

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

Der Infektionsweg humaner Papillomviren -
Untersuchungen zur Rolle des Autophagie Adapters p62
und der PML Nuclear Bodies

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

Vorgelegt von

Linda Schweiger
aus Hamburg

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

7. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Aufbau humaner Papillomviren	4
2.2 Der virale Replikationszyklus	5
2.2.1 Bindung und Endozytose.....	5
2.2.2 Intrazellulärer Transport.....	5
2.2.3 Etablierung der Infektion an PML NBs.....	6
2.2.4 Morphogenese.....	8
2.3 Karzinogenese	9
2.4 Autophagie Adapter p62.....	10
2.5 Autophagie bei viraler Infektion	12
3 Material	14
3.1 Zelllinien	14
3.1.1 HeLa-Zellen	14
3.1.2 HaCaT-Zellen	14
3.1.3 293TT-Zellen	14
3.1.4 Medien und Zellkulturzusätze	14
3.2 Laborgeräte	15
3.3 Einmalmaterialien.....	16
3.4 Chemikalien, Kits und Reagenzien	16
3.5 Puffer und Lösungen	18
3.6 siRNA	19
3.7 Plasmidvektoren.....	19

3.8	Autophagiemodulatoren	20
3.9	Antikörper.....	20
3.9.1	Primäre Antikörper.....	20
3.9.2	Sekundäre Antikörper (Immunfluoreszenz und Western Blot)	21
3.10	Größenmarker.....	21
4	Methoden	22
4.1	Zellkultur.....	22
4.1.1	Kultivierung.....	22
4.1.2	Passagieren der Zellen.....	22
4.2	Pseudovirenpräparation	22
4.3	Plasmidpräparation	23
4.4	siRNA-Transfektion	24
4.5	DNA-Transfektion.....	24
4.6	Immunfluoreszenz.....	25
4.6.1	Klassische Immunfluoreszenz	25
4.6.2	Proximity-Ligation Assay von p62 und PML	26
4.7	Infektionsversuche	26
4.7.1	Luciferase-Messung	26
4.7.2	Zytotoxizitätstest über Laktatdehydrogenase-Messung.....	27
4.8	SDS-Page	27
4.8.1	Herstellung der Gele.....	27
4.8.2	Elektrophorese.....	28
4.9	Western Blot.....	28
4.9.1	Proteintransfer	28
4.9.2	Proteindetektion.....	29
4.10	Co-Immunopräzipitation.....	29
4.11	Statistische Methoden.....	30
5	Ergebnisse	31

Inhaltsverzeichnis

5.1	p62 – ein proviraler Faktor der HPV-Infektion	31
5.2	p62 bildet einen Komplex mit den viralen Kapsidproteinen L1 und L2	31
5.3	Die funktionelle Bedeutung von p62 in der HPV-Infektion.....	32
5.3.1	Zelluläre p62 Level nach Infektion	33
5.3.2	p62 Depletion.....	33
5.3.3	Keine Anreicherung der viralen DNA im Golgi nach p62 Depletion	34
5.3.4	Nach p62-Depletion reichert sich die virale DNA in autophagosomalen Strukturen an.....	35
5.3.5	In HeLa-Zellen führt die p62-Depletion zu gesteigerter L2-Degradation	38
5.3.6	Infektionsversuche nach Modulierung früher Autophagieschritte	40
5.4	Die HPV-Infektion induziert eine Assoziation von p62 mit PML NBs.....	41
5.5	Die antiviralen Proteine Sp100 und MYPOP nach HPV-Infektion	43
5.6	Der Einfluss von L2 auf p62 und die PML NBs	44
5.6.1	p62 und L2 in PML NBs.....	44
5.6.2	L2 verändert die Morphologie der PML NBs.....	45
5.6.3	L2 beeinflusst das Level des Autophagiemarkers LC3	46
6	Diskussion.....	48
6.1	p62 bindet an eindringende HPV16-Partikel	48
6.2	p62 schützt die viralen Partikel vor dem Weg in die Autophagie	49
6.3	p62 schützt die viralen Partikel vor autophagosomaler Degradation.....	50
6.4	Autophagie wirkt der HPV-Infektionsrate entgegen.....	51
6.5	p62 begleitet die L2/virale DNA Komplexe zu PML NBs im Zellkern.....	54
6.6	L2 reorganisiert die Anordnung von PML Protein im Kern	55
6.7	L2 als mögliches Effektorprotein der Autophagiehemmung	57
6.8	Modell der HPV-Infektion	59
7	Zusammenfassung.....	61
8	Summary (English version)	63
9	Literaturverzeichnis	65

10	Anhang.....	72
10.1	Tagungsbeiträge zu Ergebnissen dieser Arbeit	72
10.2	Genehmigungen der Abbildungen aus zitierten Publikationen.....	73

Abkürzungsverzeichnis

ALIX	<i>apoptosis linked gene 2-interacting protein X</i>
ATG	<i>autophagy related gene</i> , Autophagie-assoziiertes Gen
ATP	A denosin t riphosphat
BSA	b ovines S erumalbumin
CIN	c ervikale intraepitheliale N eoplasie
DAPI	4',6-D iamidin- 2-P henylindol
DDR	<i>DNA damage repair system</i> , DNA-Schäden Reparatursystem
EDTA	E thylendiamintetraacetat
EdU	<i>5-ethynyl-2'-deoxyuridine</i> , Thymidinanalogon
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i> , epithelialer Wachstumsrezeptor
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> , endosomaler Sortierkomplex für Transport(prozesse)
et al.	<i>et alii</i> , unter anderen
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i> , Fluoreszenzregeneration nach Photobleichung
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
HaCaT	<i>human adult low calcium high temperature keratinocytes</i> , immortalisierte humane Keratinozyten
HCMV	h uman c ytomegalovirus
HPV	h umane P apillomviren
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSV-1	H erpes S implex V irus 1
LB	<i>lysogeny broth</i> , Lysogenie-Bouillon
LCR	<i>long control region</i> , lange Kontrollregion (nicht kodierend)
LDH	L aktat d ehydrogenase
LIR	<i>LC3 interacting region</i> , LC3-interagierende Region
3-MA	3-M ethyladenin
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MEF	<i>mouse embryonal fibroblasts</i> , embryonale Mausfibroblasten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> , Ziel von Rapamycin im Säugetier
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsequenz

Inhaltsverzeichnis

NHEK	<i>normal human epidermal keratinocytes</i> , primäre Keratinozyten
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssequenz
OBSL-1	<i>obscurin like protein 1</i> , Obscurin-ähnliches Protein 1
pAb	<i>polyclonal antibody</i> , polyklonaler Antikörper
Pap	P apanicolaou
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PEI	P olyethylimin
PI3K	P hosphoinositid-3-Kinase
PLA	<i>proximity ligation assay</i> , Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen
PML NBs	<i>promyelocytic leukemia nuclear bodies</i> , Promyelozyten Leukämie Kernkörperchen
PsV	P seudovirus
SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIM	<i>SUMO-interacting motif</i> , SUMO-Interaktionsmotiv
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STIKO	st ändige I mpf k ommission
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i> , kleines Ubiquitin-ähnliches Protein
TEM	<i>tetraspanine enriched microdomain</i> , Tetraspanin-reiche Mikrodomäne
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
UBA	<i>ubiquitin associated domain</i> , Ubiquitin-assoziierte Domäne
vDNA	v irale DNA
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Cryoelektronenmikroskopische Rekonstruktion eines HPV-Kapsids (aus Buck et al., 2013 (16)).....	4
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des viralen Replikationszyklus im Epithel (aus Porter et al., 2017 (38)).....	8
Abbildung 2.3: Modell der Formierung sphärischer p62 Körper (<i>p62 body</i>) durch Phasenseparation (aus Sun et al., 2018 (48))	11
Abbildung 4.1: Funktionsweise des Proximity Ligations Assay (aus Bobrich et. al 2013 (67))	26
Abbildung 5.1: Western Blot nach Co-Immunopräzipitation von p62 mit L1 und L2 in HeLa-Zellen nach 18 Stunden Infektion.....	32
Abbildung 5.2: Das p62 Level bleibt während der HPV-Infektion unverändert	33
Abbildung 5.3: Der p62-spezifische siRNA-Pool reduziert zelluläre p62 Level.....	34
Abbildung 5.4: verminderte Lokalisation viraler DNA im Golgi nach p62-Depletion ..	35
Abbildung 5.5: Erhöhte Kolokalisation von viralem Genom mit Autophagosomenmarker LC3 nach p62-Depletion	37
Abbildung 5.6: erhöhte Degradation von L2 nach p62-Depletion in HeLa-Zellen.....	39
Abbildung 5.7: Autophagie wirkt der HPV-Infektionsrate entgegen	40
Abbildung 5.8: Die HPV-Infektion steigert die Assoziation von p62 und PML im Nukleus.....	42
Abbildung 5.9: Die Level von Sp100 und MYPOP sind 24 Stunden nach Infektion nicht verändert.	43
Abbildung 5.10: Kolokalisation von L2-YFP, p62 und PML in HaCaT-Zellen	44
Abbildung 5.11: Überexprimiertes L2 induziert die Formierung großer PML- Aggregate.	46
Abbildung 5.12: L2 exprimierende Zellen zeigen reduzierte LC3-Level.	47
Abbildung 6.1: Wirkweise der Autophagiemodulatoren	52
Abbildung 6.2: Modell der HPV-Infektion.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Medien und Zellkultursätze	14
Tabelle 3.2: Laborgeräte	15
Tabelle 3.3: Einmalmaterialien	16
Tabelle 3.4: Chemikalien, Kits und Reagenzien	16
Tabelle 3.5: Puffer und Lösungen	18
Tabelle 3.6: siRNA Sequenzen	19
Tabelle 3.7: Plasmidvektoren	19
Tabelle 3.8: Primäre Antikörper	20
Tabelle 3.9: Sekundäre Antikörper	21
Tabelle 4.1: Komponenten von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Page	28

1 Einleitung

Papillomviren verursachen Warzen und Krebs. Es handelt sich um eine große Familie kleiner DNA-Viren, die neben den humanen auch viele andere tierspezifische Typen beinhaltet. Spezifisch sind Papillomviren außerdem bezüglich ihres Zielgewebes: sie infizieren ausschließlich Epithelzellen von Haut und Schleimhaut. Durch winzige Läsionen gelangen sie zu den basalen epithelialen Stammzellen, an denen die Primärinfektion stattfindet. Ihren Namen verdanken die Papillomviren ihrer banalsten klinischen Erscheinungsform, der gewöhnlichen papulösen Warze, die meist an Händen oder Füßen auftritt. Deren infektiöse Genese wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts durch erfolgreiche Übertragung auf gesunde Haut entdeckt. 1932 wurde erstmals ein Papillomvirus aus einem Kaninchen isoliert und daran bereits die maligne Transformation gutartiger Geschwüre durch Papillomviren beobachtet. Bis zur Entdeckung der humanen Papillomviren (HPV) als Ursache verschiedener Karzinome des Menschen sollten allerdings noch einige Jahre vergehen (1).

Harald zur Hausen, Mediziner und ab 1983 Vorsitzender des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, entdeckte in den 80er Jahren DNA humaner Papillomviren zuerst in gutartigen genitalen Feigwarzen (2). Er identifizierte daraufhin zahlreiche Virustypen, darunter die beiden häufigsten Hochrisikotypen HPV 16 und 18, und etablierte die HPV-Infektion als Ursache für die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs (3). Für seine Forschungsergebnisse erhielt er 2008 den Nobelpreis für Medizin.

2016 erkrankten in Deutschland 4380 Frauen an invasivem Gebärmutterhalskrebs. In nahezu allen Gebärmutterhalskarzinomen lässt sich DNA humaner Papillomviren nachweisen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate (nur krebsbedingte Sterblichkeit einbezogen) liegt in Deutschland zurzeit bei 67%. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 55 Jahren. Inzidenz und Morbidität waren zwar Mitte des letzten Jahrhunderts noch deutlich höher, sind seit Ende der neunziger Jahre allerdings kaum weiter zurückgegangen (4). Im Vergleich mit anderen Ländern wird deutlich, dass lang bestehende, etablierte Vorsorgeprogramme die Inzidenz stark verringern. Für alle Frauen ab 20 Jahren besteht die Vorsorge in Deutschland in einem jährlichen Papanicolaou (Pap) - Test, bei dem ein Zervixabstrich zytologisch auf auffällig veränderte Epithelzellen untersucht wird. Frauen ab 35 Jahren rät die neue S3-Leitlinie *Prävention des Zervixkarzinoms* seit 2018 alle drei Jahre eine Kombination aus einem Pap-Abstrich und einem Direktnachweis viraler DNA aus dem Abstrichmaterial (5).

Für andere HPV-assoziierte Karzinome ist eine so engmaschige Vorsorge nicht gegeben. Gerade Plattenepithelkarzinome an Kopf und Hals fallen meist erst in fortgeschrittenen Stadien durch Fremdkörpergefühl im Hals, Heiserkeit oder Schluckbeschwerden auf. Die HPV-Infektion trägt zum globalen Anstieg der Fallzahlen oropharyngealer Karzinome bei. In Europa hat der Anteil HPV-positiver Karzinome sich zwischen 2000 und 2005 signifikant von 35 % auf 73 % erhöht (6). HPV-Infektionen der Schleimhäute, sei es am Gebärmutterhals oder im Rachen, werden fast ausschließlich sexuell übertragen. Die Prävalenz der HPV-assoziierten Karzinome an Kopf und Hals korreliert mit der Häufigkeit oralen Geschlechtsverkehrs, was sich in deutlichen Unterschieden zwischen Ländern und Generationen widerspiegelt (7).

In Ermangelung einer spezifischen Behandlung der HPV-Infektion nimmt der seit 2006 verfügbare Impfstoff gegen die häufigsten Hochrisikotypen eine zentrale Rolle ein. Für Mädchen ab dem neunten Lebensjahr wird die Impfung in Deutschland seit 2007 von der ständigen Impfkommission (STIKO) empfohlen. Die Impfquoten steigen zwar, sind aber noch niedrig. 2018 waren nur 51 % der 18-jährigen Mädchen vollständig geimpft (8). Im Juni 2019 wurde die Impfempfehlung auf Jungen ausgeweitet, einerseits um HPV-assoziierten Krebsformen bei Männern wie Penis-, Anal-, oder Oropharynxkarzinomen vorzubeugen, andererseits um im Sinne des sogenannten Herdenschutzes die Krankheitsprävention gerecht auf beide Geschlechter aufzuteilen (9).

Der Infektionsweg der HP-Viren ist noch nicht vollständig geklärt. Dank der Herstellung von Pseudoviren existiert heute ein deutlich naturgetreueres Forschungsmodell als noch Ende des letzten Jahrhunderts (10). Trotzdem sind viele Bausteine des komplexen Zwischenspiels von Virus und Wirtszelle noch unbekannt. Auf dem Weg von der Zelloberfläche bis zum Kern treten die Viren mit zahlreichen zellulären Proteinen in Verbindung, die sie sich zunutze machen. Gleichzeitig verfügt die Zelle über antivirale Abwehrmechanismen, die wiederum teilweise durch virale Proteine außer Kraft gesetzt werden. Es gilt, weitere zelluläre Interaktionspartner der Viren und deren Einfluss auf den Infektionsprozess zu beschreiben, um mögliche Therapieziele zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung des zellulären Autophagie Adapters p62 im HPV-Infektionsweg zu untersuchen. Die hier gezeigte provirale und protektive Funktion von p62 für den viralen Transport ist bisher für kein anderes Virus beschrieben. Darüber hinaus sollen die Vorgänge im Zellkern an den PML-Kernkörperchen (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML NBs) genauer untersucht werden. Sie sind Ort früher

Einleitung

viraler Transkription und Replikation (1, 11, 12), an dem sich wiederum auch p62 unter bestimmten Bedingungen anreichert (13, 14). Über Funktionen von p62 im Zellkern ist bisher allgemein wenig bekannt. Diese Arbeit soll also mit der Untersuchung von p62 dazu beitragen, in der Zukunft ein vollständiges Bild des HPV-Infektionswegs zu erlangen.

2 Literaturdiskussion

Inzwischen sind über 200 Typen humaner Papillomviren bekannt (15). Deren genetische Unterschiede definieren Spezifität für Haut oder Schleimhaut und das Potential, gut- oder bösartige Läsionen hervorzurufen. Der Forschungsschwerpunkt liegt aufgrund der klinischen Relevanz für Krebserkrankungen bei den häufigen Hochrisikotypen HPV16, 18 und 31 (1).

2.1 Aufbau humaner Papillomviren

Papillomviren sind unbehüllt und haben einem Durchmesser von 55-60 nm (1). Das Kapsid humaner Papillomviren besteht aus den beiden Kapsidproteinen L1 und L2. Das L1-Protein liegt je Viruspartikel 360 Mal vor und lagert sich zu 72 pentameren Kapsomeren zusammen, die die äußere ikosaedrische Kapsidstruktur formen. Darunter befinden sich bis zu 72 L2-Proteine, die nur mit einer N-terminalen sechzig Aminosäuren langen Schlaufe durch die L1-Struktur nach außen ragen (11).

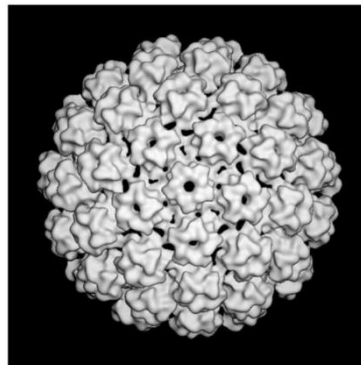


Abbildung 2.1: Cryoelektronenmikroskopische Rekonstruktion eines HPV-Kapsids (aus Buck et al., 2013 (16)).

Das Viruskapsid umschließt zelluläre Histonproteine und das zirkulär geschlossene, etwa 8000 Basenpaare lange virale Genom. Es handelt sich um ein doppelsträngiges DNA-Genom, wobei alle Gene sich auf einem der beiden Stränge befinden. Das Genom lässt sich in einen Bereich für die frühen Proteine E1 bis E8 (E für *early*), einen für die Strukturproteine L1 und L2 (L für *late*) und einen Bereich für die nicht kodierende *long control region* (LCR) mit Kontrollelementen für die Transkription sowie dem Replikationsursprung unterteilen. Die frühen Proteine regulieren die Transkription der frühen Gene, initiieren die Replikation und fördern über verschiedene Mechanismen den Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase. Die späten Proteine werden erst in differenzierten

Epithelzellen exprimiert, um durch Umschließen freier viraler Genome neue infektiöse Viren zu bilden (1).

2.2 Der virale Replikationszyklus

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und sind daher zur Vermehrung auf eine Wirtszelle angewiesen. Der produktive Replikationszyklus humaner Papillomviren erstreckt sich über die Lebenszeit einer Epithelzelle und hängt, begonnen mit der Infektion einer basalen, undifferenzierten Zelle bis zur Freisetzung infektiöser Viren aus apoptotischen Zelle der obersten Epithelschicht, eng mit dem Differenzierungsgrad der Wirtszelle zusammen (1).

2.2.1 Bindung und Endozytose

Durch Mikroläsionen der Haut oder Schleimhaut erreichen die Viren die Basalzellschicht. Hier interagiert L1 je nach Virustyp zuerst mit verschiedenen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix wie Heparansulfaten oder Laminin-332. Die mit der Zelloberfläche assoziierte Isomerase Cyclophilin B induziert anschließend durch eine Konformationsänderung die Freilegung des N-Terminus von L2, der von der Protease Furin an einer hochkonservierten Stelle gespalten wird. Diese Vorgänge an der Zelloberfläche zusammen mit ADAM17 abhängiger Signaltransduktion sind Voraussetzung für die Assoziation mit sekundären Rezeptoren (11, 17). Es handelt sich hierbei unter anderem um Tetraspanine, eine Familie von Transmembranproteinen, die durch Assoziation miteinander und mit anderen Membranproteinen sogenannte *tetraspanine enriched microdomains* (TEMs) formen, an denen sich die Viren anreichern. Für die Hochrisikotypen HPV16, 18 und 31 ist insbesondere das Tetraspanin CD151 von Bedeutung, das mit weiteren möglichen HPV-Rezeptoren wie Integrinen, Rezeptortyrosinkinasen, Annexin A2 und dem Zytoskelett-Adapterprotein *obscurin-like 1* (OBSL-1) TEMs formt. (18-20). Diese sekundären Rezeptorkomplexe werden schließlich über eine Reorganisation des Aktin Zytoskeletts mit den Viren in kleinen Vesikeln ins Zytoplasma abgeschnürt (11).

2.2.2 Intrazellulärer Transport

Beim intrazellulären Transport ausgehend von den frühen Endozytosevesikeln kommt dem Tetraspanin CD63 eine zentrale Bedeutung zu. Es interagiert luminal mit L1 und rekrutiert auf zytosolischer Seite Syntenin-1 und das ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) -assoziierte Protein ALIX (*apoptosis-linked gene 2-interacting protein X*), was Voraussetzung für den Transport zu multivesikulären Endosomen

ist (18, 21). Der niedrigere pH-Wert zusammen mit zellulären Proteinen induziert hier Konformationsänderungen der Kapsidstruktur. Bisher stellte man sich ein Aufbrechen der Kapside gefolgt von lysosomaler Degradation des L1-Proteins vor (11, 12). Neue Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass Teile der Kapsidstruktur während des Transports in den Kern erhalten bleiben (22). Auf jeden Fall verbleibt zumindest ein Teil des L1-Proteins weiterhin bei dem Komplex aus viraler DNA und L2. Eine mögliche Funktion wird hier in der Bindung der viralen DNA an L2 vermutet, da L2 zu diesem Zeitpunkt keine direkte DNA-Bindestelle mehr enthält (11, 12, 23). L2 lagert sich mit einer N-terminalen Transmembrandomäne in die Endosomenmembran ein, wodurch der Großteil von L2 inklusive des C-Terminus frei im Zytosol liegt (24). Dieser Schritt ermöglicht die direkte Interaktion von L2 mit zytosolischen Proteinen und ist somit entscheidend für die Steuerung des Transports in den Zellkern. Als Interaktionspartner konnten hier u. a. die Proteine *Sorting nexin-17* und *-27*, β -Aktin, Syntaxin 18 und die leichten Ketten des Mikrotubuli-Motorproteins Dynein DYNLT1 und DYNLT3 identifiziert werden (11, 12, 19). Über diese Interaktionen wird der retrograde Transport der HPV-gefüllten Endosomen zum *trans golgi network* (TGN) und zum endoplasmatischen Retikulum vermittelt, wobei noch unklar ist, ob diese Stationen obligatorisch sind und inwiefern sie eine funktionale Rolle für die Infektion spielen (11). Es wurde gezeigt, dass die L2/virale DNA Komplexe nicht ins Zytoplasma freigesetzt werden, sondern in vesikulären Strukturen bis in den Zellkern gelangen (25). Während sich in der Mitose die Kernmembranen in Fragmente auflösen, kolokalisieren die HPV-Transportvesikel mit kondensierten Chromosomen (26). So werden sie bei der Reorganisation der Kernmembranen miteingeschlossen und die L2/virale DNA Komplexe erst im Zellkern durch einen noch unbekanntem Mechanismus freigesetzt (11, 25).

2.2.3 Etablierung der Infektion an PML NBs

Innerhalb des Zellkerns kolokalisieren die Komplexe aus L2 und viraler DNA mit PML NBs. Hier wird die Transkription der frühen Gene und daraufhin die Replikation initiiert (11). PML NBs sind punktuell im Zellkern verteilte Proteinaggregate, die sich durch Sumoylierung des Gerüstproteins PML und zahlreichen weiteren obligatorisch und fakultativ vorhandenen Proteinen organisieren. Es handelt sich um dynamische Strukturen von variabler Zusammensetzung, die neben vielen anderen Funktionen auch eine Rolle bei der viralen Infektion spielen (27).

