

**Untersuchungen zum infektiösen Aufnahmeweg des  
humanen Papillomvirus HPV33:  
Die Rolle des minoren Kapsidproteins L2**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Nadine Kämper**  
geboren 1977 in Soest

Mainz, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Abteilung Molekulare Genetik angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. H. Paulsen

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 2005

**für den kleinen Paul**

## **Veröffentlichungen**

**Kämper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T. und Sapp, M.** A Membrane-Destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 Required for Egress of Papillomavirus Genomes from Endosomes. eingereicht bei EMBO Journal

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden auf folgenden Kongressen als Poster und in Vorträgen vorgestellt:

Jahrestagung 2003 der Gesellschaft für Virologie, Berlin

EMBO Workshop „The Structural Biology of Small DNA Tumor Viruses“ 2003, Siena (Italien)

Arbeitskreis “Zellbiologie von Virusinfektionen” der Gesellschaft für Virologie 2003, Würzburg

21th International Papillomavirus Conference 2004, Mexiko City (Mexiko)

## **Danksagung**

Bei Herrn HD Dr. x und bei Herrn Prof. Dr. x bedanke ich mich für die Vergabe des Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. x danke ich für die Übernahme des Referats im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn HD Dr. H.-C. Selinka danke ich für seine Hilfe bei den Messungen am FACS-Gerät und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Ein großes Dankeschön gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ein sehr freundliches Arbeitsklima. Das gilt besonders für Conny und Katrin, die sehr dazu beigetragen haben, dass meine Zeit in Mainz stets in guter Erinnerung bleiben wird. Weiter möchte ich vor allem Katrin für die experimentelle Hilfe während meiner Schwangerschaft danken.

Meinen Eltern möchte ich noch einmal danken, dass sie mir das Biologie-Studium ermöglichten und mir beim Zusammenschreiben dieser Arbeit bezüglich der Betreuung des kleinen Paul eine große Hilfe waren.

Ein großer Dank gilt auch meinem Mann Martin Kämper für seine Unterstützung und für sein Verständnis.

Ein abschließendes Dankeschön geht nun an unseren kleinen Sonnenschein, den Paul, weil er auf der Welt ist und mir jeden Tag gezeigt hat, wer wirklich wichtig ist im Leben.

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis	I-III
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Biologie der Papillomviren	1
1.1.1 Die genetische Organisation der Virusproteine	1
1.1.2 Die Kapsidstruktur	3
1.1.3 Der Infektionszyklus	5
1.2 Wie gelangt das Virusgenom zum Zellkern?	6
1.3 Das dhvar5-Peptid und die Rolle des L2-Proteins bei der Endosomolyse	8
1.4 Intention der vorliegenden Arbeit	9
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Material	10
2.1.1 Chemikalien	10
2.1.2 Geräte und Gebrauchswaren	10
2.1.3 Puffer und Lösungen	10
2.1.4 Medien und Zusätze	13
2.1.5 Bakterienstamm	14
2.1.6 Viren	14
2.1.7 Zell-Linien	14
2.1.8 Vektoren	15
2.1.9 Enzyme	15
2.1.10 Antiserum und Antikörper	16
2.1.11 Oligonukleotide	17
2.1.12 Molekulare Vergleichstandards	18
2.1.13 Synthetische Peptide	18
2.2 Methoden	19
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	19
2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien	19
2.2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	19
2.2.1.3 Chemische Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.2.1.4 Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	21

2.2.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen im analytischen Maßstab	21
2.2.2.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen im präparativen Maßstab	21
2.2.2.3	DNA-Isolierung aus Pseudovirionen	22
2.2.2.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	22
2.2.2.5	Ethanol-fällung von DNA	23
2.2.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.2.2.7	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	23
2.2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten zu zirkulären Produkten	23
2.2.2.9	Agarosegelelektrophorese	24
2.2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.2.11	Gerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung	25
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	25
2.2.3.1	Trichloressigsäure(TCA)-Fällung von Proteinen	25
2.2.3.2	Chloroform-Methanol-Fällung von Proteinen	26
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.3.4	„Western Blot“	26
2.2.3.5	Immunfluoreszenzmikroskopie	27
2.2.4	Kultivierung eukaryotischer Zellen	27
2.2.5	Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	28
2.2.5.1	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation	28
2.2.5.2	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion	28
2.2.5.3	Expression viraler Proteine mit rekombinanten Vacciniaviren	29
2.2.5.3.1	Herstellung rekombinanter Vacciniaviren	29
2.2.5.3.2	Amplifikation und Titerbestimmung von rekombinanten Vacciniaviren	30
2.2.5.3.3	Expression viraler Proteine mit rekombinanten Vacciniaviren	30
2.2.5.4	HPV-Pseudovirionen	31
2.2.5.4.1	Herstellung von HPV-Pseudovirionen und Reinigung über einen kontinuierlichen CsCl-Gradienten	31
2.2.5.4.2	Herstellung von HPV-Pseudovirionen und Reinigung über einen OptiPrep-Gradienten	32

2.2.5.4.3	Analytische Saccharose-Gradienten-Zentrifugation	32
2.2.5.4.4	Transduktion durch HPV-Pseudovirionen	32
2.2.6	Membranassoziations-, „Assays“	33
2.2.6.1	Fraktionierung zellulärer Membranen	33
2.2.6.2	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Extraktion zellulärer Membranen	34
2.2.7	Cytotoxizitäts-, „Assays“	34
2.2.7.1	ATP-, „Assay“	34
2.2.7.2	„Toxilight™-Assay“	35
2.2.7.3	FACS-Analyse der Aufnahme von Propidiumjodid	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1	Cytotoxizität des synthetischen Peptids 33L2-445/467	38
3.1.1	Morphologische Veränderungen von HeLa-Zellen nach Peptidinkubation	38
3.1.2	Einfluss der Peptide auf den ATP-Gehalt eukaryotischer Zellen	40
3.1.3	Permeabilität von Zellen für Propidiumjodid nach Peptidinkubation	42
3.2	Membranassoziation von GFP <sub>2</sub> -Peptid-Fusionen und L2-Proteinen	44
3.2.1	Assoziation von GFP <sub>2</sub> -Peptid-Fusionen an zellulären Membranen	44
3.2.2	Assoziation von L2-Proteinen an zellulären Membranen	49
3.3	Einfluss der L2-vermittelten Membranaktivität auf die Pseudoinfektion	52
3.3.1	Herstellung von Pseudovirionen mit mutanten 33L2-Proteinen	52
3.3.2	Einbau des mutanten 33L2 und DNA-Verpackung in die Pseudovirionen	53
3.3.3	Infektiösität von Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	Das carboxyterminale L2-Peptid von HPV33	58
4.1.1	Der Effekt von synthetischen Peptiden auf eukaryotische Zellen	59
4.1.2	Die Fähigkeit des L2-Peptids zur Membranassoziation	61
4.1.3	Die Bedeutung des L2-Peptids für die Pseudoinfektion	62
4.2	In L2 eingeführte Mutationen und ihre Bedeutung für die Morphogenese und Aufnahme der Viruspartikel	62
4.3	Die Rolle des minoren L2-Proteins bei der Endosomolyse	63
4.4	Perspektiven für zukünftige Studien	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>79</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Biologie der Papillomviren

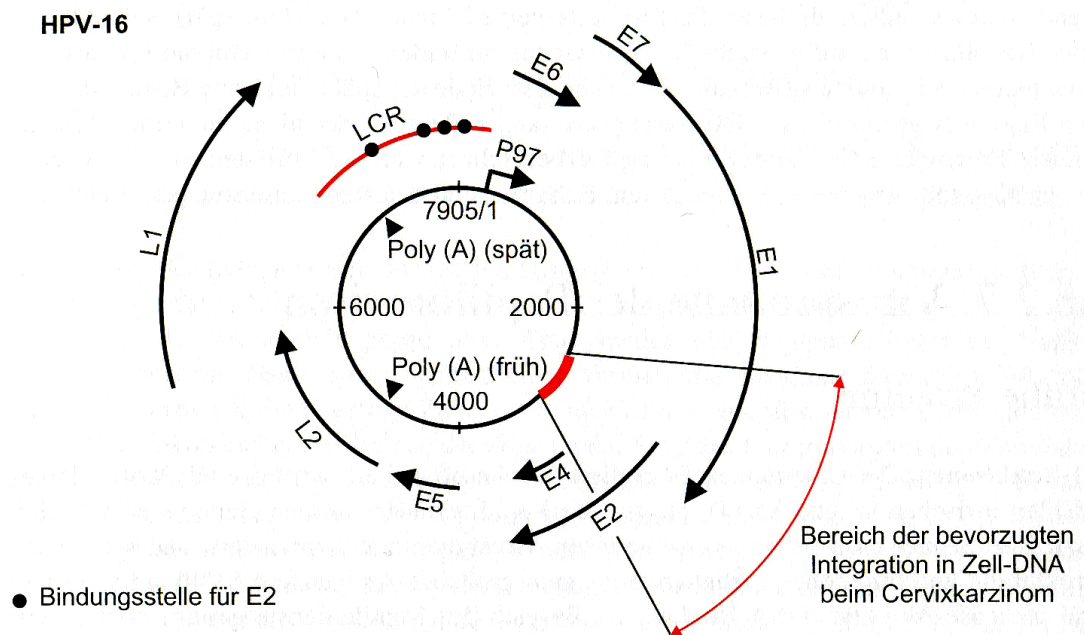
Die Familien der Papillomavirinae und der Polyomavirinae waren aufgrund struktureller Verwandtschaft früher in der Virusfamilie der Papovaviridae zusammengefasst. Das Genom der Papovaviridae besteht aus einem einzelnen Molekül kovalent geschlossener, doppelsträngiger DNA, welches von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben ist. Die Polyomaviren unterscheiden sich von den Papillomviren durch ein kleineres Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 45 nm im Gegensatz zu 55 nm bei den Papillomviren. Außerdem besitzen sie mit ca. 5 kb ein kleineres Genom gegenüber den Papillomviren mit ca. 8 kb und unterscheiden sich in ihrer genomischen Organisation (Cole, 1996). Zur Familie der Polyomaviren gehören das humane JC Virus (JCV), das humane BK Virus (BKV) sowie das SV40, das murine Polyomavirus und weitere kürzlich identifizierte Vertreter bei Säugern und Vögeln. Die Polyomaviren können multifokale Tumore hervorrufen. Papillomviren induzieren die Bildung von Warzen der Haut und Schleimhaut (Papillome) bei Menschen und weiteren höheren Wirbeltieren. Sie weisen eine ausgeprägte Wirts- und Gewebespezifität auf und gelten als strikt epitheliotrop. Sie infizieren ausschließlich basale Epithelzellen und können sich nur in enddifferenzierten Keratinocyten replizieren. Aus diesem Grunde ist eine Züchtung *in vitro* bislang unmöglich.

Es konnten allein über 100 humane Papillomvirustypen (HPV-Typen) identifiziert werden (de Villiers, 1997). Die Virustypen unterscheiden sich in mindestens 10% der Basensequenz in den offenen Leserahmen der Virusproteine E6, E7 und L1 (Delius und Hofmann, 1994; Chan *et al.*, 1995). Weiter kann man die HPV-Typen anhand der verursachten Krankheiten differenzieren. Sie infizieren Zellen der äußeren Haut- und Schleimhautschichten (kutane und mukosale Typen) und rufen zumeist lokale Zellproliferationen in dem infizierten Bereich hervor. Im Gegensatz dazu kann es aber auch zu einer HPV-assoziierten Zelltransformation und bösartigen Tumorerkrankungen kommen, wie z. B. dem Cervixkarzinom (HPV16- und -18, aber auch, -33, und -35) (Streeck, 2002).

#### 1.1.1 Die genetische Organisation der Virusproteine

Die DNA liegt- mit zellulären Histonproteinen assoziiert- als Superhelix vor (Howley und Lowy, 2001). Der Genomaufbau ist bei allen Papillomviren gleich. Das zirkuläre Genom wird in zwei Bereiche unterteilt (Abb. 1.1): eine Region, die für die früh im Vermehrungszyklus

gebildeten Proteine codiert, und eine zweite, die die Gene für die spät synthetisierten Strukturproteine umfasst. Die Transkription dieser beiden Regionen verläuft unter Verwendung der verschiedenen offenen Leserahmen nur eines DNA-Stranges. Alle frühen und späten Funktionen werden im Gegensatz zu den Polyomaviren auf einem Strang codiert. Spleißdonor- und akzeptorstellen sind an vielen Orten im Genom zu finden und werden für die Synthese der verschiedenen Produkte verwendet. Ein Bereich von etwa 1000 Basenpaaren liegt zwischen dem Ende der späten Region und dem Beginn der frühen Region. Dieser codiert nicht für virale Proteine und wird als NCR (nicht-codierende Region) oder LCR („long control region“) bezeichnet, da er die meisten viralen *cis*-wirksamen Kontrollelemente wie Promotoren, Enhancer und den Replikationsursprung enthält (Chow und Broker, 1994; Fuchs und Pfister, 1994).



### Abb. 1.1: Genomaufbau der Papillomviren

Es ist der genomische Aufbau des humanpathogenen Papillomvirus Typ 16 dargestellt. Die zirkuläre, doppelsträngige DNA wird schematisch als innerster Kreis gezeigt. Polyadenylierungssignale für frühe und späte Transkripte sind mit Pfeilen markiert. Im Replikationsverlauf gebildete mRNAs, ihre Lage auf dem Genom und ihre Translationsprodukte sind in den äußeren Kreisen dargestellt. Ein Bereich von etwa 1000 Basenpaaren (LCR, „long control region“) codiert nicht für Proteine. Weiter ist der Bereich rot gekennzeichnet, in dem sich das Virusgenom der malignen Papillomvirustypen bei der Integration in das Zellgenom bevorzugt öffnet (nach Modrow und Falke, 1998).

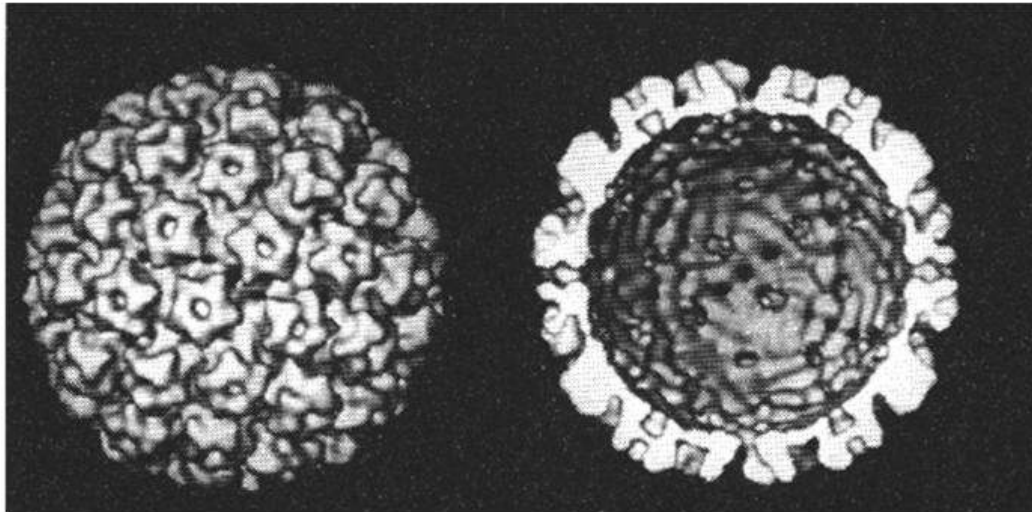
Das virale Genom von HPV enthält sechs offene Leserahmen in der frühen Region für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 (E-Proteine, E für „early“). E1 und E2 werden für die Initiation und Elongation der viralen Replikation benötigt (Seo *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994; Streeck, 2002). Verschiedene Formen des E2-Proteins fungieren auch als Transkriptionsaktivator/-Repressor und regulieren die E5-, E6- und E7-Expression (zur Hausen, 1999). Es ist kein E3-Protein bekannt. E4 ist in der frühen Region codiert, wird aber erst spät im Infektionszyklus exprimiert. Seine Funktion ist noch weitgehend unklar. Es wurde beobachtet, dass es den Abbau des zellulären Keratingerüsts induziert, was den Viren den Austritt aus infizierten Zellen ermöglichen könnte (Doorbar *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1993). E5 ist ein kleines, hydrophobes Protein mit onkogenem Potential. Es integriert in Membranen und interagiert mit Rezeptoren verschiedener Wachstumsfaktoren (Conrad *et al.*, 1993). E6 und E7 sind die Hauptkoproteine von HPV, sie immortalisieren primäre Fibroblasten und Keratinocyten (Chow und Broker, 1997; Mantovani und Banks, 1999). Dies geschieht u. a. durch den proteolytischen Abbau von p53, welches essentiell für die Kontrolle des Zellzyklus ist, und durch Interaktion mit Tumorsuppressoren wie pRb.

In der späten Region sind die beiden Strukturproteine L1 und L2 codiert (L-Proteine, L für „late“). Sie werden ausschließlich in ausdifferenzierten Keratinocyten synthetisiert (Stoler *et al.*, 1990). L1 ist mit 500 bei allen HPV-Typen hochkonservierten Aminosäuren die Hauptkapsidkomponente (Gissmann *et al.*, 1977). Es hat ein Molekulargewicht von 57 kD. Das L2-Protein hat ein ähnliches Molekulargewicht wie L1, zeigt jedoch ein abweichendes elektrophoretisches Laufverhalten von ca. 75 kD (Komly *et al.*, 1986; Volpers *et al.*, 1994). Neben strukturellen Aufgaben im Kapsid hat es mehrere Funktionen während der Infektion und der DNA-Verpackung (Roden *et al.*, 1996; Unckell *et al.*, 1997; Stauffer *et al.*, 1998). L2 lokalisiert in den sogenannten ND10 („nuclear domain 10“), speziellen Kerndomänen, in denen auch E1 und E2 zu finden sind (Swindle *et al.*, 1999). Es ist in der Lage, das L1-Protein dorthin zu rekrutieren (Day *et al.*, 1998; Florin *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Die Kapsidstruktur

Die Partikel der Papillomviren sind ähnlich wie bei den Polyomaviren kleine Kapside ohne eine umgebende Membran. Sie haben, wie bereits erwähnt, einen Durchmesser von ca. 55 nm und weisen eine ikosaedrische Symmetrie auf (Abb. 1.2). Der Grundbaustein des Kapsids ist das Kapsomer, ein sternenförmiges Pentamer des L1-Proteins. 360 L1-Moleküle bilden 72 über Disulfidbrücken miteinander verbundene Pentamere (Sapp *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998;

Sapp *et al.*, 1998). Es finden sich zwölf pentavalente Kapsomere, die von fünf weiteren Kapsomeren umgeben sind. Die übrigen 60 Kapsomere sind hexavalent. Das Kapsid wird zusätzlich aufgrund von nicht-kovalenten Wechselwirkungen durch den DNA- und L2-Einbau stabilisiert (Doorbar und Gallimore, 1987; Fligge *et al.*, 2001). Das L2-Protein ist dagegen nur mit zwölf Kopien im Viruskapsid enthalten. Man nimmt an, dass diese zwölf L2-Moleküle zentral in den pentavalenten Kapsomeren lokalisiert sind (Trus *et al.*, 1997).



**Abb. 1.2: Struktur der Papillomviren**

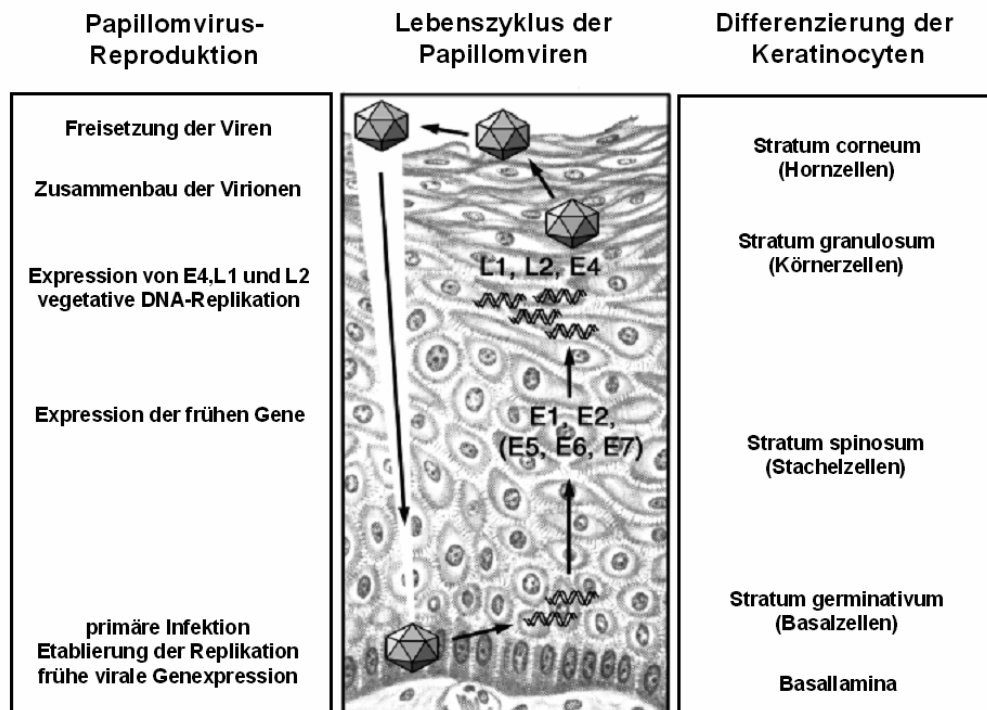
Es ist die dreidimensionale Bildrekonstruktion cryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen von HPV1-Virionen dargestellt. Links erkennt man die Kapsomere als sternförmige Strukturen und rechts einen Querschnitt durch das Kapsid.

Da Virionen nicht ausreichend verfügbar sind, werden Untersuchungen der Kapside oft mit Hilfe von artifiziellen Systemen durchgeführt. Cryoelektronenmikroskopische Aufnahmen erhält man vor allem durch den Einsatz leerer virus-ähnlicher Partikel (VLP), die entweder aus L1 allein, oder aus beiden Kapsidproteinen bestehen (Kirnbauer *et al.*, 1992; Hagensee *et al.*, 1994; Hofmann *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997). Um den Infektionsweg von HPV innerhalb der Zelle zu untersuchen, werden sowohl VLP, als auch Pseudovirionen verwendet. Letztere enthalten ein Marker-Plasmid. VLP bilden sich spontan, wenn das Kapsidprotein L1 heterolog

in eukaryotischen Zellen exprimiert wird (Hagensee *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994). Das L2-Protein wird für diesen Zusammenbau nicht benötigt, wird aber bei einer Koexpression mit L1 in die VLP eingebaut. VLP ähneln den Virionen sehr, weisen jedoch bezüglich des L1-Proteins weniger Disulfidbrücken auf. Die *in vivo* Verpackung heterologer DNA, z. B. eines Marker-Plasmids, führt zu Konformationsänderungen von L1 und zur Bildung von Pseudovirionen. Die Organisation des L1-Proteins kommt hier den Virionen näher (Fligge *et al.*, 2001).

### 1.1.3 Der Infektionszyklus

Die Replikation der Papillomviren ist stark abhängig vom Differenzierungsgrad der Epithelzellen von Haut und Schleimhaut (Abb. 1.3). Die Viren dringen durch kleinste Verletzungen der äußeren Hornschicht ein und infizieren undifferenzierte Epithelzellen in den basalen Hautschichten (Chow und Broker, 1997).



**Abb. 1.3: Infektionszyklus von Papillomviren**

Schematisch dargestellt ist die Epidermisschicht und die davon abhängige Genexpression für den reproduktiven Infektionszyklus der Papillomviren.

