

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

Die Rolle der Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im  
Infektionszyklus der humanen Papillomviren

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

Vorgelegt von

Anna-Lena Franke  
aus Miltenberg

Mainz, 2023

Tag der Promotion:

11. Dezember 2023

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	5
2 Literaturdiskussion .....	7
2.1 Humane Papillomviren .....	7
2.1.1 Klassifikation .....	7
2.1.2 Struktureller Aufbau .....	7
2.1.3 Das HPV-Genom .....	8
2.2 Der Infektionszyklus der HPV16-Viren .....	8
2.2.1 Die Bindung von HPV16 an humane basale Keratinozyten .....	9
2.2.2 Die Internalisierung über eine Tetraspanin angereicherte Eintrittsplattform... ..	10
2.2.3 Der intrazelluläre Transport der viralen DNA .....	13
2.3 Die Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 .....	13
2.3.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 .....	13
2.3.2 Die Laminin-bindenden Integrine Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 .....	14
2.4 HPV-induzierte Signalprozesse .....	15
3 Zielsetzung .....	17
4 Material .....	18
4.1 Laborgeräte .....	18
4.2 Verbrauchsmaterialien .....	19
4.3 Chemikalien .....	20
4.3.1 Reagenzien und Kits .....	20
4.3.2 Lösungen und Puffer .....	22
4.4 Small interfering RNA (siRNA) .....	23
4.5 Plasmidvektoren .....	23

4.6	Antikörper .....	25
4.6.1	Primärantikörper .....	25
4.6.2	Sekundärantikörper .....	26
4.7	Protein-Größenstandard .....	26
4.8	Zellkultur .....	26
4.8.1	Zelllinien .....	26
4.8.2	Medien und Zusätze .....	27
5	Methoden .....	28
5.1	Zellkultur .....	28
5.1.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien .....	28
5.1.2	Passagieren der Zellen.....	28
5.2	Transfektionen .....	29
5.2.1	DNA-Transfektion mit Polyethylenimine (PEI).....	29
5.2.2	DNA-Transfektion mit Lipofectamine™ 2000 .....	29
5.2.3	siRNA-Transfektion mit Lipofectamine™ RNAiMAX.....	30
5.3	Luciferase basierte Reporter-Gen-Assays.....	31
5.3.1	HPV16-Pseudoviren .....	31
5.3.2	Herstellung von HPV16-Pseudoviren .....	31
5.3.3	Infektionsversuche mit HPV16-PsV.....	32
5.3.4	Promotoranalysen mit Reporterplasmiden .....	33
5.3.5	Auswertung der Luciferase basierten Reporter-Gen-Assays .....	34
5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	36
5.5	Western Blot .....	37
5.6	Fluoreszenz-Bildgebung .....	38
5.6.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	38
5.6.2	Fluoreszenz-basierte DNA- und Zellkern-Färbung .....	39
5.6.3	Fluoreszenzmikroskopie .....	39

5.7	Statistische Methoden .....	40
6	Ergebnisse .....	41
6.1	ErbB2 als neu identifizierter Interaktionspartner der HPV16-Viren.....	41
6.1.1	ErbB2 wird mit HPV16 kointernalisiert.....	41
6.1.2	ErbB2 kolokalisiert mit dem Tetraspanin CD151.....	43
6.1.3	Vergleichende Untersuchungen zum ErbB2 Wildtyp Protein und der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS .....	45
6.1.3.1	ErbB2 und ErbB2 $\Delta$ NLS werden mit HPV16 kointernalisiert.....	45
6.1.3.2	ErbB2 und ErbB2 $\Delta$ NLS aktivieren den HPV16-Promotor .....	47
6.1.4	Der Einfluss einer ErbB2 Depletion auf die Promotoraktivität von HPV16 .....	49
6.1.5	ErbB2 und die Promotoraktivitäten von HPV11 und HPV18 .....	51
6.2	Die Rolle von Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3.....	54
6.2.1	Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 beeinflussen die HPV16-Infektionsrate .....	54
6.2.2	Regulation der Promotoraktivität von HPV16 und CMV .....	57
7	Diskussion .....	60
7.1	Die Rolle des Wachstumsfaktorrezeptors ErbB2 im Infektionszyklus von HPV ..	61
7.1.1	ErbB2 ist Bestandteil der Eintrittsplattform von HPV16 .....	61
7.1.2	Der Einfluss des ErbB2 auf den HPV16-Promotor .....	66
7.1.2.1	Eine Überexpression von ErbB2 führt zu erhöhter Aktivität des LCR-Promotors.....	66
7.1.2.2	Das Kernlokalisierungssignal von ErbB2 ist für die LCR-Promotoraktivität entbehrlich.....	67
7.1.2.3	ErbB2-Depletion hat nur einen geringen Effekt auf die LCR-Promotoraktivität von HPV16, HPV18 und HPV11 .....	68
7.2	Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Infektionszyklus der HPV16 .....	71
7.2.1	Laminin-bindende Integrine sind wichtige Kofaktoren der HPV16-Infektion...	71
7.2.2	Die Beeinflussung des HPV16-LCR Promotors .....	72
7.3	Ausblick .....	74

8	Zusammenfassung.....	75
9	Literaturverzeichnis .....	77
10	Anhang.....	91
10.1	Publikation zu Ergebnissen dieser Arbeit.....	91
10.2	Genehmigungen der Abbildungen aus zitierten Publikationen.....	92

---

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
et al	<i>et alii</i> , und andere
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetales Kälberserum
HaCaT-Zelllinie	<i>human adult low calcium high temperature keratinocytes</i>
HEK 293TT-Zelllinie	Humane embryonale Nierenepithelzellen
HPV	Humane Papillomviren
HPV16-PsV	Humane Papillomviren 16-Pseudoviren
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSPGs	Heparansulfatproteoglykane
ITG $\alpha$ 3	Integrin $\alpha$ 3
ITG $\alpha$ 6	Integrin $\alpha$ 6
KSI	Kontroll-siRNA
LCR	<i>long control region</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
NEA	Nichtessentielle Aminosäuren
NLS	Nukleares Lokalisierungssignal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PsV	Pseudoviren
RLU	<i>Relative Light Units</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

---

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEMs	<i>tetraspanin-enriched microdomains</i>
Vgl.	Vergleiche



---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau des HPV16 Genoms (adaptiert aus Harden und Munger 2017 (7)).....	8
Abbildung 2:	Die Infektion des mehrschichtigen Hautepithels durch HPV (aus Harden und Munger 2017 (6)).....	9
Abbildung 3:	Der HPV16-Infektionszyklus (aus Scheffer et al. (1)).....	12
Abbildung 4:	Luciferase basiertes Reportersystem (Eigene Abbildung) .....	35
Abbildung 5:	Kolokalisation des L1 Kapsidproteins mit ErbB2-EGFP .....	42
Abbildung 6:	Kolokalisation von ErbB2-Emerald mit CD151 und L1 .....	44
Abbildung 7:	Vergleichende Immunfluoreszenzaufnahmen von ErbB2-EGFP und der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP in infizierten und nicht infizierten Zellen.....	46
Abbildung 8:	Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität nach Überexpression von ErbB2-EGFP oder der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP.....	48
Abbildung 9:	Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität in ErbB2-Knockdown-Zellen.....	50
Abbildung 10:	Der Einfluss der siRNA-vermittelten Depletion von ErbB2 auf die Promotoraktivitäten von HPV11 und HPV18.....	52
Abbildung 11:	Darstellung der relativen HPV16-Infektionsrate nach siRNA-vermittelter Depletion von Integrin $\alpha$ 6 oder Integrin $\alpha$ 3.....	55
Abbildung 12:	Beeinflussung der Promotoraktivität des HPV16-LCR- und des CMV-Promotors durch die siRNA-vermittelte Depletion von Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 .....	58
Abbildung 13:	Modell der HPV16-induzierten Eintrittsplattform (Eigene Abbildung)...	65

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Laborgeräte .....	18
Tabelle 2:	Filme und Membranen .....	19
Tabelle 3:	Reagenzien und Kits .....	20
Tabelle 4:	Lösungen und Puffer .....	22
Tabelle 5:	siRNAs mit Leitstrang-Sequenzen .....	23
Tabelle 6:	Plasmidvektoren .....	23
Tabelle 7:	Primärantikörper .....	25
Tabelle 8:	Sekundärantikörper .....	26
Tabelle 9:	Zelllinien HaCaT und HEK 293TT .....	27
Tabelle 10:	Medien und Zusätze .....	27
Tabelle 11:	Primär- und Sekundärantikörper für die Darstellung von CD151 und L1 .....	43
Tabelle 12:	Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis des Integrin $\alpha$ 6- und Integrin $\alpha$ 3-Knockdowns im Western Blot .....	54

## 1 Einleitung

Infektionen durch humane Papillomviren (HPV) zählen zu den häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten und treten bei den meisten sexuell aktiven Menschen mindestens einmal im Leben auf (3, 4). Die Bandbreite der dadurch hervorgerufenen Erkrankungen reicht von Genitalwarzen bis hin zu anogenitalen und oropharyngealen Karzinomen, wobei etwa 5 % aller Krebsarten mit HPV-Infektionen assoziiert sind. Vor allem der Gebärmutterhalskrebs wird fast ausschließlich durch die HPV-Infektion verursacht und gilt mit jährlich mehr als 500.000 Fällen weltweit als einer der häufigsten Krebsarten bei Frauen (5-7).

Auch wenn durch zahlreiche Studien das Wissen über die Molekularbiologie der HPV-Infektion in den letzten Jahren zugenommen hat, konnte der genaue Infektionsmechanismus bislang noch nicht umfassend geklärt werden. Die vorliegende Arbeit aus der experimentellen Forschung liefert hierzu neue Erkenntnisse, indem die Rolle der zelleigenen Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Rahmen des Infektionszyklus von HPV16 untersucht wurde. Diese Proteine könnten als Interaktionspartner für HPV fungieren und sind möglicherweise nicht nur an deren Internalisierung, sondern auch an der Aktivierung von intrazellulären Signalprozessen beteiligt, welche wiederum Auswirkungen auf die Infektion haben könnten. Durch das verbesserte Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge von Virus und Wirt soll langfristig ein Beitrag zur Weiterentwicklung der Screening-Methoden, Impfstoffe und gezielter Therapien von HPV-induzierten Erkrankungen geleistet werden (1). Weiterhin können Erkenntnisse über die Interaktion der Viren mit humanen Proteinen sowie die genauen Abläufe der Infektion auf andere virale Erkrankungen übertragen werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Interaktionen der Rezeptortyrosinkinase ErbB2 (auch HER2/neu genannt) und der beiden Integrine  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 6 mit HPV16, einem HPV-Subtyp mit hohem onkogenen Potential, anhand von Fluoreszenzmikroskopie, Infektions- und Promotoranalysen untersucht. Die Versuche wurden in Zellkulturen humaner Keratinozyten, den Zielzellen von HPV, durchgeführt. Die Infektionsversuche wurden mit eigenständig hergestellten HPV16-Pseudoviren durchgeführt. Für die Promotoranalysen, welche die Beeinflussung der zellulären Proteine auf den HPV16 Promotor untersuchen, wurden Promotor-Reporterplasmide, die ein Reportergen unter der Kontrolle des HPV Promotors tragen, transfiziert.

---

Ergebnisse aus dieser Dissertationsschrift zu den Untersuchungen der Integrine wurden bereits 2020 publiziert (8):

Finke J, Mikulicic S, Loster AL, Gawlitza A, Florin L, Lang T. Anatomy of a viral entry platform differentially functionalized by integrins alpha3 and alpha6. *Sci Rep.* 2020;10(1):5356

Weiterhin sind Ergebnisse aus dieser Dissertationsschrift zu den Untersuchungen von ErbB2 Bestandteil eines am 28.09.2023 eingereichten Manuskripts der Autoren Snježana Mikuličić, Merha Shamun, Annika Massenber, Anna-Lena Franke, Kirsten Freitag, Tatjana Döring, Johannes Strunk, Stefan Tenzer, Thorsten Lang und Luise Florin mit dem Titel „ErbB2/HER2 receptor tyrosine kinase regulates human papillomavirus gene expression“

---

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Humane Papillomviren**

#### **2.1.1 Klassifikation**

Die humanen Papillomviren (HPV) werden der Familie der Papillomaviridae und dem Genus Alphapapillomavirus zugeordnet (9, 10). Die etwa 450 unterschiedlichen HPV-Typen werden weiter in Niedrigrisiko-Typen, wie HPV11, und Hochrisiko-Typen, wie HPV16 und HPV18, eingeteilt. Viele durch HPV hervorgerufene Infektionen sind asymptomatisch (11). Während die Niedrigrisiko-Typen gutartige Läsionen verursachen können, wie zum Beispiel Genitalwarzen, besitzen die Hochrisiko-Typen die Fähigkeit, die infizierten Epithelzellen zu immortalisieren (10). Dadurch können sich bei lang bestehender Infektion maligne Zellveränderungen entwickeln und zu Karzinomen führen (11). Es ist bekannt, dass die Hochrisiko-Typen für etwa 5 % der weltweiten Krebserkrankungen verantwortlich sind (7). Wichtigster Vertreter der Hochrisiko-Typen ist HPV16, der gefolgt von HPV18 am häufigsten in den durch HPV ausgelösten Karzinomen vorkommt (6, 7). Daher steht HPV16 im Mittelpunkt der Forschung und stellt auch in dieser Arbeit den Schwerpunkt dar.

#### **2.1.2 Struktureller Aufbau**

HPV sind unbehüllte kleine DNA-Viren, bestehend aus dem viralen Genom in Form von zirkulärer Desoxyribonukleinsäure (DNA) und dem Kapsid. Die Größe eines Virions beträgt 55-60 nm im Durchmesser (9, 12). Das virale Kapsid besteht aus zwei Proteinen, und besitzt die Symmetrie eines Ikosaeders (13). 360 Kopien des großen Kapsidproteins L1 ordnen sich zu 72 Pentameren an, die mit bis zu 72 Kopien des kleinen Kapsidproteins L2 interagieren (12, 14-19).

Die L1 Proteine haben die Eigenschaft, dass sie sich spontan zu virusartigen Partikeln zusammenlagern können (16, 18). Dies macht man sich in der Erforschung von HPV16 zunutze, um Pseudoviren zu erschaffen. Die L2 Proteine besitzen diese Fähigkeit nicht, sind allerdings aufgrund ihrer Interaktionsmöglichkeit sowohl mit dem viralen Genom als auch mit den L1 Proteinen wichtig für die Viruszusammensetzung (12, 14). Sofern beide Proteine koexprimiert werden, können sich die L1 und L2 Moleküle korrekt zu dem viralen Kapsid zusammenlagern und das virale Genom oder eine andere zirkuläre DNA ähnlicher Größe, wie im Falle der Pseudoviren, umhüllen (12, 15).

### 2.1.3 Das HPV-Genom

Das Genom besteht aus einer etwa 8000 Basen-Paare fassenden ringförmigen, doppelsträngigen DNA. Es kann in drei funktionelle Bereiche geteilt werden. Die *early region* codiert für die frühen Proteine E1 bis E7, welche die virale Replikation, Transkription, Freisetzung und Immunevasion regulieren (20-23). Dabei gelten E5, E6 und E7 als Onkogene, indem sie beispielsweise an den Tumorsuppressor p53 binden können und ihn dadurch inaktivieren (24-26). Die *late region* beinhaltet die Gene für die strukturellen Kapsidproteine L1 und L2. Diese werden auch die späten Proteine genannt, da sie erst in den differenzierten Keratinozyten der höheren Schichten des Epithels nachgewiesen werden können. Dort werden die neu produzierten Viren vor der Freisetzung zusammengesetzt (9, 12). L1 und L2 sind essentiell für den Viruseintritt in die Wirtszelle sowie den Transport der viralen DNA in den Zellkern (16, 27). Den dritten funktionellen Bereich stellt die *long control region* (LCR) dar, welche den Replikationsursprung und die regulatorischen Elemente für die Replikation und Transkription der viralen DNA enthält. Ebenso beinhaltet die *long control region* den frühen Promotor p97, der die frühen Gene einschließlich der Onkogene E6 und E7 reguliert (1, 28).

