McPhillips, Maria G., Veerapraditsin, Thanaporn, Cumming, Sarah A., Karali, Dimitra, Miligan, Steven G., Boner, Winifred, Morgan, Iain M., und Graham, Sheila V. (2004), 'SF2/ASF binds the human papillomavirus type 16 late RNA control element and is regulated during differentiation of virus-infected epithelial cells', *J Virol*, 78 (19), 10598-605.
- Meyers, C., Frattini, M. G., Hudson, J. B., und Laimins, L. A. (1992), 'Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation', *Science*, 257 (5072), 971-73.
- Modis, Yorgo, Trus, Benes L., und Harrison, Stephen C. (2002), 'Atomic model of the papillomavirus capsid', *EMBO J*, 21 (18), 4754-62.

- Müller, M., Gissmann, L., Cristiano, R. J., Sun, X. Y., Frazer, I. H., Jenson, A. B., Alonso, A., Zentgraf, H., und Zhou, J. (1995), 'Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species', *J Virol*, 69 (2), 948-54.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986), 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- Mulloy, B., Forster, M.J., Jones, C., und Davies, D.B. (1993), 'N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin.' *Biochem J*, 293 ( Pt 3), 849-58.
- Nakahara, Tomomi, Nishimura, Akiko, Tanaka, Masakazu, Ueno, Takaharu, Ishimoto, Akinori, und Sakai, Hiroyuki (2002), 'Modulation of the cell division cycle by human papillomavirus type 18 E4', *J Virol*, 76 (21), 10914-20.
- Olson, N. H., Kolatkar, P. R., Oliveira, M. A., Cheng, R. H., Greve, J. M., McClelland, A., Baker, T. S., und Rossmann, M. G. (1993), 'Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (2), 507-11.
- Park, P., Copeland, W., Yang, L., Wang, T., Botchan, M. R., und Mohr, I. J. (1994), 'The cellular DNA polymerase alpha-primase is required for papillomavirus DNA replication and associates with the viral E1 helicase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (18), 8700-04.
- Parkin, D. Max, Bray, Freddie, Ferlay, J., und Pisani, Paola (2005), 'Global cancer statistics, 2002', *CA Cancer J Clin*, 55 (2), 74-7108.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., und Baltimore, D. (1993), 'Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (18), 8392-96.
- Persson, G., Andersson, K., und Krantz, I. (1996), 'Symptomatic genital papillomavirus infection in a community. Incidence and clinical picture', *Acta Obstet Gynecol Scand*, 75 (3), 287-90.
- Pfister, Herbert (2003), 'Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer', *J Natl Cancer Inst Monogr*, (31), 52-56.
- Qi, Y. M., Peng, S. W., Hengst, K., Evander, M., Park, D. S., Zhou, J., und Frazer, I. H. (1996), 'Epithelial cells display separate receptors for papillomavirus VLPs and for soluble L1 capsid protein', *Virology*, 216 (1), 35-45.
- Roden, R. B., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1994a), 'Interaction of papillomaviruses with the cell surface', *J Virol*, 68 (11), 7260-66.
- Roden, R. B., Hubbert, N. L., Kirnbauer, R., Breitburd, F., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1995), 'Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor', *J Virol*, 69 (8), 5147-51.
- Roden, R. B., Hubbert, N. L., Kirnbauer, R., Christensen, N. D., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1996), 'Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition', *J Virol*, 70 (5), 3298-301.
- Roden, R. B., Day, P. M., Bronzo, B. K., Yutzy, W. H., Yang, Y., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (2001), 'Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection', *J Virol*, 75 (21), 10493-97.
- Roden, R. B., Weissinger, E. M., Henderson, D. W., Booy, F., Kirnbauer, R., Mushinski, J. F., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1994b), 'Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins', *J Virol*, 68 (11), 7570-74.