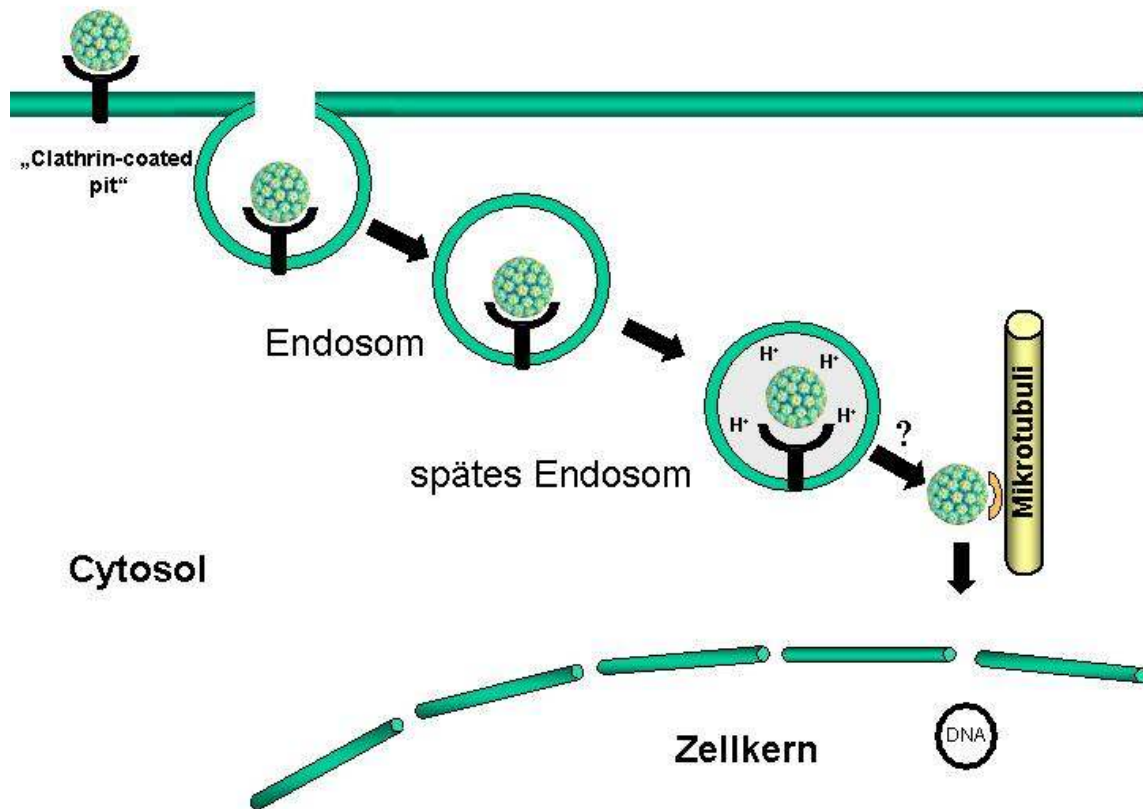
Da Papillomviren in der Lage sind, an verschiedene eukaryotische Zellen zu binden (Müller *et al.*, 1995; Unckell *et al.*, 1997), ist als Rezeptor ein häufiges und konserviertes Oberflächenmolekül anzunehmen. Als ein zellulärer Rezeptor für die Bindung und den Eintritt der Viren war lange alpha-6-Integrin im Gespräch (Evander *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 1999). Dies wurde u. a. durch Bindungsstudien mit HPV11 und Untersuchungen zur Pseudoinfektion mit HPV16 und HPV33 widerlegt (Joyce *et al.*, 1999; Giroglou *et al.*, 2001). Stattdessen geht man nun von Heparansulfatproteoglykanen (HSPGs) als Zelloberflächenrezeptor aus (Joyce *et al.*, 1999; Giroglou *et al.*, 2001; Selinka *et al.*, 2002). Die Aufnahme der Partikel erfolgt durch Endocytose (Selinka *et al.*, 2002; Day *et al.*, 2003). Nachdem das virale Genom in den Zellkern gelangt ist, wird es zunächst unabhängig vom Zellzyklus amplifiziert. Die DNA etabliert sich nach mitotischer Teilung infizierter Zellen in den Tochterzellen. Die infizierten Zellen zeigen eine verzögerte Differenzierung und eine erhöhte Proliferation, was vermutlich auf die Wirkung der Virusproteine E5, E6 und E7 zurückzuführen ist (Howley und Lowy, 2001). Die Folge ist eine Verdickung der Epithelschicht. Mit der Differenzierung der Epithelzellen kommt es dann in den oberen Schichten zur Amplifikation viraler DNA und zur Expression der Kapsidproteine. Die vollständigen Virionen werden durch Abschuppung der Zellen in der oberen Epidermis freigesetzt.

## 1.2 Wie gelangt das Virusgenom zum Zellkern?

Um eine produktive Infektion zu etablieren, müssen die meisten DNA-Viren nach Eintritt in die Wirtszelle das Cytoplasma in Richtung Zellkern durchqueren. Unter Verwendung der zellulären Kerntransportmaschinerie gelangt das virale Genom dann durch den Kernporenkomplex in den Zellkern (Kasamatsu und Nakanishi, 1998). Erfolgt die Aufnahme der Viren durch Endocytose, müssen sie Mechanismen zur Überwindung der Membranbarriere entwickelt haben. Bei umhüllten Viren kommt es zu einer Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zielzellmembran. Diese Membranfusion kann sowohl an der Zelloberfläche, als auch nach Aufnahme der Viren intrazellulär stattfinden.

Nicht-umhüllte Viren müssen entweder die vesikuläre Membran lysieren, oder eine Porenbildung induzieren, um das infektiöse Genom in das Cytosol zu entlassen. Die Bildung einer Membranpore wurde für Polioviren und Reoviren beschrieben, bei denen es sich um RNA-Viren handelt (Belnap *et al.*, 2000; Chandran *et al.*, 2002; Tosteson *et al.*, 1993; Tosteson und Chow, 1997; Tosteson *et al.*, 2004). Adenoviren hingegen sind schon länger

dafür bekannt, dass sie in der Zielzelle eine Endosomolyse induzieren (Greber *et al.*, 1996; Seth *et al.*, 1984; Seth *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2000; Wickham *et al.*, 1994). Weitgehend unklar sind jedoch die Mechanismen von Papillomviren und anderen nicht-umhüllten Viren.



**Abb. 1.4: Der infektiöse Aufnahmeweg von Papillomviren**

Es ist die zelluläre Aufnahme von Papillomvirus-Partikeln über Rezeptor-vermittelte Endocytose und der hypothetische Transport des viralen Genoms zum Zellkern dargestellt.

Papillomviren werden über Rezeptor-vermittelte Endocytose in Zielzellen aufgenommen (Abb. 1.4). Nach Ansäuerung der Endosomen gelangt infektiöses Material ins Cytosol und wird vermutlich entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Day *et al.*, 2003; Selinka *et al.*, 2002; Selinka *et al.*, 2003; Selinka und Sapp, 2003). Der Weg des viralen Genoms aus dem Endosom heraus ins Cytosol ist jedoch bislang unklar. Neben der Erforschung des „uncoating“-Prozesses (Freisetzung der viralen DNA aus dem Kapsid) steht dabei die Suche nach membrandestabilisierenden Eigenschaften der Virusproteine im Vordergrund.

### 1.3 Das dhvar5-Peptid und die Rolle des L2-Proteins bei der Endosomolyse

Im Zusammenhang mit membrandestabilisierenden Eigenschaften wurde von Ruissen *et al.* (2001) das dhvar5-Peptid beschrieben. Es handelt sich dabei um ein synthetisches Derivat des natürlich im menschlichen Speichel vorkommenden, fungiziden Histatin 5. Das dhvar5-Peptid stellt eine Variante der aktiven Domäne von Histatin 5 dar, welche eine gesteigerte mikrobizide und fungizide Aktivität aufweist. Die Fähigkeit zur Destabilisierung von Membranen konnte auch durch neuere Untersuchungen bestätigt werden (Den Hertog *et al.*, 2004). Dhvar5 (LLLFLKKRKKRKY) hat eine charakteristische Struktur. Ein Bereich hydrophober Aminosäuren schließt sich an einen Bereich basischer Aminosäuren an. Das ist ungewöhnlich und unterscheidet sich von anderen membranaktiven Peptiden. Letztere sind oft amphipatisch, mit basischen und hydrophoben Aminosäuren im Wechsel (Cole *et al.*, 2003; Gibbs *et al.*, 2003; Henzler Wildman *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2003; Papo und Shai, 2003). In der Arbeitsgruppe um Martin Sapp wurde im Vorfeld der vorliegenden Dissertation beobachtet, dass eine carboxyterminale Sequenz des minoren Kapsidproteins L2 von Papillomviren einen ähnlichen Aufbau wie das dhvar5-Peptid hat. Die Analogie der charakteristischen Sequenz von dhvar5 zu dem carboxyterminalen L2-Peptid ist am stärksten für HPV39, 68 und 70, jedoch bei allen Papillomviren konserviert.

Untersuchungen mit Pseudovirionen haben ergeben, dass das L2-Protein für die DNA-Verpackung bei einigen HPV-Typen und für die Prozesse der Internalisierung der Kapside in die Zellen entbehrlich ist (Buck *et al.*, 2005; Selinka *et al.*, 2003; Unckell *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu zeigen Pseudovirionen, die nur aus dem majoren L1 bestehen, eine deutlich reduzierte Infektiosität (Buck *et al.*, 2004; Kawana *et al.*, 1998; Unckell *et al.*, 1997). Aus diesem Grund könnte das carboxyterminale L2-Peptid bei der für die Virusreplikation unbedingt erforderlichen Endosomolyse eine wichtige Rolle spielen.

#### **1.4 Intention der vorliegenden Arbeit**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Jan Bolscher in Amsterdam wurde nachgewiesen, dass die zu dhvar5 analogen L2-Peptide von HPV16, 18 und 33 ebenfalls mikrobizide und fungizide Eigenschaften aufweisen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte nun die Rolle des carboxyterminalen L2-Peptids für den Transport des infektiösen Materials aus den Endosomen heraus zum Zellkern genauer untersucht werden. Zunächst sollte mittels unterschiedlicher Methoden analysiert werden, ob das L2-Peptid von HPV33 nicht nur im Zusammenhang mit Mikroorganismen, sondern auch bei höheren eukaryotischen Zellen eine membrandestabilisierende Wirkung zeigt. Danach galt es mit Hilfe von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen und verschiedenen L2-Mutanten zu prüfen, ob sich u. a. biochemisch eine Assoziation des L2-Peptids von HPV33 an zellulären Membranen nachweisen lässt. Zuletzt stellte sich die Frage, inwieweit Mutationen innerhalb der carboxyterminalen L2-Sequenz einen Effekt auf die Infektiosität von HPV16 und HPV33 Pseudovirionen ausüben können. Dies sollte anhand des im Labor etablierten Pseudovirus-Infektionssystems untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim) und Carl Roth (Karlsruhe) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen.

#### 2.1.2 Geräte und Gebrauchswaren

Die Herkunft der verwendeten Geräte und spezieller Gebrauchswaren wird unter den jeweiligen Methoden genannt. Plastik-Einwegartikel wurden von den Firmen Falcon/ Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Glaswaren stammten von der Firma Schott (Mainz).

#### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Die Chemikalien wurden den Erfordernissen entsprechend in bidestilliertem Wasser ( $H_2O_{bid}$ ) gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

Puffer und Lösungen von gebrauchsfertigen „Kits“ werden hier nicht aufgeführt.

Acrylamid-Stammlösung für Trenngele (pH 8,8)	Acrylamid/ N,N-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 [w/w] 10%ig [w/v] in 375 mM Tris-HCl 1% [w/v] SDS
Acrylamid-Stammlösung für Sammelgele (pH 6,8)	5% [w/v] Acrylamid 0,1% [w/v] N,N-Methylenbisacrylamid 375 mM Tris-HCl 0,1% [w/v] SDS

---

6 x DNA-Probenpuffer	0,25 % [w/v]	Bromphenolblau
	0,25 % [w/v]	Xylene cyanol
	15 % [w/v]	Ficoll type 400
“Dounce”-Puffer (pH 7,6)	10 mM	HEPES-KOH
	10 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
FACS-Puffer	1 x PBS/ FCS <sub>2%</sub>	
HBS-Puffer (pH 7,05)	2 mM	HEPES
	137 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	0,7 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	6 mM	Glucose
2 x HEBS-Puffer (pH 7,1)	1,6 % [w/v]	NaCl
	1 % [w/v]	HEPES
	0,2 % [w/v]	Glucose
	0,025 % [w/v]	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	0,074 % [w/v]	KCl
5 x Laemmli-Probenpuffer (pH 6,8)	625 mM	Tris-HCl
	10 % [w/v]	SDS
	10 % [w/v]	Glycerin
	5 mM	EDTA
	10 % [v/v]	β- Mercaptoethanol
5 x Laemmli-Laufpuffer (pH 8,3)	1,5 % [w/v]	Tris-HCl
	0,5 % [w/v]	SDS
	7,2 % [w/v]	Glycin

Lösung I (pH 8,0)	25 mM	Tris-HCl
	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
Lösung II	0,2 M	NaOH
	1 % [w/v]	SDS
Lösung III	60 ml	5 M Kaliumacetat
	11,5 ml	Eisessig
	28,5 ml	H <sub>2</sub> O
Lysepuffer (pH 7,5)	10 mM	Tris-HCl
	0,25 mM	Saccharose
	1 mM	EDTA
	5 µg/ml	Aprotinin
	5 µg/ml	Leupeptin
P1-Puffer (pH 8,0)	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNaseA
P2-Puffer	1 % [w/v]	SDS
	200 mM	NaOH
P3-Puffer	7,5 M	Ammoniumacetat
10 x PBS (pH 7,4)	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	11,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	65 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA

“Western Blot”-Transferpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 % [v/v]	Methanol

## 2.1.4 Medien und Zusätze

### 2.1.4.1 Medien für Bakterien

LB (Luria Bertani)- Medium	1% [w/v]	Pepton
	1% [w/v]	Hefeextrakt
	0,5% [w/v]	NaCl

Agarplatten enthielten 1,5% [w/v] Agar und zur Selektion wurde dem Medium 0,1 mg/ml Ampicillin oder 0,05 mg/ml Kanamycin zugesetzt.

### 2.1.4.2 Medien für eukaryotische Zellen

Die verwendeten Medien für eukaryotische Zellen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Dem DMEM-Medium wurde 10% [v/v] hitzeinaktiviertes FCS, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin (Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt. Für die Kultivierung der 293TT-Zellen wurde zudem 1 % Glutamax und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt (Invitrogen, Karlsruhe).

**Tab. 2.1 Medien für eukaryotische Zellen**

Medium	Beschreibung/Herkunft
DMEM	„Dulbecco`s modified Eagle`s medium” (Invitrogen, Karlsruhe)
Einfriermedium	20% [v/v] DMSO, 80% [v/v] FCS
OptiMem	Medium für eine Lipofektion (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.1.5 Bakterienstamm

Zur Klonierung und Anreicherung von Plasmid-DNA wurde der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  mit folgenden genetischen Eigenschaften verwendet (Hanahan, 1983):

*supE44*,  $\Delta$ *lacU169*, ( $\phi$ 80*lacZ* M15), *relA1*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA69*, *thi-1*

### 2.1.6 Viren

Die transiente Genexpression der HPV-Kapsidproteine in Säugetierzellen wurde mit Hilfe von rekombinanten Vacciniaviren durchgeführt. Für deren Herstellung und die anschließende Proteinexpression wurden folgende Viren benötigt (Moss *et al.*, 1990):

**Tab. 2.2 Vacciniaviren**

Virusstamm	Beschreibung
wt-VV	Wildtyp-Virus für die Rekombination
ts7-VV	temperatur-sensitiver Stamm
vTF7-3-VV	codiert für die T7-Polymerase

### 2.1.7 Zell-Linien

Die verwendeten Zell-Linien und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 2.3 angegeben.

**Tab. 2.3 Zelllinien**

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Medium	Referenz
COS-7	Affe	Nieren	DMEM	Gluzman, 1981
HeLa	Mensch	Gebärmutter	DMEM	Scherer <i>et al.</i> , 1953
HuTK	Mensch	Knochen	DMEM	Berson <i>et al.</i> , 1996
293TT	Mensch	Bindegewebe	DMEM	Buck <i>et al.</i> , 2004

### 2.1.8 Vektoren

Alle in der Arbeit verwendeten Vektoren tragen eine Antibiotikaresistenz, so dass sie in *E. coli* selektiert werden konnten.

pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	Klonierungsvektor (Invitrogen, Karlsruhe)
pEGFP-C1	Expressionsvektor (CLONTECH Laboratories, Heidelberg)
pEGFP <sub>2</sub> -NLS	In den pEGFP-C1-Vektor wurde ein weiteres GFP-Gen und zusätzlich die Kernlokalisationssequenz von HPV33 L1 kloniert (Luise Florin).
pTM1	Vaccinia-Transfektor (Moss <i>et al.</i> 1990)

### 2.1.9 Enzyme

Die verwendeten Enzyme und zugehörige Reaktionspuffer sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England BioLabs (Frankfurt a. M.) bezogen und laut Hersteller in den mitgelieferten Puffern eingesetzt. Enzyme aus gebrauchsfertigen „Kits“ werden hier ebenfalls nicht genannt.

**Tab. 2.4 Enzyme**

Enzym	Reaktionspuffer	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Restriktionspuffer	NEB (Frankfurt a. M.)
Klenow-Polymerase	Restriktionspuffer	NEB (Frankfurt a. M.)
RNaseI	P1-Puffer	Roche (Mannheim)
Taq-DNA-Polymerase	1 x Taq-DNA-Polymerase-puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Quick-DNA-Ligase	1 x Quick-DNA-Ligasepuffer	Roche (Mannheim)

**2.1.10 Antiserum und Antikörper****Tab. 2.5 Antiserum und Antikörper**

Antiserum/Antikörper	Spezifität	Hersteller
anti-Calnexin	monoklonal aus Maus gegen Calnexin	Dianova (Hamburg)
anti-CD138	monoklonal aus Maus gegen Syndecan CD138	IQProducts (Groningen)
anti-GFP	monoklonal aus Maus gegen GFP	Dianova (Hamburg)
anti-Hsc70	monoklonal aus Ratte gegen Hsc70	Stressgen (Victoria)
anti-58K	monoklonal aus Maus gegen Golgi-58K	Sigma-Aldrich (Steinheim)
33L2-aa445/467-Antiserum	polyklonal aus Kaninchen gegen den C-Terminus von HPV33 L2 (aa 445/467)	BioScience (Göttingen)
33L2-1	monoklonal aus Maus gegen HPV33 L2 (aa163/170)	Martin Sapp
33L1-7	monoklonal aus Maus gegen HPV33 L1 (aa303-313)	Martin Sapp
anti-Kaninchen-IgG-Cy <sup>TM</sup> 3	aus Ziege konjugiert mit rotfluoreszierendem Carbocyanin 3	Dianova (Hamburg)
anti-Maus-IgG-Cy <sup>TM</sup> 2	aus Ziege konjugiert mit grünfluoreszierendem Carbocyanin 2	Dianova (Hamburg)
anti-Maus-AlexaFluor <sup>®</sup> 594	aus Ziege konjugiert mit rotfluoreszierendem AlexaFluor <sup>®</sup> 594	MoBiTec (Göttingen)
anti-Maus-IgG-POX	aus Ziege konjugiert mit Peroxidase	Dianova (Hamburg)
anti-Ratte-IgG-POX	aus Ziege konjugiert mit Peroxidase	Dianova (Hamburg)

### 2.1.11 Oligonukleotide

Die unten aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Für Klonierungen eingeführte Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt.

- Oligonukleotide zur Herstellung von GFP-33L2-1/14 in pEGFP

GFP-fw                    5`-ATT **GAA TTC** ATG GTG AGC AAG GGC GAG-3`

GFP-33L2-1/14-rv    5`-TTT **GGA TCC** TCA TGC AGA TGC ACG CTT GCG CCT TGT  
AGA TCG TTT GTG TCT CAT CTT GTA CAG CTC GTC CAT  
GCC-3`

- Oligonukleotide zur Herstellung von verschiedenen 33L2\*NLS-Konstrukten  
(wt L2\*NLS, L2-1/420\*NLS, L2-12/420\*NLS und L2-31/456\*NLS) in pTM1

33L2-M240-fw        5`-ACA GAA TTC ATG CCT GCT TTT TTA ACA TCG-3`

33L2-390-rv         5`-TGC GGA TCC CTA GCT GGT ACG TGT TGT TGC-3`

33L2-\*NLS-fw        5`-CCT GCT ATT ACA TCT GCT GCA CAT ACT GTG GCT TTT  
AGT GCA GTA GGT CAA AAA GCC-3`

33L2-\*NLS-rv        5`-GGC TTT TTG ACC TAC TGC ACT AAA AGC CAC AGT ATG  
TGC AGC AGA TGT AAT AGC AGG-3`

- Oligonukleotide zur Herstellung von 33L2-DD452 in pTM1

33L2-M240-fw        s.o.

pTM-rv                5`-TGT TAG CAG CCG GAT CGT C-3`

33L2-DD452-fw      5`-CCT AGT TAT TTT ATT TTA CGT CGC GAC GAT AAA CGT  
TTT CCA-3`

33L2-DD452-rv 5`-TGG AAA ACG TTT ATC GTC GCG ACG TAA AAT AAA ATA  
ACT AGG-3`

### 2.1.12 Molekulare Vergleichstandards

Bei der Trennung von Nukleinsäuregemischen wurde zur Identifizierung der molekularen Größe als Standard die „100 bp DNA ladder“ oder die „MassRuler™ DNA ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt.

Bei der Trennung von Proteingemischen mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine der „LMW-Marker“ der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) verwendet.

### 2.1.13 Synthetische Peptide

Folgende synthetische Peptide wurden in einer Reinheit >70% von der Firma BioScience (Göttingen) und in einer Reinheit >95% von der Firma GENOSPHERE Biotechnologies (Paris) bezogen:

**Tab. 2.6 Synthetische Peptide**

Peptid	Sequenz
dhvar5	LLFLLKRRKRRKY
33L2-445/458	SYFILRRRRKRFPY
33L2-445/467	SYFILRRRRKRFPYFFTDVRVAA
33L1-485/499	STRTSSAKRKKVKK
33L2-1/14	MRHKRSTRRKRASA
33L2-1/20	MRHKRSTRRKRASATQLYQT
33L2-DD447	SYDDLRRRRKRFPYFFTDVRVAA
33L2-DD452	SYFILRRDDKRFPYFFTDVRVAA
33L2-DD459	SYFILRRRRKRFPYDDTDVRVAA
33L2-R453L	SYFILRRRLKRFPYFFTDVRVAA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  wurde zur Vermehrung von Bakterien in LB-Medium kultiviert. Verfügten die Bakterien zu Selektionszwecken über eine Antibiotikaresistenz, wurde dem Kulturmedium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Kulturen wurden je nach Verwendungszweck im Erlenmeyerkolben oder im Reagenzglas bei 37°C und zur optimalen Belüftung bei 150 rpm in einem Rotationsschüttler (Braun, Melsungen) inkubiert. Für die längerfristige Lagerung von *E.coli*-Klonen wurden Übernachtkulturen mit 15 % [v/v] sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

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

Zur Herstellung von kompetenten *E.coli*-Zellen wurde zunächst eine Vorkultur in 2 ml LB-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 LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und bis zu einer optischen Dichte OD<sub>600nm</sub> von 0,6 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 5 min bei 4°C und 1.200 x g pelletiert. Die weiteren Arbeiten erfolgten auf Eis. Das Pellet wurde in 100 ml eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4°C und 1.200 x g. Das erhaltene Pellet wurde in 30 ml eiskaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> mit 20 % [v/v] Glycerin resuspendiert, in 300  $\mu$ l-Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung der Kompetenz wurden die Bakterien, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, mit 50 ng Plasmid-DNA transformiert.