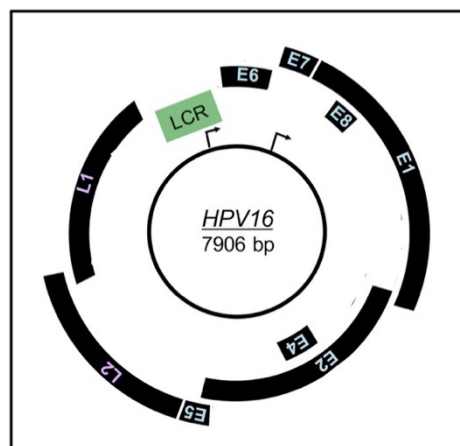


Abbildung 1: Aufbau des HPV16 Genoms (adaptiert aus Harden und Munger 2017 (1))

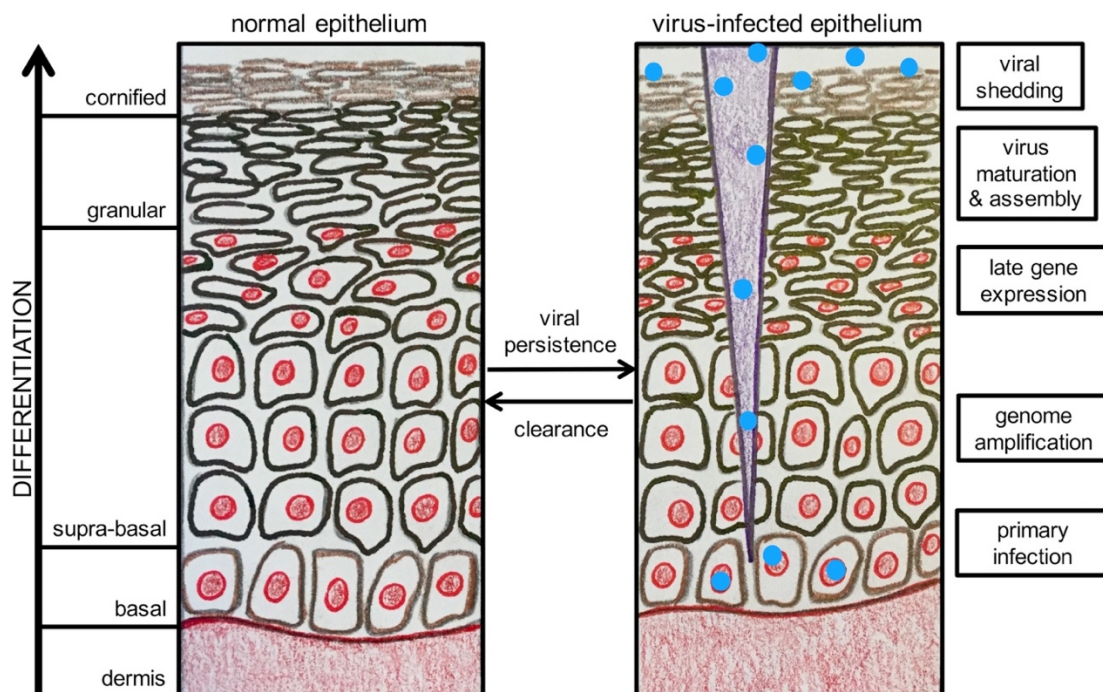
### 2.2 Der Infektionszyklus der HPV16-Viren

Der Infektionszyklus der humanen Papillomviren ist vor allem für HPV16 erforscht, sodass im Folgenden die Prozesse für diesen Typ genauer erläutert werden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass ebenfalls die Hochrisiko-Typen HPV18 und 31 ähnliche Mechanismen verwenden und es wird vermutet, dass der Prozess auf viele, wenn nicht sogar alle, humanpathogenen Papillomviren übertragen werden kann (29).

### 2.2.1 Die Bindung von HPV16 an humane basale Keratinozyten

HPV16 infiziert epitheliale Zellen der Haut und Schleimhäute. Für die Bindung an die basalen Keratinozyten wird eine Epithelverletzung und eine damit einhergehende Freilegung dieser Zellen benötigt, wie in

Abbildung 2 dargestellt ist (30, 31). Der einzigartige virale Infektionszyklus ist abhängig von den Differenzierungsprozessen der betroffenen Keratinozyten (1, 32) und beginnt mit einem mehrstufigen, langsamen und asynchronen Eintrittsprozess, der bisher noch nicht vollständig geklärt ist (33, 34). Um eine persistierende Infektion zu ermöglichen, müssen mitotisch aktive Zellen infiziert werden (1, 35). Daher ist die Infektion selbst ausschließlich an den basalen undifferenzierten Keratinozyten erfolgreich. Durch die Differenzierung der infizierten Keratinozyten und der damit verbundenen Migration in die oberflächlichen Epithelschichten wird die virale Replikation und Genexpression der Kapsidproteine induziert. Im Anschluss erfolgt die virale Zusammensetzung und Freisetzung durch Abstreifen der äußersten Hautzellen (32).



**Abbildung 2: Die Infektion des mehrschichtigen Hautepithels durch HPV (aus Harden und Munger 2017 (1))**

**Links:** Darstellung eines normalen mehrschichtigen Hautepithels

**Rechts:** Abbildung eines infizierten Hautepithels. Die Bindung von HPV erfolgt an den basalen undifferenzierten Keratinozyten, die durch Mikroläsionen zugänglich werden. Die zunehmende Differenzierung der Zellen induziert die virale Replikation und Genexpression. Anschließend werden die Viren in den oberflächlichen Schichten zusammen- und freigesetzt.

Der Infektionszyklus ist außerdem angepasst an die Prozesse der natürlichen Wundheilung, wobei HPV mit einigen zellulären Faktoren interagiert, die im Rahmen einer Verletzung hochreguliert werden. Dazu zählen unter anderem der *epidermal growth factor receptor* (EGFR), das Integrin  $\alpha 6\beta 4$  und das Tetraspanin CD151 (Review in (31, 33)).

Das HPV16 Kapsid spielt bei der Bindung an die Keratinozyten eine wichtige Rolle, indem es an Komponenten der Extrazellulären Matrix, insbesondere an Heparansulfatproteoglykane (HSPGs), als primären Rezeptor anhaftet (36-41). Ein weiterer bekannter primärer Rezeptor ist das Laminin-332, welches von migrierenden Keratinozyten sezerniert wird, wenn diese in ein verletztes Epithel eindringen (40, 42-45). Durch die Bindung an den primären Rezeptor sowie die Einwirkung von Cyclophilin B und Kallikrein-8 kommt es zu strukturellen Modifizierungen des viralen Kapsids (46-48). Unter anderem erlaubt dies die Spaltung von L2 durch Furin, eine zelluläre Protease (49-51). Dadurch wird der spätere Austritt aus den Endosomen und ein korrekter intrazellulärer Transport ermöglicht.

Weitere Faktoren wie Integrin $\alpha 6$ , Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren assoziieren mit den HSPGs und den HPV16. Dadurch werden zelluläre Signalwege über die fokale Adhäsionskinase (FAK), Tyrosinkinase wie den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) aktiviert. Dies fördert die Virusinfektion, indem sich ein sekundärer Rezeptorkomplex an der Virusbindungsstelle bildet, die Endozytose, der intrazelluläre Transport oder die virale Genexpression in der Wirtszelle vorbereitet werden (37, 38, 52-56). Durch die strukturellen Modifikationen der Kapsidproteine und die Assoziation mit löslichen Wachstumsfaktoren sowie weiteren Rezeptoren der Extrazellulären Matrix wie Laminin-332 wird die Bindung an HSPGs abgeschwächt und es erfolgt ein Transfer des HPV16 zum sekundären Rezeptorkomplex (1, 37, 50, 56, 57).

### **2.2.2 Die Internalisierung über eine Tetraspanin angereicherte Eintrittsplattform**

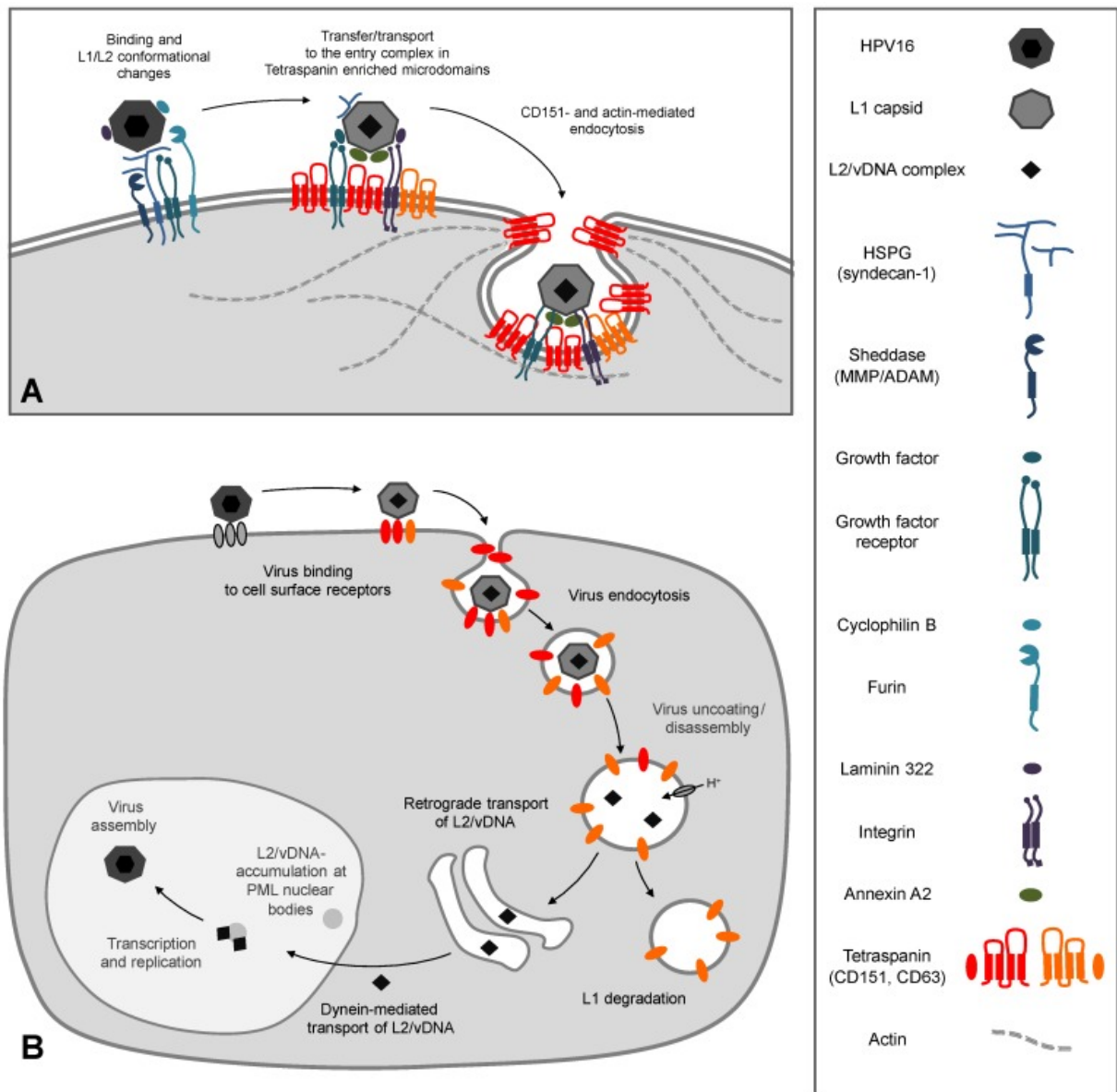
Die Zusammensetzung des sekundären Rezeptorkomplexes ist gegenwärtig noch nicht vollständig geklärt. Es wurden jedoch verschiedene Plasmamembranproteine identifiziert, die als sekundäre Rezeptoren für HPV16 dienen. Aktuell erscheint daher die Bildung einer Eintrittsplattform, an der mehrere zelleigene Rezeptoren beteiligt sind, am wahrscheinlichsten. Es konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere Tetraspanine



bei diesem Prozess eine Rolle spielen (29, 58-60). Als Tetraspanine wird eine Familie von Proteinen mit vier Transmembrandomänen bezeichnet. Diese können untereinander und mit verschiedenen Rezeptoren und Signalproteinen wie beispielsweise Integrinen und Wachstumsfaktorrezeptoren interagieren und so die Ausbildung von *tetraspanin-enriched microdomains* (TEMs) koordinieren (34, 61-63). TEMs sind in verschiedene Prozesse der Signalübertragung, Proliferation, Zelladhäsion und Reorganisation des Zytoskeletts eingebunden (62, 64-67). Auch können virale Rezeptoren und Aktivatoren, wie zum Beispiel Proteasen, in den TEMs konzentriert werden, wodurch der virale Eintritt unterstützt wird (34, 68). Es wurde bereits für Hepatitis-C-Virus (69), HIV-1 (70), Corona- und Influenza-A-Viren (71) gezeigt, dass diese TEMs als Eintrittsplattformen verwenden oder mit Tetraspaninen bei der Internalisierung assoziieren (34).

Für HPV16 wurde bereits nachgewiesen, dass sie an TEMs binden, die mit den Tetraspaninen CD151 und CD63 angereichert sind (2, 56, 58, 59, 68). Zusätzlich besteht eine Assoziation mit weiteren Plasmamembranproteinen, die eine Rolle bei der Virus-Bindung oder Endozytose einnehmen. Dazu zählt das Integrin $\alpha$ 6, das in vielen Studien als Rezeptor für HPV16 identifiziert wurde (8, 38, 59, 72-74). Außerdem finden sich Interaktionen mit Wachstumsfaktorrezeptoren (37), dem Heterotetramer Annexin A2 (75, 76), dem zytoskelettalen Adaptorprotein Obscurin-like 1 Protein und Aktin (8, 77).

Die genauen Mechanismen, die zur Bildung der HPV16-assoziierten TEMs führen, sind immer noch umstritten. Die Metalloprotease ADAM17 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen, indem sie zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie AREG, TGF- $\alpha$  oder HB-EGF führt. Diese Moleküle gelten als bekannte Aktivatoren der ERK-Signalübertragung. Es wird vermutet, dass diese Freisetzung die Bildung der TEMs vermittelt (56). Dadurch wird die Endozytose eingeleitet und die TEMs werden mit HPV16 gemeinsam internalisiert (34, 58). Dieser Vorgang erfolgt unabhängig von gängigen Interaktionen mit Clathrin, Caveolin oder Dynein. Dabei erfolgt eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, welches ebenfalls mit den TEMs verknüpft ist (54, 55, 58, 77).



**Abbildung 3: Der HPV16-Infektionszyklus (aus Scheffer et al. (2))**

**A** Darstellung der Ereignisse auf der Zelloberfläche. Die HPV16 binden an primäre Rezeptoren, wie HSPGs, und assoziieren mit Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, wodurch zelluläre Signalwege aktiviert werden. Nach einer Konformationsänderung des Kapsids wird die Bindung an Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) abgeschwächt und es erfolgt ein Transfer von HPV16 zum sekundären Rezeptorkomplex, einer *tetraspanin-enriched microdomain* (TEM). Diese setzt sich unter anderem aus dem Tetraspanin CD151, dem Integrin $\alpha$ 6 und Wachstumsfaktorrezeptoren zusammen und wird mit den Viren endozytiert.

**B** Schematische Abbildung des gesamten Infektionszyklus. Nach der Internalisierung von HPV16 wird das Kapsid zerlegt und das virale Genom in Komplex mit L2 zum Nukleus transportiert.

### **2.2.3 Der intrazelluläre Transport der viralen DNA**

Intrazellulär erfolgt zuerst die Reifung der virusbeladenen frühen Endosomen. Die Ansäuerung in reifen Endosomen ermöglicht die Kapsid-Zerlegung und die Freisetzung eines Komplexes bestehend aus dem Kapsidprotein L2, einem kleinen Teil der L1 Moleküle und dem viralen Genom (78, 79) (s. Abbildung 3). Dieser Komplex wird retrograd zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert (80-82). Durch die Fragmentierung des Golgi-Apparats während der zellulären Reorganisation im Rahmen der Mitose erfolgt die Freisetzung von Virionen, die durch eine umhüllende Membran vor zytosolischer Immunabwehr geschützt werden (33, 83, 84). Diese viralen Vesikel interagieren über L2 mit dem Dynein-Motorkomplex, wodurch der Transport entlang der Mikrotubuli zum Nukleus sichergestellt wird (33, 83, 85, 86). Die Auflösung der Kernhülle legt das mitotische Chromatin frei, mit dem der Komplex aus L2 und der viralen DNA assoziiert (87, 88). Bei der nachfolgenden Initiierung der viralen Transkription und Replikation spielen außerdem spezifische subnukleäre Strukturen, die Promyelozyten-Leukämie-Kernkörper, eine entscheidende Rolle (27, 89, 90).

