

Aus dem Institut für Virologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vergleichende Studien zur Rolle der Tetraspanine
CD9, CD81 und CD151 im Infektionsweg des Humanen Papillomvirus Typ 16

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Anna Fritzen
aus Trier

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

08.12.2020

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | IV |
| Abbildungsverzeichnis | VI |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Literaturdiskussion | 3 |
| 2.1 Aufbau der humanen Papillomviren | 3 |
| 2.2 Infektionszyklus der humanen Papillomviren | 4 |
| 2.3 Tetraspanine | 8 |
| 2.4 Aufbau der Tetraspanine..... | 8 |
| 2.5 Tetraspaninreiche Regionen | 9 |
| 2.6 Die Tetraspanine CD151, CD81 und CD9 bei Infektionen | 10 |
| 3 Material | 13 |
| 3.1 Chemikalien und Reagenzien | 13 |
| 3.2 Laborgeräte | 13 |
| 3.3 Labormaterialien | 14 |
| 3.4 Kits und Fertigreagenzien | 14 |
| 3.5 Antikörper..... | 15 |
| 3.5.1 Primäre Antikörper..... | 15 |
| 3.5.2 Sekundäre Antikörper..... | 16 |
| 3.6 siRNA | 16 |
| 3.7 Plasmide | 17 |
| 3.8 Puffer und Lösungen | 17 |
| 3.9 Marker | 18 |
| 3.10 Zellkultur..... | 19 |
| 3.10.1.1 Zelllinien..... | 19 |
| 3.10.1.2 HeLa-Zellen | 19 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.10.1.3 | HaCaT-Zellen | 19 |
| 3.10.1.4 | NHEK..... | 20 |
| 3.10.2 | Medien und Zusätze für die Zellkultur | 20 |
| 4 | Methoden..... | 21 |
| 4.1 | Zellkultur..... | 21 |
| 4.1.1 | Kultivierung der Zellen..... | 21 |
| 4.1.2 | Passagieren der Zelllinien HeLa und HaCaT | 21 |
| 4.1.3 | Passagieren von NHEK..... | 21 |
| 4.1.4 | Bestimmung der Zellzahl | 22 |
| 4.2 | Transfektion von Zellen..... | 22 |
| 4.2.1 | siRNA-Transfektion | 23 |
| 4.2.2 | DNA-Transfektion..... | 23 |
| 4.3 | Herstellung von HPV16-Pseudoviren..... | 23 |
| 4.4 | Infektionsassay | 24 |
| 4.5 | LDH-Assay..... | 25 |
| 4.6 | Gelelektrophorese | 25 |
| 4.7 | Western Blot..... | 27 |
| 4.8 | Ko-Transfektion von siRNA und DNA..... | 28 |
| 4.9 | Durchflusszytometrie..... | 29 |
| 4.10 | HPV16-Bindungsassay | 30 |
| 4.11 | Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie | 31 |
| 4.11.1 | Fixierung und Antikörperfärbung der Zellen..... | 31 |
| 4.11.2 | Mikroskopische Dokumentation | 32 |
| 4.12 | L1-7-Assay..... | 32 |
| 5 | Ergebnisse | 34 |
| 5.1 | Die Depletion von CD9 führt zu gegensätzlichen Auswirkungen auf die HPV16-Infektion in den Zelllinien HeLa, HaCaT und NHEK | 34 |
| 5.2 | Differenz der Expressionsmuster von CD151, CD81 und CD9 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.3 | Geringe Koloalisation von HPV16 und CD9 auf der Zellmembran von infizierten Keratinozyten..... | 41 |
| 5.4 | CD9-Überexpression wirkt sich negativ auf die HPV-Infektionslevel aus..... | 42 |
| 5.5 | CD9 beeinflusst die HPV16-Endozytose | 44 |
| 5.5.1 | Die Depletion von CD9 hat keinen Einfluss auf die initiale Bindung von HPV16 | 44 |
| 5.5.2 | Die Depletion von CD9 führt zu einer Reduktion der HPV16-Endozytose in HeLa-Zellen | 46 |
| 5.5.3 | Die Depletion von CD9 moduliert das HPV16-Kapsid-Disassembly..... | 48 |
| 6 | Diskussion..... | 51 |
| 6.1 | Interaktionspartner Integrine | 56 |
| 6.2 | Interaktionspartner γ -Sekretase | 58 |
| 6.3 | Interaktionspartner EWI..... | 60 |
| 6.4 | Interaktionspartner EGFR und epidermale Wachstumsfaktoren | 61 |
| 6.5 | Interaktionspartner ADAM10 und ADAM17 | 63 |
| 7 | Zusammenfassung | 68 |
| | Literaturverzeichnis | 70 |
| | Danksagung..... | 93 |
| | Tabellarischer Lebenslauf | 94 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---|
| ADAM | Metalloprotease |
| BM | Basalmembran |
| BSA | Rinderserumalbumin (bovine serum albumin) |
| CD9, CD81, CD151, CD63 | Cluster of differentiation 9, 81, 151, 63 (Tetraspanine) |
| CMV | Zytomegalievirus |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagle Serum |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor (growth factor) |
| EGFR | Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor |
| ERK | Extracellular-signal regulated kinases |
| ERM | Proteine Ezrin, Radixin und Moesin |
| EWI-F, EWI-2 | Immunglobuline mit Glu-Trp-Ile (EWI)-Motiv |
| FCS | Fetales Kälberserum (fetal calf serum) |
| GFP | Grün-fluoreszierendes Protein |
| HaCaT | Menschliche nicht-viral transformierte Keratinozyten |
| Hb-EGF, pro Hb-EGF | Heparin-bindendes EGF und Vorstufe (pro-) |
| HCV | Hepatitis-C-Virus |
| HeLa | HPV18-transformierte Keratinozyten |
| HIV | Humanes Immundefizienz Virus |
| HPV | Humanes Papillomvirus |

| | |
|---------------|---|
| HSPG | Heparansulfat-Proteoglykan |
| IF | Immunfluoreszenz |
| L1, L2 | Spät (late) exprimierte Proteine des HPV |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| mMAK | monoklonaler Maus-Antikörper |
| MMP | Matrix-Metalloprotease |
| NAD, NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| NHEK | Normale humane epitheliale Keratinozyten |
| OBSL-1 | Obscurin ähnliches zytoskelettales Adapterprotein |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PEI | Polyethylenimin |
| PIK 3 | Phosphaditylinositid-3-Kinase |
| PML | Protein der promyelotischen Leukämie |
| PsV | Pseudovirus |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SSPE | Subakute sklerosierende Panenzephalitis |
| TEM | Tetraspaninreiche Mikrodomäne |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TGF- α | Epidermaler Wachstumsfaktor (transforming growth factor alpha) |
| TSPAN | Tetraspanin |
| WB | Western Blot |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 2.1 | Zusammenlagerung des L1-Hauptproteins zum Kapsid | 3 |
| Abbildung 2.2 | Frühe Schritte der HPV-Infektion mit den beteiligten Wirtszellfaktoren | 7 |
| Abbildung 2.3 | Aufbau der Tetraspanine..... | 9 |
| Abbildung 2.4 | Tetraspaninreiche Mikrodomänen..... | 10 |
| Abbildung 5.1 | Vergleichende Infektionsversuche mit HPV16-Pseudoviren nach Knockdown von CD151, CD81 und CD9 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen..... | 36 |
| Abbildung 5.2 | Kontrolle der Luciferase-Expression nach Knockdown in HeLa-Zellen | 37 |
| Abbildung 5.3 | Expressionsmuster von CD151, CD81 und CD9 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen..... | 39 |
| Abbildung 5.4 | Räumliche Verteilung von HPV16 und CD9 in HeLa-Zellen..... | 41 |
| Abbildung 5.5 | Infektionsassays nach CD9-Überexpression in HeLa-Zellen | 43 |
| Abbildung 5.6 | Primäre Bindung von HPV16-Pseudoviren an die Zelloberfläche von HeLa-Zellen | 45 |
| Abbildung 5.7 | Kolokalisation von CD63 und HPV16 in Endozytosevesikeln in HeLa- Zellen | 47 |
| Abbildung 5.8 | Das Kapsid-Disassembly von HPV16 wird durch CD9 beeinflusst .. | 50 |
| Abbildung 6.1 | Schematische Zusammenfassung der Abbildungen 5.1 und 5.3 | 53 |
| Abbildung 6.2 | Potenzielle Tetraspanin-Interaktionspartner und Kofaktoren der HPV- Infektion. | 55 |
| Abbildung 6.3 | Infektionsmodell des HPV-Entry | 67 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|--------------|---|----|
| Tabelle 3.1 | Laborgeräte..... | 13 |
| Tabelle 3.2 | Kits und Fertigreagenzien | 14 |
| Tabelle 3.3 | Primäre Antikörper | 15 |
| Tabelle 3.4 | Sekundäre Antikörper | 16 |
| Tabelle 3.5 | Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzen | 16 |
| Tabelle 3.6 | siRNA..... | 16 |
| Tabelle 3.7 | Plasmide | 17 |
| Tabelle 3.8 | Puffer und Lösungen..... | 17 |
| Tabelle 3.9 | Marker..... | 18 |
| Tabelle 3.10 | Zelllinien..... | 19 |
| Tabelle 3.11 | Medien und Zusätze für die Zellkultur | 20 |
| Tabelle 4.1 | Zusammensetzung der Gele zur SDS-Page | 26 |

1 Einleitung

Die Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV) ist die häufigste virale sexuell übertragbare Krankheit weltweit (World Health Organization 2020). Alleine in den USA betrug die Prävalenz von HPV in einer von 2011 bis 2014 an Erwachsenen erhobenen Studie oral 7 % und genital 42 % (McQuillan et al. 2017).

Die humanen Papillomviren gehören zur Familie der Papillomaviridae und bisher wurden über 200 verschiedene Subtypen entdeckt (Arroyo 2020).

Unterteilt werden diese in sogenannte Hoch (high)- und Niedrigrisiko (low-risk) - Typen. Die Infektion mit low-risk-Typen kann vor allem die Bildung gutartiger Warzen hervorrufen. Im Gegensatz dazu können die Hochrisiko-Typen, wie beispielsweise HPV16 und HPV18, nach einer Latenzzeit von Jahren bis Jahrzehnten zur Entstehung von verschiedenen Malignomen, wie dem Gebärmutterhalskrebs, führen (Muñoz et al. 1992; Zur Hausen 2008). Sie konnten allerdings auch als Ursache für Karzinome an Penis, Vulva, Vagina, Anus und dem Mund-Rachenraum identifiziert werden (Forman et al. 2012). So wurden von den schätzungsweise 12,7 Millionen weltweit im Jahr 2008 diagnostizierten Krebserkrankungen etwa 4,8 % mit einer HPV-Infektion in Verbindung gebracht (Forman et al. 2012).

Betrachtet man isoliert die Entität des Zervixkarzinoms, so konnte allein der HPV-Typ 16 in 55 % der Fälle von Gebärmutterhalskrebs detektiert werden (Bruni et al. 2019). Mit einer Prävalenz von 6,5 % weltweit, und 19,8 % speziell in Afrika, zählte dieses im Jahr 2018 zu den vierthäufigsten Krebserkrankungen der Frau (Ferlay et al. 2018).

Für die Erkennung des Zusammenhanges zwischen der Infektion mit den humanen Papillomviren und der Entstehung des Zervixkarzinoms erhielt Harald zur Hausen 2008 den Nobelpreis für Medizin (NobelPrize.org 2020). Auf der Basis dieser Erkenntnisse konnten Impfstoffe gegen die wichtigsten Hochrisiko-Typen und damit gegen Krebs entwickelt werden.

In Deutschland empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) seit Sommer 2014 die Impfung gegen die HPV-Typen 16 und 18 für alle Mädchen im Alter von 9 bis 14 Jahren. Die Impfung sollte idealerweise vor dem ersten Sexualkontakt erfolgen (Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung 2014). Seit 2018 wird auch die Impfung aller Jungen in dieser Alterssparte empfohlen (Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung 2018).

Ist das Plattenepithel erst mit dem Virus infiziert, sind die Eradikationsoptionen begrenzt (Stern et al. 2012). Der Grund hierfür liegt sicherlich einerseits in der Natur des Virus, welches durch lokale oder systemische Therapeutika in den tiefen Hautschichten nur schwer zu erreichen ist. Zum anderen ist der Infektionszyklus des humanen Papillomvirus trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig geklärt.

In den letzten Jahren ist unter anderem eine Gruppe kleiner Transmembranproteine, die Tetraspanine, welche auf den Zielzellen des humanen Papillomvirus, den Epithelzellen, exprimiert werden, in den Fokus der Forschung gerückt.

Vorangehende Publikationen haben bereits einen Zusammenhang zwischen drei dieser Tetraspanine, CD151, CD81 und CD63, und der HPV-Infektion gezeigt (Scheffer et al. 2013; Spoden et al. 2008; Homsí et al. 2014). Bislang nicht

veröffentlichte Untersuchungen deuteten bereits stark darauf hin, dass ein weiteres Tetraspanin, CD9, ebenfalls eine tragende Rolle bei der Infektion spielen könnte.

In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit soll durch verschiedene Methoden der Einfluss der drei Transmembranproteine CD151, CD81 und CD9 auf die frühen Schritte der Infektion mit dem humanen Papillomvirus Typ 16 untersucht werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Aufbau der humanen Papillomviren

Humane Papillomviren sind kleine (ca. 55 nm große), nicht umhüllte DNA-Viren (Doorbar et al. 2015). Ihr Kapsid folgt der Symmetrie eines Polyeders mit zwanzig gleichseitigen Dreiecken (Ikosaeder). Es besteht aus dem Haupt-Kapsidprotein L1 (Baker et al. 1991; Hagensee et al. 1993), welches 72 Pentamere formt, die wiederum über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Sapp et al. 1998). Außer dem Haupt-Kapsidprotein L1 enthält das Virus das Neben-Kapsidprotein L2, welches mit L1 interagiert (Buck et al. 2013). Es konnten bis zu 72 Kopien von L2 in einem Kapsid nachgewiesen werden, was einem Verhältnis von L1 zu L2 von 5:1 entspricht (Buck et al. 2008). Während L1 hauptsächlich für die Kapsidformation und Zellbindung verantwortlich ist, dient L2 der Stabilisierung des Kapsids und spielt eine entscheidende Rolle beim Eintrittsweg des Virus während der Infektion (Finnen et al. 2003; Buck et al. 2008; Wang und Roden 2013; Doorbar et al. 2015; Becker et al. 2018).

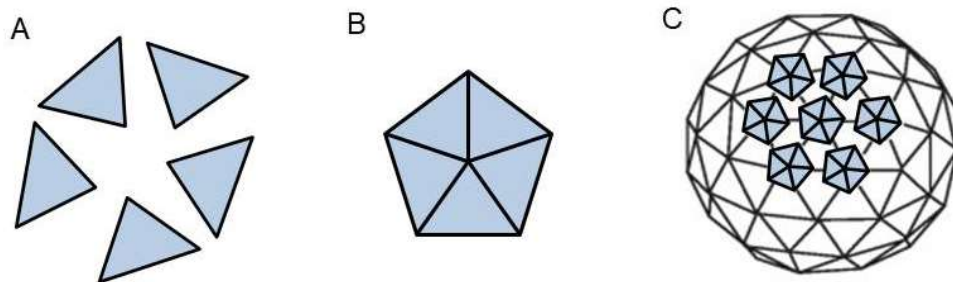


Abbildung 2.1 Zusammenlagerung des L1-Hauptproteins zum Kapsid

(A) Darstellung der L1-Moleküle. (B) Anordnung der L1-Proteine zu einem Pentamer (Kapsomer). (C) Anordnung der Kapsomere innerhalb des viralen Kapsids als Ikosaeder dargestellt (Abbildung verändert nach (Modis et al. 2002)).

2.2 Infektionszyklus der humanen Papillomviren

Das humane Papillomvirus Typ 16 (HPV16) ist stark epitheliotrop. Durch Mikroläsionen gelangt es in die tiefen Epithelschichten und infiziert die Basalzellen von Haut und Schleimhaut (Ozbun 2019). Hier findet die initiale Virusbindung über das Glykoprotein Laminin-332 an die extrazelluläre Matrix (ECM) statt (Culp et al. 2006). Oder das Virus wird über Zuckerreste, die Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), wie z. B. Syndecan-1, an der Basalmembran und der basolateralen Oberfläche der Zellen gebunden (Johnson et al. 2009; Kines et al. 2009; Schiller et al. 2010; Surviladze et al. 2015; Selinka et al. 2003). Bereits die initiale Bindung an HSPG führt zu einer Konformationsänderung von L1, welche zu einer geringeren Affinität zum primären Rezeptor führt und offenbar notwendig ist für den Transfer zum sekundären Rezeptorkomplex (Selinka et al. 2003; Selinka et al. 2007; Becker et al. 2018).

Des Weiteren findet eine strukturelle Reorganisation des viralen Kapsidproteins L2 durch zwei Enzyme, Cyclophilin B und die Furin-Konvertase, statt (Wang und Roden 2013). Zunächst katalysiert Cyclophilin B die Freilegung des N-Terminus von L2 (Bienkowska-Haba et al. 2009). Anschließend bewirkt die Furin-Konvertase die Spaltung des L2-Terminus (Richards et al. 2006; Day et al. 2008). Es wurde außerdem vermutet, dass die Spaltung von HSPG-gebundenem Virus durch spezielle Enzyme, sogenannte Matrix-Metalloproteasen (MMPs), katalysiert wird (Surviladze et al. 2012). Nach der strukturellen Umlagerung und der Spaltung vom HSPG wird die mit EGF (epidermalen Wachstumsfaktoren) und HSPG dekorierte Virushülle nun zum sekundären Rezeptorkomplex überführt. Zudem bewirkt die Protease ADAM17 die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, welche wiederum zelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Diese Aktivierung ist notwendig für die Bildung des sekundären Rezeptorkomplexes (Mikuličić et al. 2019).

Dieser Komplex besteht aus vielen verschiedenen Komponenten (Raff et al. 2013; Scheffer et al. 2014; Florin und Lang 2018). Dazu gehören unter anderem der Wachstumsfaktor EGF, seine Wachstumsfaktorrezeptoren (Surviladze et al. 2012), das zytoskelettale Adapterprotein OBSL-1 (Obscurin-like-1-Protein) (Wüstenhagen et al. 2016) und das Calcium- und Phospholipid-bindende Protein Annexin A2 (Woodham et al. 2012; Dziduszko und Ozbun 2013). Des Weiteren beteiligt sind die Transmembranproteine α 3- und α 6-Integrin (Evander et al. 1997; McMillan et al. 1999; Yoon et al. 2001), sowie Tetraspanine (Spoden et al. 2008; Scheffer et al.

2014; Scheffer et al. 2013; Fast et al. 2018), welche in sogenannte tetraspaninreiche Mikrodomänen (TEM) integriert sind (Finke et al. 2020). Die direkte Assoziation von humanen Papillomviren mit den Tetraspaninen CD151, CD63 und CD81 auf der Plasmamembran und in intrazellulären Kompartimenten konnte bereits nachgewiesen werden (Spoden et al. 2008; Scheffer et al. 2013; Homsí et al. 2014). Außerdem sind die Tetraspanine wichtige Interaktionspartner von HPV-Entry-Faktoren (Scheffer et al. 2014; Berditchevski und Rubinstein 2013; Finke et al. 2020; Florin und Lang 2018). CD151 beispielsweise interagiert mit $\alpha 6$ -Integrin, Proteasen (MMP) und mit Wachstumsfaktorrezeptoren (Hemler 2001; Yañez-Mó et al. 2008; Yang et al. 2010; Berditchevski und Rubinstein 2013). Dadurch kann es die Interaktion zwischen TEM-assoziierten Rezeptoren und Enzymen modulieren (Boucheix und Rubinstein 2001; Hemler 2001; Yañez-Mó et al. 2008; Scheffer et al. 2014). Wie vorangehende Studien zeigten, ist die Assoziation von CD151 mit Viruspartikeln, beziehungsweise die Bindung an Integrine und Integration des CD151/ Integrin-Komplexes in tetraspaninreiche Mikrodomänen eine Voraussetzung für die HPV-Endozytose (Scheffer et al. 2014; Scheffer et al. 2013; Fast et al. 2017). Die Virusaufnahme in die Wirtszelle erfolgt über Einstülpung der Zellmembran in umschriebenen Bereichen, wobei sich Vesikel ins Zellinnere abschnüren. Dies geschieht jedoch nicht via Clathrin, Caveolin und Dynamin-2, sondern über einen noch zu charakterisierenden Endozytosemechanismus (Spoden et al. 2008; Schelhaas et al. 2012). Allerdings scheint die Polymerisation und Depolymerisation des Strukturproteins Aktin essenziell zu sein (Bienkowska-Haba und Sapp 2011; Schelhaas et al. 2012; Selinka et al. 2002). Entsprechende Forschungsergebnisse zeigen, dass Aktin vor allem für das Abschnüren der Endozytosevesikel erforderlich ist (Schelhaas et al. 2012). Sowohl für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Smith et al. 2008) als auch für die Endozytose von CD151 (Liu et al. 2007) ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK 3)- Aktivität von Bedeutung. Nachfolgend scheint CD63 zusammen mit dem Adapterprotein Synthenin-1 den Transport der internalisierten viralen Partikel in den Endosomen zu regulieren (Gräbel et al. 2016). Die folgende Ansäuerung der Endozytosevesikel durch die vakuoläre ATPase (Lipovsky et al. 2013; Müller et al. 2014) ermöglicht den Zerfall des HPV-Kapsids und die Freigabe des L2/ Genom-Komplexes (Schelhaas et al. 2012). Zelluläre Chaperone erleichtern die Dissoziation des Haupt-Kapsidproteins L1 vom L2/ DNA-Komplex (Bienkowska-Haba et al. 2012), so dass sich L1 und L2 in verschiedene Kompartimente trennen. Allerdings bleibt doch ein kleiner Teil des L1-Kapsids am

infektiösen L2/ DNA-Komplex (DiGiuseppe et al. 2017). Während der größte Teil von L1 degradiert wird, nutzt L2 den retrograden Transportweg und die Aktivität der zellulären γ -Sekretase (Zhang et al. 2014; Karanam et al. 2010), um das virale Genom in das Golgi-Kompartiment zu begleiten (Day et al. 2013; Lipovsky et al. 2013). Schließlich wird der L2/ DNA-Komplex in Transportvesikeln mit Hilfe des Proteins Dynein zum Zellkern der Wirtszelle transportiert (Schneider et al. 2011; Florin et al. 2006; DiGiuseppe et al. 2016) und assoziiert dort mit bestimmten subnuklearen Strukturen, den sogenannten PML-Kernkörperchen (Florin et al. 2002; Day et al. 2004; Bund et al. 2014; Day et al. 1998). Neuere Daten weisen sogar darauf hin, dass Bestandteile der PML-Körperchen zum Virus transportiert werden, und L2 diesen Mechanismus triggert (Guion et al. 2019). In den Kernkörperchen findet letztlich die virale Transkription und Replikation statt.

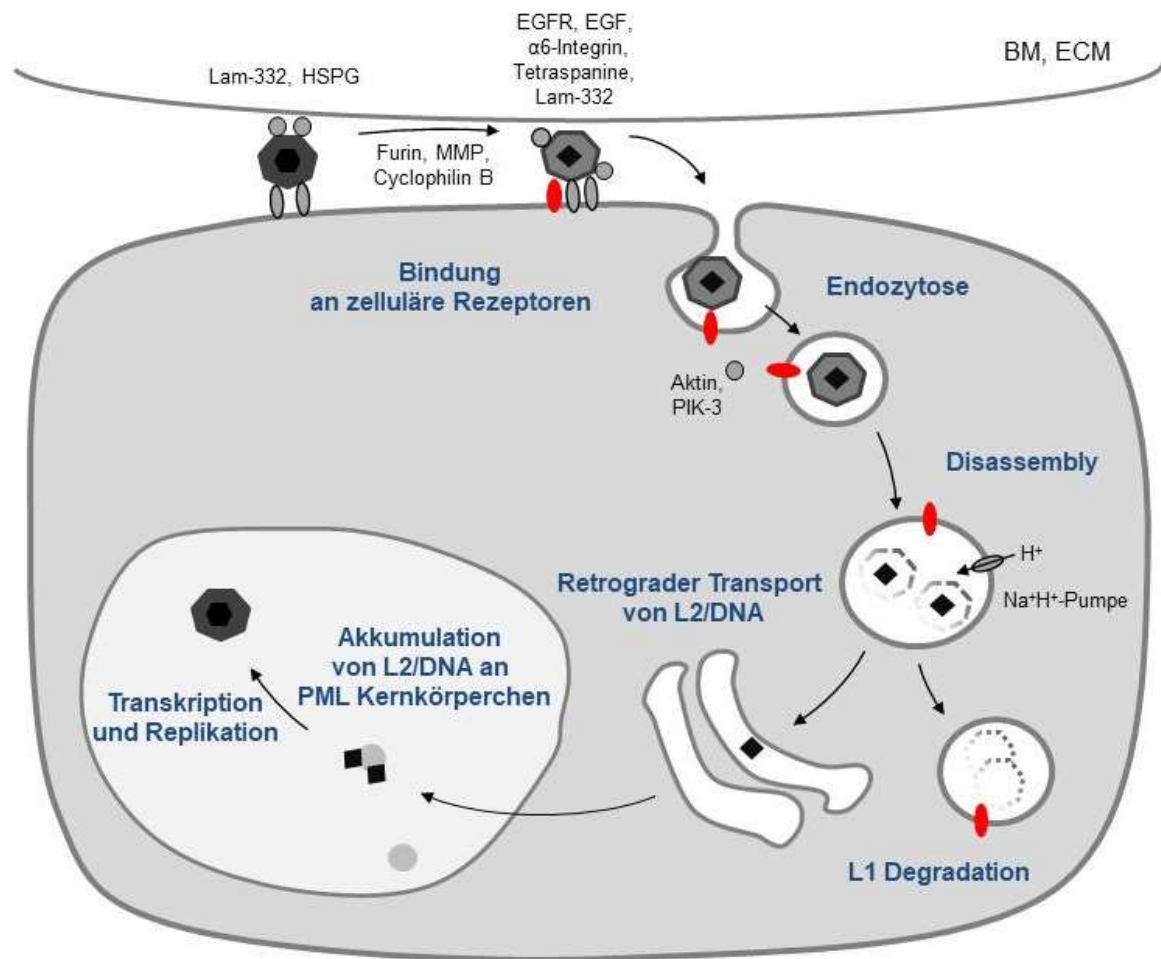


Abbildung 2.2 Frühe Schritte der HPV-Infektion mit den beteiligten Wirtszellfaktoren

Nach der primären Bindung an HSPG und Laminin-332 wird das virale Kapsid durch enzymatische Spaltung vom primären Rezeptor gelöst. Das Schneiden von Wachstumsfaktoren durch Matrix-Metalloproteasen und Konformationsänderungen der Kapsidproteine (durch Cyclophilin B und die Furin-Konvertase) bewirken die Übertragung auf den sekundären Rezeptorkomplex (α 6-Integrin, EGFR, EGF, Annexin A2, CD151, Tetraspanine (rot markiert)) und die Endozytose. Durch Ansäuerung der Endosomen mithilfe der vakuolären ATPase und strukturellen Veränderungen der viralen Proteine L1 und L2 wird das Kapsid eröffnet, so dass der L2/ DNA-Komplex aus den Endosomen freigesetzt werden kann. Im Anschluss wird der Hauptteil von L1 degradiert, während ein Teil des L1 und der L2/ DNA-Komplex retrograd zum Golgi-Apparat und entlang des Mikrotubuli-Netzwerks in den Zellkern transportiert wird. Hier lagert er sich an die PML-Körperchen an, wo die virale DNA transkribiert und repliziert wird (verändert nach (Florin et al. 2012)).