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

(Hanahan, 1983)

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 150  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mit einem vollständigen Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde dann 90 s bei 42°C im Wasserbad erwärmt und anschließend 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium vermischt und eine Stunde bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 10 min bei 1.200 x 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°C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz statt des Ligationsansatzes steriles H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> verwendet.

### 2.2.1.4 Transformation elektrokompeter *E.coli*-Zellen

Für die Transformation von Bakterienzellen mit DNA, die aus Pseudovirionen isoliert wurde (2.2.2.3), wurden elektrokompeter ELEKTROMAX-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. 20  $\mu$ l dieser Zellen wurden auf Eis mit 3  $\mu$ l DNA versetzt und dann luftblasenfrei zwischen die Platten einer Mikroelektroporationskammer (Amersham Biosciences, Freiburg) pipettiert. Die Elektroporationsbedingungen im „Cell Porator“ (Gibco BRL, Eggenstein) waren wie folgt:

2400 V  
4 k $\Omega$   
330  $\mu$ F  
„low“  $\Omega$   
„fast CHARGE RATE“

Nach der Elektroporation wurde der Ansatz zu 1 ml SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz abzentrifugiert und komplett ausplattiert.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen im analytischen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Für die „Miniprep“ wurden 3 ml LB-Medium, das das zur Selektion plasmidtragender Bakterien notwendige Antibiotikum enthielt, mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 1 min bei 11.000 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 µl P2-Puffer hinzugefügt, vorsichtig geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 300 µl kalter P3-Puffer zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 11.000 x g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur Fällung der Plasmid-DNA mit 650 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitate wurden anschließend durch Zentrifugation 30 min bei 4°C und 11.000 x g pelletiert, die Pellets mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur oder 37°C getrocknet. Die präparierte DNA wurde in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> aufgenommen.

Sollte die DNA direkt zur Sequenzierung eingesetzt bzw. verschickt werden, wurde die „Miniprep“ mit dem „E:Z:N:A: Plasmid Miniprep Kit“ der Firma Peqlab (Erlangen) durchgeführt. DNA-Sequenzierungen wurden bei den Firmen GATC (Konstanz) oder GENTERprise (Mainz) in Auftrag gegeben.

### 2.2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen im präparativen Maßstab

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA („Maxiprep“) wurde das „NucleoBond PC 500 Kit“ der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet.

Für eine besonders reine Plasmid-Präparation wurde die DNA folgendermaßen über einen CsCl-Gradienten aufgearbeitet. Die Bakteriensuspension (500 ml) wurde bei 4°C und 5.000 rpm im GS3-Rotor (Du Pont Instruments, Bad Homburg) 5 min geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml Lösung I resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Lösung II erfolgte eine zehnteilige Inkubation auf Eis. Danach wurden 15 ml Lösung III zugesetzt, geschüttelt und für 15 min bei 4°C und 5.000 rpm (GS3-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert, mit 0,6 Volumen Isopropanol vermischt und

15 min bei 15°C und 6.000 rpm im GSA-Rotor (Du Pont Instruments, Bad Homburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml TE-Puffer resuspendiert und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 g CsCl pro ml Suspension wurde dann dieser CsCl-Lösung 0,4 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugesetzt. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation für über 10 h bei 15°C und 55.000 rpm im Vti65-Rotor (Beckman, Krefeld). Danach war die DNA als dunkelrote Bande sichtbar, welche mit einer Spritze abgezogen und in ein neues Vti65-Röhrchen überführt wurde. Das Röhrchen wurde mit einer CsCl-Lösung der richtigen Dichte (0,95 g CsCl plus 1 ml H<sub>2</sub>O) aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Die Bande wurde wiederum abgezogen und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die DNA-Lösung wurde mit TE-Puffer auf 4 ml aufgefüllt und 3 x mit je 4 ml Butanol ausgeschüttelt. Das Ethidiumbromid geht so in die organische Phase über. Die DNA in der wässrigen Phase wurde schließlich mit 2,5 Volumen Ethanol<sub>abs.</sub> gefällt.

### 2.2.2.3 DNA-Isolierung aus Pseudovirionen

Um eine Verpackung von Plasmid-DNA in Pseudovirionen nachzuweisen, wurde die jeweilige Pseudovirionen-Fraktion dialysiert (2.2.5.4.1) und folgendermaßen aufgearbeitet: 100 µl der Pseudovirionen-Fraktion wurden 1 h bei 37°C mit 3-4 U DNaseI ( $c_{\text{end}}=250 \mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Anschließend wurde der Ansatz mit 400 µl einer 2,5%igen SDS-Lösung aufgefüllt und 500 µl Phenol zugegeben. Um die Kapside aufzubrechen, wurde dieser Ansatz für 30 min bei 65°C inkubiert. Danach erfolgte 2 x eine zweiminütige Zentrifugation bei 3.000 rpm in der Biofuge *pico* (Heraeus, Osterode) und anschließend 2 x eine fünfminütige Zentrifugation bei 4.000 rpm, wobei immer die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Abschließend wurde die DNA mit Ethanol<sub>abs.</sub> gefällt, in 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen und zur Elektroporation von *E. coli*-Zellen eingesetzt (2.2.1.4).

### 2.2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um DNA-Fragmente mit geeigneten einzelsträngigen Überhängen für Ligationen zu erzeugen oder den Erfolg von Klonierungen zu prüfen, wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Die Inkubation betrug für eine vollständige Spaltung von 1 µg Plasmid-DNA mit 3 U Restriktionsendonuklease 1 h bei 37°C unter vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen. Um den Erfolg der DNA-Spaltung zu prüfen oder die

verwendeten Restriktionsendonukleasen von DNA-Fragmenten zu trennen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

#### **2.2.2.5 Ethanolfällung von DNA**

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung von DNA-Molekülen. Durch Entzug der die Moleküle umgebenden Hydrathülle durch Ethanol kommt es zur Fällung der DNA. Zu DNA-Lösungen wurde das 2,5fache Volumen  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten 96 % [v/v] Ethanols plus 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat gegeben und gut vermischt. Die Präzipitate wurden anschließend bei  $11.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  30 min sedimentiert. Die DNA-Pellets wurden an der Luft getrocknet und anschließend in der gewünschten Menge  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  resuspendiert.

#### **2.2.2.6 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 und nach Herstellerangaben gereinigt.

#### **2.2.2.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Die mit einer Restriktionsendonuklease gespaltene Vektor-DNA wurde dephosphoryliert, um eine Religation der entstandenen freien Enden zu verhindern (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde nach der Restriktionsspaltung 1 U Alkalische Phosphatase pro  $1 \mu\text{g}$  DNA zugefügt und 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Enzyme wurden durch Agarosegelelektrophorese von der DNA getrennt.

#### **2.2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten zu zirkulären Produkten**

Um spezifische DNA-Bereiche in Bakterien zu vermehren, wurden diese durch eine Ligation in geeignete Vektoren eingefügt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Ligation von Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurde in einem molaren Verhältnis von 1:3 mit Quick-DNA-Ligase in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem des Enzyms in  $20 \mu\text{l}$ -Ansätzen durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Ligationsansätze direkt zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen eingesetzt.

Für die Ligation eines PCR-Produktes in den Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> wurde das „TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet.

### 2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Auftrennung oder Reinigung von Nukleinsäuregemischen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Horizontalgele mit unterschiedlichem Agarosegehalt von 1-2 % [w/v] Agarose in TAE-Puffer verwendet. Um die DNA unter UV-Licht (302 nm) zu visualisieren, wurden 100 ml flüssiger Agarose 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml-Stocklösung) zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Probenpuffer versetzt. Das im Probenpuffer enthaltene Ficoll bewirkt das Absinken der Proben in die Taschen des Gels. Die zugesetzten Farbstoffe ermöglichen es, die Lauffront zu verfolgen. Als Längenstandard diente die „100 bp DNA Ladder“. Die Auftrennung erfolgte in einer Horizontalgelelektrophoresekammer der Firma Biometra (Göttingen) mit TAE-Laufpuffer bei 120 V. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden mit der digitalen Kamera BioDoc CCD (Biometra, Göttingen) aufgenommen.

### 2.2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Saiki *et al.*, 1985)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) dient zur exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche. Dabei wird eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt. Die doppelsträngige Matrizen-DNA wird bei 95°C zu Einzelsträngen denaturiert, an die sich anschließend bei geeigneter Hybridisierungstemperatur zwei komplementäre Oligonukleotide („Primer“) anlagern. Diese flankieren den zu amplifizierenden Bereich und dienen als Ausgangspunkt für die Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase in 5`-3`-Richtung. Mehrere aufeinanderfolgende Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation führen zur exponentiellen Amplifikation des spezifischen DNA-Bereiches. Eine PCR-Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit „Ready To Go<sup>TM</sup> PCR Beads“ der Firma Amersham

Biosciences (Freiburg) durchgeführt. Die Amplifikation der DNA erfolgte mit Hilfe eines „Gradientencyclers“ der Firma Biometra (Göttingen). Die für eine PCR verwendeten Zyklusprofile sind u. a. abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und den verwendeten Oligonukleotiden. Die auf diese Weise erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einen geeigneten Vektor kloniert.

#### **2.2.2.11 Gerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung**

(Ho *et al.*, 1989)

Um bestimmte Mutationen in DNA-Sequenzen einzuführen, wurde die gerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung angewendet. Diese Methode benötigt zwei Oligonukleotidpaare. Ein Paar (als 5`-, „Primer“ und als „Forward“-Mutagenese bezeichnet) dient der Amplifikation von DNA zwischen der Mutationssequenz und der 5`-Region. Das zweite Paar („Reverse“-Mutagenese und 3`-, „Primer“) erzeugt ein PCR-Produkt über der Mutationsstelle und der 3`-Region. Jeweils der eine „Primer“ der Paare enthält die einzuführende Mutation. Die äußeren Oligonukleotide tragen häufig eine Restriktionsschnittstelle, die eine schnelle und gerichtete Klonierung des Endprodukts erlaubt.

Die beiden Oligonukleotidpaare wurden in zwei separaten Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Deren Produkte enthielten jeweils die einzuführende Mutation und überlappten in diesem Bereich. Die beiden Produkte wurden über ein Agarosegel gereinigt, gemischt, denaturiert und hybridisiert, um eine Heteroduplex zu erzeugen, die aufgefüllt werden kann. In einer dritten PCR-Reaktion wurde schließlich mit den äußeren Oligonukleotiden das mutierte Endprodukt erzeugt, welches subkloniert werden konnte.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Trichloressigsäure(TCA)-Fällung von Proteinen**

Proteinlösungen wurden mit 1 Volumen 20%iger TCA-Lösung versetzt und bei 11.000 x g 10 min abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden zuerst mit 5%iger TCA-Lösung, dann mit Aceton gewaschen und getrocknet. Da diese Methode ausschließlich vor der Auftrennung von Proteinlösungen über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Anwendung kam, wurden die Proteinpellets in 1 x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert.

### 2.2.3.2 Chloroform-Methanol-Fällung von Proteinen

Für die Fällung von membranassoziierten Proteinen wurden Proteinlösungen mit 4 Volumen Methanol und 1 Volumen Chloroform versetzt. Zusätzlich wurden zu dieser Lösung 3 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gegeben und für 1 min geschüttelt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 5.000-8.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, klare Phase verworfen, zur unteren Phase und Interphase 3 Volumen Methanol gegeben und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und für die SDS-PAGE verwendet.

### 2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische wurden durch Elektrophorese in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS aufgetrennt (Laemmli, 1970). 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 50 µl 10 % [w/v] Ammoniumpersulfat und 2,5 µl TEMED zugegeben. Die Proben wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Elektrophoresekammer der Firma LMS GmbH Labortechnik (Dossenheim) mit Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA (Sammelgel) bzw. 25 mA (Trenngel). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen.

### 2.2.3.4 „Western Blot“

(Towbin *et al.*, 1979)

Die Übertragung von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen („Western Blot“) diente zum Nachweis elektrophoretisch getrennter Proteine mit spezifischen Antikörpern. Nach der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran Protran BA Nitrozellulose (Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert und immobilisiert. Der Transfer wurde vertikal in der mit Transferpuffer gefüllten Kammer „Trans-Blot® Cell“ (Bio-Rad Laboratories, München) bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Für den spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran zunächst 30 min bei Raumtemperatur mit 5 % [w/v] fettfreiem Milchpulver in PBS inkubiert. Danach wurde sie über Nacht mit einem in Milchlösung (s.o.) verdünntem, primären Antikörper unter Schwenken inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen,

wurde mit PBS gewaschen und anschließend mit einem in Milchlösung (s.o.) verdünntem, sekundären Antikörper 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde danach erneut mit PBS gewaschen. Die hier verwendeten sekundären Antikörper waren mit Peroxidase gekoppelt. Peroxidasemarkierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit eine Chemilumineszenz aus. Das, nach Behandlung der Membran mit „ECL™ Western Blotting Detection Reagents“, entstehende Licht, wurde über einen Film gemessen (Amersham Biosciences, Freiburg) und spezifische Proteinbanden somit detektiert.

### 2.2.3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für verschiedene Untersuchungen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden Zellen auf Deckgläsern in „6well“-Platten ausgesät. Nach einer Transfektion oder Inkubation mit Peptiden wurden die Zellen zunächst mindestens 20 min mit Methanol/EGTA<sub>0,02M</sub> bei -20°C fixiert und dann mit PBS gewaschen. Freie Proteinbindungsstellen wurden mit 5 % Ziegen-Normalserum in PBS 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den jeweiligen primären und dann sekundären, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern in PBS/Tween<sub>0,1%</sub> verdünnt für je 1 h bei 37°C. Um die DNA anzufärben, wurden die Deckgläser während einer der letzten Waschschriffe mit dem Farbstoff Hoechst33342 (Bisbenzimid) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Eindeckmittel Fluoprep (bioMérieux, Nürtingen) behandelt.

Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M, der AxioCam-Digitalkamera und der Axiovision Software 3.0 (Zeiss, Jena) analysiert.

### 2.2.4 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank (Heraeus 6000, Heraeus) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C inkubiert, die zusätzlich mit 5 % CO<sub>2</sub> angereichert war. Sie wurden unter einer sterilen Werkbank (NU-440-400E, NUAIRE) zum Passagieren mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit PBS/EDTA<sub>2,5%</sub> vom Gefäßboden gelöst, im entsprechenden Medium aufgenommen und abhängig vom jeweiligen Versuchsansatz verdünnt und weiter kultiviert. Für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellkulturen bei 250 x g 5 min sedimentiert und in 500 µl frischem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen

Einfriermedium vermischt, über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff eingebracht. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt, einmal mit Medium gewaschen und anschließend kultiviert.

## **2.2.5 Proteinexpression in eukaryotischen Zellen**

### **2.2.5.1 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Elektroporation**

Für die Transfektion von COS7-Zellen mit verschiedenen Konstrukten wurden  $2 \times 10^7$  Zellen einer großen Gewebekulturschale mit PBS/EDTA<sub>2,5mM</sub> abgelöst, mit DMEM-Medium ohne Zusätze gespült und bei 1.200 rpm in der Labofuge 400R (Heraeus, Osterode) 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml HBS-Puffer resuspendiert und der Ansatz in eine Elektroporationskammer (Gibco BRL, Eggenstein) überführt. Nach Zugabe von  $15 \mu\text{g}$  DNA wurde die Elektroporation im „Cell Porator“ (Gibco BRL, Eggenstein) auf Eis unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

200 V  
330  $\mu\text{F}$   
„low“  $\Omega$   
„fast CHARGE RATE“

Nach der Elektroporation wurde der Ansatz kurz auf Eis gehalten und dann mit einer Pasteurpipette in 19 ml DMEM-Medium überführt und nach Bedarf ausgesät.

### **2.2.5.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion**

Für die Transfektion von HUTK-Zellen mit verschiedenen Konstrukten im pTM-Vektor mussten  $5 \times 10^6$  Zellen in einer 10 cm Gewebekulturschale zunächst mit dem vTF7-3-Vacciniavirus infiziert werden (2.2.5.3.3), da die rekombinanten Gene im pTM-Vektor unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Die anschließende Lipofektion wurde mit folgenden Reagenzien der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt: „LipofectAmine, PLUS-Reagent und OptiMem-Medium“.

### 2.2.5.3 Expression viraler Proteine mit rekombinanten Vacciniaviren

#### 2.2.5.3.1 Herstellung rekombinanter Vacciniaviren

Für die Herstellung rekombinanter Vacciniaviren wurden der für das entsprechende Gen rekombinante pTM1-Transfektor und Vaccinia-Wildtyp-DNA eingesetzt. Die *in vitro* Rekombination von Vacciniaviren wurde im „6well“-Format durchgeführt. Zu 90 % konfluente HUTK<sup>-</sup>-Zellen wurden mit PBS gewaschen und zur Vorbereitung auf die Rekombination eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem temperatur-sensitiven Vacciniavirus-Stamm ts7 mit einer MOI („multiplicity of infection“) von 0,1 in DMEM-Medium ohne Zusätze infiziert. Die Zellen wurden nach Austausch des DMEM<sup>-</sup> gegen DMEM<sup>+</sup> zwei Stunden bei 33°C inkubiert.

1 µg des rekombinanten pTM-Vektors und 1 µg der Vaccinia-Wildtyp-DNA wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von 125 µl 2 x HEBS-Puffer wurden unter ständiger Bewegung der Flüssigkeit 125 µl 250 mM CaCl<sub>2</sub> zugetropft. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Das Calciumphosphat-Präzipitat verblieb unter ständigem Schwenken 1 h bei Raumtemperatur auf den Zellen. Danach wurde es gegen DMEM<sup>-</sup> ersetzt und der Ansatz für 2 h bei 39°C kultiviert. Nach Austausch gegen Vollmedium wurden die Zellen zwei Tage bei 39°C gehalten. Anschließend wurden die Zellen bei 250 x g, 4°C für 5 min geerntet und das Pellet in 900 µl 10 mM HEPES (pH 7,2) resuspendiert. Mit zwei Gefrier-Tau-Zyklen wurden die Viren freigesetzt und der Ansatz mit 100 µl 10 x PBS gepuffert. Weitere Amplifikationen erfolgten in Anwesenheit von BrdU (5-Brom-2-Desoxyuridin), welches auf rekombinante Vacciniaviren selektioniert. Dazu wurden Zellen mit PBS gewaschen und das infektiöse Gemisch (ca. 800 µl) für 1 h bei Raumtemperatur zugegeben. Der Überstand wurde abgezogen, gegen Vollmedium plus 0,1 Volumen 10 x BrdU ersetzt und die Zellen bei 37°C ein bis zwei Tage inkubiert. Diese Amplifikation wurde so lange wiederholt, bis Plaques zu sehen waren. Zur Aufreinigung der rekombinanten Vacciniaviren wurde dann eine Plaque-Reinigung mit Agarose durchgeführt.

### 2.2.5.3.2 Amplifikation und Titerbestimmung von rekombinanten Vacciniaviren

Um rekombinante Vacciniaviren zu vermehren, wurden HUTK<sup>-</sup>-Zellen in großen Gewebekulturschalen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Dazu wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit den Viren in DMEM<sup>-</sup> inkubiert. Nach Austausch gegen Vollmedium erfolgte eine Inkubation für 36-40 h bei 37°C. Die Zellen wurden geerntet und das Pellet in 900 µl 10 mM HEPES (pH 7,2) resuspendiert. Um die Viren aus den Zellen zu gewinnen, folgten zwei Gefrier-Tau-Zyklen. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10 x PBS gepuffert und bei -70°C gelagert.

Zur Bestimmung der Virustiter (PFU, „plaque forming unit“) wurde eine Infektion von Zellen mit unterschiedlichen Virusverdünnungen im „6well“-Format durchgeführt. Die infizierten Zellen wurden 48 h kultiviert, das Medium abgezogen und dann mit 0,3 % Kristallviolett in 4 % Ethanol überschichtet. Im Kontrast zu dem gefärbten Zellrasen konnten die Plaques nun ausgezählt werden. Der Virustiter ergibt sich folgendermaßen:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \frac{\text{Anzahl der Plaques}}{\text{Virusverdünnung} \times \text{ausplattiertes Volumen (ml)}}$$

### 2.2.5.3.3 Expression viraler Proteine mit rekombinanten Vacciniaviren

Für die transiente Genexpression der HPV-Kapsidproteine in Säugerzellen wurden rekombinante Vacciniaviren eingesetzt, bei denen das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors stand. Die Zellen mussten für diese Proteinexpression zusätzlich mit dem rekombinanten Vacciniavirus vTF7-3 infiziert werden, welches das Gen für die T7-RNA Polymerase trägt (Moss *et al.*, 1990). HUTK<sup>-</sup>- oder COS7-Zellen wurden mit entsprechenden, rekombinanten Vacciniaviren in serumfreiem DMEM-Medium bei Raumtemperatur infiziert. Die MOI lag bei 0,1. Nach 1 h Inkubation wurde das Infektionsgemisch abgezogen und durch Vollmedium ersetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C.

## 2.2.5.4 HPV-Pseudovirionen

### 2.2.5.4.1 Herstellung von HPV-Pseudovirionen und Reinigung über einen kontinuierlichen CsCl-Gradienten

Zur Herstellung von HPV-Pseudovirionen wurden COS7-Zellen zunächst im großen Maßstab (ca. 20 große Gewebekulturschalen) mit dem pEGFP<sub>2</sub>-NLS-Konstrukt mittels Elektroporation transfiziert (2.2.5.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit den für die Kapsidproteine rekombinanten Vacciniaviren infiziert (2.2.5.3.3). Während der nächsten 48 h wurde das „Markerplasmid“ in den Zellen amplifiziert und bei der Zusammenlagerung der Kapside verpackt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei 1.500 rpm in der Labofuge 400R (Heraeus, Osterode) für 10 min geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml „Dounce“-Puffer unter Zugabe von 0,5 % NP40, 1 µg/ml Aprotinin und 1 µg/ml Leupeptin resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen nach einem Gefrier-Tau-Zyklus in einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde in ein HB4-Zentrifugenröhrchen gegeben und zur Anreicherung der Zellkerne 10 min bei 3.500 rpm im HB4-Rotor (Du Pont Instruments, Bad Homburg) zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 4,5 ml „Dounce“-Puffer aufgenommen und mittels einer Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Dazu wurde die Lösung 3 x 45 s im „Sonifier 250“ (Branson, Dietzenbach) bei 40 % Leistung (100 W) und 80er Intervallen beschallt. Unlösliches Material wurde durch eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 10.000 rpm für 10 min abgetrennt. Der partikelhaltige Überstand wurde mit 0,4 g CsCl pro 1 ml Lösung versetzt und mit einer Ultrazentrifugation aufgereinigt. Die Ultrazentrifugation erfolgte im Vti65-Rotor bei 55.000 rpm und 12°C für mindestens 12 h. Der CsCl-Gradient wurde anschließend von unten mit einer Kanüle ausgetropft (500 µl-Fraktionen). Die Fraktionen konnten bei 4°C gelagert werden.

Zur weiteren Analyse der Fraktionen wurde zunächst der Brechungsindex mit einem Refraktormeter (Krüss, Hamburg) bestimmt. Die Pseudovirionen sollten in einem Dichtebereich zwischen 1,3630 und 1,3665 liegen. 5-10 µl jeder Fraktion wurden hinsichtlich der Expression von Kapsidproteinen mittels SDS-PAGE und „Western Blot“ analysiert. Um zu untersuchen, ob das minore L2-Protein in die HPV-Pseudovirionen eingebaut wurde, wurde zusätzlich eine analytische Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (2.2.5.4.3) durchgeführt. Für eine Analyse der DNA-Verpackung (2.2.2.3) und der Infektiosität (2.2.5.4.4) mussten die Pseudovirionen-Fraktionen dialysiert werden, um das zelltoxische

Salz zu entfernen. Die Dialyse erfolgte in Dialyseschläuchen über Nacht bei 4°C gegen 5 l PBS. Die Schläuche wurden zuvor in 0,05 M EDTA gekocht und bei 4°C gelagert.