## **2.3 Die Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3**

In der Arbeitsgruppe (AG) Florin erfolgte 2013 die Isolation von virusbeladenen frühen Endosomen infizierter Zellen durch subzelluläre Fraktionierung basierend auf diskontinuierlicher Saccharose-Gradientenzentrifugation. Dabei reicherten sich Endosomen an einer bestimmten Saccharose-Grenzfläche an und konnten durch Gradientenfraktionierung gesammelt werden. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der Proteine in den Endosomenfraktionen mittels Massenspektrometrie. Dadurch konnten mit dem Virus kointernalisierte Membranproteine identifiziert werden (91). Bereits bekannte Faktoren des Viruseintritts, wie CD151 und Integrin $\alpha$ 6, wurden in der Analyse bestätigt. Außerdem konnte auch ein neuer Faktor identifiziert werden: der Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 (AG Florin, Manuskript eingereicht).

### **2.3.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2**

ErbB2 gehört neben EGFR (Synonym: ErbB1), ErbB3 und ErbB4 zu der ErbB-Familie der Rezeptortyrosinkinasen. ErbB-Rezeptoren werden durch die extrazelluläre Bindung von Wachstumsfaktoren aktiviert. Da es sich um Transmembranproteine handelt, können dadurch intrazelluläre Prozesse ausgelöst werden, was auch als Signaltransduktion bezeichnet wird (92). Neben diesem Weg der indirekten Signalgebung wird für ErbB-

Rezeptoren auch eine direkte Signalwirkung beschrieben. In Zellkernen konnten intrazelluläre Domänen von ErbB-Rezeptoren nachgewiesen werden (93-96). Durch diese nukleare Translokation können sie als direkte Transkriptionsfaktoren fungieren, indem sie gezielt an Promotoren binden und dadurch die Genexpression aktivieren (97, 98). Die ErbB-Rezeptoren sind über diese Mechanismen an der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Migration und dem Überleben von Zellen beteiligt (99).

ErbB2 ist besser bekannt unter dem Synonym HER-2/neu. Das Protoonkogen ErbB2 kodiert für das gleichnamige Protein, das in unterschiedlichen menschlichen Krebsarten einschließlich Brust-, Eierstock-, Lungen-, Magen- und Mundkrebs überexprimiert wird (100). ErbB2 besitzt keine eigene Bindungsstelle für Liganden. Jedoch kann es mit den anderen ErbB-Rezeptoren ein Heterodimer bilden, wodurch die hochaffine Bindung von verschiedenen Liganden ermöglicht wird (101-103). Über die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wie RAS/RAF/MEK/ERK oder PI3K/AKT/TOR ist es an Zellproliferation und Umgehung der Apoptose beteiligt (104-107). Auch für ErbB2 konnte eine nukleare Translokation und eine damit verbundene regulatorische Funktion der Gentranskription nachgewiesen werden (108). Um den Zellkern durch die Kernporen erreichen zu können, benötigen Proteine ein nukleares Lokalisierungssignal (NLS). Für die nukleare Translokation des ErbB2 ist daher dessen NLS-Sequenz wesentlich (103).

### **2.3.2 Die Laminin-bindenden Integrine Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3**

HPV infizieren basale Keratinozyten, die durch Mikroläsionen zugänglich sind. Da der Infektionszyklus an die Prozesse der natürlichen Wundheilung angepasst ist, gelten insbesondere basal exprimierte Proteine, die zudem im Rahmen der Wundheilung hochreguliert werden, als potentielle Interaktionspartner für HPV. Ein solches Transmembranprotein ist das Integrin $\alpha$ 6 (31, 42, 109). Integrin-Komplexe bestehen als Heterodimere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und haben unterschiedliche Funktionen im Bereich der Zelladhäsion und Integration (110), sowie Zellproliferation und Differenzierung (111-114).

Die AG um Evander et al. identifizierten bereits 1997 das Integrin $\alpha$ 6 als potentiellen Rezeptor für HPV (73), wobei weitere Studien in den darauffolgenden Jahren diese These unterstützten (72, 74). Das Integrin $\alpha$ 6 wird der Familie der Laminin-bindenden Integrine zugerechnet und bindet als Ligand das Laminin-332, welches ebenfalls ein Rezeptor für HPV sein kann (115, 116). Das Integrin $\alpha$ 6 ist ein bekannter

Interaktionspartner des Tetraspanins CD151 und ist in Assoziation mit diesem an der HPV16-Infektion beteiligt (59, 117). Ein weiteres Laminin-bindendes Integrin, das ebenfalls mit CD151 interagieren kann, ist das Integrin $\alpha$ 3 (118-120). Auch dieses Integrin könnte eine essentielle Rolle bei HPV spielen (59). Die Datenlage hierzu ist nicht ganz eindeutig und muss durch weitere Studien geklärt werden.

## 2.4 HPV-induzierte Signalprozesse

Viele Viren aktivieren zelluläre Signalkaskaden über die Bindung von Plasmamembranrezeptoren. Dies fördert häufig den Viruseintritt sowie nachfolgende zytoplasmatische Ereignisse bis hin zur viralen Genexpression (38, 121). Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, ist aus der Literatur bekannt, dass durch den Kontakt von HPV16 mit den Keratinozyten frühzeitig Signalprozesse induziert werden (37). Dadurch werden unter anderem die Endozytose, der intrazelluläre virale Transport oder die virale Genexpression in der Wirtszelle vorbereitet (37, 38, 52-55). Insbesondere Integrin-Komplexe können an Mechanismen der Signaltransduktion beteiligt sein und die Zellproliferation und Differenzierung beeinflussen (111-114). Dabei werden externe Stimuli über die Bindung eines Liganden an den Transmembranrezeptor nach intrazellulär weitergeleitet. Dies führt zu einer Phosphorylierungskaskade von verschiedenen zellulären Mediatoren, bis das Signal schließlich die Effektoren erreicht. Als Effektoren wirken zum Beispiel Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die über ihren Einfluss auf die Expression bestimmter Gene zu Zellproliferation und -differenzierung führen können.

Abban und Meneses zeigten 2010, dass HPV16-PsV bevorzugt Zellen in Anwesenheit von Integrin $\alpha$ 6 infizieren und dabei die Phosphorylierung von FAK induzieren. FAK wird dadurch aktiviert und ist essentiell für die Virusaufnahme in Endosomen (38). Für Virus-ähnliche Partikel des HPV Typ 6b konnte belegt werden, dass diese über die Phosphorylierung des  $\beta$ 4-Integrins zu einer Aktivierung des RAS/RAF/MAP-Kinase-Signalweges führen. Dadurch wird die Zellproliferation der exponierten Zellen stimuliert. Die Autoren vermuten, dass sich dadurch die Infektion verbessert, da mehr Zellen durch die initiierte Proliferation infiziert werden können (122). Weiterhin konnten Fothergill und McMillan durch Studien mit Virus-ähnlichen Partikeln der HPV-Typen 6b, 18, 31 und 35 herausarbeiten, dass deren Bindung über das Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 zur Aktivierung der PI3K führt. Daraus resultiert über den Akt-Signalweg ein anti-apoptotisches Signal (52). Smith

---

et al. legten Hinweise vor, dass HPV31 zudem Tyrosin- und PI3-Kinasen aktiviert, wodurch die virale Internalisierung und der intrazelluläre Transport der Virionen über die Einbindung des Zytoskeletts gefördert wird (53).

Auch über den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR können Signalprozesse ausgelöst werden, die humane Papillomviren nutzen. Bannach et al. vermuten, dass durch EGFR-vermittelte Signaltransduktion die Endozytose von HPV16 beeinflusst wird (55). Die AG um Surviladze und Ozbun untersuchten die Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR-Signalgebung durch HPV16-PsV. Dabei wurde festgestellt, dass diese Prozesse zumindest zum Teil über EGFR vermittelt werden und über eine Hemmung der Autophagie die virale Infektion unterstützen (123).

Insgesamt deuten die Ergebnisse der bisherigen Studien darauf hin, dass die Aktivierung von zellulären Signalprozessen eine essentielle Funktion im Infektionszyklus von humanen Papillomviren einnimmt. Dabei sind verschiedene Signalwege beteiligt, die über die Bindung der Viren an unterschiedliche Transmembranrezeptoren aktiviert werden. Während die Rolle von EGFR beim HPV16 Zelleintritt relativ gut untersucht wurde, wurden allerdings andere Moleküle der ErbB Familie im Zusammenhang mit dem Viruseintritt nicht betrachtet. Die Funktion der Integrine  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  wurde bisher kontrovers diskutiert und keinem definierten Schritt beim HPV-Zelleintritt zugeordnet.

---

### 3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Infektionszyklus des HPV16 zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Erforschung des ErbB2 als neu identifizierten Faktor der Infektion. Dafür wird unter anderem die Interaktion mit HPV16 analysiert. Weiterhin wird die Funktion der drei Plasmamembranproteine für die produktive Infektion getestet. Vor dem Hintergrund, dass humane Papillomviren durch die Bindung an Transmembranrezeptoren Einfluss auf zelluläre Signalmechanismen nehmen können, wird insbesondere geprüft, ob diese Proteine den HPV16-Promotor beeinflussen. Der Promotor ist eine definierte DNA-Sequenz, durch die die Transkription von nachgeschalteten Genabschnitten und dadurch die Genexpression reguliert ist. Dabei können Induktoren oder Inhibitoren der Genexpression über die Aktivierung oder die Inaktivierung eines Promotors wirken.

## 4 Material

### 4.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Kammer	TransBlot™ Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Brutschrank	Hera Cell 240	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Elektrophorese-Kammer		Harnischmacher, Kassel
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Heizblock	Blockthermostat BT 1303	HLC Biotech, Bovenden
Kamera	AxioCam HrM-Kamera	Carl Zeiss, Jena
Laborwaagen	BL 1500 D	Sartorius, Göttingen
	Mettler AE 100	Mettler-Toledo, Gießen
Lichtmikroskop	Wilovert S AFL	Helmut Hund, Wetzlar
Luminometer	Tristar LB 941	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetrührer	IKAMAG REC-G	Janke & Kunkel IKA®- Werke, Staufen
pH-Meter	InoLab pH Level 2	WTW, Weilheim
Pipetten	Pipetman P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton
Pipettierhilfe	PIPETBOY accu pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttler	Certomat R Rocky Wipp-Schüttler	B. Braun Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank (siRNA)	Hera Safe	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank (Zellkultur)	Nu-440-400E (Class II)	NuAire Laboratory Equipment, Plymouth
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Hanau



Ultrazentrifuge	Ultima LE 80K	Beckmann, Krefeld
Ultrazentrifugenrotoren	SW55	Beckmann, Krefeld
Wasserbad	JB1	Grant Instruments, Shepreth
Wirbelmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia
Zentrifugen	Labofuge 400R Function Line  Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed	Heraeus, Hanau   DuPont Instruments, Wilmington

#### 4.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Falcons, Mikroreaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten aus Plastik wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Kremsmünster) bezogen. Für die Lumineszenzmessung wurden weiße und für die Fluoreszenzmessung schwarze 96-Well-Mikroplatten von Greiner Bio-One verwendet.

**Tabelle 2: Filme und Membranen**

Produkt	Verwendung	Hersteller
Amersham ProtranTM 0,45 µm NC	Nitrozellulosemembran (Western Blot)	GE Healthcare, Dassel
Film: Amersham HyperfilmTM ECL	Sensitiver Film (Western Blot: Chemilumineszenz-Detektion)	GE Healthcare, Dassel
Film: Super RX-N	Universaler Film (Western Blot: Chemilumineszenz- Detektion)	Fujifilm, Minato, Japan

## 4.3 Chemikalien

### 4.3.1 Reagenzien und Kits

Tabelle 3: Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Acrylamid-Stammlösung: ROTIPHORESE®NF- Acrylamid/ Bis-Lösung 30 %	SDS-PAGE: PAGE- Gellösung	Carl Roth, Karlsruhe
Brij®58	Pseudovirenpräparation: Zell-Lyse	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Carestream® Kodak® au- toradiography GBX developer/replenisher und fixer/replenisher	Western Blot: Filmentwicklung	Sigma-Aldrich, Darmstadt
CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay (LDH)	Luciferase-Reporterge- n- Assay: Ermittlung der Zellviabilität durch Messung der LDH	Promega, Madison, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline: PBS (10x)	Phosphatgepufferte Salzlösung, angesetzt mit H <sub>2</sub> O: Waschen der Zellen	PanReac AppliChem, Darmstadt
Fluoprep	Immunfluoreszenzfärbung: Gel zur Fixierung der Deckgläser	bioMérieux, Nürtingen
Hoechst 33342 (Bisbenzimid H 33342)	Immunfluoreszenzfärbung: Fluoreszenz-basierte DNA- und Zellkern Färbung	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Lipofectamine™ 2000	DNA- Transfektionsreagenz	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA

Lipofectamine™ RNAiMAX	siRNA- Transfektionsreagenz	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent	Luciferase-Reporter- Assay: Zell-Lyse	Promega, Fitchburg, USA
Polyethylenimine (PEI)	DNA- Transfektionsreagenz	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Paraformaldehyd	Immunfluoreszenzfärbung: Fixieren der Zellen	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Tween®20	Western Blot: Blockierungspuffer	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Immunfluoreszenzfärbung: Permeabilisierung	Perkin Elmer, Rodgau
Western Lightning™ Plus- ECL	Western Blot: Chemilumineszenz Reagens zur Protein- Detektion	Perkin Elmer, Rodgau

### 4.3.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
5x Laemmli-Probenpuffer (SDS-PAGE)	312,5 mM Tris-Cl (pH 6,8) 10 % SDS 50 % Glycerin 0,025-0,5 % Bromphenolblau
10x Laemmli-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-Cl (pH 6,8) 192 mM Glycin 1 % SDS
10x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 11,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 65 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
Luciferase-Assay-Puffer	50 mM Tris-Cl (pH 7.8) 20 mM DTT 15 mM $\text{MgSO}_4$ 0,5 mM EDTA 0,5 mM Luciferin 0,5 mM ATP 0,5 mM Coenzym A
Ponceau S-Lösung	0,1 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
Polyethylenimine (PEI)	PEI (Sigma-Aldrich) mit $\text{H}_2\text{O}$ auf 1 mg/ml verdünnt. pH 7,0 mittels Zugabe von HCl einstellen
SDS-Page-Lösung B	1,5 M Tris-HCl (pH 8.8) 0,4 % SDS
SDS-Page-Lösung C	0,5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0,4 % SDS
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol

#### 4.4 Small interfering RNA (siRNA)

Für die Versuche, die auf dem Prinzip der RNA-Interferenz beruhen, wurden die Zellen mit siRNA transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurde stets die AllStars Negative Control siRNA (Kontroll-siRNA, KSI) von Qiagen verwendet, für deren Sequenz keine bekannte Homologie zu Säugetiergenen besteht. Somit besteht keine Interferenz mit humanen *messenger RNA*-Sequenzen. Die siRNAs wurden mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 20  $\mu$ M eingestellt. Hersteller der in Tabelle 5 aufgelisteten siRNAs ist die Firma Sigma-Aldrich.

**Tabelle 5: siRNAs mit Leitstrang-Sequenzen**

Knockdown-Ziel	Leitstrang-Sequenz (5'-3')
Integrin $\alpha$ 3 #1	GCUACAUGAUUCAGCGCAA
Integrin $\alpha$ 3 #2	GUUUGAAGGCUUGGGCAA
Integrin $\alpha$ 6 #1	GAUAUGCCUCCAGGUUAA
Integrin $\alpha$ 6 #2	CUGUAAGGAUCCGGAAAGA
ErbB2 #1	CAAAGAAAUCUAGACGAA
ErbB2 #2	CGGCCCUAAGGGAGUGUCUAA
ErbB2 #3	GUGUGCACCGGCACAGACA

#### 4.5 Plasmidvektoren

**Tabelle 6: Plasmidvektoren**

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller, Referenz
pcDNA3.1(+)/ <i>luciferase reporter</i> <i>plasmid</i>	Expressionsvektor pcDNA3.1(+) mit dem Luciferase-Gen unter dem CMV-Promotor	Schneider et al. 2011 (85)
pShell16L1/L2wt	Expressionsvektor für die codon-optimierten Kapsidproteine L1 und L2	Leder et al. 2001 (124), Buck et al. 2006 (125)

pGL4.20 HPV16-LCR- <i>luciferase reporter plasmid</i>	Expressionsvektor pGL4.20 mit Luciferase als Reporter gen unter dem HPV16-LCR Promotor	Schneider et al 2013 (126), Wüstenhagen et al. 2018 (127), Baldwin et al. 2007
pGL4.20 HPV11-LCR- <i>luciferase reporter plasmid</i> (p5192, Addgene Plasmid 22858)	Expressionsvektor pGL4.20 mit Luciferase als Reporter gen unter dem HPV11-LCR-Promotor	Bezogen von Peter M. Howley, Boston, MA; Schweiger et al. 2007 (128)
pGL4.20 HPV18-LCR- <i>luciferase reporter plasmid</i> (p5194, Addgene Plasmid 22859)	Expressionsvektor pGL4.20 mit Luciferase als Reporter gen unter dem HPV18-LCR-Promotor	Bezogen von Peter M. Howley, Boston, MA; Schweiger et al. 2007 (128)
ErbB2-pEGFP-N1	Expressionsvektor pEGFP-N1, der das <i>enhanced green fluorescent protein</i> (EGFP) an ErbB2 koppelt	Bezogen von Prof. Mien-Chie Hung, Houston, TX; Giri et al. 2005 (129), Boone et al. 2009 (130)
ErbB2 $\Delta$ NLS-pEGFP-N1	Expressionsvektor pEGFP-N1, der EGFP verknüpft an ErbB2 $\Delta$ NLS. Mit Deletion des nuklearen Lokalisierungssignal (NLS), (Aminosäuren 676-KRRQQKIRKYTMRR-689)	Bezogen von Prof. Mien-Chie Hung, Houston, TX; Giri et al. 2005 (129), Boone et al. 2009 (130)
pEGFP-N3	Expressionsvektor für EGFP	Clontech, Takara Bio Inc.
mEmerald-ERBB2-N18 (Addgene Plasmid 62755)	Klonierungsvektor für ErbB2, welches an Emerald, ein grün fluoreszierendes Protein verknüpft ist	Bezogen von Michael Davidson, (Addgene plasmid # 62755; <a href="http://n2t.net/addgene:62755">http://n2t.net/addgene:62755</a> ; RRID:Addgene_62755)

## 4.6 Antikörper

Im Folgenden sind die Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet, die für die Western Blots (WB) oder die Immunfluoreszenzfärbungen (IF) verwendet wurden.

