

**Charakterisierung redundanter  
Kerntransportsignale  
des minorenen Kapsidproteins L2  
humaner Papillomviren**

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich der Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

von  
Lydia Hilbig  
geb. am 30.07.1979 in Görlitz

Mainz, 2008

---

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2008



*Meiner Familie*

---

## Publikationen

Kämper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T. und Sapp, M. (2006). „A Membrane-destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 is Required for Egress of Papillomavirus Genomes from Endosomes”. J. Virol. 80: 759-68

Bienkowska-Haba, M., Hilbig, L., and Sapp, M.: The Minor Capsid Protein L2 of Human Papillomavirus Is Required for Establishment of Transcription from Incoming Viral Genome. Manuscript in preparation.

## Kongresse

Hilbig, L., Bienkowska-Haba, M., Florin, L., Streeck, R. E., Selinka, H. C., Sapp, M. (2006) „An extended Arginine-Rich Sequence Functions as Nuclear Localization Signal of the HPV Capsid Protein L2”. Cell Biology of Viral Infection: 5<sup>th</sup> Workshop, Deidesheim (Vortrag)

Hilbig, L., Bienkowska-Haba, M., Sapp, M. (2007) „An extended Arginine-Rich Sequence Functions as Nuclear Localization Signal of the HPV Capsid Protein L2”. Third European Congress of Virology, Nürnberg (Poster)

Hilbig, L., Spoden, G., Bienkowska-Haba, M., Sapp, M. (2007) „An extended Arginine-Rich Sequence Functions as Nuclear Localization Signal of the HPV Capsid Protein L2”. ELSO, Dresden (Poster)

Bienkowska-Haba, M., Hilbig, L., Sapp, M. (2008) „ The Minor Capsid Protein L2 of Human Papillomavirus is Required for Establishment of Transcription from Incoming Viral Genome“. 4<sup>th</sup> Annual Virology Colloquium, Center for Molecular and Tumor Virology LSUHSC, Dallas, USA (Talk)

Bienkowska-Haba, M., Hilbig, L., and Sapp, M. (2008): “The minor capsid protein L2 of human papillomavirus is required to establish transcription from incoming viral genomes”. FASEB Summer Research Conference “Virus Structure and Assembly”, Saxtons River, Vermont (Poster)

---

Bienkowska-Haba, M., Hilbig, L., and Sapp, M. (2008): "The minor capsid protein L2 of human papillomavirus is required to establish transcription from incoming viral genomes". *Small DNA Tumor Viruses*, Madison, Wisconsin, July 2008

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	HUMANE PAPILLOMVIREN (HPV) .....	1
1.2	DIE ORGANISATION VON HPV .....	2
1.2.1	Das virale Genom .....	2
1.2.2	Die Kapsidstruktur .....	3
1.3	DER HPV-LEBENSZYKLUS .....	4
1.3.1	Virusbindung, Virusaufnahme und Kernimport der Virus-DNA .....	5
1.3.2	Manifestierung des viralen Genoms.....	5
1.3.3	Proliferationsphase .....	6
1.3.4	Vegetative Genomamplifikation .....	7
1.3.5	Morphogenese und Freisetzung der Viren .....	8
1.4	NUKLEOZYTOPLASMATISCHE TRANSPORT VON MOLEKÜLEN .....	9
1.4.1	Struktur der Kernporenkomplexe .....	9
1.4.2	Mechanismen des bidirektionalen Transportes .....	10
1.4.3	Kernlokalisierungssignale .....	12
1.4.4	Transportrezeptoren .....	14
1.5	DER KERNIMPORT DES MINOREN HPV-KAPSIDPROTEINS L2 .....	15
1.6	ZIELSETZUNG.....	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1	MATERIAL .....	18
2.1.1	Geräte und Labormaterialien .....	18
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Fertigreagenzien und Kits .....	19
2.1.4	Enzyme .....	20
2.1.5	Protein- und DNA-Marker .....	20
2.1.6	Plasmidvektoren .....	20
2.1.7	Oligonukleotide.....	21
2.1.8	Bakterienstämme.....	24
2.1.9	Bakterienkulturmedien .....	24
2.1.10	Eukaryotische Zelllinien .....	25
2.1.11	Zellkulturmedien und -zusätze für eukaryotische Zelllinien .....	25
2.1.12	Primäre Antikörper und Antiseren .....	26
2.1.13	Sekundäre Antikörper .....	27
2.1.14	Häufig verwendete Puffer und Lösungen .....	27
2.2	METHODEN.....	29
2.2.1	DNA-Manipulationen.....	29
2.2.2	Expression von Proteinen in <i>E. Coli</i> .....	31
2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	33
2.2.4	Kultivierung von Säugerzellen.....	33

2.2.5	DNA-Transfektion von Säugerzellen .....	34
2.2.6	Präparation von HPV-Pseudovirionen.....	34
2.2.7	Infektionsassay.....	35
2.2.8	Nativer Heparin-BSA-ELISA .....	36
2.2.9	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	36
2.2.10	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	38
2.2.11	Import von Proteinen in permeabilisierten Zellen .....	39
2.2.12	Mikroskopische Dokumentation .....	41
2.2.13	GST-Bindungsassay.....	41
2.2.14	siRNA-Technologie.....	42
2.2.15	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
3.1	KERNLOKALISATIONSSIGNALE IN HPV16 L2.....	44
3.1.1	Einfluss der n- und cNLS auf die Lokalisation von HPV16 L2 .....	44
3.1.2	Einfluss des mNLS auf die Lokalisation eines zytoplasmatischen Reporterproteins .....	45
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER MNLS-AMINOSÄURESEQUENZ VON HPV L2.....	47
3.2.1	Phylogenetischer Vergleich der mNLS.....	47
3.2.2	Punktmutagenese der mNLS in HPV16 L2 .....	48
3.2.3	Bedeutung des mNLS für die Infektion mit HPV16-Pseudovirionen .....	57
3.2.4	Charakterisierung der zentralen Arginine in dem mNLS von HPV18 L2.....	59
3.3	EINFLUSS VON HSC70 AUF DIE MNLS-VERMITTELTE KERNTRANSLOKALISATION.....	63
3.4	INTERAKTION VON L2 MIT KARYOPHERINEN.....	65
3.4.1	Bedeutung spezifischer Karyopherine für die Infektion mit HPV16-PsV .....	65
3.4.2	Intrazelluläre Verteilung von GFP-16L2 280/330 in Karyopherin-depletierten HeLa-Zellen .....	67
3.4.3	Interaktion von Kernimportrezeptoren mit dem mNLS von HPV16 L2.....	69
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>71</b>
4.1	FUNKTIONELLE KERNLOKALISATIONSSSEQUENZ VON HPV16 L2 BEI DER MORPHOGENESE .....	71
4.2	FEINKARTIERUNG DES MNLS .....	73
4.3	INTERAKTION DES MNLS MIT HSC70 .....	77
4.4	ROLLE DES MITTLEREN KERNLOKALISATIONSSIGNALS BEI DER INFektion.....	78
4.5	BEDEUTUNG SPEZIFISCHER KERNTRANSPORTREZEPTOREN FÜR DIE INFektion .....	81
4.6	INTERAKTION DES MNLS MIT KERNTRANSPORTREZEPTOREN .....	82
4.7	DAS ARBEITSMODELL .....	84
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE.....</b>	<b>101</b>

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Kernlokalisierungssignale.....	13
Tab. 1.2: RanGTP bindende Transportrezeptoren der Importin $\beta$ -Familie.....	14
Tab. 2.1: Laborgeräte. ....	18
Tab. 2.2: Verwendete Fertigreagenzien und Kits. ....	19
Tab. 2.3: Verwendete DNA-Mutageneseprimer.....	21
Tab. 2.4: PCR-Primer .....	22
Tab. 2.5: Für DNA-Sequenzierungen verwendete Primer .....	23
Tab. 2.6: In der quantitativen <i>Real-Time</i> PCR verwendete Oligonukleotide .....	23
Tab. 2.7: siRNA-Oligonukleotide zur RNAi.....	23
Tab. 2.8: Zellkulturmedien und –zusätze.....	25
Tab. 2.9: Primäre Antikörper .....	26
Tab. 2.10 Sekundäre Antikörper .....	27
Tab. 2.11: PCR-Reaktionsbedingungen.....	30
Tab. 2.12: Mutagenese-PCR-Reaktionsbedingungen .....	31
Tab. 2.13: qRT-PCR Programm.....	38
Tab. 3.1: HPV16 L2 und GFP-16L2 280-330 Mutanten.....	49
Tab. 3.2: HPV18 L2 Mutanten.....	60



---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: HPV16 Genomorganisation .....	2
Abb. 1.2: Struktur des Kapsides und eines L1-Kapsomers von Papillomviren.....	3
Abb. 1.3: Infektion des mehrschichtigen Epithelgewebes mit HPV.....	4
Abb. 1.4: Modell der Raumstruktur eines Kernporenkomplexes .....	9
Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung von Prozessen des Kernimportes und Kernexportes, vermittelt durch die Transportrezeptoren der Importin- $\beta$ Familie .....	11
Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Zyklus der GTPase Ran.....	12
Abb. 1.7: potentielle Kernlokalisierungssignale in HPV16 L2 .....	15
Abb. 3.1: Untersuchungen zum Kernimport von $\Delta$ nNLS und $\Delta$ cNLS L2-Mutanten.....	45
Abb. 3.2: Untersuchungen der intrazellulären Verteilung von GFP2-L2 Fusionskonstrukten.. .....	46
Abb. 3.3: Untersuchung des Kernimportes von GST-16L2 280-330 in permeabilisierten HeLa-Zellen .....	47
Abb. 3.4: Sequenzvergleich des mNLS im L2-Protein verschiedener HPV-Typen .....	48
Abb. 3.5: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von HPV16 L2-Mutanten mit Austauschen basischer Aminosäuren im Bereich des mNLS. ....	50
Abb. 3.6: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von L2-Mutanten mit deletierter n- und cNLS sowie mutierter mNLS. ....	51
Abb. 3.7: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von GFP-16L2 280/330 Konstrukten mit Punktmutationen .....	52
Abb. 3.8: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von L2-Mutanten mit Punktmutationen von Serinen oder Threoninen.....	54
Abb. 3.9: Untersuchung der intrazelluläre Verteilung von GFP-16L2 280/330 Mutanten mit Threonin- und Serinaustauschen .....	55
Abb. 3.10: Untersuchung der Interaktion von 16L2 TS295/6A mit PML.....	56
Abb. 3.11: Untersuchung der Interaktion von 16L2 TS295/6A mit Daxx.....	56
Abb. 3.12: Immunoblotanalyse von L1 und L2 in Wildtyp und mutanten HPV16- Pseudovirionen. ....	58
Abb. 3.13: Untersuchung der Infektiosität von HPV16-Pseudovirionen mit L2- Punktmutationen .....	59
Abb. 3.14: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von HPV18 L2-Mutanten mit Austauschen basischer Aminosäuren. ....	61
Abb. 3.15: Analyse von mutanten HPV18-Pseudovirionen.....	62
Abb. 3.16: Untersuchung der Lokalisation von endogenem Hsc70 nach der Expression von GFP-L2-Fusionskonstrukten .....	64

---

Abb. 3.17: Untersuchung der Kernlokalisierung von GFP-16L2 280-330 in Hsc70-depletierten Zellen .....	65
Abb. 3.18: Untersuchung des Einflusses von Kap $\beta_2$ und Kap $\beta_3$ auf die Infektion mit HPV16-PsV .....	66
Abb. 3.19: Untersuchung der Intrazelluläre Verteilung von GFP-16L2 280/330 in Karyopherin-depletierten HeLa-Zellen.....	68
Abb. 3.20: Untersuchung der Interaktion von HPV16L2 mNLS mit den Karyopherinen Kap $\beta_1$ , Kap $\beta_2$ und Kap $\beta_3$ .....	69
Abb. 4.1: Das Arbeitsmodell - Infektion und Morphogenese von Papillomviren .....	85

# 1 Einleitung

Das medizinische Erscheinungsbild einer Infektion mit Papillomviren (PV) in Form von gutartigen Warzen auf der Haut (Papillom) und Schleimhaut (Kondylom) ist schon seit mehr als 2000 Jahren bekannt und beschrieben. Ein Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und der Ausbildung von Papillomen wurde zu Beginn des letzten Jahrhunderts auf Grund von Versuchen an Freiwilligen postuliert. Später konnten mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erstmalig Viruspartikel in Hautwarzen (1949) und in Genitalwarzen (1968) nachgewiesen werden. Etwa ein Jahrzehnt später gelang es Wissenschaftlern Papillomvirus-DNA (PV-DNA) zu isolieren (de Villiers, Gissmann, and zur Hausen, 1981; Gissmann and zur Hausen, 1980). Diese wurde als radioaktiv-markierte Sonde auf der Suche nach Anwesenheit von Virus-DNA in malignen Tumoren eingesetzt. Dabei wurde sehr schnell deutlich, dass eine große Anzahl von Karzinomen des Genitaltraktes PV-DNA enthielt. So sind zum Beispiel 99,8 % aller Zervixkarzinome auf Infektionen mit humanen PV zurückzuführen (Walboomers et al., 1999). Seit 1995 sind humane PV offiziell als Kanzerogen klassifiziert.

Bei den Papillomviren handelt es sich um eine äußerst facettenreiche Virusfamilie, die in den meisten Säugetierarten und Vögeln zu finden ist. Dabei gelten PV als streng spezies- und gewebsspezifisch. Sie beschränken ihren Lebenszyklus auf einzelne Schichten des Epithelgewebes und verursachen dort meist gutartige, lokal begrenzte Wucherungen der Haut oder der Schleimhaut.

## 1.1 Humane Papillomviren (HPV)

Basierend auf Sequenzanalysen konnten bisher mehr als 100 verschiedene HPV-Typen identifiziert werden (Bernard, 2005; de Villiers et al., 2004). Etwa 90 % der bislang charakterisierten HPV-Typen gehören zu einer der beiden Hauptgattungen, den Alpha- und Beta-Papillomviren. Die verbleibenden Virustypen sind entweder den Gamma-, Mu- oder den Nu-Papillomviren zugeordnet und verursachen generell kutane, gutartige Kondylome (de Villiers et al., 2004).

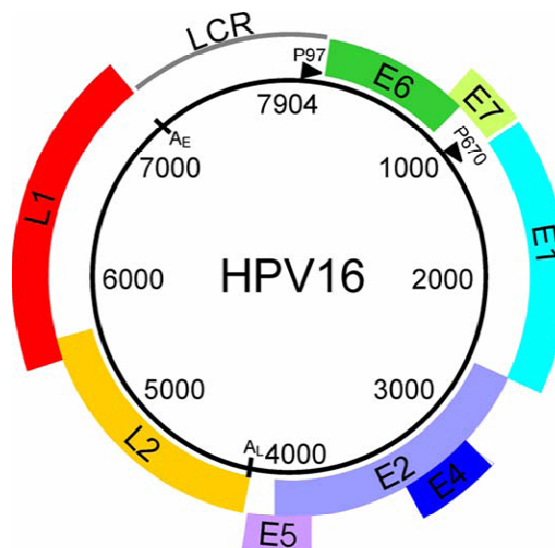
Meist verläuft eine Infektion mit HPV klinisch inapparent und wird von dem betroffenen Individuum nicht wahrgenommen. In einem geringen Prozentsatz bilden sich jedoch gutartige Wucherungen der Haut oder der Schleimhaut aus, die in der Regel nach Monaten oder Jahren spontan abheilen. Bestimmte anogenitale HPV-Typen können aber in einigen Fällen maligne Erscheinungsformen induzieren. Diese Tumor-assoziierten Viren werden auch als Hochrisiko-Typen bezeichnet. HPV16 ist das häufigste Hochrisiko-Virus und ist für

ca. 50 % der ausgebildeten Zervixkarzinome verantwortlich. Weitere weit verbreitete Risikotypen sind HPV18, -31, -33 und -45 (de Villiers, 1994; Laimins, 1993; zur Hausen and de Villiers, 1994). Hauptursache für die maligne Progression von Läsionen sind die spezifischen Aktivitäten der Oncoproteine E6 und E7 von Hochrisiko HPV-Typen (Fehrmann and Laimins, 2003) (siehe Abschnitt 1.3.3), die Destabilisierung der Wirts-DNA und die spontane Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom (Münger et al., 2004; zur Hausen, 2002).

## 1.2 Die Organisation von HPV

### 1.2.1 Das virale Genom

Das virale Genom humaner Papillomviren codiert in der Regel für 8 Genprodukte, die als polycistronische mRNAs von einem ca. 8 kb großen, zirkulären DNA-Strang abgelesen werden (siehe Abb. 1.1). Dabei werden alle 3 möglichen Leserahmen ausgenutzt (Chen et al., 1982). Das Genom wird in 3 Segmente mit unterschiedlicher Länge und Funktion unterteilt: (i) die Kontrollregion mit dem Replikationsursprung (ca. 1 kb), (ii) die frühe Region (4 kb), (iii) die späte Region (3 kb).

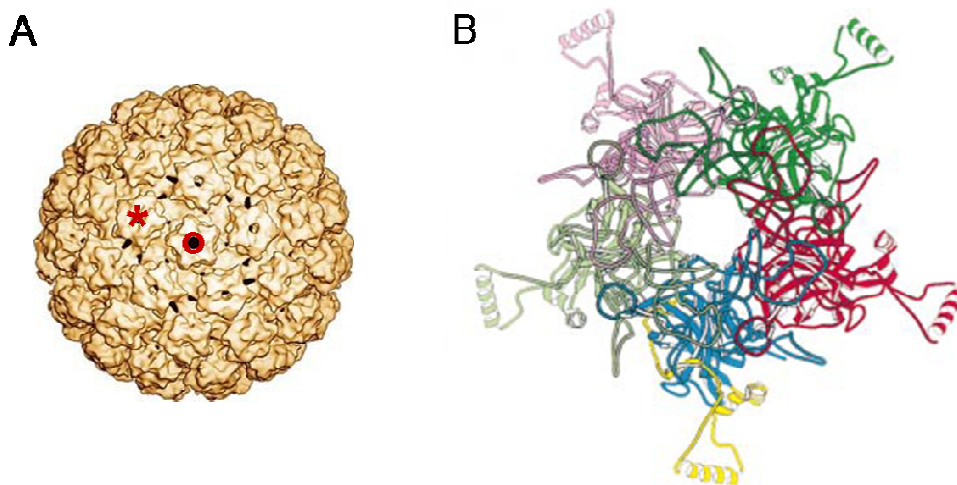


**Abb. 1.1: HPV16 Genomorganisation.** Das zirkuläre, doppelsträngige Genom mit einer Größe von 7904 bp ist als schwarzer Kreis dargestellt. Die frühen (P97) und die späten (P670) Promotorregionen sind als schwarze Pfeile gekennzeichnet. Die sechs frühen, offenen Leserahmen (E6 und E7 in Grüntönen; E1, E2, E4 und E5 in Blautönen) werden entweder von P97 oder P670 exprimiert. Die späten, offenen Leserahmen (L1 rot und L2 orange dargestellt) werden von P670 abgelesen. Zwischen der späten und der frühen Region befindet sich eine ca. 1 kb nicht-codierende Region (*LCR = Long Control Region*) mit verschiedenen Kontrollelementen.

Die frühe Region enthält vor allem Gene, deren Genprodukte bei der viralen Genomamplifikation, der viralen Genexpression, aber auch in dem Prozess der malignen Entartung eine wichtige Rolle spielen. Hierzu gehören die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 (E = *early*). In der späten Region sind die zwei Strukturgene des Virus lokalisiert, deren Genprodukte, die Proteine L1 und L2 (L = *late*), das virale Kapsid aufbauen. In Virionen ist das Genom mit zellulären Histonen assoziiert und bildet dabei Chromatin-ähnliche Strukturen aus (Howley, Knipe, and Fields, 2007).

### 1.2.2 Die Kapsidstruktur

PV sind kleine, unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von 50-55 nm, deren Kapsidhülle durch das majore Kapsidprotein L1 und das minore Kapsidprotein L2 gebildet werden. Die einzelnen Kapside bestehen aus 360 L1-Monomeren, die sich zu 72 homopentameren Kapsomeren zusammenlagern und eine ikosaedrische Symmetrie bilden (Triangulationszahl = 7) (Baker et al., 1991; Belnap et al., 1996) (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Struktur des Kapsides und eines L1-Kapsomers von Papillomviren.**

- (A) hüllenloses, ca. 55 nm großes Kapsid des Bovinen Papillomvirus Typ 1 (BPV1) (Trus et al., 1997) ○: pentavalentes Kapsomer; ✖: hexavalentes Kapsomer
- (B) Aufsicht auf ein L1-Kapsomer. Die fünf L1-Monomere sind in grau, pink, grün, rot und blau dargestellt. Der C-terminale Arm des zentralen, blauen Monomers ist gelb gekennzeichnet (Chen et al., 2000).

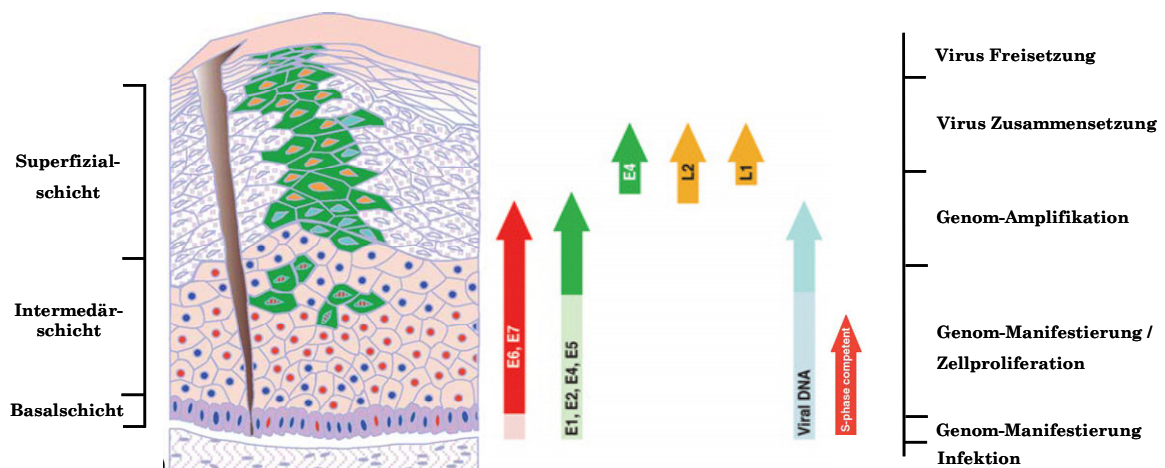
Vorgegeben durch diese Symmetrie besteht das Kapsid aus 12 pentavalenten und 60 hexavalenten Kapsomeren, d.h. sie sind von 5 bzw. 6 weiteren Kapsomeren umgeben. L1 besitzt die Fähigkeit sich spontan zu Kapsiden zusammenzulagern. Selbst Deletionen von bis zu 29 Aminosäuren des C-Terminus können dies nicht verhindern (Paintsil et al., 1996; Schäfer, Florin, and Sapp, 2002). Eine Stabilisierung der Kapside erfolgt durch die Ausbildung von mindestens 2 interkapsomeren Disulfidbrücken zwischen benachbarten L1-

Monomeren (Buck et al., 2005b; Ishii, Tanaka, and Kanda, 2003; Li et al., 1997; Sapp et al., 1998).

Die Ausbildung von Kapsidstrukturen erfolgt unabhängig von L2 (Kirnbauer et al., 1992). Das minore Kapsidprotein wird aber bei Koexpression in deutlich geringerer Kopienzahl mit eingebaut und kann den Zusammenbau der Kapside unterstützen (Ishii et al., 2005). Neueste Untersuchungen gehen davon aus, dass maximal 72 L2-Moleküle in infektiöse Partikel eingebaut werden (Buck et al., 2008). Bimolekulare Fluoreszenzanalysen zeigten, dass die N- und C-Termini benachbarter L2-Moleküle in der Lage sind miteinander in Kontakt zu treten (Buck et al., 2008). L2 könnte demzufolge eine Art Netzstruktur ausbilden und die Kapsidstruktur zusätzlich stabilisieren.

Die Interaktion von L1 und L2 erfolgt nur zwischen L2-Molekülen und L1-Kapsomeren und nicht mit intakten Kapsiden (Chen et al., 2000; Okun et al., 2001) Die dabei entstehenden Wechselwirkungen sind von nicht-kovalenter, hydrophober Natur und sind sowohl salzabhängig als auch salzunabhängig (Finnen et al., 2003; Sapp et al., 1995). Es wird vermutet, dass der salzunabhängige Kontakt mit L1 über einen Bereich nahe dem C-Terminus von L2 (Finnen et al., 2003; Okun et al., 2001) und der salzabhängige Kontakt evtl. über einen vorderen Bereich in L2 zustande kommt (Okun et al., 2001).

### 1.3 Der HPV-Lebenszyklus



**Abb. 1.3: Infektion des mehrschichtigen Epithelgewebes mit HPV.** Schematische Darstellung der Hautschichten und des Verteilungsmusters der HPV-Genexpression in den einzelnen Schichten. Die Zeitpunkte und das Ausmaß der Expression viraler Gene sind in der rechten Hälfte dargestellt. Die dadurch ausgelösten Vorgänge in der rechten Leiste. Schwächer gefärbte Pfeile spiegeln ein niedriges Expressionslevel, stark kolorierte Pfeile ein hohes Expressionslevel viraler Proteine wieder. Nach erfolgter Infektion und Virusaufnahme wird das Virusgenom in kleiner Kopienanzahl als Episomen repliziert. Während der epithelialen Differenzierung dirigiert der frühe Promotor die Expression der Proteine E6 und E7 (rot). In höheren Epithelschichten kommt es durch Aktivierung des späten Promotors zu einer drastischen Erhöhung der Expression der viralen Proteine E1, E2, E4 und E5 (grün). Das Resultat ist eine gesteigerte Genomamplifikation (blau). Veränderungen in der RNA-Prozessierung und Proteinsynthese führen in den obersten Schichten zur Expression der Kapsidproteine L1 und L2 (gelb) und es erfolgt anschließend der Zusammenbau der Kapside. (nach (Doorbar, 2006))

Die einzelnen Schritte der viralen Genexpression und der Virusreifung sind eng mit dem Differenzierungsgrad des mehrschichtigen Epithelgewebes verbunden (siehe Abb. 1.3). Die Regeneration von Epithelzellen erfolgt von der Basalschicht aus, die am Epithelgrund auf der Basalmembran liegt. Im Laufe der Entwicklung gelangen die Zellen in die darüber liegende Intermediärschicht, differenzieren und erreichen die Superfizialschicht. Hier verlieren sie zum Teil ihre Zellkerne, werden zunehmend flacher und am Ende durch Abschuppung abgestoßen.

### 1.3.1 Virusbindung, Virusaufnahme und Kernimport der Virus-DNA

PV-Partikel dringen über Mikroläsionen in die unteren Schichten der Haut und infizieren dort die Zellen der Basalschicht. Die initiale Bindung der Viren an die Basalmembran (Roberts et al., 2007) oder die Zelloberfläche erfolgt durch die Interaktion von Lysinresten des L1-Proteins (Knappe et al., 2007) mit Zelloberflächen-assoziierten Heparansulfat-Proteoglycanen (Giroglou et al., 2001). Anschließende konformationelle Veränderungen der Kapsidstruktur (Day et al., 2008; Selinka et al., 2003) bewirken eine Übertragung der Kapside auf einen zweiten noch unbekanntem Rezeptor (Selinka et al., 2007). Möglicherweise ist an dieser Interaktion das minore Kapsidprotein L2 beteiligt. Es konnten Hinweise gesammelt werden, in denen L2 ebenfalls an der Bindung mit der Zelloberfläche beteiligt ist (Kawana et al., 2001; Yang et al., 2003). Im Anschluss an die Bindung erfolgt die Internalisierung der Viren über Endozytose (Selinka, Giroglou, and Sapp, 2002). An dieser Virusaufnahme sind im Fall von HPV16 sogenannte Teraspaning Enriched Microdomains (TEMs) beteiligt (Spoden et al., 2008). Nach dem Zerfall der Kapside in den späten Endosomen (Day et al., 2004) vermittelt L2 mit Hilfe seiner Membran-destabilisierenden Domäne die Freisetzung des PV-Genoms in das Zytoplasma (Kämper et al., 2006). Durch die Interaktion von L2 mit dem Motorprotein Dynein wird das Kapsidprotein vermutlich zusammen mit der PV-DNA an Mikrotubuli entlang in die Peripherie des Zellkerns transportiert (Florin et al., 2006). Im Anschluss an den Kernimport akkumuliert L2 zusammen mit der DNA an den Nukleären Domänen 10 (ND10) (Day et al., 2004).

### 1.3.2 Manifestierung des viralen Genoms

Im Zellkern erfolgt nun die regulierte Replikation des viralen Genoms in Form von stabilen Episomen in niedriger Kopienzahl. An diesem Prozess, der lediglich auf die unteren, basalen Schichten des Epithelgewebes beschränkt ist, sind die beiden viralen Proteine E1 und E2 beteiligt. Sowohl E1 als auch E2 sind die ersten viralen Proteine, die während der

Infektion neu gebildet werden. Durch kooperative Bindung an die PV-DNA initiieren sie deren Replikation. Die DNA-Bindedomäne von E2 erkennt dabei ein palindromisches Motiv innerhalb der nicht-kodierenden Region des PV-Genoms (Dell et al., 2003). Es bindet als Dimer an die DNA und führt E1 an den Replikationsursprung. Nachdem sich E2 von der DNA wieder abgelöst hat (Chow and Broker, 1994), bilden die rekrutierten E1-Moleküle eine dihexamere Ringstruktur und entwinden die superhelikale DNA. Es folgt die Initiation der Replikation. Durch die Interaktion von E1 mit zellulären Proteinen wie der DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase und dem Einzelstrang-DNA-Bindeprotein-A werden weitere Proteine der Replikationsmaschinerie zum viralen Initiationskomplex rekrutiert (Conger et al., 1999; Loo and Melendy, 2004).

Die Replikation der viralen DNA ist synchron geschaltet mit der Replikation zellulärer DNA, d.h. sie wird einmal pro Zellzyklus repliziert. Reguliert wird die Replikation durch die Stimulation oder Inhibierung der frühen Promotorregion über die Bindung von E2. In HPV16 besitzt E2 4 DNA-Bindestellen im Bereich des Replikationsursprunges mit unterschiedlicher Affinität (Hines et al., 1998). Bei geringer Expression werden nur 2 der 4 Stellen besetzt und E2 stimuliert die Promotoraktivität (Demeret et al., 1998). Bei erhöhter Expression werden alle 4 Bindestellen besetzt. Dies führt zu einer Verdrängung der basalen Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und TBP (*TATA-box-binding protein*) (Steger and Corbach, 1997) und damit zu einer Inhibition der Replikation.

Die gleichmäßige Verteilung der replizierten Genome während der Mitose erfolgt durch die Anlagerung der Episome mit Hilfe von E2 an Chromosomen (You et al, 2004).

### 1.3.3 Proliferationsphase

Durch die Expression der beiden viralen Oncoproteine E6 und E7 wird in den suprabasalen Zellen der Ausstieg aus der Zellteilung und damit verbunden der Übergang in die terminale Differenzierung gehemmt. Die Folge ist eine Verdickung der Intermediärschicht und die charakteristische Ausbildung von Papillomen.

Die grundlegenden Mechanismen, mit denen PV den Fortschritt des Zellzyklus stimulieren sind gut untersucht. Die Hauptaufgabe von E6 ist die Ausbildung eines Komplexes mit dem Tumorsuppressorprotein p53, welches normalerweise das Teilungsverhalten der Zelle und DNA-Reparaturprozesse reguliert (Scheffner et al., 1990). In Hochrisiko HPV-Typen wie z.B. HPV16 induziert E6 zusammen mit E6AP die Ubiquitinierung und Degradation von p53 (Scheffner et al., 1993) und begünstigt damit eine unkontrollierte Zellteilung. Nicht reparierte DNA-Schäden werden an die Tochterzellen weitergegeben und dadurch die maligne Entartung der Zelle beschleunigt (Mantovani and Banks, 1999). Als weitere Funktion aktiviert das E6 Protein von Hochrisiko HPV-Typen die katalytische Untereinheit der



Telomerase und zögert damit die Seneszenz der Zelle hinaus (Klingelhutz, Foster, and McDougall, 1996).

Das Oncoprotein E7 bindet und inaktiviert Proteine, die ebenfalls in die Kontrolle des Zellwachstums involviert sind. Zu diesen Interaktionspartnern zählen das Tumorsupressorprotein pRb und seine verwandten Proteine p107 und p130 (Zerfass et al., 1995). Weitere Bindungspartner von E7 sind Cyclin E (McIntyre, Ruesch, and Laimins, 1996) und Cyclin A (Arroyo, Bagchi, and Raychaudhuri, 1993), Histondeacetylasen (Brehm et al., 1999; Longworth, Wilson, and Laimins, 2005), Komponenten des AP1 Transkriptionskomplexes (Antinore et al., 1996) und die cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 (Funk et al., 1997; Zerfass-Thome et al., 1996).

### 1.3.4 Vegetative Genomamplifikation

Voraussetzung für die Produktion von infektiösen Viren ist eine Erhöhung der DNA-Amplifikation. In den proliferierenden, suprabasalen Epithelschichten wurde das PV-Genom genau einmal je Zellzyklus repliziert. Mit fortschreitender Differenzierung der infizierten Epithelzellen kommt es zu einer Aktivierung der späten Promotorregion. Diese Umstellung des Replikationsmodus ermöglicht die Umgehung der Kontrolle durch E2 und resultiert in einer stark erhöhten Expression der viralen Proteine E1, E2, E4 und E5. Die Expression von E6 und E7 bleibt unbeeinflusst. Die gesteigerte Expression von E1 und E2 erlaubt eine ungehinderte Vermehrung der PV-DNA. Über die Funktionen von E4 und E5 ist bisher nur wenig bekannt. Beide Proteine werden auch zu Beginn der Infektion exprimiert, akkumulieren aber vorrangig zum späteren Zeitpunkt der viralen Genomamplifikation.

Der Verlust von E4 führt hauptsächlich zu einer Störung der späten Vorgänge der Infektion in verschiedenen HPV-Typen (Nakahara et al., 2005; Peh et al., 2004; Wilson, Fehrmann, and Laimins, 2005). Charakteristisch für HPV-E4 ist dessen Fähigkeit die Zellen in der G2-Phase zu arretieren und damit der E7-vermittelten Proliferation entgegen zu wirken. Diese Effekte könnten damit zusammenhängen, das E4 mit Cyclin B / Cdk2 assoziiert und diesen Komplex im Zytoplasma zurückhält (Davy et al., 2005). Desweiteren wurde für E4 eine Kolokalisation mit dem Keratingerüst der Zellen nachgewiesen (Doorbar et al., 1991). Möglicherweise fördert diese Interaktion die Instabilität der Zelle und damit die spätere Freisetzung von Viren nach dem Zusammenbruch der Zelle.

HPV-E5 ist ein Transmembranprotein, das hauptsächlich in der ER-Membran oder im Golgi Apparat lokalisiert ist und indirekt mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie z. B. EGF interagiert (Straight, Herman, and McCance, 1995).

### 1.3.5 Morphogenese und Freisetzung der Viren

Im Anschluss an die Phase der vegetativen Genomamplifikation erfolgen in den oberen, ausdifferenzierten Epithelschichten die Expression der Kapsidproteine L1 und L2. Dabei wird das Umschalten von der Genomamplifikation auf die Kapsidproteinsynthese auf der Ebene der RNA-Prozessierung reguliert (Schwartz, 2008). Der anschließende Zusammenbau der Kapside und die Verpackung der viralen DNA in infektiöse Partikel erfolgt im Kern (Becker et al., 2004). Zunächst lagern sich im Zytoplasma jeweils 5 L1 Moleküle zu den pentameren Kapsomeren zusammen. Diese werden anschließend durch die Interaktion der C-terminalen Kernlokalisationssequenz (NLS) des L1-Proteins mit dem Transportrezeptorkomplex Kap $\alpha_2$  / Kap $\beta_1$  in den Kern importiert (Nelson, Rose, and Moroianu, 2002). Darüber hinaus verhindert die Interaktion der Kapsomere mit den beiden Importinen den vorzeitigen Zusammenbau der Kapside im Zytoplasma (Bird et al., 2008). Dem Kernimport der Kapsomere vorausgegangen ist die Kerntranslokation des Kapsidproteins L2 (Florin et al., 2002a). L2 ist an bestimmten Kernstrukturen, den ND10 (Nukleären Domänen 10), assoziiert (Day et al., 1998) und hat dessen Zusammensetzung durch die Ablösung von Sp100 und die anschließende Rekrutierung von Daxx verändert (Florin et al., 2002a; Florin et al., 2002b). Die in den Kern transportierten L1-Kapsomere werden durch L2 an die ND10 rekrutiert (Day et al., 1998). Es erfolgen der Zusammenbau der Kapside und die DNA-Verpackung. Es konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von L1 für Bindung und Verpackung der DNA essentiell (Li et al., 1997; Schäfer, Florin, and Sapp, 2002) und bei einigen HPV-Typen alleine ausreichend ist. (Unckell, Streeck, and Sapp, 1997) Die Anwesenheit von L2 kann aber die Effizienz der DNA-Verpackung z. T. beträchtlich steigern (Buck et al., 2005b; Holmgren et al., 2005). Ein weiteres Protein, das durch L2 an die ND10-Domänen rekrutiert wird, ist E2 (Day et al., 1998). Es wird angenommen, dass durch dessen sequenzspezifische Interaktion mit der viralen DNA das PV-Genom in räumliche Nähe mit dem Zusammenbau der Kapside gebracht wird. Dadurch kann die spezifische Verpackung von viraler DNA gefördert werden (Zhao et al., 2000). Durch die Abstreifung der toten Zellen erfolgt die Freisetzung der Virionen. Während diesem Prozess findet die finale Reifung und die Stabilisierung der Kapside durch die Ausbildung der interkapsomeren Disulfidbrücken statt (Buck et al., 2005b).

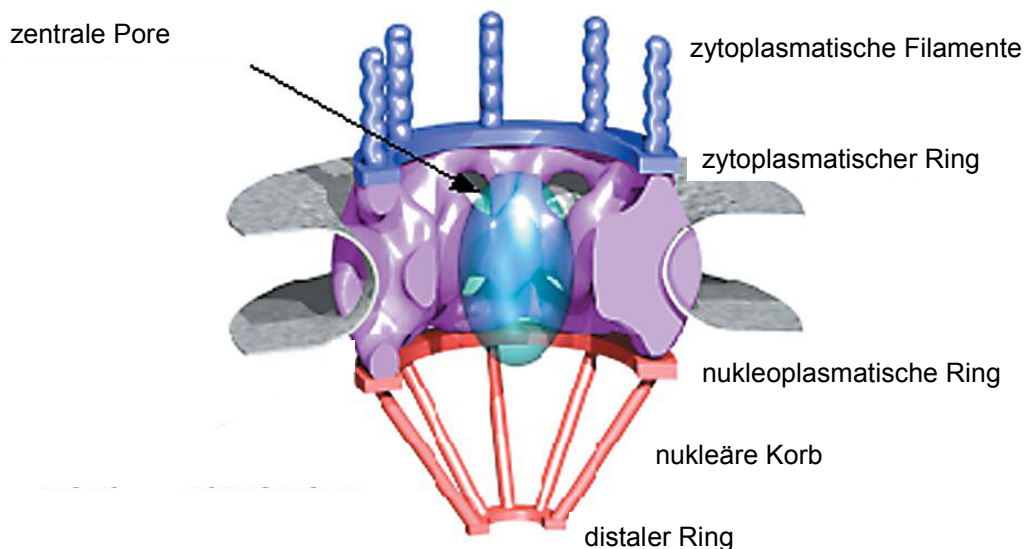
## 1.4 Nukleozytoplasmatische Transport von Molekülen

Die räumliche Trennung von DNA-Replikation (Kern) und RNA-Translation (Zytoplasma) in eukaryotischen Zellen ermöglicht eine komplexe Regulation dieser Prozesse. Sie erfordert jedoch gleichzeitig den bidirektionalen Transport von tausenden Makromolekülen über die Barriere der Kernmembran hinweg.