#### **2.2.5.4.2 Herstellung von HPV-Pseudovirionen und Reinigung über einen OptiPrep-Gradienten**

(mod. nach Buck *et al.*, 2004)

Eine weitere Methode für die Generierung von HPV-Pseudovirionen ist die Expression der Kapsidproteine sowie die Amplifikation des pEGFP<sub>2</sub>-NLS-Plasmids in 293TT-Zellen und die anschließende Reinigung über einen OptiPrep-Gradienten.

Nach Transfektion mit dem „Markerplasmid“ mittels Lipofektion wurden die Zellen mit den für die Kapsidproteine rekombinanten Vacciniaviren infiziert (2.2.5.3.3). 44 h später wurden die Zellen geerntet, die Pseudovirionen extrahiert und auf den OptiPrep-Gradienten (39 %, 33 %, 27 %) geschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 3-4 h bei 234.000 x g und 16°C. Nach Fraktionierung des Gradienten (250 µl Fraktionen) konnten 5 µl direkt zur Transduktion von Zellen eingesetzt werden (s.a 2.2.5.4.4).

#### **2.2.5.4.3 Analytische Saccharose-Gradienten-Zentrifugation**

Um den Einbau des minoren L2-Proteins in die HPV-Pseudovirionen zu untersuchen, wurden die Pseudovirionen-Fractionen aus dem CsCl-Gradienten (2.2.5.4.1) über einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Dazu wurde aus 10%iger und 60%iger Saccharoselösung in PBS unter Zusatz von 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin und 10 µg/ml BSA ein linearer Gradient gegossen und 300 µl der dialysierten CsCl-Fractionen oben aufgebracht. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 36.000 rpm und 4°C für 2,5 h im SW40-Rotor (Beckman, Krefeld). Danach wurden von oben 750 µl-Fractionen abgenommen, mit TCA gefällt und zur „Western Blot“-Analyse in 20 µl Laemmli-Probenpuffer resuspendiert.

#### **2.2.5.4.4 Transduktion durch HPV-Pseudovirionen**

Um die Infektiosität der HPV-Pseudovirionen zu testen (Infektions-„Assay“), wurden 5-10 µl der jeweiligen dialysierten Fraktion (2.2.5.4.1) in 300 µl DMEM<sup>-</sup> auf COS7- oder 293TT-Zellen gegeben („24well“-Format). Es erfolgte zunächst eine Inkubation bei 4°C für 1 h.

Nach Zugabe von ca. 500  $\mu$ l DMEM<sup>+</sup> wurden die Zellen 72 h bei 37°C kultiviert. Aufgrund des verpackten pEGFP<sub>2</sub>-NLS-Plasmids konnten infizierte Zellen wegen ihrer grünen Kernfluoreszenz ausgezählt werden. Die Infektiosität der HPV-Pseudovirionen wurde immer unter Berücksichtigung der DNA-Verpackung (2.2.2.3) ausgewertet. Die Werte für mutante Pseudovirionen wurden im Vergleich zum Wildtyp auf die relative Menge der verpackten DNA normiert.

## 2.2.6 Membranassoziations-, „Assays“

### 2.2.6.1 Fraktionierung zellulärer Membranen

(Gaynor *et al.*, 1994)

Um die Lokalisation von Proteinen an zellulären Membranen zu untersuchen, wurden 1-2 x 10<sup>7</sup> COS7-Zellen nach Transfektion mit entsprechenden Konstrukten von einer großen Gewebekulturschale abgelöst und bei 300 x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und mindestens 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen. Das Lysat wurde nun bei 800 x g und 4°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand (S<sub>800</sub>) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das Pellet (P<sub>800</sub>) in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der erste und zweite S<sub>800</sub>-Überstand wurde vereinigt und 10 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (S<sub>13.000</sub>) enthält cytosolische Proteine und konnte für weitere Analysen verwendet werden. Das Membranpellet (P<sub>13.000</sub>) wurde nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes in 100  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und direkt für die folgende Fraktionierung eingesetzt. Dazu wurden 2 ml 1,5 M Saccharoselösung in ein SW60-Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 2 ml einer 1,2 M Saccharoselösung überschichtet. Die Saccharoselösungen wurden in Lysepuffer angesetzt. Vorsichtig wurde nun die P<sub>13.000</sub>-Lösung oben aufgetragen. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation im SW60-Rotor (Beckman, Krefeld) für 1 h bei 4°C und 35.000 rpm. Während der Zentrifugation wurden 6 Reaktionsgefäße auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation sollten im Gradienten zwei Membranbanden zu sehen sein, eine in der 1,2 M Saccharosestufe und eine zwischen den beiden Stufen. Sechs Fraktionen unterschiedlichen Volumens wurden laut Protokoll in die vorgekühlten Reaktionsgefäße überführt und die Proteine mit Chloroform/Methanol gefällt (2.2.3.2). Die Präzipitate wurden in 50  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer resuspendiert.

### 2.2.6.2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Extraktion zellulärer Membranen

Um assoziierte von integralen Membranproteinen zu unterscheiden, wurden  $1-2 \times 10^7$  COS7-Zellen nach Transfektion oder HUTK<sup>-</sup>-Zellen nach Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren wie unter 2.2.6.1 geerntet und aufgearbeitet. Das P<sub>13.000</sub>-Pellet wurde hier in 2 ml Lysepuffer resuspendiert und in einem SW60-Zentrifugenröhrchen auf ein 10%iges Saccharosekissen geschichtet. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation für 45 min bei 4°C und 45.000 rpm im SW60-Rotor (Beckman, Krefeld). Das Pellet wurde in 1 ml 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (pH 11,5) mittels zehnmaliger Passage durch eine 25G-Kanüle homogenisiert und 1 h auf Eis gelagert. Der Ansatz wurde mit der Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung auf ein Endvolumen von ca. 3,7 ml gebracht und bei 4°C 30 min und 35.000 rpm im SW60-Rotor erneut zentrifugiert. Der Überstand (enthält assoziierte Membranproteine) wurde mit 7,5 µl Essigsäure pro ml Probe neutralisiert, mit TCA gefällt (2.2.3.1) und in 100 µl Lysepuffer resuspendiert. Das Pellet (enthält integrale Membranproteine) wurde in 80 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 20 µl 10 % NP40 versetzt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis konnten beide Proteinlösungen mittels „Western Blot“ analysiert werden. Zum Vergleich wurden hier auch das P<sub>800</sub>-Pellet (s. 2.2.6.1) und der S<sub>13.000</sub>-Überstand nach TCA-Fällung in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und analysiert.

### 2.2.7 Cytotoxizitäts-, „Assays“

#### 2.2.7.1 ATP-, „Assay“

Um den cytotoxischen Effekt von synthetischen Peptiden auf eukaryotische Zellen zu untersuchen, wurde u. a. das „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die zu messende, zelluläre ATP-Menge soll hier Auskunft über den Zustand der Zellen geben. Dazu wurden  $4 \times 10^4$  HeLa-Zellen pro „well“ einer „96well“-Platte ausgesät. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und 100 µl einer Peptidverdünnung zu den Zellen pipettiert. Die Peptidverdünnungen (Stammlösung: 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) wurden entweder in „Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7,2, plus 20 mM HEPES)“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) oder in einem Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (pH 6,0, plus 56 mM Glucose) angesetzt. Als Vergleichswert wurden Zellen ausschließlich mit den reinen Lösungen ohne Peptide versetzt. Die Inkubation von 1 h bis 20 h erfolgte bei 37°C in einer feuchten Kammer. Für die ATP-Messung wurde der Zellkulturüberstand abgenommen

und die Zellen in 150 µl 1 % Triton resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in ein Röhrchen mit 150 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Nach Zugabe von 10-20 µl des „Luciferase reagent“ erfolgte die Messung im Biolumat LB9500 der Firma Berthold (Pforzheim). Der Vergleichswert sollte immer zwischen 200.000 und 400.000 RLU betragen und wurde gleich 100 % ATP gesetzt.

#### **2.2.7.2 „Toxilight™-Assay“**

Eine weitere Methode zur Messung des cytotoxischen Effekts von Peptiden ist der „Toxilight™-Assay“ der Firma BioWhittaker (Verviers, Belgien). Dabei wird das Austreten der Adenylat-Kinase aus geschädigten Zellen in das umgebende Medium gemessen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.7.1 beschrieben ausgesät und mit Peptiden inkubiert. Nach Inkubation wurde der Zellkulturüberstand mit 100 µl „Detection Reagent“ versetzt und 5 min inkubiert. Danach erfolgte eine Biolumineszenzmessung (s. 2.2.7.1).

#### **2.2.7.3 FACS-Analyse der Aufnahme von Propidiumjodid**

Um direkt den Effekt von synthetischen Peptiden auf die Cytoplasmamembran von Säugerzellen zu untersuchen, wurde nach Peptidinkubation die Aufnahme von Propidiumjodid mittels FACS-Analyse gemessen. Dazu wurden  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen pro „well“ einer „6well“-Platte am Vortag ausgesät. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und die Peptidverdünnungen (in HBSS, s. 2.2.7.1) in einem Volumen von 2 ml auf die Zellen gegeben. Als Vergleichswert wurden Zellen nur mit reiner HBSS-Lösung ohne Peptide versetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 5 h bei 37°C. Die Peptide wurden dann abgezogen und die Zellen gründlich mit PBS gewaschen. Nach Abspülen und Ernten der Zellen mit PBS/EDTA<sub>2,5mM</sub> wurde das Pellet in 1 ml PBS/FCS<sub>2%</sub> resuspendiert und 3 x gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 900 µl PBS/FCS<sub>2%</sub> aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Kurz vor der Messung wurden 100 µl Propidiumjodid (c = 5 µg/ml) je Probe zugegeben. Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem FACS Calibur und entsprechender „Software“ der Firma Becton Dickinson (Heidelberg).

### 3 Ergebnisse

Auf der Suche nach potentiellen membrandestabilisierenden Aktivitäten der Kapsidproteine von HPV33 wurde die Ähnlichkeit eines carboxyterminalen L2-Peptids mit dem von Ruissen *et al.* (2001) beschriebenen Peptid dhvar5 (LLLFLKRRKKRKY) beobachtet. Charakteristisch für das synthetische dhvar5-Peptid ist ein Bereich hydrophober Aminosäuren gefolgt von einem Bereich basischer Aminosäuren. Es gilt als membrandestabilisierend und weist sowohl eine mikrobizide als auch eine fungizide Aktivität auf. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Jan Bolscher in Amsterdam konnte nachgewiesen werden, dass die analogen L2-Peptide von HPV16, 18 und 33 ebenfalls eine mikrobizide und fungizide Aktivität haben. In Cytotoxizitätstests mit u.a. *Candida albicans* wurden LC<sub>50</sub>-Werte von 16,3 µg/ml, 9,5 µg/ml und 5,5 µg/ml ermittelt (Abb. 3.1).

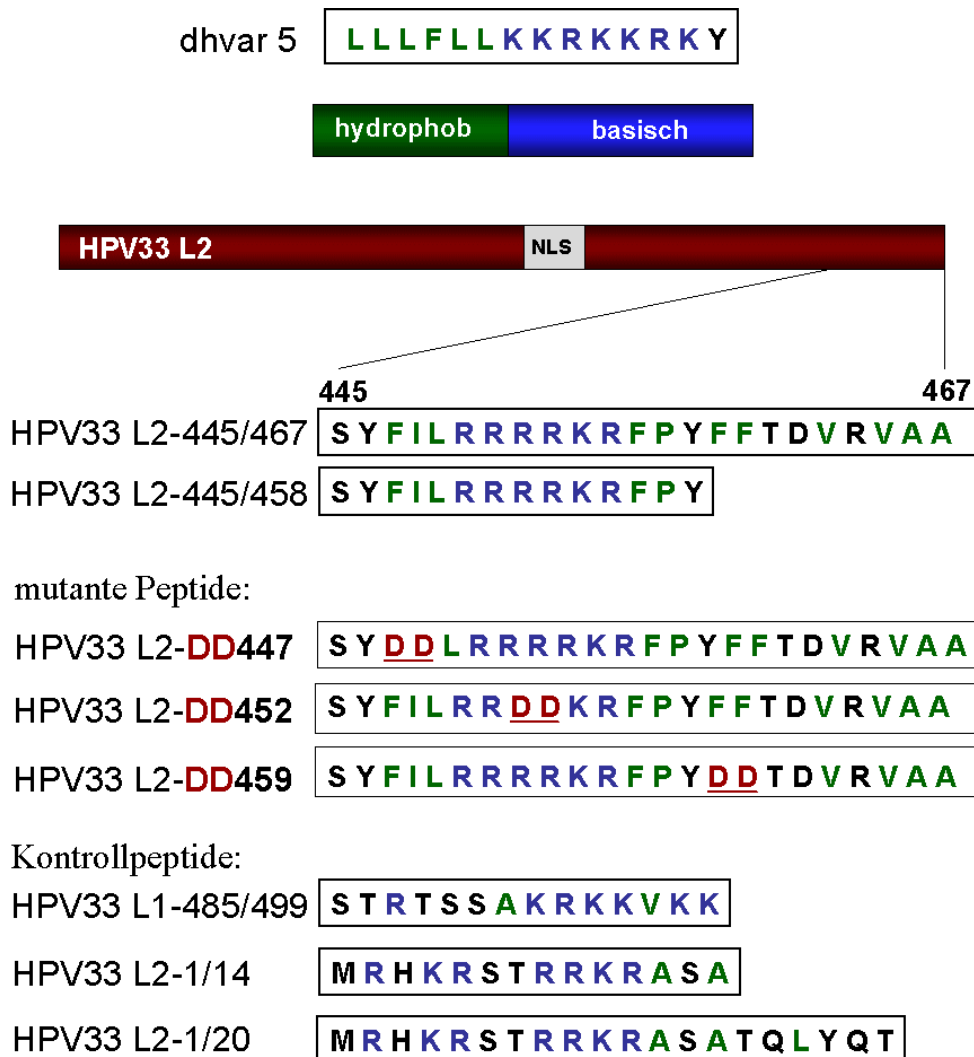
dhvar 5	LLLFLKRRKKRKY	LC <sub>50</sub> : 3.5 µg/ml
HPV16 L2	SYMLRKRRLPY	LC <sub>50</sub> : 16.3 µg/ml
HPV18 L2	LYYFIRKKRVPY	LC <sub>50</sub> : 9.5 µg/ml
HPV33 L2	SYFILRRRKRFPY	LC <sub>50</sub> : 5.5 µg/ml

**Abb. 3.1: Schematische Darstellung des dhvar5-Peptids und analoger L2-Peptide**

Es sind die zu dhvar5 analogen L2-Peptide von HPV16, 18 und 33 und die aus Cytotoxizitätstests mit *C. albicans* resultierenden letalen Konzentrationen (LC<sub>50</sub>) dargestellt.

Für die nun folgenden Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde zusätzlich zu dem dhvar5-Analog 33L2-445/458 ein auf 23 Aminosäuren verlängertes Peptid gewählt (33L2-445/467), da der Bereich „downstream“ sehr hydrophob ist (vgl. Abb. 3.2). Um nun die potentielle Rolle dieses L2-Peptids für die Virus-bedingte Endosomolyse in

Säugerzellen zu analysieren, sollte a) die membrandestabilisierende Aktivität von Peptiden, b) die Membranassoziation von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen und L2-Proteinen und c) der Effekt von Mutationen innerhalb dieses Peptids auf die Infektiosität von Pseudovirionen untersucht werden.



**Abb. 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten 33L2-Peptide**

Es sind die carboxyterminalen L2-Peptide 33L2-445/458 und 33L2-445/467 sowie mutante Peptide mit einem Aminosäureaustausch gegen zwei saure Aspartatreste dargestellt. Hydrophobe und basische Aminosäuren sind in grün und blau, eingefügte Mutationen in rot hervorgehoben. Als Kontrollen dienten Peptide von HPV33 L2 und L1 mit Bereichen basischer Aminosäuren. Die Zahlen kennzeichnen die jeweils erste und letzte im Peptid noch vorhandene Aminosäure von 33L2 bzw. 33L1. Die Peptide wurden synthetisch hergestellt. Zusätzlich ist die ungefähre Position des L2 Kernlokalisierungssignals gezeigt (aa295-aa310). NLS: „nuclear localisation sequence“

### 3.1 Cytotoxizität des synthetischen Peptids 33L2-445/467

Im Folgenden wurde untersucht, ob das carboxyterminale 33L2-Peptid nicht nur für Mikroorganismen, sondern auch für höhere eukaryotische Zellen wie die von Säugetieren cytotoxisch ist. Dazu kamen verschiedene Methoden zur Anwendung.

#### 3.1.1 Morphologische Veränderungen von HeLa-Zellen nach Peptidinkubation

Zunächst sollte geprüft werden, welche Auswirkungen die Inkubation der L2-Peptide auf das Erscheinungsbild von eukaryotischen Zellen hat. Dazu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und 5 h mit den synthetischen Peptiden inkubiert. Anschließend konnten die Zellen mit dem unter 2.2.3.5 beschriebenen Mikroskop im Durchlicht fotografiert werden.

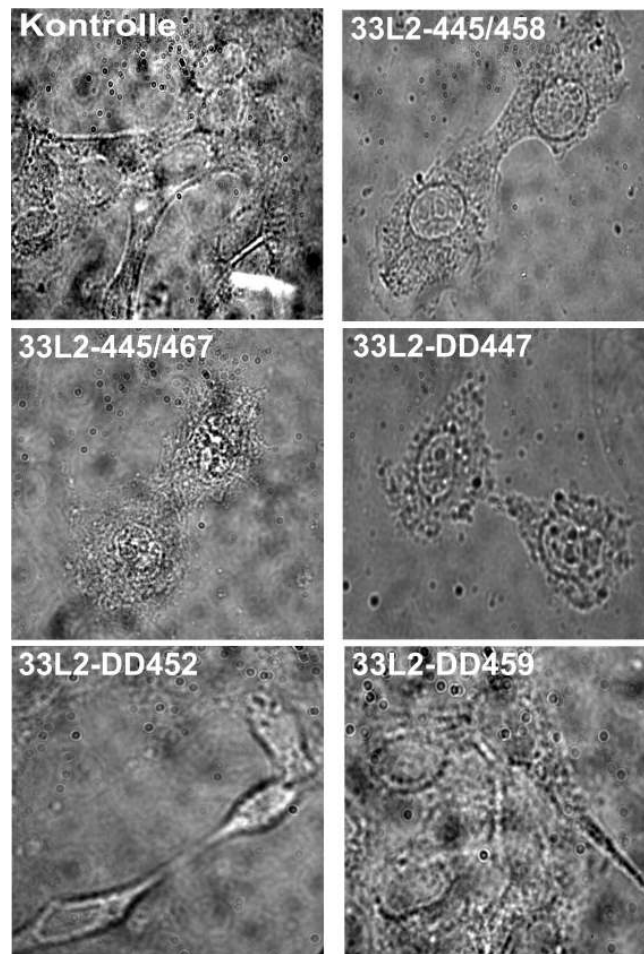


Abb. 3.3: HeLa-Zellen nach Inkubation mit carboxyterminalen 33L2-Peptiden

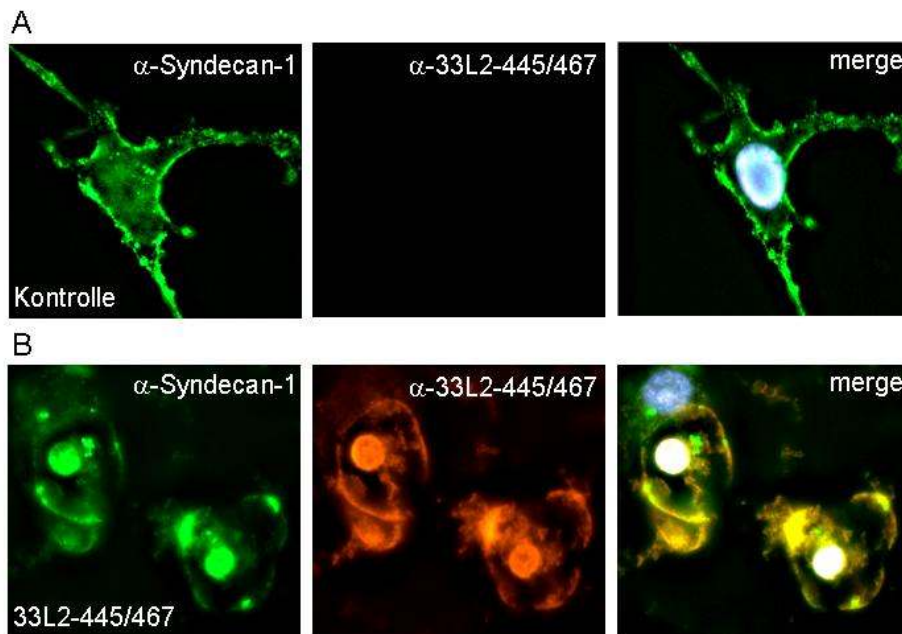
Legende siehe folgende Seite

Legende zur Abbildung 3.3

Es sind Durchlichtaufnahmen von HeLa-Zellen dargestellt, die für 5 h mit den genannten 33L2-Peptiden bei 37°C inkubiert wurden (primäre Vergrößerung: x 100). Die Peptide wurden mit einer Konzentration von 100 µg/ml in Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7,2) auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden Zellen fotografiert, die mit reiner HBSS-Lösung versehen waren.

Im Vergleich zur Kontrolle, welche die HeLa-Zellen in ihrer lang gestreckten, natürlichen Form zeigt, führte die Inkubation mit den carboxyterminalen L2-Peptiden 33L2-445/458 und 33L2-445/467 zu einer Veränderung der Zellmorphologie (Abb. 3.3). Die Zellen waren abgerundet, wirkten dehydriert und nekrotisch. Gleiches konnte auch nach Inkubation der Zellen mit der Peptid-Mutante 33L2-DD447 beobachtet werden. Im Gegensatz dazu hatten die Mutanten 33L2-DD452 und 33L2-DD459, wie auch die Kontrollpeptide (nicht gezeigt), keinen Einfluss auf das Erscheinungsbild der HeLa-Zellen.

Zusätzlich wurde mit Hilfe eines 33L2-445/467 spezifischen Antiserums die Lokalisation der Peptide an und in den HeLa-Zellen analysiert (Abb. 3.4). 5 h nach Inkubation mit 33L2-445/467 konnte eine Kolokalisation des Peptids mit der Cytoplasma- und intrazellulären Membranen wie der Kernmembran beobachtet werden. Weiter wurde das Peptid zusammen mit dem Proteoglykan Syndecan-1 im Zellkern detektiert.