### 4.6.1 Primärantikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies, Klonalität	Verdünnung	Hersteller, Referenz
Anti-Integrin $\alpha$ 3 (A-3)	Maus, onoklonal	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA; Finke et al. 2020 (8)
Anti-Integrin $\alpha$ 6 (CD49f)	Kaninchen, Polyklonal	WB 1:1000	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA; Finke et al 2020. (8)
Anti-L1 (K75)	Kaninchen, Polyklonal	IF 1:1000	Rommel et al. 2005; Bergsdorf et al. 2003 (131, 132)
Anti-CD151 (MCA1856, clone 11G5a)	Maus, monoklonal	IF 1:100	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA; Crew et al. 2004 (133)
Anti- $\beta$ -Aktin (AC-15)	Maus, monoklonal	WB 1:20000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
Anti-HER2/ErbB2 (29D8)	Kaninchen, Monoklonal	WB 1:1000	Cell Signaling, Massachusetts, USA; Muthuswamy et al. 1999 (134)

## 4.6.2 Sekundärantikörper

Alle in Tabelle 8 aufgeführten Sekundärantikörper sind polyklonal von der Spezies Ziege.

**Tabelle 8: Sekundärantikörper**

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	AlexaFluor 546	IF 1:450	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Anti-Maus	Horseradish Peroxidase (HRP)	WB 1:10.000	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen	AlexaFluor 546 AlexaFluor 647	IF 1:450	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Anti-Kaninchen	HRP	WB 1:10.000	Dianova, Hamburg

## 4.7 Protein-Größenstandard

In der SDS-PAGE wurde die PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter (10 bis 180 kDa) von Thermo Scientific™ als Maßstab für die Laufhöhe der Proteine verwendet.

## 4.8 Zellkultur

### 4.8.1 Zelllinien

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden in HaCaT-Zellen (*human adult low calcium high temperature keratinocytes*) durchgeführt. Die HaCaT-Zelllinie ist eine Epithelzelllinie aus adulter humaner Haut, die trotz ihrer Immortalität als nicht tumorigen gilt. Die Zellen weisen eine normale Differenzierung auf und proliferieren *in vitro* (135). Da die in dieser Arbeit untersuchten HPV16 humane Keratinozyten infizieren, stellt die Zellkultur aus HaCaT-Zellen eine geeignete Basis für die Versuche dar.

Bei der Herstellung der HPV16-PsV (5.3.2) wurde außerdem die Zelllinie HEK 293TT (*human embryonic kidney*) verwendet. Diese Zellen exprimieren zusätzlich zwei Antigene



des Simian-Virus 40. Sie gelten als bewährte Zellen für die Produktion von Papilloma-Pseudoviren (136).

**Tabelle 9: Zelllinien HaCaT und HEK 293TT**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft, Referenz</b>
HaCaT	Spontan immortalisierte humane Keratinozyten	CLS Cell Lines Services, Eppelheim (Boukamp et al.1988) (135)
HEK 293TT	Humane embryonale Nierenepithelzellen mit zusätzlichen zwei T-Antigenen des Simian-Virus-40	Chris Buck, Bethesda, MD (Buck et al. 2004) (136)

#### 4.8.2 Medien und Zusätze

**Tabelle 10: Medien und Zusätze**

<b>Produkt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Antibiotikum	Ciprofloxacin	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Fetales Kälberserum (FCS)	Fetal Bovine Serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
Nicht essentielle Aminosäuren	MEM Non-essential Amino Acid Solution (100×)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA;
Trypsin/EDTA	0.05 % Trypsin/EDTA (1x), Phenolrot, Gibco™	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA
Zellkulturmedium	DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose 4,5 g/L, GlutaMAX™ (L-Alanin-L-Glutamin-Dipeptid) Supplement, Gibco™</i> )	ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Waltham, USA

---

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten HaCaT- und HEK 293TT- Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % nichtessentiellen Aminosäuren (NEA) kultiviert. Dem Medium wurde 0,25 % Ciprofloxacin zugefügt, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> adhärent im Monolayer herangezogen. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurde stets steril gearbeitet. Die jeweiligen Experimente wurden in DMEM/10 % FCS/1 % NEA ohne Antibiotikazugabe durchgeführt.

#### 5.1.2 Passagieren der Zellen

Abhängig von ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurde ein Teil der Zellen bei etwa 80 bis 90 % Konfluenz in der Kulturflasche in frisches Kulturmedium passagiert, um ein ausreichendes Substratangebot zu gewährleisten.

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt und rückständiges FCS mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 2,5 mM EDTA abgewaschen. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig mit 1 ml 0,05 % Trypsin/EDTA benetzt und für fünf bis zehn Minuten bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst haben. Nach der Zugabe von 9 ml auf Raumtemperatur angewärmtes DMEM/10 % FCS/1 % NEA wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren vereinzelt und resuspendiert. Je nach Konfluenz wurde 1/10 bis 1/5 der Zellen mit 20 ml DMEM/10 % FCS/1 % NEA/0,25 % Ciprofloxacin in eine neue Kulturflasche gegeben zur weiteren Kultivierung.

Für die Vorbereitung der Experimente wurde die Zellzahl der übrigen Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. So konnte gewährleistet werden, dass die Versuche mit konstanter Zellzahl unter reproduzierbaren und vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden konnten. Die für ein Experiment benötigte Anzahl an Zellen konnte dann in Mikrotiterplatten herangezogen werden.

## 5.2 Transfektionen

Die Transfektion von DNA-Plasmiden als Expressionsvektoren in HaCaT-Zellen führt über die Transkription und Translation von bestimmten Genen zu der gezielten Bildung von Proteinen. Dies ermöglicht zudem die Expression von Proteinen, die an grün fluoreszierende Proteine, wie *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) oder Emerald, verknüpft sind. Diese können anschließend ohne weitere Anfärbung direkt in der Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. DNA-Transfektionen werden ebenfalls verwendet, um HPV16-Reporterplasmide direkt in die Zellen einzubringen. Dadurch wird die Regulierung des HPV16-LCR Promotors ohne Beeinflussung durch Prozesse bei der Internalisierung der Viren analysiert.

### 5.2.1 DNA-Transfektion mit Polyethylenimine (PEI)

Für die DNA-Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenzes PEI wurden 70.000 HaCaT-Zellen in einer 24-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Je Well wurde 1 µg DNA in 50 µl DMEM mit 1,5 µl PEI in 50 µl DMEM angesetzt. Der Ansatz wurde gemischt, kurz an zentrifugiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Ansatzes gleichmäßig auf die am Vortag ausgesäten und im Inkubator bebrüteten Zellen gegeben. Vor der Durchführung der Experimente wurde stets das Medium gewechselt. Dadurch wurden bereits abgelöste Zellen entfernt, sodass die Versuche ausschließlich an intakten Zellen durchgeführt wurden. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. PEI gilt als effizientes Transfektionsreagenz mit geringer Zytotoxizität (137). Um zytotoxische Effekte dennoch ausschließen zu können, wurde nach fünf Stunden Inkubation das Medium gewechselt.

### 5.2.2 DNA-Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Sollte nach der DNA-Transfektion noch eine Infektion mit HPV16-PsV angeschlossen werden, wurde Lipofectamine™ 2000 anstelle von PEI verwendet. Dies begründet sich darin, dass PEI ein bekannter Inhibitor der HPV-Infektion ist, indem er die primäre Bindung der Viren an die Keratinozyten verhindern kann (138). Die entsprechenden Versuche wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Daher wurden steril abgeflamte runde Deckgläser in eine 12-Well-Mikrotiterplatte gelegt und darauf jeweils 140.000 HaCaT-Zellen in Kulturmedium ohne Antibiotikum ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator bebrütet.

Es wurden je Well 3  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 mit 100  $\mu\text{l}$  DMEM gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden 1,6  $\mu\text{g}$  DNA mit 100  $\mu\text{l}$  DMEM gemischt. Beide Ansätze wurden zusammengegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je Well 200  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf die Zellen pipettiert und die Mikrotiterplatte für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei nach fünf Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, um zytotoxische Reaktionen durch das Transfektionsreagenz auszuschließen.

### 5.2.3 siRNA-Transfektion mit Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX

Eine andere Art der Transfektion ist die sogenannte siRNA-Transfektion, die der gezielten Abschaltung von Genen mittels RNA-Interferenz dient. Dabei blockiert die siRNA eine bestimmte *messenger-RNA*, die daraufhin abgebaut wird. Dies verursacht die Depletion des entsprechenden Proteins aufgrund der eingestellten Proteinsynthese. Zellen, denen siRNA transfiziert wurde, werden auch Knockdown-Zellen genannt.

Wurde nach der siRNA-Transfektion eine Infektion mit HPV16-PsV durchgeführt, wurden 30.000 HaCaT-Zellen ausgesät. Wurde eine Transfektion von Reporterplasmiden angeschlossen, wurden 70.000 HaCaT-Zellen verwendet. Die Zellen wurden jeweils in einer 24-Well-Mikrotiterplatte in DMEM/10 % FCS/1 % NEA ausgesät und für 24 Stunden im Inkubator bebrütet. Im Anschluss wurde das Medium gewechselt und die siRNA-Transfektion vorbereitet. Um potentiellen Verunreinigungen vorzubeugen, wurden die Sterilbank sowie die verwendeten Pipetten mit RNase Exitus gereinigt. Außerdem wurden Pipettenspitzen mit Filtern verwendet. Je Well wurden zuerst 0,8  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX und 0,9  $\mu\text{l}$  siRNA (20  $\mu\text{M}$ ) separat in jeweils 50  $\mu\text{l}$  DMEM verdünnt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert, bevor der Ansatz auf die Zellen gegeben wurde. Um einen ausreichenden Gen-Knockdown zu erreichen, wurde die Mikrotiterplatte im Anschluss für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

---

## 5.3 Luciferase basierte Reportergen-Assays

### 5.3.1 HPV16-Pseudoviren

Um zelluläre Mechanismen im Rahmen einer viralen Infektion gefahrlos *in vitro* nachbilden zu können, werden Infektionsversuche mit Pseudoviren (PsV) durchgeführt. Diese gelten als weit verbreitetes und geeignetes Instrument der Erforschung von HPV, um neben der HPV-Zusammensetzung auch den Virus-Eintritt sowie die Infektiosität zu untersuchen (1). Die Herstellung von HPV16-Pseudoviren (HPV16-PsV) erfolgt beispielsweise nach einem Protokoll von Buck et al. (136). Dabei entstehen HPV16-PsV mit einem Kapsid aus L1- und L2-Proteinen und einem darin verbauten Pseudogenom. Das Pseudogenom, auch Reporterplasmid genannt, enthält einen Promotor, welcher die Expression eines Reportergens reguliert (85). Dafür werden zum Beispiel Luciferase-Gene verwendet, die für die gleichnamigen Luciferase-Enzyme kodieren. Diese katalysieren unter Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) und Magnesiumionen durch Oxidation ihres Substrates Luciferin eine biolumineszente Reaktion (139). Die dabei entstehende Lichtemission kann mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden und dient in Infektionsversuchen als Maß für eine erfolgreiche Infektion.

### 5.3.2 Herstellung von HPV16-Pseudoviren

Die Infektionsversuche in dieser Arbeit wurden mit eigenständig hergestellten HPV16-PsV durchgeführt. Diese tragen als Pseudogenom die *long control region* (LCR) von HPV16, die den frühen P97 Promotor enthält, und ein Luciferase-Gen. Um diese nach dem Protokoll von Buck et al. (136) zu produzieren, wurden HEK 293TT Zellen in DMEM/10 % FCS kultiviert. Die Codon-optimierten L1- und L2-Expressionsvektoren pShell16L1/L2wt wurden zu gleichen Teilen mit dem pGL4.20 HPV16-LCR-Luciferase reporter plasmid in DMEM gegeben. Hierfür wurden für eine 175 cm<sup>2</sup> messende Zellkulturflasche je 25 µg verwendet. In einem zweiten Ansatz wurden 75 µl des Transfektionsreagenzes PEI mit DMEM gemischt. Die beiden Ansätze wurden miteinander für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Um eine ausreichende Expression der viralen Kapsidproteine zu gewährleisten, erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, wobei nach fünf Stunden das Medium gewechselt wurde. Nach 48 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS/EDTA (2,5 mM) vorsichtig gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 1,5 ml Trypsin benetzt, in 8,5 ml DMEM aufgenommen und in einen 50 ml Falcon überführt. Dieser wurde dreimal für zehn Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute und

Raumtemperatur zentrifugiert. Dazwischen wurden die Zellen zweimal in 20 ml PBS/MgCl<sub>2</sub> (9,5 mM) gewaschen und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl PBS/MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit Silikonbeschichtung überführt. Bei einem Volumen von etwa 700 µl wurden 35 µl Brij58 (0,5 %) und 1 µl Benzonase (0,1 %) zugegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Detergenz Brij58 bewirkt eine Zellyse, die durch die Nukleaseaktivität des Enzyms Benzonase und dessen Abbau von freier DNA ergänzt wird. Den Zellen im Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 125 µl NaCl (5 M) zum Stoppen der Benzonase zugefügt. Danach wurden sie für zehn Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Ansatz mit 3500 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert, wodurch Zellbruchstücke von den Viren getrennt wurden. Der Überstand, der die entstandenen Pseudoviren enthält, wurde zur Aufreinigung auf einen Dichtegradienten pipettiert und mit 55.000 Umdrehungen pro Minute bei 16 °C für 3,5 Stunden in der SW55 Ultrazentrifuge zentrifugiert. Um einen solchen Stufengradienten zu erhalten, wurde die 60 % OptiPrep Iodxanollösung mit PBS/NaCl (0,8 M) zu Lösungen mit 39 %, 33 % und 27 % OptiPrep verdünnt. 1,4 ml der 39 % OptiPrep Lösung wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert, gefolgt von 1,4 ml der 33 % und 1,4 ml der 27 % Lösung. Vor der Benutzung des Gradienten inkubiert dieser für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Durch den Dichtegradienten trennen sich die PsV von den verbliebenen Zellbestandteilen. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Gradient in jeweils 300 µl fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe eines Luciferase basiertem Reporter-Assays (s. 5.3.5) auf ihre Infektiosität hin untersucht. Dabei wurde die Biolumineszenz mit Hilfe eines Luminometers als *Relative Light Units* (RLU) gemessen und als Maß für die Luciferaseaktivität verwendet. Die Fraktionen mit der höchsten Luciferaseaktivität wurden vereint und als HPV16-PsV in den Infektionsversuchen in dieser Arbeit verwendet.

### 5.3.3 Infektionsversuche mit HPV16-PsV

Im Rahmen der Untersuchung des ErbB2 wurden Infektionen nach einer Transfektion von DNA-Plasmiden durchgeführt, die zu einer Überexpression des ErbB2 in den Zellen führte. Die Experimente wurden letztendlich mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet, weswegen 12-Well-Mikrotiterplatten verwendet wurden, in die auf runden steril abgeflamten Deckgläsern 140.000 HaCaT-Zellen ausgesät wurden. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Inkubator bebrütet, bevor sie einer DNA-Transfektion mittels

---

Lipofectamine™ 2000 unterzogen wurden. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen mit 2 µl der eigenständig hergestellten HPV16-PsV (s. 5.3.2) infiziert.