Diese Kompartimentierung stellt auch für Viren ein Problem dar. Die Nutzung der zelleigenen Transkriptions- und Replikationsmaschinerie erfordert die Einschleusung des viralen, genetischen Materials in den Zellkern. Darüber hinaus finden bei etlichen Viren der Zusammenbau der Kapside und deren Reifung im Zellkern statt. Dazu ist ebenfalls der Kernimport von viralen Komponenten notwendig.

### 1.4.1 Struktur der Kernporenkomplexe

Der Nukleozytoplasmatische Austausch von Molekülen wird durch Kernporenkomplexe (NPC = Nuclear Pore Complex) vermittelt. (Feldherr, 1962). Dabei handelt es sich um komplexe, makromolekulare Strukturen, die aus 30-50 verschiedenen Proteinen (Nukleoporine) gebildet werden (Cronshaw et al., 2002) und ein Molekulargewicht von etwa 125 MDa besitzen (Akey and Radermacher, 1993; Reichelt et al., 1990).



**Abb. 1.4: Modell der Raumstruktur eines Kernporenkomplexes.** Schematische Darstellung entspricht der tomographischen Rekonstitution von nativen Kernporenkomplexen (Stoffler et al., 2003)

Ein Großteil der Nukleoporine enthält charakteristische Domänen mit zahlreichen Wiederholungen kurzer FG-Dipeptidsequenzen (Ryan and Wentz, 2000). Diese, als *FG-Repeats* bezeichneten Abschnitte bilden untereinander reversible Interaktionen aus und erzeugen eine Art Siebstruktur (Frey and Gorlich, 2007; Frey, Richter, and Gorlich, 2006),

die den Durchtritt von Makromolekülstrukturen bis zu einem Durchmesser von 39 nm erlauben (Pante and Kann, 2002).

Transmissions-Elektronenmikroskop Aufnahmen zeigten die Kernporenkomplexe von Vertebraten als 65 nm tiefe Kanäle mit achtfacher Rotationssymmetrie (siehe Abb. 1.4), die zwischen zwei Ringstrukturen eingebettet sind (Akey and Radermacher, 1993; Hinshaw, Carragher, and Milligan, 1992; Stoffler et al., 2003). Von dem nukleoplasmatischen Ring ragen 8 dünne, lange Filamente in das Kernlumen, die sich zu einer weiteren Ringstruktur vereinen und den nukleären Korb bilden. Im Gegensatz dazu ist der zytoplasmatische Ring lediglich mit 8 kurzen, unregelmäßig geformten Filamenten ausgestattet.

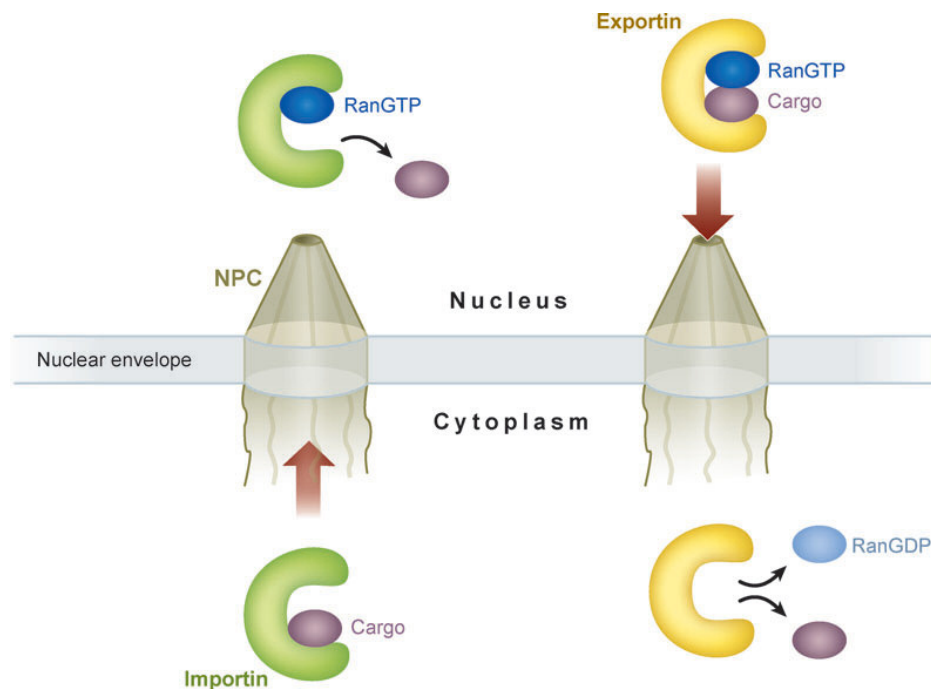
### 1.4.2 Mechanismen des bidirektionalen Transportes

Die Siebstruktur der Kernporenkomplexe erlaubt den Durchtritt von Molekülen auf zwei verschiedenen Wegen: i) passive Diffusion, ii) Rezeptor-vermittelte Translokation (Talcott and Moore, 1999). Die passive Diffusion erfordert keine spezifische Interaktion zwischen dem diffundierenden Material und den Komponenten des Kernporenkomplexes. Sie erfolgt für kleine Moleküle relativ schnell, wird aber ab einem Molekulargewicht von 20-40 kDa ineffizient und langsam (Cook et al., 2007; Paine, Moore, and Horowitz, 1975).

Die Passage von größeren Objekten erfordert das Aufbrechen der Wechselwirkungen, die sich zwischen den *FG-Repeats* der Nukleoporine ausbilden (Frey and Gorlich, 2007; Frey, Richter, and Gorlich, 2006). Dieser Vorgang ist für hydrophile Moleküle energetisch ungünstig und aus diesem Grund sind die meisten größeren Moleküle von der Diffusion durch die Kernpore ausgeschlossen. Ermöglicht wird der Transport von größeren, hydrophilen Molekülen durch deren Bindung an Transportrezeptoren (siehe Abb. 1.5). Transportrezeptoren sind in der Lage temporär an die *FG-Repeats* der Nukleoporine zu binden. Sie konkurrieren damit um die internen Wechselwirkungen zwischen den Nukleoporinen und bewirken eine transiente Öffnung (Ribbeck and Gorlich, 2002). Diese Rezeptoren werden aufgrund der Transportrichtung, die sie katalysieren entweder als Importine oder als Exportine bezeichnet.

Der Rezeptor-vermittelte Transport von Molekülen ist ein Energie verbrauchender Prozess. Diese Energie wird von dem chemischen Potential eines RanGTP-Gradienten bereitgestellt (Izauralde et al., 1997). Obwohl die kleine GTPase Ran sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu finden ist, sind deren Effektoren asymmetrisch verteilt (Abb. 1.6). Das RanGTPase aktivierende Protein (RanGAP) ist ausschließlich im Zytoplasma an den Fibrillen der Kernporenkomplexe lokalisiert (Matunis, Coutavas, and Blobel, 1996). Im Gegensatz dazu ist der Nukleotidaustauschfaktor (RanGEF, RCC1) im Kern an Chromatin gebunden (Nemergut et al., 2001; Ohtsubo, Okazaki, and Nishimoto, 1989). Diese räumliche Trennung der

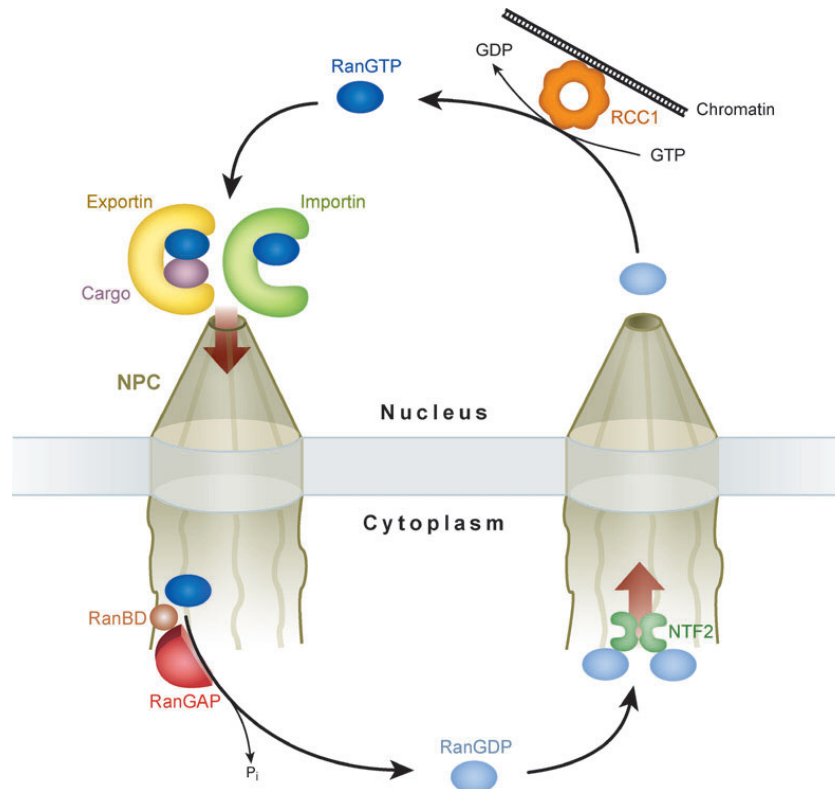
Effektoren hat zur Folge, dass zytoplasmatisches Ran mit GDP und Ran im Zellkern mit GTP assoziiert ist.



**Abb. 1.5: Vereinfachte Darstellung von Prozessen des Kernimportes und Kernexports, vermittelt durch die Transportrezeptoren der Importin- $\beta$  Familie.** Die zwei Kernporenkomplexe zeigen den charakteristischen nukleären Korb und die zytoplasmatischen Fibrillen. Der Importinrezeptor (grün dargestellt) bindet sein Cargo im Zytoplasma. Durch die Bindung von RanGTP im Kern kommt es zu einer Dissoziation des Importin-Cargo-Komplexes. Exportinrezeptoren (rot dargestellt) binden sowohl RanGTP als auch ihr Cargo im Kern und entlassen das Substrat im Zytoplasma aufgrund der Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP. Zur Vereinfachung wurde auf die Darstellung des Rücktransportes der Rezeptoren in ihre ursprünglichen Kompartimente verzichtet (Cook et al., 2007).

Charakteristisch für Transportrezeptoren, ist deren Fähigkeit die kleine GTPase Ran zu binden (Görllich et al., 1997). Importrezeptoren binden ihr Cargo im Zytoplasma bei niedrigem RanGTP Level (siehe Abb. 1.5). Im Kern führt die Bindung von RanGTP zu einer Freisetzung des transportierten Proteins (Görllich et al., 1996) und der Importin-RanGTP Komplex wird zurück in das Zytoplasma transportiert (siehe Abb. 1.6). Nach dem Rücktransport erfolgt die RanBP1/RanGAP vermittelte Ran-GTP Hydrolyse und die Freisetzung des Importrezeptors (Floer, Blobel, and Rexach, 1997; Lounsbury and Macara, 1997), der damit für eine erneute Substratbindung zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu kann sich ein Exportin-Cargo Komplex nur in Gegenwart von RanGTP im Kernlumen ausbilden (Fornerod et al., 1997; Kutay et al., 1997) und die Hydrolyse von RanGTP im Zytoplasma, führt zu einer Dissoziation dieses Komplexes (Bischoff and Gorlich, 1997; Kutay et al., 1997).

Importine und Exportine transportieren fortlaufend RanGTP aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Aufgefüllt wird dieses RanGTP-Reservoir im Kern durch den Nuclear Transport Factor 2 (NTF2) (Ribbeck et al., 1998) und dem im Kern lokalisierten Nukleotidaustauschfaktor RanGEF (Bischoff and Ponstingl, 1991). NTF2 vermittelt den Kernimport von RanGDP und RanGEF belädt Ran mit einem neuen GTP (siehe Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Zyklus der GTPase Ran.** Die hohe Konzentration von RanGDP im Zytosol wird durch RanGAP (GTPase aktivierendes Protein) aufrechterhalten, welches an den zytoplasmatischen Fibrillen des Kernporenkomplexes gebunden ist. Zusammen mit anderen Faktoren bewirkt es die Hydrolyse von an Exportin oder Importin gebundenem RanGTP. Die hohe Konzentration von RanGTP im Kern wird durch den an Chromatin gebundenen Nukleotidaustauschfaktor RanGEF (RCC1) aufrechterhalten. Dieser vermittelt den Austausch von GDP mit GTP, nachdem RanGDP zuvor mit Hilfe des Transportrezeptors NTF2 in den Kern importiert wurde (Cook et al., 2007).

### 1.4.3 Kernlokalisierungssignale

Der Nukleozytoplasmatische Transport ist ein hochgradig spezifischer Prozess, bei dem die Erkennung und Bindung von Cargomolekülen durch die Transportrezeptoren über Substratinterne Signale erfolgt. Die unterschiedlichsten Arten von Signalsequenzen konnten bisher identifiziert werden (siehe Tab. 1.1).

Transportsignale sind in zwei Gruppen eingeteilt: Kernimportsignale (NLS: Nuclear Localization Signal), und Kernexportsignale (NES: Nuclear Export Signal). Dennoch existieren Signale die eine nicht trennbare Import- und Exportaktivität besitzen und als *Shuttlesignale* bezeichnet werden. Hierzu zählt beispielsweise die M9-Domäne des RNA-bindenden Proteins hnRNP A1 (Iijima et al., 2006; Michael, Choi, and Dreyfuss, 1995) oder die KNS-Domäne von hnRNP K (Michael, Eder, and Dreyfuss, 1997).

**Tab. 1.1: Kernlokalisierungssignale.** Aufgelistet ist eine Auswahl von Proteinen mit unterschiedlichen Kernlokalisierungssignalen und den dazugehörigen Transportrezeptoren.

Kernlokalisations-signale	Protein	Sequenz	Transport-rezeptoren	Referenz
Klassisches, monopartites NLS	SV40 T Antigen	PKKKRKVE	Imp $\alpha$ /Imp $\beta$	(Kalderon et al., 1984b)
Klassisches bipartites NLS	Nucleoplasmin	KRPAATKKAGQAKKKKLD	Imp $\alpha$ /Imp $\beta$	(Robbins et al., 1991)
M9-Domäne	hnRNP A1	NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGP YGGGGQYFAKPRNQGGY	Transportin	(Siomi and Dreyfuss, 1995) (Pollard et al., 1996)
KNS-Domäne	hnRNP K	YDRRGRPGDRYDGMVGFSADE TWDSAITWSPSEWQMAY	Nukleoporeine	(Michael, Eder, and Dreyfuss, 1997)
HNS-Domäne	HuR	RRFGGPVHHQAQRFRFSPMGV DHMSGISGVNVP	Transportin	(Fan and Steitz, 1998) (Rebane, Aab, and Steitz, 2004)
BIB-Domäne	rpL23a	VHSHKKKKIRTSPTRRPKTLRL RRQPKYPRKSAPRRNKLDHY	Transportin, Importin 5, Importin 7, Imp $\beta$	(Jäkel and Görlich, 1998)
RS-Domäne	SR Proteine	Phosphorylierte RS-Wiederholungen	Transportin SR2	(Caceres, Sreaton, and Krainer, 1998) (Lai, Lin, and Tarn, 2001)
Unkonventionelle (uc) NLS	Nukleoprotein (Influenza A)	TxGTKRSYxxM	Imp $\alpha$ <sub>2</sub>	(Wang, Palese, and O'Neill, 1997) (Cros, Garcia-Sastre, and Palese, 2005)
Argininreiche Domänen in HIV1	HIV1 Rev Protein HIV1 Tat Protein	RQARRNRRRRWR RKKRRQRRR	Imp $\beta$	(Truant and Cullen, 1999)
NLM ( <i>Nuclear Localization Motiv</i> )	VP1/2 (Minute Virus of Mice)	KGKLTMRACLKLR	?	(Lombardo et al., 2000)

Kennzeichnend für Kernimportsignale sind deren hydrophiler Charakter und die Anwesenheit von Arginin / Lysin Clustern. Die meisten Transportsignale lassen sich aber nicht in definierte Konsensussequenzen einordnen und sind in Ihrer Aminosäuresequenz äußerst divers. Die erste identifizierte Kernlokalisationssequenz (Kalderon et al., 1984a) wird historisch bedingt als klassische NLS bezeichnet und ist in vielen karyophilen Proteinen zu finden. Typischerweise umfasst dieses Signal etwa 5-8 basische Aminosäuren, von denen mindestens 4 Aminosäuren Lysine sein müssen (Lange et al., 2007). Sie existieren entweder einzeln wie z.B. im SV40 T-Antigen (Kalderon et al., 1984b) oder zweiteilig wie im Fall von Nucleoplasmin (Robbins et al., 1991). Diese Signale werden von dem Adaptermolekül Importin  $\alpha$  gebunden und zusammen mit Importin  $\beta$  in den Kern transportiert (Pemberton and Paschal, 2005). Die nachfolgend identifizierten Kernlokalisierungssignale sind weitaus komplexer strukturiert (siehe Tab. 1.2). Oftmals sind diese Signale mehrteilig und die einzelnen Abschnitte in der Aminosäuresequenz voneinander getrennt. So entstehen einige

funktionelle NLS, wie z.B. die von Histonen, erst nach der Faltung des Proteins (Baake, Doenecke, and Albig, 2001).

### 1.4.4 Transportrezeptoren

Bei der Vielzahl von unterschiedlichen Transportsignalen ist es umso erstaunlicher, dass diese von einer vergleichsweise geringen Anzahl von Transportrezeptoren erkannt werden. Mit wenigen Ausnahmen sind die meisten dieser Importine und Exportine einer einzigen Proteinfamilie, der Importin  $\beta$ -Familie, zugeordnet und werden oftmals auch als Karyopherine bezeichnet (Ström and Weis, 2001) (siehe Tab. 1.2).

**Tab. 1.2: RanGTP bindende Transportrezeptoren der Importin  $\beta$ -Familie.** Aufgelistet sind die bisher identifizierten Import- und Exportrezeptoren zusammen mit einer Auswahl an Bindungspartnern (Fried and Kutay, 2003).

Transportrezeptoren	Substrate	Funktion
Importin $\alpha$ -Familie	Proteine mit klassischer NLS, Transport als Importin $\alpha/\beta$ Komplex	Import
Importin $\beta$ (Kap $\beta$ 1)	Proteine mit basischen Abschnitten wie z.B. ribosomale Protein, HIV Rev, HIV Tat, HTLV Rex, Cyclin B, Histone u. a.; ribosomale Proteine und Histone zusammen mit Importin 7	Import
Transportin 1 (Kap $\beta$ 2a, TRN1)	mRNA Bindeproteine wie z.B. hnRNP A1, F; ribosomale Proteine, c-Fos aus HIV-1	Import
Transportin 2 (Kap $\beta$ 2b, TRN2)	Überlappende Funktion mit Transportin 1	Import / Export?
Transportin SR1	SR-Proteine	Import
Transportin SR2	SR-Proteine mit phosphorylierten RS Domänen	Import
Importin 4a	ribosomales Protein S3a	Import
Importin 4b	?	Import
Importin 5 (RanBP5, Kap $\beta$ 3)	ribosomale Proteine, Histone u. a. basische Proteine	Import
Importin 7	ribosomale Proteine, Histone u. a. basische Proteine; Proteine und Histone zusammen mit Importin $\beta$	Import
Importin 8	SRP19	Import
Importin 9	Histone (vorrangig H2B), ribosomale Proteine	Import
Importin 11	UbcM2, ribisomales Protein L12	Import
Importin 13	UBC9, Y14, eIF1A, Myopodin (Liang et al., 2008)	Import
CRM1 (Exportin 1)	Proteine mit Leucin-reichen NES-Sequenzen, Snurportin 1, U snRNA Adaptoren, HIV-RNA-Adaptoren, Adaptoren der pre-60S ribisomalen Einheit	Export
CAS	Importin $\alpha$ -Familie	Export
Exportin-t	t-RNAs	Export
Exportin 4	eIF5A	Export
Exportin5	tRNAs und wahrscheinlich andere strukturierte	Export



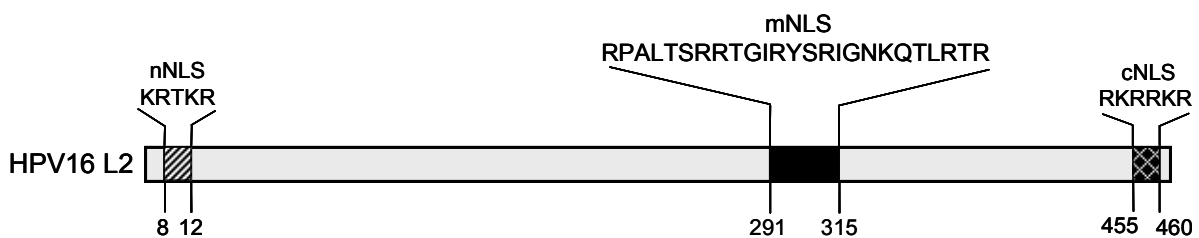
Transportrezeptoren	Substrate	Funktion
	RNAs, ILF3, eEF1A	

Alle Mitglieder dieser Superfamilie enthalten eine N-terminale RanGTP-Bindedomäne, weisen trotz geringer Sequenzhomologie eine ähnliche strukturelle Organisation auf und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 90 und 145 kDa (Fried and Kutay, 2003). Die für den Transport notwendigen Kontakte mit den *FG-Repeats* der Nukleoporine werden über die Außenseite der Rezeptoren hergestellt (Bayliss, Littlewood, and Stewart, 2000).

### 1.5 Der Kernimport des minoren HPV-Kapsidproteins L2

Das minore Kapsidprotein L2 muss im Laufe des Lebenszyklus von Papillomviren zweimal die Kernmembran auf seinem Weg vom Zytoplasma in den Zellkern überwinden. 1.) Nach den frühen Schritten der Infektion akkumuliert L2 zusammen mit der Virus-DNA im Kern an den ND10-Strukturen (Day et al., 2004). 2.) Während der Virusmorphogenese wird neu synthetisiertes L2 unabhängig von L1 in den Kern importiert, reorganisiert die ND10-Strukturen und rekrutiert L1-Kapsomere für den anschließenden Zusammenbau der Kapside (Florin et al., 2002a; Florin et al., 2002b).

Mindestens 3 verschiedene Importwege, vermittelt durch die Interaktion von L2 mit den Karyopherinen  $Kap\alpha_2/Kap\beta_1$  (Importin  $\alpha_2/\beta_1$ )  $Kap\beta_2$  (Transportin) oder  $Kap\beta_3$  (RanBP5) wurden für HPV16, HPV11 und HPV18 *in vitro* beschrieben (Bordeaux et al., 2006; Darshan et al., 2004; Klucsevsek et al., 2006). Die Aminosäuresequenz des minoren Kapsidproteins enthält 2 basische Bereiche, die charakteristische Merkmale der einteiligen, klassischen Kernlokalisierungssignale (NLS) besitzen (Vergleich Tab. 1.2). Nach ihrer Lage werden sie als nNLS bzw. cNLS bezeichnet (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7: potentielle Kernlokalisierungssignale in HPV16 L2.** Grafische Darstellung der Lokalisation der n-, m- und cNLS innerhalb des Kapsidproteins mit den jeweils begrenzenden Aminosäurepositionen. Ebenfalls mit aufgeführt ist die Aminosäuresequenz der drei Kernlokalisierungssignale.

Beide Sequenzen waren in der Lage ein zytoplasmatisches Protein in den Kern zu dirigieren. Es konnte aber z.B. bei HPV16 für beide L2-Regionen lediglich die Bindung mit dem Transportkomplex  $Kap\alpha_2 / Kap\beta_1$  nachgewiesen werden (Darshan et al., 2004). Die L2-Domäne, die für die Interaktion mit den Karyopherinen  $Kap\beta_2$  und  $Kap\beta_3$  verantwortlich ist, konnte noch nicht identifiziert werden. Neben den beiden terminalen, basischen Bereichen besitzt das Kapsidprotein eine zentrale, ausgedehnte Region die in dieser Arbeit als mNLS

bezeichnet wird (Abb. 1.7). Abgesehen von einem überdurchschnittlich hohen Anteil basischer Aminosäuren zeigt dieses Motiv keine Gemeinsamkeiten mit bislang charakterisierten Kernlokalisierungssignalen. Bisherige Untersuchungen lieferten widersprüchliche Daten über die Bedeutung der drei basischen Motive für den Kernimport von neu synthetisiertem L2 während der Morphogenese. (Becker et al., 2003; Darshan et al., 2004; Sun et al., 1995). Ebenfalls ungeklärt ist, welche Domäne für den Import des L2-DNA-Komplexes während der Infektion genutzt wird. So wird beispielsweise die nNLS durch eine Furinspaltung während der frühen Phase der Infektion entfernt (Richards et al., 2006).

## 1.6 Zielsetzung

Wie bereits dargestellt, besitzt das minore Kapsidprotein L2 von humanen Papillomviren 3 Domänen mit einem hohen Anteil an basischen Aminosäuren, deren Funktion als Kernlokalisationssequenzen in der Literatur diskutiert wird (n-, m- und cNLS; Abb. 1.7). Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der Domäne, die für den Kernimport von HPV16 und -18 L2 während Infektion und Morphogenese hauptverantwortlich ist. Des Weiteren sollten die Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für diesen Kernimport sind.

Die Interaktion des Hitzeschockproteins Hsc70 mit dem C-Terminus ist absolut notwendig für den L2-Kernimport (Florin et al., 2004). Bisherige Daten zeigten, dass aber noch weitere Hsc70-Interaktionsdomänen in L2 existieren. Untersuchungen sollten Hinweise liefern, ob die Funktion des mNLS-vermittelten Kernimportes von Hsc70 beeinflusst werden kann.

Das L2-Protein ist das einzige virale Protein, das während der Infektion zusammen mit der DNA in den Kern transportiert wird (Day et al., 2004). Wie bereits erwähnt, konnte bisher die Interaktion von L2 mit den Karyopherinen Kap $\alpha_2$  / Kap $\beta_1$ , Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  *in vitro* gezeigt werden. In dieser Arbeit sollte deshalb die Bedeutung dieser 3 Importine für die Etablierung der Infektion untersucht werden. Mit Hilfe dieser Daten könnten Rückschlüsse getroffen werden, ob eines dieser Karyopherine den L2-Kernimport während der Infektion vermitteln kann.

Bisher ist nicht bekannt welcher Bereich von L2 mit den Transportrezeptoren Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  interagiert. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe von Präzipitationsstudien analysiert werden, ob möglicherweise das mNLS von einem der beiden Importine erkannt und gebunden werden kann.

Mit Hilfe der gesammelten Ergebnisse müsste es abschließend möglich sein, die in 1.6 beschriebenen widersprüchlichen Daten zu bewerten und noch ungeklärte Fragen bezüglich der Kerntranslokation von L2 während Infektion und Morphogenese zu beantworten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Labormaterialien

Alle Plastikwaren wurden von den Firmen Falcon / Becton Dickinson (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen) and Sarstedt (Heidelberg) bezogen. Glaswaren stammten von der Firma Schott (Mainz). Die verwendeten Laborgeräte sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tab. 2.1: Laborgeräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Mettler AE 100	Mettler
Blotkammer	Trans Blot Cell	Bio-Rad
Brutschrank	Heraeus 6000	Heraeus
Elektrophorese-Kammer, horizontal (DNA)		LMS GmbH Labortechnik (Dossenheim)
Elektrophorese-Kammer vertikal (Protein)		BRL Life Technologies
ELISA-Reader	Multiscan RC Model 351	Thermo Labsystems
ELISA-Washer	AM60 Multi-Reagent Washer	Dynex Technologies
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	ZEISS
Geldokumentation	Procida	Peacock
Heizblock	Blockthermostat BT 1303	HLC
Inkubationsschüttler	Certomat	Sartorius
Laborwaage	BL 1500S	Sartorius
Magnetrührer	IKAMAG REC-G	Janke & Kunkel
Netzgeräte	PHERO-stab.500	Biotec-Fischer
	PowerPack P25	Biometra
pH-Meter	WTW pH Level 2	inoLab
Pipetten	P10, P20, P200, P1000	GILSON
Pipettierhilfen	Pipetus®-akku	Hischmann Laborgeräte
Rotoren	SW40, SW60	Beckmann
	GS 3, GSA, HB 4, SS34	Du Pont Instruments NUAIRE
sterile Werkbank	NU-440-400E (Class II)	Biological safety cabinets
		Biometra
qRT-Cycler	7300 Taqman®	Applied Biosystem
Thermocycler	T-Gradient	Heraeus
Tischzentrifugen	Biofuge pico	Heraeus
	Biofuge fresco	
Überkopfschüttler	Reax2	Heidolph
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson
Ultrazentrifuge	L8-70M UZ	Beckman
UV-Transilluminator	II-200M, 302nm	Bachofer
Wasserbad	W12D	Peter Huber
		Kältemaschinenbau GmbH
H <sub>2</sub> O-Deionisierungsanlage	Milli-Q	Millipore
Wipp-Schüttler	Rocky	Heraeus
Zentrifugen	Labofuge 400R Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments

## 2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen in der höchsten Reinheit bezogen: AppliChem, Becton Dickinson, GE Healthcare, Gibco BRL, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia-LKB Biotechnology, Roche, Roth, Serva oder Sigma-Aldrich. Die verwendete Nitrocellulose (NC)-Membran stammte von der Firma Schleicher und Schüll.

## 2.1.3 Fertigreagenzien und Kits

Tab. 2.2: Verwendete Fertigreagenzien und Kits.

Produkt	Hersteller	Verwendung
<i>Alexa-488 C5 malemeide</i>	Invitrogen	Fluoreszenzmarkierung
<i>Bio-Rad Protein Assay</i>	Bio-Rad	Bestimmung Proteinkonzentration
<i>Complete, Mini, EDTA-free</i>	Roche	Protease Inhibitor Cocktail
<i>Fluoprep</i>	bioMérieux	Einbettmedium für Immunfluoreszenzen
<i>Glutathion-Sepharose™ 4B</i>	GE-Healthcare	GST-Immobilisierung
<i>HiTrap™ Chelating HP</i>	GE-Healthcare	His-Tag Reinigung
<i>Hoechst33342 (Bisbenzimid)</i>	Sigma	DNA-Anfärbung
<i>illustra™ NAP-5 Columns</i>	GE-Healthcare	Pufferaustausch, -Entsalzung
<i>Lipofectamine™ 2000</i>	Invitrogen	DNA-Transfektion
<i>Lipofectamine™ RNAiMAX</i>	Invitrogen	siRNA-Transfektion
<i>Nucleo Bond PC500</i>	Macherey Nagel	Plasmid Isolation (Maxi)
<i>Magnet Assisted Transfection (MATra)</i>	IBA	DNA-Transfektion
<i>peqGold Plasmid Miniprep Kit I</i>	PeqLab	Plasmid Isolation (Mini)
<i>peqGold Gelextraction Kit</i>	PeqLab	DNA-Extraktion aus Agaraosegelen
<i>Pure Cycle Kit</i>	PeqLab	DNA-Reinigung für qRT-PCR
<i>Rabbit Reticulocyte Lysate</i>	Promega	Import Assay, GST-Bindungsassay
<i>TMB ELISA Peroxidase Substrat</i>	KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories)	ELISA-Detektion
<i>Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus</i>	PerkinElmer	Western Blot-Detektion (ECL)
<i>Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit</i>	Invitrogen	Subklonierung

### 2.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen und die Phosphatase wurden von der Firma New England BioLabs, DNA-Polymerasen von der Firma PeqLab bezogen und in den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben verdünnt eingesetzt. Die DNase I und die Benzonase (378 U /  $\mu$ l) stammen von der Firma Sigma. Die T4 DNA-Ligase wurde von der Firma Fermentas bezogen.

### 2.1.5 Protein- und DNA-Marker

<b>DNA-Marker:</b>	<i>peqGold 1kb DNA-Leiter</i>	PeqLab
	<i>peqGold 50bp DNA-Leiter</i>	PeqLab
<b>Protein-Marker:</b>	<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas
	<i>peqGold Protein Marker I</i>	PeqLab

### 2.1.6 Plasmidvektoren

**pUF3 / hu16L1:** codonoptimiertes HPV16 L1-Gen, über *Not* I und *Hind* III in den pUF3 AVV#893-Vektor kloniert, Ampicillinresistenzgen (Leder et al., 2001).

**pUF3 / hu16L2:** codonoptimiertes HPV16 L2-Gen, über *Not* I und *Hind* III in den pUF3 AVV#893-Vektor kloniert, Ampicillinresistenzgen (Leder et al., 2001).

**pe18L1bhb:** codonoptimiertes HPV18 L1-Gen, über *Nco* I und *Nhe* in den pBHB-CMV-Vektor kloniert, Kanamycinresistenzgen (Pastrana et al., 2004)

**pe18L2bhb:** codonoptimiertes HPV18 L2-Gen, über *Nco* I und *Nhe* in den pBHB-CMV-Vektor kloniert, Kanamycinresistenzgen (Pastrana et al., 2004)

**pCR®-Blunt II-Topo®:** Vektor für Sub-Klonierungen von *blunt end* PCR-Produkten, Kanamycinresistenzgen (Invitrogen).

**pEGFP-C1:** kodiert für ein *Enhanced Green Fluorescent Protein* (GFP) mit C-terminaler MCS (*Multiple Cloning Site*), Kanamycinresistenzgen, (BD Biosciences)

**pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS:** in den pEGFP-C1-Vektor wurde ein weiteres GFP-Gen und zusätzlich die Kernlokalisationssequenz von HPV33-L1 über *EcoR* I und *BamH* I kloniert, Kanamycinresistenzgen (zur Verfügung gestellt von Luise Florin, Universitätsklinik, Mainz)

**pQE-GST:** in den Expressionsvektor pQE-60 (Quiagen) wurde das GST-Gen über die *Nco* I-Schnittstelle mit *BspH* I und *Nco* I kloniert, Ampicillinresistenzgen (zur Verfügung gestellt von Ulrike Kutay, ETH Zürich)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.3 und 2.4 aufgeführten DNA-Primer wurden von den Firmen Biomers.net oder IDT bezogen. Die Mutageneseprimer aus Tabelle 2.3 wurden PAGE-gereinigt, die übrigen PCR-Primer (Tabelle 2.4) Kartusche-gereinigt bezogen. Die Primer und die TaqMan<sup>®</sup>-Hydrolysesonde lieferte die Firma Applied Biosystem (Tabelle 2.6).