Das HPV Kapsidprotein L2 enthält ein *SUMO interacting motive* (SIM) und kann mit sumoylierten Proteinen interagieren, was Voraussetzung für die Lokalisation an PML

NBs ist (28). Für andere DNA-Viren wie Herpes- oder Adenovirus wird den PML NBs eine restriktive Funktion zugeschrieben, der die Viren durch Auflösung oder Reorganisation der PML NBs entgegenwirken (29, 30). Für HPV hingegen ist das PML-Protein und somit das Vorhandensein von PML NBs der Infektion förderlich. In den Zellkernen PML-defizienter Zellen sind die L2/virale DNA Komplexe, statt sich an PML NBs anzureichern, diffus verteilt und die Transkription der frühen viralen Gene sowie die Replikation sind stark vermindert (31, 32). Für HaCaT-Zellen wurde der protektive Effekt der PML NBs schon genauer untersucht. Der Transport der L2/virale DNA-Komplexe in den Zellkern war in PML-defizienten HaCaT-Zellen nicht beeinträchtigt. Erst in der folgenden Interphase war die Anzahl viraler Genome in den Knockdown-Zellen reduziert. Da der Kernexport viraler Genome als Ursache hierfür ausgeschlossen wurde, werden Degradationsprozesse vermutet (33).

Die in den Zellkern gelangten L2/virale DNA Komplexe kolokalisieren außerdem nicht nur mit PML NBs, sondern scheinen auch deren Zusammensetzung zu verändern. Untersucht wurden hier speziell die Proteine Sp100 und Daxx, die Bestandteile von PML NBs sind und beide als Transkriptionsrepressor fungieren können (27, 34). Nach Überexpression von L2 konnte Sp100 nicht mehr im Zellkern detektiert werden und die Gesamtproteinmenge im Zelllysat war verringert. Ursächlich könnte ein L2-induzierter Degradationsprozess sein, da eine Repression von Sp100 auf Transkriptionsebene ausgeschlossen wurde (35). An anderen DNA-Viren, wie zum Beispiel dem Herpes Simplex Virus 1, konnte bereits die proteasomale Degradation von Sp100 nach Infektion gezeigt werden (36), was auch bei HPV ein denkbarer Mechanismus wäre. Im Gegensatz zu Sp100 wurde von Daxx nach Infektion eine verstärkte Kolokalisation mit PML NBs und L2 beobachtet. Da für L2 außerdem eine zumindest indirekte Interaktion mit Daxx nachgewiesen wurde, liegt die Vermutung einer L2-induzierten Rekrutierung von Daxx zu PML NBs nahe (35). Passend dazu konnten in siRNA-Versuchen die antivirale Rolle von Sp100 sowie die provirale von Daxx bestätigt werden. Sp100-defiziente Zellen zeigten speziell in der frühen Phase der Etablierung des viralen Genoms gesteigerte virale Transkription und Replikation und waren damit insgesamt empfänglicher für die HPV-Infektion (32). Umgekehrt führte die Depletion von Daxx zu einer verringerten Transkription der frühen viralen Gene und somit auch zu einer verringerten Replikation (37). HPV scheint also im Gegensatz zu anderen DNA-Viren die PML NBs nicht aufzulösen, sondern durch deren Reorganisation die Bedingungen für die Etablierung des viralen Genoms zu verbessern. Wie genau HPV diese Änderungen induziert, wurde bisher allerdings kaum untersucht.

2.2.4 Morphogenese

Ausgehend von epithelialen Basalzellen schaffen HP-Viren persistierende Infektionen, die dauerhaft Produktion und Freisetzung neuer Viren aus den abgeschilferten Zellen der obersten Epithelschicht erlauben.

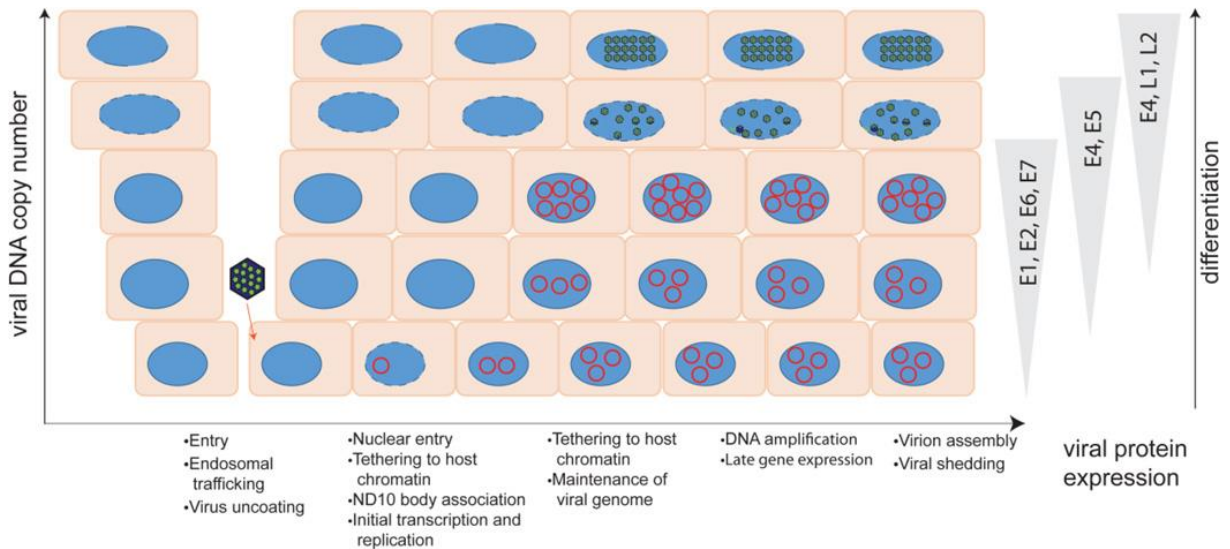


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des viralen Replikationszyklus im Epithel (aus Porter et al., 2017 (38))

Nach der primären Infektion (*Entry, Nuclear Entry*) mit einigen initialen Replikationen (*Initial transcription and replication*) etabliert sich das virale Genom als extrachromosomales Replikon und bleibt dauerhaft in geringer Anzahl in der Wirtszelle vorhanden (*Maintenance of viral genome*). Die basale Stammzelle teilt sich asymmetrisch, wobei eine Tochterzelle in der Basalschicht verbleibt und die andere sich zu differenzieren beginnt. Durch Aufteilung der viralen Genome wird hier gewährleistet, dass einerseits die Infektion persistiert und gleichzeitig in differenzierenden Zellen die produktive Phase der Virusreplikation (*DNA amplification, Virion assembly*) ablaufen kann (39).

Die initiale Replikation wird von den frühen viralen Proteinen E1 und E2 induziert. E2 vermittelt außerdem über weitere E2-Bindestellen des HPV-Genoms eine Assoziation mit zellulärem Chromatin, was sowohl für die Aufteilung auf die Tochterzellen bei der Mitose als auch für die weitere Replikation entscheidend ist. Diese findet an transkriptionsaktiven und für DNA-Schäden anfälligen Bereichen des Wirtszellgenoms statt, da die Rekrutierung des zellulären *DNA damage repair system* (DDR) neben der Aktivierung des späten viralen Promotors eine entscheidende Rolle in der produktiven Replikationsphase spielt (39). Untersuchungen von HPV16 positivem Zervixepithel haben ergeben, dass Sp100 auch in differenzierten Zellen als Restriktionsfaktor der viralen Transkription fungiert. In den infizierten Zellen war Sp100 bis einschließlich ins Stratum

spinosum verstärkt exprimiert und lag in enger Assoziation mit Bereichen viraler Replikation vor. Einige Isoformen von Sp100 binden über eine SAND-DNA-Bindedomäne im Verlauf der Zelldifferenzierung zunehmend an virale DNA, wodurch vermutlich der repressive Effekt vermittelt wird. In den obersten Zellschichten des Zervixepithels, dem Ort der maximalen viralen Replikation, war Sp100 hingegen nicht mehr detektierbar (35, 40). Hier werden durch Aktivierung des späten viralen Promotors die Kapsidproteine L1 und L2 synthetisiert. Sie enthalten beide *nuclear localization signals* (NLS), dank derer sie zurück in den Zellkern transportiert werden (16, 41). L1 lagert sich dort zu pentameren Molekülen zusammen und formt spontan durch Einschluss von L2 und Histon-gebundener viraler Genome infektiöse neue Viren (1).

2.3 Karzinogenese

In den meisten Fällen heilt die genitale HPV-Infektion durch zelluläre Immunabwehr spontan innerhalb einiger Monate aus. Bei 10-15% der Frauen misslingt die Eliminierung allerdings, was den Hauptrisikofaktor für zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) und Karzinome darstellt. Ursächlich sind hier die Hochrisikotypen HPV16, 18 und in seltenen Fällen 31, 33, 35, 45. Meist liegt eine Integration des viralen Genoms ins Wirtszellchromosomen und verstärkte Expression der viralen Onkogene für E6 und E7 zugrunde, wodurch diese Proteine selbst bei Verlust der episomalen viralen Genome kontinuierlich exprimiert werden (42). Diese Integration und auch die spätere Karzinogenese sind der Virusreplikation nicht dienlich. Vermutlich sind sie der Tatsache geschuldet, dass die Virusreplikation das DDR benötigt und deshalb in Bereichen häufiger DNA-Schädigung stattfindet, bei deren Reparatur fälschlicherweise Virusgenom mit eingebaut werden kann (39). Die maligne Entartung von Zellen entsteht aufgrund sich anhäufender Mutationen bei unkontrollierter Proliferation durch die kontinuierliche Expression der Onkogene. E6 führt das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53, das bei DNA-Schäden vor Eintritt in die S-Phase einen Zellzyklusarrest bewirkt, dem ubiquitinabhängigen Abbauweg zu. E7 bindet an die Tumorsuppressorproteine RB105 und RB107, woraufhin diese den zellulären Transaktivator E2F freisetzen, was ebenfalls den Eintritt der Zelle in die S-Phase fördert (1). Als weiterer Angriffspunkt von E7 konnte zuletzt der zelluläre Transkriptionsfaktor MYPOP identifiziert werden. Er konkurriert vermutlich mit dem Protoonkogen c-Myb um eine Bindestelle in der LCR und wirkt restriktiv auf die Transkription viraler Gene. Über einen noch unbekanntem Mechanismus eliminiert E7 MYPOP, was sich sowohl in HPV-transformierten Tumorzelllinien als auch in Gewebe aus zervikalen Läsionen zeigen ließ (43).

2.4 Autophagie Adapter p62

p62 oder *sequestosome-1* (SQSTM-1) stellt mit seinen zahlreichen Bindestellen ein Zentrum zellulärer Signalkaskaden dar. Oxidativer Stress und Entzündung induzieren die p62-Expression. p62 vermittelt Zellüberleben über eine Aktivierung von NF- κ B, kann aber auch proapoptotisch wirken. Aufgrund der Wirkung auf den Zellzyklus liegt eine Beteiligung an Krebserkrankungen nah. Erhöhte p62-Level konnten als onkogener Faktor für die Entstehung des Hepatozellulären Karzinoms identifiziert werden. Auch in der Mehrzahl der Adeno- und Plattenepithelkarzinome der Lunge liegt p62 vermehrt vor (44, 45).

In seiner Rolle als Autophagie Adapter formt p62 über die PB1-Domäne Homooligomere, bindet über die UBA (*ubiquitin associated*) -Domäne polyubiquitinierte Proteinaggregate und führt sie über die *LC3 interacting region* (LIR) der autophagosomalen Degradation (vgl. Kapitel 2.4) zu. Da es dabei selbst abgebaut wird, dient das zelluläre p62-Level oft als Maß für Autophagieaktivität, zu der es in antiproportionalem Zusammenhang steht (46).

Durch zwei NLS und ein *nuclear export signal* (NES) kann p62 inklusive gebundener Proteine aktiv durch die Kernmembran transportiert werden. Es befindet sich in zügigem Wechsel zwischen Zytoplasma und Kern (13).

p62 ist gut detektierbar, da es im Zytoplasma in fleckigen Akkumulationen vorliegt (44). Im Gegensatz zur bisher etablierten Vorstellung von starren Aggregaten aus p62-Oligomeren und ubiquitinierten Proteinen, schlagen Sun et al. ein dynamischeres Modell vor. Anhand von *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) -Versuchen konnten sie zeigen, dass p62 Kompartimente formt, die nicht membrangebunden, sondern visköser als das umliegende Zytoplasma und somit durch Phasenseparation begrenzt sind (47, 48).

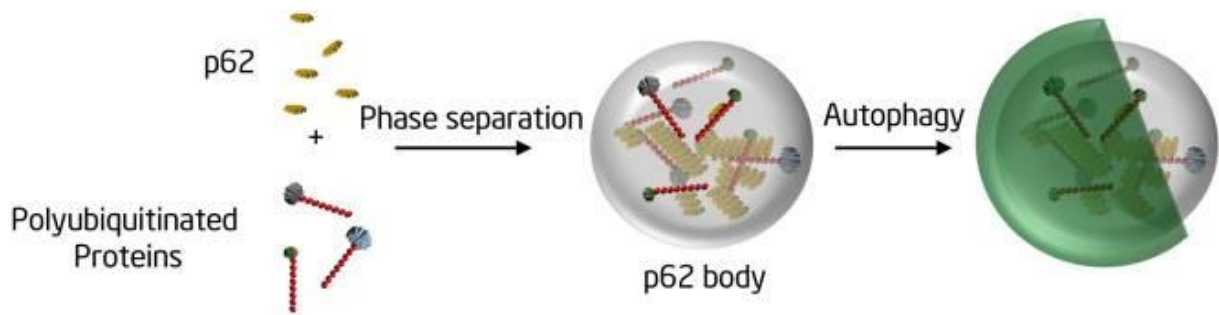


Abbildung 2.3: Modell der Formierung sphärischer p62 Körper (*p62 body*) durch Phasenseparation (aus Sun et al., 2018 (48))

p62, polyubiquitinierte Proteine und unkonjugiertes LC3 (in Abbildung nicht gezeigt) diffundieren frei innerhalb sphärischer p62 Körper. Diese können untereinander fusionieren und über enthaltenes LC3 autophagosomale Strukturen rekrutieren. Im Gegensatz zu den bisher vermuteten Aggregaten enthalten die p62-Körper Proteine in funktionstüchtiger Konformation, die miteinander interagieren und reagieren können (47, 48).

Es konnte bereits in unbehandelten HeLa-Zellen gezeigt werden, dass p62 im Kern mit PML NBs kolokalisiert (13). Die Blockade des Kernexports mit Leptomycin B führt zu stark vermehrten p62-Anreicherungen im Kern, die zunehmend mit PML NBs fusionieren. Souquere et al. haben diesen Prozess per Immunelektronenmikroskopie untersucht und beschreiben ein spezifisches Umschließen der p62-Akkumulationen von PML-Protein (14).

Für die intranukleäre Proteindegradation steht nach aktuellem Erkenntnisstand nur das proteasomale System zur Verfügung, woran p62 ebenfalls beteiligt zu sein scheint (13, 49). Das Proteasom ist ein hochkonservierter Komplex aus Proteasen, in dem Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit oder falscher Konfiguration degradiert werden. Als Markierung für proteasomalen Abbau dienen wie bei der Autophagie Polyubiquitinketten. Ubiquitin enthält sieben Lysinreste, über die eine Kettenbildung erfolgen kann. Eine Verknüpfung über K48 führt typischerweise zum Proteasom, über K63 zur Autophagie, wobei diese Unterscheidung nicht sehr spezifisch ist und auch die Länge der Ubiquitinkette sowie die Lokalisation in der Zelle einen Einfluss haben (46). Intranukleäre proteasomale Aktivität kolokalisiert teilweise mit PML NBs (49), zu denen p62 polyubiquitinierte Proteine rekrutiert. Auch an pathologischen intranukleären Proteinaggregaten konnte eine Anreicherung von p62 und dadurch vermittelt eine Rekrutierung von Bestandteilen des Proteasoms beobachtet werden (13). p62 scheint also auch im Zellkern wichtige Degradationsprozesse zu vermitteln.

Im Kontext viraler Infektion haben Zimmermann et al. eine Anreicherung und Bindung von p62 an intranukleären Kapsidproteinen von humanem Cytomegalievirus (HCMV) während der Morphogenese beobachtet. Die Funktion dieser Assoziation wurde bisher nicht abschließend geklärt (50). Für HPV zeigen neue Ergebnisse von Hong et al. eine ebenfalls provirale Wirkung von p62 während der Amplifikation des viralen Genoms in differenzierenden Zellen. p62 vermittelt hier nach HPV-induzierter Phosphorylierung die Degradation des Transkriptionsfaktors GATA4 und reguliert darüber die zelluläre Immunantwort herunter (51). Die Rolle von p62 in der primären HPV-Infektion wurde bisher nicht untersucht.

2.5 Autophagie bei viraler Infektion

Autophagie ist ein ständig ablaufender Prozess zur Degradation zytoplasmatischer Bestandteile von Proteinen bis zu Zellorganellen, wodurch wieder Aminosäuren für die Proteinsynthese zur Verfügung gestellt werden. Der Autophagieumsatz wird daher bei Nährstoffmangel und zellulärem Stress gesteigert. Pathogene Erreger können ebenfalls über Autophagie eliminiert werden, was auch als Xenophagie bezeichnet wird. Verschiedene Signalkomplexe, darunter Beclin-1 und einige Atg-Proteine (*autophagy related genes*) initiieren die Lipidierung des unkonjugierten LC3-I. Das aktive LC3-II rekrutiert zur Degradation bestimmte Zellbestandteile und reichert sich an Phagophoren an. Diese offenen Vorstufen von Autophagosomen bestehen aus zwei Lipiddoppelschichten und umschließen die Autophagiesubstrate. Autophagosomen fusionieren mit Endosomen, deren ATPasen eine Ansäuerung der nun als Amphisomen bezeichneten Vesikel ermöglichen. Diese verschmelzen mit Proteasen enthaltenden Lysosomen, wodurch ihr Inhalt degradiert wird (52).

Auch Viren werden im Rahmen der zellulären Abwehr autophagosomal abgebaut. Viele Viren haben deshalb Mechanismen entwickelt, Bildung oder Reifung von Autophagosomen zu inhibieren und sich den Autophagieweg sogar zunutze zu machen. So stellen Autophagosomen Replikationsorte für einige RNA-Viren dar und können durch Fusion mit der Plasmamembran zum Sekretionsweg umfunktioniert werden. Oft geht die virale Infektion mit einer gesteigerten Autophagie einher. Ob es sich hierbei um einen zellulären Abwehrmechanismus oder ein virusinduziertes Phänomen handelt, ist nicht immer eindeutig, da einigen Viren auch eine gezielte Autophagie fördernde Wirkung nachgewiesen wurde (52).

Die HPV-Infektion führt ebenfalls zu gesteigerter Autophagie. Es scheint sich hierbei um einen antiviralen zellulären Abwehrmechanismus zu handeln, da eine Hemmung der Autophagie durch 3-Methyladenin in primären Keratinozyten (3-MA, Vgl. Kapitel 3.8) die Infektionsrate erhöht. Auch die generell geringere Infektionsrate in primären Keratinozyten verglichen mit HaCaT-Zellen kann durch deren erhöhte basale Autophagieaktivität erklärt werden (53). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass HPV16 über EGFR (*epidermal growth factor receptor*) an der Zelloberfläche von HaCaT-Zellen die Signalkaskade über Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Akt zu mTOR (*mammalian target of rapamycin*) aktiviert (Vgl. Kap. 3.8 und Abb.6.1). Neben kataboler Wirkung und Zellüberleben führt die Aktivierung von mTOR und dessen Effektorproteinen zu reduzierter Bildung von Autophagosomen. HPV moduliert also schon vor der Endozytose zelluläre Signalwege, um der gesteigerten Autophagie und der damit verbundenen Degradation viraler Bestandteile entgegenzuwirken (53, 54). Auch in HeLa-Zellen fördert die Autophagieblockade durch Behandlung mit 3-MA die Infektion. Sie führt zu einer verringerten Kolo-kalisation von LC3 und viralem L1 im Zytoplasma, was auf eine beeinträchtigte autophagosomale Degradation der Viren hindeutet. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen zeigen nach HPV-Infektion vesikuläre Strukturen aus zwei Lipiddoppelschichten. Es handelt sich vermutlich um Phagophoren und Autophagosomen, in deren Lumen virale Partikel zu sehen sind (55). Die restriktive Wirkung der Autophagie auf die HPV-Infektion ist also schon gut etabliert, wohingegen virale Mechanismen der Autophagie zu entgehen noch nicht untersucht wurden.

3 Material

3.1 Zelllinien

Alle Experimente wurden in HeLa- und/oder HaCaT-Zellen durchgeführt. In den 293TT-Zellen erfolgte die Herstellung der Pseudoviren. Alle drei Zelllinien wachsen einschichtig als adhärenente Zellkultur.

3.1.1 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind 1951 aus einem Zervixkarzinom der Patientin Henrietta Lacks isolierte Epithelzellen. Ihre Immortalisierung beruht auf der dauerhaften Insertion mehrerer inkompletter HPV18 Genome, weshalb sie in vitro sehr empfänglich für die HPV-Infektion sind (56). Gekauft wurden sie von Leibnitz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) GmbH.

3.1.2 HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen (Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes) sind ebenfalls humane Keratinozyten, die in vitro schnell proliferieren, da sie durch chromosomale Veränderungen spontan immortalisiert sind. Die Fähigkeit zur Differenzierung ist ihnen erhalten geblieben, weshalb sie auch zur Untersuchung späterer Stadien der HPV-Infektion eingesetzt werden können (57). Gekauft wurden sie vom CLS (Cell Lines Service), Eppelheim.

3.1.3 293TT-Zellen

293TT-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, transformiert durch Insertion eines unvollständigen Adenovirus-Genoms. Sie exprimieren zusätzlich zwei T-Antigene des Simian-Virus, weshalb sie zur DNA-Replikation von Plasmiden mit dem SV40 origin of replication in der Lage sind und zur Vermehrung vieler Viren und Pseudoviren eingesetzt werden. Sie wurden im Labor von John Schiller und Christopher Buck entwickelt (10).

3.1.4 Medien und Zellkulturzusätze

Tabelle 3.1: Medien und Zellkulturzusätze

Zellkultur-Medium	Gibco® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose 4,5 g/L with GlutaMAX™ (L-
-------------------	--

Material

	Alanin-L-Glutamin-Dipeptid)), Life-Technologies Thermo Fisher Scientific
FCS	Fötale Kälberserum, Biochrom AG
Nichtessentielle Aminosäuren	MEM Non-essential Amino Acid Solution (100x), Sigma-Aldrich
Antibiotikum	Ciprofloxacin Kabi Infusionslösung 200 mg/ 100 ml, Fresenius Kabi
Gibco® Trypsin/EDTA 0,05 %	LifeTechnologies Thermo Fisher Scientific

3.2 Laborgeräte

Tabelle 3.2: Laborgeräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Blot-Kammer	TransBlot™ Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank	CO2-AUTO-ZERO	Heraeus, Hanau
Chemiluminometer	Tristar LB941	Berthold, Bad Wildbach
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M Carl Zeiss	Carl Zeiss, Jena
Heizblock	Blockthermostat BT 1303	HLC Biotech, Bovenden
Kamera	AxioCam HrM-Kamera	Carl Zeiss, Jena
Kontrastphasenmikroskop	WILOVERT S	Hund, Wetzlar
Laborwaagen	KERN 510-41	Kern, Balingen-Frommern
	Mettler AE 100	Mettler, Gießen
Pipettierhilfen	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
Pipetten	Pipetman P1000, P200, P20, P10, P2	Gilson, Middleton
Potter	2 mL Tissue Grinder, Potter-ELV	Wheaton, Millville
Schüttler	Rocky Wipptisch	Fröbel, Lindau
Elektrophoresekammer		Harnischmacher, Kassel
Sterilwerkbank	Nu-440-400E (Class 2)	NUAIRE, Plymouth
	Hera safe	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Ultima LE 80K	Beckmann, Krefeld

Material

Ultrazentrifugenrotoren	SW55	Beckmann, Krefeld
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250	Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Zentrifugen	Sorvall® RC-SB Refrigerated Superseed	Du Pont Instruments, Köln

3.3 Einmalmaterialien

Plastikeinwegwaren wie Mikroreaktionsgefäße, Falcons, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten und Pipetten wurden von den Firmen Eppendorf und Greiner bezogen.