Für die Infektionsversuche nach siRNA-vermittelter Depletion der Laminin-bindenden Integrine wurde eine 24-Well-Mikrotiterplatte mit 30.000 HaCaT-Zellen je Well verwendet. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Inkubator bebrütet, bevor die siRNA-Transfektion durchgeführt wurde. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor sie mit 1 µl der HPV16-PsV infiziert wurden. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen, die davon abgesehen identisch behandelt wurden. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Infektionsversuche mit Hilfe des Luciferase basierten Assays ausgewertet. Das entsprechende Protokoll wird in 5.3.5 beschrieben. Die dadurch ermittelten Werte wurden auf die Werte der Kontrollzellen normalisiert, wodurch die relative Infektionsrate durch die HPV16-PsV festgestellt wurde.

#### **5.3.4 Promotoranalysen mit Reporterplasmiden**

Mit Hilfe von Promotoranalysen kann die Aktivität eines Promotors differenziert untersucht werden. Dafür werden Reporterplasmide direkt in die Zellen transfiziert, wodurch die Vorgänge der viralen Internalisierung aus den Versuchen eliminiert werden. Unterschiede in der Regulierung eines Promotors können durch vergleichende Analysen detektiert werden, indem Experimente unter gleichen Bedingungen mit verschiedenen Promotoren durchgeführt werden. Die verwendeten Reporterplasmide *pGL4.20 HPV11-LCR-luciferase reporter plasmid*, *pGL4.20 HPV16-LCR-luciferase reporter plasmid* und *pGL4.20 HPV18-LCR-luciferase reporter plasmid* tragen jeweils das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des HPV11, HPV16 oder HPV18 LCR. Dabei dient die Luciferase als Reporter gen der Quantifizierung der Genexpression. Dadurch kann die Aktivität des Promotors sowie dessen Beeinflussung durch aktivierende oder inaktivierende Signale untersucht werden. Mit Hilfe von Promotoranalysen können somit Induktoren oder Inhibitoren der Genexpression identifiziert werden.

Zudem wurde die Regulation des CMV Promotors durch die Verwendung des *pcDNA3.1(+)/ luciferase reporter plasmid* im Vergleich zu dem HPV16-LCR Promotor untersucht. Dies begründet sich darin, dass der CMV Promotor bei der Herstellung von HPV16-Pseudoviren weit verbreitet ist. Um die Vorgänge an der Plasmamembran und der Endozytose zu untersuchen, ist dieses System ausreichend aussagekräftig, da die Vorgänge vor allem durch die viralen Kapsidproteine vermittelt werden. Werden jedoch

nachfolgende Schritte des Infektionszyklus, wie die Regulierung des viralen Promotors und die damit verbundene virale Genexpression untersucht, ist es relevant, den korrekten Promotor eines Virus zu verwenden. Dadurch kann die *in vivo* Regulierung des Promotors möglichst exakt in den durchgeführten Experimenten abgebildet werden. Im Fall von HPV16 handelt es sich dabei um den HPV16-LCR Promotor. Daher wurden vergleichende Promotor-Analysen durchgeführt, die mögliche Diskrepanzen bei der Verwendung des CMV Promotors aufzeigen sollten.

Für die Promotoranalysen wurden die Reporterplasmide mittels PEI in die HaCaT-Zellen transfiziert, wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde ein Luciferase-basiertes Assay zur Auswertung herangezogen (s. 5.3.5).

### **5.3.5 Auswertung der Luciferase basierten Reportergen-Assays**

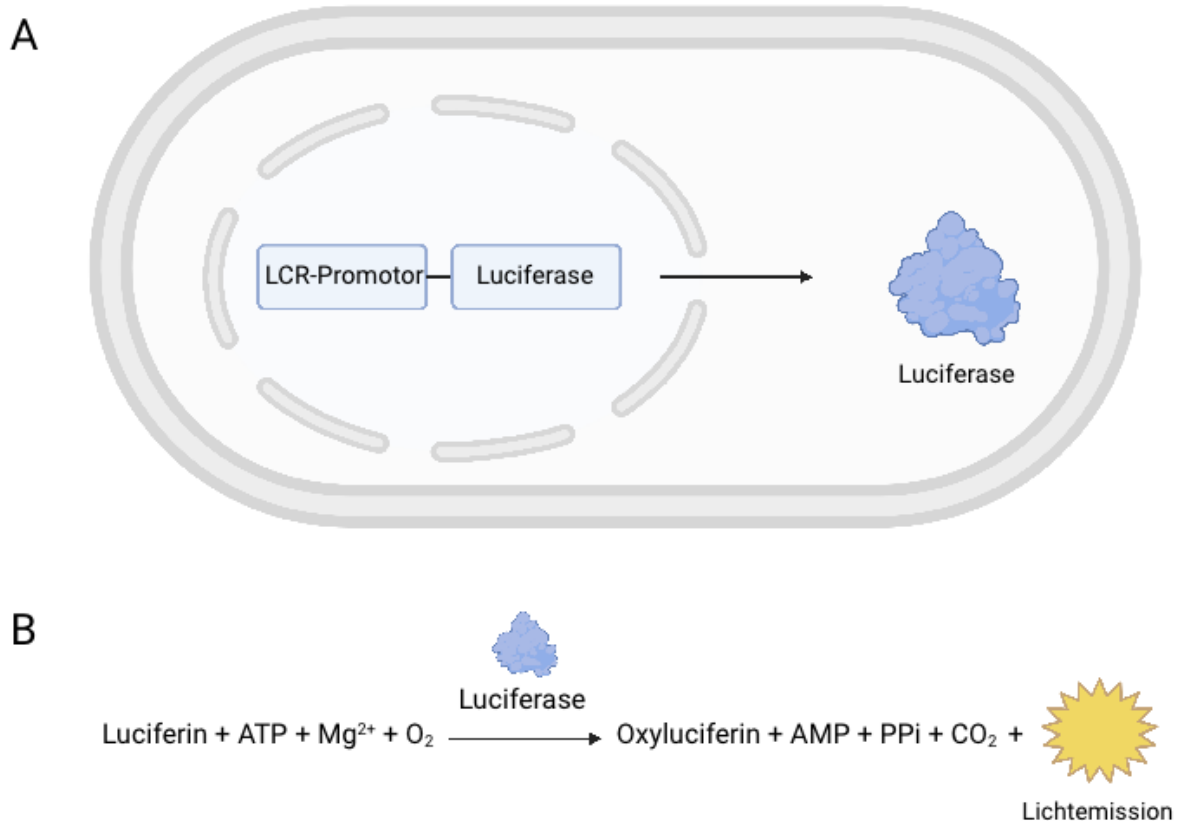
Die Auswertung der Infektions- und Promotorversuche erfolgt gleichermaßen anhand des folgenden Protokolls. Das Medium der 24-Well-Mikrotiterplatten wurde 24 Stunden nach einer Infektion mit den HPV16-PsV oder der Transfektion mit den Reporterplasmiden abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten für mindestens fünf Minuten bei -20 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen in 250 µl Lysepuffer *Luciferase Cell Culture Lysis 5x Reagent* aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden die Zellen durch mehrmaliges resuspendieren vom Zellboden abgespült und die Lysate jeweils in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Lysate für drei Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Vom Überstand wurden jeweils 150 µl des Lysats abgenommen und in weiße 96-Well Mikroplatten für die Lumineszenzmessung überführt. Zu jedem Well wurde durch den Luminometer automatisiert 50 µl Luciferase-Assay-Puffer zugegeben. Dieser enthält Luciferin als Substrat für die Luciferase, sowie ATP und Magnesiumionen. Die Expression des Reporterenzym Luciferase resultiert in einer mittels Luminometer messbaren Lichtemission.

Um diese Messwerte, die *Relative Light Units*, bezüglich der Zellzahl je Well standardisieren zu können, wurde anschließend die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) mit Hilfe des CytoTox-ONE™ *Homogeneous Membrane Integrity Assays* gemessen. Dazu wurden aus dem Lysat weitere 5 µl des Überstands in schwarze 96-



Well Mikroplatten überführt. In jedes Well wurden zusätzlich 50  $\mu\text{l}$  des CytoTox-ONE™-Reagenzes gegeben und die Platte für 15 Minuten lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 25  $\mu\text{l}$  der zugehörigen Stopp-Lösung hinzugefügt und direkt das Fluoreszenzsignal mit Hilfe des Luminometers gemessen. Die durch das LDH entstandene Fluoreszenzmenge dient als Maß für die Anzahl der Zellen je Well, zu der die gemessenen *Relative Light Units* ins Verhältnis gesetzt wurden.



**Abbildung 4: Luciferase basiertes Reportersystem (Eigene Abbildung)**

**A** Prinzip des Luciferase basierten Reportersystems. In die humane Zelle wird ein Pseudogenom eingebracht. Dieses enthält Luciferase als Reportergen unter der Kontrolle des zu untersuchenden Promotors. Im Fall von HPV16 ist dies der LCR-Promotor. Wird dieser aktiviert, erfolgt die Transkription und Translation des Luciferase-Gens. Das Luciferase-Enzym wird dadurch in der Zelle exprimiert.

**B** Auswertung des Luciferase basierten Reporterassays. Wird zu den Zellen, die Luciferase-Enzyme exprimieren, das Substrat Luciferin zugegeben, wird in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen  $\text{Mg}^{2+}$  die Oxidation zu Oxyluciferin in einer biolumineszenten Reaktion katalysiert. Die dabei entstehende Lichtemission wird mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

#### 5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proben hinsichtlich der enthaltenen Proteine analysieren zu können, wurden diese zuerst mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt. SDS, welches im Laemmli-Probenpuffer und -Laufpuffer sowie den SDS-PAGE-Lösungen B und C in unterschiedlicher Konzentration enthalten ist, überdeckt die Eigenladungen der Proteine, sodass diese konstant negativ geladen sind. Durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und das Erhitzen der Proben löst sich die Tertiärstruktur der Proteine auf und sie werden denaturiert. Insgesamt führt der Versuchsaufbau der SDS-PAGE dazu, dass sich die Proteinketten entsprechend ihres Molekulargewichts auf dem Polyacrylamid-Gel in dem angelegten elektrischen Feld bewegen, wobei kleinere Proteine stärker angezogen werden und sich somit am unteren Rand des Gels wiederfinden. Um die Proteine später ihrem Molekulargewicht zuordnen zu können, wird ein definierter Marker analog zu den Proben verwendet.

Die SDS-PAGE wurde nach 24 Stunden Inkubationszeit im Inkubator an eine Infektion oder Transfektion angeschlossen. Die jeweiligen Protokolle wurden bereits beschrieben. Das Medium wurde abgesaugt und die 24-Well-Mikrotiterplatte mit PBS (1x) gewaschen. Die Zellen jedes Wells wurden in 70  $\mu$ l 2,5x Laemmli-Probenpuffer/10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt.

Aufgrund der unterschiedlichen Größe der zu untersuchenden Proteine wurde ein 10 % Trenngel für die Integrine und ein 7,5 % Trenngel für das ErbB2 vorbereitet. Dieses dient der Auftrennung der Proteine, da es durch seine polymere Struktur wie ein Sieb fungiert. Für ein 10 % Trenngel wurden 14,2 ml destilliertes Wasser mit 11,7 ml Acrylamid Stammlösung und 8,8 ml der SDS-Page-Lösung B vermischt. Für ein 7,5 % Trenngel wurden 17,2 ml destilliertes Wasser, 8,8 ml Acrylamid Stammlösung und ebenfalls 8,8 ml der SDS-Page-Lösung B verwendet.

Den Ansätzen wurden jeweils 350  $\mu$ l Ammoniumpersulfat (APS) und 17,5  $\mu$ l Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben. Das Trenngel wurde in eine vorbereitete Kammer gegossen und für 30 Minuten polymerisiert.

In der Zwischenzeit wurde ein 5 % Sammelgel vorbereitet, welches der Konzentrierung dient, sodass alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel eintreten können. Dafür wurden

8,8 ml destilliertes Wasser mit 2,5 ml Acrylamid Stammlösung und 3,75 ml SDS-Page-Lösung C vermischt. Dem Ansatz wurden 150 µl APS und 15 µl TEMED zugegeben. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingelegt, um dadurch die Probenaschen zu formen. Nach 30 Minuten war die Polymerisierung abgeschlossen und das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Diese wurde mit 1l 10x Laemmli-Laufpuffer gefüllt und die vorbereiteten Proben und Marker wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Laufzeit der Elektrophorese hat dabei drei Stunden bei 200 V und 75 mA betragen. Anschließend wurde das Gel entnommen und die Proteine mit Hilfe eines Western Blots auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

### 5.5 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung, auch Blotting genannt, von Proteinen auf eine Trägermembran, um diese im Anschluss nachweisen zu können. Erfolgt der Western Blot beispielsweise nach einer SDS-PAGE, werden die aufgetrennten Proteine vom Trenngel fest auf die Trägermembran, wie beispielsweise eine Nitrocellulosemembran, übertragen. Nach der abgeschlossenen SDS-PAGE wurde das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel entfernt. Das Trenngel und die Nitrocellulosemembran wurden mit Western Blot-Transferpuffer befeuchtet und blasenfrei in eine Kassette gelegt. Diese wurde in die Blot-Kammer eingespannt und mit dem Western Blot-Transferpuffer aufgefüllt. Da die untersuchten Proteine eine Größe von mehr als 90 kDa aufweisen, wurde bei 150 mA und Raumtemperatur über Nacht geblottet. Anschließend wurde die Membran mit destilliertem Wasser und PBS (1x) gewaschen. Der Erfolg des Proteintransfers wurde mit Hilfe einer Ponceau S-Lösung kontrolliert. Diese kann unspezifisch die Proteine auf der Membran anfärben. Um die auf die Nitrocellulosemembran übertragenen Proteine spezifisch mittels Immundetektion zu ermitteln, wurde die Membran zuerst bei Raumtemperatur für mindestens 20 Minuten mit PBS-Tween (0,1 %) und 5 % Milchpulver geblockt, um unspezifische Bindung zu verhindern. Der Primärantikörper, der spezifisch an ein Epitop des zu untersuchenden Proteins bindet, wurde 1:1000 in PBS/5 % Milchpulver verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem Sekundärantikörper, 1:10000 in PBS/5 % Milchpulver verdünnt, inkubiert. Dieser ist gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet und an das Enzym HRP gekoppelt, welches durch Chemilumineszenz zur Detektion herangezogen werden

kann. Dafür wurde die Membran nach Herstellerangaben mit dem Western Lightning™ Plus-ECL behandelt. Das darin enthaltene Luminol dient als Substrat für HRP, welches die chemilumineszente Reaktion katalysiert. Damit kann in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm belichtet und anschließend entwickelt werden.

Um die Ergebnisse der SDS-PAGE und des Western Blot korrekt interpretieren zu können, wurden standardmäßig Ladekontrollen verwendet. Dies stellt sicher, dass in den unterschiedlichen Proben jeweils eine vergleichbare Proteinmenge enthalten ist. Es wurde darauf geachtet, dass die Signale der Ladekontrolle zwischen den Proben eines Versuches nicht variieren. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Dazu wurde der Primärantikörper Anti- $\beta$ -Aktin (Maus) 1:20000 und der Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP (Ziege) 1:10000 in PBS/5 % Milchpulver verdünnt. Die Antikörper wurden entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll im Anschluss an die Detektion der zu untersuchenden Proteine auf die Nitrocellulosemembran gegeben und wiederum ein Röntgenfilm entwickelt. Aktin besitzt ein Molekulargewicht von 48 kDa, wodurch es deutlich kleiner ist, als die zu untersuchenden Proteine in dieser Arbeit. Dadurch konnte eine eindeutig abgrenzbare Ladekontrolle sichergestellt werden.