2.3 Tetraspanine

Tetraspanine gehören zu einer Superfamilie hochkonservierter Transmembranproteine, die sowohl an der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten gefunden werden können (Berditchevski und Odintsova 1999; Sincock et al. 1999). Sie kommen in allen Organismen vor (Todres et al. 2000; Hemler 2003) und innerhalb eines Organismus können sie in unterschiedlichen Geweben exprimiert sein (Sincock et al. 1997; Boucheix und Rubinstein 2001). Bisher konnten rund 33 verschiedene Tetraspanine in Säugetieren, 20 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und 37 in der Taufliege *Drosophila* identifiziert werden (Hemler 2003; Berditchevski und Rubinstein 2013).

Ihre Funktionen sind mannigfaltig und noch nicht vollständig bekannt. Zahlreiche zelluläre Prozesse, einschließlich Zellwanderung (Migration) (García-López et al. 2005; Tejera et al. 2013), Verschmelzung (Fusion) (Charrin et al. 2013; Miyado et al. 2000), Anbindung (Adhäsion) (Spring et al. 2013; Barreiro et al. 2005), Zellwachstum (Proliferation) (Ovalle et al. 2007; Shi et al. 2000), intrazelluläre Signalweitergabe (Signaltransduktion) (Berditchevski und Odintsova 1999; Rocha-Perugini et al. 2013; Termini und Gillette 2017), Endozytose (Scheffer et al. 2013; Winterwood et al. 2006) und Proteintransport (Shoham et al. 2006; Duffield et al. 2003) werden durch Tetraspanine vermittelt.

2.4 Aufbau der Tetraspanine

Tetraspanine sind 204-355 Aminosäuren (AS) große Transmembranproteine (Boucheix und Rubinstein 2001), die die Plasmamembran charakteristischerweise viermal durchspannen. Dadurch ergeben sich ein kurzer intrazellulärer Bereich mit einem N- und C-Terminus, sowie zwei ungleich große extrazelluläre Schleifen, EC1 und EC2 (Stipp et al. 2003). Interessanterweise enthält die größere EC2-Schleife eine variable Region mit einem speziellen Aminosäuren-Triplet, bestehend aus Cystein-Cystein-Glycin (CCG), welches die Bildung von Disulfid-Brücken ermöglicht. Die dadurch entstehende Sub-Schleifen-Struktur ist essenziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, wie beispielsweise mit Integrinen oder anderen Tetraspaninen (Kitadokoro et al. 2001; Seigneuret et al. 2001). Zusätzlich dazu sind weitere intrazelluläre Cystein-Reste funktionell wichtig als Palmitoylierungsstellen. Durch diese posttranslationale Modifikation wird die Organisation von Tetraspaninen und

Partnern in so genannte tetraspaninreichen Mikrodomänen (TEMs) maßgeblich beeinflusst. (Stipp et al. 2003; Yang et al. 2002).

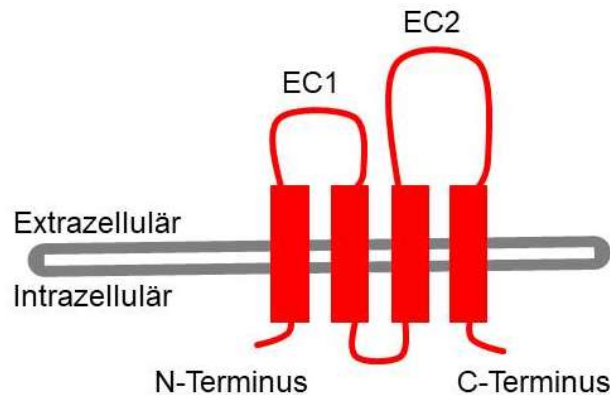


Abbildung 2.3 Aufbau der Tetraspanine

Aufbau eines Tetraspanins mit den beiden extrazellulären Schleifen EC1 und EC2, sowie dem intrazellulär liegenden N- und C-Terminus.

2.5 Tetraspaninreiche Regionen

Als Bestandteil des sekundären Rezeptorkomplexes sind tetraspaninreiche Mikrodomänen (TEM) essenziell für die Infektion mit humanen Papillomviren (Mikuličić und Florin 2019). TEM sind molekulare Mikrodomänen, bestehend aus Homo- und Heterodimeren von Tetraspaninen (z. B. CD9, CD151, CD81, CD63) (Rubinstein et al. 1996; Levy und Shoham 2005), sowie anderen Oberflächenproteinen, wie beispielsweise Integrinen (Rubinstein et al. 1996), Wachstumsfaktorrezeptoren (Alexi et al. 2011), oder Proteasen (Matrix-Metalloproteasen, γ -Sekretase) (Wakabayashi et al. 2009; Arduise et al. 2008). Tetraspanine fungieren hierbei als Modulatoren der assoziierten Moleküle. Dadurch ermöglichen sie etwa Integrin-vermittelte Zellaktivitäten, wie Ligandenbindung, Transport und Signalweiterleitung (Berditchevski 2001; Boucheix und Rubinstein 2001). Außerdem wurden Effekte der TEM auf Membranproteasen-vermittelte Proteinspaltung, sowie Matrix-Auf- und -Abbau berichtet (Cook et al. 1999; Yañez-Mó et al. 2008; Arduise et al. 2008; Machado-Pineda et al. 2018; Gutiérrez-López et al. 2011).

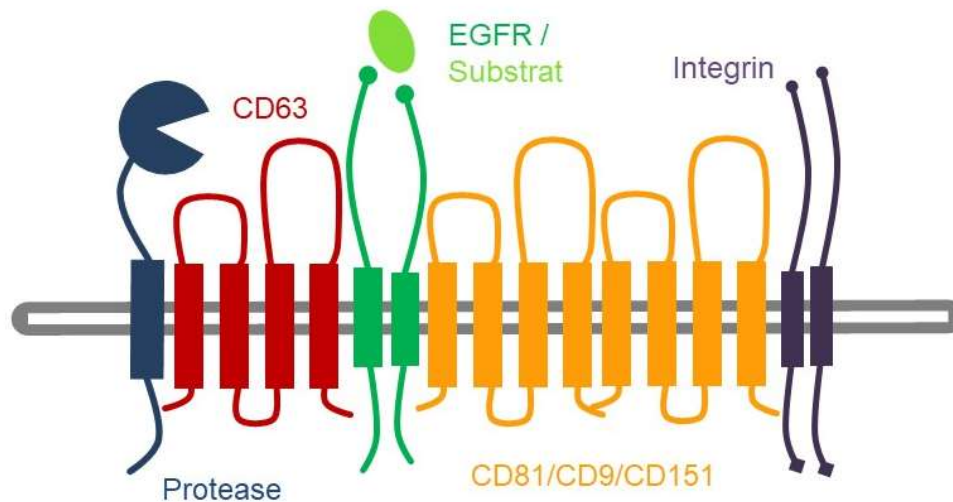


Abbildung 2.4 Tetraspaninreiche Mikrodomänen

In tetraspaninreichen Mikrodomänen interagieren Tetraspanine unter anderem mit Integrinen, Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR), Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α), Integrinen und Proteasen (z. B. MMPs) und bilden dadurch funktionelle Komplexe, die unter anderem der Virusaufnahme dienen (modifiziert nach (Scheffer 2013)).

2.6 Die Tetraspanine CD151, CD81 und CD9 bei Infektionen

Interessanterweise spielen Tetraspanine nicht nur bei der Infektion mit humanen Papillomviren eine wichtige Rolle (van Sriel und Figdor 2010; Monk und Partridge 2012; Thali 2011; Florin und Lang 2018; Hantak et al. 2019). Verschiedenste Erreger nutzen diese Transmembranproteine bei der Invasion der Wirtszellen.

So ist unter anderem die Expression vom Tetraspanin CD81 (auch als TSAN28 oder TAPA-1 bezeichnet) essenziell für den Eintritt von *Plasmodium falciparum* und -yoellii Sporozoiten in die Leberzellen (Silvie et al. 2006; Silvie et al. 2003; Risco-Castillo et al. 2014). CD81-knock-out Mäuse konnten nicht mit Malaria infiziert werden, während CD81-Antikörper das Eindringen der Plasmodien in Hepatozyten hemmten (Silvie et al. 2003; Foquet et al. 2015).

Ein weiteres Beispiel für die Interaktion von Tetraspaninen mit einem Infektionserreger stellt die Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) dar. Auch hier ist die Wechselwirkung zwischen CD81 und dem HCV-Hüll-Glykoprotein E2 kritisch für das Eindringen in die Hepatozyten (Krementsov et al. 2010; Petracca et al. 2000; Flint et al. 1999; Higginbottom et al. 2000). Neuere Studien zeigen sogar, dass CD81

zusätzlich in die Replikation des Virus involviert ist (Grigorov et al. 2009; Rocha-Perugini et al. 2017).

Das Tetraspanin CD9 (TSPAN29) hingegen ist beteiligt an der Diphtherie-Infektion. Hierbei führt die Assoziation von CD9 mit dem Diphtherie-Toxin-Rezeptor HB-EGF zu einer erhöhten Rezeptoraktivität und -affinität gegenüber dem Diphtherie-Toxin (Cha et al. 2000; Iwamoto et al. 1994; Hasuwa et al. 2001).

Auch im Rahmen einer schweren und meist letalen Komplikation der Maserninfektion, der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE), scheint das Tetraspanin CD9 eine Rolle zu spielen. Hier konnten bei Patienten mit schwerer Hirnatrophie CD9-Antikörper nachgewiesen werden (Shimizu et al. 2002).

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln dieser Arbeit bereits dargelegt worden ist, spielen die Tetraspanine, insbesondere CD151 (TSPAN24), CD81 und CD63 (TSPAN30) bei der Infektion mit dem humanen Papillomvirus eine gewichtige Rolle. So sind sie als Bestandteil des sekundären HPV-Rezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche direkte und indirekte Interaktionspartner des Virus beim Eindringen in die Epithelzellen (Scheffer et al. 2013; Homsí et al. 2014; Spoden et al. 2008). Sowohl die Assoziation von CD151 mit dem Virus als auch die CD151-vermittelte Integration von Integrin-Tetraspanin-Komplexen in die TEM stellt eine Voraussetzung für den erfolgreichen Eintritt des Virus in die Zelle dar (Spoden et al. 2008; Scheffer et al. 2013). Auch die Assoziation oder sogar Interaktion vom humanen Papillomvirus mit den Tetraspaninen CD81 und CD63 auf der Zelloberfläche, beziehungsweise in Zellkompartimenten, konnte bereits nachgewiesen werden (Spoden et al. 2008; Homsí et al. 2014; Gräßel et al. 2016). Bei den Tetraspaninen CD151 und CD63 scheint vor allem der intrazellulär gelegene C-Terminus essenziell für deren Effekt auf die HPV-Infektion zu sein (Fast et al. 2018).

Bezüglich des Tetraspanins CD9 gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung bei der Infektion mit dem humanen Papillomvirus. So zeigen beispielsweise bisher nicht veröffentlichte Proteom-Analysen von Endosomen aus dem Labor von L. Florin, dass CD9 zusammen mit HPV16 internalisiert wird. Es ist jedoch unklar, inwiefern CD9 an der HPV-Infektion beteiligt ist.

In der hier vorliegenden Arbeit soll nun mithilfe verschiedener Untersuchungsmethoden vergleichend der Einfluss der Tetraspanine CD151, CD81 und CD9 auf die Infektion mit dem humanen Papillomvirus in den gängigen Zelllinien

und primären Keratinozyten gegenübergestellt werden. Des Weiteren soll die bisher weitestgehend unklare Rolle des Tetraspanins CD9 bei der Infektion untersucht, der entscheidende durch das Tetraspanin beeinflusste Infektionsschritt identifiziert, und die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die aktuelle Forschung diskutiert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den folgenden Unternehmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Becton Dickinson, Fluka (Buchs), GE Healthcare, Gibco/ Invitrogen, Merck, Pharmacia-LKB Biotechnology (Uppsala), Roche, Roth (Horgenzell), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich und Whatman (Dassel).

3.2 Laborgeräte

Tabelle 3.1 Laborgeräte

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Blot-Kammer | Trans-Blot™ Cell | Bio-Rad, München |
| Brutschrank | CO ₂ -AUTO-ZERO | Heraeus |
| Chemiluminometer | Tristar LB941 | Berthold |
| Durchflusszytometer | FACScan | Becton Dickinson |
| Fluoreszenzmikroskop | Axiovert 200M | Carl Zeiss |
| Heizblock | Blockthermostat BT 1303 | HLC Biotech, Bovenden |
| Kontrastphasenmikroskop | Wilvort S AFL | Hund, Wetzlar |
| Laborwaagen | BL1500 D Mettler AE 100 | Sartorius Mettler, Greifensee |
| Magnetrührer | IKAMAG REC-G | IKA Labortechnik, Staufen |
| pH-Meter | InoLab pH Level 2 | WTW, Weilheim |
| Pipetten | Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000 | Gilson |
| Pipettierhilfe | PIPETBOY accu pipetus® | Hirschmann, Eberstadt |

| | | |
|------------------------------|--|---|
| Schüttler | Rocky | Heraeus |
| Sterilbank siRNA | Hera Safe | Heraeus |
| Sterilbank Zellkultur | Nu-440-400E (Class 2) | Nuaire |
| Tischzentrifugen | Biofuge pico Biofuge fresco | Heraeus |
| Wasserbad | JB1 | Grant Instruments, Shepreth |
| Wirbelmischer | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Bohemia |
| Zentrifugen | Labofuge 400 R Function Line Sorvall® RC-SB Refrigerated Superspeed | Heraeus Du Pont Instruments, Wilmington |

3.3 Labormaterialien

Die Plastikwaren stammen von den Firmen Becton Dickinson, Greiner und Sarstedt. Die Glaswaren wurden von der Firma Schott bezogen.

3.4 Kits und Fertigreagenzien

Tabelle 3.2 Kits und Fertigreagenzien

| Produkt | Hersteller | Verwendung |
|---|-------------------|---|
| Brij58 | Sigma Aldrich | Zell-Lyse bei der Herstellung der Pseudoviren |
| Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) | Roche | Zytotoxizitäts-/ LDH-Bestimmung |

| | | |
|---|--|--------------------------------------|
| Fluoprep | Biomérieux | Einbettmedium für Immunfluoreszenzen |
| Hoechst 33342 | Sigma Aldrich | Zellkernfärbung Immunfluoreszenz |
| JetPRIME™ DNA transfection reagent | Polyplus transfection, Illkirch-Graffenstaden | Ko-Transfektion von RNA und DNA |
| Lipofectamine™ 2000 | Invitrogen | Transfektion von DNA |
| Lipofectamine™ RNAiMAX | Invitrogen | Transfektion von RNA |
| Reporter Lysis Buffer 5x | Promega | Lyse-Puffer |
| Trypsin/EDTA | PAN Biotech GmbH, Aidenbach | Ablösen von adhärenen Zellen |
| Western Lightning™ Plus-ECL | Perkin Elmer | Protein-Detektion im Western Blot |

3.5 Antikörper

3.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3.3 Primäre Antikörper

| Ziel | Spezies | Verwendung/ Verdünnung | Quelle |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| CD9 | Maus, monoklonal | WB/ 1:500 | Acris, Herford |
| CD81 (1.3.3.22) | Maus, monoklonal | WB/ 1:100 | Santa Cruz |
| CD151 | Kaninchen, polyklonal | WB/ 1:1 000 | (Berditchevski et al. 2002) |
| L1 (16L1-312F) | Maus, monoklonal | WB/ 1:100 | (Volpers et al. 1995) |

| | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------|-------------------------|
| L1 (33L1-7) | Maus, monoklonal | IF/ 1:10 | (Sapp et al. 1995) |
| L1 (K75) | Kaninchen, polyklonal | IF/ 1:1 000 | (Bergsdorf et al. 2003) |
| β-Aktin (AC-15) | Maus, monoklonal | WB/ 1:20 000 | Sigma-Aldrich |

3.5.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.4 Sekundäre Antikörper

| Antikörper | Spezies | Konjugat | Verdünnung | Firma |
|-----------------------|---------|------------|------------|---------|
| Anti-Kaninchen | Ziege | Peroxidase | 1:5 000 | Dianova |
| Anti-Maus | Ziege | Peroxidase | 1:5 000 | Dianova |

Tabelle 3.5 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenzen

| Antikörper | Spezies | Konjugat | Verdünnung | Firma |
|-----------------------|---------|------------------------------------|------------|------------|
| Anti-Kaninchen | Ziege | Alexa Fluor 488 Alexa Fluor 546 | 1:250 | Invitrogen |
| Anti-Maus | Ziege | Alexa Fluor 488 | 1:250 | Invitrogen |

3.6 siRNA

Tabelle 3.6 siRNA

| Bezeichnung | Ziel-Sequenz | Hersteller |
|-----------------|----------------------------|---------------|
| CD151 #1 | CAUGUGGCACCGUUUGCCU | Qiagen |
| CD151 #2 | CACAUACAGGUGCUCAAUAAAAdTdT | Sigma-Aldrich |
| CD81 #1 | CTGACTCCGTCATTTAATAAA | Qiagen |
| CD81 #2 | CACCTTCTATGTAGGCATCTA | Qiagen |
| CD9 #1 | CAAAGAGGTCTTCGACAATAA | Qiagen |
| CD9 #2 | ACAAATGTCTATCAACTTTAA | Qiagen |

3.7 Plasmide

Tabelle 3.7 Plasmide

| Bezeichnung | Beschreibung | Referenz |
|--------------------------------|--|----------------------------|
| Kontrollvektor | pcDNA3.1(+); Expressionsvektor | Invitrogen |
| pcDNA3.1(+)/ Luciferase | Expressionsvektor pcDNA3.1(+) mit dem Luciferase-Gen | (Schneider et al. 2011) |
| CD9 HA | Expressionsvektor pcDNA3.1/Hygro(-)mit dem CD9-Gen | (Mikuličić et al. 2020) |
| CD9 Hygro | Expressionsvektor pCMV-HA mit dem CD9-Gen | (Mikuličić et al. 2020) |
| GFP-CD9 | CD9-Gen, gekoppelt an grün- fluoreszierendes Protein (GFP), Expressionsvektor pEGFP-N3 | (Snieder et al. 2019) |

3.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.8 Puffer und Lösungen

| | |
|--------------------------------|--|
| 5 x Lämmli-Probenpuffer | 312,5 mM Tris-Cl (pH 6,8) 10 % SDS 50 % Glycerin 0,025-0,5 % Bromphenolblau (ggf. 10 % Mercaptoethanol) |
| 10 x Lämmli-Laufpuffer | 25 mM Tris-Cl (pH 6,8) 192 mM Glycin 1 % SDS |
| 10 x PBS | 1,37 M NaCl 27 mM KCl 11,5 mM KH ₂ PO ₄ |

| | |
|------------------------------------|---|
| | 65 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O |
| Ponceau S- Lösung | 0,1 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure |
| SDS-Page - Lösung B | 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8) 0,4 % SDS (181 g Tris + 4 g SDS auf 1 l) |
| SDS-Page - Lösung C | 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0,4 % SDS (60,6 g Tris + 4 g SDS auf 1 l) |
| Western Blot-Transferpuffer | 25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol |
| Luciferase-Substratpuffer | 50 mM Tris-Cl (pH 7.8) 20 mM DTT 15 mM MgSO ₄ 0,5 mM EDTA 0,5 mM Luciferin 0,5 mM ATP 0,5 mM Coenzym A |
| PEI (Polyethylenimin) | Transfektionsreagenz und Inhibitor der primären Zellbindung von HP-Viren (Spoden et al. 2012) |

3.9 Marker

Tabelle 3.9 Marker

| Produkt | Hersteller |
|---|--------------------|
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Fermentas, Waltham |

3.10 Zellkultur

3.10.1.1 Zelllinien

Tabelle 3.10 Zelllinien

| Bezeichnung | Beschreibung | Herkunft, Referenz |
|--------------|--|---|
| HeLa | Isoliert aus humanem Zervixkarzinom | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, (Scherer et al. 1953) |
| HaCaT | Spontan immortalisierte humane Keratinozyten | CLS Cell Lines Service, Eppelheim, (Boukamp et al. 1988) |
| NHEK | Primäre Keratinozyten Normal Human Epidermal Keratinocytes | PromoCell |
| 293TT | Humane embryonale Nierenzellen, zusätzlich zwei T-Antigene von SV-40 | (Buck et al. 2004) |

3.10.1.2 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind immortalisierte Keratinozyten, welche im Jahre 1951 aus dem Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks isoliert worden sind. Diese Zelllinie zeichnet sich durch unbegrenzte Fähigkeit zur Zellteilung aus und ist die älteste und am meisten verwendete Zelllinie.

3.10.1.3 HaCaT-Zellen

Bei den HaCaT (Human Adult Low Calcium High Temperature)- Zellen handelt es sich um eine spontan transformierte, humane Keratinozyten-Zelllinie, die von der Arbeitsgruppe Boucamp et al. aus der Peripherie eines malignen Melanoms isoliert und etabliert wurde. Von Vorteil ist die hohe Lebensfähigkeit, die hohe genetische Stabilität und die weitgehend erhaltene epidermale Differenzierungskapazität (Boukamp et al. 1988).

3.10.1.4 NHEK

Normale humane epidermale Keratinozyten werden aus juvenilem Gewebe von Spendern isoliert und spiegeln somit die in-vivo-Verhältnisse am besten wider. Von Nachteil sind die begrenzte Kultivierbarkeit und Lebensfähigkeit, die vergleichsweise niedrige Wachstumsrate sowie die schlechte DNA-Transfizierbarkeit dieser Zellen.

3.10.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 3.11 Medien und Zusätze für die Zellkultur

| Produkt | Hersteller |
|---|-------------------|
| Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) | PAA Laboratories |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Gibco/ Invitrogen |
| Hepes-BSS | PromoCell |
| Keratinocyte Growth Medium 2 | PromoCell |
| Nicht essenzielle Aminosäuren, 100 x | PAA Laboratories |
| Trypsin Neutralizing Solution | PromoCell |
| Trypsin/ EDTA | PromoCell |

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinien HeLa und HaCaT wurden in dem Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % nicht-essenziellen Aminosäuren bei 37 °C und 5 % CO₂ angezogen. Die Kultivierung der primären Keratinozyten (NHEK) erfolgte im Keratinocyte Growth Medium 2 ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zelllinien wurden als adhärenente Einschicht-Kulturen in 75 ml oder 175 ml großen Zellkulturflaschen kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt.

4.1.2 Passagieren der Zelllinien HeLa und HaCaT

Die Zelllinien wurden abhängig von ihrer Dichte zwei- bis dreimal pro Woche unter der Sterilbank passagiert. Dazu wurden HeLa- und HaCaT- Zellen zunächst mit PBS/ 2,5 mM EDTA gewaschen. Anschließend wurden sie vom Flaschenboden gelöst durch Inkubation mit 1 ml (75 ml große Zellkulturflasche) oder 1,5 ml (175 ml große Zellkulturflasche) 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA für zehn Minuten bei 37 °C. Zur Neutralisierung der Trypsinwirkung wurden die Zellen in circa 9 ml vorgewärmtem DMEM/ 10 % FCS aufgenommen und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Schließlich wurden die Zellen verdünnt (auf 1:5 oder 1:10), in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit frischem Medium versetzt.

4.1.3 Passagieren von NHEK

Die primären Keratinozyten (NHEK) wurden ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Nach dem Waschen mit HEPES-BSS und Bedeckung mit 3,5 ml (75 ml große Zellkulturflasche) oder 7 ml (175 ml große Zellkulturflasche) Trypsin/ EDTA wurden die Zellen bei Raumtemperatur für circa zehn Minuten inkubiert. Nach dem Lösen der Zellen vom Flaschenboden wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe der gleichen Menge Trypsin Neutralizing Solution gestoppt. Im Folgenden wurden die Zellen vereinzelt, in ein 15-ml-Falkon gegeben und für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml/ 10 ml Keratinocyte Growth Medium 2 aufgenommen. Die Zellen wurden vereinzelt, verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie beschrieben (Kapitel 4.1.2 und 4.1.3) vom Zellkulturflaschenboden gelöst und in DMEM/ 10 % FCS aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden 10 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden anschließend die Zellen in den vier großen Quadraten (1 mm²) ausgezählt und die durchschnittliche Zellzahl ermittelt. Das Verdünnungsverhältnis war dabei abhängig von der Zelldichte.

Zellzahl pro 1 ml =

Summe der Zellen pro 1 mm² x Verdünnungsfaktor x 10 000

Nach Bedarf wurden die Zellen anschließend in gewünschter Dichte ausgesät.

4.2 Transfektion von Zellen

Als Transfektion bezeichnet man in der Zellbiologie das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen (Lottspeich und Engels 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich transiente Transfektionen durchgeführt. Hierbei wird die Fremd-DNA bzw. -RNA via Plasmid in die Wirtszelle eingeschleust und verbleibt dort nur kurzzeitig.

Am Vortag der Transfektion wurde die benötigte Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt (Kapitel 4.1.4). Je nach Versuchsansatz und Zelllinie wurden entsprechend viele Zellen in DMEM ausgesät. Vier bis sechs Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Wechsel des Zellmediums.