**Abb. 3.4: HeLa-Zellen nach Inkubation mit 33L2-445/467**

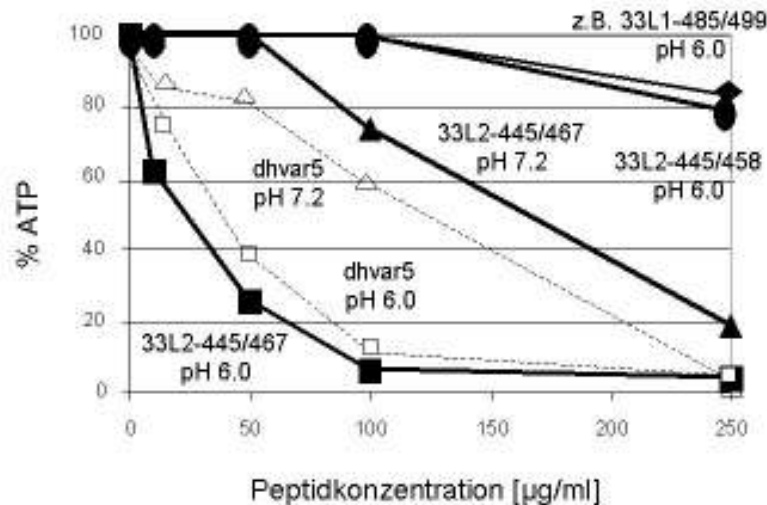
Legende siehe folgende Seite

Legende zur Abbildung 3.4

Es sind Präparate von HeLa-Zellen dargestellt, die mit 33L2-445/467 inkubiert wurden (primäre Vergrößerung: x 100). Als Kontrolle dienten wiederum Zellen, die mit reiner HBSS-Lösung (pH 7,2) versehen waren. Die Zellen wurden fixiert und mit 33L2-445/467- und Syndecan-1-spezifischen Antikörpern versetzt, welche von einem Cy3-gekoppelten Kaninchen- bzw. Cy2-gekoppelten Mausantikörper erkannt wurden. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung durchgeführt (2.2.3.5), die in der „merge“-Abbildung zu sehen ist. **A:** HeLa-Zellen, die ohne Peptide bei pH 7,2 und 37°C für 5 h inkubiert wurden, **B:** HeLa-Zellen, die für 5 h bei 37°C mit 33L2-445/467 (100 µg/ml in HBSS, pH 7,2) inkubiert wurden

### 3.1.2 Einfluss der Peptide auf den ATP-Gehalt eukaryotischer Zellen

Im Weiteren wurde der cytotoxische Effekt der carboxyterminalen L2-Peptide auf eukaryotische Zellen genauer untersucht. Eine Methode ist die Messung des intrazellulären ATP-Gehalts nach Inkubation mit den Peptiden. HeLa-Zellen wurden mit Peptiden ansteigender Konzentrationen in saurer oder neutraler Lösung inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten für einen „ATP Bioluminescence Assay“ präpariert (2.2.7.1). Die folgenden Ergebnisse wurden aus Werten von 3 unabhängigen Experimenten gemittelt.

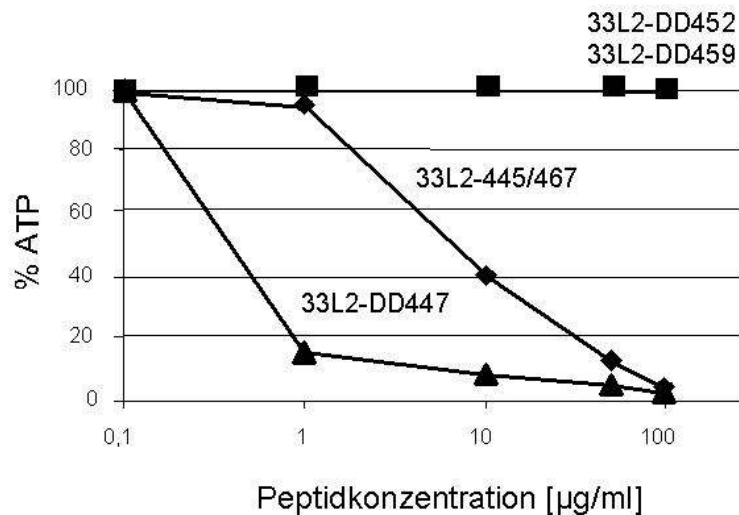


**Abb. 3.5: Zellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit 33L2-Peptiden**

Es ist der zelluläre ATP-Gehalt (% ATP) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration (µg/ml) nach 15 h Inkubation bei 37°C dargestellt. Die genannten Peptide wurden entweder in saurer oder in neutraler Lösung angesetzt (2.2.7.1). Exemplarisch für die Kontrollpeptide ist das Peptid 33L1-485/499 gezeigt. Die hier verwendeten Peptidpräparationen hatten einen Reinheitsgrad von >70%.

Die Inkubation von HeLa-Zellen mit 33L2-445/467 bei pH 7,2 reduzierte reproduzierbar den zellulären ATP-Gehalt mit einer letalen Konzentration ( $LC_{50}$ ) von etwa 170  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 3.5). Dieser Effekt konnte drastisch verstärkt werden, wenn die Inkubation der Peptide bei pH 6,0 durchgeführt wurde ( $LC_{50} = 40 \mu\text{g/ml}$ ). Kontrollpeptide wie z.B. 33L1-485/499 führten auch bei pH 6,0 nicht zu einer signifikanten Reduktion des ATP-Gehalts. Das dhvar5-Analog 33L2-445/458 zeigte in diesem Test ebenfalls keinen cytotoxischen Effekt, ganz im Gegensatz zu dhvar5. Die Aktivität von 33L2-445/467 hingegen konnte durch die Verwendung von Peptidpräparationen mit einem Reinheitsgrad von >95% auf einen  $LC_{50}$ -Wert von 8  $\mu\text{g/ml}$  weiter verstärkt werden (Abb. 3.6).

Die Untersuchung von mutanten Peptiden führte zu folgendem Ergebnis (Abb. 3.6): Während der Austausch von zwei hydrophoben Aminosäuren in der N-terminalen Region gegen Aspartat (33L2-DD447) die Aktivität von 33L2-445/467 verstärkte, wurde die Reduktion des zellulären ATP-Gehalts durch den Aminosäureaustausch in dem basischen Bereich wie auch in der C-terminalen Region (33L2-DD452 und 33L2-DD459) völlig aufgehoben.

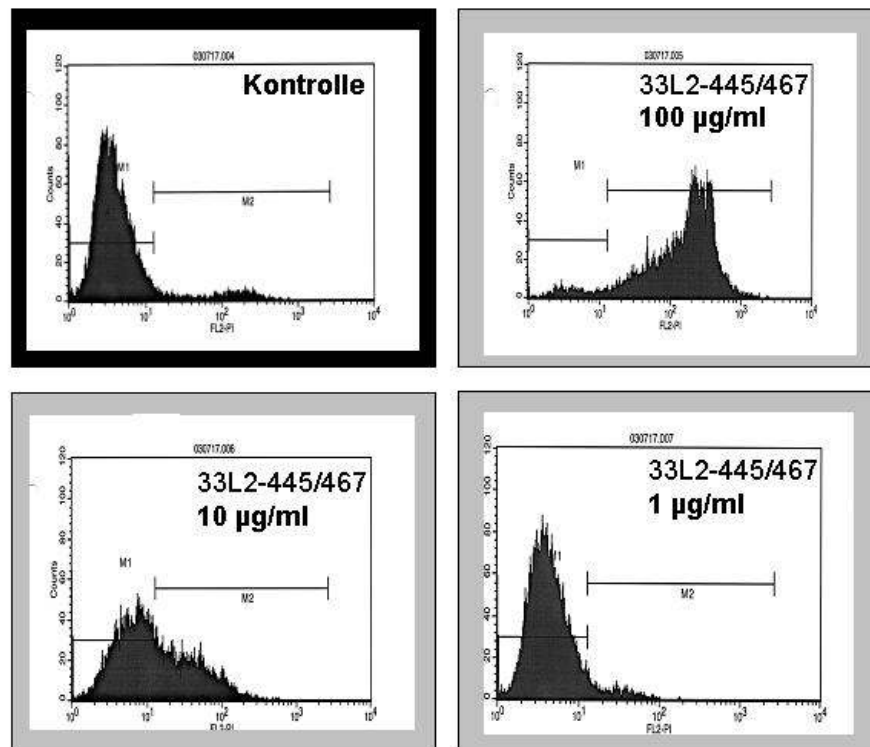


**Abb. 3.6: Zellulärer ATP-Gehalt nach Inkubation mit mutanten 33L2-Peptiden**

Es ist der zelluläre ATP-Gehalt (% ATP) in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) nach 15 h Inkubation bei 37°C und pH 7,2 dargestellt. Die hier verwendeten Peptidpräparationen hatten einen Reinheitsgrad von >95%.

### 3.1.3 Permeabilität von Zellen für Propidiumjodid nach Peptidinkubation

Schließlich sollte analysiert werden, ob eukaryotische Zellen durch den Einfluss von Peptiden auf die Cytoplasmamembran für hydrophile Substanzen permeabel werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit Peptiden ansteigender Konzentrationen für 5 h inkubiert und anschließend einer FACS-Analyse unterzogen (2.2.7.3). Auf diese Weise konnte der Influx einer hydrophilen Substanz wie Propidiumjodid (PI) in die Zellen gemessen werden. Die Abbildung 3.7 zeigt, dass, im Vergleich zur Kontrolle, ein großer Teil der Zellen, die mit 100 µg/ml 33L2-445/467 inkubiert wurden, für Propidiumjodid permeabel ist. Dieser Effekt wurde mit sinkender Peptidkonzentration schwächer. Bei 10 µg/ml waren nur noch weniger als 40% der Zellen für Propidiumjodid durchlässig (s.a. Tab. 3.1). Eine Peptidkonzentration von 1 µg/ml hatte schließlich keinen Einfluss mehr auf die Permeabilität der HeLa-Zellen.



**Abb. 3.7: Aufnahme von Propidiumjodid in HeLa-Zellen nach Inkubation mit 33L2-Peptiden**

Es ist die FACS-Analyse von HeLa-Zellen nach 5 h Inkubation mit genannten Konzentrationen von 33L2-445/467 bei 37°C und pH 7,2 dargestellt. Kurz vor der Messung wurden 0,5 µg/ml Propidiumjodid zugegeben. Die verwendeten Peptidpräparationen hatten einen Reinheitsgrad von >95%. Als Kontrolle wurden Zellen mit HBSS (pH 7,2) ohne Peptide inkubiert.

In Tabelle 3.1 sind noch einmal die Ergebnisse der FACS-Analyse zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden aus Werten von 3 unabhängigen Experimenten gemittelt. Im Gegensatz zu 33L2-445/467 konnte das kürzere 33L2-445/458, genau wie die Kontrollpeptide, auch bei einer Konzentration von 100 µg/ml keine Aufnahme von Propidiumjodid in HeLa-Zellen induzieren. Die Substitution von Aminosäuren an Position 452 und 453 oder an 459 und 460, nicht aber an Position 447 und 448, reduzierte den Effekt des carboxyterminalen L2-Peptids auf die Cytoplasmamembran. Bei einer Peptidkonzentration von 100 µg/ml war nach Inkubation mit 33L2-DD452 oder 33L2-DD459 noch ein großer Teil der Zellen permeabel für Propidiumjodid, während bei einer Konzentration von 10 µg/ml bereits kein Effekt mehr gemessen wurde.

Um eine Autofluoreszenz der untersuchten Peptide auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollen ohne Zugabe von Propidiumjodid durchgeführt (nicht gezeigt). Es konnte keine Autofluoreszenz ermittelt werden.

**Tab. 3.1 Permeabilität von HeLa-Zellen für PI nach Inkubation mit 33L2-Peptiden**

Peptid	% Permeabilität		
	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
Kontrolle		6	
<b>33L2-445/467</b>	<b>92</b>	<b>37</b>	5
33L2-445/458	7	3	3
33L2-1/14	3	3	4
33L2-1/20	4	5	4
<b>33L2-DD447</b>	<b>84</b>	<b>40</b>	3
<b>33L2-DD452</b>	<b>70</b>	6	4
<b>33L2-DD459</b>	<b>53</b>	12	3
33L1-485/499	7	5	6

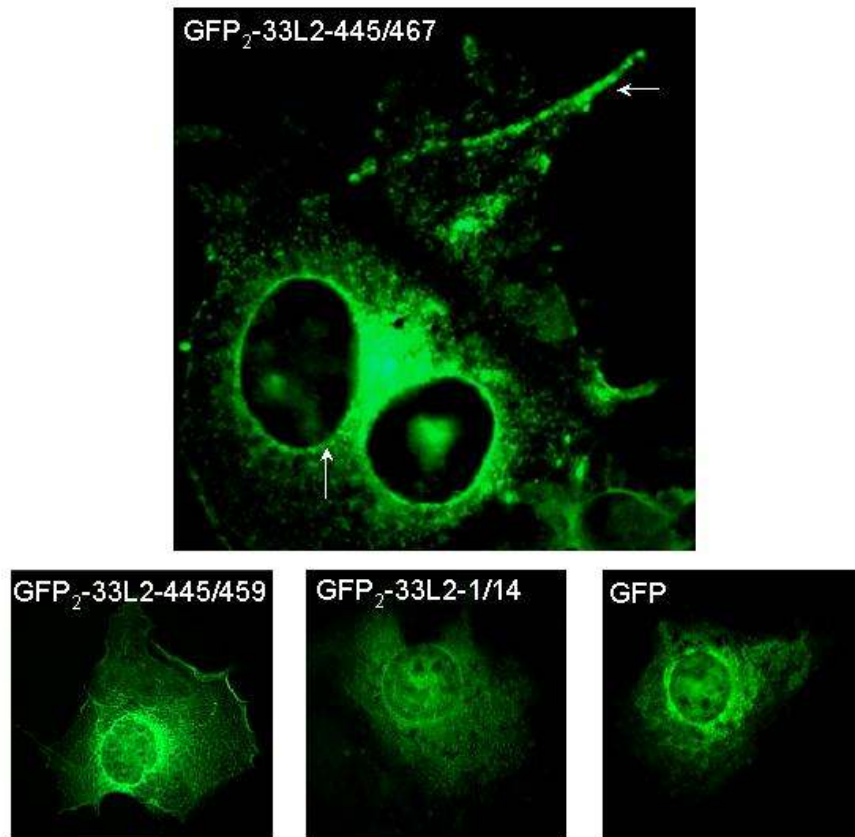
Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit einem anderen Test erzielt, dem „Toxilight<sup>TM</sup>-Assay“, bei dem nach Inkubation mit Peptiden das Austreten der Adenylat-Kinase in das umgebende Medium gemessen wurde (s. 2.2.7.2, Daten nicht gezeigt).

### 3.2 Membranassoziation von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen und L2-Proteinen

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass das carboxyterminale Peptid 33L2-445/467 mit 23 Aminosäuren cytotoxisch für höhere eukaryotische Zellen ist, indem es nach externer Zugabe membrandestabilisierend wirkt. Das kürzere dhvar5-Analog 33L2-445/458 hatte zwar einen Einfluss auf das Erscheinungsbild von Säugerzellen, konnte jedoch keinen cytotoxischen Effekt ausüben. Für die folgenden Analysen konnte auf verschiedene Konstrukte für die GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen und L2-Deletionsmutanten sowie die Wildtypproteine zurückgegriffen werden, die bereits in der Arbeitsgruppe vorlagen. Zusätzlich wurden im Verlauf dieser Arbeit weitere Konstrukte hergestellt.

#### 3.2.1 Assoziation von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen an zellulären Membranen

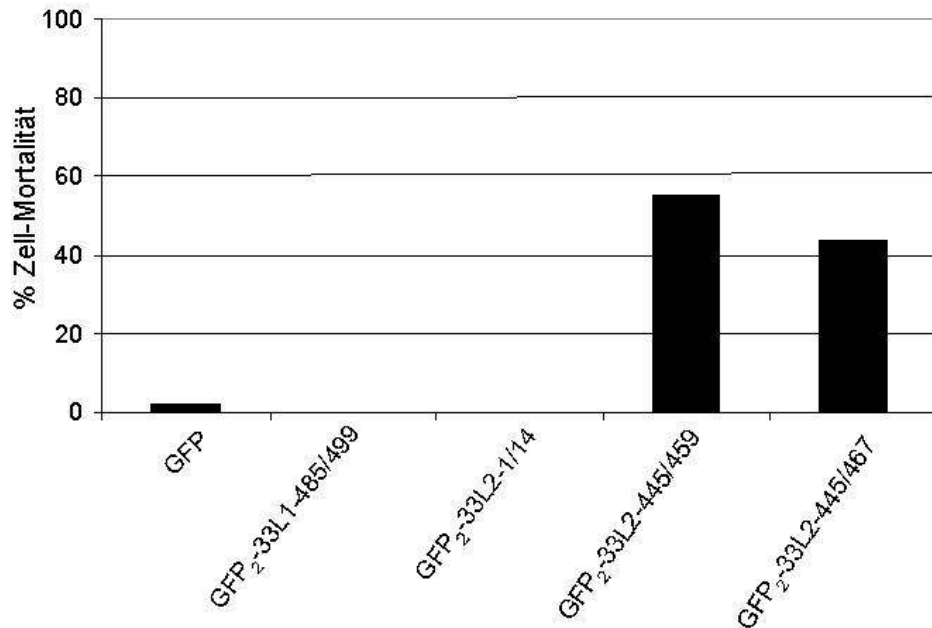
Um nun die intrazelluläre Aktivität der L2-Peptide zu untersuchen, sind Fusionskonstrukte mit dimerem GFP hergestellt worden. Hierzu wurde mittels PCR ein monomeres GFP-Peptid-Fragment amplifiziert und anhand der verwendeten Oligonukleotide mit Restriktionsschnittstellen versehen. Dieses Fragment wurde über den Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> in den gleichermaßen mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Expressionsvektor pEGFP-C1 kloniert. Die Konstrukte wurden über Elektroporation (2.2.5.1) in COS7-Zellen eingebracht und unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert. 24 h nach Transfektion wurde zunächst die subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine analysiert. Dazu wurden die Zellen direkt nach der Transfektion auf Deckgläsern ausgesät, zum genannten Zeitpunkt fixiert und die GFP-Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert (2.2.3.5). Die Abbildung 3.8 zeigt, dass Kontrollen wie GFP oder GFP<sub>2</sub>-33L2-1/14 eher diffus in der Zelle und im Zellkern verteilt sind. Im Gegensatz dazu akkumulierte GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467 an zellulären Membranen wie der Cytoplasmamembran und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Ähnliches konnte auch nach Expression von GFP<sub>2</sub>-33L2-445/459 beobachtet werden.



**Abb. 3.8: Expression von GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467 in COS7-Zellen**

Die Abbildung zeigt COS7-Zellen 24 h nach Transfektion mit pEGFP<sub>2</sub>-33L2-445/467, pEGFP<sub>2</sub>-33L2-445/459, pEGFP<sub>2</sub>-33L2-1/14 und pEGFP-C1, fotografiert mit dem Zeiss Axiovert 200 M-Mikroskop (primäre Vergrößerung: x 100). Die weißen Pfeile weisen auf eine Membranassoziation hin.

Im Verlauf dieser Expressionsanalysen wurde ebenfalls beobachtet, dass ein hoher Prozentsatz der GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467- und in diesem Fall auch GFP<sub>2</sub>-33L2-445/459-exprimierenden Zellen abgestorben ist (Abb. 3.9). Dies wurde anhand des nekrotischen Erscheinungsbildes der Zellen festgelegt und dementsprechend ausgezählt. Die toten Zellen verloren ihre ursprüngliche Form und zeigten eine Artefakt-ähnliche GFP-Fluoreszenz, welche über die gesamte Zelle hinweg akkumulierte. Die Kontrollen wie GFP oder dimeres GFP, welches an Kontrollpeptide fusioniert ist, führten nicht zum Absterben der Zellen. Diese Ergebnisse deuteten weiter darauf hin, dass die carboxyterminalen L2-Peptide, hier nach intrazellulärer Expression, einen membrandestabilisierenden Effekt ausüben können.

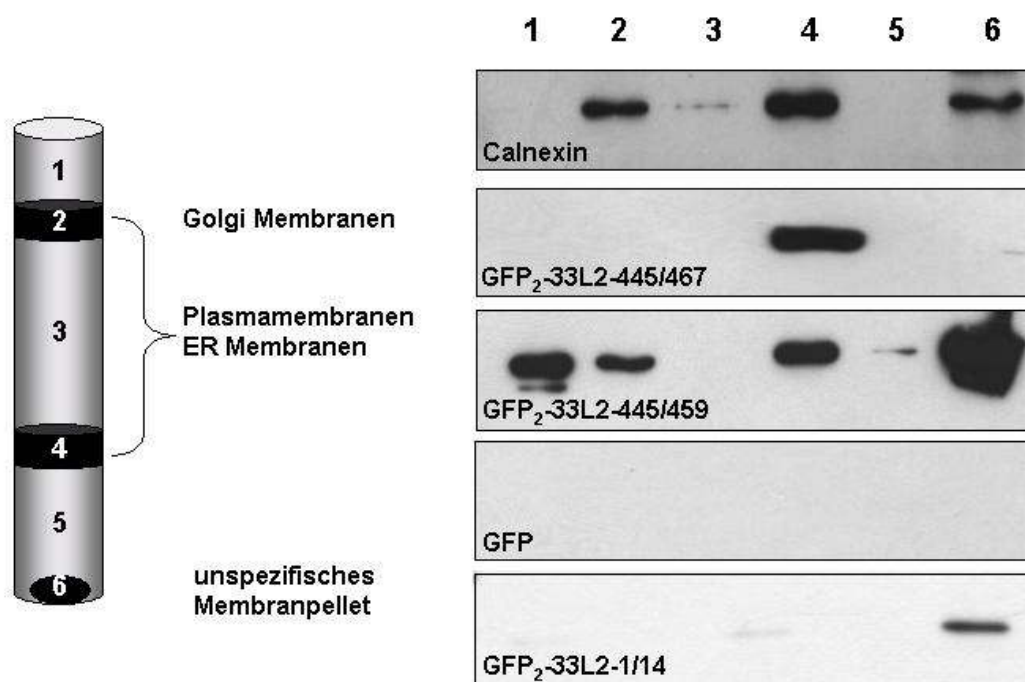


**Abb. 3.9: Mortalität von COS7-Zellen nach Expression der GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen**

Es ist die Mortalität von COS7-Zellen 24 h nach Transfektion mit verschiedenen GFP<sub>2</sub>-Peptid-Konstrukten dargestellt. Von je 100 wurden die toten Zellen ausgezählt und die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt.

Im Weiteren wurde nun eine mögliche Membranassoziation der GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen biochemisch analysiert. Die GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen wurden in COS7-Zellen exprimiert und die Zellen anschließend für eine Fraktionierung zellulärer Membranen präpariert (2.2.6.1). Dazu wurden die Zellen aufgebrochen, die Membranen isoliert und direkt für eine Zentrifugation über einen Saccharose-Stufen-Gradienten verwendet. Nach der Fraktionierung wurden die Proteine mit einem GFP-spezifischen „Western Blot“ analysiert.

Die Abbildung 3.10 zeigt eine derartige Fraktionierung von Membranen und den entsprechenden „Western Blot“. Als Kontrolle diente Calnexin, ein integrales Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums, das mit einem Calnexin-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnte. Dieses wurde in Fraktion 2, 4 und 6 gefunden, welche laut Protokoll Plasmamembranen und ER-Membranen, sowie ein unspezifisches Membranpellet in Fraktion 6 enthalten.



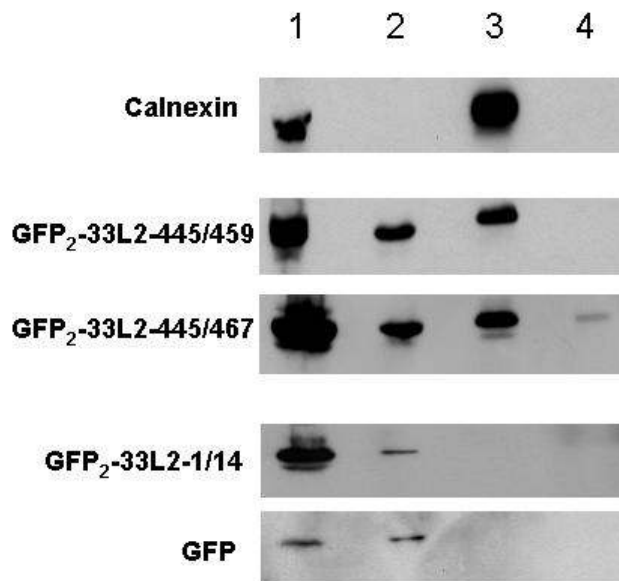
**Abb. 3.10: Fraktionierung zellulärer Membranen nach Expression der GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen**

Es sind die Fraktionierung zellulärer Membranen 24 h nach Transfektion mit den GFP<sub>2</sub>-Peptid-Konstrukten und die Calnexin- sowie die GFP-spezifischen „Western Blot“-Analysen dargestellt. Die Zahlen kennzeichnen die einzelnen Fraktionen.