Table 3.3: Einmalmaterialien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare	Sensitiver Film (Elektrochemilumineszenz)
Amersham Protran™ 0,45 µm NC	GE Healthcare	Nitrozellulosemembran für Western Blot
Super RX-N	FUJIFILM	Universaler Film (Elektrochemilumineszenz)

3.4 Chemikalien, Kits und Reagenzien

Table 3.4: Chemikalien, Kits und Reagenzien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth	SDS-PAGE
Albumin Fraction V (pH 7,0)	PanReac AppliChem	Blocken (im Rahmen von Immunfluoreszenzfärbungen)
Brij58	Sigma-Aldrich	Zelllyse zur Herstellung von Pseudoviren
Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher und fixer/replenisher	Sigma-Aldrich	Filmentwicklung (im Rahmen der Western Blot Detektion)

Material

CHAPS SigmaUltra mini- mum 98 % TLC	Sigma-Aldrich	Detergens zur Zellyse vor Co-Immunopräzipitation
CytoTox-ONE™ Homoge- neous Membrane Integrity Assay (LDH)	Promega	Zytotoxizitätstest (im Rahmen des Luciferase-Assays)
Dako Fluorescence Moun-ting Medium	Dako	Einbettung der Deckgläschen auf Objektträgern
Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit	Sigma-Aldrich	Proximity Ligation Assay
Dynabeads™ M280 Sheep anti-Mouse IgG	Invitrogen	Co-Immunopräzipitation
EdU Click-488 ROTI® kit for Imaging	Carl Roth	Fluoreszenzfärbung der DNA EdU-markierter Pseudoviren
Gibco™ Hepes 1M	Invitrogen	Puffer während Zellyse vor Co-Immunopräzipitation
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	Zellkernfärbung Immunfluor- eszenz (färbt Doppelstrang- DNA)
Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen	siRNA-Transfektionsreagenz
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel	DNA-Aufreinigung
PBS buffer (10x Dul- becco's) - Powder	PanReac AppliChem	Phosphatgepufferte Salzlö- sung, mit H ₂ O angesetzt
PEI (Polyethylenimin)	Sigma-Aldrich	DNA-Transfektionsreagenz
Reporter Lysis Buffer 5x	Promega	Lyse-Puffer (im Rahmen des Luciferase-Assay)
Tween® 20	Carl Roth	Detergens für Western Blot und Co-Immunopräzipitation
Western Lightning™ Plus- ECL	Perkin Elmer	Western Blot Detektion (Elektrochemilumineszenz)

3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 3.5: Puffer und Lösungen

<i>Puffer/Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Entwickler / Fixierer	1:4 mit H ₂ O verdünnt
Hepes Puffer	1,25 ml Hepes 1,5 ml NaCl (5 M) 0,125 ml MgCl (2 M) 5 µl Apotinin 5 µl Leupeptin 50 ml H ₂ O
5x Laemmli	25 ml Lösung C (siehe unten) 4 g SDS 1 mg Bromphenolblau 15 ml Glycerin 30 % 45 ml H ₂ O
2,5x Laemmli	5x Laemmli 1:1 mit H ₂ O
2,5x / 5x Laemmli +	+10 % β-Mercaptoethanol
Luciferase-Assay-Puffer	50 mM Tris-Cl pH 7,8 15 mM MgSO ₄ 20 mM DTT 0,5 mM EDTA 0,5 mM Luciferin 0,5 mM Coenzym A 0,5 mM ATP
PEI (Polyethylenimin)	PEI (Sigma-Aldrich) mit H ₂ O auf 1 mg/ml verdünnen, mit HCl auf pH 7,0 einstellen
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	121 g Tris (0,25 M) 587 g Glycin (2 M w/v) 40g SDS (1 % w/v) (auf 4 L)
10x Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris

Material

	192 mM Glycin
	4 L H ₂ O
1x Western Blot-Transferpuffer	10 % 10x Western Blot-Transferpuffer
	20 % Methanol
	70 % H ₂ O

Lösungen für SDS-PAGE:

Lösung B	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,4 % SDS
Lösung C	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	0,4 % SDS

3.6 siRNA

Die siRNA's wurden gemäß verwendetem Protokoll mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt. Als Negativ-Kontrolle (Kontroll-siRNA, KSI) diente in allen Versuchen die AllStars Negative Control siRNA von Qiagen, deren Sequenz keiner im menschlichen Genom vorhandenen mRNA-Nukleotidsequenz entspricht. Hersteller der aufgelisteten siRNA's ist die Firma Sigma-Aldrich.

Tabelle 3.6: siRNA Sequenzen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Leitstrang-Sequenz (5'-3')</i>
Sequestosom #1	GGGUGCAAGAAGCCAUUUA[dT][dT]
Sequestosom #2	CAUAGGUCCCUGACAUUUA[dT][dT]
Sequestosom #3	GGAGGAUCCGAGUGUGAAU[dT][dT]
Sequestosom #4	ACGUUUGCAUAGAGAGAAA[dT][dT]

3.7 Plasmidvektoren

Verwendet wurden Kodon-optimierte L2-Expressionsplasmide basierend auf HPV16 Wildtyp-Plasmiden wie von Leder et al. (58) beschrieben.

Tabelle 3.7: Plasmidvektoren

<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Referenz</i>
pUF3AAV 16L2 WT	Kodon-optimiertes L2-Gen basierend auf HPV16 Wildtyp Gen in pUF3AAV Vektor geklont	Leder et al., 2001 (58)

pEYFP-C1/16 L2	in <i>yellow fluorescent protein</i> (YFP) C1 geklontes L2 Wildtyp Gen	Schneider et al., 2013 (59)
----------------	---	--------------------------------

3.8 Autophagiemodulatoren

Zur Modulierung verschiedener Schritte der Autophagie habe ich drei Inhibitoren eingesetzt (vgl. Abb. 6.1). Bafilomycin wurde mir freundlicherweise vom Institut für Pathobiochemie Mainz zur Verfügung gestellt. Es hemmt die vakuoläre Protonen-ATPase und unterbindet damit die Ansäuerung von Endosomen. Außerdem blockiert es den lysosomalen Abbau von Autophagosomen und führt somit zu einer Anreicherung von zur Degradation bestimmtem Material, das dadurch erst im autophagosomalen Abbauweg detektiert werden kann (60, 61). Rapamycin (Sigma-Aldrich) hingegen induziert die Bildung von Phagophoren. Es inhibiert allosterisch das Schlüsselenzym mTOR (*mammalian target of rapamycin*), das normalerweise über Wachstumsfaktoren und Nährstoffe reguliert wird. In aktiviertem Zustand fördert mTOR Proteinsynthese, Zellwachstum und -proliferation (62), die Hemmung durch Rapamycin resultiert dagegen in gesteigerter Autophagie (63). Ist mTOR gehemmt, dissoziiert ein Komplex aus Atg-Proteinen (*autophagy related genes*), wird dadurch aktiv und kann die Phagophorenbildung initiieren. Hier greift der Autophagieinhibitor 3-Methyladenin (3-MA, Sigma-Aldrich). Über eine Hemmung der Klasse III Phosphoinositid-3-Kinase unterbindet er die Bildung verschiedener Komplexe von Atg-Proteinen zur Bildung und Reifung von Autophagosomen (64). 3-MA und Rapamycin wurden mir freundlicherweise beide von der AG Prange des Instituts für Virologie Mainz zur Verfügung gestellt.

3.9 Antikörper

3.9.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3.8: Primäre Antikörper

Ziel	Spezies	Verdünnung	Hersteller / Referenz
p62 (ab56416)	Maus, monoklonal	IF 1:400 WB 1:1000 IP 1:460	Abcam
Golgin-97 (A-21270)	Maus, monoklonal	IF 1:200	Thermo Fisher Scientific

Material

LC3 (0260-100)	Maus, monoklonal	IF 1:200	Nano tools
PML (SC-5621)	Kaninchen, polyklonal	IF 1:400	Santa Cruz
L2 (L2-1)	Maus, monoklonal	IF 1:350 WB 1:300	Volpers et al., 1995 (65)
L1 (K75)	Kaninchen, polyklonal	WB 1:10000	Bergsdorf et al, 2003 (66)
β -actin (A5441)	Maus, monoklonal	WB 1:20000	Sigma-Aldrich
Sp100	Kaninchen	IF 1:500 WB 1:5000	
MYPOP	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Abcam
Kontroll-IgG	Maus	IP 1:3680	Sigma-Aldrich

Ein Aliquot des LC3-Antikörpers und des Sp100-Antikörpers wurden mir freundlicherweise vom Institut für Pathobiochemie Mainz beziehungsweise vom Heinrich-Pette Institut Hamburg zur Verfügung gestellt.

3.9.2 Sekundäre Antikörper (Immunfluoreszenz und Western Blot)

Tabelle 3.9: Sekundäre Antikörper

Ziel	Spezies	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	Ziege	AlexaFluor 488 AlexaFluor 546 AlexaFluor 647	1:450	Thermo Fisher Scientific
Anti-Kaninchen	Ziege	AlexaFluor 488 AlexaFluor 546	1:450	Thermo Fisher Scientific
Anti-Maus Anti-Kaninchen	Ziege	Horse-Radish-Peroxidase (HRP)	1:10000	Dianova

3.10 Größenmarker

Als Maßstab für die Laufhöhe von Proteinen in der SDS-Page wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa) von Thermo Fisher Scientific verwendet.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung

Alle drei verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% nichtessentiellen Aminosäuren in 75 cm² Zellkulturflaschen adhärent kultiviert. Dem Medium für die Kultur wurden je 500 ml Flasche 2,8 mg Ciprofloxacin zur Verhinderung bakterieller Kontamination hinzugefügt, wohingegen die Experimente in Medium ohne Antibiotikum durchgeführt wurden. Die Zellen wurden im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.1.2 Passagieren der Zellen

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zelllinien unter der Sterilbank passagiert. Nach Absaugen des Mediums erfolgte ein Waschschriff mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) mit 2,5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten im Zellkulturschrank mit 1 ml 0,05% Trypsin/0,02% EDTA inkubiert, um sie vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. 293TT-Zellen wurden nur mit PBS/2,5 mM EDTA ebenfalls im Zellkulturschrank abgelöst. Mehrfaches Auf- und Abpipettieren in frischem, vorgewärmtem Medium bewirkte eine mechanische Vereinzelung der Zellen, woraufhin je nach Zellmenge zwischen 10% und 30% in einer neuen Zellkulturflasche mit Medium verdünnt und weiter kultiviert wurden.

Von den restlichen Zellen wurden je 10 µl in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt, entsprechend mit Medium ohne Antibiotikum verdünnt und in Zellkulturplatten für Experimente ausgesät.

4.2 Pseudovirenpräparation

Für die Versuche wurden ausschließlich Pseudoviren verwendet, die sich aus dem naturgetreuen Kapsid und einem Reporter genom zusammensetzen. Die Herstellung der HPV16 Pseudoviren erfolgte auf Basis eines Protokolls von Buck et al. (10). Dazu wurden 293TT-Zellen in zwei großen Zellkulturflaschen (175 cm²) kultiviert und je Flasche mit 45 µg DNA wie in Kapitel 4.5 beschrieben transfiziert. Dabei wurden zu gleichen Anteilen je zwei Plasmide verwendet: eins, das die beiden Gene für die Expres-

sion der Kapsidproteine enthält (pShell16-L1/L2 wt) und eins zur Expression des Reporter-genoms, das als Pseudogenom der Viren dient. Als Reporterplasmid der Pseudoviren diente ein pcDNA3.1/Luciferase-Plasmid. Die Expression von Luciferase ermöglicht die Messung der Infektionsrate, wie in Kapitel 4.7 erläutert. Als Reporterplasmid der EdU-markierten Pseudoviren, die nur für die Immunfluoreszenz verwendet werden, diente ein pGL4.20 LCR16-Plasmid. Im Rahmen des Mediumwechsels nach fünf Stunden wurde dieser Zellkulturflasche außerdem 20 μM 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) zugegeben. Dieses Thymidin-Analogon wird in das virale Pseudogenom eingebaut und lässt sich später mit dem EdU Click-488 ROTI[®] kit for Imaging spezifisch anfärben. 48 Stunden später konnten die Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst, gewaschen, vorsichtig abzentrifugiert und in 500 μl PBS/MgCl₂ (9,5 mM) aufgenommen werden. Die anschließende Zellyse erfolgte mit 0,5% Brij58. Nach Zugabe von 0,1-0,5% Benzonase zum Abbau freier Nukleinsäuren wurden die Lysate weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und regelmäßig durchmischt. Die freigesetzten Pseudoviren konnten dann durch Dichtegradientenzentrifugation (55000/min für 3,5 Stunden) in übereinander geschichteter 39%, 33% und 27% OptiPrep[®]-Lösung aufgetrennt werden. Die einzelnen Fraktionen à 300 μl wurden über einen Infektionsversuch in HeLa-Zellen wie in Kapitel 4.8 beschrieben auf ihren Gehalt an Pseudoviren untersucht und jeweils die zwei bis vier Fraktionen mit der höchsten Infektionsrate zusammengefügt.

4.3 Plasmidpräparation

Zur Amplifikation der DNA-Plasmide wurde je ein 1 μg davon durch kurzes Erhitzen auf 42°C in veränderte E.coli-Bakterien, Dh5-Alpha-Zellen, transformiert. Die Bakterien wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C in flüssigem LB-Medium (*lysogeny broth*) geschüttelt, auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte über eine im Plasmid enthaltene Antibiotikaresistenz gegen das dem Agar zugesetzte Antibiotikum. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Bakterienkolonie von der Agarplatte aufgenommen und in 150 ml LB-Medium mit Antibiotikum über Nacht bei 37°C geschüttelt. Durch Zentrifugation (30 Minuten bei 3000/min) konnte ein Bakterienpellet gewonnen werden, aus dem anschließend die DNA-Plasmide aufgereinigt wurden. Dies erfolgte mithilfe des NucleoBond[®] Xtra Midi-Kit gemäß dem Herstellerprotokoll. Mit einem Mikrovolumen-Spektralphotometer wurde die Konzentration der DNA gemessen und schließlich in sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt.

4.4 siRNA-Transfektion

Das Protokoll zur siRNA-Transfektion der AG Florin bezieht sich immer auf eine siRNA-Konzentration von 20 μM . RNase-freies Arbeiten gelang durch Säuberung der Sterilbank mit einem RNase-Dekontaminationsreagenz und der Verwendung steriler Pipettenspitzen. Für eine 12-Well-Platte wurden je Probe 1,6 μl des Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX und 0,9 μl siRNA oder Kontroll-siRNA separat in je 100 μl Zellkulturmedium ohne Zusätze vorverdünnt. Dabei durfte das Transfektionsreagenz nur durch Auf- und Abpipettieren gemischt werden. Die beiden Komponenten wurden anschließend zusammengeführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte ein Mediumwechsel bei den am Vortag ausgesäten Zellen erfolgen. Zu dem 1 ml frischen Medium im Well wurden anschließend je 200 μl der siRNA/RNAiMAX-Mischung gegeben und durch Schwenken der Platte im Well verteilt. In einer 24-Well-Platte wurde jeweils die Hälfte aller erwähnten Komponenten verwendet. Für die Ausprägung des Knock-Downs wurden die Zellen nun für 48 Stunden im Zellkulturschrank belassen.

4.5 DNA-Transfektion

Das Protokoll zur DNA-Transfektion der AG Florin bezieht sich immer auf eine DNA-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Wie bei der siRNA-Transfektion wurden auch hier zunächst die DNA-Plasmide und das Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) separat in Zellkulturmedium ohne Zusätze vorverdünnt. Das PEI Aliquot wurde nach dem zweiten Auftauen immer verworfen. Für eine 12-Well-Platte wurden dabei je Well 2 μg DNA und 3 μl PEI in 100 μl Medium gegeben. Die beiden Komponenten wurden zusammengeführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen erfolgen. Zu dem 1 ml frischen Medium im Well wurden anschließend je 200 μl der DNA/PEI-Mischung gegeben und durch Schwenken der Platte im Well verteilt. Für die DNA-Transfektion im Rahmen der Pseudovirenpräparation (s. Kapitel 4.2) wurden je Zellkulturflasche 45 μg DNA und 70 μl PEI in 6 ml Zellkulturmedium ohne Zusätze vorverdünnt. Fünf Stunden nach der DNA-Transfektion erfolgte immer ein zweiter Mediumwechsel, woraufhin die nächsten Schritte des Experiments am darauffolgenden Tag angeschlossen werden konnten.

4.6 Immunfluoreszenz

Für die Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten wurden die Zellen auf Deckgläschen in 12-Well-Platten ausgesät. Nach entsprechender Behandlung je nach Experiment wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und nach einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung durch 100% Methanol bei -20°C .

4.6.1 Klassische Immunfluoreszenz

Drei weitere Waschschriffe in PBS für insgesamt zehn Minuten folgten, woraufhin durch dreißig Minuten Inkubation mit PBS/1%BSA (bovines Serumalbumin, Albumin Fraction V) unspezifische Bindungsstellen geblockt wurden. Alle Wasch- und Blockschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Falls mit EdU-markierten Pseudoviren gearbeitet wurde, konnte die virale DNA nun mit dem EdU Click-488 ROTI® kit for Imaging gemäß dem Herstellerprotokoll angefärbt werden. In dem Fall mussten die Gläschen bereits ab diesem Zeitpunkt vor Licht geschützt werden. Nach drei Waschschriffen und zehn Minuten Blocken wurden die Gläschen mit je 50 μl des in PBS/1%BSA vorverdünnten primären Antikörpers beträufelt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die gleiche Prozedur erfolgte anschließend mit dem sekundären Antikörper, wobei hier Hoechst zur Zellkernfärbung zugegeben wurde. Bei manchen Experimenten war zur Knock-Down-Kontrolle ein Nachfärben von p62 mit dem monoklonalen Mausantikörper (Abcam) erforderlich, obwohl bereits im ersten Färbeschritt ein Mausantikörper eingesetzt wurde. Die Nachfärbung erfolgte wie oben beschrieben, wobei die Inkubationszeiten des primären und sekundären Antikörpers jeweils auf dreißig Minuten reduziert wurden. Diese Nachfärbungen wurden nie quantitativ ausgewertet, sondern dienten lediglich der Identifizierung von Zellen mit erfolgreichem Knock-Down. Die abschließenden Waschschriffe beinhalteten drei Durchgänge mit PBS/1%BSA für insgesamt zehn Minuten sowie drei Durchgänge mit PBS für insgesamt zwanzig Minuten. Die Deckgläschen wurden mit Dako Fluorescence Mounting Medium auf Objektträger eingebettet und über Nacht im Kühlschrank getrocknet. Mikroskopiert wurde mit einem 100x Ölimmersionsoberktiv am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss); die Bilder wurden mit einer AxioCam HrM-Kamera (Zeiss) aufgenommen und mit der Axiovision Software 4.7 (Zeiss) analysiert.

4.6.2 Proximity-Ligation Assay von p62 und PML

Für den Proximity Ligation Assay (PLA) wurden die Zellen vor Fixierung entweder für 24 Stunden mit HPV16 Pseudoviren infiziert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Die Herstellung der Immunfluoreszenzpräparate erfolgte anschließend mithilfe des Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma) gemäß dem Herstellerprotokoll. Als primäre Antikörper wurden der p62-spezifische monoklonale Mausantikörper (Abcam) und der PML-spezifische polyklonale Kaninchenantikörper (Santa Cruz) verwendet. Die sekundären Antikörper, Blocklösung, Puffer, Enzyme und Oligonukleotide sind im Kit enthalten. Die Sekundärantikörper sind mit je einer kurzen Oligonukleotidkette versehen, die, wenn in räumlicher Nähe, zu einem kreisförmigen DNA-Strang verbunden werden. Dieser wird unter Einbau fluoreszierender Nukleotide amplifiziert, was das Signal verstärkt und detektierbar macht. Es entsteht also nur ein Fluoreszenzsignal, wenn die zwei untersuchten Proteine interagieren oder zumindest eng assoziiert (laut Hersteller maximal 40 nm) vorliegen.

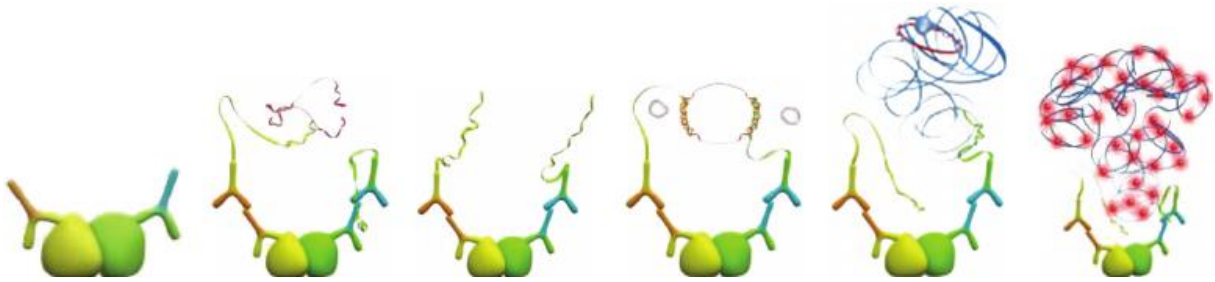


Abbildung 4.1: Funktionsweise des Proximity Ligations Assay (aus Bobrich et. al 2013 (67))

Für die Färbung der Zellkerne und die Einbettung der Deckgläschen auf Objektträgern war im Kit außerdem das Duolink® Mounting Media with DAPI enthalten. Mikroskopiert wurde mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss); die Bilder wurden mit einer AxioCam HrM-Kamera (Zeiss) aufgenommen und mit der freien Software ImageJ 1.42g analysiert.

4.7 Infektionsversuche

4.7.1 Luciferase-Messung

Im Pseudoviren-Infektionsversuch kann die Menge der nach Infektion im Zellkern transkribierten pseudoviralen DNA über die Expression des Reporterenzym Luciferase bestimmt werden. Dieses katalysiert in Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) und Magnesiumionen die oxidative Decarboxylierung von Luciferin, was in einer messbaren Lichtemission resultiert. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät,

mit den Autophagiemodulatoren für eine Stunde vorinkubiert oder unbehandelt gelassen und alle für 18 (Rapamyzin) beziehungsweise 24 (3-Methyladenin) Stunden infiziert. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Fixierung durch Einfrieren bei -20°C für mindestens zehn Minuten und die Lyse durch zwanzig Minuten Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit 250 µl 1:5 verdünntem Lysepuffer (Reporter Lysis Buffer, Promega) pro Well. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze mechanisch vom Boden des Wells abgelöst, in je ein Mikroreaktionsgefäß aufgenommen, gevortext und abzentrifugiert (13000/min für 3 Minuten). Vom Überstand wurden je 150 µl in ein Well der weißen LIA 96-Well Platte pipettiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte nach automatischer Zugabe von je 50 µl Luciferase-Assay-Puffer im Chemiluminometer Tristar LB941.

4.7.2 Zytotoxizitätstest über Laktatdehydrogenase-Messung

Eine verringerte Zellzahl oder Zellviabilität durch zytotoxische Effekte der Autophagiemodulatoren führt zu verringerten Lumineszenzwerten im Pseudoviren-Infektionsversuch. Zur Relativierung wurde die Konzentration von Laktatdehydrogenase (LDH), einem konstitutiv exprimierten Enzym, in jedem Zelllysat bestimmt. Dies geschah mithilfe des CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay ebenfalls am Chemiluminometer Tristar LB941.

4.8 SDS-Page

Die Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*) -Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) dient der Auftrennung eines Proteingemischs aus Zelllysat. Je nach Ladung und Größe durchlaufen die Proteine unterschiedliche Strecken in einer Gelmatrix im elektrischen Feld.

4.8.1 Herstellung der Gele

Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Abstandshalter und Klammern nah aneinander befestigt wurden. Zuerst wurden die Komponenten für das Trenngel gemischt, zwischen die Glasplatten gefüllt und polymerisierten dreißig Minuten bei Raumtemperatur. Ein schmaler Streifen wurde anschließend mit Sammelgel aufgefüllt, wobei ein eingesetzter Kamm Taschen für die Proben formte.