## **5.6 Fluoreszenz-Bildgebung**

### **5.6.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Um indirekte Immunfluoreszenzfärbungen herzustellen, wurden 140.000 HaCaT-Zellen je Well auf steril abgeflamten Deckgläsern in 12-Well-Mikrotiterplatten in DMEM/10 % FCS/1 % NEA ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden einer DNA-Transfektion mittels PEI unterzogen, um modifizierte ErbB2-Proteine zu exprimieren, und für weitere 24 Stunden inkubiert (s. 0). Sofern anschließend eine Infektion mit HPV16-PsV erfolgen sollte, wurde Lipofectamine™ 2000 als Transfektionsreagenz verwendet und eine zusätzliche Inkubationszeit von 24 Stunden zwischen DNA-Transfektion und Infektion gewährleistet (s. 6.1.1 und 6.1.2). Das Medium wurde abgesaugt und die Platte mit PBS (1x) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (1x) für zehn Minuten fixiert. Für die Versuche zu ErbB2, deren Ergebnisse in 6.1.1 und 0 dargestellt sind, erfolgte zusätzlich eine Inkubation mit 0,2 % Triton X-100 für zwei Minuten. Um die Reagenzien vollständig von den Zellen zu entfernen, wurde gründlich mit PBS (1x) gewaschen. Bei Raumtemperatur wurde mit 1 % BSA (bovines

Serumalbumin) in PBS für 30 Minuten auf dem Schüttler geblockt. Die Primärantikörper wurden in 1 % BSA-PBS verdünnt (Anti-L1 1:1000, Anti-CD151 1:100). Davon wurden 50 µl auf jedes Deckglas gegeben. Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert, um Evaporation zu vermeiden. Anschließend wurde wieder mit PBS (1x) gewaschen und erneut mit 1 % BSA-PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:450 in 1 % BSA-PBS analog zum Primärantikörper verwendet und ebenfalls für eine Stunde inkubiert. Die Deckgläser wurden in 1 Tropfen Fluoprep eingebettet. Vor der Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop wurde mindestens eine Stunde gewartet.

### **5.6.2 Fluoreszenz-basierte DNA- und Zellkern-Färbung**

Um die Zellkerne unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurde eine Fluoreszenz-basierte DNA- und Zellkern-Färbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 verwendet. Dazu wurden die Deckgläser nach der Behandlung mit den Primär- und Sekundärantikörpern für die indirekte Immunfluoreszenz (s. 5.6.1) zusätzlich mit einer Lösung aus Hoechst 33342 1:10.000 verdünnt in 1 % BSA-PBS für zehn Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **5.6.3 Fluoreszenzmikroskopie**

Im Anschluss an die indirekten Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Fluoreszenz-basierte Zellkern-Färbung wurden Aufnahmen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops und der Zeiss AxioCam Digitalkamera bei einer 10-, 40- oder 100-fachen Vergrößerung erstellt. Die für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Sekundärantikörper sind an ein Fluorochrom konjugiert, welches durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird und dadurch die Emission von Licht eines anderen definierten Wellenlängenspektrums auslöst. Dieses emittierte Licht kann wiederum zur Detektion herangezogen werden. Direkt fluoreszierende Proteine wie EGFP oder Emerald können ebenfalls mit Hilfe verschiedener Filter des Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden.

---

## 5.7 Statistische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Versuche mindestens drei Mal mit biologischen Replikaten wiederholt. Die deskriptiven Daten wurden mittels relativer Häufigkeit, Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Diese statistische Analyse wurde mit dem Statistikprogramm Excel Version 16.43 für macOS durchgeführt. Mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 27 für macOS wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft (Signifikanzlevel  $\alpha$  0,05). Da in den ausgewerteten Versuchen für jeweils eine oder mehrere Variable keine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen anschließend der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Wurde hierbei eine asymptotische Signifikanz auf dem Signifikanzlevel  $p < 0,05$  ermittelt, wurden paarweise Vergleiche der Gruppen für unabhängige Stichproben angeschlossen.

Die p-Werte wurden folgendermaßen angegeben:

\*-signifikant entspricht  $p < 0,05$

\*\* -signifikant entspricht  $p < 0,01$

\*\*\*-signifikant entspricht  $p < 0,001$

## 6 Ergebnisse

### 6.1 ErbB2 als neu identifizierter Interaktionspartner der HPV16-Viren

Trotz umfangreicher Forschung ist der genaue Infektionszyklus durch HPV16 noch nicht umfassend geklärt. Von besonderem Interesse und immer noch ungeklärt ist die Komposition des sekundären Rezeptorkomplexes, der zur Aufnahme von HPV16 über einen neuen Endozytosemechanismus führt. Um mögliche Rezeptorkandidaten zu identifizieren, wurde in der AG Florin eine quantitative Proteomanalyse (s. 2.3) durchgeführt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 in den Endosomen von HPV16 infizierten Keratinozyten im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich angereichert war (AG Florin, Manuskript eingereicht).

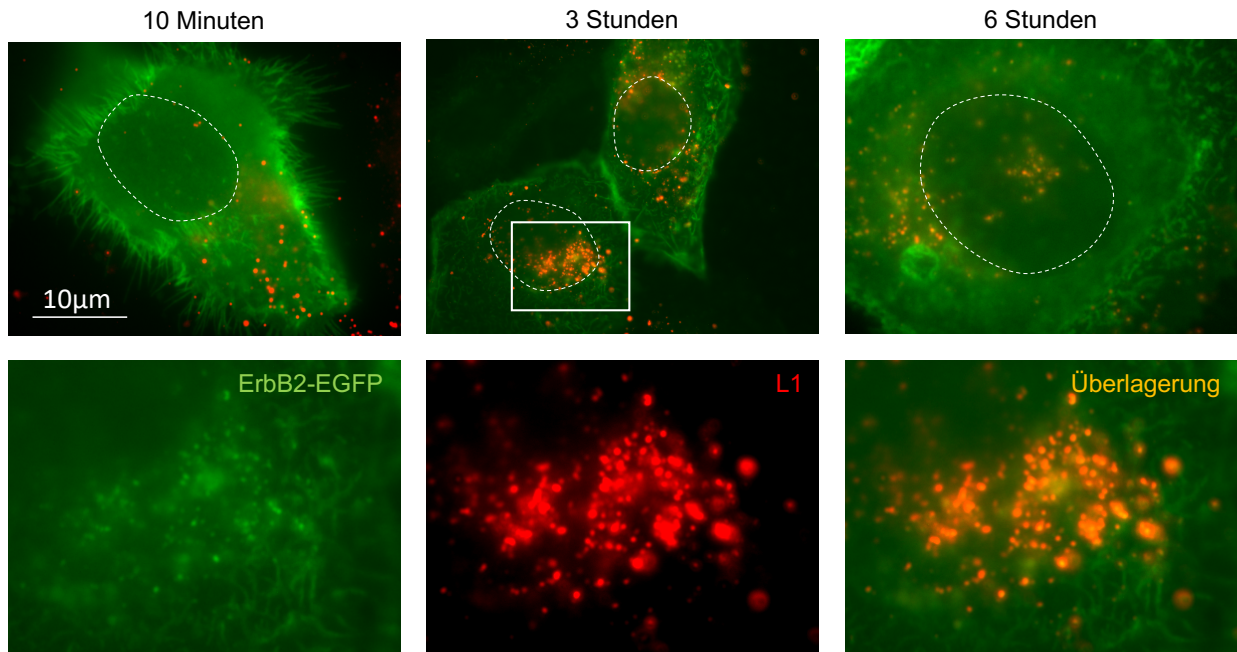
#### 6.1.1 ErbB2 wird mit HPV16 kointernalisiert

Da ErbB2 ein membranständiger Wachstumsfaktorrezeptor ist, lässt die Anreicherung in den Endosomen eine Kointernalisierung mit HPV16 vermuten. Um eine mögliche Interaktion bzw. Assoziation von ErbB2 und HPV16 darstellen zu können, wurde eine Immunfluoreszenz-Bildgebung infizierter Zellen durchgeführt.

Dafür wurden 140.000 HaCaT-Zellen mit ErbB2-pEGFP-N1 Plasmiden mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000 transfiziert. Dadurch exprimieren die Zellen ErbB2 Proteine gekoppelt mit dem verstärkten (*enhanced*) grün fluoreszierenden Protein EGFP (ErbB2-EGFP) und können direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den HPV16-PsV infiziert. Um die Interaktion im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden Inkubationszeiten von zehn Minuten, drei Stunden oder sechs Stunden gewählt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 % PFA und Triton X-100 fixiert und permeabilisiert. Das L1 Kapsidprotein der HPV16-PsV wird mittels einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Das Protokoll ist in Abschnitt 5.6.1 beschrieben. Als Primärantikörper wurde das polyklonale L1 Kaninchen Antiserum K75 verwendet, als Sekundärantikörper Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege mit dem Konjugat AlexaFluor 546. Im Anschluss wurde der Zellkern mit Hoechst 33342 angefärbt (s. 5.6.2).

Der Versuch wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M ausgewertet. Hierbei wurde auf eine Kolo-kalisation von ErbB2-EGFP (in Grün) mit L1 (in Rot) geachtet,

welche sich in den Aufnahmen der überlagerten Fluoreszenzkanäle als gelbes Signal erkennen lässt. Über den zeitlichen Verlauf von sechs Stunden sieht man eine räumliche Überlagerung der HPV16-PsV mit ErbB2 in vesikulären Strukturen, mit einem Maximum nach 3 Stunden HPV16 PsV-Inkubation. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung der gemeinsamen Internalisierung von HPV16 und ErbB2.



**Abbildung 5: Kolokalisation des L1 Kapsidproteins mit ErbB2-EGFP**

**Oben:** Repräsentative Übersichts-Immunfluoreszenzaufnahmen von HaCaT-Zellen nach Transfektion von ErbB2-pEGFP-N1 Plasmiden mittels Lipofectamine™ 2000 und anschließender Infektion mit HPV16-Pseudoviren für zehn Minuten (Links), drei Stunden (Mitte) oder sechs Stunden (Rechts). Indirekte Immunfluoreszenzfärbung des L1 Kapsidproteins von HPV16 mittels K75 (Kaninchen) und anti-Kaninchen Antikörper Alexa Fluor 546 (Ziege). Zu sehen sind L1 (Rot), ErbB2-EGFP (Grün), Zellkerne (weiß gestrichelt umrandet).

**Unten:** Vergrößerte Darstellung der Kolokalisation von ErbB2-EGFP und L1 drei Stunden nach der Infektion mit HPV16-PsV. Gezeigt wird die Vergrößerung des eingezeichneten Bildausschnitts der oberen Reihe in verschiedenen Fluoreszenzkanälen sowie deren Überlagerung. Zu sehen ist eine Kolokalisation (Gelb) von L1 (Rot) mit ErbB2-EGFP (Grün).



### 6.1.2 ErbB2 kolokalisiert mit dem Tetraspanin CD151

Nachdem die Assoziation und Kointernalisierung von ErbB2 und HPV16 in der Immunfluoreszenzbildgebung bestätigt wurde, stellte sich die Frage, ob ErbB2 an der Ausbildung der HPV16-induzierten Eintrittsplattform beteiligt ist. Für das Tetraspanin CD151 konnte in Studien gezeigt werden, dass es mit verschiedenen Proteinen der Plasmamembran interagieren kann und eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Tetraspanin reichen Mikrodomänen (TEMs) spielt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass CD151 funktionell an der Virusaufnahme beteiligt ist (59). Daher wurde eine mögliche Komplexbildung von ErbB2 mit CD151 auf der Plasmamembran untersucht.

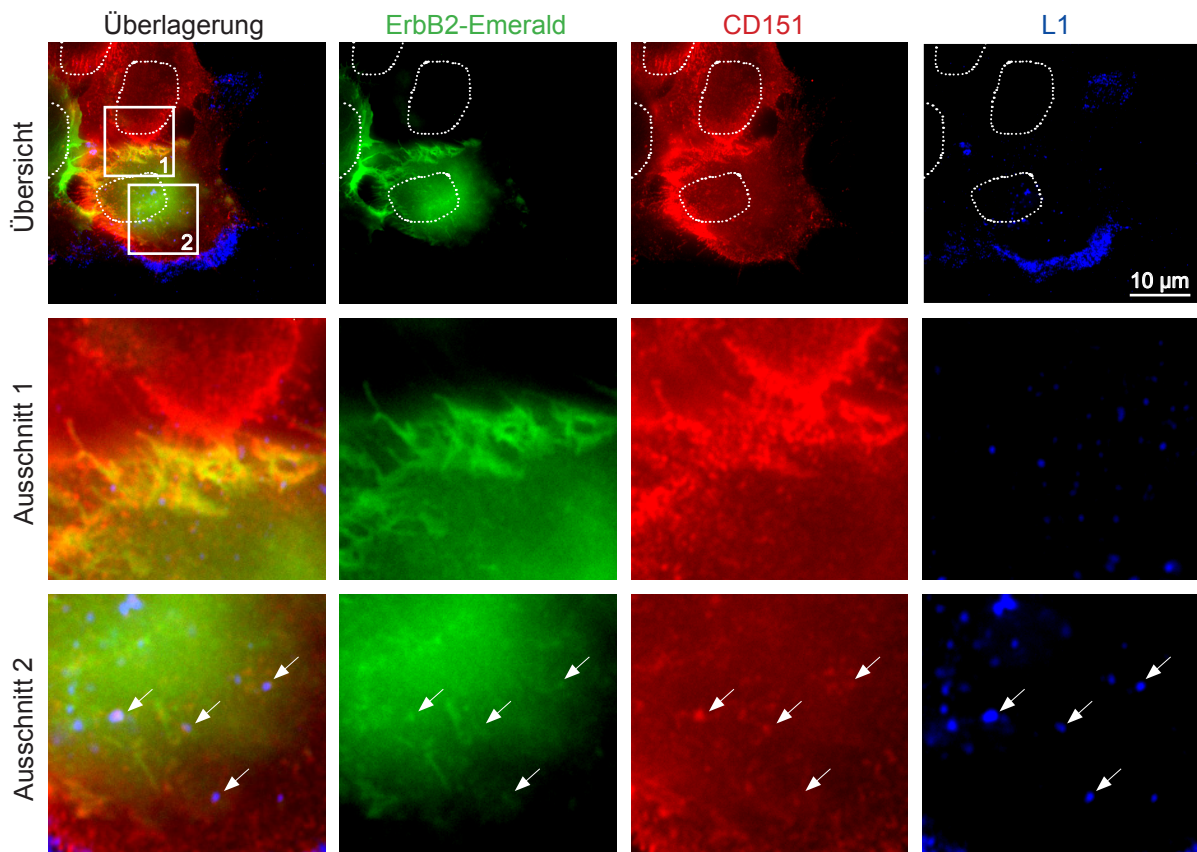
Dafür wurden HaCaT-Zellen zuerst mit ErbB2-Emerald-Plasmiden (mEmerald-ERBB2-N-18) mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000 transfiziert. Dadurch wurde von den Zellen ErbB2 gekoppelt an grün fluoreszierende Emerald-Proteine exprimiert. Dies ermöglicht die direkte Darstellung der Proteine unter dem Fluoreszenzmikroskop. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit HPV16-PsV inkubiert. Sechs Stunden später wurden die Zellen mit PFA fixiert und eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung, wie in 5.6.1 beschrieben, durchgeführt. Dieses Mal wurden die HPV16-PsV zusammen mit CD151 durch Antikörperfärbungen dargestellt und unter dem Fluoreszenzmikroskop in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen sichtbar gemacht werden. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 11 dargestellt. Anschließend wurde noch eine Fluoreszenzbasierte DNA-Färbung mittels Hoechst 33342 durchgeführt (s. 5.6.2).

**Tabelle 11: Primär- und Sekundärantikörper für die Darstellung von CD151 und L1**

Ziel	Primärantikörper	Sekundärantikörper
CD151	Anti-CD151 (Maus)	Anti-Maus Alexa Fluor 546 (Ziege)
L1	Anti-L1 K75 (Kaninchen)	Anti-Kaninchen Alexa Fluor 647 (Ziege)

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Auswertung konnte eine deutliche Kolokalisation von ErbB2-Emerald (in Grün) mit CD151 (in Rot) in typischen Oberflächenstrukturen von HaCaT-Zellen beobachtet werden, was eine Interaktion von CD151 und ErbB2 vermuten lässt. Das L1-Kapsidprotein von HPV16 (in Blau) lokalisierte außerdem besonders an

Stellen erhöhter CD151/ErbB2 Akkumulation (s. Abbildung 6). Dadurch bestätigt auch dieses Experiment die Vermutung, dass ErbB2 ein Teil des sekundären Rezeptorkomplexes ist und ErbB2, CD151 und HPV16 gemeinsam internalisiert werden.



**Abbildung 6: Kolokalisation von ErbB2-Emerald mit CD151 und L1**

Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von HaCaT-Zellen nach Transfektion von ErbB2-Emerald-Plasmiden mittels Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 und anschließender Infektion mit HPV16-PsV. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von CD151 mit Anti-CD151 (Maus) und Anti-Maus Alexa Fluor 546 (Ziege) Antikörpern. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung des L1-Kapsidproteins der HPV16-PsV mit Anti-L1 K75 (Kaninchen) und Anti-Kaninchen Alexa Fluor 647 (Ziege) Antikörpern. Zu sehen sind ErbB2-Emerald (Grün), CD151 (Rot), L1 (Blau) und die Zellkerne (Weiß gestrichelt umrandet).