**Tab. 2.3: Verwendete DNA-Mutageneseprimer.** Die veränderten Nukleotide sind rot hervorgehoben. R = A oder G; S = C oder G, Y = C oder T

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
16L2-R291A-forward	5'-GGA CAT CGT GGC CCT GCA <b>CGC</b> <b>GCC</b> CGC CCT GAC CAG C-3'
16L2-R291A-revers	5'-GCT GGT CAG GGC GGG <b>CGC</b> GTG CAG GGC CAC GAT GTC C-3'
16L2-TS295/6AA-forward	5'-GCA CAG GCC CGC CCT <b>GGC</b> <b>GGC</b> GAG GAG GAC CGG CAT CAG G-3'
16L2-TS295/6AA-revers	5'-CCT GAT GCC GGT CCT CCT <b>CGC</b> <b>CGC</b> CAG GGC GGG CCT GTG C-3'
16L2-R297A-forward	5'-GGC CCG CCC TGA CCA <b>GCG</b> <b>CGA</b> GGA CCG GCA TCA GG-3'
16L2-R297A-revers	5'-CCT GAT GCC GGT CCT <b>CGC</b> GCT GGT CAG GGC GGG CC-3'
16L2-R298A-forward	5'-GCC CTG ACC AGC AGG <b>GCG</b> ACC GGC ATC AGG TAC AGC-3'
16L2-R298A-revers	5'-GCT GTA CCT GAT GCC GGT <b>CGC</b> CCT GCT GGT CAG GGC-3'
16L2-R297/8A-forward	5'-GGC CCG CCC TGA CCA <b>GCG</b> <b>CGG</b> <b>CGA</b> CCG GCA TCA GGT ACA GC-3'
16L2-R297/8A-revers	5'-GCT GTA CCT GAT GCC GGT <b>CGC</b> <b>CGC</b> GCT GGT CAG GGC GGG CC-3'
16L2-R297/8/302/5A-forward	5'- <b>GCG</b> <b>GCG</b> ACC GGC ATC <b>GCG</b> TAC AGC <b>GCG</b> ATC GGC AAC AAG CAG ACC-3'
16L2-R297/8/302/5A-revers	5'-GGT CTG CTT GTT GCC GAT <b>CGC</b> GCT GTA <b>CGC</b> GAT GCC GGT <b>CGC</b> <b>CGC</b> -3'
16L2-R297/8/302/5K-forward	5'-CCC GCC CTG ACC AGC <b>AAG</b> <b>AAG</b> ACC GGC ATC <b>AAG</b> TAC AGC <b>AAG</b> ATC GGC AAC AAG CAG ACC-3'
16L2-R297/8/302/5K-revers	5'-GGT CTG CTT GTT GCC GAT <b>CTT</b> GCT GTA <b>CTT</b> GAT GCC GGT <b>CTT</b> <b>CTT</b> GCT GGT CAG GGC GGG-3'
16L2-R302/5A-wobble-forward	5'-GGA GGA CCG GCA TCR <b>SGT</b> ACA GCR <b>SGA</b> TCG GCA ACA AGC AGA CC-3'

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
16L2-R302/5A-wobble-revers	5'-GGT CTG CTT GTT GCC GAT <b>CSY</b> GCT GTA <b>CSY</b> GAT GCC GGT CCT CC-3'
16L2-S304A/T-forward	5'-GGA CCG GCA TCA GGT ACR <b>CCA</b> GGA TCG GCA ACA AGC-3'
16L2-S304A/T-revers	5'-GCT TGT TGC CGA TCC <b>TGG</b> YGT ACC TGA TGC CGG TCC-3'
16L2-K309A-forward	5'-GCA GGA TCG GCA ACG <b>CGC</b> AGA CCC TGA GGA CC-3'
16L2-K309A-revers	5'-GGT CCT CAG GGT CTG <b>CGC</b> GTT GCC GAT CCT GC-3'
16L2-G307A-forward	5'-GGT ACA GCA GGA TCG <b>CCA</b> ACA AGC AGA CCC TGA GG-3'
16L2-G307A-revers	5'-CCT CAG GGT CTG CTT <b>GTT</b> GGC GAT CCT GCT GTA CC-3'
16L2-R313A-forward	5'-GCA ACA AGC AGA CCC TGG <b>CGA</b> CCA GGA GCG GCA AGA GC-3'
16L2-R313A-revers	5'-GCT CTT GCC GCT CCT GGT <b>CGC</b> CAG GGT CTG CTT GTT GC-3'
16L2-R315A-forward	5'-GCA GAC CCT GAG GAC <b>CGC</b> GAG CGG CAA GAG CAT CG-3'
16L2-R315-revers	5'-CGA TGC TCT TGC <b>CGC</b> TCG CGG TCC TCA GGG TCT GC-3'
16L2-R458/9E-forward	5'-CCC AGC TAC ATG CTG AGG AAG <b>GAG GAG</b> AAG AGG CTG CCC TAC TTC-3'
16L2-R458/9E-revers	5'-GAA GTA GGG CAG CCT CTT <b>CTC CTC</b> CTT CCT CAG CAT GTA GCT GGG-3'
18L2-R290/1A-forward	5'-CCC GCC CTG ACC AGC <b>GCC GCG</b> GGC ACC GTG AGG TTC TCC-3'
18L2-R290/1A-revers	5'-GGA GAA CCT CAC GGT GCC <b>CGC GGC</b> GCT GGT CAG GGC GGG-3'
18L2-R295/8A-wobble-forward	5'-CGC AGG GGC ACC GTG <b>RSG</b> TTC TCC <b>RSG</b> CTG GGC CAG AGA GCC-3'
18L2-R295/8A-wobble-revers	5'-GGC TCT CTG GCC CAG <b>CSY</b> GGA GAA <b>CSY</b> CAC GGT GCC CCT GCG-3'

**Tab. 2.4: PCR-Primer für alle in dieser Arbeit hergestellten 16L2-Konstrukte.** Neu eingeführte Restriktionsschnittstellen sind grün hervorgehoben. Zur Vervollständigung ist ebenfalls das Primerpaar für die Klonierung eines 2. EGFP in pEGFP-C1 angegeben ( fw = forward; rev = reverse)

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Konstrukt
16L2-1-5'	5'-CGG AAT TGT ACC CGC GGC-3'	pUF16L2-HA (fw-Primer)
16L2-(Not I)M13-5'	5'-AAT AAT <b>GCG GCC GCA CCA</b> <b>TGG</b> CCA GCG CCA CCC AG-3'	pUF16L2-13/455 (fw-Primer)
16L2-(Not I)M150-5'	5'-AAA AGC <b>GGC CGC GCC</b> ACC <b>ATG</b> AAC ACC GTG ACC ACC GTG- 3'	pUF16L2-150/473 (fw-Primer)
16L2-(BamH I)M280-5'	5'-AAA <b>GGA TCC ATG</b> GAC CCC GAC TTC CTG GAC-3'	pQE-GST-16L2-280/330 (fw-Primer)
16L2-(Pst I)280-5'	5'-AAA <b>CTG CAG TCG ACC</b> CCG ACT TCC TGG AC-3'	pEGFP <sub>2</sub> 16L2-280/330 (fw-Primer)
16L2-(Pst I)291-5'	5'-AAA <b>CTG CAG TCA GGC</b> CCG CCC TGA CCA GC-3'	pEGFP <sub>2</sub> 16L2-291/315 (fw-Primer)
16L2-473HA-S(Hind III)-3'	5'-CAA <b>AAA GCT TTC</b> AAG CGT AAT CTG GAA CAT CGT ATG GGT AGG CGG CCA GGC-3'	pUF16L2-HA (rev-Primer)
16L2-455S(Hind III)-3'	5'-CAA <b>AAA GCT TTC</b> ACA GCA TGT AGT AGC TGG-3'	pUF16L2 13/455 (rev-Primer)
16L2-330(Bgl II)-3'	5'-AAA <b>AGA TCT CAG</b> GTC GTA GTA GTA GTG-3'	pQE-GST-16L2-280/330 (fw-Primer)



Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Konstrukt
16L2-330S( <i>Bam</i> HI)-3'	5'-AAA GGA TCC TCA CAG GTC GTA GTA GTA GTG-3'	pEGFP <sub>2</sub> 16L2-280/330 (rev-Primer)
16L2-315S( <i>Bam</i> H I)-3'	5'-AAA GGA TCC TCA CCT GGT CCT CAG GGT CTG-3'	pEGFP <sub>2</sub> 16L2-291/315 (rev-Primer)
GFP( <i>Bgl</i> II)-5'	5'-AAA AGA TCT ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-3'	pEGFP <sub>2</sub> (fw-Primer)
GFP( <i>Eco</i> R I)-3	5'-AAA GAA TTC GAC TTG TAC AGC TCG TCC AT-3'	pEGFP <sub>2</sub> (rev-Primer)

**Tab. 2.5: Für DNA-Sequenzierungen verwendete Primer.** Aufgelistet sind neben der Primerbezeichnung die dazugehörigen Vektoren unter Angabe der entsprechenden Primeranlagerungsstellen und wenn bekannt die Sequenz. Alle Primer werden bei der Firma Genterprise gelagert. (MCS = *Multiple Cloning Site*)

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
pMK1-5' (pUF3 AVV #893; vor MCS)	5'-AAG CTG CGG AAT TGT ACC CG-3'
pSR-3' (pUF3 AVV #893; hinter MCS)	5'-CTA GAA GGC ACA GTC GAG G-3'
M13-forward (Topo-Vektor; vor MCS)	Von Genterprise zur Verfügung gestellt
M13-reverse (Topo-Vektor; hinter MCS)	Von Genterprise zur Verfügung gestellt
SV40-PA-rev (pEGFP; hinter MCS)	Von Genterprise zur Verfügung gestellt
pQE-revers (pQE-GST; hinter MSC)	Von Genterprise zur Verfügung gestellt

**Tab. 2.6: In der quantitativen Real-Time PCR verwendete Oligonukleotide.** Für die Amplifikation des *Templates* pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS wurden die beiden Primer pEGFP-FW und pEGFP-RW verwendet. Als Fluoreszenz-markierte, hydrolysierbare Sonde diente pEGFP-YFP-DsRed.

Primerbezeichnung	Oligonukleotidsequenz	Markierung
pEGFP-YFP-DsRed	5'-CAC CTC TGA CTT GAG C-3'	6-FAM/MGB
pEGFP-FW	5'-TCT TTA TAG TCC TGT CGG GTT TCG -3'	
pEGFP-RW	5'-CTG ACG AGC ATC ACA AAA ATC-3'	

**Tab. 2.7: siRNA- Oligonukleotide zur RNAi.** Bei bekannter Sequenz ist der *forward*-Strang der RNA-Duplexe angegeben. Alle siRNAs wurden HPLC-gereinigt und bereits hybridisiert geliefert.

siRNA	Oligonukleotidsequenz	Referenz
Kap $\beta$ <sub>1</sub> -siRNA	Mix aus 3 spezifischen 20-25nt si RNA's	Santa Cruz
Kap $\beta$ <sub>2</sub> -siRNA	5'-CAC AGC ACU GCA GUC UGG AUU CC-dTdT-3'	
Kap $\beta$ <sub>3</sub> -siRNA_1	5'-UAA GAC CAA UGC UCC AAU A-dTdT-3'	(Deng et al., 2006)
Kap $\beta$ <sub>3</sub> -siRNA_2	5'-GGA AGC AAC UCU ACA GCU A-dTdT-3'	(Deng et al., 2006)
Hsc70-siRNA	5'-GAG AGA CCA AAA GCU UCU A-dTdT-3'	(Rohde et al., 2005)
Konroll-siRNA	AllStars Negative Control siRNA	Qiagen

### 2.1.8 Bakterienstämme

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

*supE44 lacU 169* ( $\Phi 80/lacZM15$ ) *hsdR17 recA endA1 gyrA1 gyrA96 thi-1 relA1*  
(Hanahan, 1983)

#### ***Escherichia coli* DH5 $\alpha$ :**

F' *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup>* ( $\Delta lacZ$ ) M15 zzf::Tn10 (*TetR*) / *fhuA2 $\Delta$*  (*argF-lacZ*) U169 ( $\Phi 80 \Delta(lacZ)$  M15) *glnV44 gyrA96* (*Nal<sup>R</sup>*) *recA1 endA1 thi-1 hsdR7*  
(NEB 5-alpha chemisch kompetente *E.coli*, New England BioLabs)

#### ***Escherichia coli* Mach1:**

F'  $\Phi 80$  (*lacZ*)  $\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR$  (*r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>*)  $\Delta recA1398 endA1 tonA$   
(One Shot<sup>®</sup> Mach1<sup>™</sup>-T1<sup>R</sup> Chemically Competent *E.coli*, Invitrogen)

#### ***Escherichia coli* BLR:**

F' *ompT hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal dcm*  $\Delta(srl-recA)$  306::Tn10 (*tet<sup>R</sup>*)  
(BLR chemically competent cells, Novagen)

#### ***Escherichia coli* M15(Rep4):**

*Nal<sup>S</sup> Str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>-</sup> gal<sup>-</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr* [pREP4 (*kanamycin<sup>R</sup>*)]  
(Quiagen)

### 2.1.9 Bakterienkulturmedien

Das Anlegen von Bakterienkulturen in flüssigen und festen Kulturmedien erfolgte standardmäßig in LB-Medium. Für feste Nährböden wurde dem jeweiligen Medium noch 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt. Das Antibiotikum für die Bakterienselektion wurde nach dem Resistenzgen des jeweiligen Vektors ausgesucht (siehe 2.1.5).

LB (Luria-Bertani)-Medium:            0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
    1 % (w/v) Trypton  
    1 % (w/v) NaCl  
    pH 7,0

Die Expression der GST-His-Fusionsproteine erfolgte in TB-Medium.

TB (Terrific Broth)-Medium:            2,4 % (w/v) Hefeextrakt  
     1,2 % (w/v) Trypton  
     0,4 % (v/v) Glycerin  
     0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
     0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 2.1.10 Eukaryotische Zelllinien

#### HeLa (ATCC CCL2):

Humane Zervixkarzinomzelllinie, durch HPV18 transformiert

#### HuTK<sup>-</sup> (ATCC CRL-8303):

Humane Osteosarcomazelllinie, Thymidinkinase defizient

#### 293TT:

Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293, enthält zusätzlich zweimal das T-Antigen von SV40 (Buck et al., 2004; Pear et al., 1993)

### 2.1.11 Zellkulturmedien und -zusätze für eukaryotische Zelllinien

Tab. 2.8: Zellkulturmedien und –zusätze.

Produkt	Hersteller	Verwendung
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA Laboratories	standardisiertes Zellkulturmedium (ZKM)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen	Zusatz für ZKM
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAA Laboratories	Zusatz für ZKM
Penicillin/Streptomycin (100x)	Invitrogen	Antibiotikum
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA Laboratories	Zusatz für ZKM
Opti-MEM®-1	GIBCO	Serum reduziertes Medium
Ciprobay® (Ciprofloxacin)	Bayer	Antibiotikum
Hygromycin	Roth	Selektion von 293TT Zellen

## 2.1.12 Primäre Antikörper und Antiseren

Tab. 2.9: primäre Antikörper. WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz

Name	Epitop	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
33L2-1	HPV16 und -33 L2 (AS 163-170)	Maus monoklonal	WB 1:200 IF 1:50	(Volpers et al., 1995)
K18	HPV16 und -33 L2	Kaninchen polyklonal	IF 1:400	M. Sapp
33L1-7	HPV16, -18, -33L1 (AS 303-313)	Maus monoklonal	WB 1:200	(Sapp et al., 1994)
16L1-312	HPV16 L1 (AS 125?)	Maus monoklonal	WB 1:200	M. Sapp
16L1-58C	HPV16 L1 (AS 260-270) FGa-Loop konformationell	Maus monoklonal	ELISA 1:1000	(Bergsdorf et al., 2003)
18L2-28F	HPV18 L2	Maus monoklonal	WB 1:200 IF 1:50	M.Sapp
18L1-1E	HPV18 L1 (AS 280)	Maus monoklonal	WB 1:200	M.Sapp
$\alpha$ -Daxx	Daxx (AS 627-739)	Kaninchen polyklonal	WB 1:500 IF 1:200	Santa Cruz
$\alpha$ -GFP (JL8)	GFP	Maus monoklonal	WB 1: 10 000	Clontech
$\alpha$ -HA	YPYDVPDYA	Ratte monoklonal	IF 1:200	Roche
$\alpha$ -Hsc70 (SPA-815)	Hsc70	Ratte monoklonal	IF 1:200	Stressgen
$\alpha$ -Kap- $\beta_1$	hKaryopherin $\beta_1$ (AS 1-300)	Kaninchen polyklonal	WB 1:600 IF 1:200	Santa Cruz
$\alpha$ -Kap- $\beta_2$	hKaryopherin $\beta_2$ (N-Terminus)	Ziege polyklonal	WB 1:600 IF 1:200	Santa Cruz
$\alpha$ -Kap- $\beta_3$	hKaryopherin $\beta_3$ (AS 1-300)	Maus monoklonal	WB 1:600 IF 1:100	Santa Cruz
$\alpha$ -PML	PML (C-Terminus)	Kaninchen polyklonal	IF 1:200	Chemicon
$\alpha$ -Sp100	SP100 (C- Terminus)	Kaninchen polyklonal	IF 1:200	Hans Will
$\alpha$ - $\alpha$ -Tubulin	h- $\alpha$ -Tubulin (C-Terminus)	Maus Monoklonal	WB 1:20 000	Sigma

### 2.1.13 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.10 Sekundäre Antikörper. WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz

gegen Spezies	Konjugat	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
α-Maus	Alexa Fluor® 488	Ziege	IF 1:250	Invitrogen
	Alexa Fluor® 546	Ziege	IF 1:250	Invitrogen
	Peroxidase	Ziege	WB 1: 10 000	Dianova
α-Kaninchen	Alexa Fluor® 488	Ziege	IF 1:250	Invitrogen
	Alexa Fluor® 546	Ziege	IF 1:250	Invitrogen
	Peroxidase	Ziege	WB 1:10 000	Dianova
α-Ratte	Alexa Fluor® 488	Ziege	IF 1:250	Invitrogen
	Alexa Fluor® 546	Ziege	IF 1:250	Invitrogen
	Peroxidase	Ziege	WB 1:10 000	Dianova
α-Ziege	Alexa Fluor® 546	Esel	IF 1:250	Invitrogen
	Peroxidase	Esel	WB 1:10 000	Dianova

### 2.1.14 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

DNA-Probenpuffer, 6x: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylene Cyanol  
15 % (v/v) Ficoll Type 400

DPBS / 9,5 mM MgCl<sub>2</sub>: 1 x PBS (siehe unten)  
9,5 mM MgCl<sub>2</sub>

DPBS / 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> / 0,8 M NaCl: 1 x PBS (siehe unten)  
9,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
800 mM NaCl

Laemmli-Probenpuffer, 1x: 50 mM Tris (pH 6,8)  
2 % (w/v) SDS  
20 % (v/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau  
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Laemmli-Probenpuffer, 5x: 250 mM Tris (pH 6,8)  
8 % (w/v) SDS  
0,2 % (w/v) Bromphenolblau  
30 % (v/v) Glycerin  
10% (v/v) β-Mercaptoethanol

Laemmli-Laufpuffer, 10x: 0,25 M Tris  
1,92 M Glycin  
1 % (w/v) SDS

Lösung B:  
(für SDS-PAGE nach Laemmli) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8  
0,4 % (w/v) SDS

## 2 Material und Methoden

---

Lösung C : (für SDS-PAGE nach Laemmli)	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
PBS, 10x, pH 7,4:	1,37 M NaCl 27 mM KCl 11,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 65 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ d}_2\text{H}_2\text{O}$
TAE-Puffer, 10x, pH 8,0: (für Agarosegele)	400 mM Tris 200 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Western Blot Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

## 2.2 Methoden

Grundlegende Methoden, die hier nicht näher aufgeführt oder nur kurz beschrieben sind, wurden nach Standardprotokollen (Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989), (Ausubel et al., 1994) durchgeführt. Dazu zählen:

- Anlegen von Bakterienkulturen in flüssigen und festen Kulturmedien
- Fragmentierung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Dephosphorylierung von Enden linearer DNA-Fragmente mit *Calf Intestinal Phosphatase*
- Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese
- Ligation von DNA-Fragmenten
- Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen
- Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE
- Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran (Western Blot)
- Proteinnachweis durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL)

Die Präparation von Plasmid-DNA (mini, midi bzw. maxi), Aufreinigung von PCR-Produkten und die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgten durch die entsprechenden Kits (siehe 2.1.2) gemäß den Herstellerangaben.

### 2.2.1 DNA-Manipulationen

Zum Studium des Kapsidproteins L2 humaner Papillomviren Typ 16 und 18 wurden Deletionen und Substitutionen ausgewählter Aminosäuren in die offenen Leserahmen der dazugehörigen Gene eingeführt. Alle DNA-Manipulationen wurden mit Hilfe von Oligonukleotidprimern und PCR (Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Dabei wurde in stets die *proof-reading* DNA-Polymerase *Pwo* (PeqLab) verwendet.

#### 2.2.1.1 DNA-Amplifikation von HPV16 L2-Konstrukten durch PCR (Mullis et al., 1986)

Als Matrize für die Amplifikation von HPV16 L2-Konstrukten unterschiedlicher Längen diente die vollständige, codonoptimierte DNA-Sequenz des Vektors pUF3 / hu16L2 (Leder et al., 2001). Zur anschließenden Klonierung in die Vektoren pUF3, pEGFP<sub>2</sub> (zweites EGFP über *Bgl* II und *EcoR* I einkloniert) oder pQE-GST enthielten die Primer-Paare entsprechende

Restriktionsschnittstellen (*Not* I und *Hind* III: pUF3; *Pst* I und *Bam*H I: pEGFP2; *Bam*H I und *Bgl* II: pQE-GST).

Folgender Ansatz wurde in dieser Arbeit verwendet:

Standardansatz für PCR:

- 10 - 200 ng Plasmid-DNA
- 100 ng *Forward*-Primer
- 100 ng *Reverse*-Primer
- 200 µM dNTP-Mix (Stratagene)
- 1 x PCR-Puffer, enthält MgSO<sub>4</sub>
- 1 Unit DNA-Polymerase *Pwo*

Die Standardreaktionsbedingungen sind in Tab. 2.11 aufgelistet.

Tab. 2.11: PCR-Reaktionsbedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Denaturierung	95°C	2 min	1
2. Denaturierung	95°C	1 min	} 30
3. Annealing	58-60°C	1 min	
4. Elongation	68°C	1 min/kb DNA	
5. Finale Elongation	68°C	10 min	1

### 2.2.1.2 Klonierung der PCR-Fragmente

Die PCR-Produkte aus 2.2.1.1 wurden mit Agarosegelen aufgetrennt. Die eluierten DNA-Banden wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben verdaut oder zunächst in den pCR®-Blunt II-Topo® Vektor kloniert und anschließend für die Umklonierung in den Zielvektor ausgeschnitten. Die Zielvektoren wurden ebenfalls mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut, mit Hilfe der Phosphatase CIP dephosphoryliert und gereinigt. Die Ligation der DNA-Fragmente in die Zielvektoren erfolgte über Nacht bei 16°C unter Verwendung der *T4*-Ligase. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte entsprechend der kodierten Antibiotikaresistenz auf LB-Agarplatten. Die Sequenzierung der Plasmide positiver Transformanten wurde von der Firma Genterprise durchgeführt.

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

Bei der ortsspezifischen Mutagenese werden zwei relativ lange (30-50 Basen), exakt komplementäre Primer, die die entsprechenden Basenaustausche im Idealfall mittig enthalten, zur Amplifikation des gesamten Plasmides verwendet. Die eingesetzten



Mutageneseprimer sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Für die Mutagenese-PCR wurde in dieser Arbeit folgender Ansatz verwendet:

Standardansatz Mutagenese-PCR:  
 10 - 15 ng Plasmid-DNA  
 100 ng Forward-Primer  
 100 ng Reverse-Primer  
 200 µM dNTP-Mix (Stratagene)  
 1x PCR-Puffer, enthält MgSO<sub>4</sub>  
 1 - 2 Units DNA-Polymerase *Pwo*

Die verwendeten Standardreaktionsbedingungen sind in der Tabelle 2.12 aufgelistet.

Tab. 2.12: PCR-Reaktionsbedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Denaturierung	95°C	2 min	1
2. Denaturierung	95°C	1 min	} 18
3. Annealing	50-55°C	1 min	
4. Elongation	68°C	2 min / kb DNA	
5. Finale Elongation	68°C	2 min / kb DNA + 3 min	1

Im Anschluss an die PCR-Reaktion erfolgt der Abbau der eingesetzten Ausgangs-DNA, die keine Mutation enthält, durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I. Standardmäßig wurde jeder Reaktionsansatz mit 1-2 µl Enzym für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem *Dpn* I-Verdau wurde die DNA in Bakterien transformiert (z.B. 3 µl DNA in 50µl NEB-5-alpha *E.coli*). Die selektierten, positiven Transformanten wurden zur Kontrolle sequenziert (Fa. Genterprise).

## 2.2.2 Expression von Proteinen in *E.Coli*

Als Expressionsvektor für Proteine in *E.coli* wurde in dieser Arbeit das Plasmid pQE-60 zusammen mit den *E.coli* Zellen M15[pREP4] der Firma Quiagen verwendet. Dieser Vektor liegt in der Zelle in niedriger Kopienzahl vor (ca. 10 Stück) und steht unter dem Einfluss eines IPTG-induzierbaren T5 Promotors, der von der *E.coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Durch die Koexpression des *lac*-Repressor-Proteins, das auf dem REP4-Plasmid kodiert wird, kann die Transkription bei nicht erfolgter Induktion effizient reguliert werden. Des Weiteren wird die MCS von pQE-60 C-terminal von der Sequenz für 6 Histidinreste flankiert. In dieser Arbeit wurde ein Derivat von pQE-60 verwendet, in welches die Sequenz für das GST-Protein über *Nco*I eingefügt wurde. Damit sind die L2-Fusionsproteine N-terminal von GST und C-terminal von dem 6xHis-Tag flankiert. Der Vorteil liegt in der möglichen

Doppelaufreinigung über GST und Nickel und in der Fähigkeit von GST zu dimerisieren. Ferner erhöht GST die Löslichkeit von in *E.coli* exprimierten Proteinen und reduziert damit die Bildung von Einschlusskörperchen.

Die Anzucht der pQE-GST-L2 Konstrukte in M15[pREP4] *E.coli* Zellen erfolgte mit TB-Medium (2.1.13) unter Zugabe von Ampicillin und Kanamycin.

### 2.2.2.1 *E.coli*-Anzucht und -Aufschluss im Großmaßstab

Für die *large-scale* Proteinexpression der GST-L2-6xHis Konstrukte in M15[pREP4] *E.coli* Zellen wurde zunächst eine Vorkultur von 250 ml TB<sub>Amp/Kan</sub>-Medium angeimpft und über Nacht bei 37° und 180 rpm inkubiert. Mit der kompletten Vorkultur wurde am nächsten Tag 1 Liter Hauptkultur angeimpft und bei 37°C, 180 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 1,6 erreicht wurde. Dann wurden 500 ml 4°C kaltes TB-Medium hinzugegeben und 30 min bei 23°C, 180 rpm inkubiert. Induziert wurde die Proteinexpression anschließend mit 1 mM IPTG für insgesamt 4 Stunden, 25°C, 180 rpm. Unmittelbar vor der Zellernte wurde 175 mg PMSF in 25 ml Ethanol zur Kultur zugegeben und die Zellen im GS3 Rotor bei 6000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in etwa 100 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris pH 7,5 / 200 mM NaCl / 5 mM MgCl<sub>2</sub> / 5 % (v/v) Glycerin / 1 mM PMSF / 10 µg/ml Aprotinin / 10 µg/ml Leupeptin) auf Eis resuspendiert und erneut bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei diesem Schritt entweder bei -80°C gelagert oder direkt aufgeschlossen. Es wurde darauf geachtet, dass alle Schritte ab diesem Zeitpunkt auf Eis bzw. bei 4°C erfolgten. Die pelletierten Zellen wurden in 60 ml kaltem Aufschlusspuffer resuspendiert, nach der Zugabe von 1 mg / ml Lysozym und 10 µg / ml DNase I für 20 min auf Eis inkubiert und mit Ultraschall behandelt (10 x 10 Sekunden, 30 % Leistung, Dauerschall, dicker Schallkopf, auf Eis). Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 % (v/v) Triton-X-100 und eine Inkubation von 30 min auf dem Taumler bei 4°C. Durch eine Zentrifugation von 10 min bei 5000 rpm und 4°C wurden Zelltrümmer und noch unaufgeschlossenes Material abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in SS34-Röhrchen überführt, im SS34-Rotor für 20 min bei 17.000 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -80°C für die anschließende Reinigung gelagert.

### 2.2.2.2 Reinigung der in *E.coli* exprimierten Proteine

Die Reinigung der in 2.2.1.2 gewonnenen GST-L2-6xHis-Fusionsproteine erfolgte über eine Metallchelate-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Superflow-Sepharose

Chromatographiesäulen (GE-Healthcare) und der Verwendung einer FPLC-Apparatur. Das Säulenvolumen betrug 1 ml und es wurden bereits gepackte Sepharosesäulen verwendet. Zu Beginn wurden die Säulen mit jeweils 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gewaschen, mit 0,5 ml 0,1M NiSO<sub>4</sub> beladen und erneut mit jeweils 5 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Entfernung von ungebundenem NiSO<sub>4</sub> wurden 5 Säulenvolumen Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 500 mM NaCl / 500 mM Imidazol) appliziert und die Säulen anschließend mit 10 Säulenvolumen Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 500 mM NaCl) äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 ml / min. Im Anschluss wurden die Säulen mit mindestens 15 Säulenvolumen Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 500 mM NaCl / 20 mM Imidazol) gewaschen und die Proteine in 5 Säulenvolumen eluiert (50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 500 mM NaCl / 500 mM Imidazol). Zur Langzeitlagerung der Säulen wurden diese mit jeweils 5 Säulenvolumen Stripppuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 500 mM NaCl / 0,05 M EDTA) äquilibriert, mit 10 Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gewaschen und in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

### 2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der in *E.coli* exprimierten und aufgereinigten GST-L2 Fusionskonstrukte erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays nach Herstellerangaben (Microassay Prozedur). Der Messbereich der verwendeten Methode lag zwischen 1,25 – 25 µg/ml. Die Proben wurden deshalb 1:2, 1:5 und 1:10 verdünnt eingesetzt und gemessen.

### 2.2.4 Kultivierung von Säugerzellen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Inkubationsschritte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in dafür vorgesehenen Brutschränken. Alle unter 2.1.9 aufgelisteten Zelllinien wurden als Einschicht-Kulturen in Plastik-Gewebekulturflaschen kultiviert.

Die Anzucht erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) unter Zusatz von 10 % (v/v) fötalem Rinderserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 1 % (v/v) nichtessentielle Aminosäuren (→ DMEM<sup>+</sup>). Das Medium für 293TT-Zellen enthielt zusätzlich 1 % (v/v) L-Glutamat. Die 293TT-Zellen wurden wöchentlich zusätzlich mit 200 µg/ml Hygromycin (Fa. Roth) bis zur nächsten Passage inkubiert. Für die Beseitigung von Mycoplasmen erfolgte die Kultivierung in DMEM<sup>+</sup> und 25 µg / ml Plasmocin (Amara).

Zum Passagieren wurden konfluente und adhärenzte Zellrasen mit PBS gewaschen, in Trypsin/EDTA vom Gefäßboden abgelöst (max. 5 min, 37°C) und abhängig vom Versuchsansatz im entsprechenden Medium verdünnt und weiter kultiviert.

Für die Langzeitlagerung von Zellen wurden von frisch aufgetauten und kultivierten Zelllinien Aliquots in 90 % (v/v) FCS / 10 % v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kryoröhrchen eingefroren. Die Kryoröhrchen wurden dabei zunächst für 2 Tage in mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen bei -80°C aufbewahrt und anschließend in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt.

### **2.2.5 DNA-Transfektion von Säugerzellen**

Die HPV16 oder -18 L2-Konstrukte in den Expressionsvektoren pUF3, pBHB-CMV oder pEGFP<sub>2</sub> wurden entweder über Lipofektion mit dem Lipofectamin 2000-Reagenz oder über Magnet-unterstützte Transfektion mit dem MATra-A-Reagenz nach Herstellerangaben in die Zellen eingebracht. Zur Verdünnung der DNA und Transfektionsreagenzien wurde Opti-MEM<sup>®</sup>-1 verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte grundsätzlich in DMEM<sup>+</sup> ohne Zusatz von Antibiotikum. Die Zellen wurden in entsprechender Verdünnung ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion 60-80 % konfluent waren.

### **2.2.6 Präparation von HPV-Pseudovirionen**

Pseudovirionen von HPV16 und HPV18 wurden nach einer von Chris Buck entwickelten Methode hergestellt (Buck et al., 2004; Buck et al., 2005a; Buck et al., 2005b). Dieses Protokoll ermöglicht die Gewinnung hoher Titer an Pseudovirionen, d.h. HPV L1/L2 Kapside, die ein Markerplasmid verpackt haben.

#### **2.2.6.1 Transfektion von 293TT-Zellen und Reifung der Pseudovirionen**

Für die Präparation von Pseudovirionen (PsV) wurden jeweils eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche 293TT-Zellen mit den codonoptimierten HPV16 oder -18 L1 und L2-Plasmiden sowie dem Markerplasmid pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS zusammen mit dem MATra-A-Reagenz nach Herstellerangaben in Opti-MEM<sup>®</sup>-1 verdünnt und kotransfiziert. Die Expression der Proteine erfolgte dann für 48 Stunden. Wenn notwendig wurden die Zellen nach 24 Stunden auf zwei 145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen aufgeteilt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde die GFP-Expression unter dem Mikroskop dokumentiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen abgelöst, in DPBS / 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, abzentrifugiert (1500 rpm / 5 min), das

Zellpellet in 400 µl DPBS / 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und in ein silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 0,5 % (v/v) Brij58 und 378 U Benzonase (Sigma, E1014) zugegeben und die Pseudovirionen für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch das Detergenz Brij58 werden Zellwände aufgelöst und die Benzonase baut freie, nicht verpackte DNA ab. Darüber hinaus ist die ausgedehnte Inkubationszeit essentiell für die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen L1-Molekülen benachbarter Kapsomere. (Buck et al., 2005b). Nach dieser Reifung wurden die Proben 5 min auf Eis abgekühlt, mit NaCl in einer Endkonzentration von 850 mM versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 3500 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Pseudovirionen enthielt, wurde vom Pellet getrennt und in ein neues silikonisiertes Eppendorfgefäß überführt. Dieses Lysat wurde sofort auf einen OptiPrep-Gradienten geladen oder für kurze Zeit bei 4°C gelagert.

### 2.2.6.2 Reinigung der Pseudovirionen

Durch die Verwendung von OptiPrep (Sigma), eine 60 %ige (w/v) Iodxanollösung in Wasser zur Herstellung von Stufengradienten, wird eine gute Trennung der Pseudovirionen von Zellkomponenten und eine partielle Trennung von leeren Kapsiden erreicht. Aus der 60%igen OptiPrep-Lösung wurden mit DPBS / 9,5 mM MgCl<sub>2</sub> / 0,8 M NaCl Lösungen von 27%, 30% und 39% OptiPrep hergestellt und in SW60-Röhrchen geschichtet (1,2 ml 39 % → 1,2 ml 33 % → 1,2 ml 27 %). Dieser Stufengradient diffundiert für 2 Stunden bei RT und konnte anschließend mit dem geklärten Lysat (max. 750 µl) überschichtet werden. Zur Auftrennung wurde eine Ultrazentrifugation für 3,5 Stunden im SW60-Rotor bei 48.000 rpm und 16°C durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte durch vorsichtiges Abnehmen in jeweils 300 µl Schritten.

Die Peakfraktionen (2-3 Stück) wurden durch einen Infektionsassay (siehe 2.2.7) ermittelt, vereint, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Pseudovirionen bei 4°C aufbewahrt. Der Einbau von L1 und L2 in die Kapsidstruktur wurde durch SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot und Chemilumineszenz nachgewiesen.

### 2.2.7 Infektionsassay

Der Infektionsassay simuliert einen natürlichen Aufnahmeweg der Pseudovirionen. Kommt es zu einer Blockierung der Infektion wird die Expression des verpackten Markerplasmides pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS verhindert.

Für diesen Assay wurden 293TT-Zellen in 24 well-Kulturplatten ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % mit 1 µl der PsV-Präparation infiziert. Nach 48-72 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Zahl der Infektionseinheiten, d. h. die Zellen mit einer grünen Kernfluoreszenz, entweder per FACS (2.2.15) ausgewertet oder unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskopes manuell ausgezählt.

### 2.2.8 Nativer Heparin-BSA-ELISA

Die Verwendung eines nativen Heparin-BSA-ELISA gab Auskunft über die Menge an intakten und bindungsfähigen HPV-Kapsiden unterschiedlicher PsV-Präparationen.

ELISA-Platten (96-well) wurden mit 200 ng / well Heparin-BSA in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet (50 µl / well). Anschließend wurden die Platten dreimal mit jeweils 300 µl / well PBS / 0,1 % (v/v) Tween-20 (PBST) gewaschen und freie Bindestellen pro well mit 350 µl PBST / 50µg/ml BSA für 1 Stunde bei RT abgesättigt. Die Platten wurden erneut dreimal mit PBST gewaschen, die PsV-Präparationen in PBST verdünnt (1:50 bis 1:3200) und direkt an die beschichteten ELISA-Platten gekoppelt (50 µl / well). Als Negativkontrolle diente PBST. Nach 1 ½ Stunden Inkubation bei 37°C in der Feuchtkammer wurden ungebundene Pseudovirionen durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend erfolgte für eine Stunde bei 37°C in der Feuchtkammer die Inkubation des monoklonalen Primärantikörpers 16L1-58c (1:1000 in PBST; 50 µl / well). Nach erneutem Waschen wurde Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper gegen Maus IgG (1:5000 in PBST; 50 µl / well) zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C in der Feuchtkammer wurden die Platten gewaschen und mit TMB (50 µl / well) die Farbreaktion induziert. Abhängig von der Farbtintensität wurde die Reaktion nach 8-15 min durch 1N HCL (50 µl / well) abgestoppt und die Extinktion anschließend im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet.

### 2.2.9 Quantitative *Real-Time* PCR

Eine weitere Methode zur Quantifizierung der PsV-Präparation ist die Bestimmung der Menge von verpackter Markerplasmid-DNA mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR. Die quantitative *Real-Time* PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der DNA-Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen am Ende eines jeden Zykluses bietet. Zur Quantifizierung wurde in dieser Arbeit eine TaqMan<sup>®</sup>-Hydrolysesonde eingesetzt, die spezifisch an die DNA bindet und an ihrem einen Ende mit dem Akzeptor- (Quencher), an ihrem anderen Ende mit dem Donorfluoreszenzfarbstoff markiert wird (Double-dye-Oligos).

Die 5'3'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zerschneidet die doppelt markierte Sonde, dabei wird das Donorfluorochrom am 5'Ende freigesetzt und dessen Emission der Wellenlänge E1 kann gemessen werden. Der *Cycler* stellt die gemessene Donorfluoreszenz am Monitor grafisch dar und die hierbei entstehende Kurve zeigt typischerweise drei Abschnitte. In der ersten Phase übersteigt die Reporterfluoreszenz noch nicht die Hintergrundfluoreszenz. Sobald aber genügend Sonde hydrolysiert wurde, steigt die Reporterfluoreszenz exponentiell an. Sie endet mit der Plateauphase, wenn die Reaktion zum Stillstand kommt. Zur Quantifizierung wird der  $C_T$ -Wert ermittelt, der auch als Schwellenwert-Zyklus bezeichnet werden kann. Dieser Wert gibt an, bei welchem Zyklus die Reporterfluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und ist umgekehrt proportional zur Ausgangsmenge der DNA.

### 2.2.9.1 Gewinnung der verpackten Markerplasmid-DNA aus Pseudovirionen

Pseudovirionen wurden 1:10 in Aufschlusspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,0 / 1 mM EDTA / 1 % Triton X-100 / 0,04 % Proteinase K) verdünnt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Endvolumen betrug dabei 30 µl. Zur anschließenden Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt. Die Isolierung und Reinigung der freigesetzten Markerplasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *Pure Cycle Kits* von PeqLab nach Herstellerangaben.

### 2.2.9.2 Amplifikation und Quantifizierung der Markerplasmid-DNA

Bei der Marker-DNA handelt es sich um die in Pseudovirionen verpackte Plasmid-DNA pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS.

Zur Quantifizierung dieser DNA wurde folgender Ansatz verwendet:

#### Ansatz für die quantitative *Real-Time* PCR

- 25 µl 2 x Mastermix (Gene Expression, Applied Biosystem)
- 400 nM pEGFP *Forward*-Primer [Stock: 10 µM]
- 400 nM pEGFP *Revers*-Primer [Stock 10 µM]
- 200 nM pEGFP-YFP-DsRed Sonde {Stock 10 µM}
- 5 µl Template (isolierte Markerplasmid-DNA)
- ad 50 µl H<sub>2</sub>O Bidest (steril, RNase- und DNase-frei)

Jede Probe wurde doppelt bestimmt und mit dem GFP-Standard verglichen, der in jeder qRT-PCR mitgeführt wurde. Als Standard-DNA wurde die Plasmid-DNA pEGFP-33L1NLS in

den Konzentrationen 10 ng /  $\mu\text{l}$ , 1 ng /  $\mu\text{l}$ , 100 pg /  $\mu\text{l}$ , 10 pg /  $\mu\text{l}$  und 1 pg /  $\mu\text{l}$  jeweils als Doppelansatz eingesetzt.

Die PCR-Reaktion und anschließende Auswertung wurde in dem *Cycler „Applied Biosystem 7300 real-Time PCR System“* durchgeführt. Das dabei verwendete Standardprogramm von Applied Biosystem für TaqMan<sup>®</sup>-Hydrolysesonden ist in Tab. 2.13 aufgelistet.

**Tab. 2.13: qRT-PCR Programm.** Es wurde das Standard 7300 Mode Programm für TaqMan<sup>®</sup>-Hydrolysesonden von Applied Biosystem verwendet. Die Sammlung der Daten erfolgte nach Ende eines jeden Zykluses.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1.	50°C	2 min	1
2.	95°C	10 min	1
3.	95°C	15 sek	40
	60°C	1 min	

## 2.2.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Zellen auf Deckgläschen in 12-well Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Deckgläschen wurden während den gesamten Arbeitsschritten bis zum Einbetten der Zellen in den 12-well Platten belassen. Im subkonfluenten Zustand erfolgte die Transfektion der Zellen mit den entsprechenden L2- oder GFP-L2-Plasmiden und anschließend eine 24-stündige Inkubation bei 37°C.

### 2.2.10.1 Fixierung der Zellen

Zur Fixierung wurden die Zellen entweder mit PBS gewaschen, 20 min mit Methanol / 0,02M EGTA pH 7,5 bei -20°C fixiert sowie gleichzeitig permeabilisiert und anschließend dreimal gewaschen. Alternativ wurden die in PBS gewaschenen Zellen bei 4°C mit 2-4 % (w/v) Paraformaldehyd (in PBS) für 15 min fixiert, anschließend mit 0,2 % (v/v) Triton-X-100 für 2 min permeabilisiert und nachfolgend dreimal mit PBS für insgesamt 10 min gewaschen. Die zweite Methode wurde hauptsächlich für Färbungen in Kombination mit transfizierten GFP-Plasmiden verwendet, um ein Verblässen der GFP-Expression zu verhindern.