Tabelle 4.1: Komponenten von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Page

	<i>Trenngel 10,0%</i>	<i>Sammelgel 5,0%</i>
Aqua dest.	14,2 ml	8,8 ml
Acrylamid Stammlösung	11,7 ml	2,5 ml
	8,8 ml Lösung B	3,75 Lösung C
APS (Ammoniumpersulfat)	350,0 µl	150,0 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	17,5 µl	15,0 µl

4.8.2 Elektrophorese

Die Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und je nach Experiment weiter behandelt. Am Ende folgte ein Waschschrift mit PBS, woraufhin die Zellen je Well mit 70 µl 2,5x Laemmli +10% β-Mercaptoethanol in ein Mikroreaktionsgefäß aufgenommen wurden. Die Proben wurden anschließend für fünf Minuten bei 95°C im Heizblock gekocht und eingefroren. Die Glasplatten mit dem Gel wurden in die Elektrophoresekammer geklemmt, diese mit 1 l 1:10 verdünntem 10x SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt, die Proben durch erneutes Kochen für fünf Minuten aufgetaut, anzentrifugiert und vorsichtig in die Taschen des Gels aufgetragen. Eine weitere Tasche wurde mit dem Größenmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder, sowie für einen geraden Lauf der Proben rechts und links jeweils zwei Taschen mit reinem 2,5x Laemmli +10% β-Mercaptoethanol befüllt. Die Elektrophorese lief bei 200 V und 75 mA für etwa drei Stunden.

4.9 Western Blot

Der Western Blot folgt auf die SDS-Page. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden dabei durch erneutes Anlegen eines elektrischen Felds auf eine Membran übertragen. Das ermöglicht die Detektion von Proteinbanden durch Antikörper.

4.9.1 Proteintransfer

Dazu wurde das Gel mit den Proteinen auf die Amersham Protran™ 0,45 µm Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen zwei Filterpapieren und einem dünnen Schwamm auf jeder Seite in die Blot-Kassette geklemmt. Zur Verhinderung von Luftblasen wurde jede Schicht vorher in 1x Western Blot-Transferpuffer getränkt und vorsichtig glattgestrichen. Die Kassette wurde schließlich senkrecht in die mit 1x Western Blot-Transferpuffer befüllte Blot-Kammer eingehängt und der Western Blot für zwei Stunden bei

400 mA laufen gelassen. Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers erfolgte anschließend eine unspezifische Proteinfärbung der Membran mit Ponceau S-Lösung, die mit PBS schnell wieder ausgewaschen werden konnte.

4.9.2 Proteindetektion

Nach dem Blocken unspezifischer Bindestellen der Membran in PBS/5% Magermilch für zwanzig Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur wurde der primäre Antikörper, entsprechend in PBS/5% Magermilch verdünnt, zugegeben und die Membran darin über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschriffe mit PBS/0,1% Tween für je zehn Minuten, woraufhin der sekundäre HRP (*horse radish peroxidase*) -Antikörper 1:10000, ebenfalls in PBS/5% Magermilch verdünnt, zugegeben wurde. Nach einer Stunde Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur erfolgten die letzten Waschschriffe mit PBS/0,1% Tween und PBS (beides dreimal für je 10 Minuten). Die Belichtung und Entwicklung der Filme erfolgte in einer Dunkelkammer nach Inkubation der Membran mit 1 ml der beiden vermischten Komponenten des Western Lightning™ Plus-ECL-Kits zur Chemilumineszenz.

4.10 Co-Immunopräzipitation

Bei der Co-Immunopräzipitation kann nachgewiesen werden, dass zwei Proteine einen Komplex bilden. Ob sie direkt oder über zwischengeschaltete Proteine interagieren, lässt sich dabei allerdings nicht unterscheiden. Es wird ein spezifischer Antikörper an magnetische Beads gebunden, was die Separation dieses Zielproteins inklusive aller interagierenden Proteine aus dem Zelllysat ermöglicht. Die Zellen wurden dazu in 10 cm Petrischalen ausgesät und am nächsten Tag für 18 Stunden mit HPV16 Pseudoviren infiziert. Je Probe wurden 50 µl der magnetischen Dynabeads™ M280 Sheep anti-Mouse IgG vorbereitet, indem sie an einem magnetischen Eppiständer von der Trägerflüssigkeit separiert, diese abpipettiert und die Beads in 200 µl PBS/0,02% Tween resuspendiert wurden. Dieser Waschschriff wurde dreimal wiederholt, woraufhin jeder Probe der spezifische Antikörper, entsprechend in 200 µl PBS/0,02% Tween verdünnt, zugegeben wurde. Um die Antikörper an die Beads zu binden, wurde das Gemisch für mindestens zwanzig Minuten auf einem rotierenden Rad bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgte der Aufschluss der infizierten Zellen. Nach einem Waschschriff mit HEPES Puffer wurde je Petrischale 1 ml HEPES/1% Chaps zur Lyse zugegeben. Das Lysat wurde mechanisch mit einem Potter und schließlich durch drei

Zyklen à zwanzig Sekunden Ultraschall weiter aufgeschlossen. Als spätere Input Kontrolle wurden nun von jeder Probe 50 µl des Lysats in je 12,5 µl 5x Laemmli aufgenommen, fünf Minuten bei 95°C im Heizblock aufgeköcht und eingefroren. Die Beads mit den gebundenen Antikörpern konnten nun wieder von der PBS/0,02%Tween separiert und mit den Zelllysaten resuspendiert werden. Dieses Gemisch wurde bei 4°C über Nacht auf einem rotierenden Rad inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Separation der Beads vom Zelllysate, das daraufhin verworfen wurde, und die Beads wurden erneut drei Mal mit PBS/0,02%Tween gewaschen. Schließlich wurde der Waschpuffer abpipettiert, die Beads in je 60 µl 2,5x Laemmli +10% β-Mercaptoethanol resuspendiert und für fünf Minuten aufgeköcht, um Antikörper und gebundene Proteinkomplexe von den Beads zu trennen, die daraufhin abzentrifugiert wurden (13000/min für eine Minute). Nach erneuter Separation am magnetischen Eppiständer konnten die Proben ohne die Beads aufgenommen und in die Gel-Taschen für die SDS-Page (Kapitel 4.8) aufgetragen werden. Der Nachweis präzipitierter und co-präzipitierter Proteine erfolgte schließlich über einen Western Blot (Kapitel 4.9).

4.11 Statistische Methoden

Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Die Testung erfolgte mit einem Zweistichproben-t-Test für unverbundene Stichproben mit Microsoft Excel 2016. Stichproben mit signifikantem Unterschied zur Kontrollstichprobe sind in den Abbildungen mit einem Sternchen markiert. Alle signifikanten Ergebnisse beruhen, wenn nicht anders angegeben, auf mindestens drei unabhängigen Wiederholungen eines Experiments. Der Fehlerbalken in den Abbildungen stellt den *standard error of the mean* (SEM) dar.

5 Ergebnisse

5.1 p62 – ein proviraler Faktor der HPV-Infektion

Um neue zelluläre Faktoren im endosomalen Transport HPV-gefüllter Vesikel zu identifizieren, haben Mitarbeiter der AG Florin eine Endosomenpräparation durchgeführt. Dazu wurden HeLa-, HaCaT-Zellen und primäre Keratinozyten (*normal human epidermal keratinocytes*, NHEK) für vier und sieben Stunden infiziert; als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Die Zellen wurden aufgeschlossen, Zellkerne und unlösliche Bestandteile präpariert und der zytoplasmatische Überstand mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert (68). Die endosomalen Fraktionen wurden mittels quantitativer Massenspektrometrie untersucht. Dabei wurden etwa hundert Proteine identifiziert, deren Anreicherung über den Verlauf von vier und sieben Stunden nach Infektion zunahm. Bei etwa 25 dieser Proteine, darunter p62, hatte außerdem die siRNA-Depletion einen negativen Effekt auf die HPV-Infektion. p62 wird also an HPV-gefüllte Endosomen rekrutiert und scheint einen proviralen Effekt auf die HPV-Infektion zu haben (unveröffentlichte Ergebnisse der AG Florin).

5.2 p62 bildet einen Komplex mit den viralen Kapsidproteinen L1 und L2

Wenn durch Ansäuerung in multivesikulären Endosomen die Kapsidstruktur der Viren verändert und das virale Genom entpackt wird, kann der C-Terminus des minoren Kapsidproteins L2 die Endosomenmembran destabilisieren, durchdringen und mit zytosolischen Proteinen interagieren, was einen entscheidenden Schritt für den weiteren Infektionsweg darstellt (25, 69, 70). Wenn auch der Mechanismus der Rekrutierung von p62 an HPV-gefüllte Endosomen nicht bekannt ist, liegt doch die Vermutung nahe, dass p62 mit dem ins Zytosol ragenden L2 interagiert. Um das zu testen, habe ich, wie in Kapitel 4.10 beschrieben, eine Co-Immunopräzipitation mit p62 aus dem Lysat HPV-infizierter HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei wird das Zielprotein p62 mitsamt direkt oder indirekt interagierenden Proteinen präzipitiert. HeLa-Zellen wurden dazu in drei Petrischalen ausgesät und am nächsten Tag mit HPV16 Pseudoviren für 18 Stunden infiziert. Die Zellen wurden lysiert und das Zelllysat mit den an magnetische Beads gebundenen Antikörpern inkubiert. Verwendet wurde der monoklonale Mausantikörper p62 (Abcam). Als Kontrollen dienten zwei Proben. In einer wurde aus Mäuseserum gereinigtes Kontroll-IgG (Sigma) an die Beads gebunden, in der zweiten befanden sich

nur magnetische Beads ohne Antikörper. Das Präzipitat konnte ich schließlich, wie in Kapitel 4.8 und 4.9 erläutert, mittels SDS-Page und Western Blot auf L2 sowie auf das majore Kapsidprotein L1 untersuchen. Hierbei wurden der polyklonale Kaninchenantikörper K75 für L1 und der monoklonale Mausantikörper L2-1 für L2 verwendet.

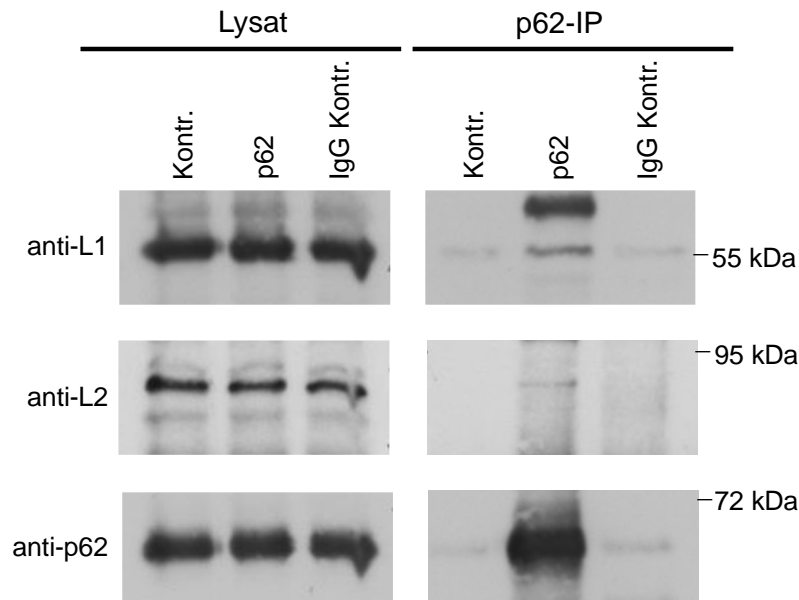


Abbildung 5.1: Western Blot nach Co-Immunopräzipitation von p62 mit L1 und L2 in HeLa-Zellen nach 18 Stunden Infektion.

Die linke Seite zeigt die Input-Kontrolle der drei Lysate; der Nachweis erfolgte mit den Antikörpern K75 (L1), L2-1 (L2) und dem p62-spezifischen monoklonalen Mausantikörper (Abcam). Die rechte Seite zeigt in der gleichen Probenreihenfolge die Präzipitate; v.l.n.r.: magnetische Beads ohne Antikörper (Kontr.), mit p62-Antikörper (p62), mit murinem Kontroll-IgG (IgG Kontr.). Es handelt sich um repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Western Blot zeigt deutlich, dass beide Kapsidproteine mit p62 co-präzipitieren. Lässt sich mit einer Co-Immunopräzipitation auch keine Aussage über die genaue Art der Interaktion und eventuelle Adapterproteine treffen, belegen diese Ergebnisse doch eindeutig, dass p62 mit L1 und L2 einen Komplex bildet. Da ein geringer Anteil L1 auch nach dem Kapsid-Disassembly beim L2/virale DNA Komplex verbleibt und mit in den Kern gelangt (23), ist es auch 18 Stunden nach Infektion hier noch nachweisbar.

5.3 Die funktionelle Bedeutung von p62 in der HPV-Infektion

Unveröffentlichte Ergebnisse der AG Florin zeigen für HeLa- und NHEK-Zellen, dass die siRNA-Depletion von p62 in einer reduzierten Infektionsrate resultiert. In p62-defizienten Zellen erreichen deutlich weniger Komplexe aus L2 und viraler DNA die PML

NBs im Zellkern, an denen die Transkription initiiert wird. Eine relevante Funktion von p62 für die Virusaufnahme in die Zelle und das Kapsid-Disassembly konnte schon in früheren Versuchen ausgeschlossen werden. Es bleibt also noch zu klären, über welchen Mechanismus p62 die Infektion, beziehungsweise das Erreichen der Komplexe aus L2 und viraler DNA an den PML NBs, begünstigt.

5.3.1 Zelluläre p62 Level nach Infektion

Da die bereits vorliegenden Ergebnisse p62 als einen proviralen Faktor in der HPV-Infektion definieren, stellt sich die Frage, ob zelluläre Level von p62 im Rahmen der HPV-Infektion beeinflusst, beziehungsweise hochreguliert werden. Dies sollte durch einen Western Blot nach SDS-Page, wie in den Kapiteln 4.8 und 4.9 erläutert, untersucht werden. HeLa- und HaCaT-Zellen wurden dazu für 24 Stunden mit einer HPV16 Pseudovirus- oder einer Kontroll-Präparation (mock) infiziert.

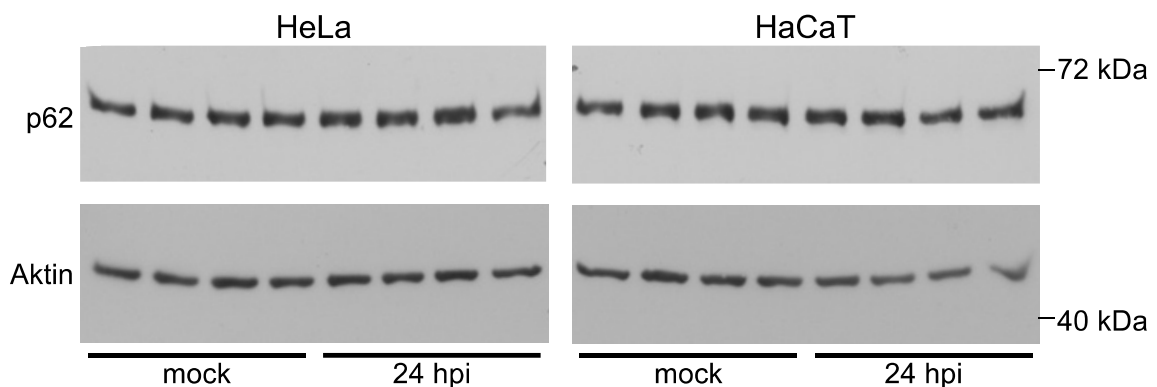


Abbildung 5.2: Das p62 Level bleibt während der HPV-Infektion unverändert

Western Blot nach SDS-Page mit je vier mock-infizierten (links) und vier infizierten (rechts) Proben von HeLa- und HaCaT-Zellen. Die Färbung erfolgte mit dem p62-spezifischen monoklonalen Mausantikörper (Abcam) und dem monoklonalen Mausantikörper β -actin (Sigma) als Ladekontrolle.

Der Western Blot zeigt deutlich, dass die Proteinmenge von p62 in HeLa- und HaCaT-Zellen durch die HPV-Infektion unbeeinflusst bleibt.

5.3.2 p62 Depletion

Um die Funktion von p62 in der HPV-Infektion genauer zu definieren, habe ich die p62-Translation mittels siRNAs, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, gehemmt und die Auswirkung der Proteindepletion auf bestimmte Schritte der Infektion untersucht. Dazu wur-

den HeLa- und HaCaT-Zellen jeweils für 48 Stunden mit dem Pool aus p62-spezifischer siRNA #1, #2, #3, und #4 (Sigma) inkubiert. Zur Knockdown-Kontrolle wurde ein Western Blot nach SDS-Page, wie in Kapitel 4.8. und 4.9 erläutert, angefertigt.

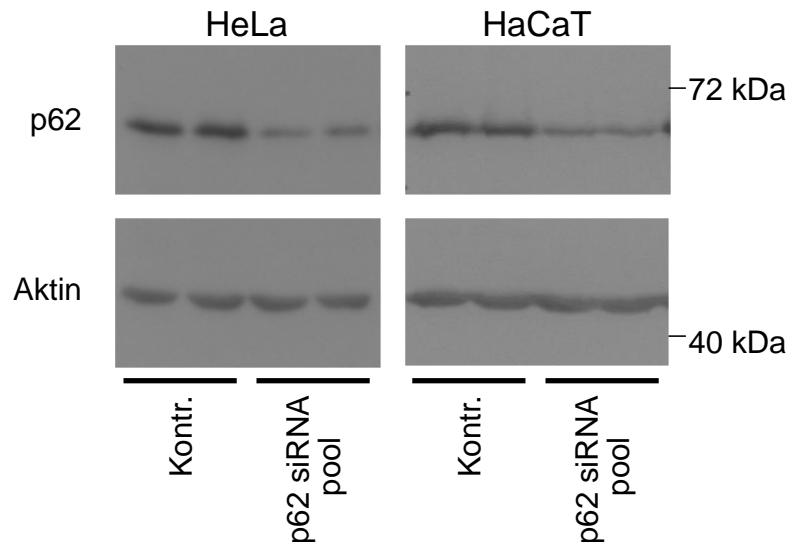


Abbildung 5.3: Der p62-spezifische siRNA-Pool reduziert zelluläre p62 Level

Western Blot nach SDS-Page zur Knockdown-Kontrolle von p62 gefärbt mit dem monoklonalen Mausantikörper (Abcam). Pro Zelllinie wurden je zwei Proben mit Kontroll-siRNA (links: Kontr.) und zwei mit dem p62 siRNA Pool (rechts) transfiziert. Zur Ladekontrolle wurde Aktin mit dem monoklonalen Mausantikörper β -actin (Sigma) angefärbt.

Der Western Blot zeigt deutlich eine Reduktion des zellulären p62-Levels nach 48 Stunden Inkubation mit dem siRNA Pool. Die Methode kann also eingesetzt werden, um Auswirkungen der p62-Depletion in HeLa- und HaCaT-Zellen zu untersuchen.

5.3.3 Keine Anreicherung der viralen DNA im Golgi nach p62 Depletion

Da die p62 Depletion zu einer verringerten Menge an L2 und viraler DNA im Zellkern der infizierten Zellen führt, habe ich untersucht, ob dies auf einen gestörten intrazellulären Transport zurückzuführen ist. Der Komplex aus L2 und viraler DNA nimmt beim Transport zum Kern den Weg über das Trans-Golgi-Netzwerk (56). Daher habe ich mir den Einfluss der p62-Depletion auf die Kolokalisation zwischen viraler DNA und Golgi in der Immunfluoreszenz angesehen. HeLa- und HaCaT-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 48 Stunden mit dem p62-spezifischen siRNA Pool oder einer Kontroll-siRNA inkubiert (Kapitel 4.4.) und anschließend mit EdU-markierten HPV16 Pseudoviren für zwölf Stunden infiziert. Die Färbung der fixierten Präparate erfolgte, wie in

Kapitel 4.6.1 beschrieben, mit dem EdU-Click ROTI® Kit (Carl Roth) für das virale Genom. Der Golgi wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper Golgin-97 (Thermo Fisher Scientific) und einem Fluorophor-markierten Sekundärantikörper (Thermo Fisher Scientific) detektiert.

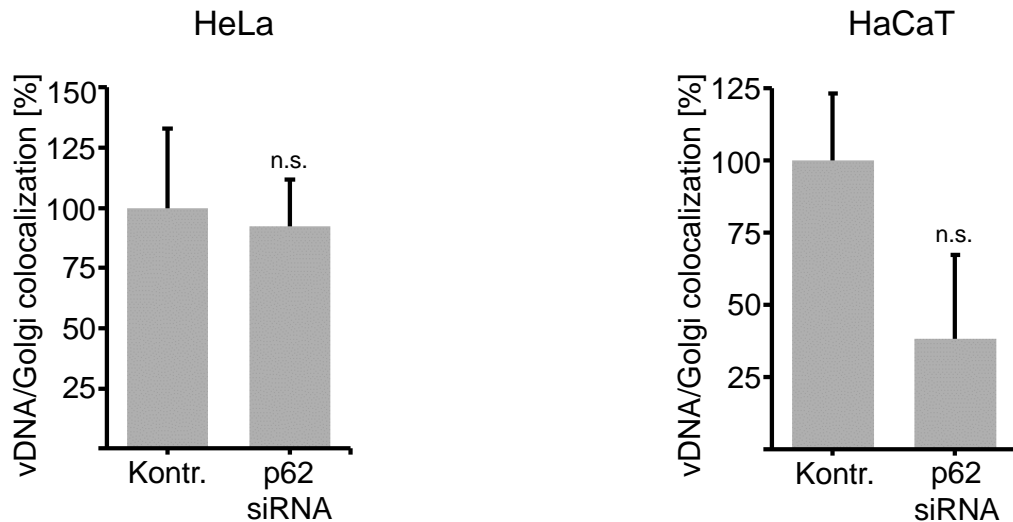


Abbildung 5.4: verminderte Lokalisation viraler DNA im Golgi nach p62-Depletion

Quantitative Analyse der Kolokalisation von viraler DNA und Golgi in HeLa- und HaCaT-Zellen nach 48 Stunden p62- oder Kontroll-siRNA-Behandlung und anschließender HPV16-Infektion für zwölf Stunden. Analysiert wurden je zwanzig Bilder pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten mit der Axiovision Software 4.7 (Zeiss). Die Kontrolle wurde auf hundert Prozent gesetzt. n.s. - nicht signifikant.

Die qualitative und die quantitative Analyse der Immunfluoreszenzbilder zeigen, dass die Kolokalisation zwischen viralem Genom und Golgi nach p62-Depletion in beiden Zelllinien verringert ist, wobei die Ergebnisse nicht signifikant sind. Eine Anreicherung des Komplexes aus L2 und viraler DNA in Golgistrukturen nach p62-Depletion lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse allerdings ausschließen. Diese Daten lassen vermuten, dass die p62 Depletion intrazelluläre Transportvorgänge, die vor dem Erreichen des Golgi Kompartiments stattfinden, beeinträchtigt.

5.3.4 Nach p62-Depletion reichert sich die virale DNA in autophagosomalen Strukturen an

Als möglicher Erklärungsansatz für die verringerte PML- und Golgi-Kolokalisation sowie für die verringerte Infektionsrate nach p62-Depletion kam ein gesteigerter autophagosomaler Abbau der Komplexe aus L2 und viraler DNA in Betracht. Es wurde bereits gezeigt, dass Viruspartikel nach dem Zelleintritt in Autophagosomen zu finden

sind (55). Um die genannte Hypothese zu überprüfen, habe ich erneut Immunfluoreszenzpräparate, wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, angefertigt und die Kollokalisierung zwischen viralem Genom und dem Autophagiemarker LC3 quantifiziert. HeLa- und HaCaT-Zellen wurden für 48 Stunden mit dem p62-spezifischen siRNA Pool oder einer Kontroll-siRNA inkubiert und anschließend mit EdU-markierten HPV16 Pseudoviren für acht Stunden infiziert. Während der acht Stunden Infektionszeit wurden die Zellen zusätzlich mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin inkubiert, um die Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen und damit deren Degradation zu unterbinden. Somit reichern sich gefüllte Autophagosomen an und ihr Inhalt bleibt detektierbar. Die Färbung erfolgte wieder mit dem EdU-Click ROTI Kit (Carl Roth) für das EdU-markierte virale Genom und mit dem monoklonalen Mausantikörper LC3 gefolgt von einem Fluorophor-markierten Sekundärantikörper (Thermo Fisher Scientific).