4.2.1 siRNA-Transfektion

Small interfering RNAs, abgekürzt siRNAs, sind RNA-Moleküle, bestehend aus circa 25 Basenpaaren, welche durch sogenannte RNA-Interferenz die Genexpression der Zelle beeinflussen können. SiRNAs bewirken, dass selektive, also zur siRNA komplementäre, Messenger-RNAs der Zelle nach der Transkription degradiert werden, so dass die genetische Information der mRNA nicht translatiert werden kann. Dies geschieht unter anderem mit Hilfe des RNA-induced silencing complex (RISC). Dieser hat die Aufgabe, einzelsträngige RNA mit einer zur siRNA komplementären Nukleotidsequenz zu zerstören. Auf diese Weise wird die Translation des Gens, welches die siRNA codiert, verhindert. In der Molekularbiologie macht man sich diesen Mechanismus zu Nutzen, um die Expression bestimmter Proteine zu verhindern. Dabei bringt man siRNA für eine bestimmte Ziel-RNA in die Zielzelle ein, welche daraufhin zerstört wird. Dieser Vorgang, auch Knockdown genannt, wird angewandt, um gezielt die Funktion einzelner Proteine zu untersuchen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden CD151-, CD81- und CD9- spezifische siRNAs verwendet, um die Herstellung dieser Tetraspanine zu unterdrücken und deren Auswirkung auf die Infektion mit HPV16 zu charakterisieren.

Hierzu wurden NHEK, HeLa- oder HaCaT-Zellen ausgesät und mit Lipofectamine™ RNAiMax nach Herstellerangaben transfiziert.

4.2.2 DNA-Transfektion

Die DNA-Transfektion von HeLa- Zellen wurden mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.3 Herstellung von HPV16-Pseudoviren

Zur Charakterisierung der Interaktion von Wirtszellproteinen mit viralen Proteinen wurden in der hier vorliegenden Arbeit Infektionsversuche mit sogenannten Pseudoviren durchgeführt. Als Pseudoviren (PsV) bezeichnet man virale Kapside, die wie native Viren aus den Kapsidproteinen L1 und L2 bestehen. Im Inneren des Kapsids ist aber nicht das virale Genom enthalten, sondern ein Reporterplasmid, das

als Indikator für eine produktive Infektion fungiert. Die Pseudoviren wurden in kultivierten HEK293TT durch Ko-Transfektion von HPV16-L1- und HPV16-L2-Plasmiden, sowie einem Reporter-gen-Plasmid (pcDNA3.1(+)/ Luciferase) produziert. Die Herstellung der Plasmide erfolgte im Labor der AG Florin außerhalb meiner Dissertation nach Buck et al. (Buck et al. 2004, 2005a; Buck und Thompson 2007; Buck et al. 2005b). Die Pseudovirus-Fraktionen wurden zu je 150- μ l-Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

4.4 Infektionsassay

Um den Einfluss der Tetraspanine CD151, CD81 und CD9 auf die HPV16-Infektion zu untersuchen, wurden Luciferase-basierte Infektionsassays durchgeführt. Dazu wurde die Expression der Tetraspanine gegebenenfalls mittels Transfektion depletiert oder erhöht, beziehungsweise deren Funktion durch spezifische Antikörper beeinflusst. Im Anschluss wurden die Zellen mit HPV16-Pseudoviren infiziert, welche anstatt des HPV-Genoms ein Reporter-gen-Plasmid im Kapsid tragen. Dieses Reporter-gen kodiert für die Oxidoreduktase Luciferase und seine Expression dient als Maß für die Infektion. Im Beisein von Adenosintriphosphat (ATP) und Magnesium (Mg^{2+}) katalysiert das Enzym Luciferase die oxidative Decarboxylierung von Luciferin. Hierbei wird Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 560nm frei.



Im Zuge eines Luciferase-basierten Infektionsassays wurden entsprechend viele Zellen der gewünschten Zelllinie ausgesät, gegebenenfalls vorbehandelt und inkubiert. Die Infektion erfolgte mit 1 μ l (NHEK 3 μ l) HPV16-PsV. Nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden, beziehungsweise 48 Stunden (NHEK), wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zum Ablösen einem Gefrier-Tau-Zyklus unterzogen. Im Anschluss wurden die Zellen in 250 μ l Reporter Gene Lysis Buffer aufgenommen und ca. 20 Minuten auf einen Schüttler gegeben. Die Zell-Lysate wurden in je 1,5-ml-Reaktionsgefäße pipettiert, drei Minuten lang bei 13.000 x g zentrifugiert und jeweils

150 µl des Überstandes wurde in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde zu jeder Probe Luciferase-Substratpuffer (50 µl) gegeben und zwei Sekunden gemischt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit dem Chemilumineszenz-Messgerät (Tristar LB941, Berthold) gemessen.

4.5 LDH-Assay

Um eine mögliche Toxizität der siRNA oder DNA auf die Zellen auszuschließen, wurde parallel zum Infektionsassay standardmäßig ein Zell-Viabilitätstest/ LDH-Test (CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay) durchgeführt. Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazellulär vorliegendes Enzym, welches die Reduktion von NAD zu NADH katalysiert. Sie ist nur aktiv in lebenden Zellen, welche über eine intakte Zellmembran verfügen und dient somit zur Messung der Zellviabilität. Die durch die Lactatdehydrogenase katalysierte Reaktion kann nach Zugabe einer bestimmten Substanz mittels eines Chemilumineszenz-Gerätes gemessen werden (siehe Kapitel 4.4). Dazu wurden vom Überstand des Zell-Lysates 10 µl jeder Probe in eine 96-Well-Platte pipettiert und nach Herstellerangaben weiter behandelt. Das Chemilumineszenz-Messgerät (Tristar LB941, Berthold) ermittelte die Zellviabilität.

Sofern die Zellviabilität der Proben den Prozentsatz von 80 % im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Kontrollzellen überschritt, wurden die Werte aus den Infektionsassays mit denen aus dem parallel erhobenen Zell-Viabilitätstest abgeglichen. Dazu wurden die Werte der Kontrollzellen auf 100 % gesetzt. Proben, deren LDH-Werte deutlich von denen der Kontrollzellen abwichen, wurden nicht in die Wertung mit einbezogen, da hier von einer mangelnden Zellvitalität auszugehen ist.

4.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese (SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Vor der Auftrennung wird dem Proteingemisch Natriumdodecylsulfat (SDS) zugeführt,

welches die Eigenladungen der Eiweiße überdeckt, so dass diese konstant negativ geladen sind und sich gegenseitig abstoßen. Zusammen mit der Denaturierung durch Erhitzen führt es dazu, dass die Proteine linearisiert werden. Anschließend wandern die Proteinketten entsprechend ihrem Molekulargewicht auf einem Polyacrylamid-Gel in einem elektrischen Feld, wobei größere Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden als kleinere.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden 5 %-ige Sammelgele und 10 %-ige Trenngele verwendet. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine und sorgt dafür, dass alle Proteine gleichzeitig in das folgende Trenngel eintreten. Im Trenngel erfolgt schließlich die Auftrennung der Proteine.

Zusammensetzung der Gele:

Tabelle 4.1 Zusammensetzung der Gele zur SDS-Page

| | |
|-------------------------|--|
| Sammelgel (5 %): | 8,8 ml H ₂ O 2,5 ml Acrylamid Stammlösung 3,75 ml Lösung C 150 µl APS-Lösung (10 %) 15 µl TEMED |
| Trenngel (10 %): | 14,2 ml H ₂ O 11,7 ml Acrylamid Stammlösung 8,8 ml Lösung B 350 µl APS 17,5 µl TEMED |

Für die Gelelektrophorese wurden die Zellen 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion mit PBS gewaschen und mit 2,5 x Lämmli-Puffer versetzt.

Die SDS-Page erfolgte sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Unter reduzierenden Bedingungen enthält der Probenpuffer Thiole, wie β -Mercaptoethanol, welche Disulfidbrücken spalten und damit die Tertiärstruktur von Proteinen auflösen. War der direkte Nachweis der Tetraspanine vorgesehen, so erfolgte die Gelelektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Das bedeutet, der Probenpuffer enthielt kein β -Mercaptoethanol. So blieb die Tertiärstruktur der Tetraspanine erhalten und

ermöglichte die Epitop-Erkennung durch Antikörper. Danach wurden die Proben fünf Minuten lang bei 95 °C erhitzt und in die Taschen des Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Das Gel wurde in eine Gelkammer gespannt und für drei Stunden an eine Spannungsquelle angeschlossen bei 200 Volt und 75 mA.

4.7 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (beispielsweise durch SDS-PAGE) auf eine Trägermembran, wie z. B. Nitrozellulose. Dazu wird ein elektrisches Feld angelegt, welches senkrecht zum Polyacrylamid-Gel steht. Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Das durch die Gelelektrophorese entstandene Muster der aufgetrennten Proteine wird auf die Membran übertragen.

Zum Übertragen der aufgetrennten Proteine wurde das Polyacrylamid-Gel direkt mit der Nitrozellulosemembran in Kontakt gebracht, in eine Kassette eingelegt und in die Blot-Kammer mit Transferpuffer gestellt. Dann wurde ein elektrisches Feld angelegt, welches senkrecht zum Polyacrylamid-Gel orientiert war, so dass die Proteine auf die Nitrozellulosemembran geblottet worden sind. Die Proteinübertragung wurde entweder für zwei Stunden bei 400 mA oder über Nacht bei 150 mA durchgeführt.

Nach dem Übertragen der Proteine auf die Nitrozellulosemembran können die Proteine durch Immundetektion sichtbar gemacht werden. Dazu wird ein primärer Antikörper auf die Membran gegeben, der spezifisch an ein Epitop des zu untersuchenden Proteins bindet. Anschließend wird ein sekundärer Antikörper hinzugefügt, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist. An den sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dessen Aktivität kann durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

Zur Entfernung von Methanol-Rückständen wurde die Membran kurz in destilliertem Wasser geschwenkt. Um den Erfolg der Proteintransfers sichtbar zu machen, wurden die Proteine zunächst mit Ponceau S-Lösung auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht und danach mit PBS wieder entfärbt.

ausgesät und am Folgetag mit der entsprechenden siRNA transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit pcDNA3.1+/Luciferase ko-transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit JetPrime™ DNA transfection reagent nach Herstellerangaben. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das Zellmedium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Messgerät (Tristar LB941, Berthold). Als Positiv-Kontrolle diente ein Ansatz mit einer Luciferase-spezifischen siRNA. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Ansatz mit Kontroll-siRNA transfiziert, welche keine Zielstruktur in der Zelle hat. Im Anschluss wurden die Messwerte aller Proben in Relation zum Wert der Negativ-Kontrolle gesetzt.

4.9 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie (flow cytometry) können auf den zu untersuchenden Proben markierte Oberflächenmoleküle und -proteine quantitativ bestimmt werden. Hierzu werden die Proteine oder Partikel auf der Zelloberfläche mit einem Farbstoff markiert. Anschließend wird dieser Farbstoff von einem Messgerät zur Fluoreszenz angeregt. Dabei kann das entstehende Lichtsignal auf jeder einzelnen Zelle gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand dieser Methode untersucht, ob Zellen, bei denen zuvor mittels siRNA-Transfektion die Expression von CD9 unterdrückt worden war, Pseudoviren an ihre Oberfläche binden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit CD9-spezifischer siRNA transfiziert (siehe Kapitel 4.2.1) und nach 48 Stunden mit Pseudoviren infiziert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden die gebundenen Viren nach folgendem Protokoll mit dem primären L1-spezifischen Antikörper K75 (siehe Tabelle 3.3) und dem sekundären Kaninchen-Antikörper AlexaFluor-488 (siehe Tabelle 3.4) markiert.

Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, mittels Trypsin-EDTA (100 µl pro Well) abgelöst und in Messröhrchen gegeben. Nach dem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 1 100 rpm wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Puffer resuspendiert und mit dem primären Antikörper (Tabelle 3.3) in 100 µl PBS

20 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper wurde danach mit 1 ml PBS wieder ausgewaschen und die Zellen wurden erneut zentrifugiert (1 100 rpm, fünf Minuten). Das Zellpellet wurde resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C mit dem in 100 µl PBS aufgelösten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 3.4) inkubiert. Auch dieser wurde mit 1 ml PBS abgewaschen, die Zellen abzentrifugiert (1 100 rpm, fünf Minuten) und der Überstand verworfen. Die Proben wurden dann in 500 µl PBS resuspendiert und kühl gestellt bei 4 °C.

Zur Messung wurde das Durchflusszytometer FACScan verwendet. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der dazugehörigen Software CellQuest Version 3.3. Die Kontrolle wurde als 100 % gesetzt und der Prozentsatz an mit Pseudoviren gebundenen Zellen davon abhängig berechnet.

4.10 HPV16-Bindungsassay

Nach siRNA-vermittelter Depletion der Tetraspanine CD9 und CD151 wurde die Bindung von HPV16-Pseudoviren an die Zelloberfläche auch durch einen Bindungsassay mit anschließendem SDS-Page und Western Blot untersucht.

Dazu wurden HeLa-Zellen ausgesät und nach 24 Stunden mit den jeweiligen siRNAs transfiziert (siehe Kapitel 4.2.1). Nach 48 Stunden Inkubation wurden zunächst einige Zellen für eine Stunde mit PEI (Polyethylenimin) versetzt, welches die Bindung der Viren an die Zelloberfläche inhibiert. Somit dienten diese Zellen als Positiv-Kontrolle. Dann wurden alle Zellen mit 50 µl Zellmedium versetzt und mit 1 µl Pseudoviren infiziert. Nach einer Stunde Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 80 µl 2,5 x Lämmli/ 10 % β-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Proben wurden im Anschluss in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben und fünf Minuten lang bei 95 °C erhitzt. Unter reduzierenden Bedingungen wurden sie mittels Gelelektrophorese und Western Blot (Kapitel 4.6 und 4.7) untersucht. L1 wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 16L1-312F detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Aktin.

4.11 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Immunfluoreszenz beruht auf der Darstellung von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern. Nach einer Permeabilisierung der Zellmembran können auch intrazelluläre Strukturen detektiert werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst ein nicht markierter primärer Antikörper spezifisch an zu untersuchenden Protein. Der sekundäre Antikörper bindet wiederum speziesspezifisch an den primären Antikörper und ist mit einem Fluorochrom konjugiert. Wird das Fluorochrom am sekundären Antikörper nun mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, emittiert es dadurch Licht eines anderen Wellenlängenspektrums.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden HeLa- und HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in 12-well-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden je nach Versuchsaufbau gegebenenfalls zuvor wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben mit siRNAs transfiziert und anschließend mit HPV16-Pseudoviren infiziert. Die Deckgläschen wurden bis zum Einbetten der Zellen in den Zellkulturplatten belassen.

4.11.1 Fixierung und Antikörperfärbung der Zellen

Als nächstes erfolgten das Absaugen des Mediums und das dreimalige Waschen der Zellen mit PBS. Anschließend wurden die Zellen durch Zusatz von Methanol und Einfrieren bei -20 °C für ca. zehn Minuten fixiert und permeabilisiert. War keine Permeabilisierung vorgesehen, so wurden die Zellen mit PBS/ 2 % Paraformaldehyd für zehn Minuten bei 4 °C lediglich fixiert. Paraformaldehyd lässt die Zellmembran weitestgehend intakt.

Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen mit PBS/ 1 % BSA bedeckt und für 30 Minuten inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in PBS/ 1 % BSA verdünnt und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgten dreimaliges Waschen mit PBS um nicht gebundene Reste des Antikörpers zu entfernen und die erneute Blockung unspezifischer Bindungsstellen mit PBS/ 1 % BSA. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Verdünnung mit PBS/ 1 % BSA auf die Zellen gegeben. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde zudem der Farbstoff Hoechst 33342 in der Verdünnung 1:20 000 zum sekundären Antikörper gegeben

und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte wiederum das Waschen der Zellen zunächst dreimal mit PBS/ 1 % BSA und dann dreimal mit PBS. Nach dem Waschen erfolgte die Einbettung der Deckgläschen auf Objektträger mit Fluoprep.

4.11.2 Mikroskopische Dokumentation

Die Aufnahmen wurden mit dem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop und der Zeiss AxioCam Digitalkamera bei einer 10-, 40- oder 100-fachen Vergrößerung erstellt. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der dazugehörigen Axiovision Software 3.0.

4.12 L1-7-Assay

Der monoklonale Antikörper 33L1-7 bindet ein Epitop des majoren Kapsidproteins L1, welches bei intaktem Kapsid nicht zugänglich ist. Erst nach Endozytose der Viren und dem Aufbrechen (disassembly) des HPV-Kapsids, kann der Antikörper 33L1-7 an sein Epitop binden. Dadurch ermöglicht er die gezielte Detektion endozytierter und entpackter Kapside in der Immunfluoreszenz.

Für den L1-7-Assay wurden HeLa- und HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in 12-Well-Kulturplatten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden sie mit der CD9-spezifischen siRNA, beziehungsweise der Kontroll-siRNA transfiziert und 48 Stunden lang inkubiert. Dann wurden die Zellen mit neuem Medium überschichtet und mit 1 µl HPV16-Pseudoviren infiziert. Nach sieben Stunden wurden die Zellansätze wie in Kapitel 4.11.1 beschrieben mit Methanol fixiert. Als primärer Antikörper wurde der monoklonale Maus-Antikörper 33L1-7 verwendet, während die Zellkerne mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht wurden. Proteinfärbung und mikroskopische Dokumentation erfolgten wie in den Kapiteln 4.11.1 und 4.11.2 beschrieben.

Für die Auswertung wurden je siRNA-Ansatz 20 fluoreszenzmikroskopische Bilder (mit jeweils 3-5 Zellen) nach dem Zufallsprinzip aufgenommen und mithilfe der Computersoftware ImageJ ausgewertet. Die Auswertung basiert auf der Auszählung der Pixel, die einen bestimmten Helligkeitswert überschreiten. Die Summe der L1-7-

positiven Pixel wurde ins Verhältnis zur Fläche der Zellkerne (Summe der positiven Pixel des Hoechst-Signals) gesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Die Depletion von CD9 führt zu gegensätzlichen Auswirkungen auf die HPV16-Infektion in den Zelllinien HeLa, HaCaT und NHEK

Um den potenziellen Einfluss der Tetraspanine CD9 und CD81 auf die HPV-Infektion von menschlichen Epithelzellen zu untersuchen, wurden zunächst Infektionsassays nach Protein-Knockdown in drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Um die Relevanz von CD9 und CD81 genauer einordnen zu können, wurden Untersuchungen zu CD151 mit eingeschlossen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CD151 essenziell für die HPV-Infektion ist und die zelluläre Depletion des Proteins die Infektion drastisch reduziert (Scheffer et al. 2013).

Die Zelllinien HeLa und HaCaT, sowie primäre Keratinozyten (NHEK), wurden wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben für 48 Stunden mit CD9- und CD81-spezifischer siRNA transfiziert. Als Kontrollen wurden Zellen aus allen drei Zelllinien mit CD151-spezifischer- und Kontroll-siRNA versetzt. Anschließend wurden sie für weitere 48 Stunden mit HPV16-Pseudoviren infiziert. Im Folgenden wurden ein Luciferase-basierter Infektionsassay und ein LDH-Assay durchgeführt (Abbildung 5.1). Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazellulär vorkommendes Enzym, dessen Aktivitäts-Messung zur Untersuchung des Lebendzellanteils dient. So kann eine mögliche Toxizität der siRNAs auf die Wirtszellen festgestellt werden.

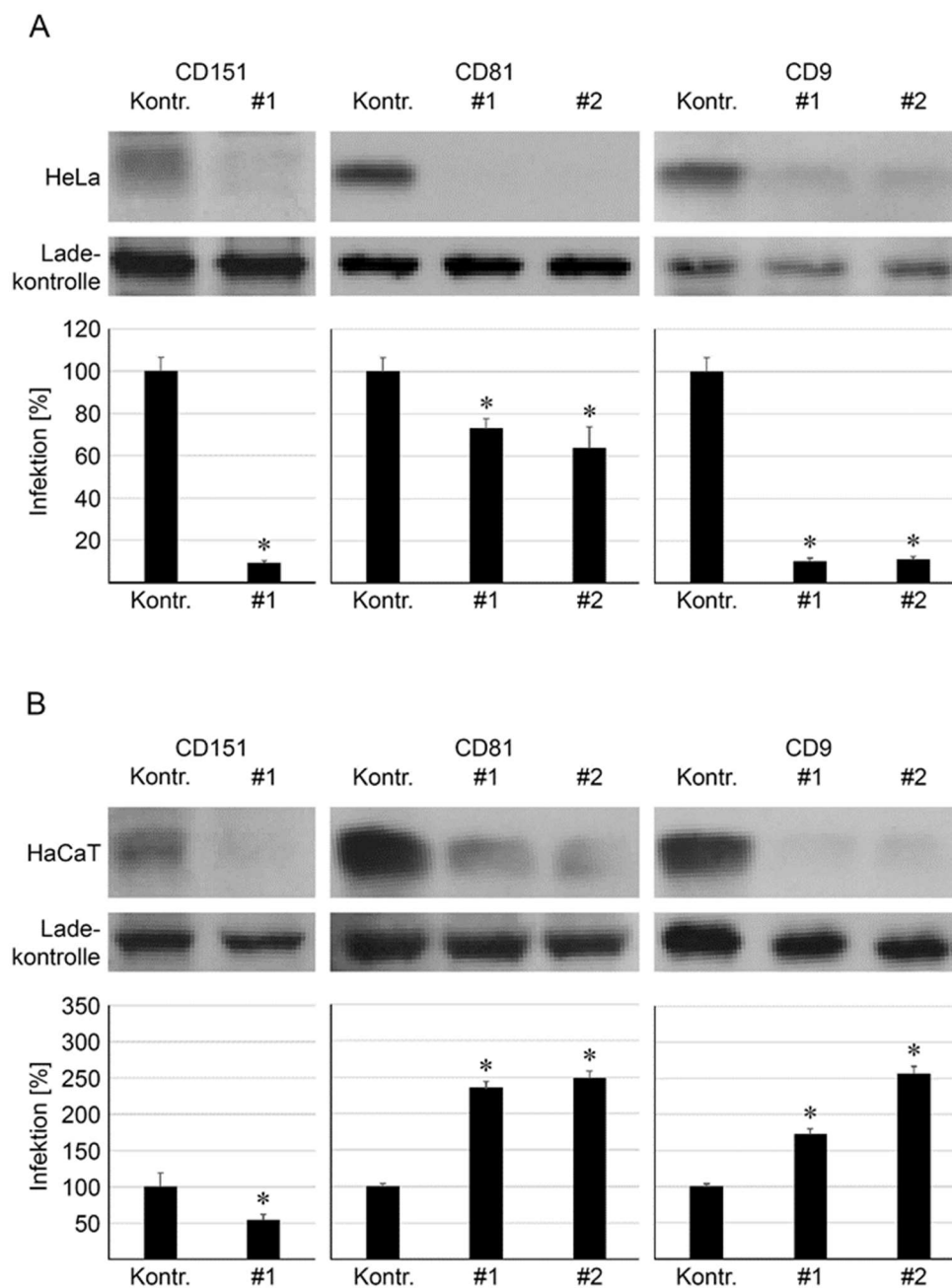
Die Expressionslevel der Tetraspanine wurden mittels Western Blot kontrolliert. Dazu wurden die Zell-Lysate 48 Stunden nach siRNA-Transfektion in nicht-reduzierenden Lämmli-Probenpuffer resuspendiert und geblottet. Im Anschluss wurden die Tetraspanine durch die entsprechenden Antikörper detektiert und die aufgetragene Zellmenge durch eine unspezifische Antikörperbande abgeschätzt.

Wie erwartet, resultierte der Protein-Knockdown von CD151 in deutlich verminderter HPV16-Infektion von NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen.

Im Gegensatz dazu führte die Depletion von CD81 lediglich zu milden Effekten auf die Infektionslevel. So war ein leichter Rückgang der Infektion um 20-30 % in NHEK und HeLa-Zellen messbar. In HaCaT-Zellen konnte überraschenderweise eine Erhöhung der Infektionsrate um mehr als das Doppelte festgestellt werden.

Ähnlich, jedoch gravierender, waren die Auswirkungen des siRNA-Knockdowns von CD9 auf die Infektionslevel. Die Depletion von CD9 führte zu einer deutlichen Infektionsinhibition in den Zelllinien HeLa und NHEK, während die Infektionsrate in HaCaT-Zellen um das Doppelte anstieg.

Zusammenfassend führte die Depletion aller drei Tetraspannine in NHEK und HeLa-Zellen also zu einem verminderten Infektionslevel. Bei HaCaT-Zellen verhielt es sich anders. Hier bewirkte lediglich der CD151-Knockdown einen Rückgang der Infektion, während verminderte CD81- und CD9-Mengen sogar mit einer verstärkten Infektion einhergingen.



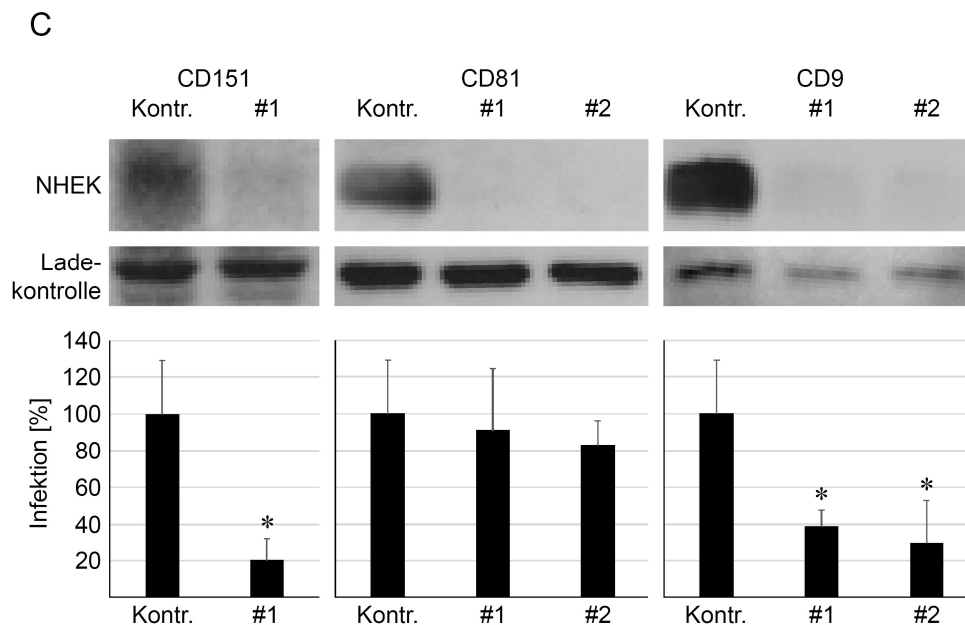


Abbildung 5.1 Vergleichende Infektionsversuche mit HPV16-Pseudoviren nach Knockdown von CD151, CD81 und CD9 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen

Die Keratinozyten HeLa (A), HaCaT (B) und NHEK (C) wurden mit CD151-, CD81- und CD9-spezifischer siRNA transfiziert, 48 Stunden inkubiert und für weitere 24 Stunden (NHEK 48 Stunden) mit HPV16-Pseudoviren infiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Luciferase- und Zellviabilität gemessen. Die Luciferasewerte wurden auf LDH-Aktivität korrigiert und in Bezug zur Kontrolle (Kontr.) gesetzt. Die Depletion der Tetraspanine wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen kontrolliert. Eine unspezifische Antikörperbande diente als Ladekontrolle. * $P < 0,05$ (t-Test, gepaart, zweiseitig)

Da der Einfluss der Tetraspanine auf den HPV-Zelleintritt und nicht deren Einfluss auf die Expression der Luciferase (Reporter der PsV-Infektion) untersucht werden sollte, wurde in entsprechenden Kontrollversuchen ein Effekt auf die Herstellung dieses Enzyms ausgeschlossen. Dazu wurden die Zellen für 48 Stunden mit den jeweiligen Tetraspanin-spezifischen siRNAs und dem Luciferase-Plasmid transfiziert. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Ansatz mit einer Luciferase-spezifischen siRNA transfiziert, als Negativ-Kontrolle wurde ein Ansatz mit Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurde die Luciferin-Aktivität gemessen, LDH-Tests durchgeführt und die Proben in Relation zur Negativ-Kontrolle gesetzt.