Es wurden beide GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen in Membranfraktionen gefunden, GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467 und GFP<sub>2</sub>-33L2-445/459 (Abb. 3.10). Während GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467 reproduzierbar mit Cytoplasmamembranen und Membranen des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert war (Abb. 3.10, Spur 4), variierte die Verteilung von GFP<sub>2</sub>-33L2-445/459 von Experiment zu Experiment. Dieses befand sich in einigen Experimenten auch in der Nicht-Membranfraktion Nr.1. GFP allein konnte hingegen nicht mit Membranen gereinigt werden. Das galt bei dieser Untersuchung nicht immer für Kontrollpeptide, die an GFP<sub>2</sub> fusioniert wurden. GFP<sub>2</sub>-33L2-1/14 konnte manchmal als schwache Bande in Fraktion 6, dem unspezifischen Membranpellet, detektiert werden. Möglicherweise lässt sich dies auf die Methodik zurückführen und die Schwierigkeit, die Zellkerne vollständig von der Membranfraktion zu trennen (s. 2.2.6.1). Auch aus diesem Grund wurde weiter untersucht, ob die GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen eher an Membranen assoziieren oder vielleicht sogar in Membranen integrieren können. Nach Transfektion von COS7-Zellen mit den entsprechenden GFP<sub>2</sub>-Peptid-

Konstrukten wurden zu diesem Zweck isolierte Membranen mit einem Carbonat-Puffer bei pH 11,5 behandelt (2.2.6.2). Diese Methode erlaubt eine Unterscheidung zwischen Membran-assoziierten Proteinen, welche von den Membranen abgelöst werden, und solchen, die als integrale Proteine vorliegen. Die Abbildung 3.11 zeigt eine GFP-spezifische „Western Blot“-Analyse dieser Carbonat-Behandlung von isolierten Membranen. Als Kontrolle für ein integrales Membranprotein diente wieder Calnexin, welches mit einem Calnexin-spezifischen Antikörper nachgewiesen und sowohl in der Kernfraktion als auch in jener mit den integralen Proteinen gefunden wurde.

Die carboxyterminalen 33L2-Peptide induzierten eine Insertion des dimeren GFP in zelluläre Membranen. GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467 und GFP<sub>2</sub>-33L2-445/459 konnten beide als integrale Membranproteine detektiert werden (Abb. 3.11, Spur 3). Sie wurden zusätzlich aber auch in der Kernfraktion und im Cytosol, sowie ein kleiner Teil von GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467 als Membran-assoziiert lokalisiert (Abb. 3.11, Spur 4). Kontrollen wie GFP allein oder GFP<sub>2</sub>-33L2-1/14 waren nicht Membran-assoziiert.

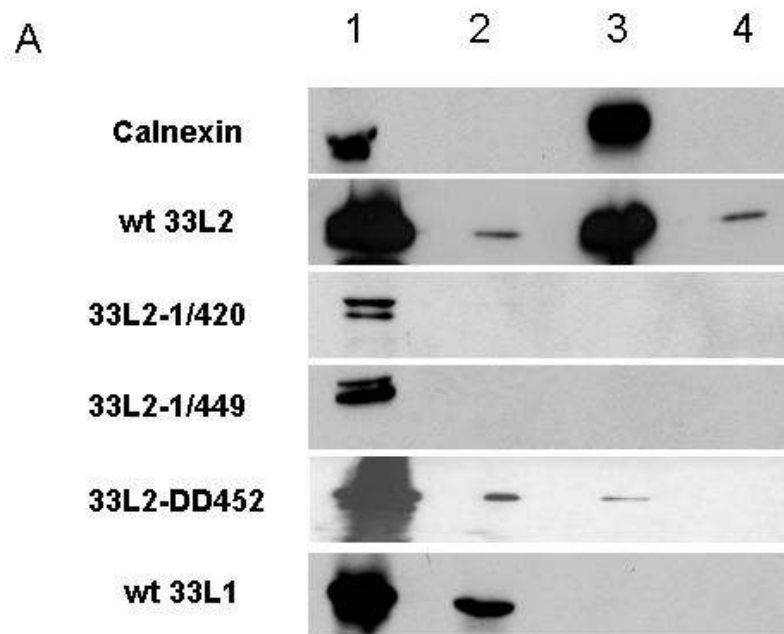


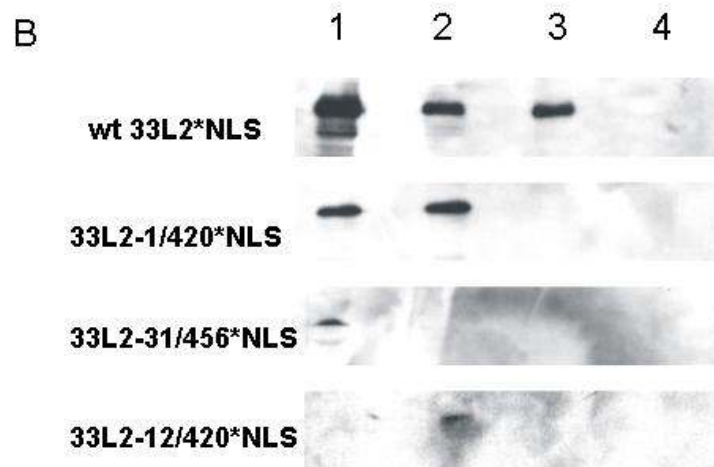
**Abb. 3.11: Carbonat-Behandlung isolierter Membranen nach Expression der GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen**

Es sind die Calnexin- sowie GFP-spezifischen „Western Blot“-Analysen der Carbonat-Behandlung isolierter Membranen 24 h nach Transfektion mit den GFP<sub>2</sub>-Peptid-Konstrukten dargestellt. **1:** Kernfraktion, **2:** Cytosol, **3:** integrale Membranproteine, **4:** assoziierte Membranproteine

### 3.2.2 Assoziation von L2-Proteinen an zellulären Membranen

Es wurde gezeigt, dass die carboxyterminalen 33L2-Peptide eine Assoziation von dimerem GFP an bzw. eine Insertion in zelluläre Membranen induzieren können. Dieses Ergebnis unterstreicht die Beobachtungen, die mit synthetischen Peptiden gemacht wurden. Um nun auszuschließen, dass es sich bei diesen Ergebnissen aufgrund der Verwendung von Peptiden um Artefakte handelt, wurde im Weiteren die Membranassoziation von wt 33L2 und verschiedenen L2-Mutanten analysiert. Dazu wurden zunächst für die 33L2-Proteine rekombinante Vacciniaviren hergestellt (2.2.5.3.1). HuTK<sup>-</sup>-Zellen wurden dann zur Proteinexpression mit den entsprechenden rekombinanten Vacciniaviren infiziert (2.2.5.3.3) und anschließend für eine Carbonat-Extraktion zellulärer Membranen präpariert (2.2.6.2). Die Abbildung 3.12 A zeigt eine 33L2- bzw. 33L1-spezifische „Western Blot“-Analyse der Carbonat-Behandlung von isolierten Membranen. Erneut diente Calnexin als Kontrolle und wurde mit einem Calnexin-spezifischen Antikörper nachgewiesen.





**Abb 3.12: Carbonat-Behandlung isolierter Membranen nach Expression der 33L2-Proteine**

Es sind die Calnexin- sowie 33L2- bzw. 33L1-spezifischen „Western Blot“-Analysen der Carbonat-Behandlung isolierter Membranen nach Expression der 33L2-Proteine dargestellt. **A:** Carbonat-Behandlung der Membranen 16 h nach Infektion von HuTK<sup>-</sup>-Zellen mit den entsprechenden Vacciniaviren für wt 33L1 als weitere Kontrolle und wt 33L2 sowie die Deletions- und Punktmutanten, **B:** Carbonat-Behandlung der Membranen 24 h nach Transfektion von HuTK<sup>-</sup>-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten für die 33L2\*NLS-Proteine, 1: Kernfraktion, 2: Cytosol, 3: integrale Membranproteine, 4: assoziierte Membranproteine

Wt 33L2 konnte als integrales Membranprotein detektiert werden (Abb. 3.12 A, Spur 3). Im Gegensatz dazu wurden die C-terminalen Deletionsmutanten 33L2-1/420 und 33L2-1/449 ausschließlich in der Kernfraktion gefunden (Abb. 3.12 A, Spur 1). Entsprechend den Peptid-Mutanten wurde ein rekombinantes Vacciniavirus für die 33L2-Punktmutante mit Aminosäuresubstitutionen an Position 452 und 453 (33L2-DD452) konstruiert. 33L2-DD452 konnte zwar als integrales Membranprotein detektiert werden, die Proteinmenge jedoch war im Verhältnis zu wt 33L2 stark reduziert (vgl. Abb. 3.12 A, Spur 3). Wt 33L1 konnte als zusätzliche Kontrolle nicht in Membranfraktionen gefunden werden.

Da es sich bei allen dargestellten 33L2-Proteinen um solche handelt, die direkt nach der Translation aufgrund ihres Kernlokalisierungssignals in den Zellkern transportiert werden, sollten als weitere Kontrollen für die Membranassoziation Konstrukte für 33L2-Proteine hergestellt werden, die einen eingeschränkten Kerntransport zeigen. Das Ziel war es, den Proteinen durch den Verbleib im Cytoplasma mehr Kontakt zu zellulären Membranen zu ermöglichen. Das Kernlokalisierungssignal wurde in früheren Untersuchungen auf die Bereiche zwischen den Aminosäuren 295-310 und 450-455 kartiert (Becker *et al.*, 2003). Um den Kerntransport zu unterbinden, wurden die basischen Aminosäuren von 33L2 an Position 295, 296, 300 und 303 folgender Konstrukte im pTM1-Vektor gegen Alanin ausgetauscht: pTM-wt33L2, pTM-33L2-1/420, pTM-33L2-12/420 und pTM-33L2-31/456. Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese durch Überhangverlängerung (2.2.2.11) wurden die Konstrukte pTM-wt33L2\*NLS, pTM-33L2-1/420\*NLS, pTM-33L2-12/420\*NLS und pTM-33L2-31/456\*NLS hergestellt. Die Konstrukte wurden über Lipofektion (2.2.5.2) in HuTK<sup>-</sup>-Zellen eingebracht und exprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für die bereits beschriebene Carbonat-Behandlung präpariert.

Die Abbildung 3.12 B zeigt eine 33L2-spezifische „Western Blot“-Analyse dieser Carbonat-Behandlung von isolierten Membranen. 33L2-12/420\*NLS wurde nicht mehr in der Kernfraktion gefunden (Abb. 3.12 B, Spur 1), im Gegensatz zu wt 33L2\*NLS, 33L2-1/420\*NLS und 33L2-31/456\*NLS. Dieses wurde auch durch Immunfluoreszenzaufnahmen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Durch die Mutagenese des 33L2 Kernlokalisierungssignals zwischen den Aminosäuren 295-310 konnte somit nur der Kerntransport der aminoterminalen und carboxyterminalen Deletionsmutante 33L2-12/420\*NLS unterbunden werden. Diese Mutante wurde nach der Carbonat-Behandlung isolierter Membranen ausschließlich in der Cytosol-Fraktion detektiert (Abb 3.12 B, Spur 2), es lag also keine Membranassoziation vor. Auch die beiden anderen Deletionsmutanten 33L2-1/420\*NLS und 33L2-31/456\*NLS konnten im Gegensatz zu wt 33L2\*NLS nicht mit Membranen gereinigt werden (Abb. 3.12 B), was aber den in Abbildung 3.12 A gezeigten Ergebnissen entspricht.

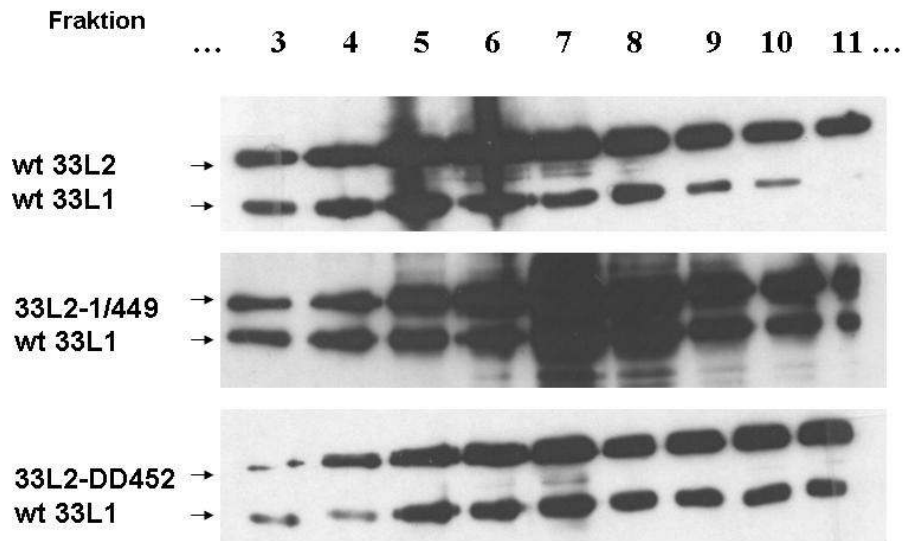
### 3.3 Einfluss der L2-vermittelten Membranaktivität auf die Pseudoinfektion

Die Untersuchungen mit den 33L2-Peptiden und den GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen haben deutlich gemacht, dass der Carboxyterminus von 33L2 eine membrandestabilisierende Aktivität aufweist. Diese Ergebnisse sind durch die Membranassoziation von wt 33L2 bestätigt worden. Es sollte nun die Bedeutung dieser membrandestabilisierenden Aktivität für die Infektion von Zellen mit Pseudovirionen analysiert werden. Dazu wurde u.a. das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte System genutzt, um Pseudovirionen herzustellen, die entweder aus wt L1 allein, aus wt L1 und wt L2, oder aus wt L1 und mutantem L2 aufgebaut sind. Die Infektiosität dieser Pseudovirionen ist, ganz im Gegensatz zur Verpackung von DNA, stark abhängig von der Anwesenheit des L2-Proteins (Unckell *et al.*, 1997).

#### 3.3.1 Herstellung von Pseudovirionen mit mutanten 33L2-Proteinen

Zur *in vivo* Herstellung von Pseudovirionen (2.2.5.4.1 oder alternativ 2.2.5.4.2) wurden zunächst Zellen mit einem „Markerplasmid“ transfiziert und anschließend mit den für die Kapsidproteine von HPV33 rekombinanten Vacciniaviren infiziert. Nach Zusammenlagerung der Kapside und Verpackung der Plasmid-DNA wurden die Pseudovirionen aus den Zellen präpariert und über einen kontinuierlichen CsCl- oder alternativ über einen OptiPrep-Gradienten gereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden dann hinsichtlich der Expression der Kapsidproteine im „Western Blot“ analysiert.

Die Abbildung 3.13 zeigt die Analyse der Fraktionen eines CsCl-Gradienten von Pseudovirionen-Präparationen bestehend aus wt 33L1 und wt 33L2, aus wt 33L1 und 33L2-1/449 oder aus wt 33L1 und 33L2-DD452. In allen drei Präparationen wurde sowohl das 33L1-Protein (Abb. 3.13, jeweils untere Reihe der Proteinbanden), als auch das 33L2-Protein bzw. die jeweilige L2-Mutante detektiert (Abb. 3.13, jeweils obere Reihe der Proteinbanden). Die Pseudovirionen sammelten sich überwiegend in den mittleren Fraktionen, welche einen Dichtebereich zwischen 1,3630 und 1,3665 aufweisen.

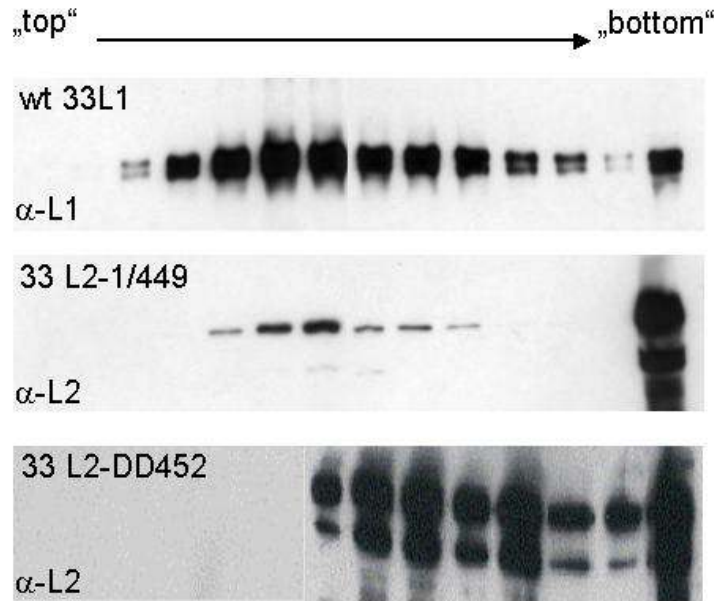


**Abb. 3.13: CsCl-Gradienten verschiedener Pseudovirionen-Präparationen**

Es ist die 33L1- und 33L2-spezifische „Western Blot“-Analyse von CsCl-Gradienten folgender Pseudovirionen-Präparationen dargestellt: wt L1/wt L2, wt L1/L2-1/449 und wt L1/L2-DD452. Die Fraktionen 3-11 stehen stellvertretend für insgesamt 12 Fraktionen aus einem CsCl-Gradienten, über welchen die Pseudovirionen gereinigt wurden. Es wurden 5-10 µl der Fraktionen für die Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel eingesetzt.

### 3.3.2 Einbau des mutanten 33L2 und DNA-Verpackung in die Pseudovirionen

Um zu klären, ob die Virusmorphogenese durch das Einführen von Mutationen in das 33L2-Protein eventuell beeinträchtigt wurde, musste der Einbau des mutanten 33L2 sowie die Verpackung des „Markerplasmids“ analysiert werden. Der Einbau des mutanten L2 in die Pseudovirionen wurde über eine Kosedimentation mit L1 in einem linearen Saccharose-Gradienten bestimmt (2.2.5.4.3). Der L2-Einbau wurde weder durch die carboxyterminale Deletion (33L2-1/449), noch durch die Punktmutagenese (33L2-DD452) behindert (Abb. 3.14). Die L2-Mutanten 33L2-1/449 und 33L2-DD452 wurden in gleichen Fraktionen detektiert, in denen auch das wt 33L1-Protein gefunden wurde.



**Abb. 3.14: Analytische Saccharose-Gradienten verschiedener Pseudovirionen-Präparationen**

Es sind der 33L1- und die 33L2-spezifischen „Western Blots“ einer Kosedimentations-Analyse folgender Pseudovirionen-Präparationen dargestellt: wt L1/L2-1/449 und wt L1/L2-DD452. Die Proteine der einzelnen Gradient-Fractionen wurden gefällt und vollständig für die Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel eingesetzt.

Die im Weiteren beschriebene Infektiösität von Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp (s. 3.3.3) wurde je Experiment auf die Menge der verpackten Plasmid-DNA normiert. Auf diese Weise konnten eventuelle Abweichungen bei der DNA-Verpackung von Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen relativiert werden. Grundsätzlich sollte jedoch zunächst untersucht werden, ob im Hinblick auf diese mutanten Pseudovirionen generell eine Verpackung des „Markerplasmids“ gewährleistet ist. Dazu wurde die DNA aus 100 µl der jeweiligen Pseudovirionen-Präparation isoliert (2.2.2.3) und zur Transformation von *E.coli*-Zellen eingesetzt. Anschließend wurde durch das Auszählen der gewachsenen Klone die relative Menge der verpackten DNA bestimmt. Die Tabelle 3.2 stellt beispielhaft die Ergebnisse einer Analyse der DNA-Verpackung dar, welche von Experiment zu Experiment leicht variieren konnten.

**Tab. 3.2** Anzahl der Bakterienklone nach Transformation mit „verpackter“ DNA

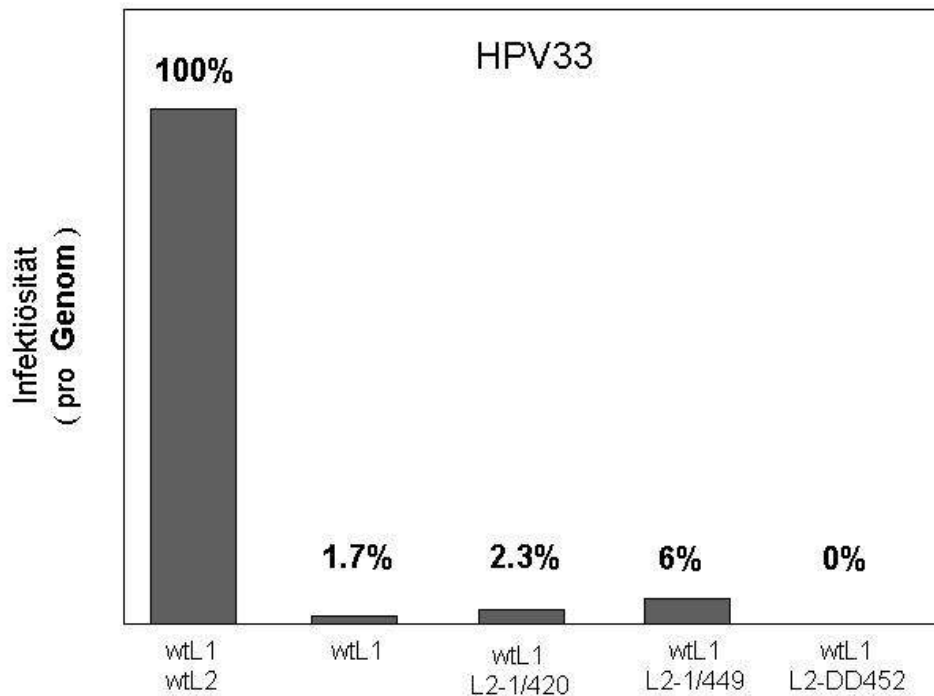
<b>Pseudovirionen-Präparation (100 µl)</b>	<b>Anzahl der <i>E.coli</i>-Klone (ein Beispiel)</b>
wt 33L1/wt 33L2	35
wt 33L1/33L2-1/449	50
wt 33L1/33L2-DD452	32

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten L2-Mutanten, die carboxyterminale Deletionsmutante 33L2-1/449 wie auch die Punktmutante 33L2-DD452, ermöglichten beide eine Verpackung des „Markerplasmids“. Es konnten in diesem Beispiel 50 bzw. 32 Bakterienklone im Vergleich zu 35 Klonen für die Wildtyp-Präparation ermittelt werden. Diese Werte wurden später im jeweiligen Experiment zur Bestimmung der Infektiösität der Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen im Vergleich zum Wildtyp berücksichtigt. Das bedeutet, dass z. B. die für die wt 33L1/L2-1/449-Pseudovirionen ermittelte Infektiösität mit dem Faktor 35/50 multipliziert bzw. reduziert wurde, um die DNA-Verpackung der Wildtyp-Präparation anzupassen.

### 3.3.3 Infektiösität von Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen

Die folgenden Untersuchungen bzw. die daraus resultierenden Ergebnisse sind z.T. in Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe erzielt worden.