### 2.2.10.2 Immunfluoreszenzfärbung

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1 % (w/v) BSA in PBS blockiert (30 min; RT). Primäre Antikörper wurden je Deckgläschen in 40  $\mu\text{l}$  PBS / 1% BSA entsprechend verdünnt



eingesetzt (siehe Tabelle 2.9) und für 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden nichtgebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen (insgesamt 20 min) mit PBS entfernt und die Zellen nochmals für 10 min in PBS / 1 % (w/v) BSA bei RT blockiert. Die sekundären Antikörper wurden ebenfalls in 40 µl PBS / 1 % (w/v) BSA verdünnt (siehe Tabelle 2.10), auf die Zellen getropft und für 60 min bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch mehrmaliges waschen in PBS / 1 % (w/v) BSA (10 min) und PBS (20 min) entfernt. Bei Doppel- oder Trippelfärbungen wurden die primären bzw. sekundären Antikörper jeweils vor dem Auftropfen in den 40µl Ansätzen gemischt und folglich gemeinsam inkubiert.

Bei erwünschter Kernfärbung wurde dem sekundären Antikörperansatz 0,3 µl des Farbstoffes Hoechst33342 (Bisbenzimid; Sigma) zugegeben.

Nach gründlichem Waschen wurden die Deckgläschen kurz getrocknet und sofort in *Fluoprep* (bioMèrieux) eingebettet. Die so behandelten Präparate konnten abgedunkelt bei 4°C gelagert werden. Die Dokumentation erfolgte am Fluoreszenzmikroskop wie unter 2.2.12 beschrieben.

### 2.2.11 Import von Proteinen in permeabilisierten Zellen

Bei dieser Art von Assay wird selektiv die Zytoplasmamembran von Zellen mit Digitonin permeabilisiert und das Zytoplasma depletiert. Dabei bleibt die Kernmembran intakt. Durch die externe Applikation von Importfaktoren kann gezielt der Kernimport von Fluoreszenzmarkierten Proteinen untersucht werden. Der Assay wurde in Anlehnung an Protokollen des Labors von U. Kutay an der ETH Zürich durchgeführt (Mühlhäusser et al., 2001)

#### 2.2.11.1 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die GST-L2 Fusionsproteine wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und so im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Dazu wurde der Farbstoff Alexa 488 an C5-Maleimide-gekoppelt verwendet (Molecular Probes / Invitrogen). Das Verhältnis von Protein zu Farbstoff betrug dabei 1 : 1,1 µM. Die Konzentration des Farbstoffes als Stocklösung betrug 10 mM. 50 µM Proteinlösung (in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 / 200 mM NaCl) wurden mit 55 µM Farbstoff über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend zum Entfernen von überschüssigem Farbstoff über eine illustra™NAP-5 Säule aus G-25 Sephadex (GE-Healthcare) gereinigt. Dazu wurde die Säule mit 10 ml kaltem Austauschpuffer (50 mM HEPES-KOH pH 7,5 / 150 mM KoAc / 1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> / 0,5 mM EGTA) äquilibriert, die Probe aufgetragen und diese mit 1 ml Austauschpuffer wieder eluiert. Von den gesammelten

Fractionen à 50 µl wurden jeweils 1 µl auf eine Nitrocellulosemembran aufgetropft und mit Ponceau gefärbt. Die Peakfraktionen wurden vereint und bei -80°C gelagert.

### 2.2.11.2 Zellpermeabilisierung

HeLa-Zellen wurden in 10cm Kulturschalen, belegt mit 12 mm Deckgläschen, ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Die Zellen wurden auf Eis gestellt und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden 25 ml Permeabilisierungspuffer (20 mM HEPES-KOH pH 7,5 / 110 mM KoAc / 5 mM MgAc / 250 mM Saccharose) mit 10 µl einer 5 %igen (v/v) Digitonin Stocklösung versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5 min unter regelmäßigem Schwenken auf Eis inkubiert und im Anschluss 3 x 5 min mit Permeabilisierungspuffer (ohne Digitonin) gewaschen. Die Deckgläschen wurden aus der Schale genommen und direkt für den Importassay verwendet.

### 2.2.11.3 Importassay

Das Reaktionsvolumen für den Importassay auf den 12 mm Deckgläschen betrug jeweils 20 µl. Standardmäßig wurde folgender Ansatz verwendet:

Standardansatz für Import Assay:

- 2 µl Fluoreszenz-markiertes Protein (40 µM Stock)
- 5 µl Reticulozytenlysat
- 2 µl 20facher Energiemix
- 2 µl 20facher Ran-Mix
- 8 µl Importpuffer

Der Importpuffer bestand aus 50 mM HEPES-KOH pH 7,5 / 150 mM KoAc / 1 mM MgAc / 0,5 mM EGTA / 250 mM Saccharose. Energiemix (20x): 1 mM ATP, 1 mM GTP, 20 mM Keratininphosphat / 50 µg/ml Keratininkinase / 0,1 U/µl Apyrase. Ran-Mix (20x): 3 mM Ran-GTP / 0,3 µM NTF2 / 0,3 µM RanBP1 / 0,2 µM Rna1p. Sowohl der Energie- als auch der Ran-Mix wurde freundlicherweise von U. Kutay (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt.

Als Negativkontrolle diente das gleiche Reaktionsvolumen mit 18 µl Importpuffer + 2 µl fluoreszenzmarkiertem Protein.

Der Reaktionsansatz wurde auf das Deckgläschen mit den permeabilisierten Zellen gegeben, 7-10 min bei RT feucht inkubiert, kurz mit PBS abgespült, in 2 % (v/v) Paraformaldehyd fixiert (10 min, 4°C), erneut in PBS gewaschen und in FluoPrep (bioMérieux) eingebettet. Die Dokumentation erfolgte am Fluoreszenzmikroskop wie unter 2.2.12 beschrieben.

## 2.2.12 Mikroskopische Dokumentation

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200 M-Mikroskop und einer Zeiss Axiocam Digitalkamera bei einer 100fachen Vergrößerung erstellt. Die Darstellung und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Axiovision Software 3.0.

## 2.2.13 GST-Bindungsassay

Für die Identifikation von Interaktionspartnern mit HPV16 L2 wurden entsprechende in 2.2.2 hergestellte GST-L2 Fusionskonstrukte an Glutathion-Sepharose immobilisiert, mit HeLa-Zelllysate inkubiert und eventuell gebundene Proteine durch Westernblotting und anschließender Immunodetektion analysiert.

### 2.2.13.1 Präparation des HeLa-Zelllysates

Ein HeLa-Zellpellet aus  $5 \times 10^9$  Zellen wurde zunächst mit 10 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM KoAc, 2 mM  $MgCl_2$ , Proteaseinhibitor Cocktail *Complete* von Roche) resuspendiert und mit 20 ml Aufschlusspuffer (+ 1,2 ml 5 % (w/v) Digitonin) aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde im Homogenisator aufgeschlossen, 10 min bei 4500 rpm, 4°C zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Im Anschluss wurde das Pellet erneut in 15 ml Aufschlusspuffer (+ 450  $\mu$ l 5 % (w/v) Digitonin) resuspendiert, im Homogenisator aufgeschlossen und 10 min bei 4500 rpm, 4°C zentrifugiert. Dieser zweite Überstand wurde mit dem ersten vereint, 1 h bei 50k ultrazentrifugiert und anschließend mit 250 mM Saccharose versetzt in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.2.13.2 Bindungsassay

Zunächst wurde die entsprechende Menge an 50 %iger Glutathion-Sepharose mit Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 5 % (v/v) Glycerin, Proteaseinhibitor Cocktail *Complete* von Roche) äquilibriert. Zum Abzentrifugieren der Sepharose wurden die Proben in allen nachfolgenden Schritten 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Die in 2.2.2 hergestellten und gereinigten GST-L2 Fusionsproteine wurden mit einer Konzentration von 2  $\mu$ g /  $\mu$ l Glutathion-Sepharose in Bindungspuffer verdünnt an die Sepharose gekoppelt. Dazu wurden die Proben 2 h auf einem Überkopftaumler bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die gekoppelten Sepharoseproben dreimal mit einem Überschuss an Bindungspuffer gewaschen und jeweils 50  $\mu$ l mit 350  $\mu$ l des präparierten

HeLa-Zellysates (2.2.13.1) für 4 h bei 4°C auf einem Überkopftaumler inkubiert. Die Proben wurden anschließend dreimal mit jeweils 500-800 µl Bindungspuffer (+0,1 % (v/v) Tween-20) gewaschen, in 1 x Laemmli-Probenpuffer aufgekocht und die Sepharose-freien Überstände auf einem SDS-PAGE aufgetrennt. Durch den anschließenden Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran und die Immunodetektion mit den entsprechenden Antikörpern konnte die Bindung der GST-L2 Fusionsproteine mit Proteinen aus dem HeLa-Zellysate untersucht werden.

### 2.2.14 siRNA-Technologie

Das in dieser Arbeit angewandte RNAi-System zur spezifischen Depletion von mRNA basiert auf bereits hybridisierten RNA-Oligonukleotiden, die chemisch synthetisiert wurden (Santa Cruz, Sigma, Qiagen). Alle verwendeten siRNAs sind in Tab. 2.7 aufgelistet. Wenn möglich wurden 2-3 spezifische siRNAs gegen jede Ziel-mRNA verwendet, um damit eine hohe Spezifität und Sensitivität zu gewährleisten.

#### 2.2.14.1 Transfektion der siRNA

Die Transfektion von doppelsträngiger siRNA erfolgte durch Lipofektion der zu 60 % konfluenten Zellen mit dem RNAi-Max-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Zur Verdünnung der siRNA und dem RNAi-Max-Reagenz wurde Opti-MEM<sup>®</sup>-1 verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM<sup>+</sup> ohne den Zusatz von Antibiotikum (siehe 2.2.4). Die lyophilisierten siRNAs wurden in RNase-freiem, doppelt destilliertem Wasser (Fa. Roth) als 20 µM Stock gelöst, die Endkonzentration der transfizierten siRNAs betrug 30 nM (in Opti-MEM<sup>®</sup>-1 verdünnt). Als Kontrolle wurde in jedem Versuchsansatz eine unspezifische siRNA kotransfiziert (Sigma). Die anschließende Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Überprüft wurde die verringerte Proteinexpression der entsprechenden Gene im Vergleich mit Kontroll-siRNA-transfizierten Proben durch Auftrennung des gesamten Zellysates im SDS-PAGE und anschließender Immunoblotfärbung.

Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen für weitere Untersuchungen z.B. für einen Infektionsassay mit Pseudovirionen infiziert (293TT-Zellen) oder für Immunfluoreszenzfärbungen mit HPV 16L2-Konstrukten transfiziert (Hela-Zellen).

### 2.2.15 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie, oftmals auch als FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) bezeichnet, dient der Analyse von Einzelzellen in Suspension. Es lassen sich gleichzeitig Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften bestimmen. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf einer simultanen Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften von Zellen, wenn diese im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl passieren. Die Zellen streuen einen Teil des Lichtes, welches mit Hilfe von Detektoren nachgewiesen wird. Dabei korreliert die Menge des gestreuten Lichtes mit der Größe der Zellen und deren Komplexität. Durch den Einsatz eines Argonlasers können darüber hinaus Fluoreszenzen angeregt und registriert werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode zur Bestimmung der Intensität einer GFP-Expression in transfizierten oder mit PsV infizierten Zellen eingesetzt. Dazu wurde das Medium von den Zellen in 24-well Zellkulturschalen abgesaugt, die Zellen je well in 0,5 ml PBS / 2,5 mM EDTA bei 37°C abgelöst und in 1 ml DMEM resuspendiert. 0,5 ml dieser Suspension wurden in FACS-Röhrchen überführt, mit 2 ml PBS aufgefüllt und 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Pellet in der Restflüssigkeit durch kräftiges vortexen resuspendiert, mit 0,5 ml 4°C kaltem PBS aufgefüllt und die Röhrchen auf Eis gestellt. Direkt vor der Messung wurde die Suspension erneut gut resuspendiert. Zur Messung wurde die Software *CellQuest* verwendet. In der FSC/SSC-Ansicht wurde die Hauptzellpopulation eingegrenzt. Die Messung erfolgte bei 10.000 Zellen (*Events*).

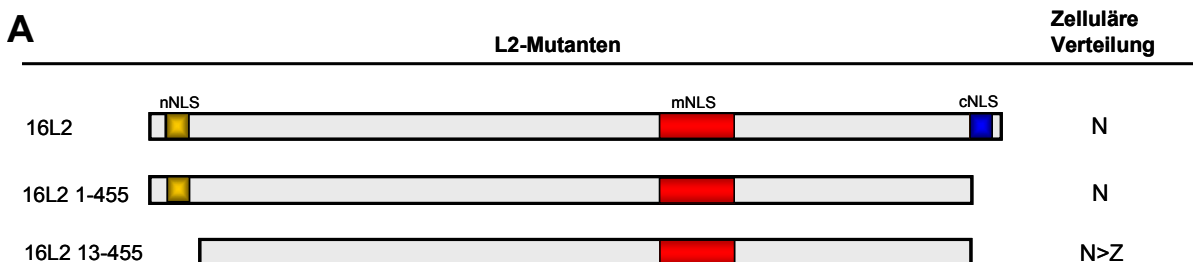
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kernlokalisierungssignale in HPV16 L2

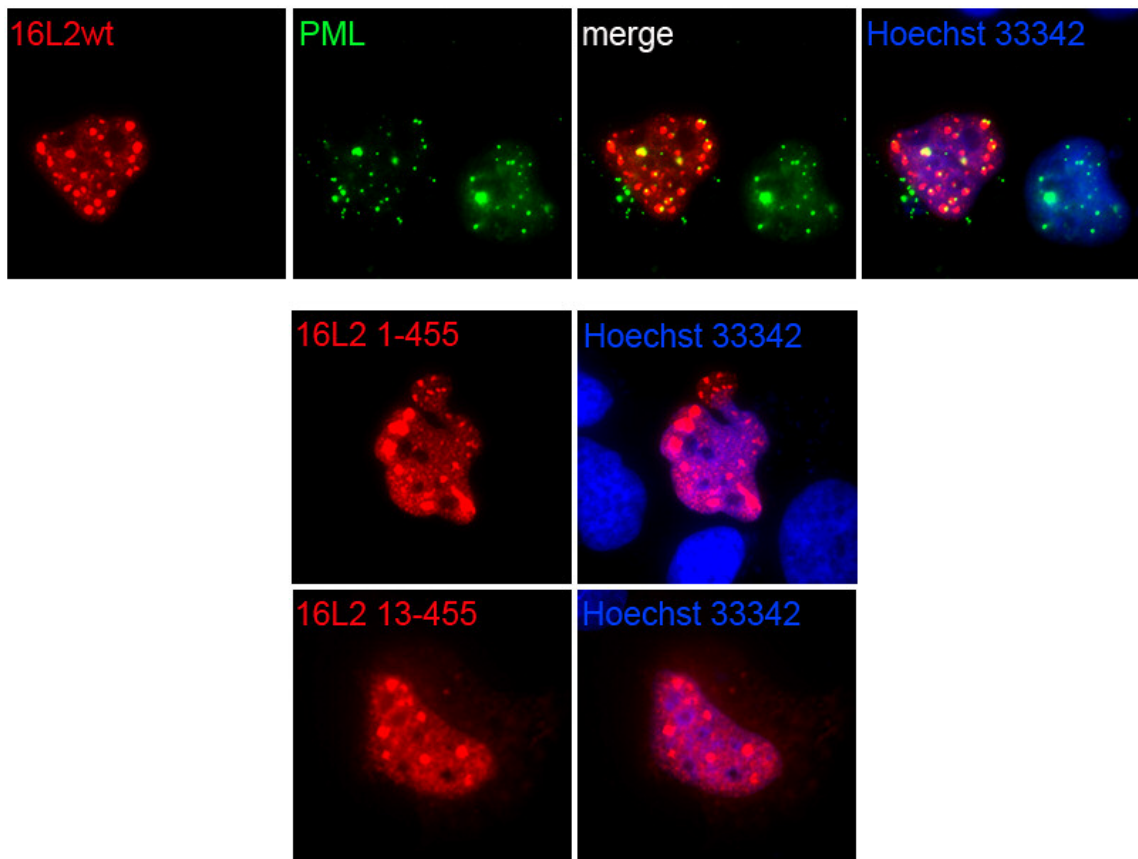
Das Kapsidprotein L2 humaner Papillomviren muss sowohl während der Infektion als auch bei der Morphogenese die Barriere der Kernmembran überwinden. Trotz intensiver Untersuchungen konnte noch nicht hinreichend geklärt werden, welcher Bereich in L2 während Infektion oder Virusmorphogenese für diesen Kernimport verantwortlich ist.

#### 3.1.1 Einfluss der n- und cNLS auf die Lokalisation von HPV16 L2

Das minore Kapsidprotein L2 besitzt an seinem N- und an seinem C-Terminus kurze basische Sequenzen. Diese Bereiche weisen Merkmale von klassischen Kernlokalisierungssignalen (NLS) auf und werden in der Literatur als n- und cNLS bezeichnet. Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Einfluss dieser beiden Regionen auf die intrazelluläre Verteilung von HPV16 L2 analysiert. Dazu wurden zwei Deletionsmutanten von HPV16 L2 generiert (Abb. 3.1 A). Bei der ersten Mutante wurde lediglich der C-Terminus mit seiner cNLS abgespalten (16L2 1-454). Der zweiten Mutante wurde sowohl der N- als auch der C-Terminus und damit beide potentiellen Kernlokalisierungssignale entfernt (16L2 13-455). Nach der Transfektion von HeLa-Zellen mit Expressionsplasmiden lokalisierte 16L2wt ausschließlich im Kern und akkumulierte dort in Form von charakteristischen Aggregaten an PML, dem Hauptbestandteil der Nukleären Domänen 10 (ND10) (Abb. 3.1 B). Fehlt der C-Terminus und damit die cNLS, wird L2 trotzdem immer noch vollständig in den Kern importiert (Abb. 3.1 B, 16L2 1-455). Die Deletionsmutante 16L2 13-455, der beide terminalen, basischen Bereiche entfernt wurden, war ebenfalls zum großen Teil im Kern an den ND 10 lokalisiert. Sie zeigte aber im Vergleich zu L2wt und L2 1/454 eine leichte Retention im Zytoplasma (Abb. 3.1.B). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es einen weiteren Bereich in L2 geben muss, der das Protein in den Kern dirigiert.



B



**Abb. 3.1: Untersuchungen zum Kernimport von  $\Delta$ NLS und  $\Delta$ CNLS L2-Mutanten.**

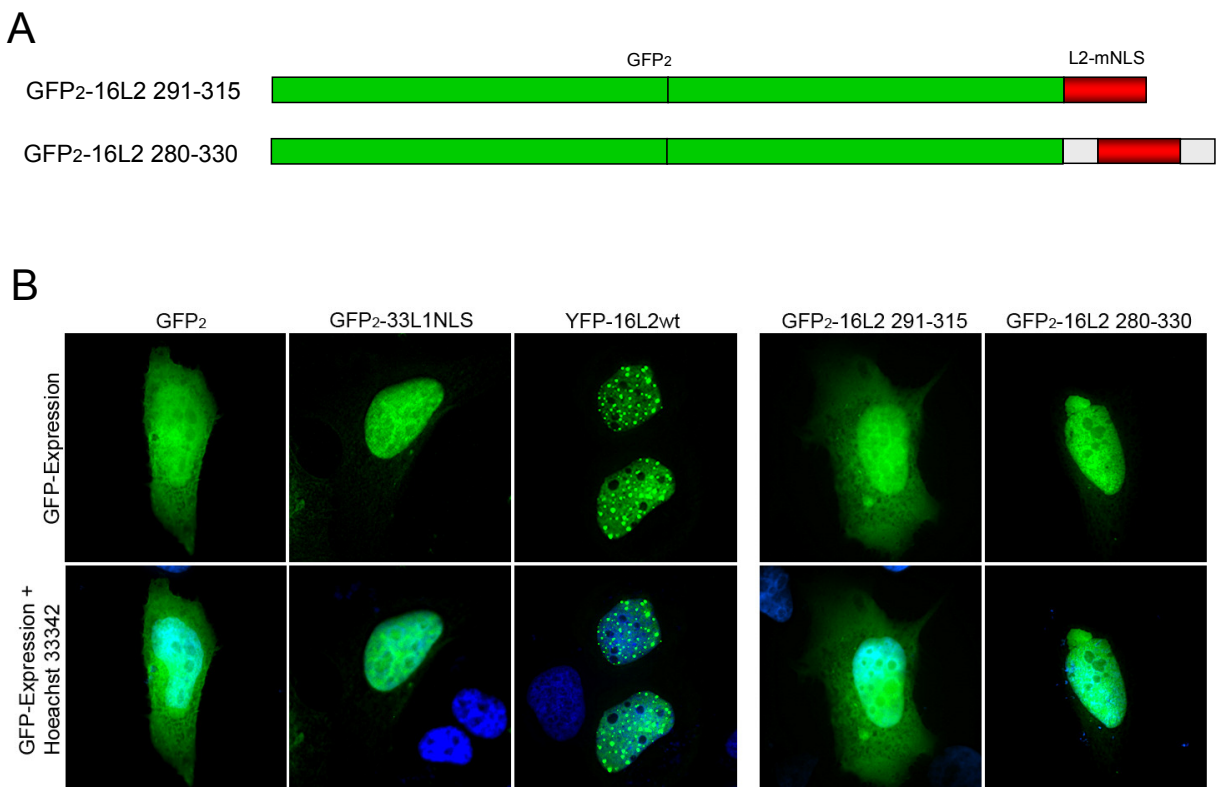
- (A) Schema der L2-Deletionsmutanten mit Angabe der intrazellulären Verteilung. Angegeben sind die jeweils ersten und letzten im Konstrukt noch vorhandenen Aminosäuren und die Lage der potentiellen Kernlokalisationsignale. NLS: Kernlokalisationsignal; N: Nukleus, Z: Zytoplasma.
- (B) HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pUF16L2wt, pUF16L2 1-455 oder pUF16L2 13/455 transient transfiziert und nach 24 h Inkubation die Lokalisation von L2 durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 33L2-1 nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Höchst 33342 gefärbt.

### 3.1.2 Einfluss des mNLS auf die Lokalisation eines zytoplasmatischen Reporterproteins

Neben den beiden terminalen, potentiellen NLS existiert eine mittlere, ausgedehnt basische Region, deren Deletion die intrazelluläre Verteilung von L2 beeinflusst (Becker et al., 2003; Sun et al., 1995). Die Fusion dieses Abschnittes von L2 mit dem zytoplasmatischen Reporterprotein GFP sollten Hinweise auf eine Funktion dieser Region als NLS liefern. Dazu wurden L2-Sequenzen von unterschiedlicher Länge mittels PCR amplifiziert und an ein dimeres GFP<sub>2</sub> fusioniert (Abb. 3.2 (A)). Dieses GFP<sub>2</sub>-Plasmid ist ein Derivat des pEGFP-C1 Vektors, dem über die *Bgl* II / *Eco*R I Schnittstelle ein zweites GFP kloniert wurde. Das Konstrukt GFP<sub>2</sub>-16L2 291-315 umfasst exakt den Bereich der zentralen, basischen Region von L2. Das zweite Konstrukt GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 enthält zusätzlich flankierende Sequenzen. Abb. 3.2 (B) zeigt die diffuse intrazelluläre Verteilung von GFP<sub>2</sub>. Die Fusion von

GFP<sub>2</sub> mit der klassischen NLS von HPV33 L1 führte zu einer deutlichen Veränderung des Phänotyps. Der Hauptanteil der GFP-Fluoreszenz war jetzt im Zellkern zu finden. Als zweite Positivkontrolle diente das Konstrukt YFP-16L2. Die Fusion der vollständigen L2-Sequenz mit YFP (*Yellow Fluorescence Proteine*) führte ebenfalls zu einer kompletten Kernlokalisation des Reporterproteins. Darüber hinaus konnte die charakteristische, punktartige Assoziation mit Kernstrukturen beobachtet werden.

Die Fusion von 16L2 280-330 an GFP<sub>2</sub> zeigte eine mit den 2 Positivkontrollen vergleichbare Kernlokalisation. Das Fehlen der flankierenden Sequenzen in 16L2 291-315 führte jedoch zu einer leichten Einschränkung des Kernimportes und damit zu einer etwas diffuseren Verteilung der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle.



**Abb. 3.2: Untersuchungen der intrazellulären Verteilung von GFP<sub>2</sub>-L2 Fusionskonstrukten.** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für die entsprechenden GFP- oder YFP-Fusionskonstrukte transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert, der Zellkern mit Höchst 33342 gefärbt und die Fluoreszenz der GFP- und YFP-Konstrukte im Mikroskop detektiert.

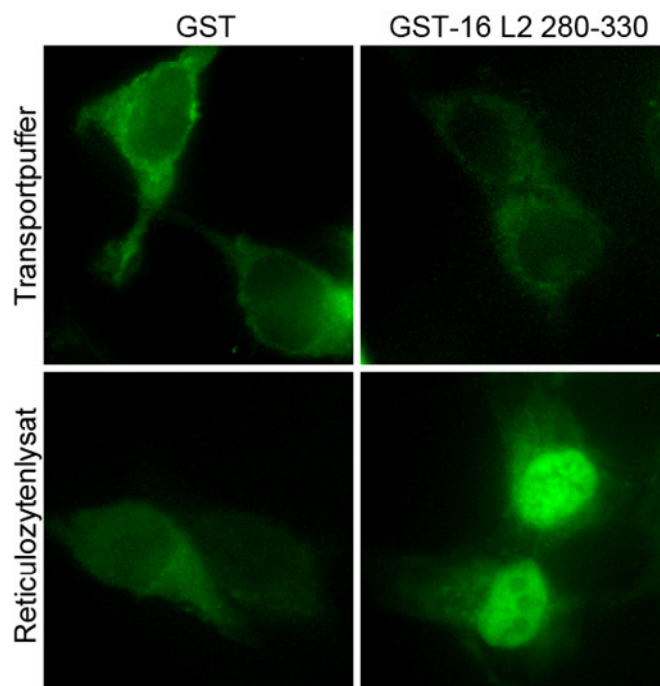
Der L2 280-330 vermittelte Import wurde ebenfalls in Zytosol-depletierten Zellen untersucht. In diesem Importassay wird durch Digitonin selektiv die Zellmembran permeabilisiert und das Zytosol mit seinen Transportfaktoren heraus gewaschen. Die Kernmembran bleibt dabei intakt. Durch die externe Applikation von Transportfaktoren ist es möglich, den Kernimport eines Proteins zu untersuchen (Adam, Marr, and Gerace, 1990).

Die Aminosäuresequenz 280-330 von HVP16 L2 wurde N-Terminal mit GST und C-Terminal mit einem His-Tag fusioniert. Dieses Fusionskonstrukt wurde anschließend in *E.coli*



exprimiert, über den His-Tag aufgereinigt und mit Alexa-488 Fluoreszenz-markiert. Als Quelle von externen Transportfaktoren diente das Reticulozytenlysat von Kaninchen. Ohne die Applikation von externem Lysat war GST-L2 280-330 nicht in der Lage im Kern zu akkumulieren (Abb. 3.3) Erst durch die Zugabe von löslichen Transportrezeptoren (Reticulozytenlysat) konnte das Fusionskonstrukt in den Zellkern transportiert werden. Im Gegensatz dazu blieb das GST-Protein auch nach der Zugabe von Lysat im Zytoplasma und wurde nicht in den Zellkern importiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die zentrale Region von HPV16 L2 zusammen mit flankierenden Sequenzen durchaus in der Lage ist den Kernimport eines zytoplasmatischen Proteins zu dirigieren.



**Abb. 3.3: Untersuchung des Kernimportes von GST-16L2 280-330 in permeabilisierten Zellen.** Die Zellmembran von HeLa-Zellen wurde 5 min mit Digitonin permeabilisiert und die Zellen anschließend 15 min mit Transportpuffer gewaschen. Die Importreaktion von Alexa-488-markiertem GST (Negativkontrolle) und Alexa-488-markiertem GST-16L2 280/330 erfolgte entweder nur mit Transportpuffer oder Transportpuffer und Reticulozytenlysat für 7 min. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation der Fluoreszenz-markierten Konstrukte im Mikroskop detektiert.

## 3.2 Charakterisierung der mNLS-Aminosäuresequenz von HPV L2

### 3.2.1 Phylogenetischer Vergleich der mNLS

Kernlokalisierungssignale zeichnen sich in aller Regel durch einen hohen Anteil von basischen Aminosäuren aus (Arginine oder Lysine) (Fried and Kutay, 2003). Die Analyse der Sequenz in HPV16 zeigt, dass der Bereich von Aminosäure 291 bis 315 eine vergleichsweise hohe

Anzahl an Argininen besitzt. In der 24 Aminosäuren umfassenden Sequenz sind 7 Arginine und 1 Lysin enthalten (Abb. 3.4).

Ein phylogenetischer Vergleich dieser Aminosäuresequenz in L2 von verschiedenen HPV-Typen zeigt zudem einen außerordentlich hohen Konservierungsgrad (Abb. 3.4). Für den Vergleich wurde der mNLS-Bereich mit flankierenden Sequenzen ausgewählt, der dem von Aminosäure 280-330 in HPV16 L2 entspricht. Als HPV-Typen wurden unter anderem die genitalen Niedrigrisikotypen HPV6 und -11, sowie die Hochrisikotypen HPV16, -18, -33, -39, -42, -45 und -51 ausgesucht.

Arginine in HPV16 L2 an Position 291, 302, 305 und 315 sowie ein Lysin an Position 309 sind zu 100% konserviert. Die beiden Arginine an Position 297 und 298 sind zu 80% konserviert. Desweiteren fällt bei der Analyse auf, dass ein Großteil der basischen Aminosäuren von ebenfalls hoch konservierten Threoninen (Position 295, 311, 314) und Serinen (Position 296, 304, 316) flankiert wird. Alle hier aufgeführten Aminosäuren sind Teil der Konsensussequenz und sind möglicherweise von besonderer Bedeutung.

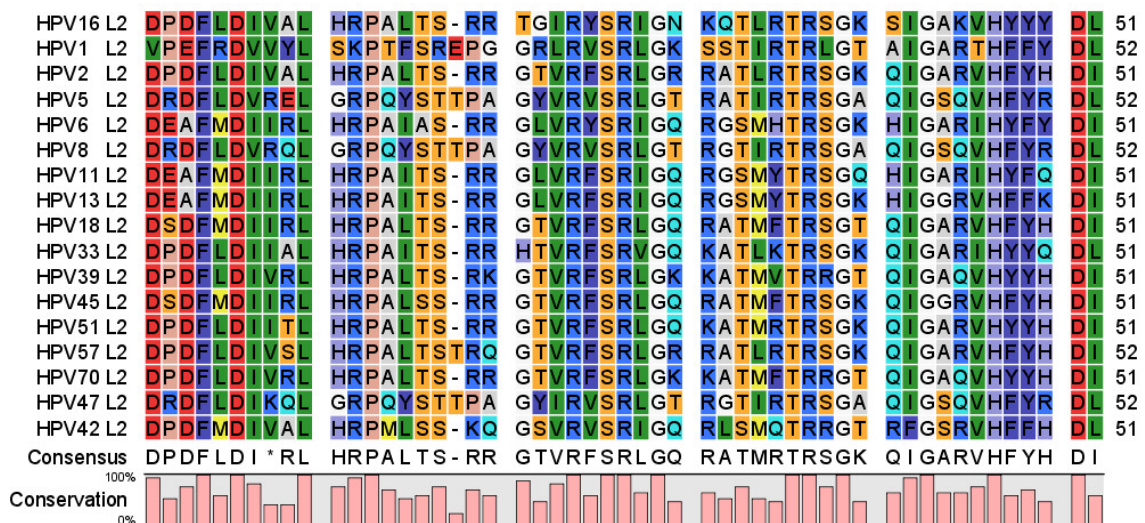


Abb. 3.4: Sequenzvergleich der mNLS im L2-Protein verschiedener HPV-Typen. Dargestellt ist ein Ausschnitt der L2-Aminosäuresequenz entsprechend HPV16 L2 280-330. Es wurden unter anderem die genitalen Typen HPV6, -11, -16, -18, -33, -39, -42, -45, und -51 ausgewählt. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *CLC Protein Workbench3* durchgeführt. Die Sequenzen stammen aus der Genbank des NCBI.

### 3.2.2 Punktmutagenese der mNLS in HPV16 L2

Zur weiterführenden Charakterisierung der mNLS und der Identifizierung essentieller Aminosäuren wurden in 3.2.1 beschriebene, konservierte Aminosäuren in HPV16 L2 und z. T. in dem Fusionskonstrukt GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 ausgetauscht. In der Tabelle 3.1 sind alle hergestellten Konstrukte zusammengefasst. Die Veränderung der Aminosäuresequenz erfolgte durch den gerichteten Basenaustausch mit Hilfe von Mutageneseprimern und der PCR. Zur Überprüfung der mutierten Nukleotidsequenz wurden die entsprechenden

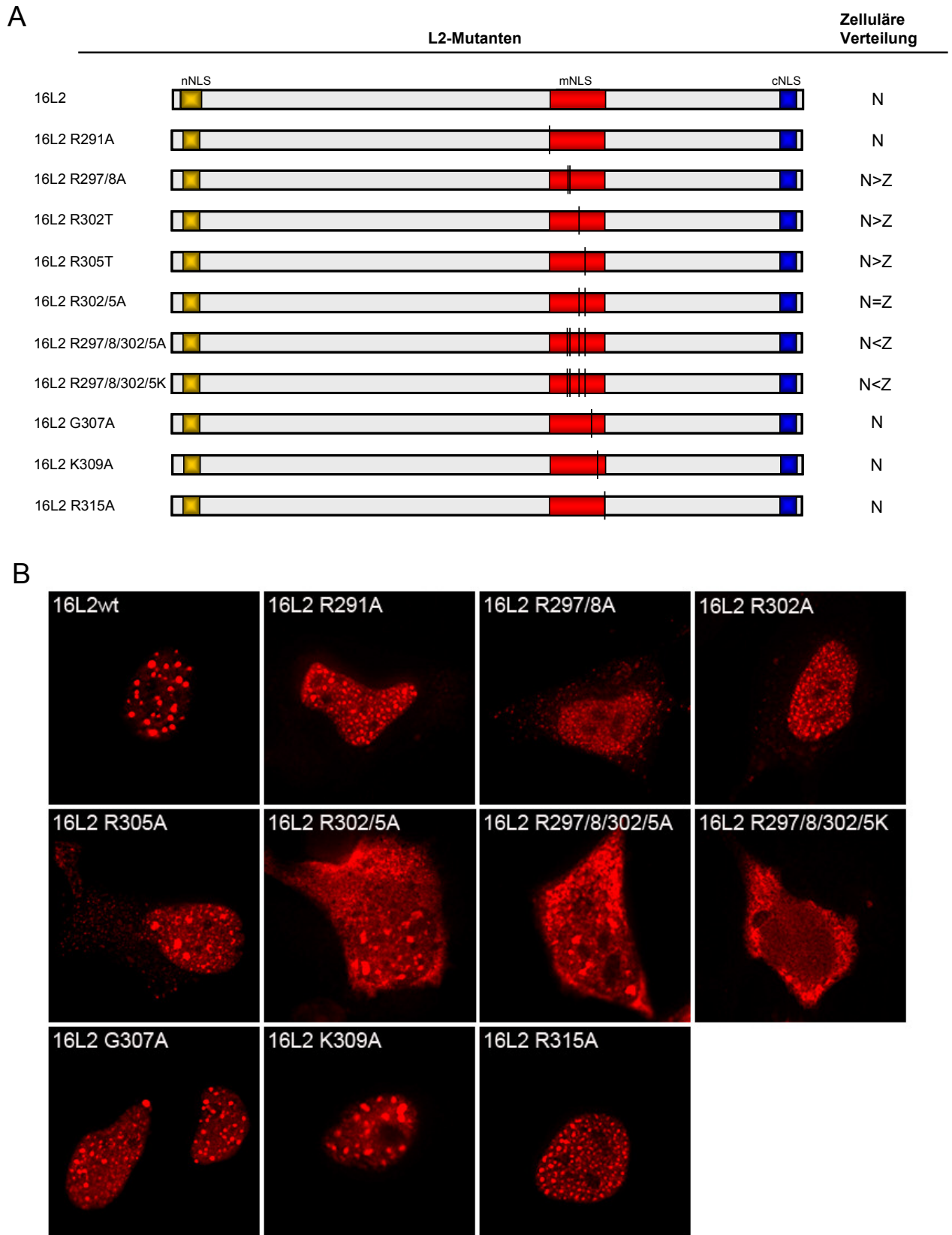
Konstrukte sequenziert. Der gleichzeitige Austausch der 4 Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 zu Alaninen wurde zusätzlich in der Deletionsmutante HPV16 L2 13-455 durchgeführt.

**Tab. 3.1: HPV16 L2 und GFP-16L2 280-330 Mutanten.** Aufgelistet sind die Namen der in dieser Arbeit hergestellten Mutanten und die entsprechenden Punktmutationen an den jeweiligen Positionen.