Wie Abbildung 5.2. demonstriert, hatten die verwendeten siRNAs keinen signifikanten Einfluss auf die Herstellung der Luciferase.

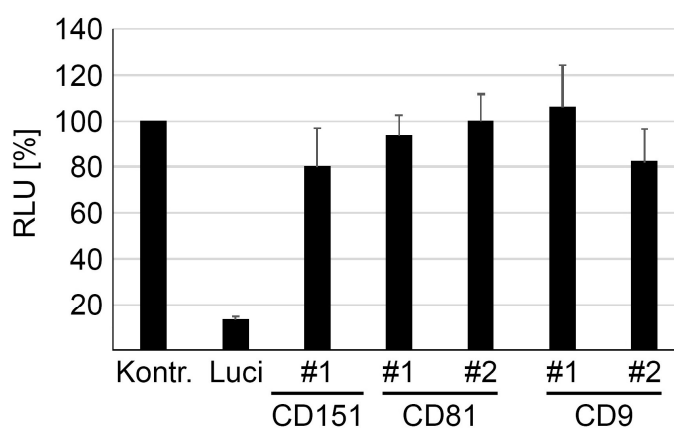


Abbildung 5.2 Kontrolle der Luciferase-Expression nach Knockdown in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden zunächst mit CD151-, CD81-, CD9-spezifischer siRNA und 24 Stunden später mit dem Luciferase-Plasmid transfiziert. Zur Positiv-Kontrolle diente ein Ansatz mit Luciferase-spezifischer siRNA (Luci). Als Negativ-Kontrolle wurde eine siRNA verwendet, welche keine Zielstrukturen in der Zelle hat (Kontr.). Nach Lyse der Zellen wurden Luciferin- und Zellviabilität (über LDH) gemessen (RLU = relative light units). Die Luciferasewerte wurden auf LDH-Aktivität korrigiert und in Bezug zur Kontrolle gesetzt

5.2 Differenz der Expressionsmuster von CD151, CD81 und CD9 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen

Die unterschiedlichen Reaktionen der verschiedenen Keratinozyten auf die Depletion der Tetraspanine (bei NHEK und HeLa-Zellen verminderte Infektionslevel nach Knockdown aller drei getesteten Tetraspanine, bei HaCaT-Zellen herabgesetzte Infektionsraten nach CD151-Depletion, aber erhöhte Infektion nach CD81- und CD9-Knockdown) führten unwillkürlich zu der Frage, ob sich die endogene Menge von CD9, CD81 und CD151 in den drei Zelllinien voneinander unterscheidet und dadurch hemmend oder aktivierend auf die HPV-Infektion wirken kann. Dazu wurden die Expressionsmuster der Tetraspanine durch quantitative Analyse der spezifischen Western Blot-Banden untersucht.

Die Zell-Lysate von NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen. Dies ist wichtig, da die Antikörper zum Nachweis der Tetraspanine für den Western Blot nur nicht-reduzierte Tetraspanine erkennen und binden können. Im Anschluss wurden die Zell-Lysate geblottet und mit den spezifischen CD9-, CD81-, sowie CD151-Antikörpern behandelt. Als Ladekontrolle diente der Nachweis des zellulären β -Aktins.

Es zeigten sich in der Tat deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Zelllinien, was die endogenen Mengen dieser Tetraspanine betrifft (Abbildung 5.3). Das Tetraspanin CD151 ist vor allem in NHEK sehr stark exprimiert, während CD81 vorwiegend in HaCaT-Zellen (und NHEK) vorkommt. Auch CD9 ist in erster Linie in HaCaT-Zellen exprimiert, während HeLa-Zellen und primäre Keratinozyten ein deutlich geringeres Expressionslevel zeigen.

Die CD151-Depletion bewirkte zuvor in allen drei Zelllinien einen etwa gleich starken Rückgang der Infektionslevel. Dabei ist dieses Tetraspanin in ungleicher Menge in den verschiedenen Zellreihen enthalten (niedriger CD151-Gehalt in HeLa- und HaCaT-Zellen, während es von NHEK-Zellen stark exprimiert wird). Die provirale Rolle dieses Tetraspanins scheint also unabhängig von seiner intrazellulären Quantität zu sein.

Anders verhält es sich bei den Tetraspaninen CD9 und CD81. Diese kommen in HaCaT-Zellen in großer Menge vor, während sie in HeLa-Zellen kaum vorhanden sind. In den Infektionsassays führte der Knockdown der beiden Tetraspanine CD9

und CD81 in HeLa-Zellen zu einem Rückgang der Infektionsraten, wobei es in HaCaT-Zellen zu einem Anstieg der Infektionslevel gekommen ist. Der Schluss liegt also nahe, dass die intrinsische Menge von CD81 und CD9 entscheidend dafür ist, ob die Infektion mit dem Papillomvirus gefördert oder behindert wird. Vergleicht man Expressionslevel und Infektionsassays von CD9 und CD81 in NHEK, so verfestigt sich diese Vermutung. In NHEK kommt CD9 analog zu HeLa-Zellen in geringer Menge vor, dementsprechend führt seine Depletion ebenfalls zu einer herabgesetzten Infektion. CD81 allerdings ist relativ stark vertreten in NHEK. So überrascht es nicht, dass es im Infektionsassay nur zu einer schwachen, nicht signifikanten Verminderung der Infektion gekommen ist. Ein hohes Expressionsniveau von CD9 oder CD81, so wie ich es in HaCaT-Zellen identifiziert habe, scheint die Infektion zu behindern.

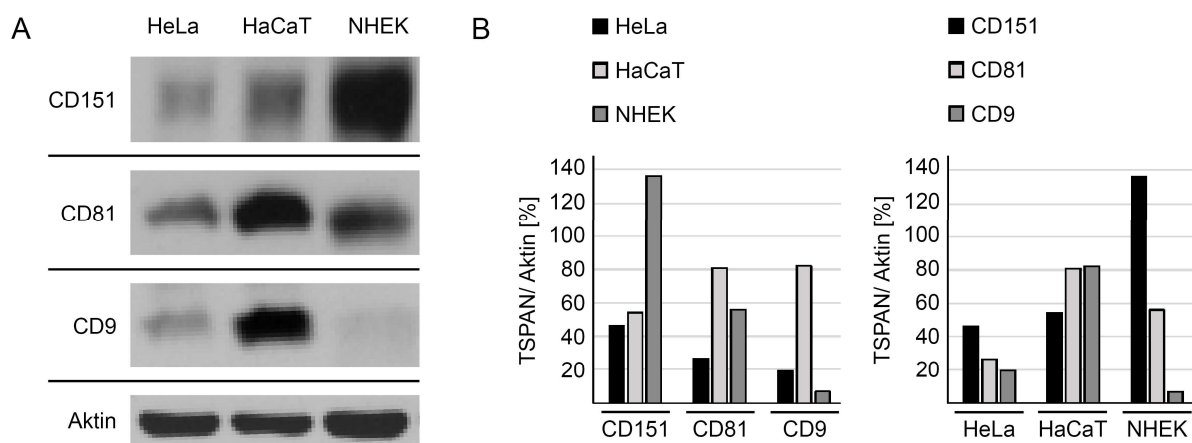


Abbildung 5.3 Expressionsmuster von CD151, CD81 und CD9 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen

Gleiche Zellmengen an NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen wurden lysiert und unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE und Western Blot auf den Gehalt der Tetraspanine und β -Aktin untersucht. Der Nachweis der Tetraspanine erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Das zelluläre β -Aktin wurde mithilfe eines monoklonalen Maus-Antikörpers (mMAk) nachgewiesen. Im Anschluss wurde der Gehalt der Tetraspanine densitometrisch bestimmt und zum Gehalt von β -Aktin in der jeweiligen Probe in Relation gesetzt. (A) zeigt die unterschiedliche Expression der drei Tetraspanine CD151, CD81 und CD9 in den drei Zelllinien HeLa, HaCaT und NHEK. In (B) wurde der relative Gehalt der einzelnen Tetraspanine in den Zelllinien graphisch dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die intrinsische Menge der getesteten Tetraspanine in den einzelnen Zelllinien stark voneinander unterscheidet. Im Hinblick auf die vorausgegangenen Infektionsassays liegt die Vermutung nahe, dass die Menge an exprimiertem CD151 immer einen positiven Einfluss auf die Infektionslevel hat. Im Gegensatz dazu scheint die Quantität von CD81 und CD9 die Infektion in unterschiedliche Richtungen modulieren zu können. Eine geringe bzw. moderate Menge an endogenem CD9 und CD81, wie in HeLa-Zellen (und NHEK), könnte möglicherweise die HPV16-Infektion begünstigen, während eine große Menge CD9 das Infektionslevel negativ zu beeinträchtigen scheint. Ein fast kompletter Verlust, wie nach Knockdown in HeLa und NHEK ist aber ebenfalls ungünstig für die Infektion.

Sowohl in den Infektionsassays nach Knockdown als auch in der Analyse der Expressionsmuster legten die Tetraspanine CD81 und CD9 ähnliche Eigenschaften an den Tag. Der Knockdown beider Tetraspanine führte in NHEK und HeLa-Zellen zur Reduktion der Infektionslevel, während er in HaCaT-Zellen die Steigerung der Infektionsrate bewirkte. Da CD9 jedoch im Vergleich zu CD81 deutlich stärkere Effekte auf die Infektionslevel zeigte, ist davon auszugehen, dass CD9 eine wichtigere Rolle bei der HPV16-Infektion spielt. Daher wurde das Hauptaugenmerk in den weiteren Experimenten auf dieses Tetraspanin gelegt.

5.3 Geringe Kolokalisation von HPV16 und CD9 auf der Zellmembran von infizierten Keratinozyten

Die räumlich enge Assoziation von CD151 und CD81 mit HPV16 auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen konnte bereits nachgewiesen werden (Homsí et al. 2014; Spoden et al. 2008; Scheffer 2013). Für das Tetraspanin CD9 war dies noch nicht untersucht worden und sollte im nächsten Versuch mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

Hierzu wurden HeLa-Zellen kultiviert und 24 Stunden mit GFP-CD9-Expressionsplasmiden transfiziert, so dass die Zellen CD9 exprimierten, welches an ein grün-fluoreszierendes Protein gekoppelt war. Dies ermöglichte die direkte Darstellung des Tetraspanins ohne Antikörperfärbung. Nach Transfektion wurden die Zellen für sieben Stunden mit HPV16-PsV inkubiert, fixiert, sowie mittels HPV16-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Darstellung des Zellkerns erfolgte mittels Hoechst 33342.

Sieben Stunden nach Infektion mit den Pseudoviren konnte eine partielle Kolokalisation des HPV-L1 mit dem Tetraspanin CD9 gezeigt werden. Hierbei handelte es sich aber um seltene Ereignisse. Eine überzeugende Kolokalisation, so wie sie für CD151 gezeigt worden war, war für CD9 nicht zu finden. CD9 scheint damit eher keine Komponente des sekundären Rezeptorkomplexes zu sein, sondern eine andere Funktion auszuüben.

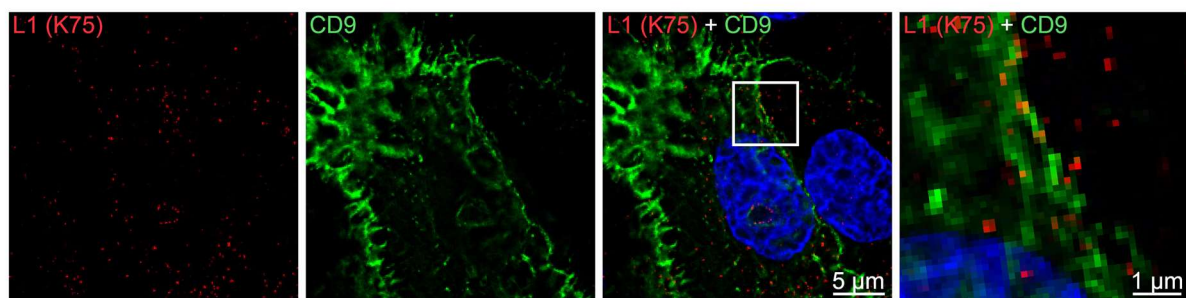


Abbildung 5.4 Räumliche Verteilung von HPV16 und CD9 in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden kultiviert, mit GFP-CD9-Plasmiden transfiziert und für sieben Stunden mit HPV-Pseudoviren infiziert. Im Anschluss folgte die Fixierung der Zellen, bevor diese mit dem polyklonalen HPV16-L1-Antikörper K75 inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff Hoechst 33342 sichtbar gemacht. Auswertung und Bearbeitung erfolgten mittels Axiovision-Software.

5.4 CD9-Überexpression wirkt sich negativ auf die HPV-Infektionslevel aus

In den vorangehenden Experimenten hat sich gezeigt, dass CD9 mengenabhängig die Infektion des humanen Papillomvirus positiv oder negativ beeinflussen kann. Der fast komplette Verlust von CD9 hemmt die Infektion, ein geringes oder moderates CD9-Niveau scheint sich förderlich auf die Infektion auszuwirken, während eine hohe Expression die Infektionsrate wiederum herabsetzt.

Um diese Annahme zu verifizieren, sollte im Folgenden überprüft werden, wie sich ein stark erhöhter CD9-Gehalt auf die Infektionsraten auswirkt. Zu diesem Zweck wurde mittels CD9-Überexpression in HeLa-Zellen ein deutlicher Überschuss von CD9 so, wie er natürlicherweise in der Zelllinie HaCaT vorkommt, induziert.

Die HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden mit zwei verschiedenen CD9-Expressionsplasmiden (CD9 Hygro und CD9 HA), sowie einer Kontroll-DNA transfiziert. Anschließend wurden sie mit HPV16-Pseudoviren infiziert, um 24 Stunden später durch Luciferase-basierte Infektionsassays die Infektionsrate zu bestimmen. Kontrolliert wurden die Expressionslevel von CD9 im Western Blot. Dazu wurden entsprechende Zell-Lysate 24 Stunden nach Infektion mit Pseudoviren unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen.

Wie vermutet, wurde die Infektionsrate der HPV16-Pseudoviren durch die CD9-Überexpression der Zielzellen erheblich beeinträchtigt. Im Vergleich zur Kontrolle sank die Anzahl infizierter Zellen, welche zuvor mit CD9-Plasmiden behandelt worden waren, auf etwa 20 % (Abbildung 5.5 A). Weiterführende Experimente mit verschiedenen Konzentrationen von CD9 zeigten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem CD9-Gehalt der Zellen und dem Infektionslevel (Abbildung 5.5 B). Je stärker das Tetraspanin CD9 von den Zielzellen exprimiert wurde, desto weniger stark wurden sie infiziert.

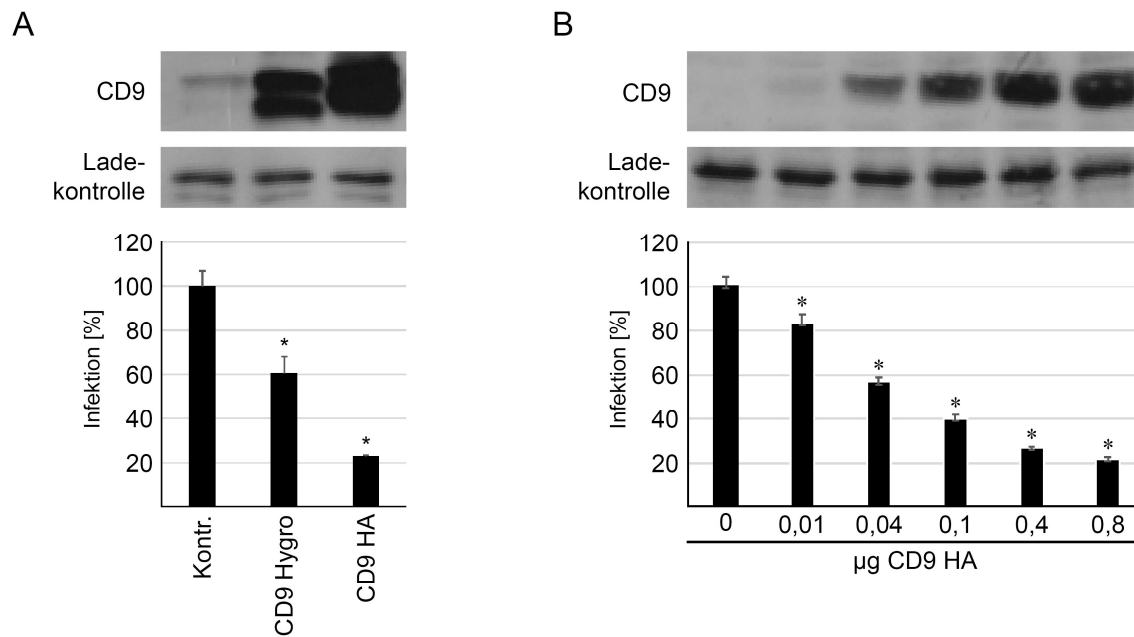


Abbildung 5.5 Infektionsassays nach CD9-Überexpression in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden (A) mit zwei verschiedenen CD9-Plasmiden derselben Konzentration, CD9 Hygro (ohne Tag) und CD9 HA (mit HA-Tag), beziehungsweise mit CD9 HA in aufsteigender Konzentration (B) für 24 Stunden transfiziert und für weitere 24 Stunden mit HPV16-Pseudoviren infiziert.

Anschließend wurden die Zell-Lysate auf die Aktivität von Luciferase und LDH hin untersucht.

Die Luciferasewerte wurden auf LDH-Aktivität korrigiert und in Bezug zur Kontrolle (Kontr.) gesetzt.

* $P < 0,05$ (t-Test, gepaart, zweiseitig). Die CD9 Expression wurde mittels SDS-PAGE und

Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen kontrolliert. Unspezifische Banden dienen als Ladekontrolle.

5.5 CD9 beeinflusst die HPV16-Endozytose

Nachdem durch die vorangegangenen Versuche ein deutlicher konzentrationsabhängiger Effekt des Tetraspanins CD9 auf die HPV-Infektion nachgewiesen werden konnte, konzentrierten sich die folgenden Experimente darauf, mittels verschiedener Methoden den entscheidenden Schritt des Infektionszyklus zu identifizieren, auf den CD9 Einfluss nimmt.

5.5.1 Die Depletion von CD9 hat keinen Einfluss auf die initiale Bindung von HPV16

Anhand von Bindungsassays in Western Blot- und Durchflusszytometrie-Analysen wurde der Effekt des CD9-Knockdowns auf die primäre Bindung der Viren an die Zelloberfläche getestet.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen zunächst für 48 Stunden mit CD9- und CD151-spezifischer siRNA transfiziert, und mit HPV16-PsV für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich gewaschen, um nicht gebundene Viren zu entfernen. Die Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Als Positiv-Kontrolle für inhibierte Bindung dienten Zellen, die für eine Stunde vor Infektion mit Polyethylenimin (PEI) behandelt worden waren. PEI ist ein Inhibitor der primären Bindung des HPV16 an die Zelloberfläche. Als Negativ-Kontrollen dienten unbehandelte, sowie CD151-depletierte Zellen, da bereits bekannt war, dass CD151 die Bindung der Viren nicht beeinflusst (Scheffer et al. 2013).

HPV16-L1 wurde mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 16L1-312F nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente das zelluläre β -Aktin. Die Menge des HPV16-L1 wurde in Relation zum β -Aktin-Gehalt der Zellen gesetzt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels ImageJ.

Die Western Blot-Banden zeigten keine wesentlich verringerte Bindung der Pseudoviren an die CD9- und CD151-depletierten Zellen, verglichen mit den nicht behandelten Kontrollzellen (Abbildung 5.6 A). CD9 und CD151 scheinen also beide nicht an der primären Bindung von HPV16-Pseudoviren beteiligt zu sein.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Bindung zusätzlich mithilfe der Durchflusszytometrie untersucht. HeLa-Zellen wurden dazu mit zwei verschiedenen CD9-spezifischen siRNAs transfiziert und mit Pseudoviren für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die an die Zelloberfläche gebundenen Pseudoviren mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des polyklonalen L1-Antikörper K75 quantifiziert.

Wie Abbildung 5.6 B illustriert, haben K75-markierte Pseudoviren in gleichem Maße an CD9-depletierte wie an die Kontrollzellen gebunden. Somit konnten die Resultate unserer vorangehenden Bindungsassays bestätigt werden, dass das Tetraspanin nicht die initiale Bindung des Papillomvirus beeinflusst, sondern vermutlich nachfolgende Schritte der Infektion.

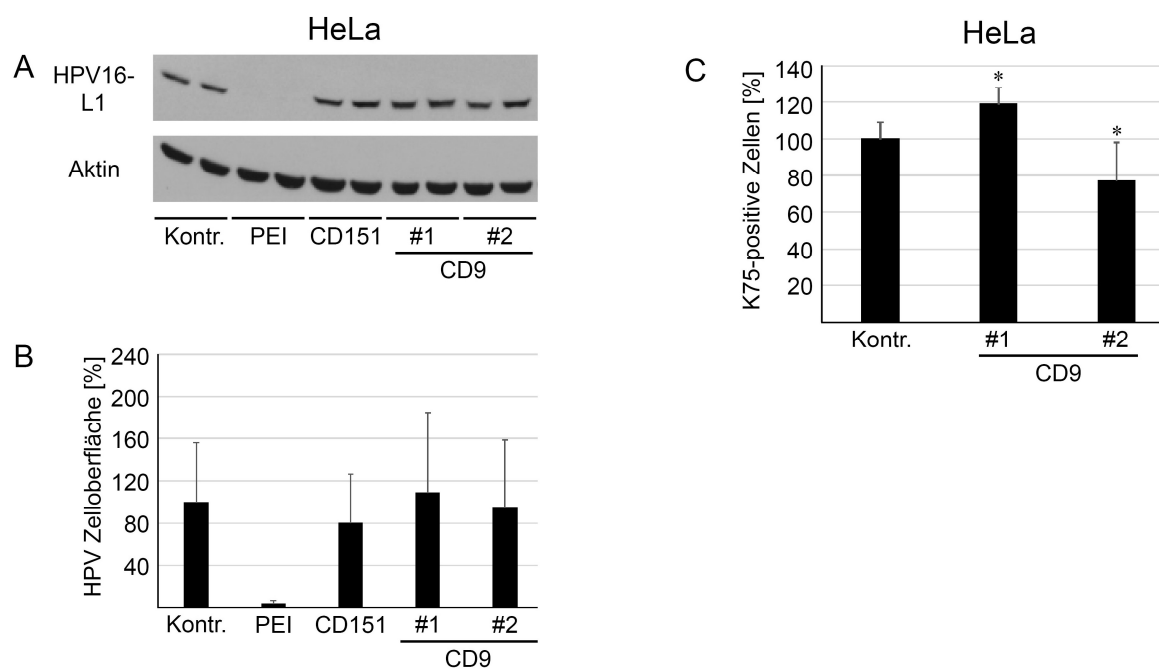


Abbildung 5.6 Primäre Bindung von HPV16-Pseudoviren an die Zelloberfläche von HeLa-Zellen

(A) HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden CD9- und CD151-spezifischen siRNAs für 48 Stunden transfiziert und anschließend für eine Stunde mit HPV16-Pseudoviren infiziert. Zum einen wurden die Zellen in Lämmli-Probenpuffer lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot auf den Gehalt von HPV16-L1 hin untersucht. Als Positiv-Kontrolle dienten HeLa-Zellen, die eine Stunde vor Infektion mit 52 nM PEI, einem Bindungsinhibitor von HPV-Viren, inkubiert worden waren. HPV16-L1 wurde mit dem mMAk 16L1-312F nachgewiesen. Der Nachweis des zellulären Proteins β -Aktin erfolgte mit dem mMAk gegen β -Aktin. (B) Zeigt die quantitative Analyse aus drei unabhängigen Western Blots. (C) Zum anderen wurden die mit der Zelloberfläche assoziierten Pseudoviren nach 48-stündiger Kontroll- oder CD9-siRNA-Transfektion mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des polyklonalen L1-Antikörper K75 quantifiziert. * $P < 0,05$ (t-Test, gepaart, zweiseitig)

5.5.2 Die Depletion von CD9 führt zu einer Reduktion der HPV16-Endozytose in HeLa-Zellen

Im weiteren Verlauf sollte der Effekt von CD9 auf die virale Endozytose evaluiert werden. Hierzu wurde die HPV-Internalisierung bei CD9-depletierten und CD9-haltigen HeLa-Zellen mittels zweier Verfahren untersucht. Zum einen sollten die HPV-Viren mittels Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert werden. Zum anderen wurden mittels Durchflusszytometrie die auf der Zelloberfläche verbliebenen, also nicht internalisierten Viren detektiert.

Bei der Kolokalisationsanalyse von HPV16-Pseudoviren mit dem Endosomen-Marker CD63 wurde die Anzahl endozytierter Pseudoviren in CD9-depletierten HeLa-Zellen mit der in Kontrollzellen verglichen.

Auf Deckgläsern gewachsene HeLa-Zellen wurden mit CD9-spezifischer siRNA transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Nach der Infektion mit HPV16-Pseudoviren für sieben Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, für die Immunfluoreszenz vorbereitet und mit dem L1-Antikörper K75 sowie einem CD63-Antikörper behandelt. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Abbildung 5.7 A) wurde die Kolokalisation von CD63-positiven und K75-positiven Viren in Endozytosevesikeln sichtbar gemacht. Für die quantitative Analyse der CD63-kolokalisierten Partikel wurde eine Pixel-für-Pixel-Analyse mit dem Axiovision Kolokalisationsmodul durchgeführt. Bei den Kontrollzellen mit unbeeinflusstem CD9-Gehalt zeigten sich zahlreiche Kolokalisationen von CD63 mit L1. Im Gegensatz dazu war bei den CD9-depletierten Zellen nur eine geringe Kolokalisation nachweisbar. Die quantitative Analyse zeigt ein Absinken der Kolokalisation um 90 %. Dies deutet klar darauf hin, dass die Aufnahme der Viren in die Zelle durch die CD9-Depletion in HeLa-Zellen gestört ist (Abbildung 5.7 B).