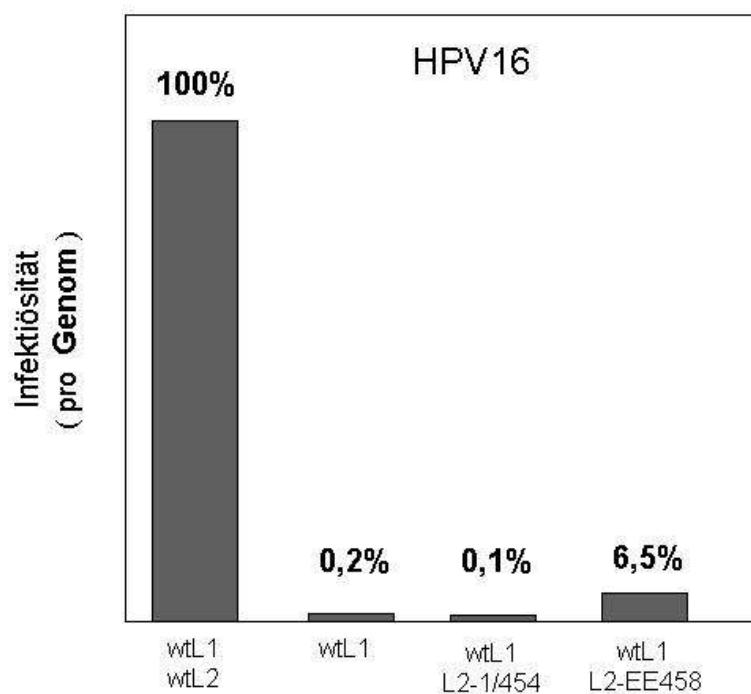
Um die Infektiösität von Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen zu untersuchen, wurde ein Infektions-„Assay“ durchgeführt (2.2.5.4.4). Dazu wurden 5-10 µl der jeweiligen Pseudovirionen-Fraktion auf Zellen gegeben und für 72 h inkubiert. Aufgrund des verpackten „Markerplasmids“ pEGFP<sub>2</sub>-NLS konnten anschließend infizierte Zellen wegen ihrer grünen Kernfluoreszenz ausgezählt werden und, wie bereits beschrieben (s. 3.3.2), die infektiösen Einheiten im Vergleich zum Wildtyp auf die relative Menge der verpackten DNA normiert werden. Die Virusmorphogenese aller im Folgenden untersuchten und dargestellten Pseudovirus-Mutanten war weder bezüglich der DNA-Verpackung noch des L2-Einbaus in die Pseudovirionen beeinträchtigt.



**Abb. 3.15: Infektiösität von HPV33 Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen**

Die Abbildung stellt die Infektiösität in % von HPV33 Pseudovirionen, welche aus den genannten Kapsidproteinen bestehen, im Vergleich zu Wildtyp-Pseudovirionen (wt L1/wt L2) dar. Die infizierten Zellen (COS7) wurden hinsichtlich der grünen Kernfluoreszenz quantifiziert und die Werte auf die relative Menge verpackter Plasmid-DNA normiert. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus Werten unabhängiger Experimente gemittelt.

Wenn man die Infektiösität von HPV33 Pseudovirionen, die aus wt 33L1 allein bestehen, mit der von Wildtyp-Pseudovirionen (wt 33L1/wt 33L2) vergleicht, wird sofort die Bedeutung des L2-Proteins für die Infektion von COS7-Zellen deutlich (Abb. 3.15). L1/L2-Pseudovirionen sind fast 50 x infektiöser als diejenigen, denen das L2-Protein fehlt. Die Deletion des C-terminalen Membran-aktiven Peptids im minoren Kapsidprotein, 33L2-1/420 und 33L2-1/449, führte zu einer starken Reduktion der Infektiösität. Auch die Substitution der Arginine an Position 452 und 453 zu Aspartat zeigte diesen Effekt (33L2-DD452). Diese Ergebnisse bestätigten, dass das carboxyterminale 33L2-Peptid essentiell für eine effiziente Infektion ist.



**Abb. 3.16: Infektiösität von HPV16 Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen**

Die Abbildung stellt die Infektiösität in % von HPV16 Pseudovirionen, welche aus den genannten Kapsidproteinen bestehen, im Vergleich zu Wildtyp-Pseudovirionen (wt L1/wt L2) dar. Die infizierten Zellen (293TT) wurden hinsichtlich der grünen Kernfluoreszenz quantifiziert und die Werte auf die relative Menge verpackter Plasmid-DNA normiert. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus Werten unabhängiger Experimente gemittelt.

Schließlich sollte geklärt werden, ob das membrandestabilisierende L2-Peptid auch für eine Infektion durch andere Papillomvirus-Typen von Bedeutung ist. Dazu wurden HPV16 Pseudovirionen generiert (nach Buck *et al.*, 2004), die neben dem Wildtyp entweder aus wt 16L1 allein, aus wt 16L1 und der C-terminalen Deletionsmutante 16L2-1/454, oder aus wt 16L1 und der C-terminalen Punktmutante 16L2-EE458 bestehen. Für den Infektions-„Assay“ mit diesen Pseudovirionen wurden 293TT-Zellen verwendet (s.a. 2.2.5.4.4).

Auch die Infektiösität von HPV16 Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen war weitgehend auf das Niveau von denjenigen reduziert, die aus wt 16L1 allein bestehen (Abb. 3.16). Das spricht dafür, dass die membrandestabilisierende Aktivität des L2-Proteins der Papillomviren bei den unterschiedlichen Virustypen konserviert ist.

## 4 Diskussion

Die Fortschritte in der *in vitro* Kultivierung und die Verwendung von VLP und Pseudovirionen, welche mit Hilfe heterologer Expressionssysteme hergestellt werden können, haben viele Informationen über den Lebenszyklus von Papillomviren erbracht. Es konnte inzwischen erstmals der gesamte Lebenszyklus von HPV31b *in vitro* nachgestellt werden, indem mittels aufwändiger Systeme undifferenzierte Keratinocyten auf Kollagenschichten aufgebracht wurden (Meyers *et al.*, 1992). Die Zellen differenzieren sich wie in der natürlichen Epithelschicht hier an der Grenze zwischen Luft und Flüssigkeit. Der Einsatz von VLP und DNA-enthaltenden Pseudovirionen hat zudem die Kenntnis bezüglich früher Stadien der Papillomvirusinfektion deutlich verbessert (Selinka und Sapp, 2003). Dennoch bleiben viele Fragen unbeantwortet. Weitgehend unklar ist u. a., auf welche Art und Weise die Virionen nach Aufnahme in die Wirtszellen durch Endocytose die Membranbarriere überwinden, um den Zellkern zu erreichen. Auch die Freisetzung der viralen Nukleinsäure aus dem Kapsid („uncoating“) und der intracytoplasmatische Transport ist ein noch unvollständig geklärter Prozess. Schließlich muss langfristig der Beweis erbracht werden, dass sich die Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten auf natürliche Prozesse einer Papillomvirusinfektion übertragen lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das minore Kapsidprotein L2 von HPV33 eine membrandestabilisierende Aktivität besitzt, welche essentiell für eine effiziente Infektion ist, und die bei Papillomviren konserviert ist. Diese Aktivität ist in Form einer Peptidsequenz von 23 Aminosäuren am Carboxyterminus von L2 lokalisiert.

### 4.1 Das carboxyterminale L2-Peptid von HPV33

Die Suche nach membrandestabilisierenden Aktivitäten der Kapsidproteine von Papillomviren führte zu der Erkenntnis, dass die zu dem synthetischen dhvar5-Peptid analogen Sequenzen des minoren L2 eine mikrobizide und fungizide Wirkung haben (s. a. 1.3 und Kapitel 3). Für die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurde zusätzlich zu dem dhvar5-Analog 33L2-445/458 das auf 23 Aminosäuren verlängerte Peptid 33L2-445/467 eingesetzt, da der „downstream“-Bereich eine große Hydrophobizität aufweist. Die potentielle Bedeutung dieses L2-Peptids für das Überwinden der Membranbarriere zur Etablierung einer produktiven viralen Infektion ist analysiert worden, indem in Säugerzellen die

membrandestabilisierende Aktivität von Peptiden, die Membranassoziation von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen und L2-Proteinen, und der Effekt von Mutationen innerhalb dieses Peptids auf die Infektiosität von Pseudovirionen untersucht wurde.

#### 4.1.1 Der Effekt von synthetischen Peptiden auf eukaryotische Zellen

Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden wurde zunächst der Effekt des carboxyterminalen L2-Peptids von HPV33 auf höhere, eukaryotische Zellen untersucht (s. 3.1). Eine Inkubation mit den synthetischen Peptiden 33L2-445/458, 33L2-445/467 und der Peptidmutante 33L2-DD447 führte zu sichtbaren, morphologischen Veränderungen von HeLa-Zellen (3.1.1). Im Gegensatz dazu hatten die Peptidmutanten 33L2-DD452 und 33L2-DD459 keinen Einfluss auf die Zellmorphologie. Die Färbung mit einem spezifischen Antiserum und sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpern verdeutlichte die Lokalisation von 33L2-445/467 an und in den HeLa-Zellen (vgl. Abb. 3.4). 33L2-445/467 wurde an der Cytoplasmamembran und intrazellulären Membranen detektiert. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass das Peptid zusammen mit dem Membranprotein Syndecan-1 im Zellkern lokalisiert war. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Inkubation mit dem carboxyterminalen L2-Peptid einen Einfluss auf die Integrität der Cytoplasmamembran ausübt. Bei der Kernlokalisation der Peptide und des Syndecan-1 ist aber eventuell auch eine Artefaktbildung nicht auszuschließen. Richard *et al.* (2003) haben im Zusammenhang mit den sehr kationischen „cell-penetrating peptides (CPP)“ beschrieben, dass die Fixierung der mikroskopisch zu untersuchenden Zellen zu einer fälschlichen Aufnahme und Verteilung dieser Peptide im Zellkern führte. Jene assoziieren dort stark mit der negativ geladenen, genomischen DNA. Dieser Effekt wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation jedoch nicht untersucht. Eine derartige Analyse stünde somit noch aus.

Eine destabilisierende Wirkung des carboxyterminalen L2-Peptids auf Zellmembranen konnte dann allerdings im Folgenden mittels verschiedener Cytotoxizitäts-„Assays“ nachgewiesen werden, in denen die Fixierung von Zellen keine Rolle spielte. Diesbezüglich ist die Messung des intrazellulären ATP-Gehalts nach Inkubation von Zellen mit einer potentiell toxischen Substanz eine etablierte Methode (Bhakdi *et al.*, 1990; Stassen *et al.*, 2003). Sie führte zu dem Ergebnis, dass das Peptid 33L2-445/467, wie auch dhvar5, einen cytotoxischen Effekt auf Säugerzellen hat, welcher durch die Erniedrigung des pH-Wertes von 7,2 auf 6,0 verstärkt werden konnte (3.1.2). Überraschenderweise zeigte das kürzere dhvar5-Analog 33L2-445/458

keinen Einfluss auf die verwendeten HeLa-Zellen. Die Analyse von mutanten Peptiden bestätigte die Vermutung, dass der N-terminale, hydrophobe Bereich des 33L2-Peptids zusammen mit den basischen Aminosäuren nicht ausreicht, um die Membranen der HeLa-Zellen zu destabilisieren (vgl. Abb. 3.2). Vielmehr werden sowohl die basischen Aminosäuren, als auch die C-terminalen, hydrophoben Aminosäuren benötigt. Ein Aminosäureaustausch in der N-terminalen, hydrophoben Region gegen Aspartat verstärkte die Aktivität von 33L2-445/467, während nur ein Austausch in dem basischen oder carboxyterminalen, hydrophoben Bereich zur völligen Aufhebung des cytotoxischen Effekts führte (33L2-DD452 und 33L2-DD459, s. Abb. 3.6). Gleiches ergab auch die FACS-Analyse von HeLa-Zellen, die zuvor mit den 33L2-Peptiden inkubiert wurden, sowie der „Toxilight-Assay“ (3.1.3). Mit beiden Methoden kann man direkt den Einfluss der Peptide auf die Cytoplasmamembran untersuchen. Die Inkubation von 33L2-445/467 resultierte in einer stark erhöhten Permeabilität der Membran für die hydrophile Substanz Propidiumjodid bzw. im Austreten der Adenylat-Kinase aus den Zellen. Auch hier führten die Peptidmutanten 33L2-DD452 und 33L2-DD459 zu einer Reduktion der beschriebenen Wirkung.

Die charakteristische Struktur des carboxyterminalen L2-Peptids mit einem Bereich basischer Aminosäuren gefolgt von einem Bereich hydrophober Aminosäuren unterscheidet sich von der vieler anderer membrandestabilisierender Peptide. Diese werden meist als amphipatisch mit alternierenden hydrophoben und basischen Aminosäuren beschrieben und führen nicht selten zur Bildung einer Membranpore, wie es beispielsweise von Henzler Wildman *et al.* (2003) für das mikrobizide LL-37-Peptid postuliert wird. Zudem stellt man sich auch vor, dass die amphipatischen Peptide eine Destabilisierung von Zellmembranen hervorrufen, indem sie wie ein Detergenz wirken (Papo und Shai, 2003). Einen ähnlichen Mechanismus könnte auch das L2-Peptid ausüben, wobei es sich aber zu diesem Zeitpunkt um eine reine Hypothese handelt, die durch neuere Untersuchungen zu der Interaktion von dhvar5 mit Liposomen gestützt wird (Den Hertog *et al.*, 2004). Die positiven Ladungen des Bereiches der basischen Aminosäuren könnten eine Bindung an die negativ geladenen Phospholipide der Membranen vermitteln. In einem zweiten Schritt würde es dann zu einer Insertion des hydrophoben Bereiches in die Membranen kommen, was eine Zerstörung der Membran induzieren könnte.

Es fällt auch auf, dass die genannten Daten der Cytotoxizitäts-„Assays“ mit dem L2-Peptid aus vergleichsweise langen Inkubationszeiten resultieren. Diese verzögerte cytotoxische Wirkung könnte verschiedene Gründe haben. So ist beispielsweise die mikrobizide Spezifität von membrandestabilisierenden Peptiden mit hydrophoben und kationischen Bereichen darauf

zurückzuführen, dass Membranen von Mikroorganismen mehr negativ geladene Phospholipide aufweisen als Wirtszellmembranen. Letztere würden den untersuchten HeLa-Zellen ähneln. Weiter wird vermutet, dass das L2-Peptid keine Membranporen verursacht, durch welche die Zellen innerhalb von Minuten geschädigt werden. Den Hertog *et al.* (2004) zeigten für das analog aufgebaute dhvar5-Peptid, dass die Membrantranslokation wesentlich mehr Zeit in Anspruch nimmt, als das Permeabilisieren der Membran. Das spricht gegen eine Porenbildung, da diese mit der Membrantranslokation der Peptide gekoppelt ist (Matsuzaki, 1999). Zuletzt ist auch eine Beteiligung zusätzlicher, bisher unbekannter Faktoren in und um die Membran denkbar.

#### 4.1.2 Die Fähigkeit des L2-Peptids zur Membranassoziation

Durch die Untersuchungen von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen konnte im Anschluss die intrazelluläre Aktivität des carboxyterminalen L2-Peptids näher beschrieben werden (3.2.1). Um eine Diffusion der Fusionsproteine in den Zellkern zu vermeiden, wurde das Peptid mit einem GFP-Dimer gekoppelt. Es wurde gezeigt, dass beide L2-Peptid-Fusionen, GFP<sub>2</sub>-33L2-445/459 und GFP<sub>2</sub>-33L2-445/467, an zellulären Membranen akkumulieren und zum Absterben der Zellen führen. Die biochemischen Analysen der möglichen Membranassoziation verdeutlichten dann die Fähigkeit des L2-Peptids, eine Insertion des globulären GFP-Dimers in zelluläre Membranen zu induzieren. Die nach intrazellulärer Expression erhaltenen Daten verstärkten die Annahme, dass die carboxyterminalen L2-Peptide, hier auch das Kürzere, eine membrandestabilisierende Wirkung haben. Eine Artefaktbildung konnte durch die Analyse der Membranassoziationseigenschaften von wt 33L2 und verschiedenen L2-Mutanten ausgeschlossen werden (3.2.2). Wt 33L2 wurde im Gegensatz zu carboxyterminalen Deletionsmutanten als integrales Membranprotein gefunden. Für die Punktmutante 33L2-DD452 mit einem Aminosäureaustausch im basischen Bereich gegen Aspartat konnte eine Reduktion der Fähigkeit zur Membranintegration festgestellt werden, was mit den Ergebnissen auf Peptidebene übereinstimmt. Auch die Verwendung der Kerntransportmutante 33L2-12/420\*NLS als weitere Kontrolle untermauerte die Fähigkeit von wt 33L2, in zelluläre Membranen zu integrieren. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass dem N-Terminus des L2-Proteins von HPV33, zusätzlich zu den von Becker *et al.* (2003) beschriebenen Bereichen, eine wichtige Bedeutung für den Kerntransport zukommt. Dies wurde ebenfalls anhand der Kernlokalisation von GFP<sub>2</sub>-33L2-1/14 beobachtet (vgl. Abb. 3.8).

### 4.1.3 Die Bedeutung des L2-Peptids für die Pseudoinfektion

Die Bedeutung des carboxyterminalen L2-Peptids für den Infektionsprozess von HPV wurde durch die Analyse von Pseudovirionen beschrieben, die entweder aus wt L1 allein, aus wt L1 und wt L2, oder aus wt L1 und mutantern L2 aufgebaut sind (3.3). Wie bereits erwähnt ist die Infektiosität von HPV33 Pseudovirionen, ähnlich der von HPV16 Pseudovirionen, stark abhängig von der Anwesenheit des L2-Proteins (Buck *et al.*, 2004; Unckell *et al.*, 1997). Für alle untersuchten Pseudovirus-Mutanten konnte sowohl der Einbau des minoreren L2-Proteins, als auch eine Verpackung von DNA nachgewiesen werden (3.3.2). Die Virusmorphogenese scheint demnach nicht beeinträchtigt zu sein.

Die Deletion des carboxyterminalen L2-Peptids oder der Aminosäureaustausch in dessen basischer Region gegen Aspartat führte zu einer signifikanten Reduktion der Infektiosität von HPV33 Pseudovirionen (3.3.3). Gleiches konnte auch bei der Analyse von HPV16 Pseudovirionen festgestellt werden, was dafür spricht, dass die Funktion dieses Bereiches ein konserviertes Charakteristikum unter Papillomviren darstellt. Diesbezüglich wurde auch für bovine Papillomviren gezeigt, dass die Deletion der C-terminalen, basischen Region des L2-Proteins von BPV-1 eine effiziente Infektion unmöglich macht (Roden *et al.*, 2001). Auch in diesem Fall konnten sich die Pseudovirionen ungehindert zusammenlagern und DNA verpacken. Aus bislang ungeklärten Gründen waren sie jedoch nicht infektiös.

## 4.2 In L2 eingeführte Mutationen und ihre Bedeutung für die Morphogenese und Aufnahme der Viruspartikel

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Morphogenese der Viruspartikel durch die in L2 eingeführten Mutationen nicht behindert wird (3.3.2). Ein wichtiger Aspekt ist an dieser Stelle allerdings die von Florin *et al.* (2004) beschriebene Interaktion des Carboxyterminus von L2 mit dem zellulären Chaperon Hsc70. Hsc70 begleitet das L2-Protein während der Virusmorphogenese durch die transiente Assoziation an den C-Terminus zum Zellkern, wo L2 dann in die Virionen eingebaut wird. Es selbst wird jedoch, anders als bei VLPs, nicht in DNA-enhaltende Virionen eingebaut und kann somit die mögliche endosomolytische Aktivität von L2 während der Infektion nicht behindern. Eine Störung der Hsc70/L2-Interaktion im Fall einer carboxyterminalen Mutation von L2 könnte dennoch in einer Konformationsänderung des eingebauten Proteins resultieren. Dies würde eventuell zu

falsch gefalteten und in ihrer Funktion beeinträchtigten Viruspartikeln führen. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe um M. Sapp die Interaktion von Hsc70 und der Punktmutante 33L2-DD452 näher untersucht; anhand von Kosedimentationsanalysen mit VLP. Es stellte sich heraus, dass es keinen Unterschied zu der Interaktion mit wt 33L2 gibt. Der beobachtete Effekt der stark reduzierten Infektiosität von wt 33L1/33L2-DD452-Pseudovirionen, wie auch von denjenigen mit L2-Deletionsmutanten, ist somit nicht auf eine fehlerhafte Morphogenese zurückzuführen.

In Zusammenarbeit mit H.-C. Selinka konnte weiter herausgefunden werden, dass die beschriebenen Effekte der in L2 eingeführten Mutationen auf die Infektiosität nicht im Zusammenhang mit initialen Schritten wie der Partikeladsorption- und -aufnahme in die Zielzellen stehen. Es wurden keine Unterschiede bei der Internalisierung von HPV33 Pseudovirionen beobachtet, die aus wt L1 allein, aus wt L1 und wt L2, oder aus wt L1 und mutantem L2 bestehen, was durch frühere Untersuchungen unterstrichen werden kann (Selinka *et al.*, 2003). Auch Müller *et al.* (1995) und Roden *et al.* (1994) postulierten bereits für andere HPV-Typen, dass dem L2-Protein keine entscheidende Rolle bei den ersten Schritten einer Papillomvirusinfektion zukommt.

### **4.3 Die Rolle des minoren L2-Proteins bei der Endosomolyse**

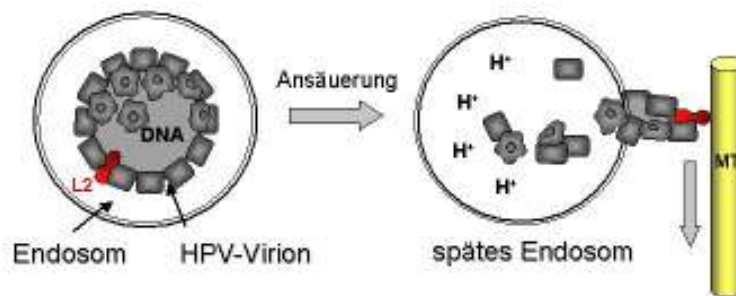
Es wurden in dieser Arbeit verschiedene Hinweise erbracht, dass das L2-Protein von HPV eine bedeutende Rolle während der Infektion ausübt. Ein carboxyterminales Peptid mit 23 Aminosäuren konnte als essentiell für eine effiziente Pseudoinfektion beschrieben werden. Dieses Peptid ist nach externer Zugabe cytotoxisch für Mikroorganismen und Säugerzellen, indem es Membranen depolarisiert und permeabilisiert. Es induziert zudem die Integration von dimerem GFP und wt 33L2 in Membranen, wenn es intrazellulär exprimiert wird. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um J. T. Schiller in den USA wurde nun genauer untersucht, ob die Anwesenheit des L2-Proteins von Papillomviren für den „uncoating“-Prozess des Viruspartikels und den darauf folgenden Transport des viralen Genoms in den Zellkern notwendig ist. Day *et al.* (2004) beschrieben die Kollokalisierung von L2 und der viralen DNA in den Kerndomänen ND10, analysierten jedoch in diesem Zusammenhang nicht die Lokalisation der DNA in Abwesenheit von L2. Zu diesem Zweck wurden nun HPV16 Pseudovirionen mit BrdU-markierten Genomen generiert, deren DNA nur dann detektiert werden kann, wenn die Partikel bereits teilweise dissoziiert sind (Buck *et al.*, 2004; Day *et al.*,

2004). Nach Zugabe von L1-Pseudovirionen konnten in den Zellen BrdU-markierte Genome detektiert werden. Das weist darauf hin, dass das minore L2 für den initialen „uncoating“-Prozess entbehrlich ist. Die unterschiedliche zelluläre Verteilung von markierten Genomen aus Pseudovirionen, die nur aus L1 oder aus L1 und L2 bestehen, war jedoch auffällig. Das markierte Genom von L1-Pseudovirionen scheint in den zellulären Vesikeln zurückgehalten, während jenes aus L1/L2-Pseudovirionen vorwiegend im Zellkern zu finden ist. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das L2-Protein den Austritt des viralen Genoms aus den Endosomen vermittelt. Wenn man nun die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Peptidsequenz von L2 und die stark reduzierte Infektiosität von Pseudovirionen mit Mutationen innerhalb dieser Sequenz bedenkt, könnte man schlussfolgern, dass dieser Defekt mit einer mangelhaften Endosomolyse zu erklären ist. Aus diesem Grund wurde in der Gruppe um J. T. Schiller weiter die zelluläre Lokalisation von BPV- und HPV16-Pseudovirionen mit C-terminalen L2-Deletions- und Punktmutanten untersucht. Diese Analysen führten zu dem Ergebnis, dass Pseudovirionen mit Mutationen im C-Terminus des L2-Proteins nicht aus den Endosomen austreten. Doppelfärbungen mit anti-Lamp-2 zeigten die Lokalisation des deletierten L2 in späten Endosomen oder Lysosomen, was aber auch bedeuten kann, dass Pseudovirionen mit mutiertem L2 in diesem Kompartiment akkumulieren, nachdem sie bei der Endosomolyse scheiterten.