- Rommel, Oliver, Dillner, Joakim, Fligge, Claudia, Bergsdorf, Christian, Wang, Xiaohong, Selinka, Hans-Christoph, und Sapp, Martin (2005), 'Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA.' *J Med Virol*, 75 (1), 114-21.
- Rossmann, M. G., Arnold, E., Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Griffith, J. P., Hecht, H. J., Johnson, J. E., Kamer, G., Luo, M., und Mosser, A. G. (1985), 'Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses', *Nature*, 317 (6033), 145-53.
- Roth, Stefanie D., Sapp, Martin, Streeck, Rolf E., und Selinka, Hans-Christoph (2006), 'Characterization of neutralizing epitopes within the major capsid protein of human papillomavirus type 33.' *Virol J*, 3, 83.
- Rous, P. und Beard, J. W. (1935), 'A virus-induced mammalian growth with the characters of a tumor (the Shope rabbit papilloma). I. The growth on implantation within favorable hosts.' *J. Exp. Med.*, 60, 701-22.
- Sadeyen, Jean-Remy, Tourne, Sylvie, Shkreli, Marina, Sizaret, Pierre-Yves, und Coursaget, Pierre (2003), 'Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope', *Virology*, 309 (1), 32-40.
- Saphire, A. C., Bobardt, M. D., und Gallay, P. A. (2000), 'Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells', *Immunol Res*, 21 (2-3), 211-17.
- Sapp, M., Volpers, C., Muller, M., und Streeck, R. E. (1995), 'Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles', *J Gen Virol*, 76 ( Pt 9), 2407-12.
- Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J. R., und Streeck, R. E. (1998), 'Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines', *J Virol*, 72 (7), 6186-89.
- Sapp, M., Kraus, U., Volpers, C., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., und Streeck, R. E. (1994), 'Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein', *J Gen Virol*, 75 ( Pt 12), 3375-83.
- Schäfer, Frank, Florin, Luise, und Sapp, Martin (2002), 'DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo', *Virology*, 295 (1), 172-81.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., und Howley, P. M. (1993), 'The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53', *Cell*, 75 (3), 495-505.
- Schofield, D. J., Stephenson, J. R., und Dimmock, N. J. (1997), 'Variations in the neutralizing and haemagglutination-inhibiting activities of five influenza A virus-specific IgGs and their antibody fragments', *J Gen Virol*, 78 ( Pt 10), 2431-39.
- Schwartz, S. (2000), 'Regulation of human papillomavirus late gene expression', *Ups J Med Sci*, 105 (3), 171-92.
- Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., und Rowekamp, W. G. (1985), 'Human papillomavirus type 16 DNA sequence', *Virology*, 145 (1), 181-85.
- Selinka, Hans-Christoph und Sapp, Martin (2003), 'Papillomavirus/cell-interactions initiating the infectious entry pathway', *Papillomavirus Report*, 14 (6), 259-66.