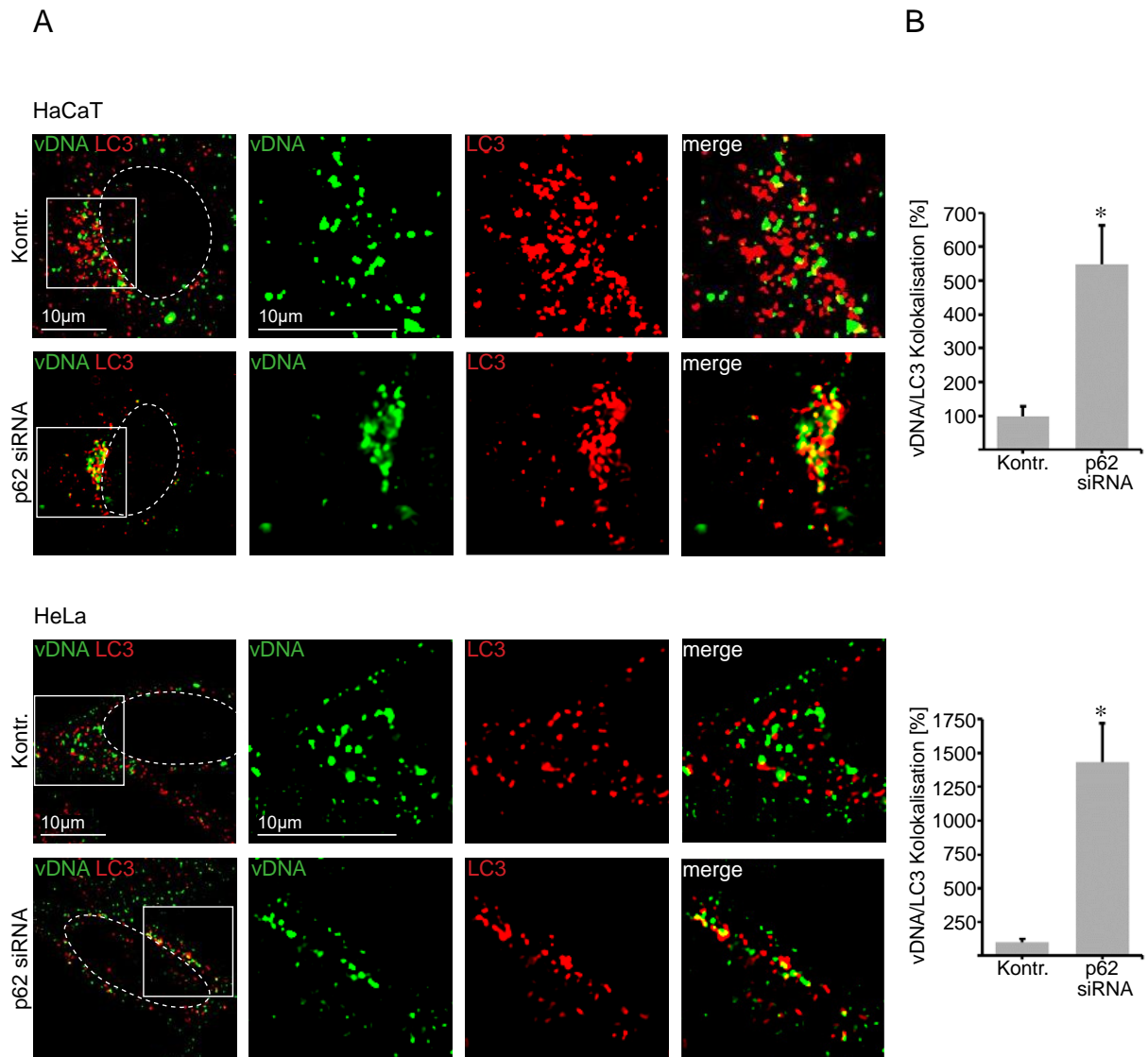


Abbildung 5.5: Erhöhte Kolokalisation von viralem Genom mit Autophagosomenmarker LC3 nach p62-Depletion

A Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen nach Behandlung mit Kontroll-siRNA (obere Reihe) oder p62-spezifischem siRNA Pool (untere Reihe) und anschließender Bafilomycin-Behandlung (1,25 µM) und Infektion mit HPV16 Pseudoviren. Zu sehen sind das virale Genom (grün), LC3 (rot) und kolokalisierende Bereiche (gelb). Der Kasten in der Übersichtsaufnahme links wird in den weiteren Bildern in Vergrößerung gezeigt. Es ist in beiden Zelllinien deutlich zu sehen, dass in p62-defizienten Zellen mehr virales Genom mit LC3 kolokalisiert als in den Kontrollzellen.

B Quantifizierung der kolokalisierenden (gelben) Pixel mit Axiovision Software 4.7 (Zeiss). Die Kontrollzellen wurden auf hundert Prozent gesetzt. Es wurden je zwanzig Bilder pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. In beiden Zelllinien zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Kolokalisation nach p62-Depletion ($p < 0,000012$ in HeLa-, $p < 0,000242$ in HaCaT-Zellen).

Dank Autophagiehemmung mit Bafilomycin zeigt dieses Experiment deutlich, dass die Komplexe aus L2 und viraler DNA sich in p62 defizienten Zellen vermehrt in autophagosomalen Strukturen anreichern und unter normalen Umständen vermutlich schnell degradiert würden. In einem ersten Anlauf dieses Experiments ohne Bafilomycin ließ sich virale DNA nämlich kaum in der Autophagie nachweisen (nicht gezeigt). Die Anwesenheit von p62 verhindert also im Umkehrschluss den Weg der Komplexe aus L2 und viraler DNA in die Autophagie und fördert den erfolgreichen Transport in den Zellkern.

5.3.5 In HeLa-Zellen führt die p62-Depletion zu gesteigerter L2-Degradation

Als Mechanismus der infektionsfördernden Wirkung von p62 lag nach den Immunfluoreszenzversuchen der Schutz vor autophagosomaler Degradation der L2/virale DNA Komplexe nah. Um das zu überprüfen, habe ich in einem Western Blot nach Infektion den L2-Gehalt von p62-defizienten Zellen mit Kontrollzellen verglichen. Dazu wurden HeLa- und HaCaT-Zellen für 48 Stunden mit dem p62-spezifischen siRNA Pool oder einer Kontroll-siRNA inkubiert und anschließend mit HPV16 Pseudoviren für 18 Stunden infiziert. Zur Bekräftigung der Autophagie als relevanten Abbauweg der L2/virale DNA Komplexe, wurde jeweils der Hälfte der Proben während der Infektionszeit der Autophagieinhibitor Bafilomycin (vgl. Kapitel 5.3.4) zugegeben. Anschließend konnten die Proben, wie in Kapitel 4.8 und 4.9 erläutert, mittels SDS-Page und Western Blot auf ihren L2-Gehalt untersucht werden. Gefärbt wurde dabei mit dem monoklonalen Mausantikörper L2-1 für L2, dem monoklonalen Mausantikörper p62 (Abcam) zur Knock-Down-Kontrolle sowie dem monoklonalen Mausantikörper β -actin (Sigma) zur Ladekontrolle.

Ergebnisse

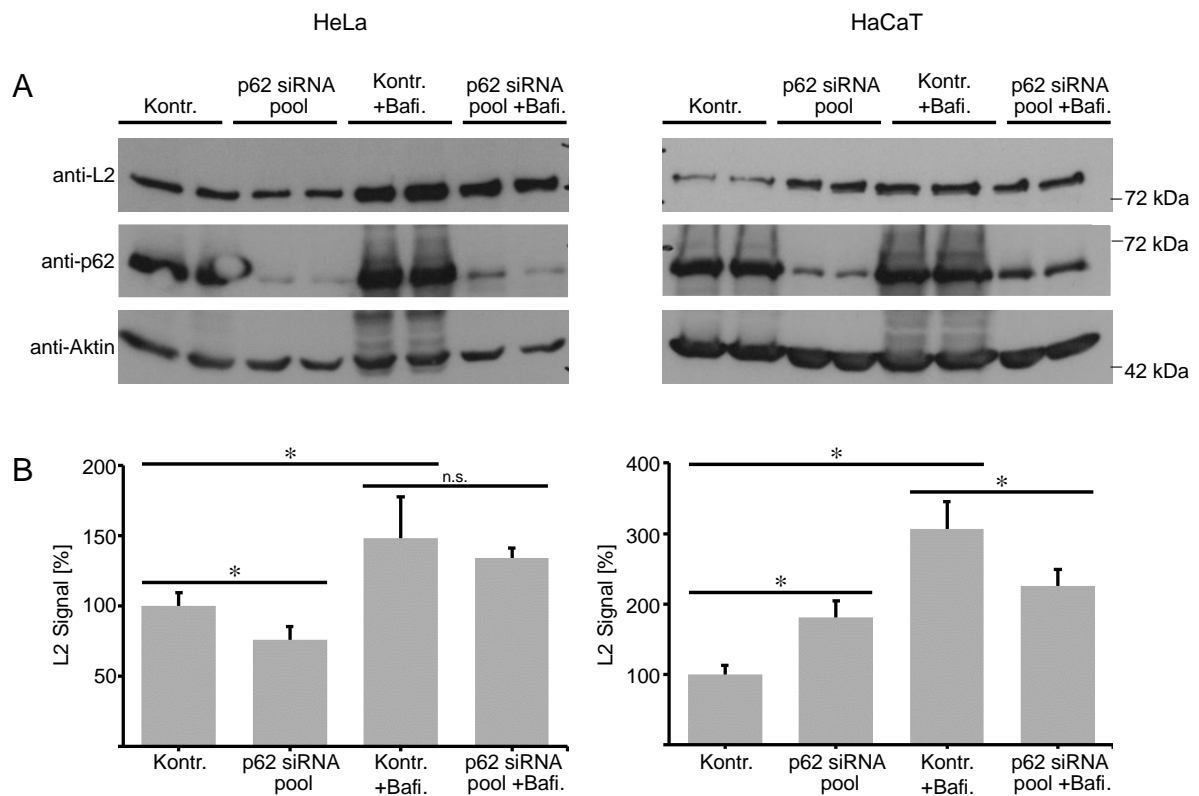


Abbildung 5.6: erhöhte Degradation von L2 nach p62-Depletion in HeLa-Zellen

A Repräsentativer Western Blot nach SDS-Page je mit Duplikaten von HeLa- und HaCaT-Zellen, die mit Kontroll-siRNA (Kontr.) oder p62-spezifischem siRNA Pool behandelt wurden. Während der anschließenden Infektion mit HPV16 Pseudoviren für 18 Stunden wurden den rechten vier Proben jeder Zelllinie Bafilomyzin (1,25 μ M, +Bafi.) zugesetzt. Gefärbt wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper L2-1 für L2, dem monoklonalen Mausantikörper p62 (Abcam) als Knock-Down-Kontrolle sowie dem monoklonalen Mausantikörper β -actin (Sigma) als Ladekontrolle.

B Quantifizierung des L2-Signals mit der freien Software ImageJ 1.42g. Es wurden je Kondition insgesamt 4 Proben (n=4) aus 2 unabhängigen Experimenten analysiert. Die verglichenen Proben sind durch horizontale Balken verbunden, wobei die jeweiligen Kontrollzellen auf hundert Prozent gesetzt wurden. * - signifikant zu jeweiligen Kontrollzellen (HeLa-Proben v.l.n.r. $p < 0,0107$, $p < 0,0209$, n.s. - nicht signifikant; HaCaT-Proben v.l.n.r. $p < 0,0016$, $p < 0,0001$, $p < 0,0224$).

In den Kontrollzellen beider Zelllinien war die Menge an L2 nach Bafilomyzinbehandlung signifikant erhöht. Ohne Bafilomyzinbehandlung verhielten sich HeLa- und HaCaT-Zellen gegensätzlich. Während bei den HeLa-Zellen die p62-Depletion wie erwartet zu einer signifikanten L2-Reduktion führte, war in p62-defizienten HaCaT-Zellen vermehrt L2 vorhanden. Auf die Bildung des Aktin-Quotienten wurde in diesem Experiment verzichtet, da es sich bei L2 um ein in definierter Menge zugesetztes Protein handelt. Im Gegensatz zu zellulären Proteinen wird es nicht proportional zur Zellzahl nachsynthetisiert, sondern im Gegenteil von mehr Zellen sogar schneller degradiert.

Die Aktinquantifizierung diente lediglich zur groben Kontrolle vergleichbarer Proben (nicht gezeigt). In HeLa-Zellen führt die p62-Depletion, wie nach den Immunfluoreszenzversuchen erwartet, zu einer verstärkten Degradation von L2. Dass der Unterschied nach Bafilomycinbehandlung geringer ausfällt, unterstützt die Vermutung der Autophagie als relevantem Degradationsweg der L2/virale DNA Komplexe: wird dieser blockiert, ist in Autophagosomen angereichertes L2 noch detektierbar. Die HaCaT-Zellen hingegen zeigten mit erhöhtem L2-Level nach p62-Depletion ein gegensätzliches Ergebnis. Das Modell des Schutzes vor autophagosomaler Degradation durch p62 lässt sich also auf HeLa-Zellen anwenden, bei den HaCaT-Zellen scheinen zusätzlich noch andere Mechanismen eine Rolle zu spielen.

5.3.6 Infektionsversuche nach Modulierung früher Autophagieschritte

Die Rolle der Autophagie in der HPV-Infektion ist noch nicht eindeutig geklärt (53-55). Um sie genauer zu untersuchen, habe ich getestet, wie sich eine Steigerung und im Gegensatz dazu eine Hemmung der Autophagie auf die Infektion auswirken. Die Inkubation von HeLa- und HaCaT-Zellen mit Rapamycin beziehungsweise 3-Methyladenin induzierte beziehungsweise hemmte die Bildung von Phagophoren, der Vorstufe von Autophagosomen (vgl. Abb. 6.1). Nach einer Stunde Vorinkubation mit den Modulatoren wurden die Zellen für 18 (Rapamycin) beziehungsweise 24 (3-Methyladenin) Stunden mit HPV16 Pseudoviren infiziert. Die kürzere Infektionsdauer der Rapamycin-Proben liegt in der stärker zytotoxischen Wirkung begründet. Die Messung erfolgte über einen Luciferase-basierten Infektionsversuch mit Relativierung an die Zellviabilität wie in Kapitel 4.7 beschrieben.

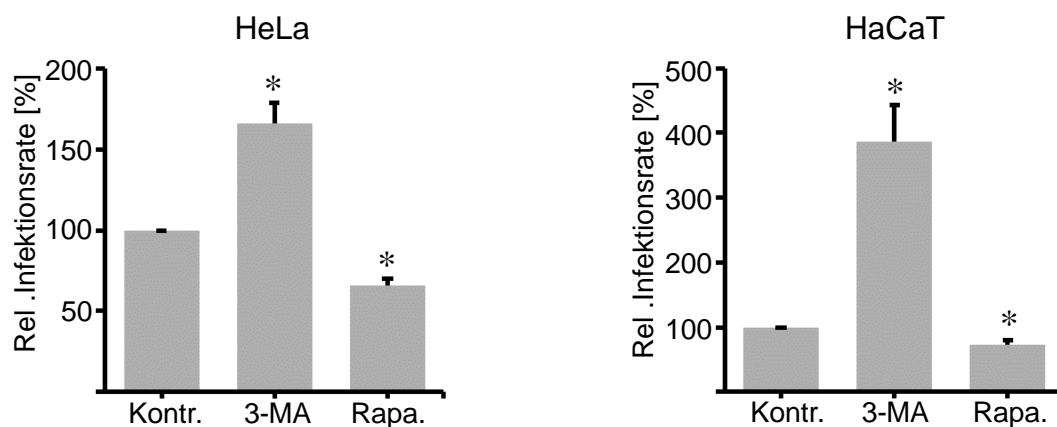


Abbildung 5.7: Autophagie wirkt der HPV-Infektionsrate entgegen

Auswertung des Infektionsversuchs nach Inkubation mit Rapamycin (Rapa, 50nM) oder 3-Methyladenin (3-MA, 5mM) in HeLa- und HaCaT-Zellen. Es wurden je fünf Proben pro Kondition aus drei

unabhängigen Experimenten einbezogen. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf hundert Prozent gesetzt. * - signifikant zu Kontrollzellen (HeLa-Proben: 3-MA $p < 0,0054$, Rapa. $p < 0,0009$; HaCaT-Proben: 3-MA $p < 0,0072$, Rapa. $p < 0,0282$).

Gemäß der Vorstellung der Autophagie als antiviralem Mechanismus gegen die HPV-Infektion resultiert die Hemmung der frühen Autophagie in einer deutlichen Erhöhung der Infektionsrate, wohingegen eine durch Rapamycin gesteigerte Bildung von Autophagosomen die Infektionsrate senkt.

Zusammenfassend lässt sich zu diesen Versuchen festhalten, dass ein wichtiger Aspekt der proviralen Funktion von p62 darin besteht, dem Transport der Komplexe aus L2 und viraler DNA in Autophagosomen entgegenzuwirken. Zumindest in HeLa-Zellen ließ sich auch die gesteigerte, vermutlich autophagosomale, Degradation nach p62-Depletion nachweisen. Die Infektionsversuche bestätigen nochmal, dass Autophagie tatsächlich einen zellulären Abwehrmechanismus gegen die HPV-Infektion darstellt.

5.4 Die HPV-Infektion induziert eine Assoziation von p62 mit PML NBs

Wie vorherige Immunfluoreszenz-Versuche der AG Florin zeigen, begleitet p62 den Komplex aus L2 und viraler DNA in den Nukleus, genauer gesagt zu PML NBs. Um den Einfluss der HPV-Infektion auf die Assoziation von p62 und PML-Protein im Kern genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, habe ich einen Proximity Ligation Assay (PLA) durchgeführt. Hierbei können zwei einzelne Proteine, vorausgesetzt sie liegen eng assoziiert vor, durch Amplifikation des Fluoreszenzsignals nachgewiesen werden. Dazu mussten spezielle Immunfluoreszenzpräparate, wie in Kapitel 4.6.2 erläutert, unter Verwendung des Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma) angefertigt werden. HeLa- und HaCaT-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag für 24 Stunden mit HPV16 Pseudoviren infiziert oder unbehandelt gelassen. Nach Fixierung konnten, wie in der normalen Immunfluoreszenz, der monoklonale Mausantikörper p62 (Abcam) und der polyklonale Kaninchenantikörper PML (Santa Cruz) als Primärantikörper eingesetzt werden. Die Sekundärantikörper, fluoreszierende Nukleotide und Enzyme (Ligase und Polymerase) zur Amplifikation des Signals sind alle im Kit des Herstellers enthalten. Die Zellkerne werden beim Einbetten der Gläschen durch das im Einbettmedium enthaltene DAPI angefärbt.

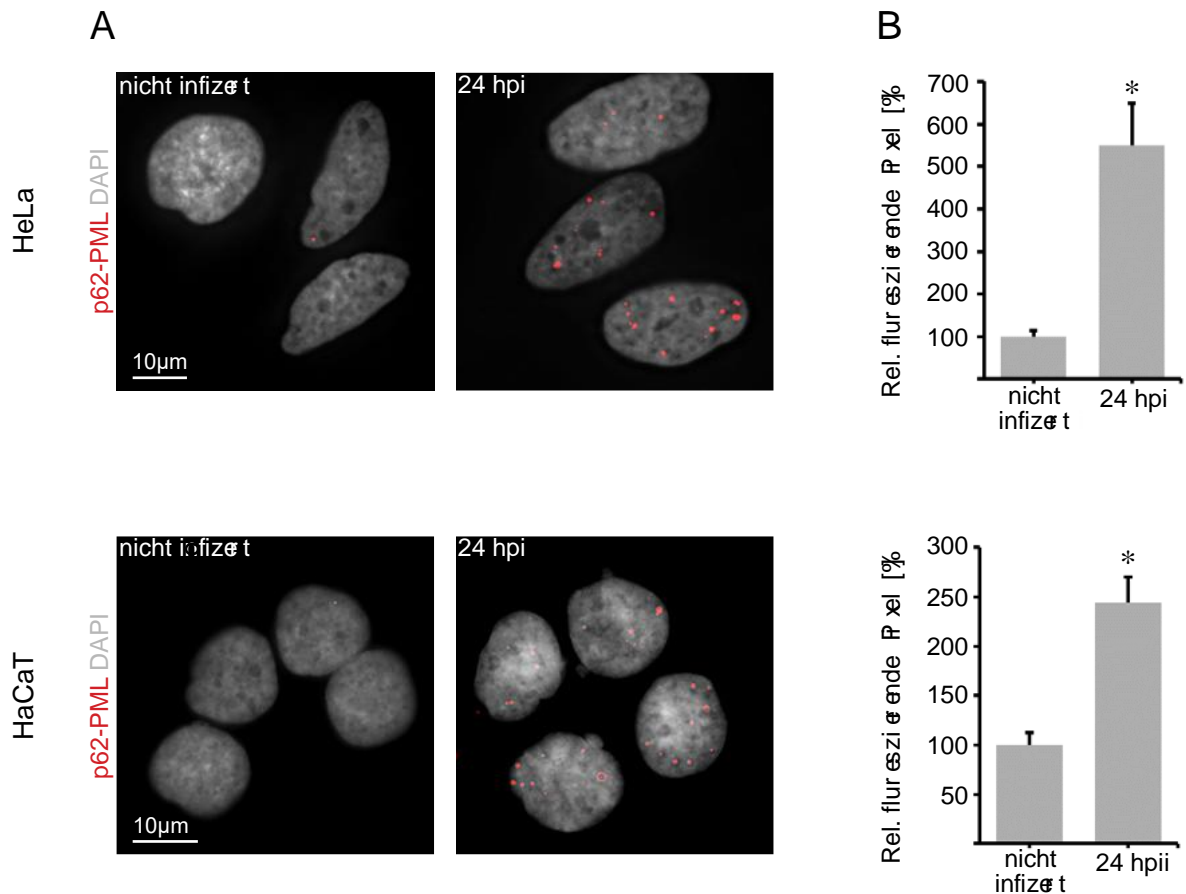


Abbildung 5.8: Die HPV-Infektion steigert die Assoziation von p62 und PML im Nukleus.

A Repräsentative Aufnahmen zeigen die Zellkerne (grau) und das PLA-Fluoreszenzsignal (rot) von p62 und PML in nicht infizierten HeLa und HaCaT-Zellen (links) oder nach 24 Stunden Infektion (rechts).

B Quantifizierung des PLA Signals mithilfe der ImageJ 1.42g Software durch Messung der Fluoreszenzpixel und Relativierung an den DAPI-Pixeln je Bild. Die Kontrollzellen wurden auf hundert Prozent gesetzt und es zeigte sich eine signifikante ($p < 0,000014$ für HeLa-; $p < 0,000003$ für HaCaT-Zellen) Erhöhung des Fluoreszenzsignals in den Zellen 24 Stunden nach Infektion. Ausgewertet wurden je zwanzig Bilder pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten.

Der Proximity Ligation Assay zeigt in beiden Zelllinien eine deutlich erhöhte Assoziation zwischen p62 und PML-Protein im Kern 24 Stunden nach Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen aus der normalen Immunfluoreszenz und belegen die enge räumliche Assoziation der beiden Proteine, die ursächlich auf die HPV-Infektion zurückzuführen ist.

5.5 Die antiviralen Proteine Sp100 und MYPOP nach HPV-Infektion

Die Überexpression von L2 induziert, vermutlich durch Degradationsprozesse, eine Reduktion des antiviralen Proteins Sp100 an den PML NBs (35). Da p62 ein Autophagie Adapter ist, habe ich untersucht, ob die HPV-Infektion durch Rekrutierung von p62 in die PML NBs ebenfalls eine Sp100 Degradation oder die Degradation des antiviralen MYPOP Proteins bewirken kann. Um die Proteinlevel infizierter und nicht infizierter Zellen im Western Blot zu vergleichen, wurden HeLa- und HaCaT-Zellen für je 24 Stunden mit HPV16 Pseudoviren oder einem Kontrollpräparat (mock) infiziert, lysiert, in der SDS-Page aufgetrennt und auf eine Membran transferiert, wie in Kapitel 4.8 und 4.9 erläutert. Gefärbt wurde mit dem Kaninchenantikörper Sp100 und dem monoklonalen Mausantikörper β -actin (Abcam) als Ladekontrolle. Eine weitere Färbung erfolgte mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen MYPOP (Abcam), einem Restriktionsfaktor der HPV-Transkription, der im Zuge der HPV-Onkogenese herunterreguliert wird (43).