Bezeichnung	Mutationen
16L2 R291A	Arginin an Position 291 durch Alanin ersetzt
16L2 TS265/6A	Threonin an Position 295 und Serin an Position 296 durch Alanin ersetzt
16L2 R297/8A	Arginine an Position 297 und 298 durch Alanine ersetzt
16L2 R302A	Arginin an Position 302 durch Alanin ersetzt
16L2 R305A	Arginin an Position 305 durch Alanin ersetzt
16L2 R302/5A	Arginine an Position 302 und 305 durch Alanine ersetzt
16L2 R297/8/302/5A	Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 durch Alanine ersetzt
16L2 S304A	Serin an Position 304 durch Alanin ersetzt
16L2 S304T	Serin an Position 304 durch Threonin ersetzt
16L2 S304D	Serin an Position 304 durch Aspartat ersetzt
16L2 G307A	Glycin an Position 307 durch Alanin ersetzt
16L2 K309A	Lysin an Position 309 durch Alanin ersetzt
16L2 R315A	Arginin an Position 315 durch Alanin ersetzt
16L213/455 R297/8/302/5A	Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 durch Alanine in der Mutante 16L2 13/455 ersetzt
GFP-16L2 280-330 TS295/5A	Threonin an Position 295 und Serin an Position 296 durch Alanin ersetzt
GFP-16L2 280-330 R297/8A	Arginine an Position 297 und 298 durch Alanine ersetzt
GFP-16L2 280-330 R302/5A	Arginine an Position 302 und 305 durch Alanine ersetzt
GFP-16L2 280-330 R297/8/302/5A	Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 durch Alanine ersetzt
GFP-16L2 280-330 R297/8A302/5K	Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 durch Lysine ersetzt
GFP-16L2 280-330 S304A	Serin an Position 304 durch Alanin ersetzt
GFP-16L2 280-330 S304T	Serin an Position 304 durch Threonin ersetzt

### 3.2.2.1 Einfluss basischer Aminosäuren auf den Kernimport von HPV16 L2 und GFP-16L2 280-330

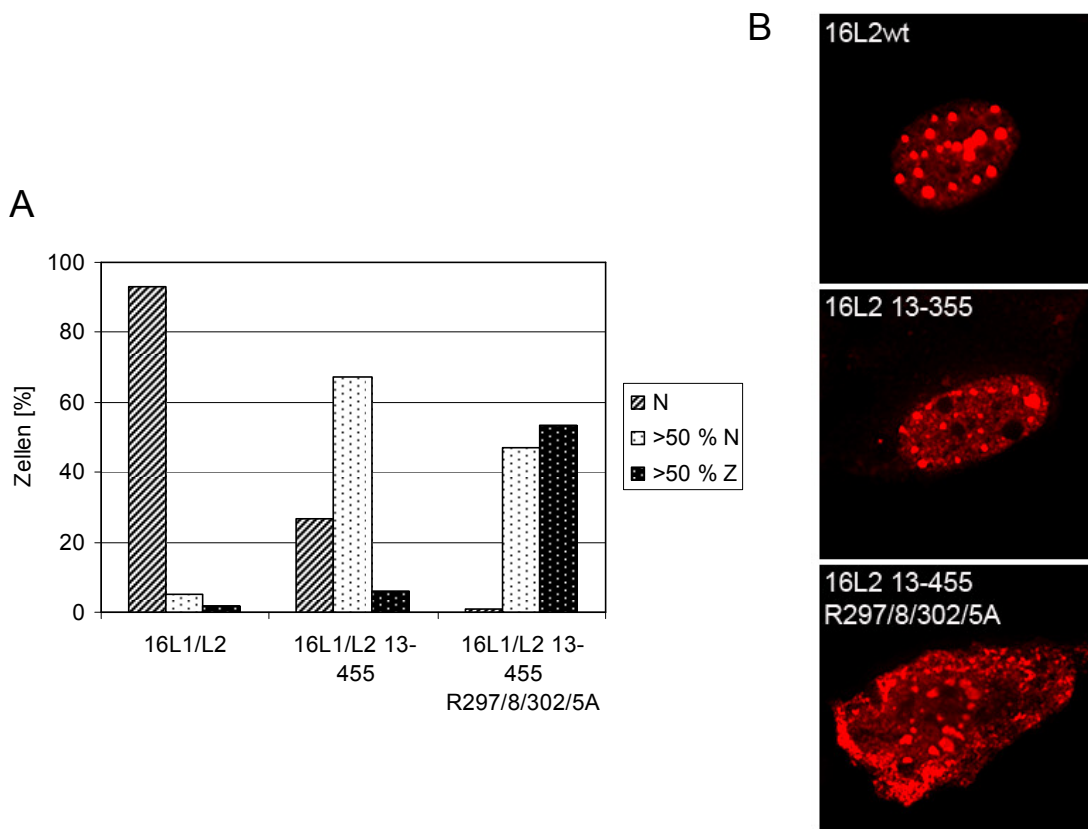
Durch die Expression der in Tab. 3.1 aufgeführten Konstrukte in HeLa-Zellen konnte die intrazelluläre Lokalisation der L2-Mutanten untersucht und mikroskopisch ausgewertet werden. Abb. 3.5 zeigt die Lokalisation der Punktmutationen von basischen Aminosäuren innerhalb der L2-Sequenz und die zelluläre Verteilung der Mutanten.



**Abb. 3.5: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von HPV16 L2-Mutanten mit Austausch basischer Aminosäuren im Bereich des mNLS.**

- (A) Schematische Darstellung der Lokalisation einzelner Punktmutationen innerhalb von L2. Ebenfalls angegeben ist die intrazelluläre Verteilung der jeweiligen Konstrukte. NLS: Kernlokalisierungssignal; N: Nukleus, Z: Zytoplasma.
- (B) HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von L2 durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 33L2-1 im Mikroskop detektiert.

HPV16 L2wt wurde ebenso wie die Mutanten R291A, G307A, K309A und R315A ohne Einschränkungen in den Kern importiert. Eine deutliche Störung des Kernimportes von L2 wurde durch die Doppelmutation R297/8A erzielt. Die Hälfte der Zellen zeigte eine sichtbare Akkumulation von L2 im Zytoplasma. Der Einzelaustausch der Argine an Position 302 oder 305 zu Alaninen reduzierte ebenfalls die Kerntranslokation. Die Kombination beider Austausche in der L2-Doppelmutante R302/5A konnte diesen Effekt weiter verstärken. Durch den gleichzeitigen Austausch der 4 Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 zu Alaninen wurde der Anteil an Zellen mit einem gestörten L2-Kernimport noch weiter erhöht. Auch der konservative Austausch der 4 Arginine zu Lysinen konnte einen ungestörten Kernimport, ähnlich dem von L2wt, nicht wieder herstellen.



**Abb. 3.6: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von L2-Mutanten mit deletierter n- und cNLS sowie mutierter mNLS.** HeLa-Zellen wurden transient transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von L2 durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 33-L2-1 im Mikroskop detektiert.

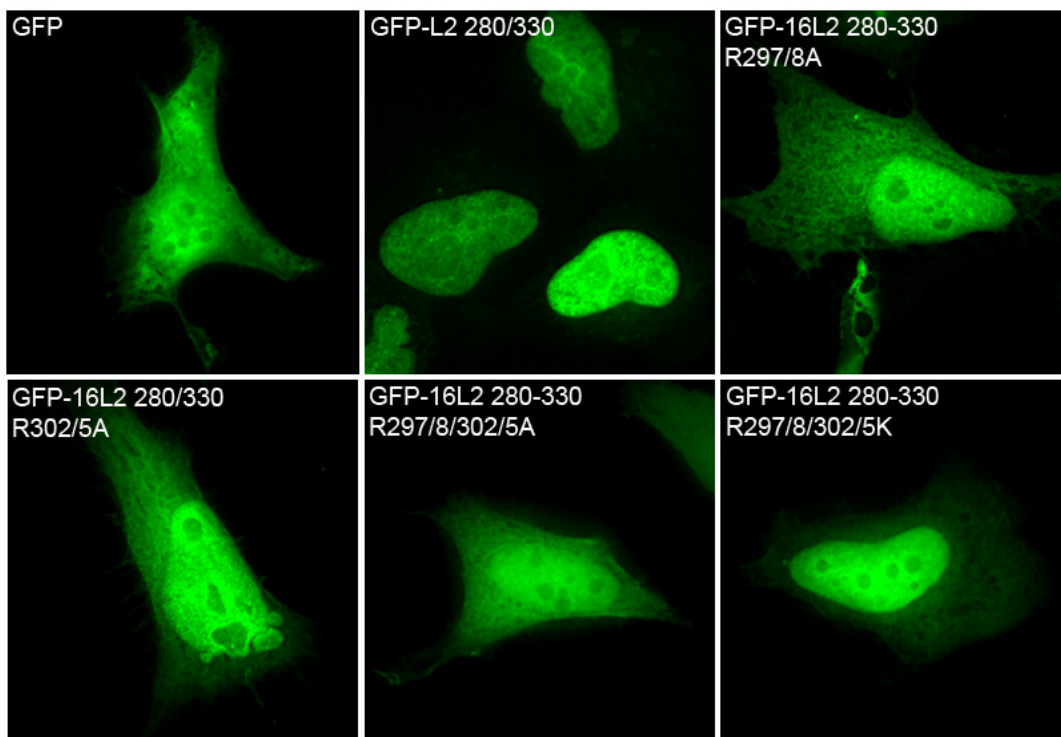
- (A) statistische Auswertung der Lokalisation von L2 in 300 zufällig ausgewählten Zellen; N: vollständige Kerntranslokation von L2; >50 % N: Großteil von L2 ist im Kern lokalisiert, >50 % Z = der Hauptanteil von L2 ist Zytoplasma zurückgeblieben.  
 (B) dominierender Phänotyp der Lokalisation von L2

Die Untersuchungen zeigten, dass L2 auch bei der Mutation R297/8/302/5A nicht vollständig im Zytoplasma zurückgehalten wurde. Fast immer konnte ein Teil von L2 im Kernlumen nachgewiesen werden. Abb. 3.6 zeigt, dass diese restliche Kerntranslokation auch durch die zusätzliche Deletion der n- und c-terminalen, basischen Bereiche nicht verhindert werden



kann. So sind in der Mutante 16 L2 13-455 R297/8/302/5A beide terminalen, potentiellen NLS entfernt und das basische *Cluster* des mNLS mutiert. Dennoch ist der Kernimport dieser Mutante immer noch nicht vollständig inhibiert.

Beschriebene Punktmutationen, die zu einer gestörten L2-Kerntranslokalisierung führten, müssten ebenfalls die Lokalisation von GFP-16L2 280/330 beeinflussen. In Abb. 3.7 ist die intrazelluläre Verteilung der in Tab. 3.1 aufgelisteten GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 Mutanten dargestellt. Eine leichte Beeinträchtigung der Kernlokalisierung konnte bereits durch den doppelten Austausch entweder an Position 297/298 oder 302/305 erzielt werden. Die Mutante GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 R297/8/302/5A zeigte eine ähnlich diffuse, intrazelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz wie GFP<sub>2</sub>. Interessanterweise konnte im Gegensatz zum L2-Protein der konservative Austausch der 4 Arginine zu Lysin den Kernimport des GFP-Fusionskonstruktes wieder fast vollständig herstellen.



**Abb. 3.7: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von GFP-16L2 280/330 Konstrukten mit Punktmutationen.** HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden GFP-Fusionskonstrukten transient transfiziert, nach 24 h Inkubation fixiert und die Lokalisation der Konstrukte mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz im Mikroskop detektiert.

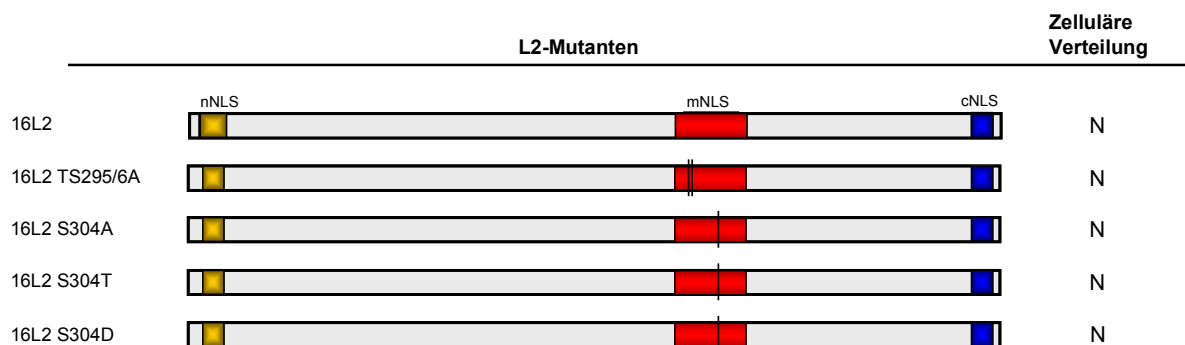
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass vor allem die 4 Arginine an Position 297, 298, 302 und 305 einen maßgeblichen Anteil zur Ausbildung des basischen *Clusters* der mNLS beitragen und essentiell für den Kernimport von L2 sind. Dabei ist im Gegensatz zu GFP-16L2 280/330 für L2wt nicht nur die positive Nettoladung der mittleren, basischen Region von Bedeutung, sondern auch die Beibehaltung der spezifischen Sequenz. Dennoch gelingt

es immer noch einem Anteil von L2 auch ohne nNLS, cNLS und mit mutierter mNLS die Kernmembran zu überwinden und in den Kern importiert zu werden.

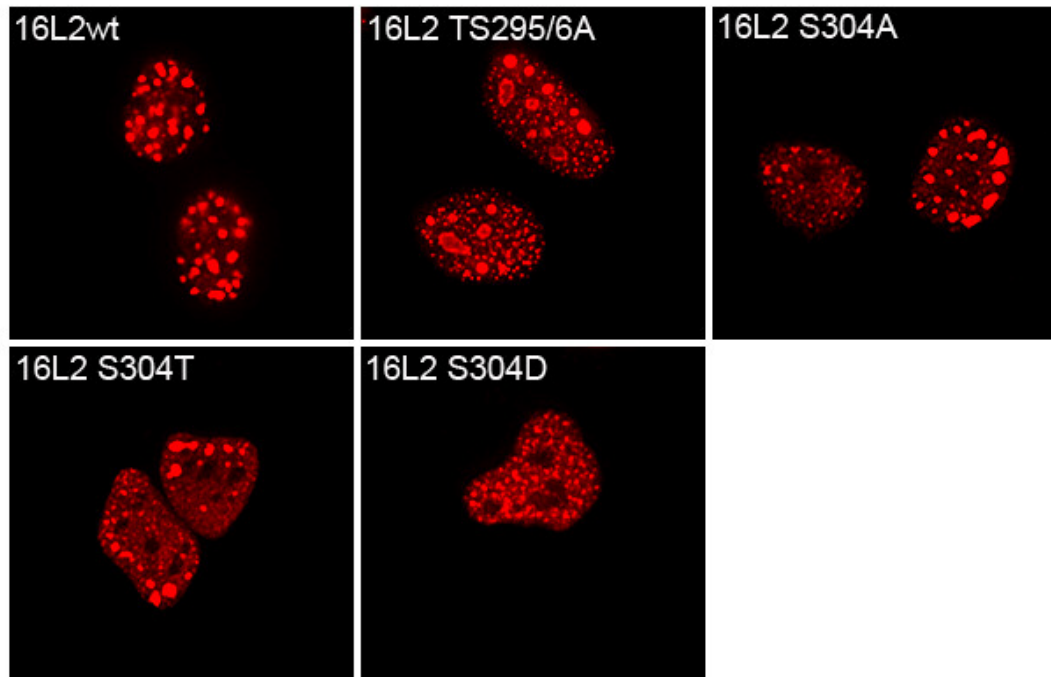
### 3.2.2.2 Einfluss von Threonin- und Serinaustauschen auf den Kernimport von HPV16 L2 und GFP-16L2 280/330

Wie in Abb. 3.4 deutlich wird, werden die zentralen, basischen Aminosäuren von konservierten Serinen oder Threoninen flankiert. Es gibt zahlreiche Beispiele in denen speziell Serine funktionelle Bestandteile in ausgedehnten Kernlokalisierungssignalen sind (Fan and Steitz, 1998; Jäkel and Görlich, 1998; Michael, Eder, and Dreyfuss, 1997; Pollard et al., 1996). Die Analyse von HPV16 L2-Mutanten (siehe Tab. 3.1) sollte zeigen, ob exemplarisch ausgewählte Serine oder Threonine in der Lage sind den Kernimport von L2 zu beeinflussen. Abb. 3.8 zeigt die Lokalisation dieser Serin- bzw. Threoninmutationen in L2 und die zelluläre Verteilung der Mutanten. Wie zu erkennen ist, führte der Austausch von Threonin und Serin an Position 295 und 296 zu keiner Beeinträchtigung des Kernimportes. Ebenfalls unbeeinflusst blieb der Kernimport durch den Austausch von Serin zu Alanin an Position 304. Wurde das gleiche Serin konservativ zu Threonin ausgetauscht, so zeigte auch diese Mutation keine negativen Auswirkungen auf die Kerntranslokalisierung. Lediglich durch den Austausch von Serin zu Asparat wurde der Kernimport minimal gestört.

A



B



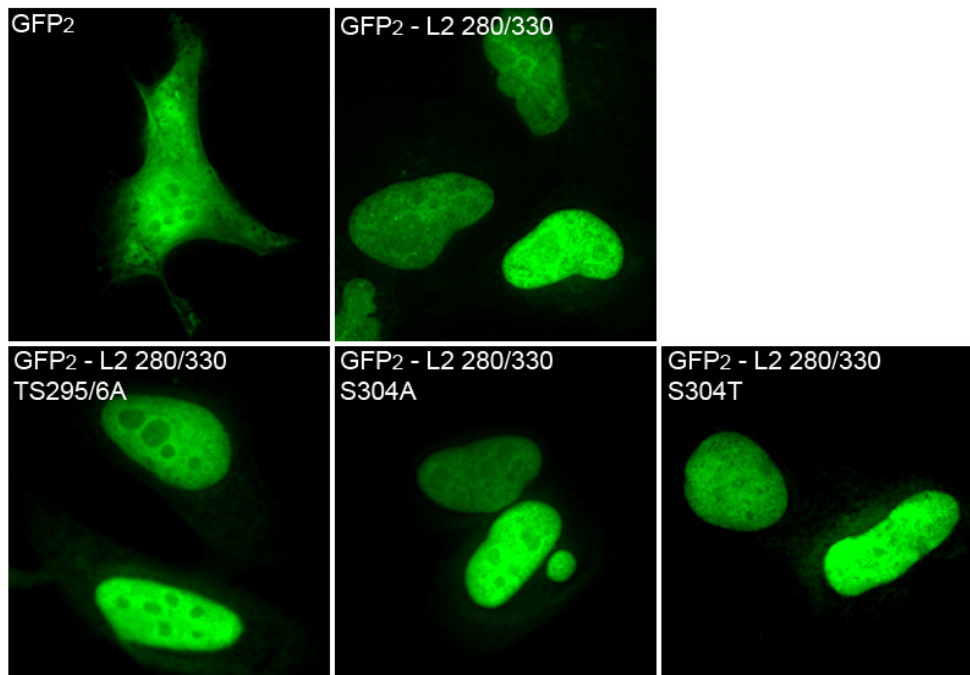
**Abb. 3.8: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von L2-Mutanten mit Punktmutationen von Serinen oder Threoninen.**

- (A) Schematische Darstellung der Lokalisation der Punktmutationen innerhalb von L2. Ebenfalls angegeben ist die intrazelluläre Verteilung der jeweiligen Konstrukte. NLS: Kernlokalisierungssignal; N: Nukleus, Z: Zytoplasma.
- (B) HeLa-Zellen wurden transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von L2 durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 33-L2-1 im Mikroskop detektiert.

Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Analyse von GFP-16L2 280-330-Mutanten mit den entsprechenden Punktmutationen. Abb. 3.9 zeigt, dass auch in diesem Fall sowohl die Mutation TS295/6A als auch der Austausch von Serin an Position 304 zu Alanin oder Threonin zu keiner Beeinträchtigung der Kerntranslokation des Fusionskonstruktes führte. Der Phänotyp der GFP-Fluoreszenz war bei den drei untersuchten Mutanten nicht von GFP-L2 280/330wt zu unterscheiden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die exemplarisch ausgewählten Serine und das Threonin keinen nennenswerten Beitrag für die Funktion des mNLS liefern. Lediglich durch die Einführung einer negativen Ladung durch Aspartat an Position 304 konnte in manchen Fällen eine minimale Beeinträchtigung des Kernimportes festgestellt werden.



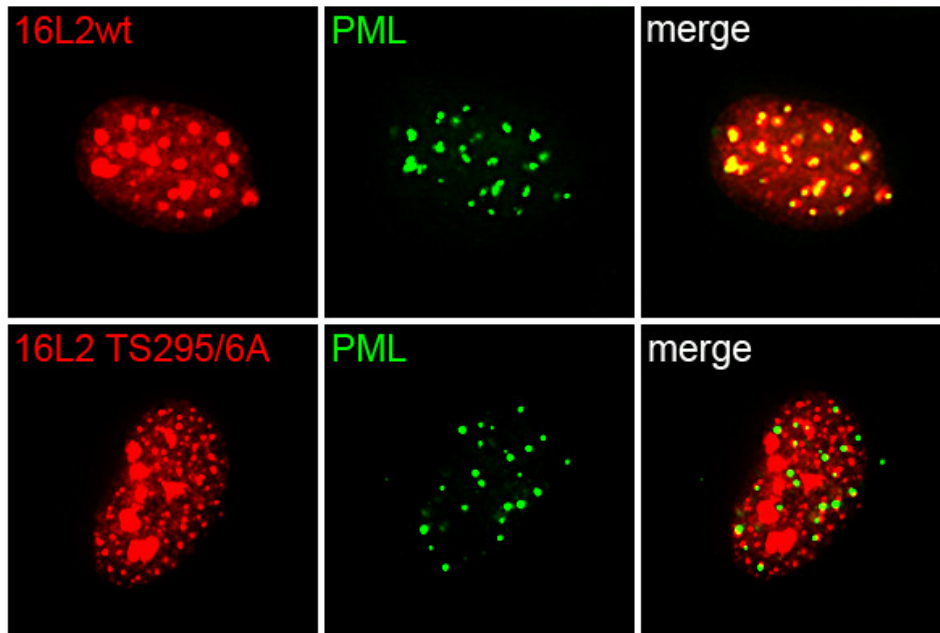


**Abb. 3.9: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von GFP-16L2 280/330 Mutanten mit Threonin- und Serinaustauschen.** HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden GFP-Fusionskonstrukten transient transfiziert, nach 24 h Inkubation fixiert und die Lokalisation der Konstrukte mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz im Mikroskop detektiert.

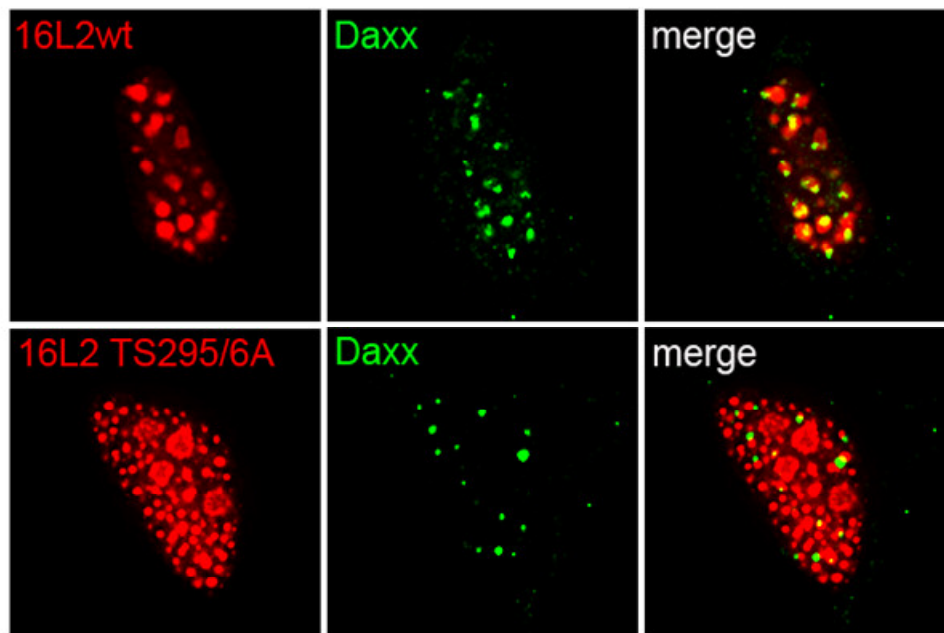
### 3.2.2.3 Charakterisierung der Kernaggregate von HPV16 L2 TS295/6A

Wie bereits erwähnt, akkumuliert das L2-Protein im Kern an Nukleären Domänen 10 (ND10) und rekrutiert den transkriptionellen Regulator Daxx an diese Strukturen (Becker et al., 2003; Day et al., 1998; Florin et al., 2002b). Alle bisher dargestellten L2-Mutanten wurden routinemäßig auf ND10-Kolokalisation getestet. Dabei konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Auch L2-Mutanten mit einem massiv beeinträchtigten Kernimport waren immer noch in der Lage an ND10 zu akkumulieren. Eine Ausnahme bildete dabei die L2-Mutante TS295/6A. Die von dieser Mutante gebildeten Kernaggregate kolokalisierten nicht mit PML, der Hauptstrukturkomponente von ND10. Das bedeutet, diese Aminosäuren könnten essentiell für die korrekte Assoziation mit ND10 sein.

L2 rekrutiert im Kern auch unabhängig von der Assoziation mit ND10 den transkriptionellen Regulator Daxx (Becker et al., 2004). Es stellte sich die Frage, ob die Mutante 16L2 TS295/6A ebenfalls noch dazu in der Lage ist. Dazu wurde die Interaktion von L2 mit endogenem Daxx durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Abb. 3.11 zeigt, dass die L2-Mutante im Gegensatz zu L2wt nicht mehr fähig war mit Daxx zu interagieren und beweist erneut die auffällige Bedeutung von TS295/6.



**Abb. 3.10: Untersuchung der Interaktion von 16L2 TS295/6A mit PML.** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von 16L2wt oder der L2-Mutante TS295/6A transient transfiziert, die Zellen nach 24 h Inkubation fixiert und die Kolokalisation durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 33L2-1 und pAk  $\alpha$ -PML im Mikroskop detektiert.



**Abb. 3.11: Untersuchung der Interaktion von 16L2 TS295/6A mit Daxx.** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von 16L2wt oder der Mutante 16L2 TS295/6A transient transfiziert, die Zellen nach 24 h Inkubation fixiert und die Kolokalisation durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 33L2-1 und pAk  $\alpha$ -Daxx im Mikroskop detektiert.

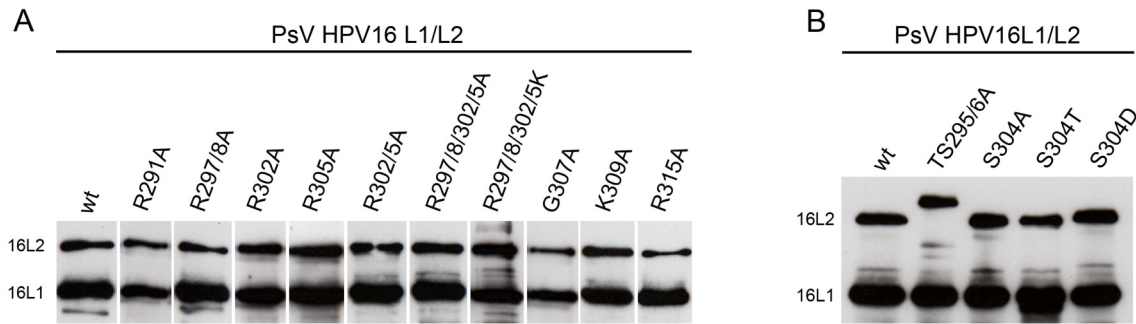
### **3.2.3 Bedeutung des mNLS für die Infektion mit HPV16-Pseudovirionen**

Die dargestellten Untersuchungen haben deutlich gemacht, dass der mittlere, basische Bereich von L2 einen maßgeblichen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von neu synthetisiertem L2-Protein besitzt. Es stellte sich also die Frage, ob diese Region auch eine essentielle Rolle während der Infektion von Zellen mit Pseudovirionen spielt.

#### **3.2.3.1 Herstellung von HPV16-Pseudovirionen mit mutanten L2-Proteinen**

Pseudovirionen (PsV) sind HPV L1/L2-Kapside mit einem verpackten Markerplasmid wie z.B. pEGFP und werden zur Untersuchung von Prozessen während der Infektion benutzt. Zur Herstellung von PsV wurde ein Protokoll verwendet, welches in der Arbeitsgruppe von John T. Schiller etabliert wurde (Buck et al., 2004; Buck et al., 2005a; Buck et al., 2005b). Der Zusammenbau von L1 und L2 zu intakten Kapsiden erfolgt im Kern. Bei einer gemeinsamen Expression kann das L2-Protein zusammen mit L1 in den Kern transportiert werden (Becker et al., 2004). Der Einbau von L2 in Pseudovirionen kann demnach auch unabhängig von einem aktiven Kerntransport von L2 stattfinden und erlaubt die Herstellung von Partikeln mit Mutationen im Bereich des mNLS von L2.

Plasmide mit veränderter HPV16 L2-Sequenz (siehe Tab. 3.1) wurden zusammen mit dem Expressionsplasmid von HPV16 L1 und dem Markerplasmid pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS in 293TT-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die generierten Pseudovirionen extrahiert und über einen OptiPrep-Gradienten gereinigt (siehe 2.2.6). Mit Hilfe eines Immunoblottes wurde der Einbau von L1 und L2 in den Kapsiden der entsprechenden Peakfraktionen untersucht. Abb. 3.12 zeigt, dass die Ausbeuten von PsV-Partikeln und der Einbau mutanter L2-Proteine mit wt-PsV vergleichbar waren. Das bedeutet, der Zusammenbau von Kapsiden wird durch Mutationen im Bereich des mNLS von L2 nicht negativ beeinflusst. Leichte Schwankungen bezüglich der Ausbeuten wurden später bei den entsprechenden Versuchen durch die Normierung berücksichtigt.



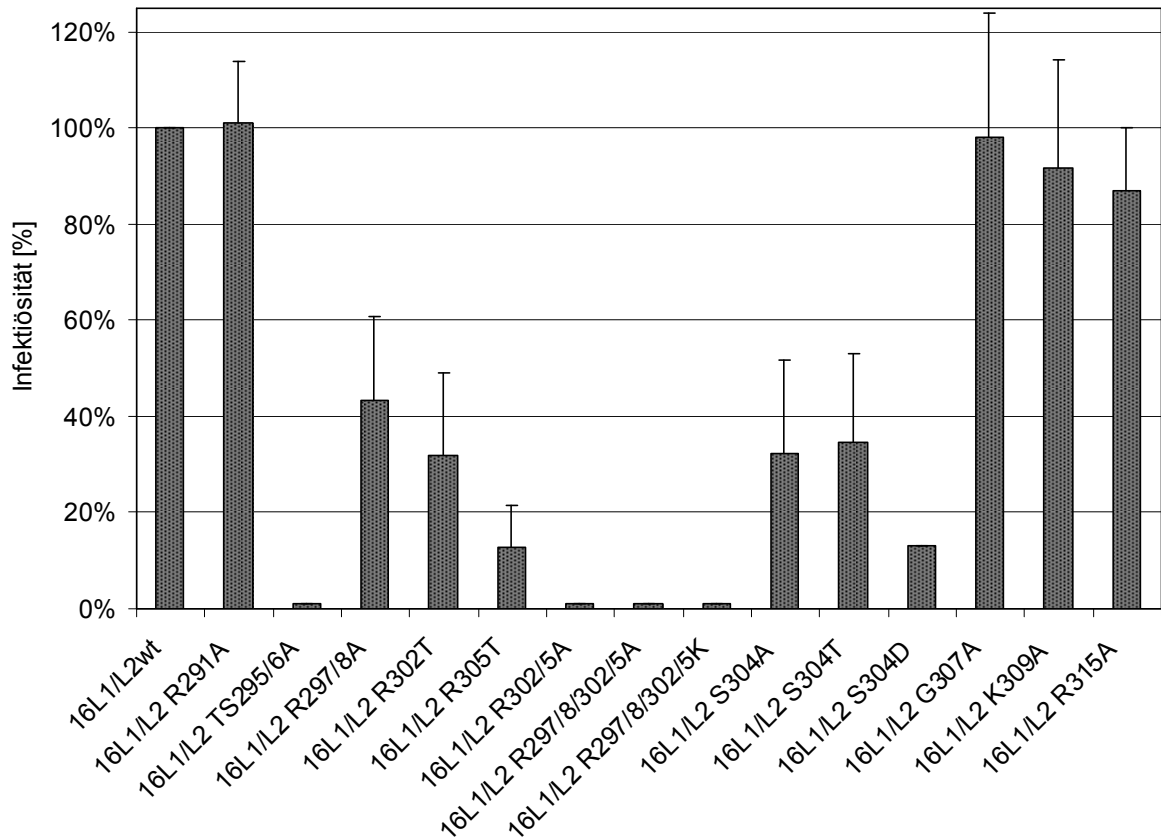
**Abb. 3.12: Immunoblotanalyse von L1 und L2 in Wildtyp und mutanten HPV16-Pseudovirionen (PsV).** Gleiche Volumina von Peakfraktionen aus PsV-Präparationen wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulosemembran wurden die Kapsidproteine L1 und L2 gleichzeitig mit den monoklonalen Antikörpern 33L2-1 und 16L1-312F detektiert.  
**(A)** PsV mit Punktmutationen von basischen Aminosäuren in der mNLS von L2  
**(B)** PsV mit Punktmutationen von Threonin bzw. Serinen in der mNLS von L2

### 3.2.3.2 Analyse der Infektion mit mutanten Pseudovirionen

Die Auswirkungen der L2-Punktmutationen auf die Infektion mit Pseudovirionen, wurden mit Hilfe von Infektionsassays bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.7). Dazu wurden 293TT-Zellen mit gleichen Volumina an PsV infiziert und die Anzahl der infizierten Zellen nach 72 h ausgewertet. Die Infektion einer Zelle konnte dabei durch die Expression des verpackten Markerplasmides pEGFP<sub>2</sub>-33L1 NLS sichtbar gemacht werden. Die ermittelten Infektionseinheiten der einzelnen Viruspräparationen wurden anschließend auf eine einheitliche Kapsidkonzentration normiert (Heparin-BSA-ELISA, Abschnitt 2.2.8) und miteinander verglichen. In Abb. 3.13 sind die Ergebnisse der Infektionsassays aller hergestellten Pseudovirionen zusammengefasst. Zur statistischen Absicherung wurde die Infektionsrate von jeder Mutante aus mindestens 2 unabhängigen Präparationen mit dem Wildtyp, der in jeder Präparationsrunde mitgeführt wurde, verglichen.

L2-Mutanten, die in der Expression ähnlich wie L2wt im Kern akkumulierten, hatten auch auf die Infektionsrate keinen negativen Effekt. Dazu zählten die L2-Mutanten R291A, G307A, K309A und R315A (Abb. 3.13).

Im Vergleich dazu beeinträchtigten L2-Mutanten mit einem gestörten Kernimport signifikant die Infektion. So wurde die Infektiosität durch die Doppelmutation R297/8A um etwa 50 % reduziert. Die Mutationen der konservierten Arginine an Position 302 und 305 verringerten die Infektion um 68 % bzw. 87 %. Durch die Kombination als Doppelmutation R302/5A wurde die Infektion komplett inhibiert. Dasselbe Resultat wurde mit dem gleichzeitigen Austausch der 4 Arginine R297, 298, 302 und 305 zu Alanin erzielt. Auch der konservative Austausch der 4 Arginine zu Lysinen konnte die Infektion nicht wiederherstellen.



**Abb. 3.13: Untersuchung der Infektiösität von HPV16-Pseudovirionen mit L2-Punktmutationen.** Dargestellt sind die gesammelten Ergebnisse von durchschnittlich 2-3 Präparationen je PsV-Mutante. In einem Infektionsassay wurden 4 parallele Ansätze ausgewertet. Dazu wurden 293TT-Zellen mit den Peakfraktionen der einzelnen PsV-Präparationen in gleichen Volumina infiziert. Nach 72 h erfolgte die Auszählung der grün fluoreszierenden Zellen. Die ermittelten Infektionseinheiten wurden auf die gleiche Kapsidmenge normiert und miteinander verglichen. Die Infektiösität der wt-PsV wurde dabei als 100% gesetzt.

Die Mutation TS295/6A hatte keinen Einfluss auf die Kerntranslokalisierung von neu synthetisiertem L2-Protein. Stattdessen verhinderte sie die Akkumulation an den ND10 und die Rekrutierung von Daxx. In Pseudovirionen führte der Austausch zu einer vollständigen Inhibition der Infektion (Abb. 3.13). Die Mutation von Serin an Position 304 zu Alanin bzw. Threonin führte zu keiner Einschränkung des Kernimportes (Vergleich Abb. 3.8), reduzierte aber die Infektion mit mutanten Pseudovirionen um 73 % bzw. 65 %. Diese Infektionsrate konnte durch den Austausch zu Aspartat noch weiter auf 13 % gesenkt werden (Abb. 3.13).

### 3.2.4 Charakterisierung der zentralen Arginine in dem mNLS von HPV18 L2

Wie gezeigt werden konnte, sind die 4 Arginine in HPV16 an Position 297, 298, 302 und 305 sowohl während der Expression von 16L2 als auch bei der Infektion von zentraler

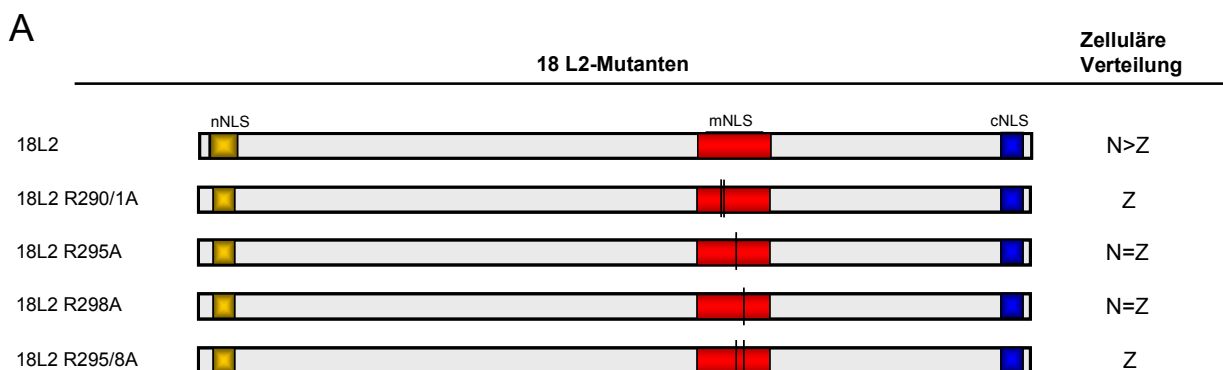
Bedeutung. Im Folgenden wurde untersucht ob eine Übertragung der Ergebnisse auf einen anderen HPV-Typ, z.B. HPV18, möglich ist.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz (Abb. 3.4) zeigt, dass die entsprechenden Arginine bei HPV18 L2 an Position 290, 291, 295 und 298 liegen. Durch Punktmutationen mit Hilfe von Mutageneseprimern und der PCR wurden die 4 HPV18 L2-Mutanten R290/1A, R295A, R298A und R295/8A hergestellt (Tab. 3.2).

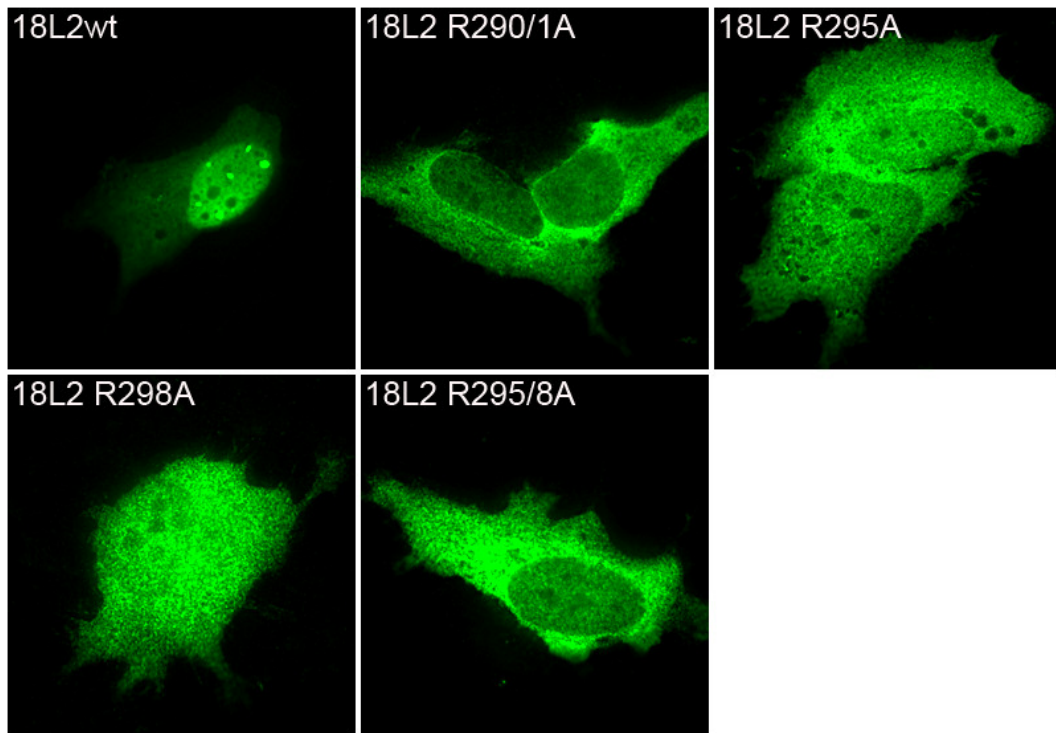
**Tab. 3.2: HPV18 L2 Mutanten.** Aufgelistet sind die Namen der hergestellten L2-Mutanten mit den jeweiligen Positionen der Punktmutationen. Zum Vergleich ist die in HPV16 entsprechende Mutation ebenfalls dargestellt.