- Selinka, Hans-Christoph, Giroglou, Tzenan, und Sapp, Martin (2002), 'Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions', *Virology*, 299 (2), 279-87.
- Selinka, Hans-Christoph, Giroglou, Tzenan, Nowak, Thorsten, Christensen, Neil D., und Sapp, Martin (2003), 'Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations', *J Virol*, 77 (24), 12961-67.
- Selinka, Hans-Christoph, Florin, Luise, Patel, Hetal D., Freitag, Kirsten, Schmidtke, Michaela, Makarov, Vadim A., und Sapp, Martin (2007), 'Inhibition of Transfer to Secondary Receptors by Heparan Sulfate-Binding Drug or Antibody Induces Non-Infectious Uptake of Human Papillomavirus', *J Virol*.
- Shope, R.E. (1933), 'Infectious papillomatosis of rabbits.' *J. Exp. Med.*, 58, 607-24.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., und Spear, P.G. (1999), 'A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry.' *Cell*, 99 (1), 13-22.
- Smith, Alicia E. und Helenius, Ari (2004), 'How viruses enter animal cells', *Science*, 304 (5668), 237-42.
- Spear, Patricia G. (2004), 'Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry', *Cell Microbiol*, 6 (5), 401-10.
- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K., und Beard, P. (1998), 'Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions', *J Mol Biol*, 283 (3), 529-36.
- Stehle, T., Yan, Y., Benjamin, T.L., und Harrison, S.C. (1994), 'Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment.' *Nature*, 369 (6476), 160-63.
- Strauss, M. J. und Shaw, E. W. (1949), 'Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies', *Proc Soc Exp Biol Med*, 72 (1), 46-50.
- Summerford, C. und Samulski, R.J. (1998), 'Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions.' *J Virol*, 72 (2), 1438-45.
- Thompson, L. D., Pantoliano, M. W., und Springer, B. A. (1994), 'Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain', *Biochemistry*, 33 (13), 3831-40.
- Tiwari, Vaibhav, Clement, Christian, Duncan, Michael B., Chen, Jinghua, Liu, Jian, und Shukla, Deepak (2004), 'A role for 3-O-sulfated heparan sulfate in cell fusion induced by herpes simplex virus type 1.' *J Gen Virol*, 85 (Pt 4), 805-09.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979), 'Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9), 4350-54.
- Trus, B. L., Roden, R. B., Greenstone, H. L., Vrhel, M., Schiller, J. T., und Booy, F. P. (1997), 'Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution', *Nat Struct Biol*, 4 (5), 413-20.
- Trybala, E., Bergstrom, T., Spillmann, D., Svennerholm, B., Olofsson, S., Flynn, S.J., und Ryan, P. (1996), 'Mode of interaction between pseudorabies virus and heparan sulfate/heparin.' *Virology*, 218 (1), 35-42.
- Unckell, F., Streeck, Sapp (1997), 'Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33', *JVI*, 71, 2934-39.

- Volpers, C., Schirmacher, P., Streeck, R. E., und Sapp, M. (1994), 'Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells', *Virology*, 200 (2), 504-12.
- Volpers, C., Sapp, M., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., und Streeck, R. E. (1995a), 'Conformational and linear epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 identified by monoclonal antibodies to the minor capsid protein L2', *J Gen Virol*, 76 ( Pt 11), 2661-67.
- Volpers, C., Unckell, F., Schirmacher, P., Streeck, R. E., und Sapp, M. (1995b), 'Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells', *J Virol*, 69 (6), 3258-64.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., und Munoz, N. (1999), 'Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide', *J Pathol*, 189 (1), 12-19.
- White, W. I., Wilson, S. D., Palmer-Hill, F. J., Woods, R. M., Ghim, S.-J., Hewitt, L. A. Goldman, D. M., Burke, S. J., Jenson, A. B., Koenig, S., and Suzich, J. A. (1999), 'Characterization of a Major Neutralizing Epitope on Human Papillomavirus Type 16 L1', *JVI*, 73, 4882-89.
- WuDunn, D. und Spear, P. G. (1989), 'Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate', *J Virol*, 63 (1), 52-58.
- Xiao, C., Bator, C. M., Bowman, V. D., Rieder, E., He, Y., Hebert, B., Bella, J., Baker, T. S., Wimmer, E., Kuhn, R. J., und Rossmann, M. G. (2001), 'Interaction of coxsackievirus A21 with its cellular receptor, ICAM-1', *J Virol*, 75 (5), 2444-51.
- Yanagishita, M. und Hascall, V. C. (1992), 'Cell surface heparan sulfate proteoglycans', *J Biol Chem*, 267 (14), 9451-54.
- Yang, Rongcun, Day, Patricia M., Yutzy, William H., Lin, Ken-Yu, Hung, Chien-Fu, und Roden, Richard B. S. (2003), 'Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection', *J Virol*, 77 (6), 3531-41.
- You, Jianxin, Croyle, Jennie L., Nishimura, Akiko, Ozato, Keiko, und Howley, Peter M. (2004), 'Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes', *Cell*, 117 (3), 349-60.
- Zautner, Andreas E., Jahn, Birgit, Hammerschmidt, Elke, Wutzler, Peter, und Schmidtke, Michaela (2006), 'N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells', *J Virol*, 80 (13), 6629-36.
- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B., und Jansen-Durr, P. (1995), 'Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation', *J Virol*, 69 (10), 6389-99.
- Zhao, Xiaomin, Rush, Margaret, und Schwartz, Stefan (2004), 'Identification of an hnRNP A1-dependent splicing silencer in the human papillomavirus type 16 L1 coding region that prevents premature expression of the late L1 gene', *J Virol*, 78 (20), 10888-905.
- zur Hausen, H. (2000), 'Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis', *J Natl Cancer Inst*, 92 (9), 690-98.
- zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., und Bornkamm, G. W. (1974), 'Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus', *Int J Cancer*, 13 (5), 650-56.