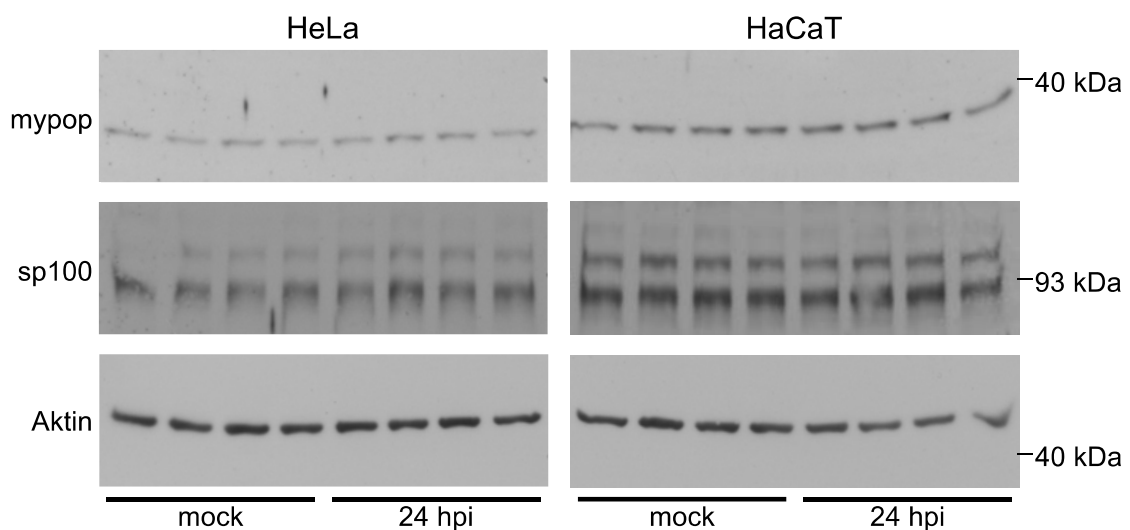


Abbildung 5.9: Die Level von Sp100 und MYPOP sind 24 Stunden nach Infektion nicht verändert.

Western Blot nach SDS-Page mit je vier für 24 Stunden Mock-infizierten (links) und vier infizierten (rechts) Proben von HeLa- und HaCaT-Zellen. Die Färbung erfolgte mit dem Sp100-spezifischen Kaninchenantikörper, dem MYPOP-spezifischen polyklonalen Kaninchenantikörper (Abcam) und dem monoklonalen Mausantikörper β -actin (Sigma) als Ladekontrolle.

Der Western Blot zeigt, dass die zelluläre Proteinmenge von Sp100 und MYPOP durch die HPV-Infektion nicht beeinflusst wird. Untersucht wurde hier das gesamte Zelllysate, wodurch eine eventuelle Relokalisation der Proteine innerhalb der Zelle im Zuge der Infektion nicht auszuschließen ist. Über die Funktion von p62 im Zellkern kann daher

vorerst nur spekuliert werden. Zusammenfassend kann allerdings gesagt werden, dass p62 die Viren vor dem Transport in Autophagosomen bewahrt, den infektiösen Komplex aus L2 und viraler DNA in den Kern begleitet und die Infektion unterstützt.

5.6 Der Einfluss von L2 auf p62 und die PML NBs

Um Effekte des minoren Kapsidproteins L2 zu untersuchen, kann L2 durch DNA-Transfektion, wie in Kapitel 4.5 erläutert, überexprimiert werden.

5.6.1 p62 und L2 in PML NBs

Eine weitere Fragestellung zu p62 betraf die mögliche Beeinflussung der Kolokalisation von L2 und PML-Protein. Dazu wurden HeLa- und HaCaT-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, am nächsten Tag mit dem Pool aus p62-spezifischer siRNA oder einer Kontroll-siRNA für 48 Stunden inkubiert und anschließend mit einem Expressionsplasmid für YFP-markiertes (*yellow fluorescent protein*) L2 weitere 24 Stunden inkubiert. Die Färbung der fixierten Immunfluoreszenzpräparate erfolgte mit dem monoklonalen Mausantikörper p62 (Abcam), dem polyklonalen Kaninchenantikörper PML (Santa Cruz) und Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern (Thermo Fisher Scientific), die dann, wie auch das fluoreszierende L2-YFP, unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss) detektiert werden konnten.

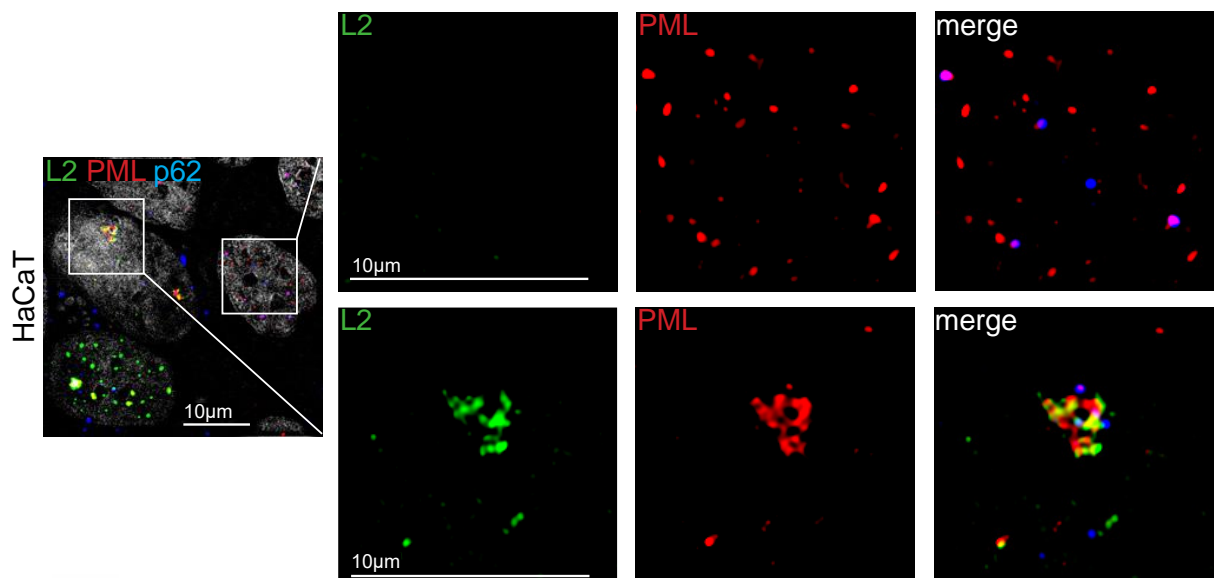


Abbildung 5.10: Kolokalisation von L2-YFP, p62 und PML in HaCaT-Zellen

Gezeigt ist eine repräsentative Aufnahme von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Kontroll-siRNA für 48 Stunden und Überexpression von L2-YFP für 24 Stunden in den beiden linken Zellen der Übersichtsaufnahme (links). Sichtbar sind L2-YFP (grün), PML (rot) und p62 (blau). Die Kästen in der

Übersichtsaufnahme sind auf den weiteren Bildern vergrößert dargestellt, wobei die obere Reihe eine nicht L2-YFP exprimierende Zelle, die untere eine L2-YFP exprimierende zeigt.

L2, PML und p62 kolokalisieren wie in der Abbildung gezeigt; allerdings scheint p62 die Kolokalisation von L2 und PML nicht zu beeinflussen, da die vergleichende Analyse nach p62-Depletion keine signifikanten Unterschiede hervorbrachte (Daten nicht gezeigt). Es fiel aber auf, dass sich häufig in L2-exprimierenden Zellen die Anordnung des PML-Proteins verändert darstellte. Wie auch in der beispielhaften Abbildung zu sehen, organisiert sich das Gerüstprotein der PML NBs in L2-exprimierenden Zellen zu einzelnen großen Kernkörperchen anstelle der Vielzahl kleinerer in nicht transfizierten Zellen.

5.6.2 L2 verändert die Morphologie der PML NBs

Um die in Kapitel 5.6.1 beschriebenen Veränderungen der PML-Morphologie zu quantifizieren, habe ich erneut Immunfluoreszenzpräparate, wie in Kapitel 5.6.1 erläutert, angefertigt. In diesem Fall genügte die DNA-Transfektion der HeLa- und HaCaT-Zellen, die mit einem L2 Expressionsplasmid wieder für 24 Stunden erfolgte. L2 war nun nicht mit YFP fusioniert, um unspezifische Effekte des YFP auszuschließen. Gefärbt wurde mit dem monoklonalen Mausantikörper L2-1 für L2 und dem monoklonalen Mausantikörper für p62 (Abcam) sowie Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern (Thermo Fisher Scientific). Zur quantitativen Auswertung wurde jeweils der Durchmesser des größten PML Aggregats einer L2-exprimierenden Zelle mit der Axiovision Software 4.7 (Zeiss) bestimmt und anhand dessen die PML-Morphologie als verändert oder unverändert klassifiziert, wobei der Schwellenwert des Durchmessers für HeLa-Zellen bei 1,5 μm und für HaCaT-Zellen bei 2,0 μm festgelegt wurde. Die Differenz der Schwellenwerte liegt darin begründet, dass die PML-Aggregate in HaCaT-Zellen generell etwas größer sind und auch ohne L2-Expression häufig über 1,5 μm Durchmesser aufwiesen.

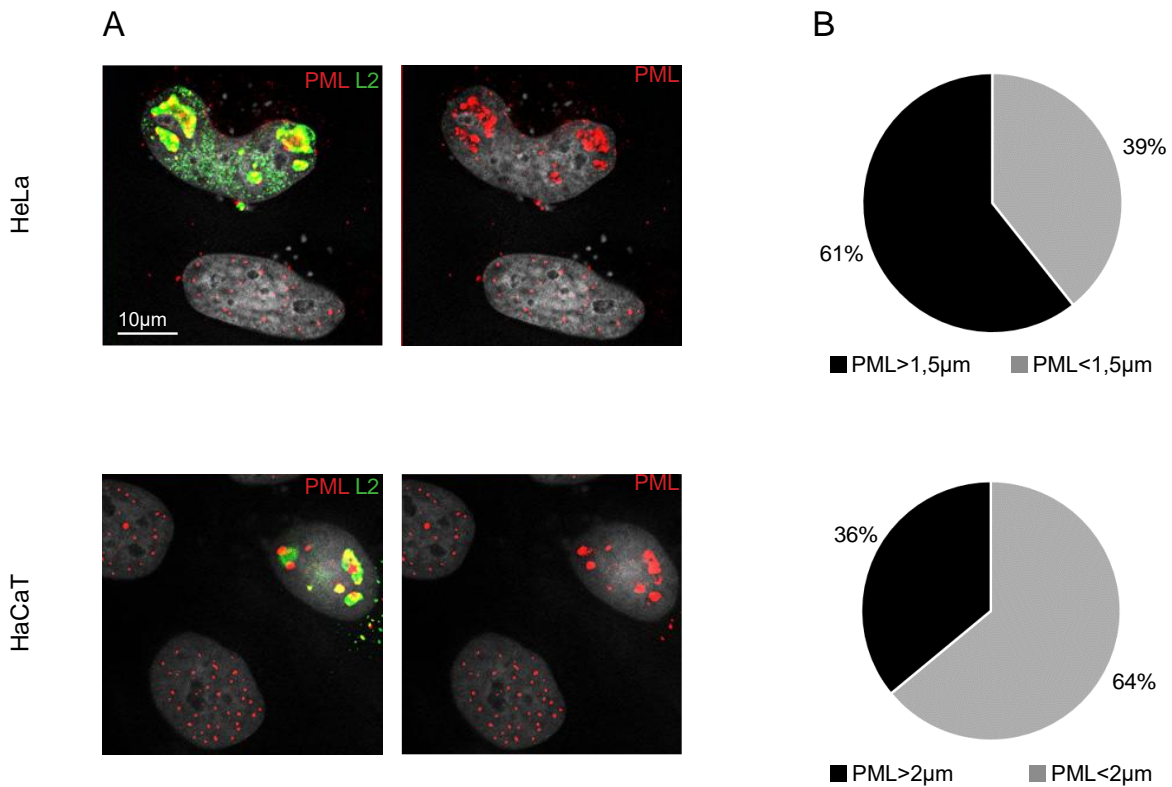


Abbildung 5.11: Überexprimiertes L2 induziert die Formierung großer PML-Aggregate.

A Repräsentative Aufnahmen von L2-transfizierten neben nicht transfizierten HeLa- und HaCaT-Zellen; L2 in grün und PML in rot gefärbt.

B Quantifizierung der veränderten PML-Morphologie anhand des größten PML-Durchmessers pro Zelle. Es wurden je fünfzig L2-exprimierende Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ausgewertet.

Die Quantifizierung bestätigte den Eindruck, dass L2-Expression das Muster des PML-Proteins im Kern von HeLa- und HaCaT-Zellen häufig dahingehend verändert, dass die zahlreichen kleinen PML NBs zu wenigen großen verschmelzen. Dies war in HeLa-Zellen bei etwa zwei Dritteln, in HaCaT-Zellen bei etwa einem Drittel der L2-exprimierenden Zellen der Fall.

5.6.3 L2 beeinflusst das Level des Autophagiemarkers LC3

Es ist bereits publiziert, dass durch die HPV-Infektion zwar einerseits die zelluläre Autophagie als Abwehrmechanismus gesteigert wird (53), andererseits die Viren inhibierend auf die Bildung von Autophagosomen wirken (54). Welche Anteile der Viruspartikel diesen Mechanismus in Gang setzen ist noch nicht bekannt; L2 könnte hier ein modulierender Faktor sein. Daher habe ich wie in Kapitel 4.6.1 erläutert Immunfluoreszenzpräparate von HeLa- und HaCaT-Zellen nach DNA-Transfektion mit einem L2 Plasmid für 24 Stunden angefertigt. Die Zellen wurden zusätzlich für sechs Stunden

mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin zur Blockierung des autophagosomalen Abbaus inkubiert. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen Mausantikörper für LC3 und dem monoklonalen Mausantikörper L2-1 für L2, gefolgt von Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern.

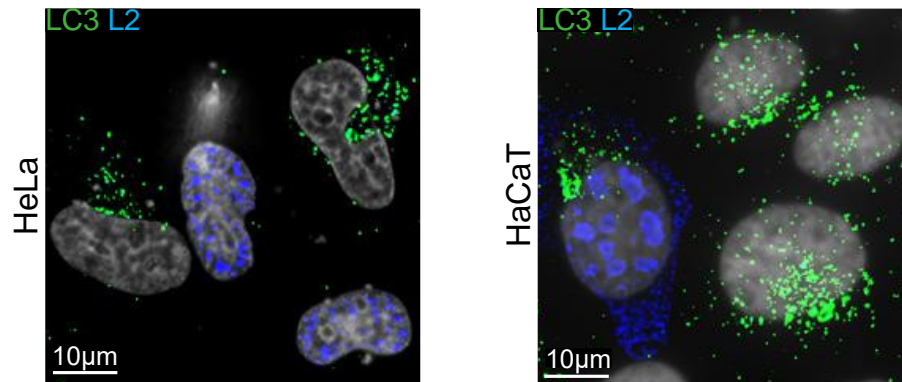


Abbildung 5.12: L2 exprimierende Zellen zeigen reduzierte LC3-Level.

Beispielhafte Aufnahmen von HeLa- und HaCaT-Zellen, gezeigt sind nur überexprimiertes L2 (blau) und der Autophagiemarker LC3 (grün). Die LC3-Level sind insgesamt erhöht nach Behandlung mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin (1,25 µM).

In der Immunfluoreszenz konnte ich beobachten, dass L2 überexprimierende Zellen oft ein reduziertes LC3-Level aufwiesen. Dies war sowohl in HeLa- als auch in HaCaT-Zellen der Fall. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass L2 zur Suppression der Autophagie beiträgt.

6 Diskussion

6.1 p62 bindet an eindringende HPV16-Partikel

Durch die Co-Immunopräzipitation von den beiden Kapsidproteinen L1 und L2 mit p62 konnte ich eine Komplexbildung zwischen dem Autophagie Adapter und eindringenden Viren nachweisen (Vgl. Kap. 5.2) und somit den Mechanismus des gemeinsamen Transports in den Zellkern näher charakterisieren. p62 wird an HPV-gefüllte Endosomen rekrutiert (unveröffentlichte Ergebnisse der AG Florin). Aufgrund des zugänglichen C-Terminus von L2 im Zytosol liegt die Vermutung von L2 als primärem Interaktionspartner nahe.

Dass L1 ebenfalls mitpräzipitiert wurde, ist vermutlich ein indirekter Effekt durch Bindung an L2. DiGiuseppe et al. hatten bereits vermutet, dass intakte L1 Kapsomere die L2/virale DNA Komplexe bis in den Kern begleiten (23). Die viralen Bestandteile verbleiben dabei in Membranvesikeln, die mitoseabhängig in den Kern gelangen (25, 71). Passend dazu haben Day et al. mithilfe verschiedener L1-Immunfluoreszenzantikörper und Elektronenmikroskopie ein neues Modell für den Kerneintritt viraler HPV-Partikel während der Auflösung der Kernmembran in der Mitose vorgeschlagen. Entgegen des bisher beschriebenen Kapsid-Disassembly konnten sie bis in den Kern intakte Viruspartikel von ursprünglicher Größe und Form nachweisen. Die Ansäuerung nach der Endozytose bewirkt demnach nur kleine Konformationsänderungen, die die Freilegung des zytosolischen L2-Anteils ermöglichen, wobei die Kapsidstruktur insgesamt erhalten bleibt. Passend dazu konnten sie auch deutlich mehr nukleäres L1 detektieren, als bisher angenommen (22). Insofern ist die Co-Präzipitation von L1 mit L2 und p62 auch nach 18 Stunden Virusexposition nicht überraschend.

Bezüglich L2 wäre es interessant zu untersuchen, ob es sich um eine direkte Interaktion mit p62 handelt, oder ob die Verbindung durch eine Komplexbildung über zwischengeschaltete Proteine zustande kommt. Gemäß dem Modell von Sun et al. liegt p62 in Kompartimenten vor, die zwar nicht membranbegrenzt, aber durch Phasenseparation vom restlichen Zytosol abgegrenzt sind. Innerhalb dieser können zur Degradation bestimmte ubiquitinylierte Proteine frei flottieren und dank erhaltener Konformation miteinander reagieren (48). Welche weiteren Proteine hier zusätzlich assoziiert sind und womöglich an der Verbindung zwischen p62 und L2 mitwirken, wurde bisher nicht untersucht (47). Vorerst sei festgehalten, dass p62 und L2 sehr wahrscheinlich

bereits im Zytosol in Verbindung treten, die p62-Kompartimente die virushaltigen Vesikel in sich aufnehmen und dies die Relokalisation von p62 mit den viralen Partikeln in den Zellkern zur Folge hat.

6.2 p62 schützt die viralen Partikel vor dem Weg in die Autophagie

Die Anreicherung der L2/virale DNA Komplexe an autophagosomalen Strukturen war in der Immunfluoreszenz p62-defizienter HeLa- und HaCaT-Zellen deutlich zu sehen (Vgl. Kap. 5.3.4). Ein wichtiger Aspekt der proviralen Funktion von p62 besteht also darin, dem Transport der Komplexe aus L2 und viraler DNA in Autophagosomen entgegenzuwirken. Dies steht in starkem Kontrast zur bisher bekannten Funktion von p62, Zellbestandteile zu autophagosomalen Strukturen zu rekrutieren. Gemäß unserem Modell würden in Anwesenheit von p62 mehr L2/virale DNA Komplexe den Kern erreichen und zu einer höheren Infektionsrate führen. Das bestätigen Ergebnisse der AG Florin von Immunfluoreszenz- und Infektionsversuchen nach p62-Depletion (unveröffentlichte Ergebnisse).

Zumindest für HeLa-Zellen ist bekannt, dass die p62 Depletion als solche die Zahl der Autophagosomen und den zellulären Autophagieumsatz nicht verändert (72). Der Arrest der autophagosomalen Degradation durch die Behandlung mit Bafilomycin (Vgl. Abb. 6.1) war für dieses Experiment unerlässlich. Nur so konnten die in Autophagosomen befindlichen L2/virale DNA Komplexe überhaupt detektiert werden, was in einem ersten Anlauf des Experiments ohne Bafilomycin misslang. Über die Hemmung der vakuolären ATPase verhindert Bafilomycin allerdings nicht nur die Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen, sondern hat noch weitere Effekte auf den Infektionsvorgang. Durch die beeinträchtigte Ansäuerung von Kompartimenten können die Konformationsänderungen des Kapsids und auch die Reifung von frühen zu späten Endosomen erschwert werden (60). In meinem Immunfluoreszenzversuch waren die L2/virale DNA Komplexe allerdings offensichtlich bis zu autophagosomalen Strukturen gelangt und der beobachtete Unterschied eindeutig auf p62 zurückzuführen, weshalb mögliche Nebeneffekte von Bafilomycin vermutlich zu vernachlässigen sind.

Es bleibt die Frage, über welchen Mechanismus L2 die Autophagie Adapter-Funktion von p62 zugunsten der viralen Infektion beeinflusst. An dem RNA-Virus Coxsackie B3 konnte gezeigt werden, dass die Bildung einer viralen Protease p62 durch Spaltung außer Kraft setzt (73). HPV scheint aber nicht nur die Autophagie Adapter-Funktion von p62 außer Kraft zu setzen, sondern von der Anwesenheit des zellulären Proteins

sogar zu profitieren. Einen vergleichbaren Nutzen der viralen Rekrutierung eines Autophagie-Proteins haben Montespan et al. bei Adenoviren beobachtet. Diese DNA-Viren enthalten ebenfalls eine Membran destabilisierende Sequenz, die im Gegensatz zu HPV aber den Austritt aus Endosomen ins Zytosol bewirkt. Benachbart liegt ein konserviertes PPxY-Motiv, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht. Darüber wird die zelluläre Ubiquitinligase Nedd4.2 rekrutiert und in ihrer Autophagie-Funktion limitiert, wodurch sich weniger Autolysosomen formen und der Transport der Viren entlang Mikrotubuli zum Zellkern erleichtert wird (74).

Denkbar für HPV wäre, dass p62 direkt oder indirekt über zwischengeschaltete Proteine an den zytosolischen Bereich von L2 bindet und dabei eine für Autophagie benötigte Bindestelle unzugänglich macht. Über welchen Autophagie Adapter und welche L2-Aminosäuresequenzen die Rekrutierung der L2/virale DNA Komplexe zu autophagosomalen Strukturen vermittelt wird, ist allerdings noch nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin an ein SIM von L2 bindet (75), was sowohl die Rekrutierung von p62 als auch von anderen Autophagie Adapter-Proteinen bedingen könnte. Ob die Markierung von L2 für autophagosomale Degradation aber überhaupt durch Poly-Ubiquitylierung erfolgt, wurde bisher nicht untersucht.

Auch eine stabilisierende Wirkung von p62 auf L2 mit Schutz vor proteasomaler Degradation des zytosolischen Anteils wäre möglich. Intaktes L2 steuert den erfolgreichen Transport in den Zellkern, während Degradationsprozesse es in seiner Funktion stark einschränken könnten und die viralen Transportvesikel eher in die Autophagie geleitet würden. Fest steht also, dass, entgegen der bisher bekannten Funktion von p62 als Autophagie Adapter, die direkte oder indirekte Bindung von p62 an L2 die viralen Partikel vor dem Weg in Autophagosomen schützt und somit die Infektion begünstigt.

6.3 p62 schützt die viralen Partikel vor autophagosomaler Degradation

In HeLa-Zellen bestätigte der Western Blot nach p62-Depletion die gesteigerte L2-Degradation (Vgl. Kap. 5.3.5). Gemäß dem vorgeschlagenen Modell auf Basis der Immunfluoreszenzversuche würden die endosomalen L2/virale DNA Komplexe ohne die protektive Funktion von p62 vermehrt der autophagosomalen Degradation zugeführt, weshalb weniger L2-Protein nachweisbar war.

Konsistent damit relativierte sich der Unterschied bei den HeLa-Zellen, sobald Bafilomycin eingesetzt wurde. Insgesamt war durch die Blockade des lysosomalen Abbaus deutlich mehr L2 nachweisbar, wobei die p62-Depletion bei blockierter Degradation nicht mehr zu einem signifikanten Unterschied führte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die autophagosomale Degradation tatsächlich der Weg ist, über den ein Großteil der L2/virale DNA Komplexe ohne den p62-vermittelten Schutz abgebaut werden.