**Oben:** Darstellung der Übersichtsaufnahme der einzelnen Fluoreszenzkanäle sowie deren Überlagerung (Links)

**Mitte:** Vergrößerung des Ausschnitt 1. Dieser Ausschnitt wurde ausgewählt, um die deutliche Kolokalisation (in Gelb) von ErbB2-Emerald und CD151 auf der Plasmamembran zu zeigen.

**Unten:** Vergrößerte Darstellung des Ausschnitts 2. Die Pfeile kennzeichnen in jedem Fluoreszenzkanal und der Überlagerungsaufnahme jeweils die gleichen Stellen und verdeutlichen die Kolokalisation von ErbB2-Emerald, CD151 und L1.

### **6.1.3 Vergleichende Untersuchungen zum ErbB2 Wildtyp Protein und der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS**

Um zu untersuchen, welchen Einfluss ErbB2 auf die einzelnen Schritte der HPV16 Infektion hat, wurden in der AG Florin diverse Analysen durchgeführt. Die siRNA vermittelte Depletion von ErbB2 (ErbB2-Knockdown) bestätigten die funktionelle Beteiligung des Proteins bei der HPV16 Infektion (AG Florin, Manuskript eingereicht). Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch in weiteren Untersuchungen, dass ErbB2 nur geringfügig die Virusaufnahme in die Zelle beeinflusst. Daher lag die Vermutung nahe, dass ErbB2 die lange Kontroll Region (LCR) und den darin enthaltenen Promotor von HPV16 aktiviert. Hier kommen zwei Szenarien in Frage: Auf der einen Seite könnte ErbB2 durch Signaltransduktion über den ERK- oder Akt- Weg die HPV Genexpression aktivieren, auf der anderen Seite könnte ErbB2 selbst mit Hilfe des nuklearen Lokalisierungssignal (NLS) in den Zellkern translozieren und dort aktivierend wirken. Um diese Wirkungsweisen zu unterscheiden wurden das ErbB2 Wildtyp Protein und eine Mutante von ErbB2, der das Kernlokalisierungssignal fehlt, überexprimiert und die Wirkung auf die HPV Kolo-kalisation und Promotoraktivität untersucht.

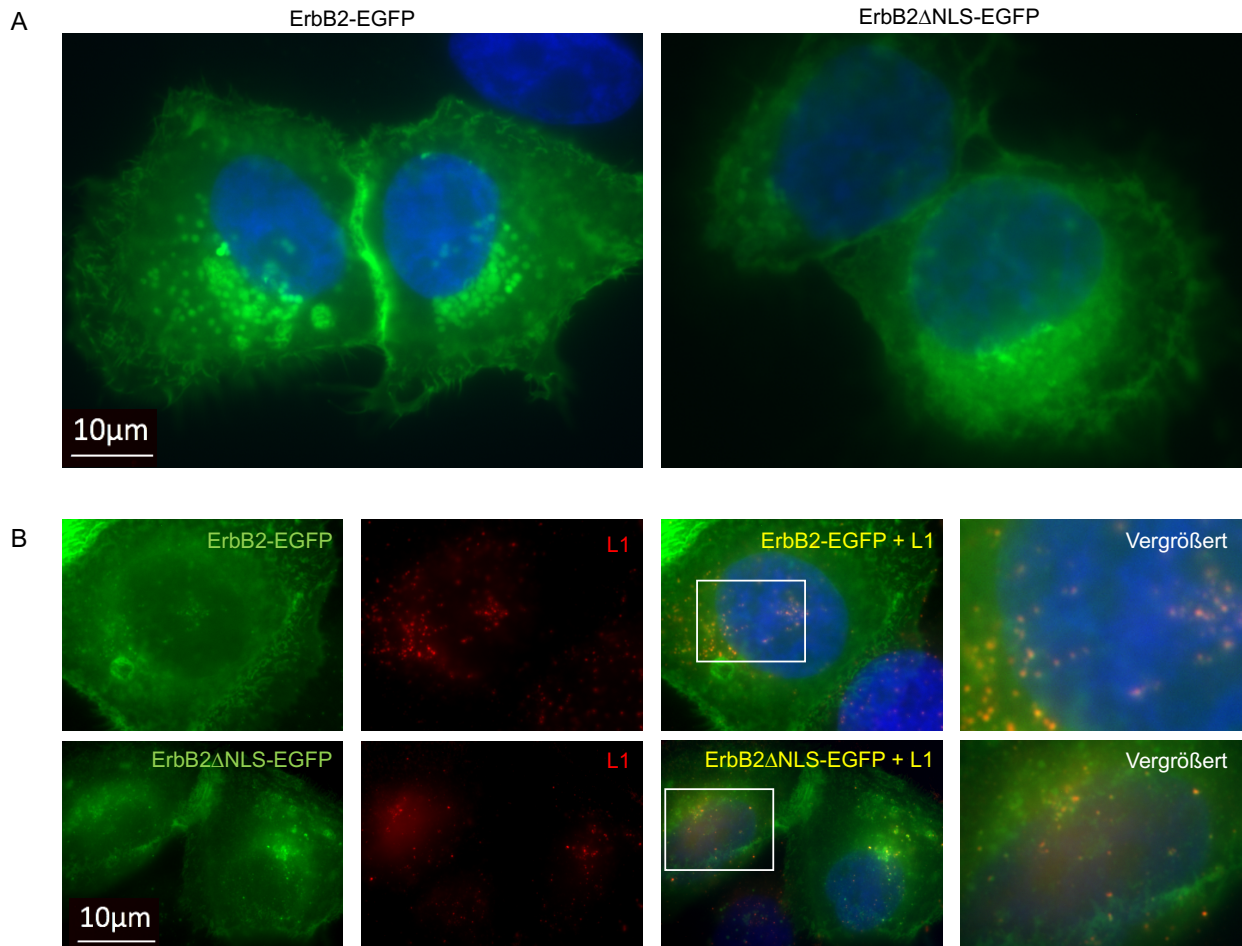
#### **6.1.3.1 ErbB2 und ErbB2 $\Delta$ NLS werden mit HPV16 kointernalisiert**

Als erstes wurde eine Immunfluoreszenzbildgebung durchgeführt, um ErbB2 und die Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS jeweils in infizierten Zellen sichtbar zu machen. Es wurde insbesondere auf mögliche Unterschiede bei der Internalisierung geachtet.

Dafür wurden Immunfluoreszenzfärbungen analog zu dem in 6.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Als Plasmide wurden entweder ErbB2-pEGFP-N1 oder ErbB2 $\Delta$ NLS-pEGFP-N1 mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000 transfiziert. Zuerst wurden nicht infizierte Zellen untersucht, um die Expression von ErbB2-EGFP und ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP darzustellen (Abbildung 7 A). Im Anschluss wurde der Versuch mit einer Infektion durch HPV16-PsV für sechs Stunden Inkubationszeit wiederholt (Abbildung 7 B). Dabei wurden die Zellen 24 Stunden nach der DNA-Transfektion infiziert. Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde K75 (Kaninchen) als Primärantikörper gegen das L1-Kapsidprotein von HPV16 verwendet. Als Sekundärantikörper wurde der anti-Kaninchen Antikörper Alexa Fluor 546 (Ziege) verwendet. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzbasierte Zellkernfärbung mittels Hoechst, wie in 5.6.2. beschrieben, durchgeführt.

Als Auswertungsmethode wurde die Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. In der qualitativen Analyse der nicht-infizierten Zellen zeigt sich, dass sowohl ErbB2-EGFP als auch ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP von den HaCaT-Zellen vergleichbar exprimiert wurde. In der

Auswertung der infizierten Zellen wurde anschließend auf eine Überlagerung von L1 (in Rot) mit ErbB2-EGFP oder ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP (jeweils in Grün) geachtet, die als Kolokalisation gewertet wurde. Sowohl das Wildtyp Protein, als auch die Mutante werden vergleichbar gut exprimiert, in die Membran eingebaut und kolokalisieren mit den internalisierten Viren in endosomalen Strukturen.



**Abbildung 7: Vergleichende Immunfluoreszenzaufnahmen von ErbB2-EGFP und der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP in infizierten und nicht infizierten Zellen**

**A** Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie von nicht infizierten HaCaT-Zellen nach Transfektion von ErbB2-pEGFP-N1 oder ErbB2 $\Delta$ NLS-pEGFP-N1 Plasmiden mittels Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 und Fluoreszenz-basierter Zellkernfärbung mittels Hoechst (in Blau). Es zeigt sich, dass sowohl ErbB2-EGFP als auch ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP (jeweils in Grün) von den Zellen vergleichbar exprimiert wird.

**B** Immunfluoreszenzaufnahmen von HaCaT-Zellen nach Transfektion von ErbB2-pEGFP-N1 oder ErbB2 $\Delta$ NLS-pEGFP-N1 Plasmiden und anschließender Infektion mit HPV16-PsV für sechs Stunden. Dargestellt sind jeweils die einzelnen Fluoreszenzkanäle sowie eine

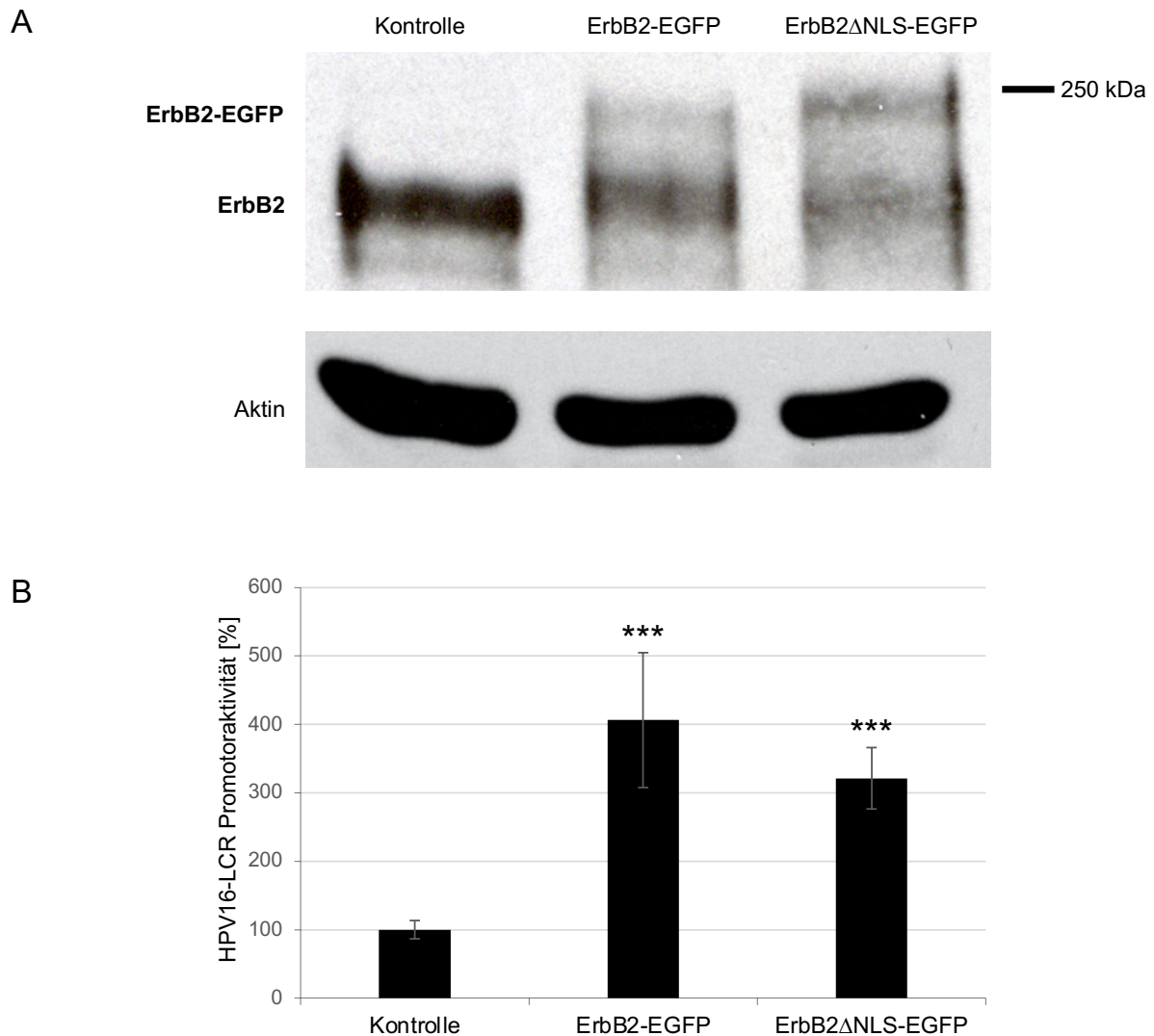
Überlagerungsaufnahme und einem daraus vergrößerten Ausschnitt. Angefärbt zu sehen sind ErbB2-EGFP oder die Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP (jeweils in Grün), L1 (in Rot) und die Zellkerne (in Blau). Es sind Überlagerungen von ErbB2-EGFP und ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP jeweils mit dem L1-Kapsidprotein der HPV16-PsV in Form eines gelben Signals erkennbar.

### 6.1.3.2 ErbB2 und ErbB2 $\Delta$ NLS aktivieren den HPV16-Promotor

Da beide ErbB2 Varianten vergleichbar in HaCaT-Zellen exprimiert und lokalisiert gefunden werden konnten, wurde anschließend die regulierende Funktion von ErbB2 auf den LCR analysiert. Hierzu wurden Promotoranalysen durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Auswirkung der Überexpression vom ErbB2 Wildtyp auf die LCR Aktivität untersucht.

HaCaT-Zellen wurden mit ErbB2-pEGFP-N1 oder mit ErbB2 $\Delta$ NLS-pEGFP-N1 Plasmiden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes PEI transfiziert. Als Kontroll-Plasmid wurde der Expressionsvektor pEGFP-N3 transfiziert. Da die verwendeten ErbB2-Plasmide für eine Verknüpfung von ErbB2 mit grün fluoreszierendem EGFP kodieren, kann der Einfluss des EGFP auf den HPV16-Promotor durch die Verwendung von pEGFP-N3 als Kontrolle ausgeschlossen werden. Die Zellen exprimieren durch die Transfektion der Plasmide zusätzliches ErbB2 zum bereits vorhandenen endogenen ErbB2. Dies entspricht einer Überexpression.

Gleichzeitig wurden pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmids* transfiziert, wodurch der Effekt auf den LCR Promotor untersucht werden konnte. Eine Beeinflussung durch Vorgänge bei der Internalisierung von HPV16 wurde durch die direkte Transfektion in die Zellen ausgeschlossen. Nach 24 Stunden wurde die HPV16-LCR Promotoraktivität mittels Luciferase basierendem Reporteragen-Assay analysiert, wie in 5.3.5 ausführlich beschrieben. Um die Transfektionseffizienz durch die verwendeten ErbB2-Plasmide kontrollieren und vergleichen zu können, wurde außerdem eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Dafür wurden die Zellen 24 Stunden nach der DNA-Transfektion in Probenpuffer aufgenommen und die SDS-PAGE und der Western Blot nach Protokoll durchgeführt.



**Abbildung 8: Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität nach Überexpression von ErbB2-EGFP oder der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP**

**A** Western Blot nach SDS-PAGE zur Kontrolle der Überexpression von ErbB2 mittels ErbB2-EGFP und der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP nach erfolgter Transfektion von DNA-Plasmiden.

**Oben:** Mit einer Proteingröße von etwa 185kDa stellt sich das endogene ErbB2 in der unteren Bande dar, wohingegen die überexprimierten Varianten ErbB2-EGFP und ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP durch die Verknüpfung mit EGFP als schmale Banden darüber erscheinen (etwa 250kDa). Zur Anfärbung wurden als Primärantikörper Anti-HER2/ErbB2 (Kaninchen) und als Sekundärantikörper Anti-Kaninchen (Ziege, Konjugat HRP) verwendet.

**Unten:** Gezeigt ist die Ladekontrolle mittels Anfärbung von Aktin (48kDa) mit dem monoklonalen Primärantikörper Anti- $\beta$ -Aktin (Maus) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus (Ziege, Konjugat HRP).

**B** Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität nach Überexpression von ErbB2-EGFP oder ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP. HaCaT-Zellen wurden mit ErbB2-pEGFP-N1, ErbB2 $\Delta$ NLS-

pEGFP oder dem Kontroll-Plasmid pEGFP-N3 und jeweils pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmids* für 24 Stunden kotransfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde PEI verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Luciferase basierten Reporter-Gen-Assays. Die HPV16-LCR Promotoraktivität wurde mit Hilfe einer LDH-Messung auf die Zellviabilität normalisiert.