# Abkürzungen und Symbole

## A.1 IUPAC/IUB-Symbole

Folgende Ein- und Drei-Buchstaben Symbole wurden als Nomenklatur von der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) und der „International Union of Biochemistry“ (IUB) für die am häufigsten verwendeten Aminosäuren und Nucleinsäuren international verbindlich vereinbart und in dieser Arbeit auch wie folgt verwendet (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), 1968; 1970).

**Tabelle A.1:** IUPAC/IUB-Symbole für Nucleinsäuren.

Symbol	Bedeutung	Nucleinsäure	Symbol	Bedeutung
A	A	Adenin	W	A oder T
C	C	Cytosin	S	C oder G
G	G	Guanin	Y	C oder T
T	T	Thymin	K	G oder T
U	U	Uracil	V	A, C oder G
N	G, A, T, C		H	A, C oder T
M	A oder C		D	A, G oder T
R	A oder G		B	C, G oder T

**Tabelle A.2:** IUPAC/IUB-Symbole für Aminosäuren

Ein-Buchstaben Symbol	Drei-Buchstaben Symbol	Aminosäure
A	Ala	Alanin
B	Asx	Aspartat oder Asparagin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat



**Tabelle A.2:** IUPAC/IUB-Aminosäuren-Symbole (Fortsetzung)

Ein-Buchstaben Symbol	Drei-Buchstaben Symbol	Aminosäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
X	Xaa	Unbekannte bzw. jede mögliche Aminosäure
Y	Tyr	Tyrosin

## A.2 Abkürzungen

Im Folgenden sind im Text häufig verwendete Abkürzungen nochmals alphabetisch aufgelistet. Zusätzlich wurden in diese Liste allgemein gebräuchliche Abkürzungen von Einheiten und Chemikalien aufgenommen, die nicht im Text definiert wurden.

AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BPV	Rinder-Papillomvirus ( <i>Bovine Papillomavirus</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie ( <i>Cervical Intraepithelial Neoplasia</i> )
CRPV	Kaninchen-Papillomvirus ( <i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i> )
C-terminal	carboxyterminal
<i>dd</i> H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	früh ( <i>early</i> ) exprimiertes Protein
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )

## Anhang A Abkürzungen und Symbole

---

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
<i>et al.</i>	und andere
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
g	Relative Erdbeschleunigung= $9,80665\text{m x s}^{-1}$
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HRV	humanes Rhinovirus
HPV	humanes Papillomvirus
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HSV	Herpes Simplex Virus
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	spät ( <i>late</i> ) exprimiertes Protein
LCR	lange Kontrollregion ( <i>Long Control Region</i> )
M	Molarität (mol/l)
Min	Minute(n)
N-terminal	aminoterminal
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressor
PsV	Pseudovirionen
PV	Papillomviren
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Rotations/Rounds per Minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
sec	Sekunde(n)
SV40	Affen- ( <i>Simian</i> ) Virus 40
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>Unit</i> )
VLP	Virusähnliches Partikel ( <i>Virus-Like Particles</i> )
v/v	Volume per Volume
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumen

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Maren Knappe, gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 28. September 2004, dass ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Mainz, den ..... 2007

.....  
Maren Knappe