Die gegensätzlichen Ergebnisse bei den HaCaT-Zellen lassen hingegen vermuten, dass noch weitere Mechanismen eine Rolle spielen. Um eventuelle Interaktionen während der im Vergleich zu den Immunfluoreszenzversuchen (Vgl. Kapitel 5.3.4) langen Infektionszeit (18 statt 8 Stunden) zu reduzieren, habe ich das Experiment mit einer auf acht Stunden verkürzten Infektionszeit wiederholt, was die hier gezeigten Unterschiede allerdings nur abschwächte (nicht gezeigt). Trotzdem lässt sich nicht ausschließen, dass in den 18 Stunden Infektionszeit p62-unabhängige Degradationsmechanismen in Kraft treten und speziell im Kern dort bereits vorhandenes L2 abgebaut wird. Die viralen Partikel in den p62-defizienten Zellen gelangen weniger in den Kern und wären möglicherweise noch vermehrt in Transportvesikeln nachweisbar

Ein Erklärungsansatz für die signifikante Verringerung des L2-Gehalts in p62-defizienten HaCaT-Zellen unter Bafilomycin wäre hingegen der Einfluss von p62 auf den proteasomalen Abbau. Da p62 selbst Substrat der Autophagie ist, müsste es bei einer Blockade durch Bafilomycin in der Zelle angereichert werden. Korolchuk et al. haben eine p62-abhängige Hemmung des proteasomalen Degradationsvorgangs gezeigt (72). Demnach könnte der in den Bafilomycin-Kontrollzellen erhöhte L2-Gehalt auf eine Hemmung des Proteasoms durch angereichertes p62 zurückzuführen sein. Während bei den HaCaT-Zellen also noch einige Fragen offenbleiben, unterstützen die Ergebnisse in HeLa-Zellen das bisherige Modell. Der Western Blot zeigt, dass p62 die viralen Partikel nicht nur vor dem Transport in autophagosomale Strukturen, sondern auch vor der tatsächlichen Degradation schützt.

6.4 Autophagie wirkt der HPV-Infektionsrate entgegen

Meine Infektionsversuche nach Hemmung und Induktion der Autophagie belegen konsistent mit allen bisherigen Veröffentlichungen die nachteilige Wirkung von Autophagie auf die HPV-Infektion (Vgl. Kap. 5.3.6). Sowohl der antiproportionale Zusammenhang zwischen Infektionsrate und basaler Autophagieaktivität verschiedener Zelllinien als

auch die frühe Autophagiehemmung durch HPV16 über die EGFR-vermittelte mTOR-Aktivierung unterstreichen diese Hypothese (53-55).

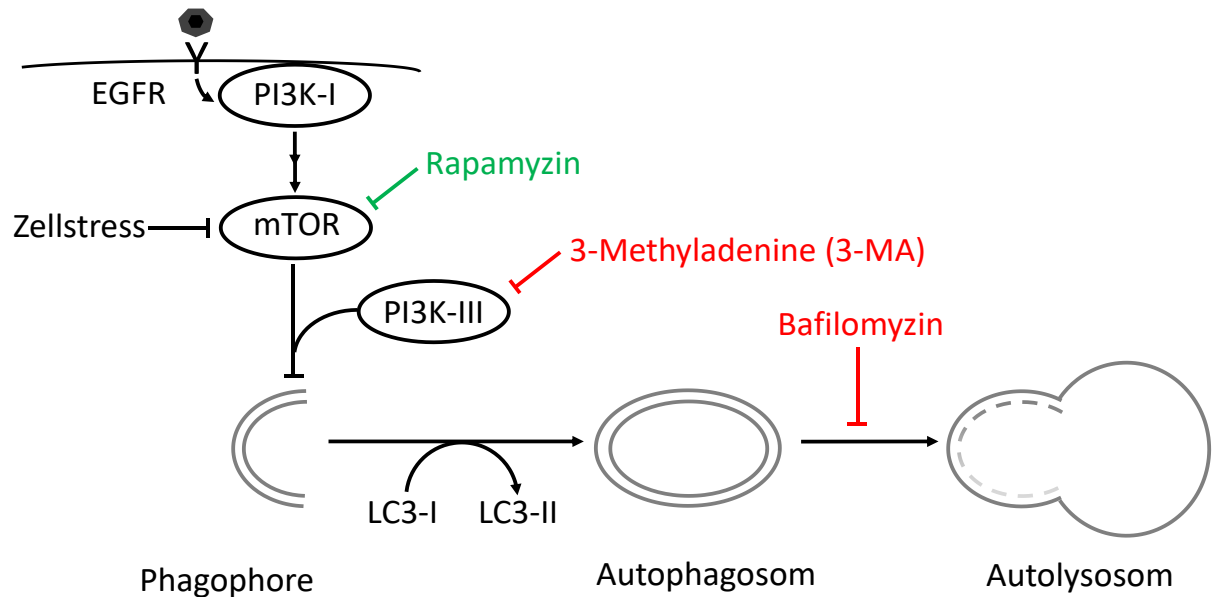


Abbildung 6.1: Wirkweise der Autophagiemodulatoren

Rapamycin induziert Autophagie über eine Hemmung von mTOR (62, 63), während 3-MA über eine Hemmung der Klasse III PI3-Kinase die Bildung verschiedener Komplexe von Atg-Proteinen zur Bildung von Autophagosomen unterbindet (64). Bafilomycin schließlich hemmt unter anderem die Degradation von Autophagosomen, indem es deren Verschmelzung mit Lysosomen blockiert (60, 61).

Im Gegensatz zu meinen Ergebnissen konnten Surviladze et al. unter Rapamycinbehandlung keine signifikante Reduktion der Infektionsrate beobachten (54). Ob dies auf meine Verringerung von Expositionszeit (18 Stunden statt 24 Stunden wie bei Surviladze et al.) und Rapamycin-Konzentration (50 mM statt 100 μ M wie bei Surviladze et al.) zurückzuführen ist, bleibt letztlich unklar. Zumindest konnte ich damit in meinen Versuchen die Zytotoxizität deutlich abmildern. Eine reduzierte Infektionsrate bei gesteigerter autophagosomaler Degradation, wie ich sie unter Rapamycin beobachtet habe, deckt sich jedenfalls mit der Vorstellung von Autophagie als zellulärer Abwehrfunktion.

Genauere Untersuchungen der Funktion von 3-MA durch Wu et al. haben gezeigt, dass sich bei längerer Behandlungszeit die Wirkung auf die Autophagie umkehrt. An verschiedenen Zelllinien, darunter auch HeLa-Zellen, konnte nach neun Stunden sowohl eine Erhöhung des Autophagiemarkers LC3-II als auch eine gesteigerte Protein-

degradation gezeigt werden. Ursächlich hierfür ist wohl die unterschiedlich lange Wirkung von 3-MA auf verschiedene Klassen der PI3K: die Autophagiehemmung über die Klasse III PI3K lässt nach einigen Stunden nach, während die Klasse I PI3K-Aktivierung durch 3-MA persistiert und Autophagie induziert (64). Während der Behandlungszeit von 24 Stunden in meinem Experiment müsste 3-MA demnach im Verlauf auch eine Autophagieinduktion bewirkt haben. Vermutlich ist aber speziell in den ersten Stunden der Virusexposition die Suppression der Autophagie entscheidend, um den viralen Partikeln den Weg in den Zellkern zu erleichtern, weshalb 3-MA insgesamt infektionsfördernd wirkt.

Eine weitere interessante Beobachtung von Wu et al. ist ein 3-MA-induzierter erhöhter p62-Gehalt in MEF-Zellen (*mouse embryonal fibroblasts*), der nicht etwa auf Akkumulation bei gehemmter Autophagie, sondern auf gesteigerter Expression von p62 beruht (64). Gemäß dem Modell der protektiven und proviralen Wirkung von p62 könnte die vermehrte Expression ein weiterer Grund für die deutliche Infektionssteigerung unter 3-MA sein.

Ausgehend von der Erkenntnis, dass die HPV-Infektion in der Zelle den Abwehrmechanismus Autophagie induziert, bleibt noch zu klären, wie dies vonstattengeht. Für das RNA-Virus Enterovirus 71 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Autophagie nach Infektion über bestimmte PML-Isoformen reguliert wird. Durch eine Virusprotease wird PML-Protein degradiert, was in HeLa-Zellen zu gesteigerter Autophagie führt (76). Dieses Modell lässt sich auf HPV zwar nicht übertragen, da Autophagie im Falle des Enterovirus 71 proviral wirkt. PML hat hingegen in der HPV-Infektion eine provirale Wirkung, weshalb es nach aktuellem Kenntnisstand nicht degradiert wird (35). Die dennoch nachweisbare gesteigerte Autophagie im Rahmen der zellulären Abwehr der HPV-Infektion (53) muss also über einen anderen Mechanismus initiiert werden.

In Zusammenschau von Immunfluoreszenz-, Infektionsversuchen und dem Western Blot ergibt sich für HPV und die Autophagie ein stimmiges Bild. Dank der Bindung von p62 gelangen die HPV-gefüllten Vesikel nicht zu autophagosomalen Strukturen, sondern in den Zellkern, um das virale Genom dort zu etablieren. Autophagosomen scheinen auch nicht, wie bei manch anderen Viren, als Transportmittel auf dem Weg zum Zellkern zu dienen. Dagegen spricht, dass die vermehrte autophagosomale Anreicherung bei p62-Depletion mit vermehrter Degradation von L2 und einer verringerten Infektionsrate (unveröffentlichte Ergebnisse der AG Florin) einhergeht. Schließlich wirkt

die Autophagie unabhängig von p62 negativ auf die Infektionsrate, während gehemmte Autophagie den viralen Partikeln den Transport in den Zellkern erleichtert.

6.5 p62 begleitet die L2/virale DNA Komplexe zu PML NBs im Zellkern

Immunfluoreszenzversuche der AG Florin zeigen nach HPV-Infektion eine starke p62-Relokalisation vom Zytoplasma in den Kern. Es kolokalisiert dort mit viralen Partikeln an PML NBs (unveröffentlichte Ergebnisse der AG Florin). Mithilfe des *Proximity Ligation Assay* (PLA) lässt sich deutlich spezifischer als mit herkömmlicher Kolokalisationsanalyse die räumliche Nähe von zwei Proteinen nachweisen, da nur bei Verbindung der Nukleotidketten an den beiden spezifischen Antikörpern ein Fluoreszenzsignal entsteht (Vgl. Kap. 4.6.2). Hierbei zeigte sich sowohl in HeLa- als auch in HaCaT-Zellen eine deutlich erhöhte Assoziation zwischen p62 und PML-Protein im Kern 24 Stunden nach Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Vgl. Kap. 5.4). Zusätzlich zur Kolokalisation belegt der PLA die enge räumliche Assoziation von p62 und PML, die an die von Souquere et al. elektronenmikroskopisch beobachtete Fusion von p62- mit PML-Körpern denken lässt (14).

p62 pendelt zwar kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Kern, ist aber im Kern nur nach Blockade des Kernexports vermehrt detektierbar (13, 14). Im Fall der HPV-Infektion akkumuliert p62 vermutlich durch die Bindung von L2 an PML NBs. Dass die Relokalisation von p62 in den Zellkern in solch starkem Ausmaß geschieht, könnte zusätzlich in der von Surviladze et al. beschriebenen virusinduzierten Signaltransduktion begründet sein (54). Über die Aktivierung des mTOR-Signalwegs wird neben zahlreichen zellulären Prozessen auch Autophagie gesteuert, was ebenfalls einen Einfluss auf die Lokalisation von p62 haben könnte. Auch die HPV-induzierte Phosphorylierung von p62 wäre hierbei weitere Untersuchungen wert. Hong et al. haben diese unter Expression der späten viralen Proteine E6 und E7 beobachtet (51). Ob die phosphorylierte Form von p62 auch schon in frühen Phasen der HPV-Infektion auftritt und womöglich eine Relokalisation in den Zellkern vermittelt, haben wir bisher nicht untersucht. Dass die Kolokalisation von überexprimiertem L2 und PML nach p62-Depletion nicht beeinträchtigt war (einmaliger Versuch, Daten nicht gezeigt), lässt vermuten, dass bei der Ansteuerung der PML NBs eher L2 führend ist und das gebundene p62 mitnimmt. L2 besitzt ein SUMO-Interaktionsmotiv (SIM), das entscheidend für die Lokalisierung an PML NBs ist (28). L2 kann darüber mit Ubiquitin interagieren und somit

als Bindeglied zwischen Ubiquitin enthaltenden p62-Kompartimenten und SUMO enthaltenden PML NBs fungieren.

Bisher konnte also die Funktion von p62 für den erfolgreichen Kerntransport der L2/virale DNA Komplexe durch Schutz vor autophagosomaler Degradation gezeigt werden. Die Relokalisation von p62 mit den viralen Partikeln in den Zellkern lässt weitere Funktionen für die Etablierung der Infektion vermuten. In einem ersten Versuch hat die HPV-Infektion am zellulären Gehalt der antiviralen Proteine Sp100 und MYPOP nichts geändert. Untersucht wurde hier aber das gesamte Zelllysate. Eine Relokalisation der Proteine vom Kern ins Zytoplasma, an der p62 beteiligt sein könnte, ist also nicht auszuschließen. Bekannt ist ein solcher Mechanismus bei der akuten Promyelozytenleukämie. Hier transportiert p62 das onkogene PML-RAR α Fusionsprotein von PML NBs ins Zytoplasma und vermittelt so die autophagosomale Degradation. PML-RAR α hemmt die Ausdifferenzierung der myeloischen Zellen. Klinisch wird All-trans-Retinsäure zur Anregung des p62-vermittelten Abbaus eingesetzt, wodurch die Leukozyten wieder zu funktionsfähigen Zellen ausdifferenzieren (77). Ob p62 auch im Kontext viraler Infektion Proteine aus dem Kern der Autophagie zuführt, ist bisher nicht bekannt. An der von Florin et al. nach L2-Überexpression beobachteten starken Degradation von Sp100 (35) wäre eine Beteiligung von p62 vorstellbar, da beide Proteine nach Infektion an PML NBs angereichert vorliegen. Es sind also weitere Untersuchungen notwendig, um mögliche Funktionen von p62 für die Schaffung guter Infektionsbedingungen im Kern aufzudecken.

6.6 L2 reorganisiert die Anordnung von PML Protein im Kern

Meine Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass die Überexpression von L2 eine Reorganisation des nukleären PML-Proteins von zahlreichen kleinen zu wenigen großen PML Aggregaten induziert, mit denen L2 stark kolokalisiert (Vgl. Kap. 5.6.2). Auch hier war der Effekt in HeLa-Zellen mit veränderter PML Morphologie mit zwei Dritteln der L2 exprimierenden Zellen deutlich stärker als in den HaCaT-Zellen.

Bei früheren Untersuchungen der AG Florin zu PML NBs wurde ein Einfluss der L2 Überexpression auf die Zusammensetzung der PML NBs gezeigt. Daxx wird zu PML NBs rekrutiert, während das antivirale Protein Sp100 über einen noch unbekanntem Mechanismus degradiert wird. Allerdings war weder der zelluläre PML-Gehalt beeinflusst (35), noch fiel ein verändertes PML Verteilungsmuster auf. Ursächlich könnten

methodische Unterschiede sein. Die Versuche wurden damals in HuTK⁻143B-Zellen und die Überexpression mithilfe rekombinanter Vacciniaviren durchgeführt (35).

PML NBs sind Orte viraler Transkription und Replikation und werden durch virale Proteine verändert. Für die meisten DNA-Viren wird den PML NBs eine antivirale Funktion zugesprochen (27). Am besten untersucht ist die Rolle der PML NBs bisher für Herpesviren. PML NBs formen sich im Kern um das durch Kernporen eingebrachte virale Genom des Humanen Herpesvirus-1 (HSV-1) (78). Verschiedene in den PML NBs enthaltene Proteine, darunter PML und Sp100, werden daraufhin durch das virale Protein ICP0 dem proteasomalen Abbau zugeführt, um die virale Transkription zu ermöglichen (79). Bei HPV handelt es sich im Vergleich zu Herpesviren um deutlich kleinere DNA-Viren, deren hauptsächlich aktives Protein während der Infektion L2 ist. L2 muss also selbst oder durch Rekrutierung zellulärer Proteine zahlreiche Funktionen, wie auch die Reorganisation der PML NBs zugunsten der viralen Infektion, übernehmen.

Für das Varizella Zoster Virus (VZV), ein weiteres Herpesvirus, wurde eine Abkapselung nukleärer Viruskapside durch sphärische Anlagerung von PML-Protein beschrieben. In der Immunfluoreszenz erinnert das PML Verteilungsmuster nach VZV-Infektion stark an das von mir nach L2 Expression beobachtete. Die Quantifizierung bestätigte nach VZV-Infektion eine verringerte Anzahl dafür größerer PML NBs, wobei der zelluläre PML-Gehalt unverändert blieb. Durch die als „Käfige“ (*cages*) bezeichnete PML-Anordnung konnten deutlich weniger Nukleokapside ins Zytoplasma ausgeschleust und weniger infektiöse VZV-Viren gebildet werden (80). Wenn auch die PML-Morphologie Ähnlichkeiten aufweist, könnte die Wirkung auf die virale Infektion gegensätzlicher kaum sein: während PML-Protein eindeutig restriktiv auf Infektion und Synthese verschiedener Herpesviren wirkt, hat es auf die Etablierung der HPV-Infektion einen positiven Einfluss (27, 31, 33).

Guion et al. haben den Vorgang der Kolokalisation viraler HPV-Partikel und PML NBs genauer untersucht. Sie konnten zeigen, dass das PML-Protein, wenn es nach der Mitose wieder in den Kern gelangt, über L2 zu viralen Partikeln rekrutiert wird (81). Entscheidend zur Kolokalisation ist hierbei das bereits von Bund et al. beschriebene SIM in L2 (28). Gemäß dem Modell von Guion et al. befinden sich die viralen Partikel zu diesem Zeitpunkt sogar noch in vesikulären Strukturen. Von PML-Protein umschlossen wäre die Freisetzung der viralen DNA dann geschützt vor Sensoren des zellulären

Immunsystems möglich (81). PML-Protein scheint also in der Lage, verschiedene virale Proteine im Kern zu erkennen und durch Bildung neuer PML NBs zu umschließen, wobei der Effekt je nach Virus sehr unterschiedlich sein kann.

Nach bisheriger Vorstellung war die Kolokalisation von PML-Protein und L2 eher das Ergebnis einer Ansteuerung bestehender PML NBs durch L2. Guion et al. beschreiben nun vergleichbar mit den Vorgängen bei Herpesviren eine Rekrutierung von PML, was auch die Reorganisation des PML-Proteins im Kern nach L2-Überexpression erklären würde. Das synthetisierte L2 gelangt dank eines NLS wieder in den Zellkern (41) und vorhandene PML NBs brechen ihre Struktur auf, damit sich PML-Protein an L2 anreichern kann. Durch die Überexpression ist außerdem insgesamt mehr L2-Protein in der Zelle vorhanden, weshalb vermutlich die PML Aggregate auffallend größer sind, als wir sie nach Infektion in der Immunfluoreszenz sehen. Die Tatsache, dass nicht in allen L2 exprimierenden Zellen die charakteristischen großen PML-Aggregate vorhanden waren, könnte an der von Zelle zu Zelle unterschiedlichen Transfektionseffizienz liegen.

Genau genommen ist die L2 Überexpression eher ein Modell für die Morphogenese-phase von HPV, in der massenhaft L1 und L2 zur Umschließung viraler DNA synthetisiert werden. Für die tatsächlichen Vorgänge während der Infektion ist dieses Experiment insofern nur eine Annäherung, liefert aber trotzdem wichtige Hinweise auf Funktionen von L2 und passt gut zu den neuen Ergebnissen von Guion et al. über die protektive Anreicherung von PML um nukleäres L2 (81).

6.7 L2 als mögliches Effektorprotein der Autophagiehemmung

Eine weitere Veränderung, die ich in der Immunfluoreszenz L2 überexprimierender Zellen beobachten konnte, war ein stark reduzierter Gehalt des Autophagiemarkers LC3-II (Vgl. Kap. 5.6.3). Es ist bereits publiziert, dass die Viren schon an der Zelloberfläche über EGFR eine Signalkaskade aktivieren, die schließlich über eine mTOR-Aktivierung Autophagie inhibiert (54). Ob und wie HPV zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion dem antiviralen Abwehrmechanismus Autophagie entgegenwirken kann, ist allerdings noch nicht bekannt. Da L2 durch seine Exposition im Zytoplasma zahlreiche Funktionen für die Infektion innehat, wäre eine Suppression der Autophagie ebenfalls vorstellbar. Es handelt sich bei meinen Immunfluoreszenzaufnahmen bisher nur um einen ersten Eindruck, der für eine statistisch valide Aussage der Wiederholung und

Quantifizierung bedürfte. Trotzdem sind die Bilder sehr eindrücklich und lassen einen Zusammenhang zwischen L2 und der Autophagieaktivität der Zelle vermuten.

Gut vorstellbar wäre ein indirekter Effekt über andere von L2 beeinflusste Proteine analog zu der von Chen et al. beschriebenen PML-vermittelten Autophagieregulation durch das Enterovirus 71 (Vgl. Kap. 6.4) (76). Bisher konnte zwar keine Veränderung der PML-Level durch L2 beobachtet werden, vorstellbar ist allerdings ein Effekt auf PML Isoformen, die durch den verwendeten Antikörper nicht erkannt werden. Ob außerdem die Reorganisation der PML NBs durch L2 mit Sp100-Degradation und Daxx-Rekrutierung (35) möglicherweise Autophagie beeinflusst oder ob L2 schon auf dem Weg zum Zellkern eine suppressive Wirkung entfaltet, wurde bisher nicht untersucht.

Nicht zuletzt zeigen unveröffentlichte Ergebnisse der AG Florin und mein PLA nach Infektion eine starke Relokalisation des Autophagie Adapters p62 vom Zytoplasma in den Kern. Man könnte vermuten, dass das fehlende p62 im Zytoplasma Autophagie erschwert, wobei bisher unter p62-Deletion eher eine Steigerung der Autophagie oder gar kein Effekt beobachtet wurden (46). Nicht zuletzt sei als Einschränkung meiner Hypothese genannt, dass ein verringerter LC3-II-Gehalt auch Ergebnis eines gesteigerten Autophagieumsatzes sein könnte, da es selbst mit degradiert wird. Auch in diesem Fall wäre es aber eine interessante neue Erkenntnis, dass L2 ursächlich für den Effekt ist. Es bleibt also offen und bedarf weiterer Untersuchungen, ob und wie L2 wirklich Autophagie supprimieren kann.