Es ist bislang wenig über die Art und Weise bekannt, wie nicht-umhüllte Viren die zelluläre Membranbarriere durchqueren, um eine produktive Infektion zu etablieren. Polioviren sind in diesem Zusammenhang ausführlich erforscht (Belnap *et al.*, 2000; Tosteson und Chow, 1997; Tosteson *et al.*, 2004). Die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor PVR/CD155 induziert eine bestimmte, temperatur-sensitive Konformationsänderung der Kapsidproteine VP1 und VP4. Hydrophobe Aminosäuren werden dadurch frei zugänglich und inserieren in die Wirtszellmembran. Es kommt zur Bildung einer Pore, durch welche Ionen und auch die virale RNA ins Cytoplasma gelangen. Die Pore könnte bereits an der Cytoplasmamembran, oder aber erst später an der Endosomenmembran entstehen. Diese Frage gilt es noch zu beantworten. Eine durch nicht-umhüllte Viren verursachte Porenbildung in der Endosomenmembran ist auch für Reoviren beschrieben worden (Chandran *et al.*, 2002; Tosteson *et al.*, 1993). In diesem Fall werden durch proteolytische Dissoziation in den Endosomen sogenannte ISVPs („infectious subvirion particles“) gebildet. Diese aktivierten Partikel induzieren dann die Bildung von Poren, durch welche infektiöses Material ins Cytoplasma gelangt.

Adenoviren hingegen sind dafür bekannt, dass sie in der Zielzelle die Lyse der Endosomen verursachen. Das Kapsidprotein „penton base“ und die Virus-codierte Cysteinprotease scheinen dabei von großer Bedeutung zu sein (Greber *et al.*, 1996; Seth *et al.*, 1984; Seth *et al.*, 1985). Neuere Untersuchungen legen allerdings nahe, dass das Protein VI an einer Porenbildung bedingt durch ein amphipatisches Peptid beteiligt ist (Wiethoff *et al.*, 2005). Außerdem wird für den Austritt der Adenoviren aus den Endosomen der zelluläre Rezeptor  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin benötigt (Wang *et al.*, 2000; Wickham *et al.*, 1994). Weitgehend unbekannt ist jedoch der genaue Mechanismus der Endosomolyse.

Erstmalig wurde somit in der vorliegenden Arbeit eine membranstabilisierende Sequenz innerhalb eines Kapsidproteins von Papillomviren, kleinen DNA-Tumolviren, beschrieben, welche für den Austritt aus den Endosomen essentiell zu sein scheint. Die Abbildung 4.1 zeigt schematisch unsere Vorstellung der Vorgänge innerhalb des Endosoms. Da die Ansäuerung der Endosomen ein entscheidender Schritt während der Papillomvirusinfektion ist und das „uncoating“ ebenfalls in den Endosomen stattfindet (Day *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2004; Selinka *et al.*, 2002), könnte es an dieser Stelle zu einer Dissoziation des Kapsids und somit zur Freilegung des L2-Carboxyterminus kommen. Dieser weist im vollständigen Kapsid wahrscheinlich nach innen (Day *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1997). Der Carboxyterminus des minoren L2-Proteins könnte dann mit der Membran interagieren und die Freisetzung der viralen Nukleinsäure induzieren. Diese wird vermutlich zusammen mit L2 entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert.



**Abb. 4.1: Ein hypothetisches Arbeitsmodell**

Es ist die potentielle Rolle des minoren L2-Proteins für das Überwinden der Endosomenmembran während der Infektion dargestellt. Nähere Erläuterungen sind im Text zu lesen.

#### 4.4 Perspektiven für zukünftige Studien

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass das carboxyterminale L2-Peptid von HPV33 eine membrandestabilisierende Aktivität aufweist, die für das Etablieren einer produktiven Infektion unentbehrlich ist. Diese Aktivität scheint unter Papillomviren konserviert zu sein. Es sollte nun langfristig ein direkter Beweis erbracht werden, dass eben diese Aminosäuresequenz die erforderliche Lyse der Endosomen induzieren kann. Man könnte diese Sequenz beispielsweise an ein Protein koppeln, von dem man weiß, dass es nach endocytotischer Aufnahme in den Endosomen wiederverwertet und aus der Zelle ausgeschleust wird, ohne ins Cytoplasma zu gelangen. Würde sich das Fusionsprotein im Cytoplasma nachweisen lassen, hätte man die durch das Peptid verursachte Endosomolyse demonstriert. Ein Kandidat hierfür wäre z.B. Transferrin.

Weiter sollte dann der Mechanismus der durch Papillomviren induzierten Endosomolyse genauer erforscht werden. Mit Hilfe von Liposomen oder künstlichen Membranen könnte eventuell geklärt werden, ob es sich wirklich um die Lyse der Endosomen oder doch eher um eine Porenbildung handelt. Ein wichtiger Aspekt ist auch die Untersuchung zusätzlicher Faktoren, die an dem Infektionsprozess bzw. dem Überwinden der Membranbarriere beteiligt sein könnten. Hierbei könnte es sich vielleicht sogar um weitere Sequenzen innerhalb des L2-Proteins handeln. Roden *et al.* (2001) haben für bovine Papillomviren auch eine N-terminale L2-Mutante beschrieben, die nicht mehr infektiös ist. Im Fall von HPV33 zeigte sich ein aminoterminaleres L2-Peptid (33L2-1/14) nicht membrandestabilisierend, ein Pseudovirion dieser Art wurde jedoch nicht generiert. Diese Analyse stünde somit noch aus.

## 5 Zusammenfassung

Nicht-umhüllte humane Papillomviren binden an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der Zelloberfläche und werden durch Endocytose in Zielzellen aufgenommen. Um eine effiziente Infektion zu etablieren, muss die virale DNA in den Zellkern transportiert werden. Auf welche Art und Weise hierbei die Endosomenmembran überwunden wird, war bislang völlig unklar. Die Suche nach potentiellen membrandestabilisierenden Eigenschaften der Kapsidproteine L1 und L2 von HPV führte im Vorfeld der vorliegenden Dissertation zur Identifizierung eines carboxyterminalen Peptids des minorens L2-Proteins, welches als sehr mikrobizid und fungizid beschrieben werden konnte. Es ist gekennzeichnet durch einen Bereich basischer und einen Bereich hydrophober Aminosäuren. Da das minore L2-Protein für den Infektionsprozess von Papillomviren essentiell ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle des C-terminalen Peptids für den Transport des infektiösen Materials durch die zelluläre Membranbarriere genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das carboxyterminale L2-Peptid von HPV33 nach externer Zugabe eine cytotoxische Wirkung auf höhere eukaryotische Zellen hat. Es lokalisiert an zellulären Membranen und induziert eine pH-abhängige Reduktion des ATP-Gehalts von Säugerzellen. Weiter wurde nachgewiesen, dass das Peptid die Cytoplasmamembran permeabilisieren und für kleine, hydrophile Substanzen wie Propidiumjodid durchlässig machen kann. Mutationen innerhalb des Peptids verdeutlichten die Notwendigkeit beider Bereiche, basischer und hydrophober Aminosäuren, für den membrandestabilisierenden Effekt. Im Folgenden wurde die intrazelluläre Aktivität des L2-Peptids mit Hilfe von GFP<sub>2</sub>-Peptid-Fusionen analysiert. Das Peptid ist in der Lage, eine Integration des globulären GFP-Dimers in Membranen zu vermitteln, was bei einem hohen Prozentsatz der exprimierenden Zellen zum Absterben führt. Auch wt 33L2 weist im Gegensatz zu C-terminalen Deletions- und Punktmutanten die Fähigkeit zur Membranassoziation auf. Abschließend wurde der Effekt von Mutationen innerhalb dieses L2-Peptids auf die Infektiosität von L1/L2-Pseudovirionen beschrieben. Die Mutationen haben keinen Einfluss auf den Einbau des L2-Proteins in die Pseudovirionen und auf die DNA-Verpackung. Die Virusmorphogenese ist somit nicht negativ beeinträchtigt. Die Infektiosität der HPV33- wie auch von HPV16-Pseudovirionen mit C-terminal mutiertem L2-Protein ist jedoch auf das Niveau von solchen reduziert, die nur aus dem majoren L1 bestehen und geht gegen Null. Zusammenfassend kann man festhalten, dass das minore Kapsidprotein L2 von HPV am Carboxyterminus eine membrandestabilisierende Aktivität besitzt, welche unter Papillomviren konserviert und für eine effektive Infektion essentiell ist.

**6 Literaturverzeichnis**

**Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C. und Sapp, M. (2003).** Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology* **314**: 161-167.

**Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., Curry, S., Hiremath, C. N., Tsang, S. K., Steven, A. C. und Hogle, J. M. (2000).** Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J. Virol.* **74**: 1342-1354.

**Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R. und Doms, R. W. (1996).** A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* **70**:6288-6295

**Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. und Schmidt, G. (1990).** Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest.* **85**:1746-1753.

**Birnboim, H. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* **7**: 1513-1518.

**Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. (2004).** Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.* **78**: 751-757.

**Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y. Y. S., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. (2005).** Maturation of papillomavirus capsids. *J. Virol.* **79**: 2839-2846.

**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**: 3074-3083.

**Chandran, K., Farsetta, D. L. und Nibert. M. L. (2002).** Strategy for nonenveloped virus entry: a hydrophobic conformer of the reovirus membrane penetration protein micro 1 mediates membrane disruption. *J. Virol.* **76**: 9920-9933.

**Chow, L. T. und Broker, T. R. (1994).** Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* **37**: 150-158.

**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**: 217-227.

**Cole, C. N. (1996).** Polyomavirinae: The viruses and their replication. *Fundamental Virology* herausgegeben von Fields, B. N., Knipe, D. M. und Howley, P. M.; Lippincott Raven Publisher: 1997-2025.

**Cole, A. M., Liao, H-I., Ganz, T. und Yang, O. O. (2003).** Antibacterial activity of peptides derived from envelope glycoproteins of HIV-1. *FEBS Letters* **535**: 195-199.

**Conrad, M., Bubb, V. J. und Schlegel, R. (1993).** The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* **67**: 6170-6178.

**Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. (2004).** Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14252-14257.

**Day; P. M., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (2003).** Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**: 1-11.

**Day, P. M., 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**: 142-150.

**Delius, H. und Hofmann, B. (1994).** Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**: 13-31.

**Den Hertog, A. L., Wong Fong Sang, H. W., Kraayenhof, R., Bolscher, J. G., Van't Hof, W., Veerman, E. C. und Nieuw Amerongen, A. V. (2004).** Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. *Biochem. J.* **379**: 665-672.

**De Villiers, E. M. (1997).** Papillomavirus and HPV typing. *Clin. Dermatol.* **15**: 199-206.

**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**: 824-827.

**Doorbar, J. und Gallimore, P. H. (1987).** Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J. Virol.* **61**: 2793-2799.

**Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E. Y., Qi, Y. M., Hengst, K. und McMillan, M. A. (1997).** Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J. Virol.* **71**: 2449-2456.

**Fligge, C., Schäfer, F. Selinka, H. C., Sapp, C. und Sapp, M. (2001).** DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid. *J. Virol.* **75**: 7727-7731.

**Florin, L., Becker, K. A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Müller, M., Streeck, R. E. und Sapp, M. (2004).** Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J. Virol.* **78**: 5546-5553.

**Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E. und Sapp, M. (2002).** Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. Virol.* **76**: 10009-10014.

**Fuchs, P. G. und Pfister, H. (1994).** Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* **37**: 159-167.

**Gaynor, E. C., te Heesen, S., Graham, T. R., Aebi, M. und Emr, S. D. (1994)** . Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J Cell Biol.* **127**:653-665.

**Gibbs, J. S., Malide, D., Hornung, F., Bennink, J. R. und Yewdell, J. W. (2003)**. The Influenza A Virus PB1-F2 Protein Targets the Inner Mitochondrial Membrane via a Predicted Basic Amphipathic Helix That Disrupts Mitochondrial Function. *J. Virol.* **77**: 7214-7224.

**Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E. und Sapp, M. (2001)**. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* **75**: 1565-1570.

**Gissmann, L., Pfister, H. und zur Hausen, H. (1977)**. Human papillomaviruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* **76**: 569-580.

**Gluzman, Y. (1981)**. SV40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-182.

**Greber, U. F., Webster, P., Weber, J. und Helenius, A. (1996)**. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* **15**: 1766-1777.

**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**: 4503-4503.

**Hagensee, M. E., Yaegashi, N. und Galloway, D. A. (1993)**. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **67**: 315-322.

**Hanahan, D. (1983)**. Studies of transformation of *E.coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

**Henzler Wildman, K. A., Lee, D. K. und Ramamoorthy, A. (2003)**. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* **42**: 6545-6558.

**Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.

**Hofmann, K. J., Cook, J. C., Joyce, J. G., Brown, D. R., Schultz, L. D., George, H. A., Rosolowsky, M., Fife, K. H. und Jansen, K. U. (1995).** Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* **209**: 506-518.

**Howley, P. M. und Lowy, D. R. (2001).** Papillomaviruses and their replication. *Fundamental Virology* herausgegeben von Fields, B. N., Knipe, D. M. und Howley, P. M.; Lippincott Raven Publisher: 2197-2229.

**Jin, Y., Mozsolits, H., Hammer, J., Zmuda, E., Zhu, F., Zhang, Y., Aguilar, M. I. und Blazyk, J. (2003).** Influence of tryptophan on lipid binding of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry* **42**: 9395-9405.

**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**: 5810-5822.

**Kasamatsu, H. und Nakanishi, A. (1998).** How do animal DNA viruses get to the nucleus? *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 627-686.

**Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. und Kanda, T. (1998).** *In vitro* construction of pseudovirions of human papillomavirus type 16: incorporation of plasmid DNA into reassembled L1/L2 capsids. *J. Virol.* **72**: 10298-10300.

**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. USA* **89**: 12180-12184.

- Komly, C. A., Breitburd, F., Croissant, O. und Streeck, R. E. (1986).** The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens. *J. Virol.* **60**: 813-816.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, M., Beard, P., Estes, P. A., Lyon, M. K. und Garcea, R. L. (1998).** Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.* **72**: 2160-2167.
- 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**: 2988-2995.
- Liu, W. J., Gissmann, L., Sun, X. Y., Kanjanahaluethai, A., Muller, M., Doorbar, J. und Zhou, J. (1997).** Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology* **227**: 474-483.
- Mantovani, F. und Banks, L. (1999).** The interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin. Cancer. Biol.* **9**: 387-395.
- Matsuzaki, K. (1999).** Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**: 1-10.
- McMillan, N. A., Payne, E., Frazer, I. H. und Evander, M. (1999).** Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology* **261**: 271-279.
- 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**: 971-973.

**Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W. A. und Fuerst, T. R. (1990).** New mammalian expression vectors. *Nature* **348**: 91-92.

**Müller, M., Gissmann, L., Cristiano, R. C., 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**: 948-954.

**Papo, N. und Shai, Y. (2003).** New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry* **42**: 9346-9354.

**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. *PNAS USA* **91**: 8700-8704.

**Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. und Lebleu, B. (2003).** Cell-penetrating Peptides. *J. Biol. Chem.* **278**: 585-590.

**Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G. D., Kreider, J. W. und Gallimore, P. H. (1993).** Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* **197**: 176-187.

**Roden, R. B., Day, P. M., Bronzo, B. K., Yutzy IV, 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**: 10493-10497.

**Roden, R. B., Greenstone, H. L., Kirnbauer, R., Booy, F. P., Jessie, J., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. (1996).** *In vitro* generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* **70**: 5875-5883.

**Roden, R. B., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. (1994).** Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J. Virol.* **68**: 7260-7266.

**Ruissen, A. L. A., Groenink, J., Helmerhorst, E. J., Walgreen-Weterings, E., van't Hof, W., Veerman, E. C. I. und Nieuw Amerongen, A. V. (2001).** Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochem. J.* **356**: 361-368.

**Saiki, R. K., Scharf, S., Faloon, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. und Arnheim, N. (1985).** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. Auflage, Cold Spring Harbor, New York, USA.

**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**: 6186-6189.

**Sapp, M., Volpers, C., Müller, 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**: 2407-2412.

**Scherer, W. F., Syverton, J. T. und Gey, G. O. (1953).** Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **97**:695-710.

**Selinka, H. C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N. D. und Sapp, M. (2003).** Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J. Virol.* **77**: 12961-12967.

**Selinka, H. C., Giroglou, T. und Sapp, M. (2002).** Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**: 279-287.

**Selinka, H. C. und Sapp, M. (2003).** Papillomavirus/cell-interactions initiating the infectious entry pathway. *Papillomavirus Report* **14**: 259-265.

**Seo, Y. S., Muller, F., Lusky, M. und Hurwitz, J. (1993).** Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *PNAS USA* **90**: 702-706.

**Seth, P., Fitzgerald, D., Ginsberg, H. Willingham, M. und Pastan, I. (1984).** Evidence that the penton base of adenovirus is involved in potentiation of toxicity of *Pseudomonas* exotoxin conjugated to the epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 1528-1533.

**Seth, P., Pastan, I. und Willingham, M. C. (1985).** Adenovirus-dependent increase in cell membrane permeability. *J. Biol. Chem.* **260**: 9598-9602.

**Stassen, M., Muller, C., Richter, C., Neudorfl, C., Hultner, L., Bhakdi, S., Walev, I. und Schmitt, E. (2003).** The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependent pathways. *Infect Immun.* **71**:6171-6177.

**Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. und Beard, P. (1998).** Infectious human papillomavirus type 18 pseudovirions. *J. Mol. Biol.* **283**: 529-536.

**Stoler, M. H., Whitbeck, A., Wolinsky, S. M., Broker, T. R., Chow, L. T., Howett, M. K. und Kreider, J. W. (1990).** Infectious cycle of human papillomavirus type 11 in human foreskin xenografts in nude mice. *J. Virol.* **64**: 3310-3318.

**Streeck, R. E. (2002).** A Short Introduction to Papillomavirus Biology. *Intervirolgy* **45**: 287-289.

**Swindle, C. S., Zou, N., Van Tine, B. A., Shaw, G. M., Engler, J. A. und Chow, L. T. (1999).** Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J. Virol.* **73**: 1001-1009.

**Tosteson, M. T. und Chow; M. (1997).** Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J. Virol.* **71**: 507-511.

**Tosteson, M. T., Nibert, M. L. und Fields, B. N. (1993).** Ion channels induced in lipid bilayers by subviral particles of the nonenveloped mammalian reoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10549-10552.

**Tosteson, M. T., Wang, H., Naumov, A. und Chow, M. (2004).** Poliovirus binding to its receptor in lipid bilayers results in particle-specific, temperature-sensitive channels. *J. Gen. Virol.* **85**: 1581-1589.

**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. USA* **76**: 4350-4354.

**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**: 413-420.

**Unckell, F., Streeck, R. E. und Sapp, M. (1997).** Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J. Virol.* **71**: 2934-2939.

**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**: 504-512.

**Wang, K., Guan, T., Cheresch, D. A. und Nemerow, G. R. (2000).** Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5. *J. Virol.* **74**: 2731-2739.

**Wickham, T. J., Filardo, E. J., Cheresch, D. A. und Nemerov, G. R. (1994).** Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J. Cell. Biol.* **127**: 257-264.

**Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L., Nemerow, G. R. (2005).** Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* **79**: 1992-2000.

---

**zur Hausen, H. (1999).** Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin. Cancer. Biol.* **9**: 405-411.

**7 Verzeichnis der Abkürzungen**

aa	Aminosäure („amino acid“)
A	Ampere
A	Purinbase Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bid.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BPV	Rinder-Papillomvirus (BPV, „bovine papillomavirus“)
BrdU	5-Brom-2-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (BSA, „bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
C	Pyrimidinbase Cytosin
°C	Grad Celsius
c	zenti
CTP	Cytosintriphosphat
Cy-2	Carbocyanin 2
d	desoxy
Da	Dalton ( $1D = 1,66 \times 10^{-24}$ g)
DMEM	„Dulbecco`s modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNA, „desoxyribonucleic acid“)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
DTT	1,4-Dithiotreitol
E	früh („early“) exprimiertes Protein
ECL	verstärkte Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-N,N`-tetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
ELISA	enzymgekoppelter Immuntest

---

	(ELISA, „enzyme-linked immunosorbent assay“)
<i>et al.</i>	und andere („et alteri“)
FCS	Fötales Kälberserum (FCS, „fetal calf serum“)
fw	vorwärts (fw, „forward“)
g	Gramm
G	Purinbase Guanin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung („HEPES buffered saline“)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPV	humanes Papillomvirus
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
k	kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
L	spät („late“) exprimiertes Protein
LB	Luria Bertani
M	Molarität
m	Meter
μ	mikro (1 x 10 <sup>-6</sup> )
m-	milli (1 x 10 <sup>-3</sup> )
min	Minute
MOI	Infektionsmultiplizität (MOI, „multiplicity of infection“)
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
n	nano (1 x 10 <sup>-9</sup> )
NCR	nichtkodierende Region („non-coding region“)
ND10	„nuclear domain 10“
NLS	Kernlokalisierungssignal („nuclear localization signal“)
NP40	Nonidet-40
N-Terminus	Aminotermiales Ende von Proteinen
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte

---

ORF	offener Leserahmen (ORF, „open reading frame“)
p	piko ( $1 \times 10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, „phosphate-buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“)
PFU	Plauebildende Einheit (PFU, „plaque forming unit“)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
POX	Peroxidase
RLU	relative Lichteinheit (RLU, „relative light unit“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
rv	rückwärts (rv, „reverse“)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (SDS, „sodium dodecylsulfate“)
SV40	Affenvirus 40 (SV40, „simian virus 40“)
T	Pyrimidinbase Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	trisgepufferte Salzlösung (TBS, „tris-buffered saline“)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Einheit der Enzymaktivität (U, „unit“)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
vgl.	vergleiche
VLP	virus-ähnliche Partikel (VLP, „virus-like particle“)
VP	Virusprotein
[v/v]	Volumen/Volumen
w	Gewicht (w, „weight“)

---

wt	Wildtyp
[w/v]	Gewicht/Volumen
x g	Erdbeschleunigung = $9,80665 \text{ m x s}^{-1}$
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

---

Vor-und Zuname	Nadine Kämper geb. Dammeier
Anschrift	Rosenstr. 22 51766 Engelskirchen
Geburtsdatum	20.07.1977
Geburtsort	Soest
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet, ein Kind

### Schulausbildung

---

1984-1988	Grundschule in Lippetal-Oestinghausen
1988-1997	Gymnasium in Soest

### Studium

---

1997-2002	Diplom-Biologie an der Georg-August-Universität in Göttingen
1999-2000	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Virologie und Immunologie des Deutschen Primatenzentrums
Juli 2001	Diplomprüfung in den Fächern: Mikrobiologie, Immunologie und Biochemie
2001-2002	Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung Virologie und Immunologie des Deutschen Primatenzentrums mit dem Titel „Charakterisierung des N-terminal modifizierten Hauptstrukturproteins VP1 des humanen Polyomavirus JCV“
seit Juli 2002	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

Hiermit versichere ich, Nadine Kämper, gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003, dass ich die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel angegeben habe.

Mainz, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Nadine Kämper)