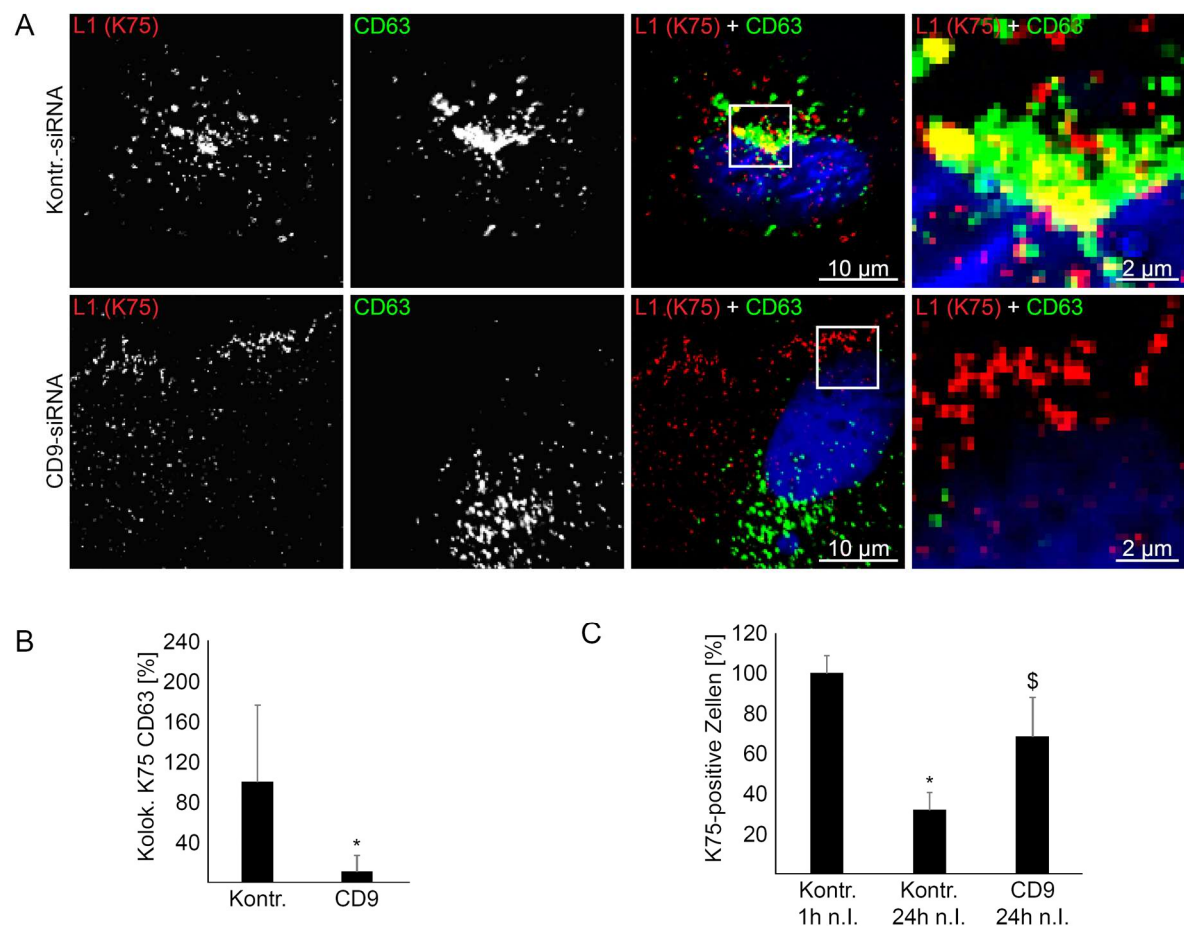


Abbildung 5.7 Kolokalisation von CD63 und HPV16 in Endozytosevesikeln in HeLa-Zellen

(A) HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für sieben Stunden infiziert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit dem HPV16-L1-Antikörper K75 und dem CD63-Antikörper behandelt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht. Die Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte die Kolokalisation von CD63 und K75-positiven Viren in Endozytosevesikeln. (B) Zur quantitativen Analyse der CD63-kolokalisierten Partikel wurde eine Pixelmessung mittels des Axiovision Kolokalisationsmoduls durchgeführt. In den CD9-depletierten HeLa-Zellen zeigte sich lediglich eine geringe Kolokalisation von CD63 mit dem K75-L1-Signal. (C) Durchflusszytometrische Bestimmung der auf der Zelloberfläche gebundenen HP-Viren bei CD9-depletierten Zellen. HeLa-Zellen wurden mit CD9-siRNA transfiziert und für 24 Stunden mit HPV16-Pseudoviren inkubiert. Die Kontrollzellen wurden für eine Stunde beziehungsweise 24 Stunden mit den Viren inkubiert. Anschließend wurden die Oberflächen-assoziierten Viren wie in Kapitel 4.9 beschrieben mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Hierbei zeigte sich in der Gegenüberstellung der Kontrollzellen, dass nach 24 Stunden signifikant deutlich weniger Oberflächen-assoziierte Viren auf den Zellen zu detektieren waren als eine Stunde nach Infektion. Verglichen mit den Kontrollzellen nach 24 Stunden Infektion waren im Testansatz der CD9-depletierten Zellen auch nach 24 Stunden deutlich mehr Viren auf der Zelloberfläche verblieben. * $P < 0,05$ (t-Test, gepaart, zweiseitig)

Zusätzlich zur Kolokalisationsanalyse wurde die Durchflusszytometrie verwendet, um deren Ergebnisse zu validieren. Hierbei wurden im Durchflusszytometer die nach der Infektion auf der Zelloberfläche verbliebenen, also nicht internalisierten Pseudoviren, gemessen. Anhand dieser Methode lässt sich also indirekt das Ausmaß der Endozytose beurteilen.

CD9-depletierte HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden mit Pseudoviren inkubiert, während Zellen der Kontrolle eine Stunde, beziehungsweise 24 Stunden, inkubiert wurden. Die Oberflächen-assoziierten Virionen wurden dann wie in Kapitel 4.9 beschrieben im Durchflusszytometer quantifiziert. Wie Abbildung 5.7 C demonstriert, führt der Knockdown von CD9 zu einer starken Hemmung der Aufnahme der Viren in die Wirtszellen. 24 Stunden nach der Infektion waren nur noch 20 % der K75-markierten Viruspartikel auf der Zelloberfläche in der Kontrollgruppe nachweisbar. Im Gegensatz dazu waren noch etwa 70 % der CD9-depletierten Zellen K75-positiv im Vergleich zur initialen Virusbindung nach einer Stunde Inkubation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels Kolokalisationsanalyse und Durchflusszytometrie gezeigt werden konnte, dass eine CD9-Depletion in den schwach exprimierenden HeLa-Zellen die Endozytose der humanen Papillomviren negativ beeinflusst. Der CD9-Knockdown in HeLa-Zellen führte einerseits dazu, dass weniger Pseudoviren in den Endozytosevesikeln nachweisbar waren; andererseits verblieben in diesen Zellen deutlich mehr Viren auf der Zelloberfläche, so dass von einer Kausalität auszugehen ist.

5.5.3 Die Depletion von CD9 moduliert das HPV16-Kapsid-Disassembly

Als zusätzliche Kontrolle der HPV-Endozytose wurde die Eröffnung des viralen Kapsids, das sogenannte Kapsid-Disassembly, untersucht. Nach der verminderten Virusaufnahme bei CD9-Knockdown sollte erwartungsgemäß auch der konsequente Schritt des Infektionszyklus, das Kapsid-Disassembly, negativ beeinflusst sein. Bei dieser Methode wurde nach der Aufnahme der Viren in die Zellen die Menge der eröffneten Kapside in den Endosomen gemessen. Dazu wurde der spezifische monoklonale L1-Antikörper L1-7 verwendet, der nur ein spezielles Epitop des Kapsidproteins L1 erkennt, welches erst durch den Aufbruch des Kapsids zugänglich wird (Sapp et al. 1994; Spoden et al. 2008).

Nach der Transfektion mit CD9-spezifischer siRNA wurden die Zellen mit HPV16-Pseudoviren für sieben Stunden infiziert. Die aufgebrochenen viralen Kapside wurden mit dem monoklonalen Maus-Antikörper 33L1-7 und die Zellkerne mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht. Fixierung, Färbung und mikroskopische Dokumentation erfolgten wie im den Kapiteln 4.11.1 und 4.11.2 beschrieben. Abbildung 5.8 A zeigt, dass der CD9-Knockdown in HeLa-Zellen in einer erheblichen Reduktion der L1-7-positiven Endosomen um etwa 40-15 % resultierte, was auf eine Inhibition des HPV16-Disassembly zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu führte die Depletion in HaCaT-Zellen (Abbildung 5.8 B) zu einer geringfügig erhöhten Anzahl L1-positiver Pixel. Dies korreliert mit der Beeinflussung der Infektion nach Knockdown in HeLa- und HaCaT-Zellen.

Während also ein niedriges CD9-Expressionslevel, wie in HeLa-Zellen, die Virusaufnahme und damit das Disassembly fördert, hemmt ein quasi kompletter Verlust, wie er durch die siRNA-Behandlung erzielt wird, die Virusaufnahme, das Kapsid-Disassembly und schließlich auch die Infektion. Ein hoher CD9-Gehalt, wie in HaCaT-Zellen, hemmt diesen Prozess ebenfalls. Eine Reduktion durch siRNA wirkt daher in CD9-hoch-exprimierenden Zellen förderlich.

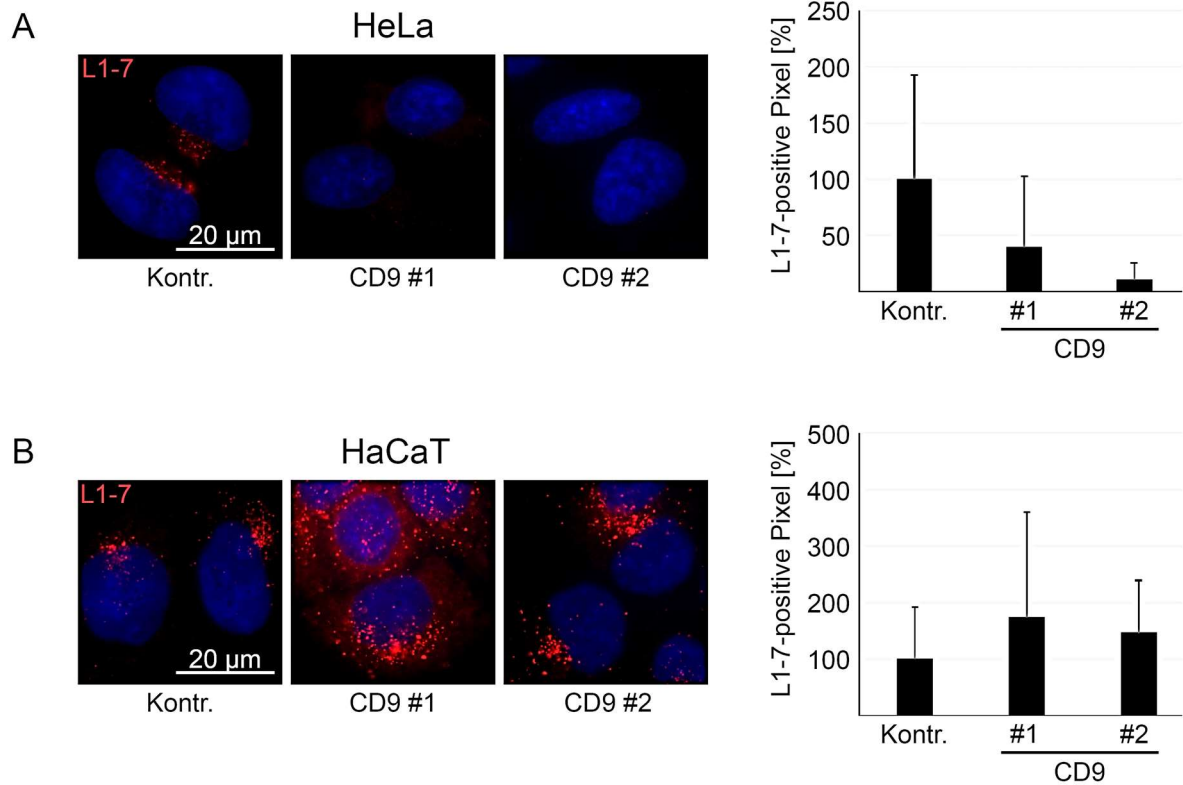


Abbildung 5.8 Das Kapsid-Disassembly von HPV16 wird durch CD9 beeinflusst

HeLa-Zellen (A) und HaCaT-Zellen (B) wurden nach Transfektion mit CD9- und Kontroll-siRNA für sieben Stunden mit Pseudoviren inkubiert. Die aufgebrochenen Kapside wurden mit dem Antikörper 33L1-7 und die Zellkerne mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der L1-7-positiven Pixel. * $P < 0,05$ (t-Test, gepaart, zweiseitig)

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung von CD9, CD81 und CD151 in Bezug auf die HPV-Infektion vergleichend untersucht und CD9 als neuer Entry-Modulator identifiziert und analysiert.

Zunächst wurde gezeigt, dass der Knockdown der Tetraspanine CD9, CD81 und CD151 die HPV-Infektion beeinflusst. Wie bereits zuvor von Scheffer et al. demonstriert worden war (Scheffer et al. 2013), führte die Depletion von CD151 auch in meinen Versuchen zu verminderten Infektionsraten in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen. Überraschenderweise zeigten die Knockdown-Versuche mit CD9 und CD81 teils konträre Ergebnisse. Während die Depletion dieser beiden Tetraspanine in NHEK und HeLa-Zellen zur verminderten Infektion führte, stiegen in HaCaT-Zellen die HPV-Infektionsraten deutlich an. Diese Ergebnisse waren insofern verwunderlich, als CD9, CD81 und CD151 oftmals miteinander assoziieren, im sekundären Rezeptorkomplex gemeinsam vorhanden sein könnten und CD151 und CD81 mit dem HP-Virus assoziieren, wie bereits in der Literaturdiskussion dargelegt wurde (Spoden et al. 2008; Homsí et al. 2014). Aus diesem Grund hatte ich einen ähnlichen Einfluss der drei Tetraspanine auf die HPV-Infektion erwartet. Doch während CD151 die Aufnahme des Virus in allen drei Zelllinien fördert, beeinflussen die Tetraspanine CD9 und CD81 die Infektionsrate offenbar zellabhängig auf positive oder negative Weise.

Um dem unterschiedlichen Einfluss der Tetraspanin-Depletion auf die Infektion weiter auf den Grund zu gehen, wurde der Gehalt an Tetraspaninen in den zu untersuchenden Zelllinien analysiert. Dazu führte ich eine quantitative Analyse ihrer Expressionsmuster durch. Hier zeigte sich eine sehr unterschiedliche Repräsentation der Tetraspanine in den drei Zelllinien. Demnach ist CD151 in großen Mengen in NHEK enthalten. Da CD151 Teil des sekundären Rezeptorkomplexes von onkogenen HPV-Typen ist (Scheffer et al. 2013), war eine hohe Expression in den natürlichen Zielzellen, den primären Keratinozyten (NHEK) zu erwarten und konnte in dieser Arbeit klar nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu exprimieren NHEK und HeLa-Zellen nur eine geringe Menge an CD9 und CD81, während HaCaT-Zellen eine hohe Expression zeigen. In Hinblick auf die vorausgegangenen Infektionstests lag insofern die Vermutung nahe, dass die Quantität der Tetraspanine einen Effekt auf die Infektion haben könnte. So scheinen die Tetraspanine CD81 und CD9

konzentrationsabhängig entweder förderlich oder aber hinderlich auf die HPV-Infektionsraten zu wirken. Eine hohe Menge des endogenen CD9 und CD81, wie beispielsweise natürlicherweise in HaCaT-Zellen enthalten, scheint die HPV16-Infektion deutlich negativ zu beeinflussen.

Interessanterweise haben die beiden Tetraspanine CD81 und CD9 schon mehrfach synergistische und negativ regulatorische Effekte gezeigt. Eine ähnliche Wirkweise ist insofern nicht verwunderlich, als dass CD81 und CD9 phylogenetisch sehr nah miteinander verwandt sind (Garcia-España et al. 2008). Beide Tetraspanine begünstigen unter anderem die Fusion von Spermien und Eizellen, sowie die Fusion von Muskelzellen (Takahashi et al. 2001; Tachibana und Hemler 1999). Negative Effekte haben CD9 und CD81 beispielsweise bei der Verschmelzung von Phagozyten oder der Membranfusion bei der HIV-1-Infektion gezeigt (Gordón-Alonso et al. 2006; Takeda et al. 2003). In den Makrophagen des Lungengewebes scheint sowohl die alleinige Depletion von CD9, als auch der kombinierte Knockout von CD9 und CD81 die Expression und Aktivität von Metalloproteasen zu steigern (Takeda et al. 2008; Suzuki et al. 2009).

Im Folgenden sollte nun gezeigt werden, dass die Wirkweise der Tetraspanine CD81 und CD9 abhängig von deren Quantität ist. Zu diesem Zweck wurde in HeLa-Zellen, welche natürlicherweise wenig CD9 enthalten, mittels Überexpression ein hoher CD9-Gehalt erreicht. Der anschließende Infektionsversuch bestätigte die inhibitorische Wirkung eines hohen CD9-Levels auf die HPV-Infektion. Diesen Effekt konnte ich sogar direkt abhängig vom CD9-Gehalt der Zellen darstellen.

Zusammenfassend stelle ich folgende Hypothese auf. Für CD151 gilt: je mehr CD151, desto besser läuft die HPV16-Infektion ab. Für CD9 und CD81 gilt dagegen: ein geringer oder moderater Gehalt wird für die effiziente Infektion benötigt. Eine Erhöhung oder Verminderung dieses optimalen Tetraspanin-Levels wirkt sich dagegen nachteilig auf die HPV16-Infektion aus.

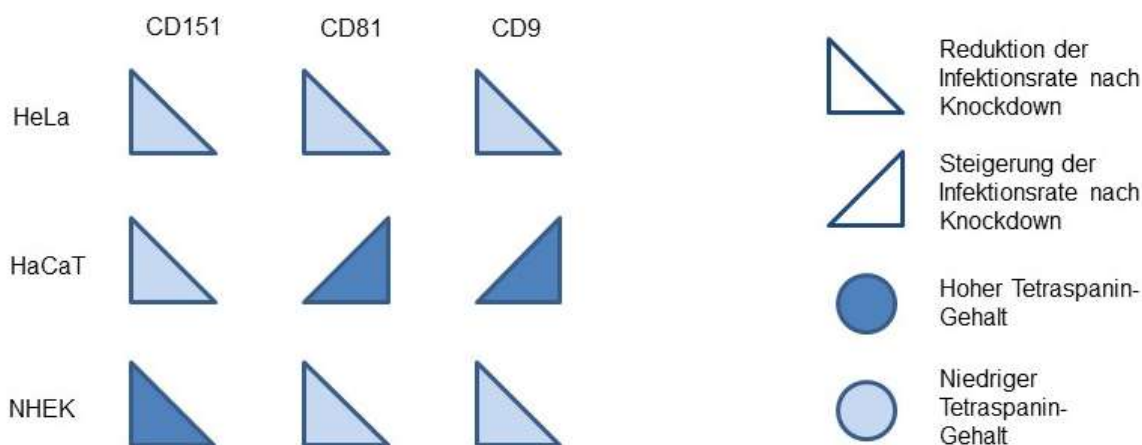


Abbildung 6.1 Schematische Zusammenfassung der Abbildungen 5.1 und 5.3

Zusammenführung von Abbildung 5.1 und Abbildung 5.3. Darstellung der Tetraspanin-Expression von CD9, CD81 und CD151 in NHEK, HeLa- und HaCaT-Zellen in Relation zur HPV-Infektionsrate. Primären Keratinozyten, die Zielzellen von HPV16, haben die optimale Tetraspanin Ausstattung für eine effiziente Infektion.

Um welche Schritte handelt es sich nun genau? Wie Scheffer et al. bereits gezeigt hatten, ist das Tetraspanin CD151 essenziell für die Endozytose des HP-Virus. Bereits an der Zelloberfläche kolokalisierte CD151 mit den Viren, bevor Rezeptorkomponente und Virus im Anschluss gemeinsam internalisiert wurden (Scheffer et al. 2013). Auch der Effekt von CD81 auf die HPV-Infektion wurde bereits ausführlich untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass CD81 keinen Einfluss auf die initiale Viruszellbindung hat, aber ebenfalls an der Endozytose von HPV beteiligt ist und sogar teilweise mit dessen Kapsidprotein L1 kolokalisiert (Brasch 2013; Homsy et al. 2014). Da somit für CD151 und CD81 der essenzielle Schritt im HPV-Infektionszyklus bereits erforscht war und CD81 nur geringfügig zur Infektion beiträgt (Abbildung. 5.1), lag der Fokus dieser Arbeit auf der Rolle des Tetraspanins CD9 bei der HPV-Infektion.

Mit Hilfe einer Reihe von funktionellen Analysen, wie Bindungs- und Endozytose-Experimenten, sowie Kolokalisationsstudien, konnte gezeigt werden, dass CD9 ebenfalls keine Auswirkung auf die initiale Bindung von HPV16 an die Zelloberfläche der Keratinozyten hat (Abbildung 5.6).

Vielmehr moduliert das Tetraspanin offenbar die Internalisierung der Viren in die Zielzellen, obwohl fast keine Kolo-kalisation zwischen CD9 und den Viren festgestellt werden konnte (Abbildung 5.4). In HeLa-Zellen kolo-kalisiert das HP-Virus in Endozytosevesikeln mit CD63 (Abbildung 5.7). Nach CD9-Depletion konnte diese Kolo-kalisation nicht mehr nachgewiesen werden, während gleichzeitig mehr Pseudoviren auf der Zelloberfläche detektiert wurden. Des Weiteren wurde auch der Einfluss der CD9-Depletion auf das Kapsid-Disassembly in HeLa-Zellen fluoreszenzmikroskopisch und densitometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich wie erwartet, dass nach CD9-Knockdown mit gehemmter Virusinternalisierung auch das Disassembly der Viren vermindert ist (Abbildung 5.8). In HaCaT-Zellen hingegen konnten geringfügig mehr zerlegte virale Partikel nach CD9-Depletion detektiert werden. Somit waren auch diese Ergebnisse kongruent mit den bisher erhobenen Infektionsdaten und bestätigten die Theorie, dass ein hoher CD9-Gehalt der Zellen die Infektion und bereits den Viruseintritt negativ beeinflusst.

Da CD9 kaum in Assoziation mit den Viren gefunden werden konnte, könnte CD9 indirekt über die Beeinflussung anderer proviraler Faktoren auf die Infektion einwirken. Für CD9 wurden bisher zahlreiche Interaktionspartner beschrieben (Matrix-Metalloproteasen, Integrine, γ -Sekretase, EWI-Proteine und Wachstumsfaktorrezeptoren) (Arduise et al. 2008; Liu et al. 2019; Jones et al. 1996; Baudoux et al. 2000; Wakabayashi et al. 2009; Stipp et al. 2001a; Stipp et al. 2001b; Murayama et al. 2008). Auch für die Tetraspanine CD151 und CD81 wurden bisher mutmaßliche Interaktionspartner, wie Integrine, γ -Sekretase, die EWI-Proteine, der Wachstumsfaktor und -rezeptor, sowie die Matrix-Metalloproteasen in Betracht gezogen (Stipp und Hemler 2000; Wakabayashi et al. 2009; Charrin et al. 2003; Diao et al. 2012; Deng et al. 2012; Hemler 2005; Takeda et al. 2008; Yañez-Mó et al. 2008) (Abbildung 6.2) und werden im Folgenden diskutiert.

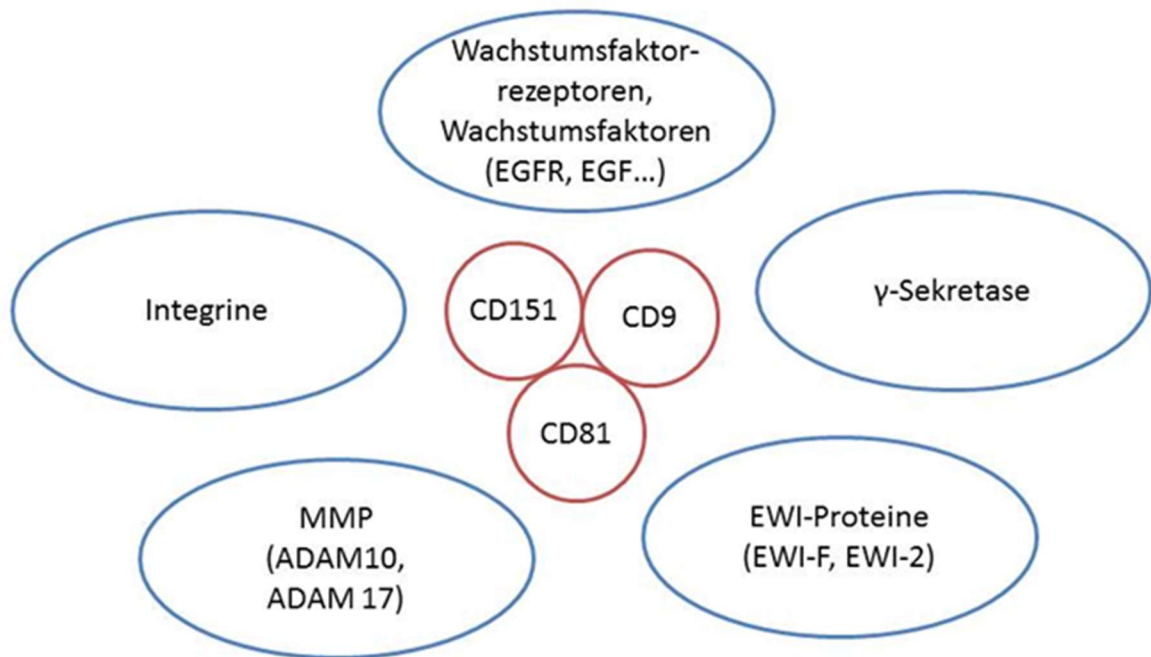


Abbildung 6.2 Potenzielle Tetraspanin-Interaktionspartner und Kofaktoren der HPV-Infektion.