Bezeichnung	Mutationen	entsprechende Mutation in HPV16 L2
18L2 R290/1A	Arginine an Position 290 und 291 durch Alanine ersetzt	16L2 R297/8A
18L2 R295A	Arginin an Position 295 durch Alanin ersetzt	16L2 R302A
18L2 R298A	Arginin an Position 298 durch Alanin ersetzt	16L2 R305A
18L2 R295/8A	Arginine an Position 295 und 298 durch Alanine ersetzt	16L2 R302/5A

Die hergestellten HPV18 L2-Mutanten wurden zunächst hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisation untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den jeweiligen HPV18 L2-Expressionsplasmiden transfiziert und die Lokalisation von 18L2 durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Wie in Abb. 3.14 zu sehen ist, war die Kerntranslokation von HPV18 L2wt im Vergleich zu HPV16 L2wt weniger effizient (Vergleich z.B. Abb 3.1). Das minore Kapsidprotein von HPV18 akkumulierte nicht wie bei HPV16 ausschließlich im Kern. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zu HPV16 das L2-Protein von HPV18 im Kern deutlich seltener mit den ND10 assoziiert war.



B



**Abb. 3.14: Untersuchung der intrazellulären Verteilung von HPV18 L2-Mutanten mit Austausch basischer Aminosäuren.**

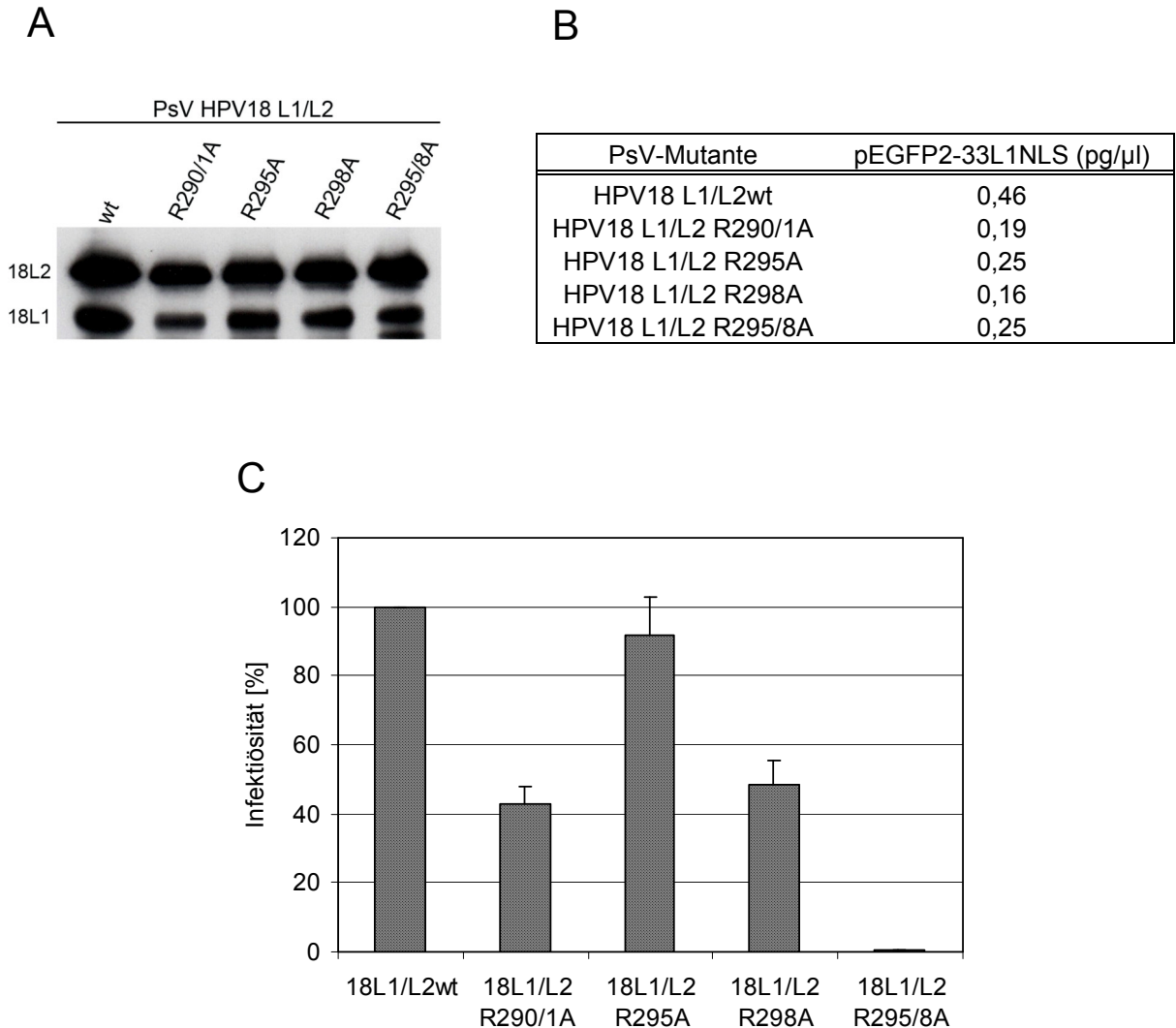
- (A) Schematische Darstellung der Lokalisation einzelner Punktmutationen innerhalb von L2. Ebenfalls angegeben ist die intrazelluläre Verteilung der jeweiligen Konstrukte. NLS: Kernlokalisierungssignal; N: Nukleus, Z: Zytoplasma.
- (B) HeLa-Zellen wurden transient transfiziert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von L2 durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit mAk 18L2-28F im Mikroskop detektiert.

Die Zerstörung des basischen *Clusters* des mNLS von HPV18 L2 durch die zwei Doppelmutationen R290/1A und R295/8A führte in fast allen der untersuchten Zellen zu einer kompletten zytoplasmatischen Lokalisation. Bereits die Einführung der zwei Einzelmutationen R295A bzw. R298A resultierten in einer gleichmäßigen Verteilung von L2 zwischen Kern und Zytoplasma (Abb. 3.14). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass auch HPV18 L2 ein zentrales NLS besitzt, welches aber im Vergleich zu HPV16 deutlich labiler ist.

Im folgenden Abschnitt ist der Einfluss der HPV18 L2-Punktmutationen auf die Infektion mit Pseudovirionen dargestellt. Dazu wurden, wie unter 2.2.6 beschrieben, HPV18-Pseudovirionen mit den entsprechenden L2-Mutanten aus Tab. 3.2 generiert. Ebenso wie bei HPV16-Pseudovirionen beeinträchtigten die Mutationen im Bereich des mNLS nicht den Einbau von L2 in die Kapside (Abb. 3.15 (A)). Wie der Vergleich von PsV-Mutanten mit dem Wildtyp in der Immunoblotanalyse zeigt, wurden die Kapsidproteine L1 und L2 ohne Einschränkungen eingebaut. Desweiteren wurde die Verpackung des Markerplasmides pEGFP<sub>2</sub>-33L1NLS in HPV18-PsV mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Verpackung der Markerplasmid-DNA durch den



Einbau von L2-Mutanten in die Kapside nicht verhindert wird. (Abb. 3.15 (B)). Die erkennbaren Schwankungen sind vermutlich auf eine unterschiedliche Konzentration der Kapside zurückzuführen und wurden später bei den entsprechenden Versuchen durch die Normierung berücksichtigt.



**Abb. 3.15: Analyse von HPV18-Pseudovirionen mit mutierten L2-Proteinen.**

- (A) Immunoblotanalyse von L1 und L2 in Wildtyp (wt)- und mutanten HPV18-Pseudovirionen (PsV). Gleiche Volumina von Peakfraktionen einzelner PsV-Präparationen wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulosemembran wurden die Kapsidproteine L1 und L2 gleichzeitig mit den monoklonalen Antikörpern 18L2-28F und 18L1-1E detektiert.
- (B) Quantifizierung der verpackten Markerplasmid-DNA pEGFP-33L1NLS. Dazu wurde die Plasmid-DNA aus Proteinase K-behandelten PsV isoliert und die Konzentration mit Hilfe der quantitativen *Real Time-PCR* bestimmt.
- (C) Untersuchung der Infektiösität von HPV18-Pseudovirionen. Dargestellt sind die Infektionsdaten von 2 unabhängigen Viruspräparationen. In jedem Infektionsassay wurden 4 parallele Ansätze ausgewertet. Dazu wurden 293TT-Zellen mit den Peakfraktionen der einzelnen PsV-Präparationen in gleichen Volumina infiziert. Nach 48 h erfolgte die Auszählung der grün-fluoreszierenden Zellen. Die ermittelten Infektionseinheiten wurden auf die gleiche Menge von verpackter DNA normiert und miteinander verglichen. Die Infektiösität der wt-PsV wurde dabei als 100% gesetzt



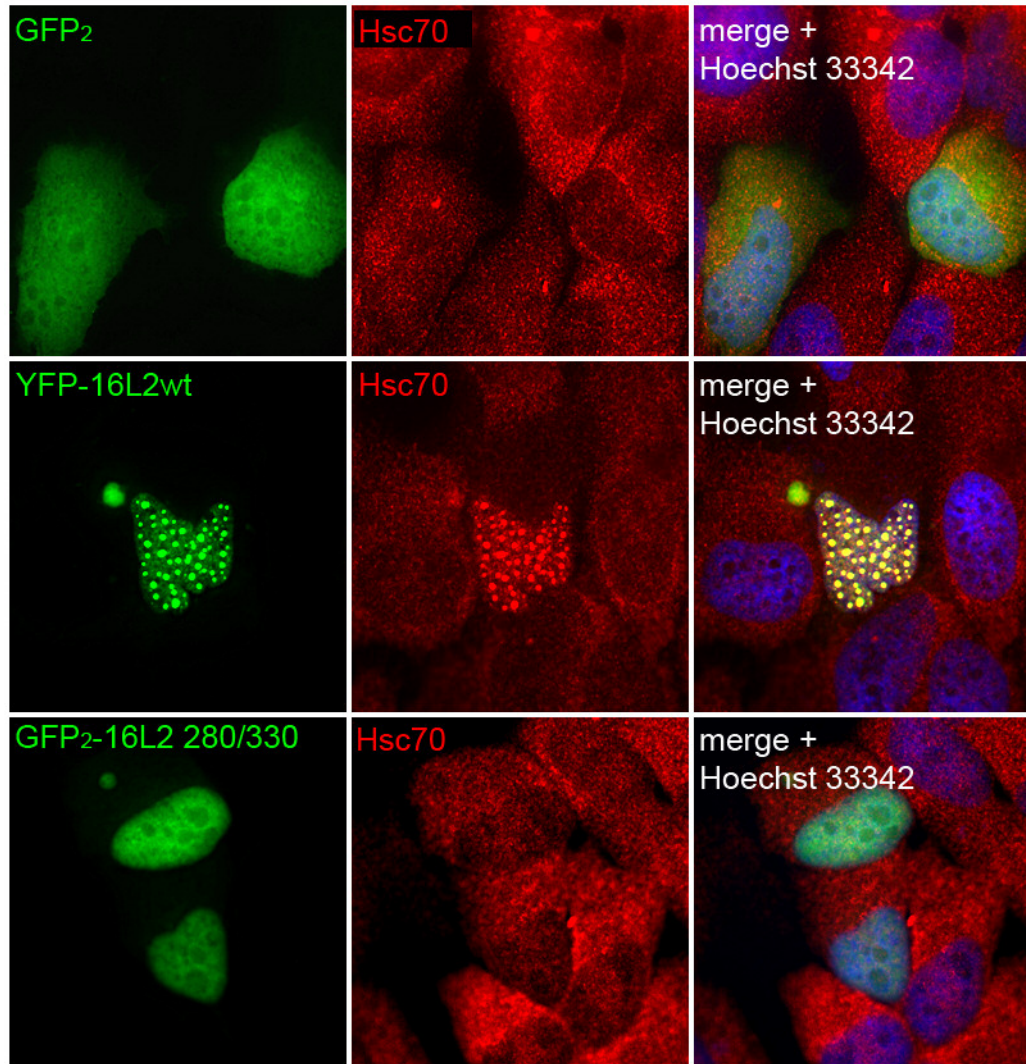
Für die Untersuchung der Infektionsrate wurden 293TT-Zellen mit gleichen Volumina der verschiedenen HPV18-PsV-Präparationen infiziert und nach 48 Stunden die Anzahl der infizierten Zellen ausgezählt. Die Infektionswerte wurden anschließend auf die gleiche Anzahl von verpackter DNA normiert und miteinander verglichen. Die Auswertung der Infektionsassays zeigte mit Ausnahme der Mutation R295A eine deutliche Beeinträchtigung der Infektionsrate. (Abb. 3.15 (C)). Der Aminosäureaustausch R290/1A führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer Halbierung der Infektionsrate auf 43%. Bereits der Einzelaustausch R298A reduzierte die Infektion um 51 %. Die Doppelmutante R295/8A führte ebenfalls wie bei HPV16-PsV R302/5A zu einer vollständigen Inhibition.

### **3.3 Einfluss von Hsc70 auf die mNLS-vermittelte Kerntranslokation**

Wird L2 in Zellen exprimiert, bindet Hsc70 an das Kapsidprotein und es erfolgt ein gemeinsamer Kernimport. (Florin et al., 2004). Diese Interaktion ist eine wichtige Voraussetzung für die Kerntranslokation von L2. Frühere Untersuchungen zeigten, dass L2 mehr als eine Hsc70-Bindedomäne besitzt. Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob das mNLS von L2 eine solche Hsc70-Bindedomäne enthält und ob Hsc70 für die Funktion des mNLS benötigt wird.

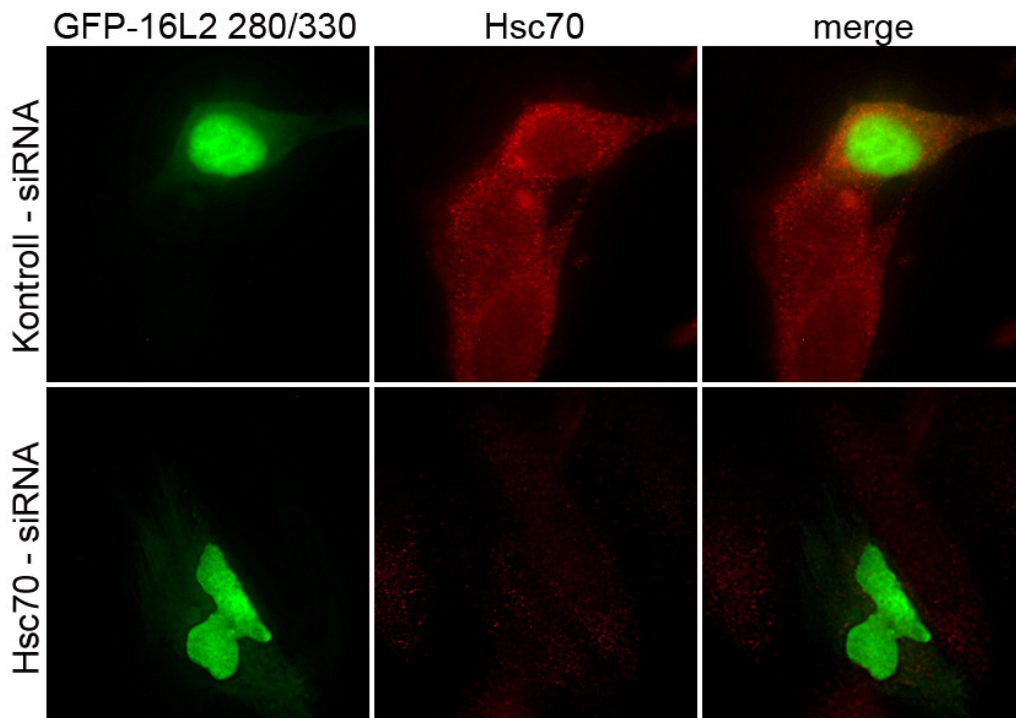
Zunächst wurde die intrazelluläre Verteilung von endogenem Hsc70 während der Expression von GFP<sub>2</sub>-Konstrukten untersucht. Bei der Expression von GFP<sub>2</sub> ist die charakteristische Verteilung von Hsc70 unter physiologischen Bedingungen zu erkennen (Abb. 3.16). Hsc70 war entweder primär im Zytoplasma lokalisiert oder leicht diffus in der gesamten Zelle verteilt. Der gleiche Phänotyp konnte bei der Expression von GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 beobachtet werden. Im direkten Vergleich mit Zellen, die kein GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 exprimierten, konnte kein Unterschied in der Verteilung von Hsc70 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu akkumulierte Hsc70 bei der Expression der Positivkontrolle YFP-16L2wt wie erwartet deutlich im Kern und war zusammen mit L2 an Kerndomänen assoziiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Region des mNLS keine Bindestelle für Hsc70 darstellt, sondern diese in anderen L2-Regionen liegen müssen.



**Abb. 3.16: Untersuchung der Lokalisation von endogenem Hsc70 nach der Expression von GFP-L2-Fusionskonstrukten.** HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für GFP<sub>2</sub>, GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 oder YFP-16L2wt transient transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation der Konstrukte wurde mikroskopisch mit Hilfe der GFP- oder YFP-Fluoreszenz detektiert. Der Nachweis von endogenem Hsc70 erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit rAk SPA-815.

Ist Hsc70 dennoch für die Faltung des mNLS essentiell, ohne direkt mit dieser Region zu interagieren, so sollte die Depletion von Hsc70 einen Einfluss auf die Kernlokalisierung von GFP<sub>2</sub>-16L2 280/330 ausüben. Abb. 3.17 zeigt, dass Hsc70 in HeLa-Zellen mit Hilfe von Hsc70-siRNA erfolgreich depletiert werden konnte. Dennoch kam es im direkten Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zu keiner Einschränkung der Kerntranslokation von GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330. Dies bedeutet, dass Hsc70 nicht für einen mNLS-vermittelten Kernimport benötigt wird.



**Abb. 3.17: Untersuchung der Kernlokalisierung von GFP-16L2 280-330 in Hsc70-depletierten Zellen.** HeLa-Zellen wurden entweder mit Kontroll-siRNA oder mit Hsc70-siRNA transfiziert. Nach 48h erfolgte die Transfektion mit GFP-16L2 280/330 und eine weitere Inkubation von 24h. Die Lokalisation von GFP-L2 280-330 wurde mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz im Mikroskop detektiert. Der Nachweis der Depletion von endogenem Hsc70 erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit rAk-SPA 815. Bei den mikroskopischen Aufnahmen der Hsc70-Fluoreszenz wurde darauf geachtet, dass sowohl für die Proben der Kontroll-siRNA als auch der Hsc70-siRNA immer die gleiche Belichtungszeit und –stärke verwendet wurde.

### 3.4 Interaktion von L2 mit Karyopherinen

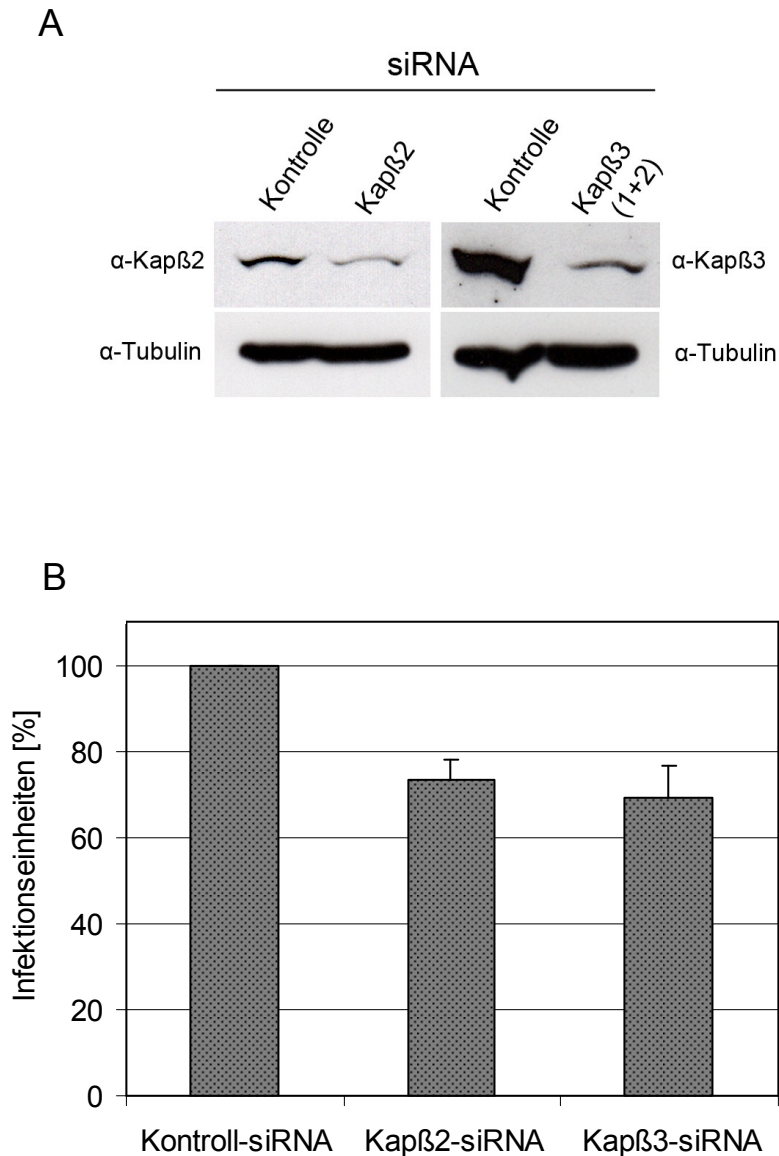
Das Kapsidprotein L2 von HPV16 ist in der Lage mit verschiedenen Kerntransportrezeptoren zu interagieren (Darshan et al., 2004). Bisher nachgewiesene Bindungspartner sind der Rezeptorkomplex  $\text{Kap}\alpha_2 / \text{Kap}\beta_1$  sowie die beiden Importine  $\text{Kap}\beta_2$  und  $\text{Kap}\beta_3$ .

#### 3.4.1 Bedeutung spezifischer Karyopherine für die Infektion mit HPV16-PsV

Im Folgenden wurde der Einfluss dieser Interaktionen während der Infektion untersucht. Dazu wurden in 293TT-Zellen gezielt die einzelnen Karyopherine mit Hilfe von siRNA depletiert und diese Zellen anschließend mit HPV16-PsV infiziert. Als Referenz diente eine Kontroll-siRNA ohne spezifisches mRNA-Ziel.

Bei der Depletion von  $\text{Kap}\beta_1$  wurde in allen Ansätzen zunächst eine Störung der Proliferation mit anschließender Zellapoptose beobachtet. Deshalb konnten in diesem Fall keine weiterführenden Untersuchungen stattfinden und die Frage nach dem Einfluss von  $\text{Kap}\beta_1$  auf die Infektion blieb unbeantwortet.

Sowohl die Depletion von Kap $\beta$ <sub>2</sub> als auch von Kap $\beta$ <sub>3</sub> war nach 48 h Inkubation ausreichend, um mögliche Auswirkungen auf die Infektion mit Pseudovirionen zu testen. Im Vergleich zu Kontroll-siRNA-behandelten Zellen waren die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Karyopherine in den Zellextrakten der siRNA-behandelten Zellen deutlich reduziert (Abb. 3.18 (A)).



**Abb. 3.18: Untersuchung des Einflusses von Kap $\beta$ <sub>2</sub> und Kap $\beta$ <sub>3</sub> auf die Infektion mit HPV16-PsV.** 293TT-Zellen wurden mit Kap $\beta$ <sub>2</sub>- und Kap $\beta$ <sub>3</sub>-siRNA's aus Tab. 2.6 transfiziert und nach 48h mit HPV16- PsV infiziert.

(A) Immunoblotanalyse der Karyopherin-Depletion nach 48 h im Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Gesamtzellextrakte der siRNA-transfizierten Zellen wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocelulosemembran erfolgte der getrennte Nachweis von Kap $\beta$ <sub>2</sub> und Kap $\beta$ <sub>3</sub> mit den entsprechenden Antikörpern. Zur Kontrolle eines einheitlichen Probenauftrages wurde endogenes Tubulin nachgewiesen.

(B) Auswertung der Infektiösität 48h p.i.. Es wurde die Anzahl der Zellen ausgezählt, die das verpackte Markerplasmid pEGFP-33L1NLS exprimierten. Die ermittelten Infektionswerte der Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurden dabei als 100% gesetzt. Karyopherin-siRNA bedingte Veränderungen der GFP-Expression wurden durch FACS-Analysen mit GFP-transfizierten Zellen normiert. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen.

Die siRNA-behandelten Zellen wurden mit HPV16-PsV infiziert und die Infektionsrate nach weiteren 48 h durch Auszählen der GFP-exprimierenden Zellen ausgewertet. Dabei musste bedacht werden, dass Veränderungen in der Infektionsrate auch das Resultat einer veränderten Intensität der Expression des Markerplasmides pEGFP-33L1NLS sein könnten; hervorgerufen durch die transfizierten siRNA's. Aus diesem Grund wurden zusätzlich FACS-Analysen von siRNA-behandelten und GFP-transfizierten Zellen durchgeführt. Diese zeigten, dass die Depletion von Kap $\beta_2$  die GFP-Expression um durchschnittlich 30 % erhöht. Im Gegensatz dazu senkte die Abnahme von zellulärem Kap $\beta_3$  die GFP-Expression um etwa 30%. Diese Werte mussten demzufolge bei der Auswertung der Infektionseinheiten berücksichtigt werden. Die Ergebnisse aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Studien sind in Abb. 3.19 (B) dargestellt. Die Depletion von Kap $\beta_2$  führte im Vergleich mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu einer Verringerung der Infektionsrate um 27 %. Auch die Applikation von Kap $\beta_3$ -siRNA reduzierte die Infektionsrate von HPV16-PsV um durchschnittlich 31 %.

Das bedeutet, beide untersuchten Karyopherine können an den Prozessen der Infektion beteiligt sein.

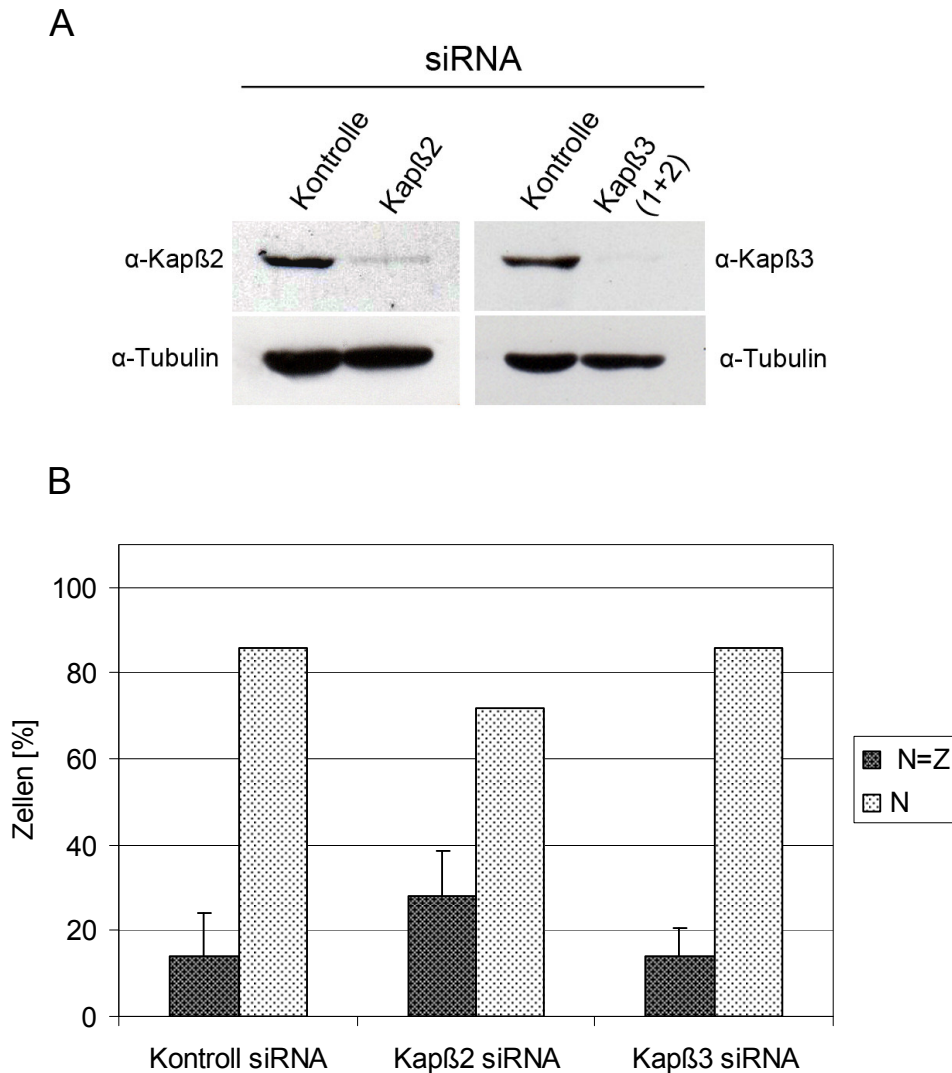
#### **3.4.2 Intrazelluläre Verteilung von GFP-16L2 280/330 in Karyopherin-depletierten HeLa-Zellen**

Bisher unbeantwortet ist die Frage, welcher Kernimportrezeptor in der Lage ist das mNLS von L2 zu erkennen und zu binden. In dieser Arbeit sollte deshalb eine Interaktion von L2 280-330 mit den bisher beschriebenen Karyopherinen Kap $\alpha_2$  / Kap $\beta_1$ , Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  untersucht werden. Bei einer Interaktion von L2 280-330 mit einem der drei Karyopherine, sollte dessen Depletion demzufolge zu einer Störung des Kernimportes von GFP-L2 280-330 führen.

HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden Karyopherin-siRNAs (Tab. 2.7) transfiziert. Nach einer Inkubation von etwa 48 h konnte mit Hilfe von Immunoblotanalysen die Verringerung der Proteinkonzentration der jeweiligen Karyopherine festgestellt werden (Abb. 3.19 (A)). Es erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Transfektion der Zellen mit GFP-16L2 280-330. Nach 24 h Inkubation wurde in jedem Versuchsansatz die Lokalisation des GFP-L2 Fusionskonstruktes in etwa 200 zufällig ausgewählten Zellen mit Hilfe des Mikroskops ausgewertet. Die Depletion der jeweiligen Karyopherine wurde dabei durch Immunfluoreszenzfärbung überprüft.

In Abb 3.19 (B) sind die zusammengefassten Ergebnisse aus 5 unabhängigen Versuchen dargestellt. Leider konnte die Lokalisation von GFP-16L2 280-330 in Kap $\beta_1$ -siRNA behandelten Zellen nicht ausgewertet werden, weil das Ausschalten dieses Importrezeptors

zu einer Apoptose der Zellen führte. Deshalb wurde auf eine Darstellung in Abb. 3.19 verzichtet. Etwa 14 % der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, zeigten eine gleichmäßig intrazelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz; 86 % zeigten die typische Kernlokalisation des Konstruktes. Wurden die Zellen zuvor mit Kap $\beta$ <sub>2</sub>-siRNA behandelt, so konnte eine leichte Störung der Kerntranslokation beobachtet werden. Die diffuse Verteilung der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle erhöhte sich auf 28 %. Die Depletion von Kap $\beta$ <sub>3</sub> führte im Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zu keiner Veränderung des Phänotyps.



**Abb. 3.19: Untersuchung der Intrazelluläre Verteilung von GFP-16L2 280/330 in Karyopherin-depletierten HeLa-Zellen.**

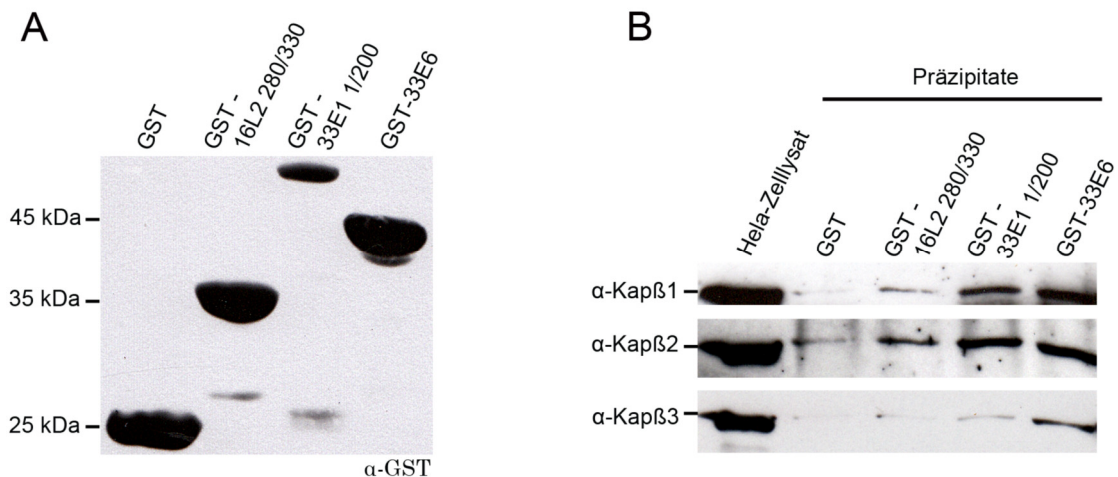
- (A) Immunoblotanalyse der Karyopherin-Depletion nach 48 h im Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Gesamtzell-extrakte der siRNA-transfizierten HeLa-Zellen wurden in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocelulosemembran erfolgte der getrennte Nachweis von Kap $\beta$ <sub>2</sub> und Kap $\beta$ <sub>3</sub> mit den entsprechenden Antikörpern. Zur Kontrolle eines einheitlichen Probenauftrages wurde endogenes Tubulin nachgewiesen.
- (B) HeLa-Zellen wurden mit Kap $\beta$ <sub>2</sub>- oder Kap $\beta$ <sub>3</sub>-siRNAs (Tab. 2.3) transfiziert und nach 48h mit GFP-16L2 280/330 erneut transfiziert. Die Zellen wurden nach 24h Inkubation fixiert und mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung die Depletion von Kap $\beta$ <sub>2</sub> oder Kap $\beta$ <sub>3</sub> im Vergleich mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zusätzlich überprüft. In 200 zufällig ausgewählten Zellen wurde die Lokalisation von GFP-L2 280-330 mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz mikroskopisch ausgewertet. Dargestellt sind die gesammelten Ergebnisse aus 5 unabhängigen Versuchsansätzen. N: GFP-Fluoreszenz im Kern, N = Z: GFP-Fluoreszenz in der gesamten Zelle gleichmäßig verteilt.



Es ist anzumerken, dass die Kap $\beta$ <sub>3</sub>-siRNA behandelten Zellen in einem sehr schlechten Zustand waren und demzufolge deutlich weniger Zellen ausgewertet werden konnten. Desweiteren wurde beobachtet, dass in fast allen Zellen, in denen eine eindeutige Depletion von Kap $\beta$ <sub>3</sub> stattgefunden hat, keine Transfektion von GFP-L2 280-330 mehr erfolgte. Demzufolge ist die Interpretation dieser Daten äußerst fragwürdig.

### 3.4.3 Interaktion von Kernimportrezeptoren mit dem mNLS von HPV16 L2

Abschließend wurde *in vitro* die Interaktion des mNLS von HPV16 L2 mit den 3 Karyopherinen Kap $\beta$ <sub>1</sub>, Kap $\beta$ <sub>2</sub> und Kap $\beta$ <sub>3</sub> in einem Bindungsassay untersucht. Dazu wurde das Fusionskonstrukt GST-16L2 280-330 an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit HeLa-Zellessat inkubiert. Mögliche gebundene Proteine wurden zusammen mit dem GST-L2-Fusionskonstrukt eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die Immobilisierung des GST-Proteins sollte bei der anschließenden Auswertung als Negativkontrolle dienen, da es nachweislich mit keinem der Karyopherine interagiert. Die beiden Fusionskonstrukte GST-33E1 1-200 und GST-33E6 sind beide in der Lage mit verschiedenen Transportrezeptoren zu interagieren (Bian et al., 2007; Le Roux and Moroianu, 2003). Deshalb wurden diese beiden Konstrukte als Positivkontrollen verwendet.



**Abb. 3.20: Untersuchung der Interaktion von HPV16L2 mNLS mit den Karyopherinen Kap $\beta$ <sub>1</sub>, Kap $\beta$ <sub>2</sub> und Kap $\beta$ <sub>3</sub>.** GST-Fusionskonstrukte wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert (2  $\mu$ g /  $\mu$ l) und anschließend 4 h mit präpariertem HeLa-Zellessat inkubiert. Gebundene Proteine wurden zusammen mit den GST-Fusionskonstrukten durch die Inkubation mit SDS-Probenpuffer eluiert, zusammen mit dem eingesetzten HeLa-Zellessat in einem 10 %igem SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und sukzessive mit den Antikörpern **(A)**  $\alpha$ -GST und **(B)**  $\alpha$ -Kap $\beta$ <sub>1</sub>,  $\alpha$ -Kap $\beta$ <sub>2</sub> und  $\alpha$ -Kap $\beta$ <sub>3</sub> inkubiert. Als Positivkontrollen dienten die Konstrukte GST-33E1 1/200 sowie GST-33E6; Negativkontrolle war GST.

Sowohl GST als auch GST-L2 280-330 und die Positivkontrolle GST-33E6 wurden zu gleichen Verhältnissen an die Sepharose gebunden (Abb. 3.20 (A)). Unterschiede in der Bindung von zellulären Proteinen an diese 3 Fusionskonstrukte können demzufolge nicht auf eine ungleiche Immobilisierung zurückzuführen sein. Wie in der Abb. 3.20 (B) zu sehen ist, konnten sowohl mit der Positivkontrolle GST-33E6 als auch mit dem Konstrukt GST-33E1 1-200 die Karyopherine Kap $\beta_1$  und Kap $\beta_2$  aus dem HeLa-Zelllysät präzipitiert werden. Kap $\beta_3$  konnte lediglich mit der Kontrolle GST-33E6 deutlich interagieren. Die Präzipitation von Kap $\beta_3$  durch GST-16L2 280-330 war im Vergleich mit der Negativkontrolle GST nicht signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu konnte GST-16L2 280-330 mit Kap $\beta_2$  eine etwas stärkere Interaktion eingehen, die jedoch nicht ganz die Intensität der beiden Positivkontrollen erreichte. Im Vergleich mit der Negativkontrolle war auch die Bindung von Kap $\beta_1$  an GST-16L2 280-330 leicht erhöht.