6.8 Modell der HPV-Infektion

Auf Basis meiner Ergebnisse und der aktuellen Literatur schlage ich folgendes Modell der HPV-Infektion vor:

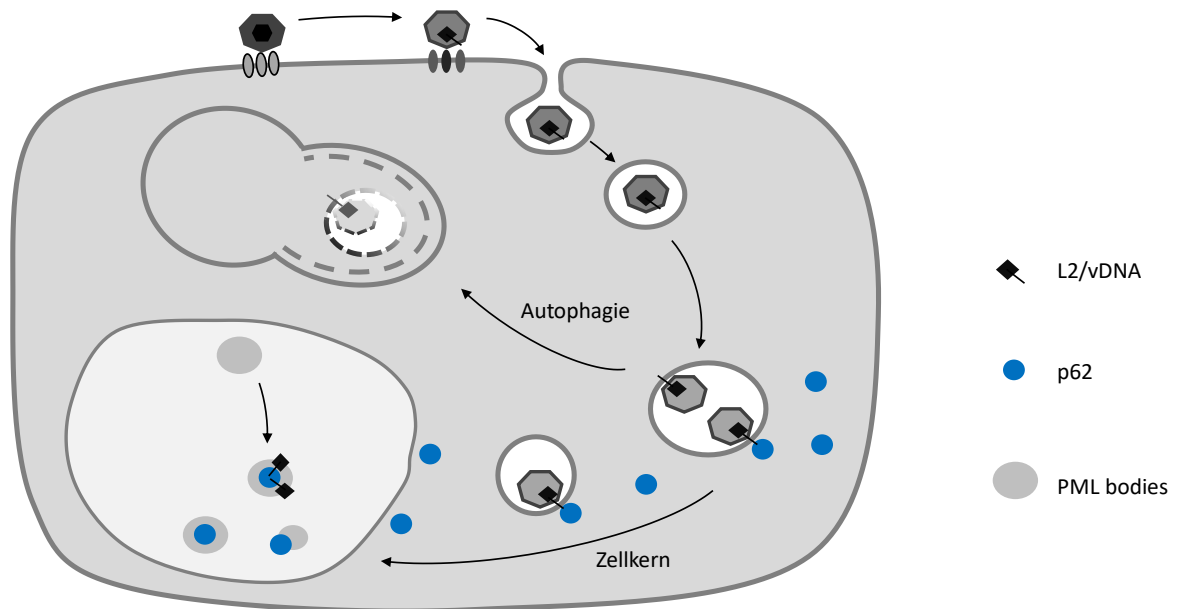


Abbildung 6.2: Modell der HPV-Infektion

Nach primärer Bindung und Endozytose gelangen die Viren über kleine Endozytosevesikel zu multivesikulären Endosomen. Ansäuerung induziert eine Konformationsänderung der Kapsidstruktur, woraufhin L2 die Endosomenmembran durchbricht und Kontakt zum Zytoplasma erlangt (11, 12). p62 kann nun mit L2 in Verbindung treten und seine protektive Wirkung entfalten. Die Anwesenheit von p62 bewahrt die viralen Vesikel über einen noch unbekanntem Mechanismus vor dem Transport in Autophagosomen und somit vor der Degradation. Weiterhin bleibt die Verbindung von L2 und p62 auf dem Transport der viralen Vesikel bis in den Zellkern bestehen, was eine starke p62-Relokalisation vom Zytoplasma in den Zellkern beinhaltet. Der Kerneintritt geschieht mitoseabhängig während die Kernmembran aufgelöst ist (25). Anschließend akkumuliert PML-Protein dank des SIM von L2 um die Komplexe aus L1, L2, viraler DNA und p62 und formt dort mit weiteren Proteinen wie Sp100 und Daxx PML NBs. Nach neueren Erkenntnissen handelt es sich zu diesem Zeitpunkt sogar noch um weitgehend intakte Viruspartikel in vesikulären Strukturen, die erst nach Akkumulation von PML freigesetzt werden (22, 81). PML hat eine provirale Wirkung auf HPV, indem es die frühe Transkription und Replikation der viralen DNA begünstigt (27, 31, 33). Ob

Diskussion

und inwiefern p62 zur Reorganisation der PML NBs beiträgt, indem es beispielsweise antivirale Proteine wie Sp100 der Degradation zuführt, bleibt noch zu klären.

7 Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine DNA-Viren, die Epithelzellen von Haut und Schleimhaut infizieren und dabei Warzen induzieren. Sogenannte Hochrisikotypen, vor allem HPV16 und 18, können bei persistierender Infektion zu maligner Transformation von Epithelzellen führen, was die häufigste Ursache von Gebärmutterhalskrebs ist. Der Infektionsweg der HP-Viren von der Zelloberfläche zum Kern ist noch nicht vollständig beschrieben (1, 11, 12). Neben zahlreichen anderen zellulären Proteinen scheint der Autophagie Adapter p62 hierbei eine Rolle zu spielen, was bisher nicht untersucht wurde. p62 rekrutiert zelluläre Bestandteile zu autophagosomalen Strukturen und vermittelt so deren Degradation (46). Auch gegen eindringende Viren kann Autophagie als Abwehrmechanismus fungieren, was für die HPV-Infektion bereits nachgewiesen (53-55) und in meinen Infektionsversuchen erneut bestätigt wurde (Vgl. Kap. 5.3.6). Entgegen der Erwartung konnte für p62 in dieser Arbeit allerdings eine provirale Funktion beobachtet werden, die im Gegensatz zur bisher bekannten Rolle als Autophagie Adapter steht. Durch p62-Depletionsversuche wurde gezeigt, dass sich in Abwesenheit von p62 deutlich mehr virale Partikel an autophagosomalen Strukturen anreichern und schließlich auch mehr des minoren Kapsidproteins L2 degradiert wird (Vgl. Kap. 5.3.4, 5.3.5). p62 bietet im Umkehrschluss den HP-Viren also Schutz vor autophagosomaler Degradation und begünstigt somit die Infektion, da mehr virale Partikel den Zellkern erreichen. Wie frühere Versuche der AG Florin zeigen, wird p62 an Virus gefüllte Endosomen rekrutiert (Vgl. Kap.5.1). Durch meine Co-Immunopräzipitation konnte ich eine Komplexbildung von p62 mit den beiden Kapsidproteinen L1 und L2 nachweisen (Vgl. Kap. 5.2). Die Interaktion geschieht vermutlich über den C-Terminus von L2, den einzigen im Zytoplasma exponierten Anteil der viralen Partikel (19). Zusätzlich zur protektiven Funktion auf dem Weg durchs Zytoplasma begleitet p62 die viralen Partikel in den Zellkern und reichert sich dort an PML nuclear bodies (*promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML NBs) an. PML NBs sind dynamische Proteinaggregate im Zellkern und unter anderem Ort viraler Transkription und Replikation, wobei viele Viren die Zusammensetzung der PML NBs verändern (27, 29, 30). Die deutlich gesteigerte enge räumliche Assoziation von p62 und PML-Protein nach der HPV-Infektion konnte ich mithilfe des *Proximity Ligation Assay* quantifizieren (Vgl. Kap.5.4). Dabei werden kurze Oligonukleotidketten an den p62- und PML-Antikörpern ringförmig ligiert und amplifiziert, wodurch ein sehr spezifisches Fluoreszenzsignal entsteht. Über Funktionen von p62 im Zellkern ist bisher allgemein wenig bekannt. Was sich bisher

nicht beobachten ließ, trotzdem aber vorstellbar wäre, ist eine Beteiligung von p62 an der Veränderung der Zusammensetzung von PML NBs nach HPV-Infektion. Diese ist nach aktuellem Kenntnisstand L2-induziert (35). In Immunfluoreszenzversuchen konnte ich nach Überexpression von L2 außerdem eine veränderte Morphologie des PML-Proteins beobachten und quantifizieren. Anstelle des punktförmigen Verteilungsmusters formten sich wenige große PML-Aggregate, die stark mit L2 kolokalisierten (Vgl. Kap. 5.6.2). Das passt gut zu neuen Untersuchungen von Guion et al., denen zufolge sich das PML-Protein neu um die in den Kern gelangten HPV-Vesikel strukturiert (81). Eine weitere Auffälligkeit nach L2-Überexpression bestand in einem stark verminderten Fluoreszenzsignal des Autophagiemarkers LC3 (Vgl. Kap. 5.6.3). Diese Beobachtung bedarf weiterer Untersuchung und Quantifizierung, da sie vermuten lässt, dass L2 neben vielen anderen Funktionen auch zur Suppression von Autophagie beiträgt. Somit konnten in dieser Arbeit verschiedene Aspekte des HPV-Infektionswegs genauer beschrieben werden, wobei speziell die überraschende provirale Funktion des Autophagie Adapters p62 hervorzuheben ist.

8 Summary (English version)

Human papilloma viruses (HPV) are small DNA viruses that infect epithelial cells of the skin and mucosa and thereby induce warts. So-called high-risk types, especially HPV16 and 18, can lead to persistent infections and malignant transformation of epithelial cells, which is the most common cause of cervical cancer. The infectious pathway from the cell surface to the nucleus has not been fully described yet (1, 11, 12). In addition to numerous other cellular proteins, the autophagy adapter p62 seems to play a role here, which had not been investigated so far. p62 recruits cellular components into autophagosomal structures and thus mediates their degradation (46). Autophagy can also act as a defense mechanism against invading viruses. This has already been proven for HPV infection (53-55) and has been confirmed by my infection assays (see chapter 5.3.6). In contrast to our expectations and the previously known role as autophagy adapter, p62 has shown to have a proviral function in HPV infection. siRNA assays have shown that in the absence of p62 significantly more viral particles accumulated at autophagosomal structures and that more of the minor capsid protein L2 is ultimately degraded (see chapters 5.3.4, 5.3.5). p62 therefore protects the HP virus against autophagosomal degradation and thus favors the infection as more viral particles reach the cell nucleus. Earlier experiments by the AG Florin showed that p62 is recruited to virus-filled endosomes (see chapter 5.1). My co-immunoprecipitation assay furthermore revealed that p62 forms a complex with the two capsid proteins L1 and L2 (see chapter 5.2). The interaction most likely occurs via the C-terminus of L2 which is the only part exposed to the cytoplasm (19). In addition to its protective function during trafficking p62 accompanies viral particles into the nucleus and accumulates at PML nuclear bodies (promyelocytic leukemia nuclear bodies, PML NBs). PML NBs are dynamic protein aggregates in the cell nucleus where many viruses locate at for transcription and replication. They thereby tend to change the composition of PML NBs (27, 29, 30). Concerning p62 I was able to quantify a significant increase of close association with PML protein after HPV infection using the Proximity Ligation Assay (see chapter 5.4). Thereby short oligonucleotide chains linked to closely bound p62 and PML antibodies are ligated and amplified, which results in a very specific fluorescence signal. Little is known about the functions of p62 in the cell nucleus. Whether p62 is involved in changing the composition of PML NBs after HPV infection or not is still conceivable. Furthermore, immunofluorescence experiments displayed an altered

Summary

morphology of PML protein after overexpression of L2. Instead of the punctiform distribution pattern fewer large PML aggregates formed that strongly colocalized with L2 (see chapter 5.6.2). These observations are supported by recent findings by Guion et al. indicating that PML protein is rearranged around invading virus-filled vesicles (81). Another conspicuous feature after L2 overexpression was a greatly reduced fluorescence signal of autophagy marker LC3 (see chapter 5.6.3). This observation requires further investigation and quantification since it suggests that L2 among its many other functions may also contribute to the suppression of autophagy. Overall, this work revealed various details of the infectious pathway of HPV whereby the surprising proviral function of autophagy adapter p62 should be emphasized.

9 Literaturverzeichnis

1. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molekulare Virologie. 3. Aufl. ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
2. zur Hausen H, de Villiers EM, Gissmann L. Papillomavirus infections and human genital cancer. *Gynecologic oncology*. 1981;12(2 Pt 2):S124-8.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
4. Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) ICD-10 C53 [Stand 12.06.2020] 2020 [cited 11.03.2021]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebraermutterhalskrebs_node.html.
5. Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). S3-Leitlinie Prävention des Zervixkarzinoms Version 1.0. 2017.
6. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & neck*. 2013;35(5):747-55.
7. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(29):3235-42.
8. Robert Koch Institut. Impfquoten von Kinderschutzimpfungen in Deutschland – aktuelle Ergebnisse aus der RKI-Impfsurveillance. *Epidemiologisches Bulletin*. 2020;32/33 2020.
9. Robert Koch Institut. Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV - Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. *Epidemiologisches Bulletin*. 2018;26/2018.
10. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. *Journal of Virology*. 2003;78(2):751-7.
11. DiGiuseppe S, Bienkowska-Haba M, Guion LG, Sapp M. Cruising the cellular highways: How human papillomavirus travels from the surface to the nucleus. *Virus Research*. 2017;231:1-9.
12. Florin L, Sapp M, Spoden GA. Host-cell factors involved in papillomavirus entry. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201(4):437-48.

13. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(8):5941-53.
14. Souquere S, Weil D, Pierron G. Comparative ultrastructure of CRM1-Nucleolar bodies (CNoBs), Intranucleolar bodies (INBs) and hybrid PML/p62 bodies uncovers new facets of nuclear body dynamic and diversity. *Nucleus*. 2015;6(4):326-38.
15. International Human Papillomavirus Reference Center. Human reference clones [last update 17.05.2019] 2019 [cited 2019 30.09.]. Available from: https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/.
16. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013;445(1-2):169-74.
17. Mikulicic S, Finke J, Boukhallouk F, Wustenhagen E, Sons D, Homsy Y, et al. ADAM17-dependent signaling is required for oncogenic human papillomavirus entry platform assembly. *eLife*. 2019;8.
18. Fast LA, Lieber D, Lang T, Florin L. Tetraspanins in infections by human cytomegalo- and papillomaviruses. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(2):489-97.
19. Campos SK. Subcellular Trafficking of the Papillomavirus Genome during Initial Infection: The Remarkable Abilities of Minor Capsid Protein L2. *Viruses*. 2017;9(12).
20. Mikulicic S, Florin L. The endocytic trafficking pathway of oncogenic papillomaviruses. *Papillomavirus research (Amsterdam, Netherlands)*. 2019;7:135-7.
21. Grassel L, Fast LA, Scheffer KD, Boukhallouk F, Spoden GA, Tenzer S, et al. The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. *Scientific reports*. 2016;6:32337.
22. Day PM, Weisberg AS, Thompson CD, Hughes MM, Pang YY, Lowy DR, et al. Human Papillomavirus 16 Capsids Mediate Nuclear Entry during Infection. *J Virol*. 2019;93(15).
23. DiGiuseppe S, Bienkowska-Haba M, Guion LG, Keiffer TR, Sapp M. Human Papillomavirus Major Capsid Protein L1 Remains Associated with the Incoming Viral Genome throughout the Entry Process. *Journal of Virology*. 2017;91(16).
24. DiGiuseppe S, Keiffer TR, Bienkowska-Haba M, Luszczek W, Guion LG, Muller M, et al. Topography of the Human Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 during Vesicular Trafficking of Infectious Entry. *J Virol*. 2015;89(20):10442-52.

25. DiGiuseppe S, Luszczek W, Keiffer TR, Bienkowska-Haba M, Guion LG, Sapp MJ. Incoming human papillomavirus type 16 genome resides in a vesicular compartment throughout mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(22):6289-94.
26. Aydin I, Villalonga-Planells R, Greune L, Bronnimann MP, Calton CM, Becker M, et al. A central region in the minor capsid protein of papillomaviruses facilitates viral genome tethering and membrane penetration for mitotic nuclear entry. *PLoS Pathog.* 2017;13(5):e1006308.
27. Everett RD, Chelbi-Alix MK. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie.* 2007;89(6-7):819-30.
28. Bund T, Spoden GA, Koynov K, Hellmann N, Boukhallouk F, Arnold P, et al. An L2 SUMO interacting motif is important for PML localization and infection of human papillomavirus type 16. *Cell Microbiol.* 2014;16(8):1179-200.
29. Scherer M, Stamminger T. Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J Virol.* 2016;90(13):5850-4.
30. Komatsu T, Nagata K, Wodrich H. The Role of Nuclear Antiviral Factors against Invading DNA Viruses: The Immediate Fate of Incoming Viral Genomes. *Viruses.* 2016;8(10).
31. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(39):14252-7.
32. Stepp WH, Meyers JM, McBride AA. Sp100 provides intrinsic immunity against human papillomavirus infection. *MBio.* 2013;4(6):e00845-13.
33. Bienkowska-Haba M, Luszczek W, Keiffer TR, Guion LGM, DiGiuseppe S, Scott RS, et al. Incoming human papillomavirus 16 genome is lost in PML protein-deficient HaCaT keratinocytes. *Cell Microbiol.* 2017;19(5).
34. Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, et al. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *The Journal of cell biology.* 1999;147(2):221-34.
35. Florin L, Schafer F, Sotlar K, Streeck RE, Sapp M. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology.* 2002;295(1):97-107.
36. Chelbi-Alix MK, de The H. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene.* 1999;18(4):935-41.

37. Kivipold P, Vosa L, Ustav M, Kurg R. DAXX modulates human papillomavirus early gene expression and genome replication in U2OS cells. *Virology journal*. 2015;12:104.
38. Porter SS, Stepp WH, Stamos JD, McBride AA. Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus. *Virus Res*. 2017;231:10-20.
39. McBride AA. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological chemistry*. 2017;398(8):919-27.
40. Stepp WH, Stamos JD, Khurana S, Warburton A, McBride AA. Sp100 colocalizes with HPV replication foci and restricts the productive stage of the infectious cycle. *PLoS Pathog*. 2017;13(10):e1006660.
41. Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013;445(1-2):175-86.
42. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*. 2010;117(2 Suppl):S5-10.
43. Wustenhagen E, Boukhallouk F, Negwer I, Rajalingam K, Stubenrauch F, Florin L. The Myb-related protein MYPOP is a novel intrinsic host restriction factor of oncogenic human papillomaviruses. *Oncogene*. 2018;37(48):6275-84.
44. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell*. 2009;137(6):1001-4.
45. Moscat J, Karin M, Diaz-Meco MT. p62 in Cancer: Signaling Adaptor Beyond Autophagy. *Cell*. 2016;167(3):606-9.
46. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett*. 2016;21:29.
47. Herhaus L, Dikic I. Ubiquitin-induced phase separation of p62/SQSTM1. *Cell Res*. 2018;28(4):389-90.
48. Sun D, Wu R, Zheng J, Li P, Yu L. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell Res*. 2018;28(4):405-15.
49. Rockel TD, Stuhlmann D, von Mikecz A. Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 22):5231-42.
50. Zimmermann C, Krämer N, Krauter S, Strand D, Sehn E, Wolfrum U, et al. Autophagy interferes with human cytomegalovirus genome replication, morphogenesis, and progeny release. *Autophagy*. 2020:1-17.

51. Hong S, Li Y, Kaminski PJ, Andrade J, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses Requires the ATR/p62 Autophagy-Related Pathway. *mBio*. 2020;11(4).
52. Jackson WT. Viruses and the autophagy pathway. *Virology*. 2015;479-480:450-6.
53. Griffin LM, Cicchini L, Pyeon D. Human papillomavirus infection is inhibited by host autophagy in primary human keratinocytes. *Virology*. 2013;437(1):12-9.
54. Surviladze Z, Sterk RT, DeHaro SA, Ozbun MA. Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *J Virol*. 2013;87(5):2508-17.
55. Ishii Y. Electron microscopic visualization of autophagosomes induced by infection of human papillomavirus pseudovirions. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;433(4):385-9.
56. Lipovsky A, Popa A, Pimienta G, Wyler M, Bhan A, Kuruvilla L, et al. Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(18):7452-7.
57. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*. 1988;106(3):761-71.
58. Leder C, Kleinschmidt JA, Wiethe C, Muller M. Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. *J Virol*. 2001;75(19):9201-9.
59. Schneider MA, Scheffer KD, Bund T, Boukhallouk F, Lambert C, Cotarelo C, et al. The transcription factors TBX2 and TBX3 interact with human papillomavirus 16 (HPV16) L2 and repress the long control region of HPVs. *J Virol*. 2013;87(8):4461-74.
60. Bayer N, Schober D, Prchla E, Murphy RF, Blaas D, Fuchs R. Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol*. 1998;72(12):9645-55.
61. Guo X, Dong Y, Yin S, Zhao C, Huo Y, Fan L, et al. Patulin induces pro-survival functions via autophagy inhibition and p62 accumulation. *Cell death & disease*. 2013;4:e822.
62. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004;18(16):1926-45.
63. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*. 2007;6(6):458-71.

64. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(14):10850-61.
65. Volpers C., Sapp M., Snijders P. J., Walboomers J. M., Streeck R. E. Conformational and linear epitopes on virus-like particles of human papillomavirus type 33 identified by monoclonal ab to the minor capsid protein L2. *Journal of General Virology*. 1995;76:2661-7.
66. Bergsdorf C, Beyer C, Umansky V, Werr M, Sapp M. Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. *FEBS Letters*. 2003;536(1-3):120-4.
67. Bobrich MA, Schwabe SA, Brobeil A, Viard M, Kamm M, Mooren FC, et al. PTPIP51: a new interaction partner of the insulin receptor and PKA in adipose tissue. *Journal of obesity*. 2013;2013:476240.
68. Scheffer KD, Popa-Wagner R, Florin L. Isolation and characterization of pathogen-bearing endosomes enable analysis of endosomal escape and identification of new cellular cofactors of infection. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013;1064:101-13.
69. Kamper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, et al. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *J Virol*. 2006;80(2):759-68.
70. Popa A, Zhang W, Harrison MS, Goodner K, Kazakov T, Goodwin EC, et al. Direct binding of retromer to human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 mediates endosome exit during viral infection. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):e1004699.
71. Calton CM, Bronnimann MP, Manson AR, Li S, Chapman JA, Suarez-Berumen M, et al. Translocation of the papillomavirus L2/vDNA complex across the limiting membrane requires the onset of mitosis. *PLoS Pathog*. 2017;13(5):e1006200.
72. Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Molecular cell*. 2009;33(4):517-27.
73. Shi J, Wong J, Piesik P, Fung G, Zhang J, Jagdeo J, et al. Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NFkB signaling. *Autophagy*. 2013;9(10):1591-603.
74. Montespan C, Wiethoff CM, Wodrich H. A Small Viral PPxY Peptide Motif To Control Antiviral Autophagy. *J Virol*. 2017;91(18).
75. Bund T. Characterization of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Capsid-Cell Interactions During Viral Cell Entry. Mainz: Johannes Gutenberg University; 2012.

76. Chen D, Feng C, Tian X, Zheng N, Wu Z. Promyelocytic Leukemia Restricts Enterovirus 71 Replication by Inhibiting Autophagy. *Front Immunol.* 2018;9:1268.
77. Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y, et al. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RAR α oncoprotein. *Autophagy.* 2014;7(4):401-11.
78. Everett RD, Murray J. ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol.* 2005;79(8):5078-89.
79. Boutell C, Sadis S, Everett RD. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J Virol.* 2002;76(2):841-50.
80. Reichelt M, Wang L, Sommer M, Perrino J, Nour AM, Sen N, et al. Entrapment of viral capsids in nuclear PML cages is an intrinsic antiviral host defense against varicella-zoster virus. *PLoS Pathog.* 2011;7(2):e1001266.
81. Guion L, Bienkowska-Haba M, DiGiuseppe S, Florin L, Sapp M. PML nuclear body-residing proteins sequentially associate with HPV genome after infectious nuclear delivery. *PLoS Pathog.* 2019;15(2):e1007590.

10 Anhang

10.1 Tagungsbeiträge zu Ergebnissen dieser Arbeit

Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch Kolleginnen aus dem Team auf folgender Konferenz vorgestellt:

28. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 14.-17. März 2018 in Würzburg

Titel: „HPV16 induces fusion of autophagy adapter p62/sequestosome-1 with PML-bodies to enable infection”

Autoren: L. Fast, L. Schweiger, F. Boukhallouk, S. Tenzer, L. Florin

10.2 Genehmigungen der Abbildungen aus zitierten Publikationen

Abbildung 2.1:

4.5.2021

RightsLink - Your Account

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 04, 2021

This Agreement between Linda Schweiger ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4818720972174
License date	Apr 30, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Virology
Licensed Content Title	The papillomavirus major capsid protein L1
Licensed Content Author	Christopher B. Buck,Patricia M. Day,Benes L. Trus
Licensed Content Date	Oct 1, 2013
Licensed Content Volume	445
Licensed Content Issue	1-2
Licensed Content Pages	6
Start Page	169
End Page	174
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of translations	1
Title	Zelluläre Mechanismen der HPV-Infektion – Untersuchungen zur Rolle des Autophagie Adapters p62 und der PML Nuclear Bodies
Institution name	Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz
Expected presentation date	May 2021
Portions	Figure 1
Specific Languages	German
Requestor Location	Linda Schweiger Kästrich 1 Mainz, 55116 Germany Attn: Linda Schweiger
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Abbildung 2.2:

4.5.2021

RightsLink - Your Account

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 04, 2021

This Agreement between Linda Schweiger ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4834741200135
License date	May 23, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Virus Research
Licensed Content Title	Host cell restriction factors that limit transcription and replication of human papillomavirus
Licensed Content Author	Samuel S. Porter,Wesley H. Stepp,James D. Stamos,Alison A. McBride
Licensed Content Date	Mar 2, 2017
Licensed Content Volume	231
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	11
Start Page	10
End Page	20
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of translations	1
Title	Zelluläre Mechanismen der HPV-Infektion – Untersuchungen zur Rolle des Autophagie Adapters p62 und der PML Nuclear Bodies
Institution name	Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz
Expected presentation date	May 2021
Portions	Figure 2
Specific Languages	German
Requestor Location	Linda Schweiger Kästrich 1 Mainz, 55116 Germany Attn: Linda Schweiger
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Abbildung 2.3:

Figure 8 aus Publikation von Sun et. al, 2018 (48). Es handelt sich um einen *open access article* nach der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>); die Abbildung wurde unverändert verwendet.

Abbildung 4.1:

Figure 1 aus Publikation von Bobrich et al. 2013 (67). Es handelt sich um einen *open access article* nach der *Creative Commons Attribution License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>); die Abbildung wurde unverändert verwendet