Zusammenstellung möglicher Interaktionspartner der Tetraspanine CD151, CD81 und CD9, über die diese eine Einflussnahme auf die Infektion mit dem humanen Papillomvirus nehmen könnten.

6.1 Interaktionspartner Integrine

Für das Tetraspanin CD151 war bereits in vorausgehenden Publikationen gezeigt worden, dass es Komplexe mit sogenannten Laminin-bindenden Integrinen (z. B. $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1/4$) bildet und deren Aktivität kontrollieren kann (Stipp 2010; Stipp und Hemler 2000; Berditchevski et al. 1996). Dabei wird vor allem eines der CD151-assoziierten Integrine, das Integrin $\alpha 6$, bereits seit langem als mutmaßlicher HPV-Rezeptor diskutiert (Evander et al. 1997; Yoon et al. 2001). Scheffer et al. konnten schließlich mittels Recovery-Experimenten nachweisen, dass die Bildung von CD151-Integrin-Komplexen wichtig für die HPV16-Infektion ist (Scheffer et al. 2013). In der Tat führte die Depletion von CD151, Integrin $\alpha 3$ und Integrin $\alpha 6$ zu reduzierten HPV-Infektionslevel in den getesteten Zellen (Scheffer et al. 2013; Finke et al. 2020). Bislang nicht publizierte Daten von Scheffer, Spoden und Florin bestätigen sogar die Ko-Internalisierung von Integrinen mit HPV16 in infizierten Epithelzellen. Dabei beeinflussen die CD151-Integrin-Komplexe nicht die initiale Virusbindung, sondern vielmehr die nachfolgende Endozytose, wie Versuche mit CD151-Mutanten demonstrieren (Scheffer et al. 2013).

Als mögliche Interaktionspartner von CD9 und CD81 zur Modulation der HPV-Infektion käme die Familie der Integrine ebenfalls in Frage. Für das Tetraspanin CD9 konnte bereits die Assoziation mit dem Integrin $\alpha 6\beta 4$ in epidermalen Keratinozyten demonstriert werden (Jones et al. 1996; Baudoux et al. 2000). Auch CD81 ist dazu in der Lage, mit den Laminin-bindenden Integrinen $\alpha 3$ und $\alpha 6$ zu interagieren (Stipp und Hemler 2000; Berditchevski et al. 1996).

In Bezug auf die Infektion mit dem humanen Papillomvirus wäre beispielsweise denkbar, dass die Tetraspanine CD81 und CD9 die Aktivität der Integrine hemmen oder sie zumindest nicht so sehr stimulieren, wie die Interaktion mit CD151 das zu tun vermag. Möglicherweise konkurrieren die beiden Tetraspanine mit CD151 um Integrin-Bindungsstellen. Bei einer niedrigen CD9- und CD81-Konzentration könnten an der Zellmembran überwiegend Komplexe von CD151 mit Integrinen vorliegen, welche sich positiv auf die HPV-Endozytose auswirken. Ein hoher Gehalt von CD9 oder CD81 würde möglicherweise CD151 von den Integrin-Bindungsstellen verdrängen, und so die Interaktion der beiden Proteine stören.

Allerdings konnten Rubenstein et al. darlegen, dass zumindest CD9 mit anderen Tetraspaninen nicht direkt um Integrin-Bindungsstellen konkurriert. Stattdessen

scheint sich dieses Tetraspanin eher in bereits vorhandene Cluster zu integrieren (Rubinstein et al. 1996).

Alternativ wäre es denkbar, dass CD9 und CD81 statt mit CD151 direkt um die Integrin-Bindungsstellen zu konkurrieren, auf indirekte Weise die Interaktion dieser beiden Proteine stören. Hierbei könnte ihre Rolle als Organisatoren der TEM bedeutsam sein. Eine hohe Konzentration von CD9/ CD81-Cluster könnte beispielsweise die laterale Diffusion von CD151 und Integrinen in der Zellmembran behindern und so die Assoziation der beiden erschweren. In der Folge würde die Internalisierung des humanen Papillomvirus gehemmt werden.

6.2 Interaktionspartner γ -Sekretase

Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner der Tetraspanine und gleichzeitiger Modulator der Infektion mit dem humanen Papillomvirus ist die γ -Sekretase (Karanam et al. 2010; Zhang et al. 2014). Dieses Enzym ist ein aus vier Untereinheiten bestehender membranständiger Proteinkomplex (Edbauer et al. 2003), welcher beispielsweise in der Plasmamembran (Ray et al. 1999), am Golgi-Apparat (Baulac et al. 2003) und in Lysosomen (Pasternak et al. 2003) vorkommen kann.

Für die HPV-Infektion ist die Funktion der Protease essenziell. Ihre Hemmung führt zu einem Einbruch der Infektionslevel, wie Versuche mit Inhibitoren und γ -Sekretase-spezifischen siRNAs zeigten (Zhang et al. 2014; Karanam et al. 2010).

Interessanterweise ist ein Teil der Plasmamembran-assoziierten γ -Sekretase in TEMs verteilt. Die Tetraspanine CD9 und CD81 interagieren nicht nur mit dem Enzymkomplex, sondern beeinflussen dessen Funktion sogar direkt (Wakabayashi et al. 2009). In Anbetracht dieser Erkenntnisse ließe sich darüber spekulieren, dass die Tetraspanine CD9 und CD81 möglicherweise dazu in der Lage sind, durch Regulation der γ -Sekretase-Aktivität an der Plasmamembran die Internalisierung der humanen Papillomviren zu modulieren.

In der Tat scheinen die Tetraspanine die Protease-Aktivität konzentrationsabhängig positiv und negativ zu beeinflussen. Im Rahmen von Studien konnte gezeigt werden, dass der siRNA-vermittelte CD81-Knockdown in HeLa-Zellen genauso wie der Einsatz von CD81- und/ oder CD9- spezifischen Antikörpern in HEK293-Zellen zu einer verminderten Substratfreisetzung durch die γ -Sekretase führt. Ebenso reduzierte die Überexpression von CD9 die Substratfreisetzung (Wakabayashi et al. 2009). Offensichtlich hemmen also sowohl der Verlust von CD9 und CD81 als auch eine große Menge des Tetraspanins CD9 die Aktivität der γ -Sekretase. Dabei ist allerdings unklar, ob die enzymatische Aktivität selbst oder die Kolokalisation mit den Substraten durch die Tetraspanine beeinflusst werden.

Allerdings scheint die γ -Sekretase als CD9-beeinflusster Faktor bei der Virusinternalisierung unwahrscheinlich, da sie erst für einen späteren Schritt des Infektionszyklus entscheidend ist. Wie Untersuchungen demonstrierten, werden durch den Funktionsverlust der Protease weder die initiale Virusbindung noch die Endozytose oder das Kapsid-Disassembly blockiert (Karanam 2010, Zahng 2014).

Vielmehr scheint die Protease ausschließlich für die Aufnahme von L2 und dem viralen Genom in den Golgi-Apparat und in das Endoplasmatische Retikulum notwendig zu sein, bevor L2 und die virale DNA in den Zellkern transportiert werden (Zhang 2014).

Zusammen genommen ist die γ -Sekretase also zweifelsohne ein wichtiger Mediator der HPV-Infektion und der Regulation ihrer enzymatischen Aktivität durch Tetraspanine kommt eine große Bedeutung zu. Die hier vorliegenden Einflüsse der Tetraspanine auf die Virusinternalisierung können durch das Tetraspanin- γ -Sekretase-Modell allerdings nicht hinreichend erklärt werden. Die γ -Sekretase moduliert den HPV-Infektionszyklus erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt als es die Tetraspanine CD9, CD81 und CD151 tun.

Da meine eigenen Daten zum Einfluss von CD81 und CD9 auf die Virusinfektion die gleichen Tendenzen zeigen, wie die bereits publizierten Daten zum Einfluss auf Proteasen, kann zusammenfassend gesagt werden, dass CD9 und CD81 ein Konzentrationsoptimum besitzen um z. B. die Aktivität von assoziierten Proteasen zu regulieren, die wiederum die HPV16-Infektion beeinflussen (siehe auch Kapitel 6.5).

6.3 Interaktionspartner EWI

Die EWI-Proteine sind ebenfalls Transmembranproteine und gehören zur Familie der Immunglobuline (Clark et al. 2001). Diese umfassen unter anderem EWI-F und EWI-2, welche über die ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin die Plasmamembran mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle verbinden. Des Weiteren sind EWI-F und EWI-2 Interaktionspartner der Tetraspanine. Mit CD81 und CD9 können sie stabile Verbindungen eingehen, während sie mit CD151 lediglich indirekt interagieren (Stipp et al. 2001a; Stipp et al. 2001b; Charrin et al. 2001; Charrin et al. 2003). Auf diese Weise können die EWI-Proteine die für die Infektion mit dem humanen Papillomvirus essenziellen tetraspaninreichen Mikrodomänen mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle verknüpfen (Sala-Valdés et al. 2006). Daher wurde bereits spekuliert, dass die EWI-Proteine am Aktin-gekoppelten intrazellulären Transport der HPV-Kapside beteiligt sein könnten. Tatsächlich wurden in Infektionsassays nach Depletion von EWI-F ein eindeutiger Effekt des Proteins auf die Infektionsraten mit dem humanen Papillomvirus Typ 16 nachgewiesen (Brasch 2013). Auch eine Ko-Immunpräzipitation von EWI-F mit dem Kapsidprotein L1 war möglich (Brasch 2013).

Vor diesem wissenschaftlichen Hintergrund erscheint eine gemeinsame Beeinflussung der HPV-Internalisierung durch CD9, CD81 und die EWI-Proteine durchaus plausibel. CD9 und CD81 könnten auch hier durch laterale Segregation die Verteilung der EWI-Proteine an der Zellmembran modulieren und deren Interaktion mit dem Zytoskelett steuern. Möglicherweise könnte diese durch vermehrte CD9/CD81-Clusterbildung gestört werden. Oder die Tetraspanine könnten direkt mit den EWI-Proteinen um Bindungsstellen konkurrieren.

Allerdings konnten weitere Versuche zeigen, dass die EWI-Proteine auf die Endozytose selbst keinen Einfluss haben. Vielmehr scheinen sie an einem nachfolgenden Schritt der Infektion (z. B. Kapsidtransfer, Disassembly) beteiligt zu sein. So führte der Knockdown in HeLa- und HaCaT-Zellen zu einer verminderten Kapsidzerlegung (Brasch 2013). Die EWI-Proteine modulieren also möglicherweise tatsächlich über das Aktin-Zytoskelett die HPV-Infektion. Sie dienen allerdings nicht als essenzielle Tetraspanin-Interaktionspartner bei der Virusinternalisierung.

6.4 Interaktionspartner EGFR und epidermale Wachstumsfaktoren

Weitere Proteine, welche in den tetraspaninreichen Regionen gefunden werden können und möglicherweise über Tetraspanine Einfluss auf die HPV-Internalisierung ausüben, sind die epidermalen Wachstumsfaktoren (z. B. EGF oder TGF- α) und der Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) (Surviladze et al. 2012; Mikulić et al. 2019). Die Aktivierung des EGFR erfolgt durch extrazelluläre Bindung des EGF, des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF α), oder anderen Wachstumsfaktoren, nachdem diese durch bestimmte Enzyme, wie ADAM-Proteasen gespalten worden sind. Nach Aktivierung des Rezeptors durch Ligandenbindung dimerisieren die EGF-Rezeptoren und leiten unter anderem über die ERK (extracellular-signal regulated kinases) -Kaskade Signale in den Intrazellularraum (Jura et al. 2009; Gööz et al. 2006; Kansra et al. 2004). Auf diese Weise können verschiedene zelluläre Prozesse gesteuert werden (Yarden und Sliwkowski 2001; Burden und Yarden 1997).

Für die Infektion mit dem humanen Papillomvirus konnte bereits gezeigt werden, dass die Viren primär an HSPG/ EGF-Komplexe binden und im Folgenden die intrazelluläre Signalweiterleitung in HaCaT-Zellen initiieren (Surviladze et al. 2012; Schelhaas et al. 2012). Diese intrazelluläre Aktivierung (via Phosphatidylinositol 3-Kinase und mTOR) findet bereits wenige Minuten nach Exposition des Virus statt und scheint einen wichtigen Schritt des Infektionszyklus darzustellen (Surviladze et al. 2013). So konnten Inhibitoren der an der Signalkaskade beteiligten Proteine eine starke Reduktion der Infektionsrate bewirken (Surviladze et al. 2013).

Nun gäbe es in Bezug auf HPV verschiedene Möglichkeiten, wie die Tetraspanine die durch EGFR initiierten Signalkaskaden regulieren könnten. Beispielsweise wäre dies indirekt über einen gemeinsamen Interaktionspartner, die Integrine, möglich. So konnte bereits gezeigt werden, dass diese Signalkaskaden nicht nur durch EGFR und seine Substrate selbst, sondern auch durch die mit ihnen interagierenden Integrine und Tetraspanine reguliert werden können (Miyamoto et al. 1996; Yang et al. 2008; Novitskaya et al. 2014). Des Weiteren wäre die Einflussnahme über eine direkte Interaktion des Tetraspanins mit dem Wachstumsfaktorrezeptor plausibel. Für das Tetraspanin CD9 konnte beispielsweise auf der Zelloberfläche von hepatozellulären Karzinomen oder Ovarialkarzinomen eine Assoziation mit dem epidermalen Wachstumsrezeptor nachgewiesen werden (Murayama et al. 2008). Interessanterweise zeigen einige Daten, dass CD9 nicht nur direkt mit dem EGFR

assoziiert, sondern dessen Aktivität auch negativ beeinflussen kann. Ein spezifischer CD9-Antikörper führte zur gesteigerten EGFR-Internalisation nach Stimulation durch seinen Liganden EGF. Hingegen führte eine CD9-Überexpression zu vermindertem EGFR-Signalling durch Herunterregulation der Oberflächenexpression des EGFR (Murayama et al. 2008).

Hier sehe ich ebenfalls eine Erklärung für meine erhobenen Daten: Auch bei der HPV-Infektion wäre eine direkte Stimulation beziehungsweise Depression durch direkte Interaktion der Tetraspanine CD9 und CD81 mit dem Wachstumsfaktorrezeptor möglich. Ein hoher Gehalt von CD9/ CD81 könnte dazu führen, dass die Expression des EGFR auf der Keratinozytenoberfläche herunterreguliert wird. Dadurch wäre die intrazelluläre Signaltransduktion eingeschränkt und die Infektion vermindert.

Abgesehen von diesen beiden Modellen wäre es ebenfalls denkbar, dass die Tetraspanine die Aktivierung des EGFR über dessen Substrate, wie z. B. EGF und TGF- α , regulieren. Dies wäre beispielsweise über die Aktivität der sie bereitstellenden Matrix-Metalloprotease möglich und soll im folgenden Abschnitt eingehender diskutiert werden.

6.5 Interaktionspartner ADAM10 und ADAM17

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Matrix-Metalloproteasen, insbesondere die ADAM (a disintegrin and metalloprotease)-Familie, während der ersten Schritte des HPV-Infektionszyklus bedeutsam sind (Surviladze et al. 2012). Sie ermöglichen die intrazelluläre Signaltransduktion durch das Spalten von Wachstumsrezeptor-Liganden, wie beispielsweise den epidermalen Wachstumsfaktoren EGF oder TGF- α (Sahin et al. 2004; Gooz 2010). Von Keratinozyten, den Zielzellen der Infektion, werden vor allem die Matrix-Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 exprimiert, die somit für die HPV-Forschung besonders interessant sind (Brooke et al. 2014; Maretzky et al. 2008; Hirayama et al. 2017).

Lange Zeit war angenommen worden, dass sich HPV16 nach der initialen Zellbindung vom HSPG löst. Die Arbeitsgruppe um Surviladze konnte allerdings demonstrieren, dass der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), wie Syndecan-1 zunächst gespalten werden müssen, bevor sie zusammen mit HPV16 vom primären auf den sekundären Rezeptorkomplex übertragen werden können (Surviladze et al. 2012). Anhand von Studien mit verschiedenen Protease-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass es HSPG-schneidende Matrix-Metalloproteasen sind, die die Freisetzung von Zell-gebundenem HPV regulieren (Surviladze et al. 2012). Weitere Versuche mit ADAM10 und ADAM17-spezifischen Inhibitoren und siRNAs demonstrierten, dass vor allem die Funktion der Matrix-Metalloprotease ADAM17 für die HPV-Infektion essenziell ist (Mikuličić et al. 2019). Weitere Daten der AG Florin lieferten Evidenz dafür, dass die ADAM17-vermittelte Spaltung der epidermalen Wachstumsfaktoren über die nachfolgende intrazelluläre ERK-Signalweiterleitung die Bildung des sekundären Rezeptorkomplexes bewirkt (Mikuličić et al. 2019).

Außerhalb der HPV-Forschung wurden bereits einige Studien veröffentlicht, welche eine Regulation der Matrix-Metalloproteasen durch die Tetraspanine CD9 und CD81 demonstrieren. Interessanterweise hat CD9 in diesem Szenario, wie bereits für die γ -Sekretase diskutiert, einen hemmenden Effekt auf die Protease-Funktion. So stimulieren Tetraspanin Antikörper innerhalb weniger Minuten die Freisetzung von ADAM10-Substraten (Arduise et al. 2008). Auch die Wechselwirkung von CD9 mit ADAM17 scheint negative regulatorische Effekte auf das Shedding durch das Enzym zu haben (Gutiérrez-López et al. 2011; Tsukamoto et al. 2014; Liu et al. 2019).

Für CD81 konnte bislang keine Assoziation oder direkte Wechselwirkung mit ADAM10 oder ADAM17 nachgewiesen werden. Allerdings demonstrierten Takeda et al, dass CD81, genau wie CD9, eine andere Matrix-Metalloprotease, die MMP9, negativ reguliert. So führte der siRNA-Knockdown von CD81 und CD9 zu einer gesteigerten Aktivität dieses Enzyms (Takeda et al. 2008).

Analog dazu ist denkbar, dass CD9 und CD81 auch bei der HPV-Infektion die Enzymaktivität der Matrix-Metalloproteasen negativ beeinflussen können. So ließe sich erklären, weshalb der natürliche hohe CD9- und CD81-Gehalt in HaCaT-Zellen in der Regel hemmend auf die Infektion mit HPV wirkt, genauso wie in HeLa-Zellen nach CD9-Überexpression. Ist viel CD9 und CD81 auf der Zelloberfläche vorhanden, werden weniger Wachstumsfaktoren freigesetzt, weniger EGFR und der ERK Signalweg aktiviert und es bilden sich weniger Eintrittsplattformen für das Virus. Dadurch wird die virale Endozytose herabgesetzt, die Infektionsrate sinkt. Wird in diesen Zellen jedoch durch Knockdown der CD9- und CD81-Gehalt herabgesetzt, werden die Proteasen weniger gehemmt, so dass letztendlich mehr Virus/Rezeptorkomplexe entstehen, die schlussendlich endozytiert werden können.

Zur Überprüfung dieser möglichen Beeinflussung von ADAM17 durch CD9 wurden außerhalb der vorliegenden Arbeit im Labor der AG Florin weitergehende Versuche durchgeführt. Unter anderem konnten Immunfluoreszenzen eine Kollokalisierung von CD9 und ADAM17 zeigen (Mikuličić et al. 2020). Des Weiteren wurden tiefgreifende Studien zur Rolle von ADAM17 bei der HPV16-Infektion durchgeführt (Mikuličić et al. 2019). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass nicht das Loslösen von HPV von seinem primären Rezeptor, sondern die Bildung des sekundären Rezeptorkomplexes durch die ADAM17-Aktivität vermittelt wird. Hierbei spielen das Shedding von Wachstumsfaktoren und die nachfolgende Signaltransduktion eine entscheidende Rolle (Mikuličić et al. 2019). In einer zweiten Studie, in die meine Daten maßgeblich einfließen, zeigte sich, dass unterschiedliche CD9-Level die Spaltung des epidermalen Wachstumsfaktors TGF- α und die ERK-Signaltransduktion beeinflussen (Mikuličić et al. 2020). So führte etwa die CD9-Depletion in HeLa-Zellen zu einer TGF- α -Reduktion im Zellüberstand und verminderten ERK-Signalweiterleitung, während der CD9-Knockdown in HaCaT-Zellen die erhöhte TGF- α -Freisetzung und ERK-Signaltransduktion bewirkte.

Diese weiterführenden Analysen unterstützen damit die hier aufgestellte Hypothese, dass CD9 einen wichtigen Endozytosefaktor der HPV-Infektion darstellt und die

Internalisierung der Viren über die Aktivität der Matrix-Metalloprotease ADAM17 reguliert. In Abhängigkeit seiner Quantität hemmt oder fördert CD9 die ADAM17-Funktion, so dass die Spaltung des epidermalen Wachstumsfaktors TGF- α und die dadurch vermittelte ERK-Signalweiterleitung beeinflusst werden, welche wiederum die Bildung des sekundären Rezeptorkomplexes und die folgende Internalisierung des HP-Virus bewirken.

Letztlich bleibt zu klären, über welchen Mechanismus das Tetraspanin die ADAM17-Aktivität beeinflusst. Gutiérrez-Lopez et al. haben sich intensiv mit dieser Fragestellung auseinandergesetzt und den Einfluss von CD9 auf die Matrix-Metalloprotease ADAM17 untersucht. In Ihren Studien zeigte sich ebenfalls ein negativer regulatorischer Effekt von CD9 auf die Aktivität von ADAM17. Außerdem konnte mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden, dass CD9 und ADAM17 auf der Zelloberfläche von Monozyten und Endothelzellen kolokalisieren. Diese Ergebnisse lassen somit auf eine direkte Assoziation und Interaktion der Proteine schließen (Gutiérrez-López et al. 2011). Eine weitere Studie der AG Florin, in die meine Daten eingeflossen sind, befasste sich mit der vergleichenden Analyse von Tetraspaninen auf die Infektion verschiedener Zelltypen durch humane Papillom- und Zytomegalieviren (HCMV) (Fast et al. 2018). Wie meine Infektionsassays zeigten, ist CD9 wichtig für die Infektion in HeLa-Zellen. Der C-Terminus von CD9 jedoch scheint für dessen Funktion nicht benötigt zu werden. Rekombinante Peptide von CD151- und CD63-C-Termini konnten die Infektionen inhibieren, während die entsprechenden CD9-Peptide keinen Einfluss hatten (Fast et al. 2018). Die große extrazelluläre Domäne von CD9 könnte die ADAM-Aktivität negativ beeinflussen. Andere Modelle vermuten, dass CD9 die Zugänglichkeit von ADAM17 und seinen Substraten reguliert (Mikuličić et al. 2020). So ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben worden, dass nicht nur die Proteasen selbst, sondern auch ihre Substrate durch CD9 in TEMs rekrutiert werden. Auf diese Weise könnte das Tetraspanin indirekt die enzymatische Aktivität und die intrazelluläre Signalweiterleitung kontrollieren (Yáñez-Mó et al. 2011; Barreiro et al. 2005; Barreiro et al. 2008). Ein hoher Gehalt von CD9 in den tetraspaninreichen Regionen könnte beispielsweise die räumliche Annäherung von ADAM17 und seinen Substraten verhindern, so dass die TGF- α -Freisetzung vermindert ist und weniger HP-Viren internalisiert werden können (Mikuličić et al. 2020).

Ein zusammenfassendes Modell könnte man sich daher folgendermaßen vorstellen: CD9 reguliert die räumliche Verteilung von ADAM17 und eventuell anderen proviralen Faktoren in der Membran. Fehlt CD9, könnten Mobilität und damit die Nachlieferung von ADAM17-Substraten zum Erliegen kommen. Ein zu hoher CD9-Gehalt ist ebenso hinderlich, da Protease und Wachstumsfaktor durch zu viel CD9 voneinander abgeschirmt werden könnten. Beide Szenarien wirken sich negativ auf das ADAM17-vermittelte ERK-Signalling, die Rezeptorkomplexbildung und letztendlich die Infektion aus.

Während somit die Einflussnahme von CD9 auf die HPV-Infektion im Zuge dieser Arbeit und darüber hinaus näher beleuchtet werden konnte, bleibt die Rolle des Tetraspanins CD81 weiterhin im Dunkeln und es bleibt zu klären, über welchen Mechanismus CD81 die Virusinternalisierung beeinflusst.

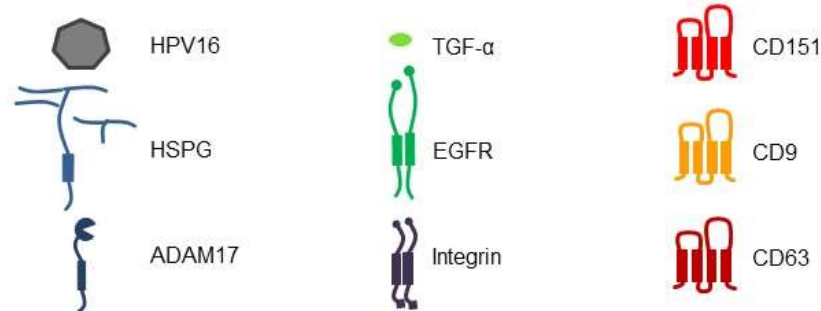
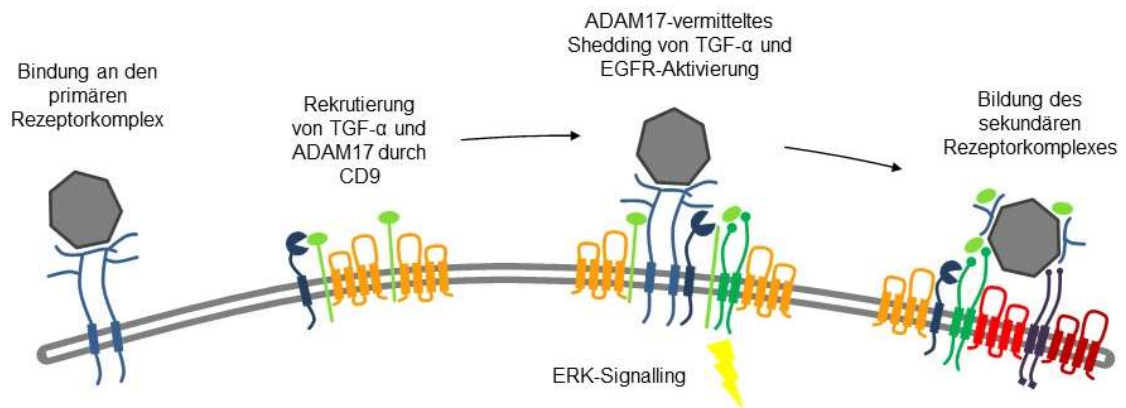


Abbildung 6.3 Infektionsmodell des HPV-Entry

Initiale Virusbindung über HSPG an der Zelloberfläche. CD9-vermittelte Rekrutierung des membranständigen Wachstumsfaktors TGF- α und der Protease ADAM17 zum primären Rezeptorkomplex. Shedding von TGF- α durch ADAM17, Aktivierung und Dimerisierung des EGFR und intrazelluläres Signalling über die ERK-Kaskade. Hierdurch wird die Bildung des sekundären Rezeptorkomplexes aus Tetraspaninen, Integrinen, EGFR, ADAM17 und Wachstumsfaktoren initiiert (modifiziert nach (Mikuličić et al. 2019)).