## 4 Diskussion

Papillomviren (PV) besitzen ebenso wie alle anderen Viren keinen eigenen Stoffwechsel. Sie sind nicht in der Lage sich selbst zu vermehren und infizieren zu diesem Zweck lebende Zellen. Sowohl die Schritte der Replikation und Transkription des viralen Genoms von Papillomviren als auch deren Morphogenese erfolgen im Zellkern der infizierten Zellen. Dazu müssen virale Komponenten, wie z.B. das minore Kapsidprotein L2 in den Kern importiert werden.

Das L2-Protein wird im Laufe eines HPV-Lebenszyklus zweimal in den Zellkern importiert. Zum einen begleitet es während der Infektion als einziges virales Protein das PV-Genom in den Zellkern und ist dort zusammen mit der DNA in räumlicher Nähe zu den Nukleären Domänen 10 (ND10) lokalisiert (Day et al., 2004). Diese Strukturen werden als Ort von Replikation und Transkription des viralen Genoms angesehen (Swindle et al., 1999). Während der Morphogenese wird für den Zusammenbau der Kapside neu synthetisiertes L2-Protein unabhängig von L1 ein weiteres Mal in den Zellkern importiert (Florin et al., 2002a).

Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit dienten dazu, neue Erkenntnisse über den Kernimport des minorens Kapsidproteins L2 während Infektion und Morphogenese zu erlangen und bisherige kontrovers diskutierte Ergebnisse zu bewerten. Ziel war v. a. die Charakterisierung der Domäne innerhalb des L2-Proteins, die für den Kernimport von HPV16 und -18 L2 verantwortlich ist. Dies wurde sowohl im Kontext von Morphogenese als auch von Infektion untersucht. Anschließend wurde der Einfluss von bekannten Transportrezeptoren auf die Infektion untersucht. Abschließend konnte gezeigt werden, welcher Kernimportrezeptor in der Lage ist mit der redundanten Kernlokalisationssequenz von L2 zu interagieren.

### **4.1 Funktionelle Kernlokalisationssequenz von HPV16 L2 bei der Morphogenese**

Kernlokalisierungssignale (engl. Nuclear Localization Signal = NLS) sind oftmals Bereiche mit einem überdurchschnittlich hohen Anteil basischer Aminosäuren. Das minore Kapsidprotein L2 humaner Papillomviren hat 3 solcher basischen Bereiche. Zwei dieser Domänen sind an den beiden terminalen Regionen von L2 lokalisiert und werden entsprechend ihrer Lage in der Literatur als n- und cNLS bezeichnet. Beide Bereiche besitzen charakteristische Merkmale der einteiligen, klassischen Kernlokalisationssequenzen. Der dritte basische Bereich ist in der mittleren Aminosäureregion von L2 zu finden (mNLS). Bei den basischen Aminosäuren dieser Region handelt es sich mit einer Ausnahme ausschließlich um Arginine,

die nicht direkt hintereinander liegen. In HPV16 L2 umfasst der Bereich die Aminosäuren 291-315.

Welche der 3 Domänen für den Kernimport von L2 während der Morphogenese verantwortlich ist wird in der Literatur äußerst kontrovers diskutiert. Eine Meinung ist, dass die beiden terminalen, basischen Bereiche für den Kernimport von L2 absolut notwendig sind. Gestützt wird die Hypothese von der Tatsache, dass diese Regionen von HPV11, -16 und -18 L2-Proteinen *in vitro* mit dem Importrezeptorkomplex Kap $\alpha_2$  / Kap $\beta_1$  interagieren können. Darüber hinaus sind sie in der Lage ein zytoplasmatisches Reporterprotein in den Kern zu dirigieren (Bordeaux et al., 2006; Darshan et al., 2004; Klucsevsek et al., 2006).

In HPV6b und -33 L2-Proteinen führten die Deletionen dieser terminalen Sequenzen jedoch zu keinen Beeinträchtigungen des Kernimportes (Becker et al., 2003; Sun et al., 1995). Im Gegensatz dazu verhinderte die Deletion der zentralen, basischen Region (mNLS) die Kerntranslokation dieser L2-Proteine. Es wurde deshalb von den Autoren spekuliert, dass nicht die terminalen Regionen sondern diese Domäne hauptverantwortlich für den Kernimport von L2 ist.

Die Frage, welche Domäne in HPV16 L2 nun den Kernimport des Kapsidproteins während der Morphogenese vermittelt, wurde in dieser Arbeit aufgegriffen und detailliert bearbeitet. Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass beide terminalen, basischen Regionen von HPV16 L2 gleichzeitig entfernt werden können und neu synthetisiertes Kapsidprotein trotzdem im Kern akkumuliert. Diese Ergebnisse erlauben folgende Schlussfolgerung: Genauso wie bei HPV6b und HPV33 sind die terminalen, basischen Sequenzen für den Kernimport von HPV16 L2 entbehrlich.

Auch wenn die Diffusion von Molekülen in den Zellkern ab einem Molekulargewicht von 20-30 kDa uneffektiv und langsam wird (Cook et al., 2007; Paine, Moore, and Horowitz, 1975), ist L2 mit seinen ca. 50 kDa noch klein genug, um theoretisch den Kernporenkomplex durch Diffusion zu durchqueren. Wenn aber die Deletionsmutante 16L2 13-455 nur durch Diffusion in den Kern gelangt wäre, dann hätte man einen weniger eindeutigen Kernimport erwartet. (Vgl. diffuse zelluläre Verteilung des 50 kDa-großen GFP<sub>2</sub>-Proteins).

Es ist nicht zwingend notwendig, dass die terminalen Sequenzen für den Kernimport von L2 verantwortlich sein müssen. Auch wenn sie prinzipiell in der Lage sind mit Karyopherinen zu interagieren und ein zytoplasmatisches Protein in den Kern dirigieren können. So ist z. B. der C-Terminus von L2 mit seiner cNLS während der Morphogenese von Hsc70 maskiert und unzugänglich für Importine (Florin et al., 2004). Der N-Terminus mit seinen basischen Sequenzen könnte durch Faltungen ebenfalls verdeckt sein. Dies wäre durchaus sinnvoll, da in diesem Bereich eine Furinspaltstelle lokalisiert ist, die geschützt werden muss (Richards et al., 2006).

Bisher konnte für keinen HPV-Typ gezeigt werden, dass die zentrale, basische Region von L2 in der Lage ist den Kernimport eines zytoplasmatischen Proteins zu dirigieren. Diese Tatsache war das Hauptargument für die These, dass die mittlere Region beispielsweise in HPV16 L2 kein NLS darstellt (Darshan et al., 2004). Aufklärung konnten die Untersuchungen von GFP-L2 Fusionskonstrukten in dieser Arbeit liefern. So war GFP<sub>2</sub>-16L2 291-315 durchaus in der Lage deutlicher im Kern zu akkumulieren als GFP<sub>2</sub> allein. Eine eindeutige Verbesserung der Kerntranslokation konnte erreicht werden, wenn zusätzlich flankierende Sequenzen (Aminosäuren 280-330) mit eingefügt wurden. Untermuert wurden diese Ergebnisse durch einen Importassay mit Digitonin-behandelten HeLa-Zellen. Hier konnte die Aminosäureregion 280-330 von HPV16 L2 durch die externe Zugabe von zytosolischen Faktoren das Reporterprotein GST ebenfalls in den Kern dirigieren. Die Ergebnisse unterstützen weiter die Hypothese, dass die zentrale Region von HPV16 L2 während der Morphogenese hauptverantwortlich für die Kernlokalisierung des Kapsidproteins ist.

Es bleibt dennoch die Frage offen, warum es bisher nicht gelungen war, die Funktion dieser Region als Kernlokalisierungssignal durch die Fusion an ein Reporterprotein zu beweisen. In allen früheren Studien wurden Fusionskonstrukte mit L2-Fragmenten verwendet, die kürzer als die in dieser Arbeit gewählte Mindestgröße waren. So wurde beispielsweise in HPV16 die Aminosäureregion 296-318 ausgewählt (Darshan et al., 2004). Wie wichtig aber gerade die flankierenden Sequenzen für die Funktionalität sind, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Vielleicht kann erst durch die Anwesenheit der zusätzlichen L2-Sequenzen eine spezifische Faltung stabilisiert werden. So ist zum Beispiel auch die 22 Aminosäuren umfassende NLS des ribosomalen Proteins rpS7 in seiner ursprünglichen Umgebung effektiver, als wenn es isoliert an GFP fusioniert wird (Jäkel et al., 2002). Es könnte aber auch sein, dass die vorderen, flankierenden Sequenzen lediglich als unspezifischer Abstandhalter zum Reporterprotein benötigt werden. Wird beispielsweise das komplexe Kernlokalisierungssignal des RNA-bindenden Proteins hnRNP K direkt an ein Reporterprotein gekoppelt, ist es nicht funktionsfähig. Erst durch das Einfügen entweder einer hnRNP K-spezifischen Sequenz oder einer zufälligen, heterologen Sequenz zwischen dem Signal und dem Reporterprotein kann der Kernimport vermittelt werden (Michael, Eder, and Dreyfuss, 1997).

### **4.2 Feinkartierung des mNLS**

Der phylogenetische Sequenzvergleich machte deutlich, dass es sich bei der zentralen, basischen Region um einen Bereich in L2 handelt, der in diversen HPV-Typen fast

vollständig konserviert ist. Abgesehen von einem überdurchschnittlich hohen Anteil basischer Aminosäuren, die nicht direkt hintereinander liegen, zeigt diese Region keine Gemeinsamkeiten bezüglich der Sequenz mit bisher charakterisierten Kernlokalisationsignalen. Es war demzufolge interessant zu erfahren, welche Aminosäuren für den Kernimport von essentieller Bedeutung sind. Für die Untersuchungen wurden eine Reihe von HPV16 L2-Mutanten hergestellt, in denen sukzessive alle basischen Aminosäuren der Region 291-315 gegen Alanine ausgetauscht wurden. Es zeigte sich, dass vor allem die vier zentralen Arginine R297, R298, R302 und R305 für die Funktionalität des Kernlokalisationssignals verantwortlich sind. Mutationen dieser 4 Arginine führten zu drastischen Einschränkungen des L2-Kernimportes. Interessanterweise konnte der konservative Austausch der 4 Arginine zu Lysin diesen Kernimport nicht wieder herstellen. Offenbar spielen nicht nur basische Aminosäuren, sondern vor allem die präzise Konformation des mNLS in L2 eine wichtige Rolle. Ähnliche Beobachtungen konnten zum Beispiel für die ausgedehnte NLM-Domäne (Nukleäres Lokalisations Motiv) des Strukturproteins VP2 aus Murine Virus of Minute Mice (MVM) gemacht werden (Lombardo et al., 2000).

Die essentielle Bedeutung dieser 4 zentralen Arginine für die Kerntranslokation, konnte auch durch die Mutagenese des Fusionskonstruktes GFP<sub>2</sub>-L2-280-330 belegt werden. Hier führte die Substitution der Arginine zu Alaninen zu einer ähnlich gleichmäßigen, intrazellulären Verteilung wie bei GFP<sub>2</sub> allein. Mutationen der 4 zentralen Arginine resultierten auch bei HPV18 L2 in massiven Einschränkungen des L2-Kernimportes. Folglich handelt es sich bei diesem zentralen Arginin-Cluster mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Motiv, das in vielen HPV-Typen eine essentielle Rolle für den L2-Kernimport spielt.

Die hoch konservierten, basischen Aminosäuren R291, K309, R313 und R315, die dieses zentrale Arginin-Motiv flankieren, spielen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Mutationen dieser Aminosäuren führten zu keiner Veränderung der intrazellulären Verteilung von HPV16 L2.

Die Aminosäure Glycin an Position 307 ist ebenfalls zu 100% konserviert. Dies spricht für dessen besondere Bedeutung. Die Analyse der intrazellulären Verteilung ergab, dass die Mutation G307A zu keiner Beeinträchtigung der Kerntranslokation von HPV16 L2 führte und demzufolge diese Aminosäure für die Funktion des mNLS nicht essentiell ist. Es gibt Beispiele von Kernimportsignalen, in denen Glycine wichtige Bestandteile der Aminosäuresequenz sind. Ein besonders wichtiger Vertreter ist die M9-Domäne des RNA-bindenden Proteins hnRNP A1 (Iijima et al., 2006). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, ist im Gegensatz dazu das mNLS von HPV16 L2 nicht zu dieser Gruppe zu zählen.

Trotz der Mutation des zentralen Arginin-Motivs R297/8/302/5 in HPV16 L2 konnte ein Teil der exprimierten Mutante immer noch im Zellkern detektiert werden. Im Vergleich dazu verhinderte die gleiche Mutation den aktiven Kernimport von GFP<sub>2</sub>-16L2 280-330 R297/8/302/5A. Das mutierte Fusionskonstrukt präsentierte eine ähnlich diffuse, intrazelluläre Verteilung der GFP-Fluoreszenz wie GFP<sub>2</sub>. Das zeigt, dass die Mutation der 4 zentralen Arginine des mNLS prinzipiell ausreicht, um eine Interaktion mit Kernimportrezeptoren zu blockieren. Dennoch ist es durchaus möglich, dass das mNLS in seiner natürlichen Umgebung deutlich stabiler ist. Zusätzliche Mutationen könnten notwendig sein, damit die Bindungsaffinität des mNLS zu den entsprechenden Importinen vollständig unterbunden werden kann.

Die zusätzliche Deletion der beiden terminalen, basischen Bereiche in der HPV16 L2-Mutante 13-455 R297/8/302/5A führte zu keiner weiteren Reduktion des Kernimportes von L2. Der nicht vollständig blockierte Kernimport von L2 könnte demnach auch nicht durch die Anwesenheit von einer der beiden terminalen, basischen Bereiche erklärt werden, die evtl. den Kernimport von neu synthetisiertem L2 während der Morphogenese unterstützen. Vielleicht ist die Kernlokalisierung der L2-Mutante auch lediglich auf Diffusion durch die Kernporenkomplexe hindurch zurückzuführen. Vielleicht kann HPV16 L2 aber auch mit zellulären Proteinen interagieren, die aktiv in den Kern transportiert werden. Dadurch würden L2-Proteine mit einem defekten Kernimport in den Zellkern kotransportiert werden.

Im Gegensatz zu HPV16 L2 wurde in HPV18 L2 bereits durch die Mutation von 2 der 4 zentralen Arginine des mNLS der Kernimport komplett verhindert. Das mNLS von HPV18 L2 scheint deutlich labiler zu sein. In der Vergangenheit wurde spekuliert, dass HPV18 L2 weitere noch unbekannte Faktoren für einen effektiven Transport in den Kern und an die ND10 benötigt (Kieback and Muller, 2006). Vielleicht bindet das mNLS von HPV18 L2 auch nur mit deutlich geringerer Affinität Kernimportrezeptoren als das mNLS von HPV16 L2. Dies würde die Unterschiede in der Effizienz des Kernimportes zwischen HPV16 und -18 durchaus erklären.

Die Sequenzanalyse der zentralen, basischen Region in L2-Proteinen verschiedener HPV-Typen offenbarte ebenfalls, dass die Arginine von 100% konservierten Serinen oder Threoninen flankiert werden. Serine können wie beispielsweise in den NLS der RNA-bindenden Proteinen hnRNP A1, hnRNP D, hnRNP F oder HuR wichtiger Bestandteil der Erkennungssequenz für Transportrezeptoren sein (Fan and Steitz, 1998; Iijima et al., 2006; Siomi et al., 1997; Suzuki et al., 2005). Serine und Threonine können aber auch die Aktivität eines NLS positiv oder negativ regulieren (Poon and Jans, 2005; Sorokin, Kim, and Ovchinnikov, 2007). So führen Phosphorylierungen in der Nähe von

Kernlokalisierungssignalen wie z.B. bei BPV E1 zu einer intramolekularen Maskierung des NLS (Bian et al., 2007). Phosphorylierungen können den Kernimport aber auch positiv beeinflussen, indem sie die Bindungsaffinität zu Karyopherinen erhöhen. Meist finden diese Formen der Modifikation aber an Aminosäureresten statt, die nicht intrinsisch sondern vorrangig in benachbarter Umgebung zum NLS zu finden sind (Jans and Hubner, 1996). Bekannte intrinsische Phosphorylierungsstellen sind die RS-Domänen von SR-Proteinen. Diese werden wiederum ausschließlich von Transportin SR2 in den Kern importiert (Lai et al., 2000; Lai, Lin, and Tarn, 2001).

Aus diesem Grund war interessant zu erfahren, ob Mutationen von ausgewählten Serinen und Threoninen die intrazelluläre Lokalisation von HPV16 L2 beeinflussen. Sowohl TS295/6 als auch S304 flankieren das zentrale Arginin-Motiv R297/8/302/5 und wurden deshalb für diese Analysen ausgewählt. Weder der Austausch dieser Serine und des Threonins zu Alaninen, noch der konservative Austausch von Serin 304 zu Threonin konnte den Kernimport von L2 oder von GFP-L2 Fusionskonstrukten negativ beeinflussen. Lediglich die Einführung einer permanent negativen Ladung an Position 304 durch Aspartat führte zu einer leichten Retention von L2 im Zytoplasma. Damit kann zum einen ausgeschlossen werden, dass diese untersuchten Aminosäuren Bestandteil der Erkennungssequenz für Transportrezeptoren sind. Zum anderen ist anzunehmen, dass eventuelle Phosphorylierungen dieser Aminosäuren keinen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität des mNLS besitzen.

Die genaue Analyse der Doppelmutante TS295/6A zeigte im Vergleich mit 16L2wt aber ein deutlich abweichendes Verteilungsmuster von L2 im Kern. Normalerweise akkumuliert L2 während der Morphogenese im Kern an ND10 (Day et al., 1998) und bewirkt deren Reorganisation. L2 initiiert die Ablösung von SP100 aus ND10 und die Rekrutierung des transkriptionellen Regulators Daxx (Florin et al., 2002b). ND10 scheinen ein geeignetes Milieu für die virale Transkription darzustellen (Ishov, Stenberg, and Maul, 1997) und auch die Replikation und Transkription von Papillomviren ist mit ND10 assoziiert (Swindle et al., 1999). Des Weiteren geht man davon aus, dass an diesen Strukturen die Morphogenese der Papillomviren erfolgt (Day et al., 1998; Florin et al., 2002a). Durch die Binding von Histon-Deacetylasen (HDACs) oder Transkriptionsfaktoren kann Daxx die zelluläre Transkription reprimieren (Hollenbach et al., 1999; Lehembre et al., 2001; Li and Chen, 2000; Li et al., 2000). Die Rekrutierung von Daxx ermöglicht damit die Termination der viralen Replikation und Transkription als Voraussetzung für den anschließenden Zusammenbau der Virionen. Die Doppelmutante TS295/6A war nicht mehr in der Lage mit PML, dem Hauptbestandteil der ND10, zu kolokalisieren. Sie bildete selbst organisierte Proteinaggregate mit unterschiedlichem Muster aus und konnte auch nicht mehr mit Daxx interagieren. In früheren

Untersuchungen wurde die ND10-Lokalisationsdomäne (NDLD) in HPV33 L2 innerhalb der Aminosäureregion 390-420 kartiert (Becker et al., 2003). Der Einsatz von GFP-33L2 390-420 Fusionskonstrukten zeigte aber, dass flankierende Sequenzen auch notwendig sind. Vielleicht sind weitere Bereiche von L2 abseits der NDLD, wie z. B. TS295/6, für die Assoziation an ND10 ebenfalls essentiell. Wie die diffuse Kernfluoreszenz von GFP-L2 280-330 bestätigt, ist das mNLS alleine nicht in der Lage mit ND10 zu interagieren. Dass die Mutation TS295/6A nicht zwangsweise zu einer Aggregation führt, zeigt ebenfalls die diffuse, nukleäre Verteilung des Fusionskonstruktes GFP<sub>2</sub>-L2-280-330-TS295/6A. Es wäre interessant zu überprüfen, ob eine der beiden Aminosäuren (TS295/6) ein Substrat für spezifische Kinasen darstellt. Posttranslationale Modifikation wie, z. B. Phosphorylierungen sind wichtige Regulationsmechanismen für die Assoziation von Proteinen mit ND10-Strukturen (Everett et al., 1999; Ishov, Vladimirova, and Maul, 2004). Ob solche oder andere Modifikationen ebenfalls bei der Assoziation von L2 mit ND10 eine Rolle spielen, ist eine interessante Frage für weitere Forschungsarbeiten. Die weiterführende Untersuchung der Mutante 16L2 TS295/6A könnte dabei von großem Nutzen sein.

Studien mit PML-negativen Zellen zeigten, dass L2 auch unabhängig von ND10 selbst organisierte Proteinaggregate ausbildet und den transkriptionellen Regulator Daxx an diese Strukturen rekrutiert (Becker et al., 2004). Es wurde spekuliert, dass die für diese Rekrutierung verantwortliche L2-Region eventuell ebenfalls in der NDLD zu finden ist. Wie bereits erwähnt konnte aber die Mutation TS295/6A die Interaktion von L2 mit Daxx inhibieren. Es wäre in der Zukunft interessant zu erfahren, ob vielleicht die Daxx-Interaktionsdomäne nicht in der NDLD sondern überlappend mit dem Bereich des mNLS existiert.

### **4.3 Interaktion des mNLS mit Hsc70**

Während der Morphogenese ist der L2-Kernimport von der Interaktion mit dem zellulären Chaperon Hsc70 abhängig (Florin et al., 2004). Hsc70 maskiert den basischen C-Terminus von L2 und verhindert damit unerwünschte Interaktionen mit Mikrotubuli und Assoziationen mit Membranen (Kämper et al., 2006). Das Chaperon wird anschließend zusammen mit L2 in den Zellkern und an die ND10 transportiert. Hsc70 kolokalisiert aber auch mit einer C-Terminal verkürzten L2-Mutante an ND10. Daher muss neben dem C-Terminus noch eine weitere Region in L2 existieren, die in der Lage ist mit Hsc70 zu interagieren. Auf der Suche nach der zweiten Hsc70-Interaktionsdomäne wurden der mNLS-vermittelte Kernimport und die mögliche Rolle von Hsc70 näher untersucht.

Die Bindung von Transportrezeptoren an ausgedehnte Kernlokalisierungssignale ist häufig von der Konformation des betreffenden NLS abhängig (Lombardo et al., 2000). Zelluläre

Chaperone können dabei die Ausbildung einer bestimmten Konformation wie z. B. die des mNLS unterstützen (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Darüber hinaus sind sie in der Lage Proteine mit ausgedehnt basischen Bereichen auf dem Weg zu ihrem Zielort vor unerwünschten Interaktionen zu schützen. Neben dem L2 Protein gibt es zahlreiche weitere Beispiele, bei denen die Bindung von Hsc70 für den Kernimport notwendig ist. Dazu zählen z. B. der Wachstumsfaktor NF $\kappa$ B (Fujihara and Nadler, 1999), das Tumorsuppressorprotein p53 (Akakura et al., 2001) und das SV40 T-Antigen (Imamoto et al., 1992).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hsc70 nicht mit GFP<sub>2</sub>-L2 280-330 im Zellkern akkumuliert. Der Import des Fusionskonstruktes führte zu keiner Veränderung der primär zytoplasmatischen Lokalisation von Hsc70. Darüber hinaus zeigte die Depletion von Hsc70, dass der mNLS-vermittelte Kernimport auch unabhängig von Hsc70 erfolgen kann. Diese Ergebnisse lassen folgende Rückschlüsse zu: Zum einen spielt Hsc70 beim Kernimport des mNLS von L2 keine wichtige Rolle, indem es z. B. eine bestimmte Konformation stabilisiert. Zum anderen ist das mNLS keine zweite Bindedomäne für Hsc70. Mögliche unerwünschte Interaktionen des mNLS mit anderen Molekülen im Zytoplasma müssten demzufolge auf eine andere Art und Weise verhindert werden. Es ist z. B. bekannt, dass auch Transportrezeptoren diese Funktion der Maskierung übernehmen können (Jäkel et al., 2002).

### **4.4 Rolle des mittleren Kernlokalisationssignals bei der Infektion**

Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von L2 absolut unentbehrlich für die Etablierung der Infektion sind (Roden et al., 2001). Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Annahme, dass eine der beiden basischen L2-Termini als NLS für den L2-Kernimport während der Infektion verwendet wird (Fay et al., 2004). In neueren Untersuchungen konnte aber demonstriert werden, dass andere Ursachen als ein blockierter Kernimport von L2 für die inhibierte Infektion mit N- und C-terminalen Deletionsmutanten verantwortlich sind. So konnte am N-Terminus eine Furinspaltstelle lokalisiert werden, deren Deletion die Infektion blockiert. Es wurde gezeigt, dass der N-Terminus von L2 zusammen mit seiner nNLS während der frühen Phase der Infektion durch die Protease Furin abgespalten wird (Richards et al., 2006). Die N-terminale Region steht demzufolge für eine Interaktion mit Importinen nicht mehr zur Verfügung. Durch die Entfernung der C-terminalen Sequenzen fehlt L2 seine Membran-destabilisierende Domäne und das Protein ist nicht mehr in der Lage den endosomalen Austritt zu induzieren (Kämper et al., 2006). Darüber hinaus wird die Interaktion mit Dynein im Zytoplasma verhindert und es kann kein gerichteter Transport an den Mikrotubuli mehr stattfinden (Florin



et al., 2006). In BPV L2 konnte durch eine zufällige, heterologe Sequenz von basischen Aminosäuren im Bereich der C-terminalen NLS die Infektion aber nicht die Interaktion mit  $Kap\alpha_2$  /  $Kap\beta_1$  wiederhergestellt werden (Fay et al., 2004). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass andere Bereiche als die beiden basischen Termini von L2 für den Kernimport während der Infektion verantwortlich sein müssen.

Die Untersuchungen der Infektionsrate von HPV16- und HPV18-Pseudovirionen mit einem veränderten mNLS-L2 Motiv zeigten, dass das mNLS nicht nur während der Morphogenese sondern auch während der Infektion eine große Rolle spielt. Mutationen des zentralen Arginin-Motivs R297/8/302/5 in HPV16-Pseudovirionen bewirkten signifikante Veränderungen der Infektionseffizienz. Bereits die Doppelmutation R302/5A führte zu einer vollständigen Blockierung der Infektion. Punktmutationen, die den Kernimport von neu synthetisiertem L2-Protein während der Morphogenese nicht negativ beeinflussten, führten auch zu keiner Veränderung der Infektionsrate. Eine nicht erklärbare Ausnahme bildeten hierbei die Mutationen von Serin an Position 304.

Die Mutation der 4 zentralen Arginine resultierte auch bei HPV18-Pseudovirionen in massiven Einschränkungen der Infektionsrate. Ebenso wie bei 16L2 R302/5A inhibierte der homologe Austausch R295/8A in 18L2 bereits die Infektion mit Pseudovirionen vollständig und demonstriert damit erneut die essentielle Bedeutung des mNLS während der Infektion.

Die Unterscheidung von infizierten und nicht infizierten Zellen erfolgte durch die mikroskopische Detektion der Expression des Markerplasmides GFP<sub>2</sub>-33L1NLS. Eine Inhibierung der Infektionsrate könnte demzufolge auch auf eine verhinderte DNA-Verpackung zurückzuführen sein. Basische Bereiche, wie z. B. das mNLS von L2, können an der Interaktion mit DNA beteiligt sein (LaCasse and Lefebvre, 1995). Es ist außerdem bekannt, dass L2 einen Einfluss auf die Effizienz der DNA-Verpackung besitzt (Buck et al., 2005b; Holmgren et al., 2005). Aus diesem Grund musste überprüft werden, ob der Einbau von L2-Mutanten zu einer gestörten DNA-Verpackung führte. Die Quantifizierung der verpackten Markerplasmid-DNA mit Hilfe von quantitativen *Real-Time* PCR Analysen zeigten aber keine gravierenden Veränderungen. Das Markerplasmid in mutierten HPV16- und HPV18-Pseudovirionen wurde ohne Unterschiede zu wt-Pseudovirionen verpackt (z. T. in Zusammenarbeit mit M. Bienkowska-Haba, Labor M. Sapp). Demzufolge müssen die Veränderungen in der Infektionsrate mit mutierten Pseudovirionen andere Ursachen als eine gestörte DNA-Verpackung haben.

Eine Erklärung der inhibierten Infektion konnten konfokale Mikroskopanalysen liefern, die in Zusammenarbeit mit M. Bienkowska-Haba (Labor M. Sapp) durchgeführt wurden. Es wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen die intrazelluläre Lokalisation von HPV16 L2-

mNLS Mutanten und der verpackten Marker-DNA während der Infektion untersucht. L2wt kolokalisierte zusammen mit dem Markerplasmid im Kern an ND10-Strukturen. Wie bereits erwähnt findet an diesen Strukturen die Replikation und Transkription von Papillomviren statt (Swindle et al., 1999).

Bei der Infektion mit Pseudovirionen, deren zentrales Arginin-Motiv R297/8/302/5 in L2 mutiert wurde, konnte das Kapsidprotein nur im Zytoplasma und nicht im Zellkern detektiert werden. Der zentrale, basische Bereich von L2 ist also auch für den Kernimport des Kapsidproteins während der Infektion hauptverantwortlich. Erstaunlicherweise konnte aber die Marker-DNA trotzdem im Kern an den ND10-Strukturen detektiert werden. Demzufolge kann entgegen bisherigen Annahmen die verpackte DNA auch unabhängig von L2 in den Kern importiert werden und kolokalisiert an ND10.

Einen interessanten Phänotyp zeigten Pseudovirionen mit der L2-Mutation R297/8A. Auch bei dieser Mutation konnte L2 nur im Zytoplasma detektiert werden und die DNA akkumulierte im Kern an ND10. Trotzdem war die Infektion nicht vollständig blockiert. In diesem Fall wurde die Infektion erst durch die Mikroinjektion von L2-spezifischen Antikörpern ins Zytoplasma infizierter Zellen inhibiert (Daten von M. Bienkowska-Haba). Weiterführende Untersuchungen mit dieser Mutante könnten wichtige Hinweise über den zu Grunde liegenden Mechanismus liefern, der zur Inhibierung der Infektion führt.

Auch wenn die verpackte DNA unabhängig von L2 in den Kern importiert werden kann, muss das Markerplasmid der mutanten Pseudovirionen nach der Endosomolyse in die Nähe der Kernporenkomplexe gelangen. Die freie Diffusion der DNA innerhalb des Zytoplasmas ist stark größenabhängig. Sie findet ab einer Größe von 2 kb praktisch nicht mehr statt (Lukacs et al., 2000). Dabei ist das engmaschige Zytoskelett der Haupthinderungsgrund für eine freie Diffusion (Dauty and Verkman, 2005). Das ca. 6 kb große Markerplasmid ist deshalb alleine nicht in der Lage die Kernmembran zu erreichen. L1 kommt als Partner für den DNA-Transport im Zytoplasma nicht in Frage. Infektionen mit Pseudovirionen deren Kapsid lediglich aus dem L1-Protein gebildet wird, zeigten eine Kolokalisation von L1 mit dem Markerplasmid in Lysosomen (Day et al., 2004). Die konfokalen, mikroskopischen Aufnahmen der mutanten Pseudovirionen zeigten, dass zu einem frühen Zeitpunkt die DNA noch mit L2 im Zytoplasma assoziiert ist. Das bedeutet die DNA wird durch den L2-vermittelten Transport entlang von Mikrotubuli in die Kernperipherie transportiert und kann anschließend losgelöst von L2 in den Kern importiert werden.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass für eine erfolgreiche Infektion der Kernimport und die ND10-Lokalisation der Virus-DNA alleine nicht ausreichend sind. Hierfür ist der Import von L2 und dessen Assoziation mit ND10 zusammen mit der DNA absolut notwendig. In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die fehlende L2 Assoziation mit der Marker-DNA an den ND10 zu einer Blockierung der Transkription führt.

Welche Domäne von L2 für die Stimulierung der Transkription verantwortlich sein könnte und welche Rolle dabei das mNLS spielt, ist Gegenstand der derzeitigen Untersuchungen. Neueste Studien konnten beispielsweise zeigen, dass Kernlokalisierungssignale wie z.B. die KNS-Domäne von hnRNP K gleichzeitig auch Transkriptionsaktivierungsdomänen darstellen (Chan et al., 2008).

Ebenfalls wichtige Erkenntnisse über die Bedeutung der Assoziation von L2 mit ND10 während der Infektion könnten weiterführende Untersuchung der Mutante L2TS295/6A liefern. In neu synthetisiertem L2-Protein verhinderte die Mutation die Assoziation mit den ND10 und Daxx. Die Doppelmutante hatte auch gleichermaßen drastische Auswirkungen auf die Infektion, die vollständig blockiert wurde. (Abb. 3.13). Konfokale Mikroskopuntersuchungen könnten in diesem Fall Hinweise liefern, ob die Mutante wie bei der Morphogenese nicht mehr in der Lage ist an ND10 zu akkumulieren und wo in diesem Fall das Markerplasmid lokalisiert ist.

### **4.5 Bedeutung spezifischer Kerntransportrezeptoren für die Infektion**

Das Kapsidprotein L2 ist in der Lage mit verschiedenen Kernimportrezeptoren zu interagieren. Bisher wurden *in vitro* für HPV11, -16 und -18 die Interaktionen mit  $\text{Kap}\alpha_2$  /  $\text{Kap}\beta_1$  (Importin  $\alpha_2$  / Importin  $\beta$ ),  $\text{Kap}\beta_2$  (Transportin) und  $\text{Kap}\beta_3$  (RanBP5, Importin5) identifiziert (Bordeaux et al., 2006; Darshan et al., 2004; Klucsevsek et al., 2006). HPV11 L2 ist zusätzlich in der Lage  $\text{Kap}\beta_1$  direkt ohne den Adaptor  $\text{Kap}\alpha_2$  zu binden (Bordeaux et al., 2006). Im Gegensatz dazu bindet das minore Kapsidprotein boviner Papillomviren ausschließlich den Rezeptorkomplex  $\text{Kap}\alpha_2$  /  $\text{Kap}\beta_1$  (Fay et al., 2004). In all diesen Studien wurde aber nicht untersucht, welchen Einfluss diese Interaktionen auf die Infektion besitzen.

Sowohl die Depletion von  $\text{Kap}\beta_2$  als auch  $\text{Kap}\beta_3$  durch die entsprechenden siRNAs reduzierte die Infektionsrate von HPV16-Pseudovirionen jeweils um etwa 30 %. Das L2-Protein ist das einzige virale Protein, das während der Infektion die Virus-DNA in den Kern begleitet (Day et al., 2004). Demzufolge ist es auch das einzige virale Proteine, das mit Importinen während der Infektion interagiert. Sowohl  $\text{Kap}\beta_2$  als auch  $\text{Kap}\beta_3$  scheinen also für den Kernimport von HPV16 L2 während der Infektion eine Rolle zu spielen und können sich möglicherweise gegenseitig kompensieren. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Untersuchungen bei denen die Bindung von  $\text{Kap}\beta_2$  an HPV16 L2 durch  $\text{Kap}\beta_3$  verdrängt werden konnte und umgekehrt (Darshan et al., 2004). Ob weitere Kernimportrezeptoren für die Infektion wichtig sein könnten, müsste in weiteren Untersuchungen gezeigt werden.

Leider war es nicht möglich die Bedeutung von Kap $\beta_1$  für die Infektion mit Pseudovirionen zu analysieren. Aufgrund der Depletion des Karyopherins wurde die Zellteilung massiv gestört und die Zellen wurden anschließend apoptotisch. Ein solches Verhalten wurde bereits in anderen Untersuchungen beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Kap $\beta_1$  den Kernimport des Nukleotidaustauschfaktors RCC1 inhibiert. Im Vergleich mit Kontrollen wurde dadurch die Proliferation von HeLa-Zellen auf 30-50 % gesenkt (Quensel et al., 2004). Die in dieser Arbeit verwendeten Kap $\beta_1$ -siRNAs basierten auf publizierten Daten, bei denen nicht von einer gestörten Proliferation berichtet wurde (Kaku et al., 2008; Nakahara et al., 2006). Dennoch scheinen sie zelluläre Vorgänge massiv zu beeinflussen. Es wäre aber äußerst interessant gewesen zu erfahren, welchen Einfluss Kap $\beta_1$  auf die Infektion mit HPV16-PsV besitzt. HPV16 L2 bindet beispielsweise die beiden Karyopherine Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  mit deutlich höherer Affinität (Darshan et al., 2004). Kap $\beta_1$  interagiert in HPV16 und -18 L2 nur mit Hilfe des Adaptors Kap $\alpha_2$  mit den terminalen Sequenzen. Eine Ausnahme bildet HPV11 L2. Dieses Kapsidprotein ist in der Lage Kap $\beta_1$  auch direkt zu binden (Bordeaux et al., 2006). Der Kernimport während der Infektion muss unabhängig von den beiden terminalen, basischen Bereichen erfolgen. Demzufolge sollte auch die Depletion von Kap $\beta_1$  keine signifikanten Auswirkungen auf die Infektion mit HPV16-Pseudovirionen ausüben. Es sei denn Kap $\beta_1$  kann über einen anderen Adaptor wie z.B. Importin 7 (Jäkel et al., 1999) mit L2 interagieren. Dann könnte Kap $\beta_1$  auch einen Einfluss auf die Infektion besitzen. Die Interaktion von L2 mit Importin 7 wurde bisher *in vitro* noch nicht untersucht.

### **4.6 Interaktion des mNLS mit Kerntransportrezeptoren**

Noch ungeklärt ist die Frage, welche Transportrezeptoren in der Lage sind mit dem mNLS von L2 zu interagieren. Bislang konnten lediglich die terminalen, basischen Bereiche von HPV11, -16 und -18 L2-Proteinen als Bindungsdomänen für Kap $\alpha_2$  / Kap $\beta_1$  eindeutig identifiziert werden. (Bordeaux et al., 2006; Darshan et al., 2004; Klucevsek et al., 2006). Wie bereits erwähnt, interagiert z. B. HPV16 L2 auch mit Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$ . Es konnte aber noch nicht die Region in L2 identifiziert werden, die für diese Assoziation verantwortlich ist. Nicht verwunderlich ist, dass die beiden terminalen, basischen Sequenzen nicht in der Lage waren Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  zu binden (Darshan et al., 2004). Klassische Kernlokalisierungssignale, wozu auch die beiden terminalen Sequenzen zu zählen sind, werden typischerweise nur über den Adaptor Kap $\alpha$  an Kap $\beta_1$  gebunden (Lange et al., 2007). Im Gegensatz dazu erfolgt die direkte Bindung von Importrezeptoren der Importin  $\beta$  Familie wie z. B. Kap $\beta_1$ , Kap $\beta_2$  oder Kap $\beta_3$  hauptsächlich an komplexen und ausgedehnten

Kernlokalisierungssignalen (Fried and Kutay, 2003). Vermutlich ist deshalb das ausgedehnte mNLS von L2 der wahrscheinlichere Partner für die Interaktion mit Kap $\beta_2$  oder Kap $\beta_3$ .