7 Zusammenfassung

Die Infektion mit dem humanen Papillomvirus ist die häufigste sexuell übertragbare Krankheit weltweit. Während es bei der Infektion mit low-risk-Typen zur Ausbildung von gutartigen Warzen kommt, können high-risk-Typen mit einer Latenz von bis zu mehreren Jahrzehnten zur Ausbildung von Karzinomen führen. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Entstehung des Zervixkarzinoms, welches in mehr als 50 % der Fälle mit HPV16 assoziiert ist. Im Jahre 2008 erhielt Harald zur Hausen für die Erkenntnis dieses Zusammenhangs den Nobelpreis für Medizin. Doch trotz intensiver Forschungsarbeit sind bisher nicht alle zellulären Mechanismen und Kofaktoren der Infektion bekannt. Allerdings kristallisierten sich in den letzten Jahren unter anderem die Tetraspanine immer mehr als wichtige zelluläre Eintrittsfaktoren des humanen Papillomvirus heraus. Es konnte bereits in vorangehenden Publikationen gezeigt werden, dass das Tetraspanin CD151 maßgeblich an der viralen Endozytose beteiligt ist. Wird es depletiert, so kann die Infektion nur schwerlich stattfinden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei plasmamembranständige Tetraspanine, CD151, CD81 und CD9 hinsichtlich ihrer Funktion und Expression in verschiedenen Zelllinien vergleichend analysiert. Es konnte die Relevanz von CD151 bestätigt und vor allem CD9 als wichtiger neuer zellulärer Faktor bei der HPV-Infektion identifiziert werden (Fast et al. 2018). Das Tetraspanin CD81 spielt anscheinend eine untergeordnete Rolle bei der HPV16-Infektion. Im Gegensatz zu CD151 wirken CD9 und CD81 in Abhängigkeit von ihrer Expressionsstärke hinderlich oder förderlich auf die HPV-Infektion. Während ein geringer bzw. moderater Gehalt an CD9 oder CD81 förderlich für eine Infektion ist, hemmen ein hoher Gehalt oder auch ein fast kompletter Verlust der Tetraspanine die Infektion. Es kristallisierte sich ein CD9-Optimum für die HPV16-Infektion heraus, welches auch natürlicherweise in primären Keratinozyten vorkommt.

Mithilfe verschiedener Methoden, wie durchflusszytometrischen Analysen von zellgebundenem Virus und quantitativen Western Blot-Analysen, konnte ich zeigen, dass CD9 die Virusaufnahme, nicht aber die Virusbindung reguliert.

Immunfluoreszenzanalysen mit einem Disassembly-spezifischen Antikörper bestätigten die Wichtigkeit eines moderaten CD9-Levels für die Virusaufnahme und das anschließende Entpacken des viralen Kapsids. Diese Daten verifizierten die

Rolle von CD9 bei der HPV16-Infektion von epithelialen Zellen, die sich in meinen Infektionsanalysen mit Pseudoviren in CD9-depletierten und -überexprimierenden Zellen gezeigt hatte.

Während die Interaktionspartner von CD9 bei der HPV-Infektion bisher weitestgehend unbekannt sind, ist die Einflussnahme von CD151 auf die Infektion über Komplexierung mit den Integrinen bereits nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zelluläre Proteine, wie Integrine, Proteasen (γ -Sekretase, MMP), EWI-Proteine oder EGFR/ EGF als mögliche Bindeglieder zu CD9/ CD81 diskutiert, um deren Einfluss auf die virale Endozytose zu erklären. Als vielversprechendste Partner rücken hier vor allem die ADAM-Metalloproteasen in den Vordergrund. So lieferte meine Arbeit die entscheidende Basis für nachfolgende Studien der AG Florin. Die gemeinsamen Ergebnisse zeigten, dass CD9 die ADAM17-Aktivität konzentrationsabhängig beeinflusst. Durch die Funktion der Protease wird der epidermale Wachstumsfaktor TGF- α gespalten und die ERK-Signalweiterleitung aktiviert. Letztere wiederum ist essenziell für die effiziente HPV-Infektion (Mikuličić et al. 2020).

Die Erforschung des zugrundeliegenden Mechanismus, über den CD9 die Aktivität der Matrix-Metalloprotease moduliert, bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren bleibt zu klären, ob das Tetraspanin CD9 andere HPV-Kofaktoren beeinflusst und ob CD81, welches in den Infektionsassays und Expressionsmustern zu ähnlichen Resultaten führte wie CD9, ebenfalls eine Matrix-Metalloproteasen-Aktivität reguliert oder aber andere zelluläre Interaktionen nutzt, um die HPV-Infektion zu modulieren.

Literaturverzeichnis

- Alexi, X.; Berditchevski, F.; Odintsova, E. (2011): The effect of cell-ECM adhesion on signalling via the ErbB family of growth factor receptors. In: *Biochemical Society transactions* 39 (2), S. 568–573. DOI: 10.1042/BST0390568.
- Arduise, C.; Abache, T.; Li, L.; Billard, M.; Chabanon, A.; Ludwig, A. et al. (2008): Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181 (10), S. 7002–7013. DOI: 10.4049/jimmunol.181.10.7002.
- Arroyo, Laila Sara (Hg.) (2020): Human Reference clones. International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center. Online verfügbar unter https://www.hpvcntr.se/human_reference_clones, zuletzt geprüft am 31.03.2020.
- Baker, T. S.; Newcomb, W. W.; Olson, N. H.; Cowser, L. M.; Olson, C.; Brown, J. C. (1991): Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. In: *Biophysical journal* 60 (6), S. 1445–1456. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82181-6.
- Barreiro, O.; Yáñez-Mó, M.; Sala-Valdés, M.; Gutiérrez-López, M. D.; Ovalle, S.; Higginbottom, A. et al. (2005): Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. In: *Blood* 105 (7), S. 2852–2861. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3606.
- Barreiro, O.; Zamai, M.; Yáñez-Mó, M.; Tejera, E.; López-Romero, P.; Monk, P. N. et al. (2008): Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. In: *The Journal of cell biology* 183 (3), S. 527–542. DOI: 10.1083/jcb.200805076.
- Baudoux, B.; Castanares-Zapatero, D.; Leclercq-Smekens, M.; Berna, N.; Poumay, Y. (2000): The tetraspanin CD9 associates with the integrin alpha6beta4 in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility. In: *European journal of cell biology* 79 (1), S. 41–51. DOI: 10.1078/s0171-9335(04)70006-0.
- Baulac, Stephanie; LaVoie, Matthew J.; Kimberly, W. Taylor; Strahle, Jennifer; Wolfe, Michael S.; Selkoe, Dennis J.; Xia, Weiming (2003): Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin,

- nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates. In: *Neurobiology of disease* 14 (2), S. 194–204. DOI: 10.1016/s0969-9961(03)00123-2.
- Becker, Miriam; Greune, Lilo; Schmidt, M. Alexander; Schelhaas, Mario (2018): Extracellular Conformational Changes in the Capsid of Human Papillomaviruses Contribute to Asynchronous Uptake into Host Cells. In: *Journal of virology* 92 (11). DOI: 10.1128/JVI.02106-17.
- Berditchevski, F. (2001): Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. In: *Journal of cell science* 114 (Pt 23), S. 4143–4151.
- Berditchevski, F.; Odintsova, E. (1999): Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. In: *The Journal of cell biology* 146 (2), S. 477–492. DOI: 10.1083/jcb.146.2.477.
- Berditchevski, F.; Zutter, M. M.; Hemler, M. E. (1996): Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). In: *Molecular biology of the cell* 7 (2), S. 193–207. DOI: 10.1091/mbc.7.2.193.
- Berditchevski, Fedor; Odintsova, Elena; Sawada, Shigeaki; Gilbert, Elizabeth (2002): Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (40), S. 36991–37000. DOI: 10.1074/jbc.M205265200.
- Berditchevski, Fedor; Rubinstein, Eric (2013): *Tetraspanins*. Dordrecht: Springer (Proteins and Cell Regulation, 9). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10715996>.
- Bergsdorf, Christian; Beyer, Carsten; Umansky, Viktor; Werr, Margaret; Sapp, Martin (2003): Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. In: *FEBS letters* 536 (1-3), S. 120–124. DOI: 10.1016/s0014-5793(03)00039-5.
- Bienkowska-Haba, Malgorzata; Patel, Hetalkumar D.; Sapp, Martin (2009): Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. In: *PLoS pathogens* 5 (7), e1000524. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000524.
- Bienkowska-Haba, Malgorzata; Sapp, Martin (2011): The cytoskeleton in papillomavirus infection. In: *Viruses* 3 (3), S. 260–271. DOI: 10.3390/v3030260.

- Bienkowska-Haba, Malgorzata; Williams, Carlyn; Kim, Seong Man; Garcea, Robert L.; Sapp, Martin (2012): Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. In: *Journal of virology* 86 (18), S. 9875–9887. DOI: 10.1128/JVI.00980-12.
- Boucheix, C.; Rubinstein, E. (2001): Tetraspanins. In: *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 58 (9), S. 1189–1205. DOI: 10.1007/PL00000933.
- Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *The Journal of cell biology* 106 (3), S. 761–771. DOI: 10.1083/jcb.106.3.761.
- Brasch, Vera M. (2013): Untersuchungen zur HPV16-Infektion. Beteiligung der zellulären Kofaktoren CD81, der EWI-Proteine und der ERM-Proteine. Dissertation Medizin. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.
- Brooke, Matthew A.; Etheridge, Sarah L.; Kaplan, Nihal; Simpson, Charlotte; O'Toole, Edel A.; Ishida-Yamamoto, Akemi et al. (2014): iRHOM2-dependent regulation of ADAM17 in cutaneous disease and epidermal barrier function. In: *Human molecular genetics* 23 (15), S. 4064–4076. DOI: 10.1093/hmg/ddu120.
- Bruni, L.; Albero, G.; Serrano, B.; Mena, M.; Gómez, D.; Muñoz, J.; Bosch, F. X. (2019): Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Hg. v. de Sanjosé S. ICO/ IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre) (Summary Report).
- Buck, Christopher B.; Cheng, Naiqian; Thompson, Cynthia D.; Lowy, Douglas R.; Steven, Alasdair C.; Schiller, John T.; Trus, Benes L. (2008): Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. In: *Journal of virology* 82 (11), S. 5190–5197. DOI: 10.1128/JVI.02726-07.
- Buck, Christopher B.; Day, Patricia M.; Trus, Benes L. (2013): The papillomavirus major capsid protein L1. In: *Virology* 445 (1-2), S. 169–174. DOI: 10.1016/j.virol.2013.05.038.
- Buck, Christopher B.; Pastrana, Diana V.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T. (2004): Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. In: *Journal of virology* 78 (2), S. 751–757. DOI: 10.1128/jvi.78.2.751-757.2004.

- Buck, Christopher B.; Pastrana, Diana V.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T. (2005a): Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. In: *Methods in molecular medicine* 119, S. 445–462. DOI: 10.1385/1-59259-982-6:445.
- Buck, Christopher B.; Thompson, Cynthia D. (2007): Production of papillomavirus-based gene transfer vectors. In: *Current protocols in cell biology* Chapter 26, Unit 26.1. DOI: 10.1002/0471143030.cb2601s37.
- Buck, Christopher B.; Thompson, Cynthia D.; Pang, Yuk-Ying S.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T. (2005b): Maturation of papillomavirus capsids. In: *Journal of virology* 79 (5), S. 2839–2846. DOI: 10.1128/JVI.79.5.2839-2846.2005.
- Bund, Timo; Spoden, Gilles A.; Koynov, Kaloian; Hellmann, Nadja; Boukhallouk, Fatima; Arnold, Philipp et al. (2014): An L2 SUMO interacting motif is important for PML localization and infection of human papillomavirus type 16. In: *Cellular microbiology* 16 (8), S. 1179–1200. DOI: 10.1111/cmi.12271.
- Burden, S.; Yarden, Y. (1997): Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. In: *Neuron* 18 (6), S. 847–855. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80324-4.
- Cha, J. H.; Brooke, J. S.; Ivey, K. N.; Eidels, L. (2000): Cell surface monkey CD9 antigen is a coreceptor that increases diphtheria toxin sensitivity and diphtheria toxin receptor affinity. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (10), S. 6901–6907. DOI: 10.1074/jbc.275.10.6901.
- Charrin, S.; Le Naour, F.; Oualid, M.; Billard, M.; Faure, G.; Hanash, S. M. et al. (2001): The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (17), S. 14329–14337. DOI: 10.1074/jbc.M011297200.
- Charrin, Stéphanie; Latil, Mathilde; Soave, Sabrina; Poleskaya, Anna; Chrétien, Fabrice; Boucheix, Claude; Rubinstein, Eric (2013): Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. In: *Nature communications* 4, S. 1674. DOI: 10.1038/ncomms2675.
- Charrin, Stéphanie; Le Naour, François; Labas, Valérie; Billard, Martine; Le Caer, Jean-Pierre; Emile, Jean-François et al. (2003): EWI-2 is a new component of the

- tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. In: *The Biochemical journal* 373 (Pt 2), S. 409–421. DOI: 10.1042/BJ20030343.
- Clark, K. L.; Zeng, Z.; Langford, A. L.; Bowen, S. M.; Todd, S. C. (2001): PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (9), S. 5115–5121. DOI: 10.4049/jimmunol.167.9.5115.
- Cook, G. A.; Wilkinson, D. A.; Crossno, J. T.; Raghov, R.; Jennings, L. K. (1999): The tetraspanin CD9 influences the adhesion, spreading, and pericellular fibronectin matrix assembly of Chinese hamster ovary cells on human plasma fibronectin. In: *Experimental cell research* 251 (2), S. 356–371. DOI: 10.1006/excr.1999.4596.
- Culp, Timothy D.; Budgeon, Lynn R.; Marinkovich, M. Peter; Meneguzzi, Guerrino; Christensen, Neil D. (2006): Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. In: *Journal of virology* 80 (18), S. 8940–8950. DOI: 10.1128/JVI.00724-06.
- Day, P. M.; Roden, R. B.; Lowy, D. R.; 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. In: *Journal of virology* 72 (1), S. 142–150.
- Day, Patricia M.; Baker, Carl C.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T. (2004): Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (39), S. 14252–14257. DOI: 10.1073/pnas.0404229101.
- Day, Patricia M.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T. (2008): Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. In: *Journal of virology* 82 (24), S. 12565–12568. DOI: 10.1128/JVI.01631-08.
- Day, Patricia M.; Thompson, Cynthia D.; Schowalter, Rachel M.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T. (2013): Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. In: *Journal of virology* 87 (7), S. 3862–3870. DOI: 10.1128/JVI.03222-12.

Deng, Xinyu; Li, Qinglin; Hoff, John; Novak, Marian; Yang, Helen; Jin, Hongyan et al. (2012): Integrin-associated CD151 drives ErbB2-evoked mammary tumor onset and metastasis. In: *Neoplasia* (New York, N.Y.) 14 (8), S. 678–689. DOI: 10.1593/neo.12922.

Diao, Jingyu; Pantua, Homer; Ngu, Hai; Komuves, Laszlo; Diehl, Lauri; Schaefer, Gabriele; Kapadia, Sharookh B. (2012): Hepatitis C virus induces epidermal growth factor receptor activation via CD81 binding for viral internalization and entry. In: *Journal of virology* 86 (20), S. 10935–10949. DOI: 10.1128/JVI.00750-12.

DiGiuseppe, Stephen; Bienkowska-Haba, Malgorzata; Guion, Lucile G. M.; Keiffer, Timothy R.; Sapp, Martin (2017): Human Papillomavirus Major Capsid Protein L1 Remains Associated with the Incoming Viral Genome throughout the Entry Process. In: *Journal of virology* 91 (16). DOI: 10.1128/JVI.00537-17.

DiGiuseppe, Stephen; Luszczek, Wioleta; Keiffer, Timothy R.; Bienkowska-Haba, Malgorzata; Guion, Lucile G. M.; Sapp, Martin J. (2016): Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (22), S. 6289–6294. DOI: 10.1073/pnas.1600638113.

Doorbar, John; Egawa, Nagayasu; Griffin, Heather; Kranjec, Christian; Murakami, Isao (2015): Human papillomavirus molecular biology and disease association. In: *Reviews in medical virology* 25 Suppl 1, S. 2–23. DOI: 10.1002/rmv.1822.

Duffield, Amy; Kamsteeg, Erik-Jan; Brown, Andrea N.; Pagel, Philipp; Caplan, Michael J. (2003): The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26), S. 15560–15565. DOI: 10.1073/pnas.2536699100.

Dziduszko, Agnieszka; Ozbun, Michelle A. (2013): Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes. In: *Journal of virology* 87 (13), S. 7502–7515. DOI: 10.1128/JVI.00519-13.

Edbauer, Dieter; Winkler, Edith; Regula, Joerg T.; Pesold, Brigitte; Steiner, Harald; Haass, Christian (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. In: *Nature cell biology* 5 (5), S. 486–488. DOI: 10.1038/ncb960.

- Evander, M.; Frazer, I. H.; Payne, E.; Qi, Y. M.; Hengst, K.; McMillan, N. A. (1997): Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. In: *Journal of virology* 71 (3), S. 2449–2456.
- Fast, Laura A.; Lieber, Diana; Lang, Thorsten; Florin, Luise (2017): Tetraspanins in infections by human cytomegalo- and papillomaviruses. In: *Biochemical Society transactions* 45 (2), S. 489–497. DOI: 10.1042/BST20160295.
- Fast, Laura A.; Mikuličić, Snježana; Fritzen, Anna; Schwickert, Jonas; Boukhallouk, Fatima; Hochdorfer, Daniel et al. (2018): Inhibition of Tetraspanin Functions Impairs Human Papillomavirus and Cytomegalovirus Infections. In: *International journal of molecular sciences* 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19103007.
- Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Pineros, M., Znaor, A. et al. (2018): *Global Cancer Observatory: Cancer today*. Hg. v. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Lyon, France. Online verfügbar unter <http://gco.iarc.fr/today>, zuletzt geprüft am 22.01.2020.
- Finke, Jérôme; Mikuličić, Snježana; Loster, Anna-Lena; Gawlitza, Alexander; Florin, Luise; Lang, Thorsten (2020): Anatomy of a viral entry platform differentially functionalized by integrins $\alpha 3$ and $\alpha 6$. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 5356. DOI: 10.1038/s41598-020-62202-9.
- Finnen, Renée L.; Erickson, Kimberly D.; Chen, Xiaojiang S.; Garcea, Robert L. (2003): Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. In: *Journal of virology* 77 (8), S. 4818–4826. DOI: 10.1128/jvi.77.8.4818-4826.2003.
- Flint, M.; Maidens, C.; Loomis-Price, L. D.; Shotton, C.; Dubuisson, J.; Monk, P. et al. (1999): Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. In: *Journal of virology* 73 (8), S. 6235–6244.
- Florin, Luise; Becker, Katrin A.; Lambert, Carsten; Nowak, Thorsten; Sapp, Cornelia; Strand, Dennis et al. (2006): Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein I2. In: *Journal of virology* 80 (13), S. 6691–6696. DOI: 10.1128/JVI.00057-06.
- Florin, Luise; Lang, Thorsten (2018): Tetraspanin Assemblies in Virus Infection. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 1140. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01140.

- Florin, Luise; Sapp, Cornelia; Streeck, Rolf E.; Sapp, Martin (2002): Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. In: *Journal of virology* 76 (19), S. 10009–10014. DOI: 10.1128/jvi.76.19.10009-10014.2002.
- Florin, Luise; Sapp, Martin; Spoden, Gilles A. (2012): Host-cell factors involved in papillomavirus entry. In: *Medical microbiology and immunology* 201 (4), S. 437–448. DOI: 10.1007/s00430-012-0270-1.
- Foquet, Lander; Hermsen, Cornelius C.; Verhoye, Lieven; van Gemert, Geert-Jan; Cortese, Riccardo; Nicosia, Alfredo et al. (2015): Anti-CD81 but not anti-SR-BI blocks *Plasmodium falciparum* liver infection in a humanized mouse model. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70 (6), S. 1784–1787. DOI: 10.1093/jac/dkv019.
- Forman, David; Martel, Catherine de; Lacey, Charles J.; Soerjomataram, Isabelle; Lortet-Tieulent, Joannie; Bruni, Laia et al. (2012): Global burden of human papillomavirus and related diseases. In: *Vaccine* 30 Suppl 5, F12-23. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.07.055.
- Garcia-España, Antonio; Chung, Pei-Jung; Sarkar, Indra Neil; Stiner, Eric; Sun, Tung-Tien; Desalle, Rob (2008): Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. In: *Genomics* 91 (4), S. 326–334. DOI: 10.1016/j.ygeno.2007.12.005.
- García-López, M. Angeles; Barreiro, Olga; García-Díez, Amaro; Sánchez-Madrid, Francisco; Peñas, Pablo F. (2005): Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility. In: *The Journal of investigative dermatology* 125 (5), S. 1001–1009. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2005.23882.x.
- Gooz, Monika (2010): ADAM-17: the enzyme that does it all. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45 (2), S. 146–169. DOI: 10.3109/10409231003628015.
- Göoz, Monika; Göoz, Pal; Luttrell, Louis M.; Raymond, John R. (2006): 5-HT_{2A} receptor induces ERK phosphorylation and proliferation through ADAM-17 tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE) activation and heparin-bound epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) shedding in mesangial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (30), S. 21004–21012. DOI: 10.1074/jbc.M512096200.

Gordón-Alonso, Mónica; Yañez-Mó, María; Barreiro, Olga; Alvarez, Susana; Muñoz-Fernández, M. Angeles; Valenzuela-Fernández, Agustín; Sánchez-Madrid, Francisco (2006): Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177 (8), S. 5129–5137. DOI: 10.4049/jimmunol.177.8.5129.

Gräßel, Linda; Fast, Laura Aline; Scheffer, Konstanze D.; Boukhallouk, Fatima; Spoden, Gilles A.; Tenzer, Stefan et al. (2016): The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. In: *Scientific reports* 6, S. 32337. DOI: 10.1038/srep32337.

Grigorov, Boyan; Attuil-Audenis, Valérie; Perugi, Fabien; Nedelec, Martine; Watson, Sarah; Pique, Claudine et al. (2009): A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. In: *Retrovirology* 6, S. 28. DOI: 10.1186/1742-4690-6-28.

Guion, Lucile; Bienkowska-Haba, Malgorzata; DiGiuseppe, Stephen; Florin, Luise; Sapp, Martin (2019): PML nuclear body-residing proteins sequentially associate with HPV genome after infectious nuclear delivery. In: *PLoS pathogens* 15 (2), e1007590. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007590.

Gutiérrez-López, Maria Dolores; Gilsanz, Alvaro; Yañez-Mó, María; Ovalle, Susana; Lafuente, Esther M.; Domínguez, Carmen et al. (2011): The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68 (19), S. 3275–3292. DOI: 10.1007/s00018-011-0639-0.

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

Hantak, Michael P.; Qing, Enya; Earnest, James T.; Gallagher, Tom (2019): Tetraspanins: Architects of Viral Entry and Exit Platforms. In: *Journal of virology* 93 (6). DOI: 10.1128/JVI.01429-17.

Hasuwa, H.; Shishido, Y.; Yamazaki, A.; Kobayashi, T.; Yu, X.; Mekada, E. (2001): CD9 amino acids critical for upregulation of diphtheria toxin binding. In: *Biochemical and biophysical research communications* 289 (4), S. 782–790. DOI: 10.1006/bbrc.2001.6053.

- Hemler, M. E. (2001): Specific tetraspanin functions. In: *The Journal of cell biology* 155 (7), S. 1103–1107. DOI: 10.1083/jcb.200108061.
- Hemler, Martin E. (2003): Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. In: *Annual review of cell and developmental biology* 19, S. 397–422. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609.
- Hemler, Martin E. (2005): Tetraspanin functions and associated microdomains. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (10), S. 801–811. DOI: 10.1038/nrm1736.
- Higginbottom, A.; Quinn, E. R.; Kuo, C. C.; Flint, M.; Wilson, L. H.; Bianchi, E. et al. (2000): Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. In: *Journal of virology* 74 (8), S. 3642–3649. DOI: 10.1128/jvi.74.8.3642-3649.2000.
- Hirayama, Aya; Awano, Shuji; Seta, Yuji; Ansai, Toshihiro (2017): ADAM17 regulates TNF- α expression upon lipopolysaccharide stimulation in oral keratinocytes. In: *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 38 (3), S. 157–165. DOI: 10.2220/biomedres.38.157.
- Homsy, Yahya; Schloetel, Jan-Gero; Scheffer, Konstanze D.; Schmidt, Thomas H.; Destainville, Nicolas; Florin, Luise; Lang, Thorsten (2014): The extracellular δ -domain is essential for the formation of CD81 tetraspanin webs. In: *Biophysical journal* 107 (1), S. 100–113. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.05.028.
- Iwamoto, R.; Higashiyama, S.; Mitamura, T.; Taniguchi, N.; Klagsbrun, M.; Mekada, E. (1994): Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. In: *The EMBO journal* 13 (10), S. 2322–2330.
- Johnson, Katherine M.; Kines, Rhonda C.; Roberts, Jeffrey N.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T.; Day, Patricia M. (2009): Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. In: *Journal of virology* 83 (5), S. 2067–2074. DOI: 10.1128/JVI.02190-08.
- Jones, P. H.; Bishop, L. A.; Watt, F. M. (1996): Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. In: *Cell adhesion and communication* 4 (4-5), S. 297–305. DOI: 10.3109/15419069609010773.

- Jura, Natalia; Endres, Nicholas F.; Engel, Kate; Deindl, Sebastian; Das, Rahul; Lamers, Meindert H. et al. (2009): Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. In: *Cell* 137 (7), S. 1293–1307. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.025.
- Kansra, Sanjay; Stoll, Stefan W.; Johnson, Jessica L.; Elder, James T. (2004): Autocrine extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation in normal human keratinocytes: metalloproteinase-mediated release of amphiregulin triggers signaling from ErbB1 to ERK. In: *Molecular biology of the cell* 15 (9), S. 4299–4309. DOI: 10.1091/mbc.e04-03-0233.
- Karanam, Balasubramanyam; Peng, Shiwen; Li, Tong; Buck, Christopher; Day, Patricia M.; Roden, Richard B. S. (2010): Papillomavirus infection requires gamma secretase. In: *Journal of virology* 84 (20), S. 10661–10670. DOI: 10.1128/JVI.01081-10.
- Kines, Rhonda C.; Thompson, Cynthia D.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T.; Day, Patricia M. (2009): The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (48), S. 20458–20463. DOI: 10.1073/pnas.0908502106.
- Kitadokoro, K.; Bordo, D.; Galli, G.; Petracca, R.; Falugi, F.; Abrignani, S. et al. (2001): CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. In: *The EMBO journal* 20 (1-2), S. 12–18. DOI: 10.1093/emboj/20.1.12.
- Krementsov, Dimitry N.; Rassam, Patrice; Margeat, Emmanuel; Roy, Nathan H.; Schneider-Schaulies, Jurgen; Milhiet, Pierre-Emmanuel; Thali, Markus (2010): HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (11), S. 1401–1414. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2010.01111.x.
- Levy, Shoshana; Shoham, Tsipi (2005): Protein-protein interactions in the tetraspanin web. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 20, S. 218–224. DOI: 10.1152/physiol.00015.2005.
- Lipovsky, Alex; Popa, Andreea; Pimienta, Genaro; Wyler, Michael; Bhan, Ashima; Kuruvilla, Leena et al. (2013): Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as

- a cellular entry factor for human papillomavirus. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (18), S. 7452–7457. DOI: 10.1073/pnas.1302164110.
- Liu, Jie; Zhu, Guoqin; Jia, Naixin; Wang, Weiyi; Wang, Yuan; Yin, Meifang et al. (2019): CD9 regulates keratinocyte migration by negatively modulating the sheddase activity of ADAM17. In: International journal of biological sciences 15 (2), S. 493–506. DOI: 10.7150/ijbs.29404.
- Liu, Li; He, Bo; Liu, Wei M.; Zhou, Dongming; Cox, John V.; Zhang, Xin A. (2007): Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. In: The Journal of biological chemistry 282 (43), S. 31631–31642. DOI: 10.1074/jbc.M701165200.
- Lottspeich, Friedrich; Engels, Joachim W. (Hg.) (2012): Bioanalytik. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Machado-Pineda, Yesenia; Cardeñes, Beatriz; Reyes, Raquel; López-Martín, Soraya; Toribio, Víctor; Sánchez-Organero, Paula et al. (2018): CD9 Controls Integrin $\alpha 5\beta 1$ -Mediated Cell Adhesion by Modulating Its Association With the Metalloproteinase ADAM17. In: Frontiers in immunology 9, S. 2474. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02474.
- Maretzky, Thorsten; Scholz, Felix; Köten, Bente; Proksch, Ehrhardt; Saftig, Paul; Reiss, Karina (2008): ADAM10-mediated E-cadherin release is regulated by proinflammatory cytokines and modulates keratinocyte cohesion in eczematous dermatitis. In: The Journal of investigative dermatology 128 (7), S. 1737–1746. DOI: 10.1038/sj.jid.5701242.
- McMillan, N. A.; Payne, E.; Frazer, I. H.; Evander, M. (1999): Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. In: Virology 261 (2), S. 271–279. DOI: 10.1006/viro.1999.9825.
- McQuillan, Geraldine; Kruszon-Moran, Deanna; Markowitz, Lauri (2017): Prevalence of HPV in Adults Aged 18–69: United States, 2011–2014. Hg. v. Centers for Disease Control and Prevention National Center for Health Statistics. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (Data Briefs, 280). Online verfügbar unter <https://www.cdc.gov/nchs/products/databriefs/db280.htm#ref1>, zuletzt aktualisiert am 14.03.2020, zuletzt geprüft am 14.03.2020.

- Mikuličić, Snježana; Finke, Jérôme; Boukhallouk, Fatima; Wüstenhagen, Elena; Sons, Dominik; Homsí, Yahya et al. (2019): ADAM17-dependent signaling is required for oncogenic human papillomavirus entry platform assembly. In: *eLife* 8. DOI: 10.7554/eLife.44345.
- Mikuličić, Snježana; Florin, Luise (2019): The endocytic trafficking pathway of oncogenic papillomaviruses. In: *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)* 7, S. 135–137. DOI: 10.1016/j.pvr.2019.03.004.
- Mikuličić, Snježana; Fritzen, Anna; Scheffer, Konstanze; Strunk, Johannes; Cabañas, Carlos; Sperrhacke, Maria et al. (2020): Tetraspanin CD9 affects HPV16 infection by modulating ADAM17 activity and the ERK signalling pathway. In: *Medical microbiology and immunology*. DOI: 10.1007/s00430-020-00671-5.
- Miyado, K.; Yamada, G.; Yamada, S.; Hasuwa, H.; Nakamura, Y.; Ryu, F. et al. (2000): Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5451), S. 321–324. DOI: 10.1126/science.287.5451.321.
- Miyamoto, S.; Teramoto, H.; Gutkind, J. S.; Yamada, K. M. (1996): Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. In: *The Journal of cell biology* 135 (6 Pt 1), S. 1633–1642. DOI: 10.1083/jcb.135.6.1633.
- Modis, Yorgo; Trus, Benes L.; Harrison, Stephen C. (2002): Atomic model of the papillomavirus capsid. European Molecular Biology Organization. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126290/>, zuletzt aktualisiert am 01.01.2002, zuletzt geprüft am 21.01.2020.
- Monk, Peter N.; Partridge, Lynda J. (2012): Tetraspanins: gateways for infection. In: *Infectious disorders drug targets* 12 (1), S. 4–17. DOI: 10.2174/187152612798994957.
- Müller, Konstantin H.; Spoden, Gilles A.; Scheffer, Konstanze D.; Brunnhöfer, Regina; Brabander, Jef K. de; Maier, Martin E. et al. (2014): Inhibition by cellular vacuolar ATPase impairs human papillomavirus uncoating and infection. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58 (5), S. 2905–2911. DOI: 10.1128/AAC.02284-13.

- Muñoz, N.; Bosch, F. X.; Sanjosé, S. de; Tafur, L.; Izarzugaza, I.; Gili, M. et al. (1992): The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. In: *International journal of cancer* 52 (5), S. 743–749. DOI: 10.1002/ijc.2910520513.
- Murayama, Yoko; Shinomura, Yasuhisa; Oritani, Kenji; Miyagawa, Jun-Ichiro; Yoshida, Hitoshi; Nishida, Makoto et al. (2008): The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. In: *Journal of cellular physiology* 216 (1), S. 135–143. DOI: 10.1002/jcp.21384.
- NobelPrize.org (Hg.) (2020): Press release. Nobel Media AB. Online verfügbar unter <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2008/press-release>, zuletzt geprüft am 31.03.2020.
- Novitskaya, V.; Romanska, H.; Kordek, R.; Potemski, P.; Kusińska, R.; Parsons, M. et al. (2014): Integrin $\alpha3\beta1$ -CD151 complex regulates dimerization of ErbB2 via RhoA. In: *Oncogene* 33 (21), S. 2779–2789. DOI: 10.1038/onc.2013.231.
- Ovalle, Susana; Gutiérrez-López, María Dolores; Olmo, Nieves; Turnay, Javier; Lizarbe, María Antonia; Majano, Pedro et al. (2007): The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. In: *International journal of cancer* 121 (10), S. 2140–2152. DOI: 10.1002/ijc.22902.
- Ozbun, Michelle A. (2019): Extracellular events impacting human papillomavirus infections: Epithelial wounding to cell signaling involved in virus entry. In: *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)* 7, S. 188–192. DOI: 10.1016/j.pvr.2019.04.009.
- Pasternak, Stephen H.; Bagshaw, Richard D.; Guiral, Marianne; Zhang, Sunqu; Ackerley, Cameron A.; Pak, Brian J. et al. (2003): Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (29), S. 26687–26694. DOI: 10.1074/jbc.m304009200.
- Petracca, R.; Falugi, F.; Galli, G.; Norais, N.; Rosa, D.; Campagnoli, S. et al. (2000): Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. In: *Journal of virology* 74 (10), S. 4824–4830. DOI: 10.1128/jvi.74.10.4824-4830.2000.
- Raff, Adam B.; Woodham, Andrew W.; Raff, Laura M.; Skeate, Joseph G.; Yan, Lisa; Da Silva, Diane M. et al. (2013): The evolving field of human papillomavirus receptor

research: a review of binding and entry. In: *Journal of virology* 87 (11), S. 6062–6072. DOI: 10.1128/JVI.00330-13.

Ray, W. J.; Yao, M.; Mumm, J.; Schroeter, E. H.; Saftig, P.; Wolfe, M. et al. (1999): Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (51), S. 36801–36807. DOI: 10.1074/jbc.274.51.36801.

Richards, Rebecca M.; Lowy, Douglas R.; Schiller, John T.; Day, Patricia M. (2006): Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5), S. 1522–1527. DOI: 10.1073/pnas.0508815103.

Risco-Castillo, Veronica; Topçu, Selma; Son, Olivia; Briquet, Sylvie; Manzoni, Giulia; Silvie, Olivier (2014): CD81 is required for rhoptry discharge during host cell invasion by *Plasmodium yoelii* sporozoites. In: *Cellular microbiology* 16 (10), S. 1533–1548. DOI: 10.1111/cmi.12309.

Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung (Hg.) (2014): *Epidemiologisches Bulletin* 35 / 2014.

Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung (Hg.) (2018): *Epidemiologisches Bulletin* 26 / 2018.

Rocha-Perugini, V.; Zamai, M.; González-Granado, J. M.; Barreiro, O.; Tejera, E.; Yañez-Mó, M. et al. (2013): CD81 controls sustained T cell activation signaling and defines the maturation stages of cognate immunological synapses. In: *Molecular and cellular biology* 33 (18), S. 3644–3658. DOI: 10.1128/MCB.00302-13.

Rocha-Perugini, Vera; Suárez, Henar; Álvarez, Susana; López-Martín, Soraya; Lenzi, Gina M.; Vences-Catalán, Felipe et al. (2017): CD81 association with SAMHD1 enhances HIV-1 reverse transcription by increasing dNTP levels. In: *Nature microbiology* 2 (11), S. 1513–1522. DOI: 10.1038/s41564-017-0019-0.

Rubinstein, E.; Le Naour, F.; Lagaudrière-Gesbert, C.; Billard, M.; Conjeaud, H.; Boucheix, C. (1996): CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. In: *European journal of immunology* 26 (11), S. 2657–2665. DOI: 10.1002/eji.1830261117.

Sahin, Umut; Weskamp, Gisela; Kelly, Kristine; Zhou, Hong-Ming; Higashiyama, Shigeki; Peschon, Jacques et al. (2004): Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in

- ectodomain shedding of six EGFR ligands. In: *The Journal of cell biology* 164 (5), S. 769–779. DOI: 10.1083/jcb.200307137.
- Sala-Valdés, Mónica; Ursa, Angeles; Charrin, Stéphanie; Rubinstein, Eric; Hemler, Martin E.; Sánchez-Madrid, Francisco; Yáñez-Mó, María (2006): EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (28), S. 19665–19675. DOI: 10.1074/jbc.M602116200.
- Sapp, M.; Fligge, C.; Petzak, I.; Harris, J. R.; Streeck, R. E. (1998): Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. In: *Journal of virology* 72 (7), S. 6186–6189.
- Sapp, M.; Kraus, U.; Volpers, C.; Snijders, P. J.; Walboomers, J. M.; 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. In: *The Journal of general virology* 75 (Pt 12), S. 3375–3383. DOI: 10.1099/0022-1317-75-12-3375.
- Sapp, M.; Volpers, C.; Müller, M.; Streeck, R. E. (1995): Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. In: *The Journal of general virology* 76 (Pt 9), S. 2407–2412. DOI: 10.1099/0022-1317-76-9-2407.
- Scheffer, Konstanze D. (2013): Zelluläre Kofaktoren der Infektion des Humanen Papillomvirus Typ 16. Dissertation Biologie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.
- Scheffer, Konstanze D.; Berditchevski, Fedor; Florin, Luise (2014): The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. In: *Viruses* 6 (2), S. 893–908. DOI: 10.3390/v6020893.
- Scheffer, Konstanze D.; Gawlitza, Alexander; Spoden, Gilles A.; Zhang, Xin A.; Lambert, Carsten; Berditchevski, Fedor; Florin, Luise (2013): Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis. In: *Journal of virology* 87 (6), S. 3435–3446. DOI: 10.1128/JVI.02906-12.
- Schelhaas, Mario; Shah, Bhavin; Holzer, Michael; Blattmann, Peter; Kühling, Lena; Day, Patricia M. et al. (2012): Entry of human papillomavirus type 16 by actin-

- dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. In: PLoS pathogens 8 (4), e1002657. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002657.
- Scherer, W. F.; Syverton, J. T.; Gey, G. O. (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. In: The Journal of experimental medicine 97 (5), S. 695–710. DOI: 10.1084/jem.97.5.695.
- Schiller, John T.; Day, Patricia M.; Kines, Rhonda C. (2010): Current understanding of the mechanism of HPV infection. In: Gynecologic oncology 118 (1 Suppl), S12-7. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.04.004.
- Schneider, Marc A.; Spoden, Gilles A.; Florin, Luise; Lambert, Carsten (2011): Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. In: Cellular microbiology 13 (1), S. 32–46. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01515.x.
- Seigneuret, M.; Delaguillaumie, A.; Lagaudrière-Gesbert, C.; Conjeaud, H. (2001): Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. In: The Journal of biological chemistry 276 (43), S. 40055–40064. DOI: 10.1074/jbc.M105557200.
- Selinka, Hans-Christoph; Florin, Luise; Patel, Hetal D.; Freitag, Kirsten; Schmidtke, Michaela; Makarov, Vadim A.; Sapp, Martin (2007): Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. In: Journal of virology 81 (20), S. 10970–10980. DOI: 10.1128/JVI.00998-07.
- Selinka, Hans-Christoph; Giroglou, Tzenan; Nowak, Thorsten; Christensen, Neil D.; Sapp, Martin (2003): Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. In: Journal of virology 77 (24), S. 12961–12967. DOI: 10.1128/jvi.77.24.12961-12967.2003.
- Selinka, Hans-Christoph; Giroglou, Tzenan; Sapp, Martin (2002): Analysis of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 33 pseudovirions. In: Virology 299 (2), S. 279–287. DOI: 10.1006/viro.2001.1493.
- Shi, W.; Fan, H.; Shum, L.; Derynck, R. (2000): The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor

- activation and cell proliferation. In: *The Journal of cell biology* 148 (3), S. 591–602. DOI: 10.1083/jcb.148.3.591.
- Shimizu, Toko; Matsuishi, Toyojiro; Iwamoto, Ryo; Handa, Kazuyo; Yoshioka, Hiroshi; Kato, Hirohisa et al. (2002): Elevated levels of anti-CD9 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with subacute sclerosing panencephalitis. In: *The Journal of infectious diseases* 185 (9), S. 1346–1350. DOI: 10.1086/340134.
- Shoham, Tsipi; Rajapaksa, Ranjani; Kuo, Chiung-Chi; Haimovich, Joseph; Levy, Shoshana (2006): Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. In: *Molecular and cellular biology* 26 (4), S. 1373–1385. DOI: 10.1128/MCB.26.4.1373-1385.2006.
- Silvie, Olivier; Greco, Céline; Franetich, Jean-François; Dubart-Kupperschmitt, Anne; Hannoun, Laurent; van Gemert, Geert-Jan et al. (2006): Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species. In: *Cellular microbiology* 8 (7), S. 1134–1146. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00697.x.
- Silvie, Olivier; Rubinstein, Eric; Franetich, Jean-François; Prenant, Michel; Belnoue, Elodie; Rénia, Laurent et al. (2003): Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. In: *Nature medicine* 9 (1), S. 93–96. DOI: 10.1038/nm808.
- Sincock, P. M.; Fitter, S.; Parton, R. G.; Berndt, M. C.; Gamble, J. R.; Ashman, L. K. (1999): PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. In: *Journal of cell science* 112 (Pt 6), S. 833–844.
- Sincock, P. M.; Mayrhofer, G.; Ashman, L. K. (1997): Localization of the transmembrane 4 superfamily (TM4SF) member PETA-3 (CD151) in normal human tissues: comparison with CD9, CD63, and alpha5beta1 integrin. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 45 (4), S. 515–525. DOI: 10.1177/002215549704500404.
- Smith, Jessica L.; Campos, Samuel K.; Wandinger-Ness, Angela; Ozbun, Michelle A. (2008): Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in

- human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. In: *Journal of virology* 82 (19), S. 9505–9512. DOI: 10.1128/JVI.01014-08.
- Snieder, Beatrice; Brast, Sabine; Grabner, Alexander; Buchholz, Sven; Schröter, Rita; Spoden, Gilles A. et al. (2019): Identification of the Tetraspanin CD9 as an Interaction Partner of Organic Cation Transporters 1 and 2. In: *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* 24 (9), S. 904–914. DOI: 10.1177/2472555219859837.
- Spoden, Gilles; Freitag, Kirsten; Husmann, Matthias; Boller, Klaus; Sapp, Martin; Lambert, Carsten; Florin, Luise (2008): Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). In: *PloS one* 3 (10), e3313. DOI: 10.1371/journal.pone.0003313.
- Spoden, Gilles A.; Besold, Katrin; Krauter, Steffi; Plachter, Bodo; Hanik, Nils; Kilbinger, Andreas F. M. et al. (2012): Polyethylenimine is a strong inhibitor of human papillomavirus and cytomegalovirus infection. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56 (1), S. 75–82. DOI: 10.1128/AAC.05147-11.
- Spring, Frances A.; Griffiths, Rebecca E.; Mankelow, Tosti J.; Agnew, Christopher; Parsons, Stephen F.; Chasis, Joel A.; Anstee, David J. (2013): Tetraspanins CD81 and CD82 facilitate $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion of human erythroblasts to vascular cell adhesion molecule-1. In: *PloS one* 8 (5), e62654. DOI: 10.1371/journal.pone.0062654.
- Stern, Peter L.; van der Burg, Sjoerd H.; Hampson, Ian N.; Broker, Thomas R.; Fiander, Alison; Lacey, Charles J. et al. (2012): Therapy of human papillomavirus-related disease. In: *Vaccine* 30 Suppl 5, F71-82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.05.091.
- Stipp, C. S.; Hemler, M. E. (2000): Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 11), S. 1871–1882.
- Stipp, C. S.; Kolesnikova, T. V.; Hemler, M. E. (2001a): EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (44), S. 40545–40554. DOI: 10.1074/jbc.M107338200.

- Stipp, C. S.; Orlicky, D.; Hemler, M. E. (2001b): FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (7), S. 4853–4862. DOI: 10.1074/jbc.M009859200.
- Stipp, Christopher S. (2010): Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. In: *Expert reviews in molecular medicine* 12, e3. DOI: 10.1017/S1462399409001355.
- Stipp, Christopher S.; Kolesnikova, Tatiana V.; Hemler, Martin E. (2003): Functional domains in tetraspanin proteins. In: *Trends in biochemical sciences* 28 (2), S. 106–112. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)00014-2.
- Surviladze, Zurab; Dziduszko, Agnieszka; Ozbun, Michelle A. (2012): Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. In: *PLoS pathogens* 8 (2), e1002519. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002519.
- Surviladze, Zurab; Sterk, Rosa T.; DeHaro, Sergio A.; Ozbun, Michelle A. (2013): Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. In: *Journal of virology* 87 (5), S. 2508–2517. DOI: 10.1128/JVI.02319-12.
- Surviladze, Zurab; Sterkand, Rosa T.; Ozbun, Michelle A. (2015): Interaction of human papillomavirus type 16 particles with heparan sulfate and syndecan-1 molecules in the keratinocyte extracellular matrix plays an active role in infection. In: *The Journal of general virology* 96 (8), S. 2232–2241. DOI: 10.1099/vir.0.000147.
- Suzuki, Mayumi; Tachibana, Isao; Takeda, Yoshito; He, Ping; Minami, Seigo; Iwasaki, Takeo et al. (2009): Tetraspanin CD9 negatively regulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation and lung inflammation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (10), S. 6485–6493. DOI: 10.4049/jimmunol.0802797.
- Tachibana, I.; Hemler, M. E. (1999): Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. In: *The Journal of cell biology* 146 (4), S. 893–904. DOI: 10.1083/jcb.146.4.893.
- Takahashi, Y.; Bigler, D.; Ito, Y.; White, J. M. (2001): Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1

integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. In: *Molecular biology of the cell* 12 (4), S. 809–820. DOI: 10.1091/mbc.12.4.809.

Takeda, Yoshito; He, Ping; Tachibana, Isao; Zhou, Bo; Miyado, Kenji; Kaneko, Hideshi et al. (2008): Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (38), S. 26089–26097. DOI: 10.1074/jbc.M801902200.

Takeda, Yoshito; Tachibana, Isao; Miyado, Kenji; Kobayashi, Masatoshi; Miyazaki, Toru; Funakoshi, Toshiki et al. (2003): Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. In: *The Journal of cell biology* 161 (5), S. 945–956. DOI: 10.1083/jcb.200212031.

Tejera, Emilio; Rocha-Perugini, Vera; López-Martín, Soraya; Pérez-Hernández, Daniel; Bachir, Alexia I.; Horwitz, Alan Rick et al. (2013): CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. In: *Molecular biology of the cell* 24 (3), S. 261–273. DOI: 10.1091/mbc.E12-09-0642.

Termini, Christina M.; Gillette, Jennifer M. (2017): Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 5, S. 34. DOI: 10.3389/fcell.2017.00034.

Thali, Markus (2011): Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. In: *Biochemical Society transactions* 39 (2), S. 529–531. DOI: 10.1042/BST0390529.

Todres, E.; Nardi, J. B.; Robertson, H. M. (2000): The tetraspanin superfamily in insects. In: *Insect molecular biology* 9 (6), S. 581–590. DOI: 10.1046/j.1365-2583.2000.00222.x.

Tsukamoto, Shokichi; Takeuchi, Masahiro; Kawaguchi, Takeharu; Togasaki, Emi; Yamazaki, Atsuko; Sugita, Yasumasa et al. (2014): Tetraspanin CD9 modulates ADAM17-mediated shedding of LR11 in leukocytes. In: *Experimental & molecular medicine* 46, e89. DOI: 10.1038/emm.2013.161.

van Spriel, Annemiek B.; Figdor, Carl G. (2010): The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. In: *Microbes and infection* 12 (2), S. 106–112. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.11.001.

- Volpers, C.; Sapp, M.; Snijders, P. J.; Walboomers, J. M.; 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. In: *The Journal of general virology* 76 (Pt 11), S. 2661–2667. DOI: 10.1099/0022-1317-76-11-2661.
- Wakabayashi, Tomoko; Craessaerts, Katleen; Bammens, Leen; Bentahir, Mostafa; Borgions, Filip; Herdewijn, Piet et al. (2009): Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. In: *Nature cell biology* 11 (11), S. 1340–1346. DOI: 10.1038/ncb1978.
- Wang, Joshua W.; Roden, Richard B. S. (2013): L2, the minor capsid protein of papillomavirus. In: *Virology* 445 (1-2), S. 175–186. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.017.
- Winterwood, Nicole E.; Varzavand, Afshin; Meland, Marit N.; Ashman, Leonie K.; Stipp, Christopher S. (2006): A critical role for tetraspanin CD151 in alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. In: *Molecular biology of the cell* 17 (6), S. 2707–2721. DOI: 10.1091/mbc.e05-11-1042.
- Woodham, Andrew W.; Da Silva, Diane M.; Skeate, Joseph G.; Raff, Adam B.; Ambroso, Mark R.; Brand, Heike E. et al. (2012): The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. In: *PloS one* 7 (8), e43519. DOI: 10.1371/journal.pone.0043519.
- World Health Organization (2020): Human papillomavirus (HPV) (CC BY-NC-SA 3.0 IGO). Online verfügbar unter <https://www.who.int/immunization/diseases/hpv>, zuletzt aktualisiert am 14.03.2020, zuletzt geprüft am 31.03.2020.
- Wüstenhagen, Elena; Hampe, Laura; Boukhallouk, Fatima; Schneider, Marc A.; Spoden, Gilles A.; Negwer, Inka et al. (2016): The Cytoskeletal Adaptor Obscurin-Like 1 Interacts with the Human Papillomavirus 16 (HPV16) Capsid Protein L2 and Is Required for HPV16 Endocytosis. In: *Journal of virology* 90 (23), S. 10629–10641. DOI: 10.1128/JVI.01222-16.
- Yañez-Mó, María; Barreiro, Olga; Gonzalo, Pilar; Batista, Alicia; Megías, Diego; Genís, Laura et al. (2008): MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. In: *Blood* 112 (8), S. 3217–3226. DOI: 10.1182/blood-2008-02-139394.

- Yáñez-Mó, María; Gutiérrez-López, María Dolores; Cabañas, Carlos (2011): Functional interplay between tetraspanins and proteases. In: Cellular and molecular life sciences : CMLS 68 (20), S. 3323–3335. DOI: 10.1007/s00018-011-0746-y.
- Yang, Xiuwei; Claas, Christoph; Kraeft, Stine-Kathrein; Chen, Lan Bo; Wang, Zemin; Kreidberg, Jordan A.; Hemler, Martin E. (2002): Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. In: Molecular biology of the cell 13 (3), S. 767–781. DOI: 10.1091/mbc.01-05-0275.
- Yang, Xiuwei H.; Flores, Ludmila M.; Li, Qinglin; Zhou, Pengcheng; Xu, Fenghui; Krop, Ian E.; Hemler, Martin E. (2010): Disruption of laminin-integrin-CD151-focal adhesion kinase axis sensitizes breast cancer cells to ErbB2 antagonists. In: Cancer research 70 (6), S. 2256–2263. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4032.
- Yang, Xiuwei H.; Richardson, Andrea L.; Torres-Arzayus, María I.; Zhou, Pengcheng; Sharma, Chandan; Kazarov, Alexander R. et al. (2008): CD151 accelerates breast cancer by regulating alpha 6 integrin function, signaling, and molecular organization. In: Cancer research 68 (9), S. 3204–3213. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2949.
- Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. In: Nature reviews. Molecular cell biology 2 (2), S. 127–137. DOI: 10.1038/35052073.
- Yoon, C. S.; Kim, K. D.; Park, S. N.; Cheong, S. W. (2001): alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. In: Biochemical and biophysical research communications 283 (3), S. 668–673. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4838.
- Zhang, Wei; Kazakov, Teymur; Popa, Andreea; DiMaio, Daniel (2014): Vesicular trafficking of incoming human papillomavirus 16 to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum requires γ -secretase activity. In: mBio 5 (5), e01777-14. DOI: 10.1128/mBio.01777-14.
- Zur Hausen, H. (2008): Papillomaviruses - to vaccination and beyond. In: Biochemistry. Biokhimiia 73 (5), S. 498–503. DOI: 10.1134/s0006297908050027.

Danksagung

Tabellarischer Lebenslauf