In Präzipitationsversuchen mit dem mNLS von HPV16 L2 konnten in dieser Arbeit nur eine erhöhte Bindungsaffinität mit Kap $\beta_2$  nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde Kap $\beta_3$  von dem mNLS nicht gebunden. Importstudien demonstrierten aber, dass die Importine Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  von ein und derselben Region in HPV16 L2 gebunden werden müssen, da sie sich gegenseitig verdrängen konnten (Darshan et al., 2004). Weiterführende Untersuchungen sind deshalb notwendig, damit diese Frage endgültig aufgeklärt werden kann. Wichtige Versuche wären z. B. Importstudien mit rekombinanten Kernimportrezeptoren. Sie würden zeigen, ob die bereits charakterisierten Karyopherine Kap $\beta_2$  und/oder Kap $\beta_3$  die Bindungspartner des mNLS sind oder ob vielleicht bisher noch nicht getestete Transportrezeptoren in Frage kommen. Im Rahmen der Präzipitationsversuche konnte beispielsweise auch festgestellt werden, dass das mNLS von L2 eine erhöhte Bindungsaffinität zu Kap $\beta_1$  besitzt. Wie bereits erwähnt, ist HPV16 L2 nicht in der Lage Kap $\beta_1$  direkt zu binden (Darshan et al., 2004). Kap $\beta_1$  ist aber von allen Importinen der vielseitigste Importrezeptor. Er kann nicht nur direkt oder über eine der 5 verschiedenen Kap $\alpha$ -Adaptoren mit dem Cargo in Kontakt treten. Kap $\beta_1$  kann auch noch mit anderen Mitgliedern der Importin  $\beta$ -Familie heterodimere Komplexe ausbilden. So vermitteln Importin 7 und Importin 8 ebenfalls als Adaptoren die Bindung zwischen Kap $\beta_1$  und dem Cargo (Görlich et al., 1997). Diese beiden Karyopherine wurden hinsichtlich einer Interaktion mit L2 noch nicht getestet. Vor allem der Komplex Kap $\beta_1$  / Importin 7 scheint spezialisiert für die Bindung von ausgedehnten NLS zu sein (Bauerle, Doenecke, and Albig, 2002).

Weitere bekannte und im Kontext mit L2 noch nicht untersuchte Transportrezeptoren sind z. B. Importin 4, Importin 9a und Importin 9b, die unter anderem den Kerntransport von ribosomalen Proteinen oder Histonen vermitteln (Jäkel et al., 2002). Importin 11 ist ebenfalls an dem Transport von ribosomalen Proteinen beteiligt (Plafker and Macara, 2002). All diese Transportrezeptoren sind aus einem Grund interessant. Sie vermitteln den Kernimport von Proteinen mit ausgedehnten Kernlokalisierungssignalen, in denen die basischen Aminosäuren, hauptsächlich Arginine, nicht direkt hintereinander liegen. Ein solches Beispiel ist die BIB-Domäne (engl.  *$\beta$ -like Import Receptor Binding*) von ribosomalen Proteinen, die dem mNLS von L2 sehr ähnlich ist.

Es ist zu vermuten, dass der zentrale, basische L2-Bereich von mehreren Importinen erkannt und gebunden werden kann. Vor allem ausgedehnte Kernlokalisierungssignale, wozu auch das mNLS zu zählen ist, machen von dieser Strategie gebrauch. So werden wie bereits angedeutet die NLS der ribosomalen Proteinen (Jäkel and Görlich, 1998) und der Histone

(Mühlhäusser et al., 2001) aber auch die NLS des Rev-Proteins von HIV1 (Arnold et al., 2006) oder des Signal Recognition Particle SRP19 (Dean et al., 2001) von einer Reihe von Transportrezeptoren gebunden. Dadurch kann sicher gestellt werden, dass das entsprechende Protein tatsächlich in den Kern importiert wird. Präzipitationsversuche mit rekombinanten Importrezeptoren könnten in zukünftigen Forschungsarbeiten wichtige Daten liefern, ob weitere als die bisher charakterisierten Importine für die Bindung mit L2 in Frage kommen.

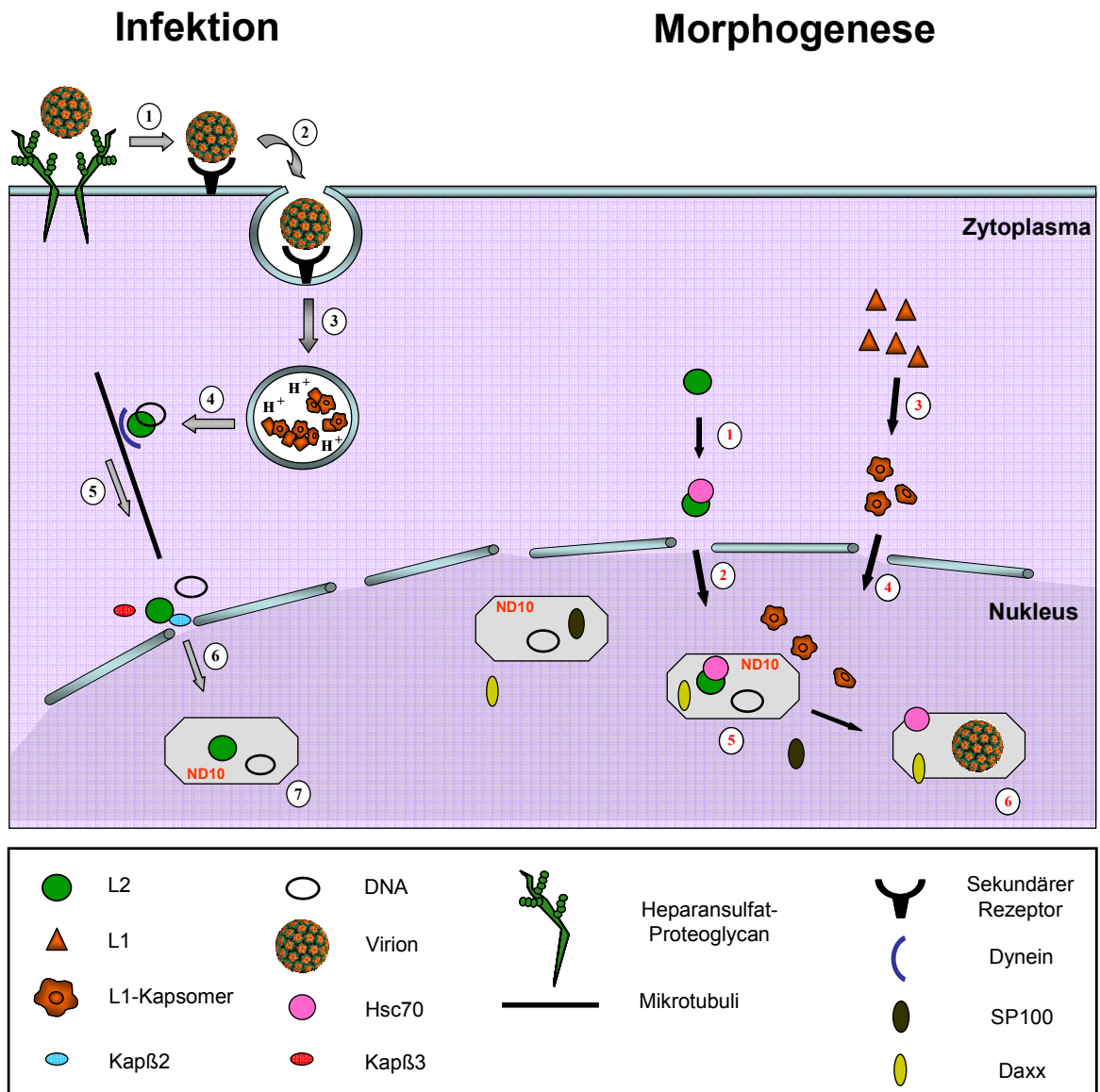
### 4.7 Das Arbeitsmodell

Die im Rahmen dieser und vorheriger Arbeiten erzielten Erkenntnisse tragen dazu bei, die Abläufe während Infektion und Morphogenese von Papillomviren besser und detaillierter zu verstehen. Ein Modell soll die aufeinanderfolgenden Schritte nochmals verdeutlichen.

Nach der Bindung an den Primärrezeptor Heparansulfat-Proteoglycan erfolgt die Übergabe des Virions auf einen noch unbekanntem Sekundärrezeptor (1) und die Endozytose (2). Die Ansäuerung in den späten Endosomen bewirkt die Zerstörung der Kapsidstruktur (3) und durch die membrandestabilisierende Domäne von L2 kann das Kapsidprotein zusammen mit der Virus-DNA freigesetzt werden (4). Aufgrund der Interaktion von L2 mit Dynein erfolgt im Anschluss der gemeinsame Transport mit der Virus-DNA entlang an Mikrotubuli in die Nähe der Kernmembran (5). Der darauf folgende Kernimport von L2 wird während der Infektion über dessen zentralen, basischen Bereich (mNLS) vermittelt. Hierbei scheint die Interaktion mit den beiden Karyopherinen Kap $\beta_2$  und Kap $\beta_3$  eine wichtige Rolle zu spielen (6). Der Transport von L2 und der DNA durch die Kernporenkomplexe in den Zellkern muss aber nicht gemeinsam erfolgen. Im Gegensatz dazu ist für die Transkription und Replikation des Virus-Genoms im Zellkern die Kolokalisation des L2-Proteins mit der DNA an ND10 essentiell (7).

In der späten Phase des Lebenszyklus von Papillomviren findet die Morphogenese statt. Zu Beginn wird nur das minore Kapsidprotein L2 exprimiert. Der C-Terminus von L2 wird durch die Interaktion mit Hsc70 maskiert und unerwünschte Interaktionen können dadurch verhindert werden (1). Gemeinsam werden diese beiden Proteine in den Kern importiert (2). Hauptverantwortlich für die Interaktionen mit Karyopherinen wie z. B. Kap $\beta_2$  ist das mNLS von L2 mit seinem zentralen Arginin-Motiv. Der Zusammenbau von 5 L1-Molekülen zu Kapsomeren findet bereits im Zytoplasma statt (3). Diese werden dann mit Hilfe der Interaktion von Kap $\alpha_2$  / Kap $\beta_1$  in den Zellkern importiert (4). Im Zellkern akkumuliert der L2-Hsc70 Komplex an ND10. Dort induziert L2 den Ausschluss von SP100 und die verstärkte

Akkumulation von Daxx in ND10. Die L1-Kapsomere werden L2-abhängig ebenfalls in ND10 rekrutiert. (5). Nach der Beendigung der viralen Transkription und Replikation kommt es zum Zusammenbau der Virionen und erst durch die Verpackung der DNA in die Viren wird Hsc70 ausgeschlossen (6).



**Abb. 4.1: Das Arbeitsmodell - Infektion und Morphogenese von Papillomviren.** Die einzelnen Schritte sind durchnummeriert und im Text erklärt.

## 5 Zusammenfassung

Das minore Kapsidprotein L2 humaner Papillomviren wird im Laufe des HPV-Lebenszyklus zweimal in den Zellkern importiert und akkumuliert dort an den Nukleären Domänen 10 (ND10). Der erste Kernimport erfolgt in der frühen Phase der Infektion zusammen mit der Virus-DNA. Für den Zusammenbau von Virionen wird neu synthetisiertes L2-Protein ein weiteres Mal in den Kern transportiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Domäne von L2 identifiziert werden, die für den Kernimport von HPV16 L2 absolut notwendig ist. Dabei gelang es diesen Bereich auf 25 Aminosäuren einzuengen. Sowohl während der frühen Phase der Infektion als auch während der Morphogenese scheint die zentrale, basische Aminosäureregion 291-315 (mNLS) hauptverantwortlich für die Interaktion mit Kernimportrezeptoren zu sein. Möglicherweise leisten dabei flankierende Sequenzen einen Beitrag zur Stabilisierung der notwendigen Konformation.

Des Weiteren gelang die Identifizierung der Aminosäuren, die für die Funktionalität des mNLS essentiell sind. Hierbei handelt es sich um ein zentrales Arginin-Motiv, bestehend aus vier dicht beieinander liegenden Argininen, dessen Mutation den Kernimport von L2 während Infektion und Morphogenese verhindert. Untersuchungen mit HPV16 und HPV18 L2-Proteinen verdeutlichten, dass es möglicherweise ein universelles Motiv zu sein scheint und in verschiedenen HPV-Typen konserviert ist.

Flankiert wird dieses Arginin-Motiv von konservierten Serinen und Threoninen. Wie die Analyse von Punktmutationen zeigte, sind diese Aminosäuren für den Kernimport von L2 ohne Bedeutung. Interessanterweise verhinderte aber die Mutation TS295/6A die Kolo-kalisation von L2 mit ND10 im Zellkern. L2wt rekrutiert den transkriptionellen Regulator Daxx. Auch diese Funktion ging bei der Mutante TS295/6A verloren. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur die ND10-Lokalisationsdomäne (AS 390-420) in L2 sondern auch weitere Aminosäuren oder Domänen für die Assoziation mit ND10 und die Rekrutierung von Daxx verantwortlich sein könnten.

Auf der Suche nach zellulären Faktoren, die eine Rolle im mNLS-vermittelten Kernimport spielen, wurde zunächst die Bedeutung von Hsc70 untersucht. Während der Morphogenese maskiert Hsc70 den C-Terminus von L2 und verhindert damit unerwünschte Interaktionen mit Mikrotubuli im Zytoplasma. Es existieren aber weitere noch unbekannte Hsc70-Bindedomänen in L2, die möglicherweise den Kernimport ebenfalls beeinflussen können. Wie die Untersuchungen deutlich machten, ist der zentrale, basische Bereich von L2 aber nicht mit Hsc70 assoziiert und der mNLS-vermittelte Kernimport findet unabhängig von Hsc70 statt.



In einem *siRNA-Screen* wurde anschließend die Rolle von Karyopherinen während der Infektion untersucht. Sowohl Kap $\beta_2$ -*siRNA* als auch Kap $\beta_3$ -*siRNA* waren in der Lage unabhängig voneinander die Infektion von HPV16-Pseudovirionen zu reduzieren. Für beide Karyopherine konnte in der Vergangenheit *in vitro* die Interaktion mit HPV16 L2 nachgewiesen werden. Das L2-Protein ist das einzige virale Protein, das während der Infektion die Virus-DNA in den Kern begleitet (Day et al., 2004). Demzufolge ist es auch das einzige virale Protein, das mit Importinen während der Infektion interagiert. Möglicherweise sind also beide Karyopherine in der Lage sein L2 während der Infektion in den Kern zu importieren.

Abschließend wurden Präzipitationsversuche durchgeführt, die zur Identifizierung möglicher Bindungspartner des mNLS führen sollten. In diesen Versuchen konnte eine erhöhte Bindungsaffinität zu den beiden Importinen Kap $\beta_1$  und Kap $\beta_2$  festgestellt werden. Möglicherweise ist das L2-Protein mit seiner mNLS in der Lage mehrere Importrezeptoren zu binden und für den Kernimport zu nutzen. Eines dieser Importine ist Kap $\beta_2$ . Dieser Importrezeptor scheint sowohl bei der Infektion als auch während der Morphogenese den Kernimport von L2 durch die Bindung an das mNLS zu vermitteln.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L. (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* 111(3), 807-16.
- Akakura, S., Yoshida, M., Yoneda, Y., and Horinouchi, S. (2001). A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J Biol Chem* 276(18), 14649-57.
- Akey, C. W., and Radermacher, M. (1993). Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* 122(1), 1-19.
- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L., and McCance, D. J. (1996). The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. *Embo J* 15(8), 1950-60.
- Arnold, M., Nath, A., Hauber, J., and Kehlenbach, R. H. (2006). Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem* 281(30), 20883-90.
- Arroyo, M., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (1993). Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 13(10), 6537-46.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol.1-3. New York: John Wiley & Sons.
- Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W. (2001). Characterisation of nuclear localisation signals of the four human core histones. *J Cell Biochem* 81(2), 333-46.
- Baker, T. S., Newcomb, W. W., Olson, N. H., Cowser, L. M., Olson, C., and Brown, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* 60(6), 1445-56.
- Bauerle, M., Doenecke, D., and Albig, W. (2002). The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. *J Biol Chem* 277(36), 32480-9.
- Bayliss, R., Littlewood, T., and Stewart, M. (2000). Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* 102(1), 99-108.
- Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., Maul, G. G., and Sapp, M. (2004). Nuclear localization but not PML protein is required for incorporation of the papillomavirus minor capsid protein L2 into virus-like particles. *J Virol* 78(3), 1121-8.
- Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., and Sapp, M. (2003). Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. *Virology* 314(1), 161-7.
- Belnap, D. M., Olson, N. H., Cladel, N. M., Newcomb, W. W., Brown, J. C., Kreider, J. W., Christensen, N. D., and Baker, T. S. (1996). Conserved features in papillomavirus and polyomavirus capsids. *J Mol Biol* 259(2), 249-63.

- Bergsdorf, C., Beyer, C., Umansky, V., Werr, M., and Sapp, M. (2003). Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. *FEBS Lett* **536**(1-3), 120-4.
- Bernard, H. U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* **32 Suppl 1**, S1-6.
- Bian, X. L., Rosas-Acosta, G., Wu, Y. C., and Wilson, V. G. (2007). Nuclear import of bovine papillomavirus type 1 E1 protein is mediated by multiple alpha importins and is negatively regulated by phosphorylation near a nuclear localization signal. *J Virol* **81**(6), 2899-908.
- Bird, G., O'Donnell, M., Moroianu, J., and Garcea, R. L. (2008). Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. *J Virol* **82**(20), 9848-57.
- Bischoff, F. R., and Gorlich, D. (1997). RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett* **419**(2-3), 249-54.
- Bischoff, F. R., and Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**(6348), 80-2.
- Bordeaux, J., Forte, S., Harding, E., Darshan, M. S., Klucsevsek, K., and Moroianu, J. (2006). The L2 minor capsid protein of low-risk human papillomavirus type 11 interacts with host nuclear import receptors and viral DNA. *J Virol* **80**(16), 8259-62.
- Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1999). The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *Embo J* **18**(9), 2449-58.
- Buck, C. B., Cheng, N., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Steven, A. C., Schiller, J. T., and Trus, B. L. (2008). Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* **82**(11), 5190-7.
- Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2004). Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol* **78**(2), 751-7.
- Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2005a). Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol Med* **119**, 445-62.
- Buck, C. B., Thompson, C. D., Pang, Y. Y., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2005b). Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol* **79**(5), 2839-46.
- Caceres, J. F., Screatton, G. R., and Krainer, A. R. (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* **12**(1), 55-66.
- Chan, J. Y., Huang, S. M., Liu, S. T., and Huang, C. H. (2008). The transactivation domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overlaps its nuclear shuttling domain. *Int J Biochem Cell Biol* **40**(10), 2078-89.
- Chen, E. Y., Howley, P. M., Levinson, A. D., and Seeburg, P. H. (1982). The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature* **299**(5883), 529-34.

- Chen, X. S., Garcea, R. L., Goldberg, I., Casini, G., and Harrison, S. C. (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell* **5**(3), 557-67.
- Chow, L. T., and Broker, T. R. (1994). Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* **37**(3-4), 150-8.
- Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T., and Wang, T. S. (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* **274**(5), 2696-705.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M., and Conti, E. (2007). Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* **76**, 647-71.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T., and Matunis, M. J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* **158**(5), 915-27.
- Cros, J. F., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. (2005). An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic* **6**(3), 205-13.
- Darshan, M. S., Lucchi, J., Harding, E., and Moroianu, J. (2004). The I2 minor capsid protein of human papillomavirus type 16 interacts with a network of nuclear import receptors. *J Virol* **78**(22), 12179-88.
- Dauty, E., and Verkman, A. S. (2005). Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery. *J Biol Chem* **280**(9), 7823-8.
- Davy, C. E., Jackson, D. J., Raj, K., Peh, W. L., Southern, S. A., Das, P., Sorathia, R., Laskey, P., Middleton, K., Nakahara, T., Wang, Q., Masterson, P. J., Lambert, P. F., Cuthill, S., Millar, J. B., and Doorbar, J. (2005). Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *J Virol* **79**(7), 3998-4011.
- Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(39), 14252-7.
- Day, P. M., Gambhira, R., Roden, R. B., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2008). Mechanisms of human papillomavirus type 16 neutralization by I2 cross-neutralizing and I1 type-specific antibodies. *J Virol* **82**(9), 4638-46.
- Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* **72**(1), 142-50.
- de Villiers, E. M. (1994). Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* **186**, 1-12.
- de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**(1), 17-27.
- de Villiers, E. M., Gissmann, L., and zur Hausen, H. (1981). Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* **40**(3), 932-5.

- Dean, K. A., von Ahsen, O., Gorlich, D., and Fried, H. M. (2001). Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin. *J Cell Sci* **114**(Pt 19), 3479-85.
- Dell, G., Wilkinson, K. W., Tranter, R., Parish, J., Leo Brady, R., and Gaston, K. (2003). Comparison of the structure and DNA-binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J Mol Biol* **334**(5), 979-91.
- Demeret, C., Goyat, S., Yaniv, M., and Thierry, F. (1998). The human papillomavirus type 18 (HPV18) replication protein E1 is a transcriptional activator when interacting with HPV18 E2. *Virology* **242**(2), 378-86.
- Deng, T., Engelhardt, O. G., Thomas, B., Akoulitchev, A. V., Brownlee, G. G., and Fodor, E. (2006). Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* **80**(24), 11911-9.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* **110**(5), 525-41.
- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., and Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* **352**(6338), 824-7.
- Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R., and Orr, A. (1999). Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* **112** ( Pt 24), 4581-8.
- Fan, X. C., and Steitz, J. A. (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26), 15293-8.
- Fay, A., Yutzy, W. H. t., Roden, R. B., and Moroianu, J. (2004). The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol* **78**(24), 13447-54.
- Fehrmann, F., and Laimins, L. A. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene* **22**(33), 5201-7.
- Feldherr, C. M. (1962). The nuclear annuli as pathways for nucleocytoplasmic exchanges. *J Cell Biol* **14**, 65-72.
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., and Garcea, R. L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **77**(8), 4818-26.
- Floer, M., Blobel, G., and Rexach, M. (1997). Disassembly of RanGTP-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. *J Biol Chem* **272**(31), 19538-46.
- Florin, L., Becker, K. A., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., Streeck, R. E., and Sapp, M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. *J Virol* **80**(13), 6691-6.
- Florin, L., Becker, K. A., Sapp, C., Lambert, C., Sirma, H., Müller, M., Streeck, R. E., and Sapp, M. (2004). Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70. *J Virol* **78**(11), 5546-53.
- Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E., and Sapp, M. (2002a). Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol* **76**(19), 10009-14.

- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E., and Sapp, M. (2002b). Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein L2. *Virology* **295**(1), 97-107.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, J. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**(6), 1051-60.
- Frey, S., and Gorlich, D. (2007). A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell* **130**(3), 512-23.
- Frey, S., Richter, R. P., and Gorlich, D. (2006). FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* **314**(5800), 815-7.
- Fried, H., and Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* **60**(8), 1659-88.
- Fujihara, S. M., and Nadler, S. G. (1999). Intranuclear targeted delivery of functional NF-kappaB by 70 kDa heat shock protein. *Embo J* **18**(2), 411-9.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., and Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**(16), 2090-100.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E., and Sapp, M. (2001). Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol* **75**(3), 1565-70.
- Gissmann, L., and zur Hausen, H. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (Condylomata acuminata). *Int J Cancer* **25**(5), 605-9.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., and Izaurralde, E. (1997). A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* **138**(1), 65-80.
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F. R. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J* **15**(20), 5584-94.
- Hartl, F. U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**(5561), 1852-8.
- Hines, C. S., Meghoo, C., Shetty, S., Biburger, M., Brenowitz, M., and Hegde, R. S. (1998). DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. *J Mol Biol* **276**(4), 809-18.
- Hinshaw, J. E., Carragher, B. O., and Milligan, R. A. (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* **69**(7), 1133-41.
- Hollenbach, A. D., Sublett, J. E., McPherson, C. J., and Grosveld, G. (1999). The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *Embo J* **18**(13), 3702-11.
- Holmgren, S. C., Patterson, N. A., Ozbun, M. A., and Lambert, P. F. (2005). The minor capsid protein L2 contributes to two steps in the human papillomavirus type 31 life cycle. *J Virol* **79**(7), 3938-48.

- Howley, P. M., Knipe, D. M., and Fields, B. N. (2007). "Fields Virology." Lippincott Williams & Wilkins.
- Iijima, M., Suzuki, M., Tanabe, A., Nishimura, A., and Yamada, M. (2006). Two motifs essential for nuclear import of the hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling sequence M9 core. *FEBS Lett* **580**(5), 1365-70.
- Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., and Yoneda, Y. (1992). Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J Cell Biol* **119**(5), 1047-61.
- Ishii, Y., Ozaki, S., Tanaka, K., and Kanda, T. (2005). Human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 helps capsomeres assemble independently of intercapsomeric disulfide bonding. *Virus Genes* **31**(3), 321-8.
- Ishii, Y., Tanaka, K., and Kanda, T. (2003). Mutational analysis of human papillomavirus type 16 major capsid protein L1: the cysteines affecting the intermolecular bonding and structure of L1-capsids. *Virology* **308**(1), 128-36.
- Ishov, A. M., Stenberg, R. M., and Maul, G. G. (1997). Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol* **138**(1), 5-16.
- Ishov, A. M., Vladimirova, O. V., and Maul, G. G. (2004). Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J Cell Sci* **117**(Pt 17), 3807-20.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W., and Görlich, D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* **16**(21), 6535-47.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D., and Görlich, D. (1999). The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *Embo J* **18**(9), 2411-23.
- Jäkel, S., and Görlich, D. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J* **17**(15), 4491-502.
- Jäkel, S., Mingot, J. M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., and Görlich, D. (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *Embo J* **21**(3), 377-86.
- Jans, D. A., and Hubner, S. (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* **76**(3), 651-85.
- Kaku, N., Matsuda, K., Tsujimura, A., and Kawata, M. (2008). Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin alpha/beta and Ran-guanosine 5'-triphosphate systems. *Endocrinology* **149**(8), 3960-9.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., and Smith, A. E. (1984a). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**(5981), 33-8.

- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984b). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**(3 Pt 2), 499-509.
- Kämper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H. C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T., and Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol* **80**(2), 759-68.
- Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., and Kanda, T. (2001). Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol* **75**(5), 2331-6.
- Kieback, E., and Muller, M. (2006). Factors influencing subcellular localization of the human papillomavirus L2 minor structural protein. *Virology* **345**(1), 199-208.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24), 12180-4.
- Klingelutz, A. J., Foster, S. A., and McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**(6569), 79-82.
- Klucsevsek, K., Daley, J., Darshan, M. S., Bordeaux, J., and Moroianu, J. (2006). Nuclear import strategies of high-risk HPV18 L2 minor capsid protein. *Virology* **352**(1), 200-8.
- Knappe, M., Bodevin, S., Selinka, H. C., Spillmann, D., Streeck, R. E., Chen, X. S., Lindahl, U., and Sapp, M. (2007). Surface-exposed amino acid residues of HPV16 L1 protein mediating interaction with cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* **282**(38), 27913-22.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**(6), 1061-71.
- LaCasse, E. C., and Lefebvre, Y. A. (1995). Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **23**(10), 1647-56.
- Lai, M. C., Lin, R. I., Huang, S. Y., Tsai, C. W., and Tarn, W. Y. (2000). A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem* **275**(11), 7950-7.
- Lai, M. C., Lin, R. I., and Tarn, W. Y. (2001). Transportin-SR2 mediates nuclear import of phosphorylated SR proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(18), 10154-9.
- Laimins, L. A. (1993). The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect Agents Dis* **2**(2), 74-86.
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., and Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**(8), 5101-5.
- Le Roux, L. G., and Moroianu, J. (2003). Nuclear entry of high-risk human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein occurs via several pathways. *J Virol* **77**(4), 2330-7.



- Leder, C., Kleinschmidt, J. A., Wiethe, C., and Muller, M. (2001). Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J Virol* **75**(19), 9201-9.
- Lehembre, F., Muller, S., Pandolfi, P. P., and Dejean, A. (2001). Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML. *Oncogene* **20**(1), 1-9.
- Li, H., and Chen, J. D. (2000). PML and the oncogenic nuclear domains in regulating transcriptional repression. *Curr Opin Cell Biol* **12**(5), 641-4.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J., and Chen, J. D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* **20**(5), 1784-96.
- Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C., and Garcea, R. L. (1997). Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in Escherichia coli: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol* **71**(4), 2988-95.
- Liang, J., Ke, G., You, W., Peng, Z., Lan, J., Kalesse, M., Tartakoff, A. M., Kaplan, F., and Tao, T. (2008). Interaction between importin 13 and myopodin suggests a nuclear import pathway for myopodin. *Mol Cell Biochem* **307**(1-2), 93-100.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Agbandje-McKenna, M., and Almendral, J. M. (2000). A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* **74**(8), 3804-14.
- Longworth, M. S., Wilson, R., and Laimins, L. A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *Embo J* **24**(10), 1821-30.
- Loo, Y. M., and Melendy, T. (2004). Recruitment of replication protein A by the papillomavirus E1 protein and modulation by single-stranded DNA. *J Virol* **78**(4), 1605-15.
- Lounsbury, K. M., and Macara, I. G. (1997). Ran-binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin beta and reduces Ran GTPase-activating protein (RanGAP) inhibition by karyopherin beta. *J Biol Chem* **272**(1), 551-5.
- Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., and Verkman, A. S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **275**(3), 1625-9.
- Mantovani, F., and Banks, L. (1999). The interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* **9**(6), 387-95.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* **135**(6 Pt 1), 1457-70.
- McIntyre, M. C., Ruesch, M. N., and Laimins, L. A. (1996). Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* **215**(1), 73-82.

- Michael, W. M., Choi, M., and Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* **83**(3), 415-22.
- Michael, W. M., Eder, P. S., and Dreyfuss, G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* **16**(12), 3587-98.
- Mühlhäusser, P., Müller, E. C., Otto, A., and Kutay, U. (2001). Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep* **2**(8), 690-6.
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., and Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* **78**(21), 11451-60.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73.
- Nakahara, S., Hogan, V., Inohara, H., and Raz, A. (2006). Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. *J Biol Chem* **281**(51), 39649-59.
- Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D., and Lambert, P. F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol* **79**(20), 13150-65.
- Nelson, L. M., Rose, R. C., and Moroianu, J. (2002). Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. *J Biol Chem* **277**(26), 23958-64.
- Nemergut, M. E., Mizzen, C. A., Stukenberg, T., Allis, C. D., and Macara, I. G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* **292**(5521), 1540-3.
- Ohtsubo, M., Okazaki, H., and Nishimoto, T. (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol* **109**(4 Pt 1), 1389-97.
- Okun, M. M., Day, P. M., Greenstone, H. L., Booy, F. P., Lowy, D. R., Schiller, J. T., and Roden, R. B. (2001). L1 interaction domains of papillomavirus I2 necessary for viral genome encapsidation. *J Virol* **75**(9), 4332-42.
- Paine, P. L., Moore, L. C., and Horowitz, S. B. (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**(5496), 109-14.
- Paintsil, J., Müller, M., Picken, M., Gissmann, L., and Zhou, J. (1996). Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation. *Virology* **223**(1), 238-44.
- Pante, N., and Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**(2), 425-34.
- Pastrana, D. V., Buck, C. B., Pang, Y. Y., Thompson, C. D., Castle, P. E., FitzGerald, P. C., Kruger Kjaer, S., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2004). Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* **321**(2), 205-16.

- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18), 8392-6.
- Peh, W. L., Brandsma, J. L., Christensen, N. D., Cladel, N. M., Wu, X., and Doorbar, J. (2004). The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J Virol* **78**(4), 2142-51.
- Pemberton, L. F., and Paschal, B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**(3), 187-98.
- Plafker, S. M., and Macara, I. G. (2002). Ribosomal protein L12 uses a distinct nuclear import pathway mediated by importin 11. *Mol Cell Biol* **22**(4), 1266-75.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F., and Dreyfuss, G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**(6), 985-94.
- Poon, I. K., and Jans, D. A. (2005). Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* **6**(3), 173-86.
- Quensel, C., Friedrich, B., Sommer, T., Hartmann, E., and Kohler, M. (2004). In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol Cell Biol* **24**(23), 10246-55.
- Rebane, A., Aab, A., and Steitz, J. A. (2004). Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *Rna* **10**(4), 590-9.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A., and Aebi, U. (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* **110**(4), 883-94.
- Ribbeck, K., and Gorlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *Embo J* **21**(11), 2664-71.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., and Gorlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* **17**(22), 6587-98.
- Richards, R. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T., and Day, P. M. (2006). Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5), 1522-7.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**(3), 615-23.
- Roberts, J. N., Buck, C. B., Thompson, C. D., Kines, R., Bernardo, M., Choyke, P. L., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2007). Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nat Med* **13**(7), 857-61.
- Roden, R. B., Day, P. M., Bronzo, B. K., Yutzy, W. H. t., Yang, Y., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (2001). Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. *J Virol* **75**(21), 10493-7.

- Rohde, M., Daugaard, M., Jensen, M. H., Helin, K., Nylandsted, J., and Jaattela, M. (2005). Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms. *Genes Dev* **19**(5), 570-82.
- Ryan, K. J., and Wentz, S. R. (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **12**(3), 361-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sapp, M., Fligge, C., Petzak, I., Harris, J. R., and Streeck, R. E. (1998). Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol* **72**(7), 6186-9.
- Sapp, M., Kraus, U., Volpers, C., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., and Streeck, R. E. (1994). Analysis of type-restricted and cross-reactive epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 and in infected tissues using monoclonal antibodies to the major capsid protein. *J Gen Virol* **75** ( Pt 12), 3375-83.
- Sapp, M., Volpers, C., Müller, M., and Streeck, R. E. (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol* **76** ( Pt 9), 2407-12.
- Schäfer, F., Florin, L., and Sapp, M. (2002). DNA binding of L1 is required for human papillomavirus morphogenesis in vivo. *Virology* **295**(1), 172-81.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**(3), 495-505.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6), 1129-36.
- Schwartz, S. (2008). HPV-16 RNA processing. *Front Biosci* **13**, 5880-91.
- Selinka, H. C., Florin, L., Patel, H. D., Freitag, K., Schmidtke, M., Makarov, V. A., and Sapp, M. (2007). Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol* **81**(20), 10970-80.
- Selinka, H. C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N. D., and Sapp, M. (2003). Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol* **77**(24), 12961-7.
- Selinka, H. C., Giroglou, T., and Sapp, M. (2002). Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. *Virology* **299**(2), 279-287.
- Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* **129**(3), 551-60.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q., and Dreyfuss, G. (1997). Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J Cell Biol* **138**(6), 1181-92.

- Sorokin, A. V., Kim, E. R., and Ovchinnikov, L. P. (2007). Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* **72**(13), 1439-57.
- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C., and Florin, L. (2008). Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE* **3**(10), e3313.
- Steger, G., and Corbach, S. (1997). Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol* **71**(1), 50-8.
- Stoffler, D., Feja, B., Fahrenkrog, B., Walz, J., Typke, D., and Aebi, U. (2003). Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* **328**(1), 119-30.
- Straight, S. W., Herman, B., and McCance, D. J. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* **69**(5), 3185-92.
- Ström, A. C., and Weis, K. (2001). Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* **2**(6), REVIEWS3008.
- Sun, X. Y., Frazer, I., Müller, M., Gissmann, L., and Zhou, J. (1995). Sequences required for the nuclear targeting and accumulation of human papillomavirus type 6B L2 protein. *Virology* **213**(2), 321-7.
- Suzuki, M., Iijima, M., Nishimura, A., Tomozoe, Y., Kamei, D., and Yamada, M. (2005). Two separate regions essential for nuclear import of the hnRNP D nucleocytoplasmic shuttling sequence. *Febs J* **272**(15), 3975-87.
- Swindle, C. S., Zou, N., Van Tine, B. A., Shaw, G. M., Engler, J. A., and Chow, L. T. (1999). Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol* **73**(2), 1001-9.
- Talcott, B., and Moore, M. S. (1999). Getting across the nuclear pore complex. *Trends Cell Biol* **9**(8), 312-8.
- Truant, R., and Cullen, B. R. (1999). The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**(2), 1210-7.
- Trus, B. L., Roden, R. B., Greenstone, H. L., Vrhel, M., Schiller, J. T., and Booy, F. P. (1997). Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat Struct Biol* **4**(5), 413-20.
- Unckell, F., Streeck, R. E., and Sapp, M. (1997). Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol* **71**(4), 2934-9.
- Volpers, C., Sapp, M., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., and Streeck, R. E. (1995). Conformational and linear epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 identified by monoclonal antibodies to the minor capsid protein L2. *J Gen Virol* **76** ( Pt 11), 2661-7.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**(1), 12-9.

- Wang, P., Palese, P., and O'Neill, R. E. (1997). The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**(3), 1850-6.
- Wilson, R., Fehrmann, F., and Laimins, L. A. (2005). Role of the E1-E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **79**(11), 6732-40.
- Yang, R., Day, P. M., Yutzy, W. H. t., Lin, K. Y., Hung, C. F., and Roden, R. B. (2003). Cell surface-binding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. *J Virol* **77**(6), 3531-41.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W., and Jansen-Durr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**(11), 2323-30.
- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B., and Jansen-Durr, P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* **69**(10), 6389-99.
- Zhao, K. N., Hengst, K., Liu, W. J., Liu, Y. H., Liu, X. S., McMillan, N. A., and Frazer, I. H. (2000). BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology* **272**(2), 382-93.
- zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**(5), 342-50.
- zur Hausen, H., and de Villiers, E. M. (1994). Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* **48**, 427-47.

## 7 Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
BPV	Rinder-Papillomvirus ( <i>Bovine Papillomavirus</i> )
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C-Terminus	Carboxyterminus
CMV	Cytomegalovirus
$d_dH_2O$	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
E	früh ( <i>early</i> ) exprimiertes Protein
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykolaminoethylethertetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
<i>et al.</i>	und andere
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>Fetal Calf serum</i> )
g	relative Erdbeschleunigung = $9,80665 \text{ m} \times \text{s}^{-1}$
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HPV	humanes Papillomvirus / humane Papillomviren
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
HSV	Herpes Simplex Virus
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	späte ( <i>late</i> ) exprimiertes Protein
LCR	lange Kontrollregion ( <i>Long Control Region</i> )
M	Molarität (mol / l)
mAK	monoklonaler Antikörper
MDa	Megadalton
ME	Mercaptoethanol
min	Minute(n)
ND10	Nukleäre Domänen 10 ( <i>Nuclear Domain 10</i> )
NDLD	ND10-Lokalisationsdomäne
NES	Kernexportsignal ( <i>Nuclear Export Signal</i> )
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>Nuclear Localization Signal</i> )
NP40	Nonidet-40
NPC	Kernporenkomplexe ( <i>Nuclear Pore Complexes</i> )

nt	Nukleotide
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PML	Protein der promyelotischen Leukämie
POX	Peroxidase
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressor
PsV	Pseudovirionen
PV	Papillomviren
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Rotations / Rounds per Minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
sek	Sekunde(n)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthesephase
SV40	Affen- (Simian) Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U	Einheit der Enzymaktivität ( <i>Unit</i> )
VLP	Virusähnliches Partikel ( <i>Virus-Like Particles</i> )
v / v	Volume per Volume
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w / v	Gewichtseinheit pro Volumen
YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein ( <i>Yellow Fluorescence Protein</i> )

Folgende verbindlich vereinbarten Ein- und Drei-Buchstaben Symbole wurden als Nomenklatur für Nukleinsäuren und Aminosäuren in dieser Arbeit verwendet.

**Tab. 7.1: Symbole für Nukleinsäuren**

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



Tab. 7.2: Symbole für Aminosäuren

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

## Eidesstattliche Erklärung

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

Mainz, den ..... 2008

.....

(Lydia Hilbig)