Die Überexpression von ErbB2 sowie der ErbB2-Mutante führen jeweils zu einer deutlichen Erhöhung der HPV16-LCR Promotoraktivität. Die Expression von zusätzlichem ErbB2 im Vergleich zu rein endogenem ErbB2 führt folglich zu einer zusätzlichen Aktivierung des HPV16-LCR Promotors.

Zur statistischen Auswertung wurde die HPV16-LCR Promotoraktivität der mit dem Kontroll-Plasmid behandelten Zellen auf 100 % gesetzt.

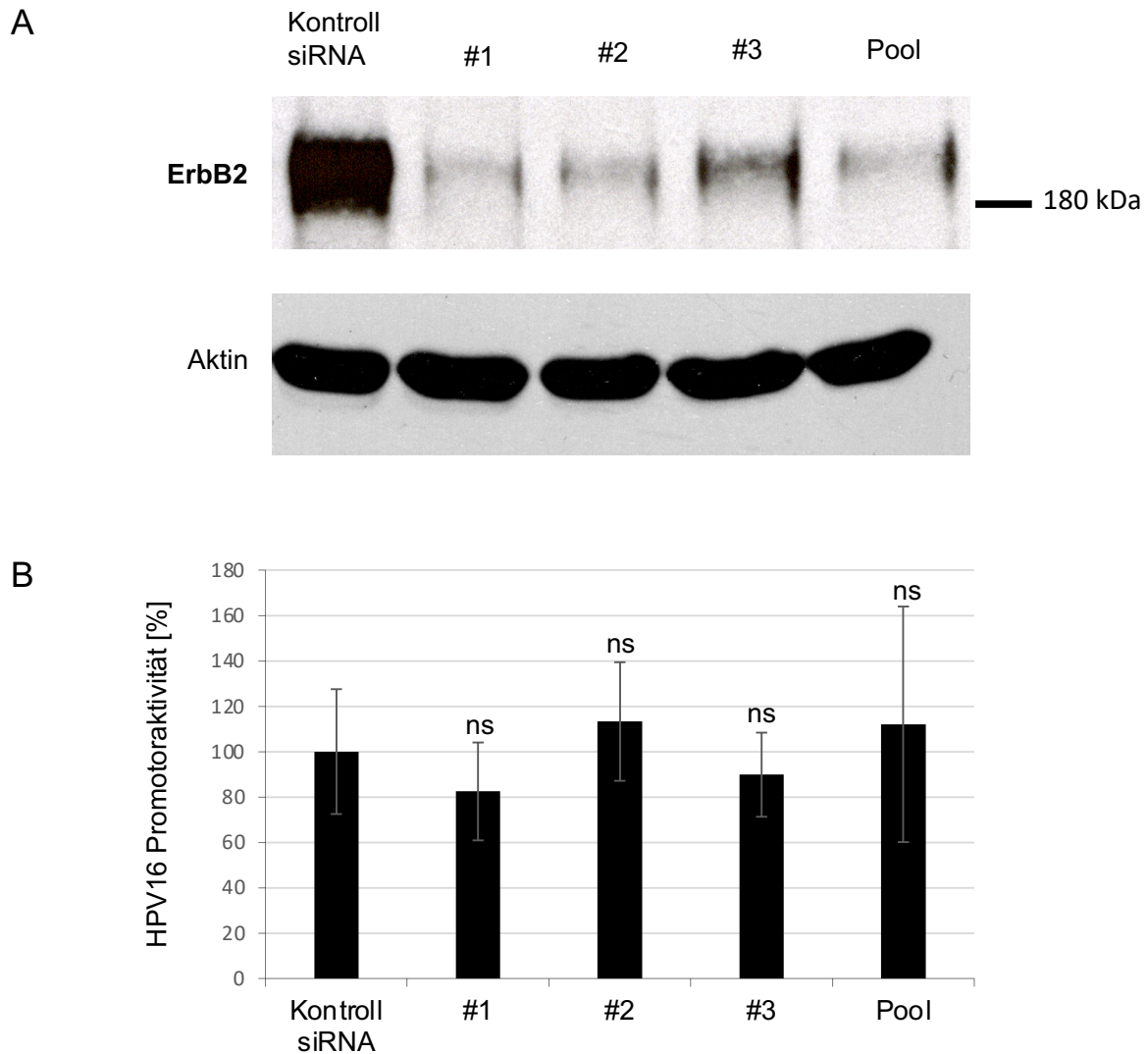
\*\*\*-signifikant entspricht  $p < 0,001$  zu Zellen behandelt mit dem Kontroll-Plasmid

Die Auswertung dieser Promotoranalysen zeigt deutlich, dass der Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 die lange Kontrollregion und damit den frühen HPV16 Promotor aktiviert. Das nukleare Lokalisierungssignal von ErbB2 ist hingegen für die Aktivierung der viralen Genexpression entbehrlich. Die Aktivierung verläuft daher vermutlich über die klassischen Signaltransduktionswege.

#### **6.1.4 Der Einfluss einer ErbB2 Depletion auf die Promotoraktivität von HPV16**

Um die Untersuchungen der Interaktion zwischen ErbB2 und dem LCR Promotor zu vervollständigen, wurde im nächsten Schritt der Einfluss einer ErbB2 Depletion auf den HPV16-LCR untersucht. Dafür wurde in HaCaT-Zellen mittels siRNA-Transfektion eine Depletion von ErbB2 ausgelöst. Diese ErbB2-Knockdown-Zellen wurden zusätzlich mit HPV16-Reporterplasmiden transfiziert und die HPV16-LCR Promotoraktivität bestimmt. Es wurden drei siRNAs verwendet, die im Folgenden als #1, #2 und #3 bezeichnet werden und jeweils zu einem Knockdown von ErbB2 führen sollen. Es wurden verschiedene siRNAs verwendet, um unerwünschte Nebeneffekte durch eine der siRNAs mit Hilfe der vergleichenden Analyse ausschließen zu können. Außerdem wurde eine Mischung mit jeweils gleichen Anteilen aus den siRNAs getestet, welche als Pool bezeichnet wird. Die Kontrollzellen wurden mit der Kontroll-siRNA transfiziert und davon abgesehen stets gleichbehandelt. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine™ RNAiMAX verwendet, wie in 5.2.3 beschrieben. Um die ErbB2-Depletion durch die verwendeten siRNAs kontrollieren zu können, erfolgte außerdem ein Western Blot 48h nach siRNA Transfektion (Abbildung 9 A). Acht Stunden nach siRNA Behandlung wurde in einem parallelen Ansatz das pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmid* mittels

PEI transfiziert. Dieses Reporterplasmid beinhaltet Luciferase als Reporter gen unter der Kontrolle des HPV16-LCR Promotors. 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde der Versuch, wie in 5.3.5 beschrieben, mittels Luciferase basierten Reporter gen-Assays ausgewertet. Die mit Hilfe des Luminometers gemessenen *Relative Light Units* als Maß für die LCR-Promotoraktivität wurden auf die Zellviabilität normalisiert. Die Werte der Kontrollzellen wurden anschließend auf 100 % relative LCR-Promotoraktivität gesetzt (Abbildung 9 B).



**Abbildung 9: Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität in ErbB2-Knockdown-Zellen**

**A** Western Blot nach der SDS-PAGE zur Kontrolle der siRNA vermittelten Depletion von ErbB2 in den Knockdown-Zellen.

**Oben:** #1, #2 und #3 bezeichnen die unterschiedlichen siRNAs, die jeweils zu einem Knockdown von ErbB2 (185kDa) führen, im Vergleich zur Transfektion mit der Kontroll-siRNA. Der Pool setzt



sich aus den drei siRNAs zu gleichen Anteilen zusammen. Die Anfärbung von ErbB2 erfolgte mittels dem HER2/ErbB2-Antikörper 29D8 (Cell Signaling).

**Unten:** Als Ladekontrolle wurde die Anfärbung von Aktin (48 kDa) mit dem monoklonalen Maus-Antikörper Anti- $\beta$ -Aktin (Sigma) verwendet.

**B** Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität nach siRNA-vermittelter Depletion von ErbB2. HaCaT-Zellen wurden mit den ErbB2-siRNAs #1, #2, #3 oder deren Mischung (Pool) mittels Lipofectamine™ RNAiMAX transfiziert. Dies führt zu einem Knockdown von ErbB2, wie der Western Blot aus **A** zeigt. Als Kontrolle dient die Behandlung mit Kontroll-siRNA. Nach acht Stunden wurde zusätzlich pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmid* mittels PEI transfiziert. Die Auswertung mit Hilfe des Luciferase basierten Reporter-Gen-Assays wurde 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion umgesetzt. Die HPV16-LCR Promotoraktivität wurde mit Hilfe einer LDH-Messung auf die Zellviabilität normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde die HPV16-LCR Promotoraktivität der mit der Kontroll-siRNA (KSI) behandelten Zellen auf 100 % gesetzt.

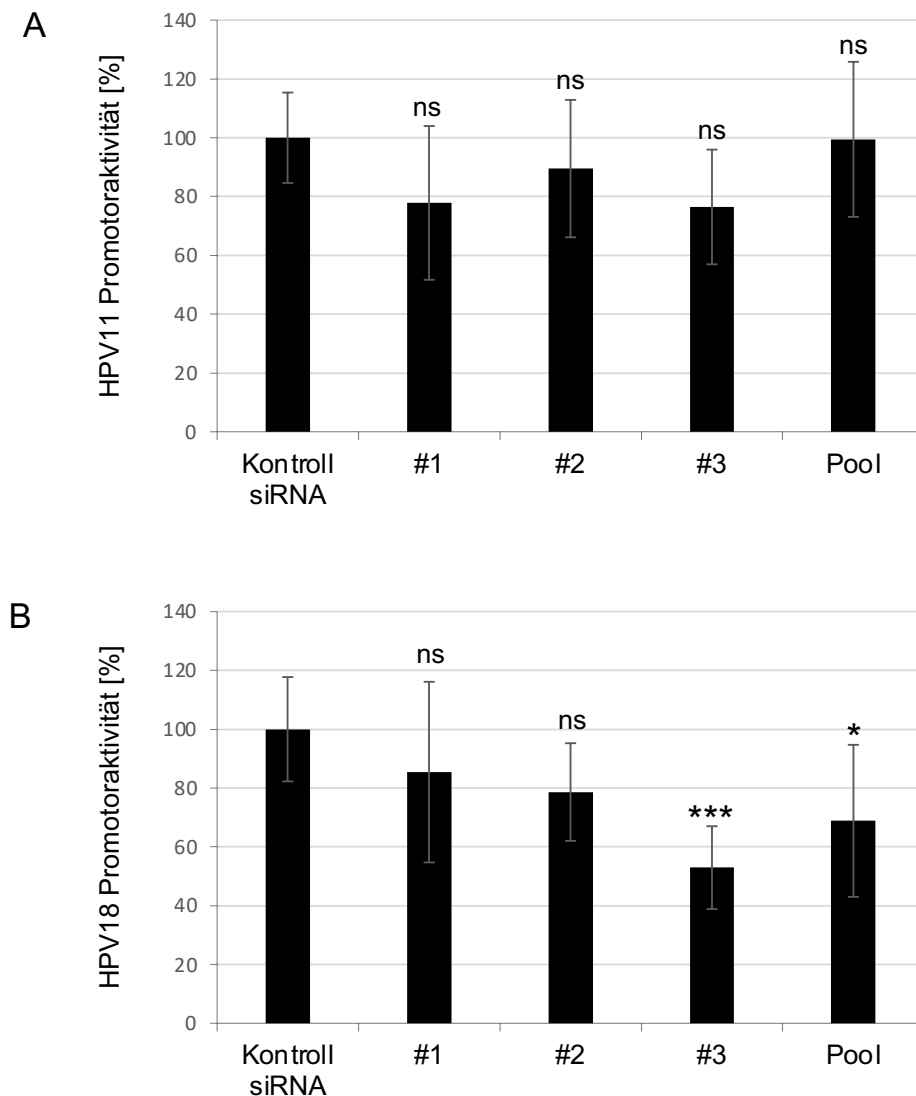
Zu sehen ist, dass die HPV16-LCR Promotoraktivität sich nicht signifikant durch den ErbB2 Knockdown reduziert. Allerdings zeigt sich für die siRNAs #1 und #3 eine leichte Tendenz dazu bei insgesamt hoher Standardabweichung in allen Gruppen.

ns: entspricht nicht signifikant zu Zellen behandelt mit der KSI (Signifikanzlevel  $p < 0,05$ )

Die Auswertung der Promotoranalyse zeigt keine signifikant reduzierte LCR Promotoraktivität von HPV16.

### 6.1.5 ErbB2 und die Promotoraktivitäten von HPV11 und HPV18

Unveröffentlichte Experimente der AG Florin lassen vermuten, dass ErbB2 auch bei der Infektion durch HPV11 und HPV18 eine relevante Rolle spielen könnte. Daher wurde parallel zu den HPV16 Analysen untersucht, ob ErbB2 einen Einfluss auf die Promotoraktivitäten von HPV11 und 18 hat (analog zu 6.1.4). Die Depletion von ErbB2 in HaCaT-Zellen wurde unter Verwendung der identischen siRNAs #1, #2 und #3 sowie des Pools erreicht. Acht Stunden später erfolgte die Transfektion des pGL4.20 HPV11-LCR-*luciferase reporter plasmids* oder des pGL4.20 HPV18-LCR-*luciferase reporter plasmids*. Diese beiden Plasmide entsprechen im Aufbau dem HPV16-Reporterplasmid, sodass Luciferase als Reporter-Gen unter der Kontrolle des HPV11-LCR oder des HPV18-LCR Promotors steht. 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die jeweilige Promotoraktivität mit dem Luciferase-basierten Reporter-Gen-Assay (s. 5.3.5) ausgewertet.



**Abbildung 10: Der Einfluss der siRNA-vermittelten Depletion von ErbB2 auf die Promotoraktivitäten von HPV11 und HPV18**

**A** Darstellung der relativen HPV11-LCR Promotoraktivität nach siRNA-vermittelter Depletion von ErbB2. HaCaT-Zellen wurden mit den siRNAs #1, #2, #3, deren Mischung (Pool) oder der Kontroll-siRNA mittels Lipofectamine™ RNAiMAX transfiziert. Acht Stunden später erfolgte die Transfektion des pGL4.20 HPV11-LCR-*luciferase reporter plasmids* mittels PEI. 48 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die HPV11-LCR Promotoraktivität anhand der biolumineszenten Reaktion nach Zugabe durch Luciferin mit Hilfe des Luminometers gemessen und auf die Zellviabilität normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde die HPV11-LCR Promotoraktivität der mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen auf 100 % gesetzt. Zu sehen ist, dass die HPV11-LCR Promotoraktivität sich nicht signifikant durch den ErbB2 Knockdown reduziert. Allerdings zeigt sich für die siRNAs #1, #2 und #3 eine leichte Tendenz dazu bei insgesamt hoher Standardabweichung in allen Gruppen.

ns: entspricht nicht signifikant zu Zellen behandelt mit der Kontroll-siRNA (Signifikanzlevel  $p < 0,05$ )

---

**B** Gezeigt wird die relative HPV18-LCR Promotoraktivität nach siRNA-vermittelter Depletion von ErbB2. Der Versuch wurde analog zu der Beschreibung aus **A** durchgeführt, allerdings wurden pGL4.20 HPV18-LCR-*luciferase reporter plasmids* verwendet. Zur statistischen Auswertung wurde die HPV18-LCR Promotoraktivität der mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen auf 100 % gesetzt. Die Behandlung mit der siRNA #3 führt zu einer signifikant reduzierten Promotoraktivität von HPV18.

\*-signifikant entspricht  $p < 0,05$

\*\*\*-signifikant entspricht  $p < 0,001$

ns: entspricht nicht signifikant (Signifikanzlevel  $p < 0,05$ )

jeweils im Vergleich zu Zellen behandelt mit der Kontroll-siRNA

Für die Promotoraktivität von HPV11 zeigt sich ein vergleichbares Bild wie zuvor für HPV16. Bei insgesamt hoher Standardabweichung in allen Gruppen einschließlich der Kontrolle, wurde in einzelnen Messungen eine Tendenz beobachtet, durch den ErbB2-Knockdown eine reduzierte Promotoraktivität zu verursachen. Dies kann statistisch jedoch nicht als signifikant nachgewiesen werden.

Allerdings wurde eine signifikant reduzierte HPV18-LCR-Promotoraktivität nach ErbB2-Knockdown durch die siRNA #3 sowie den Pool nachgewiesen.

## 6.2 Die Rolle von Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3

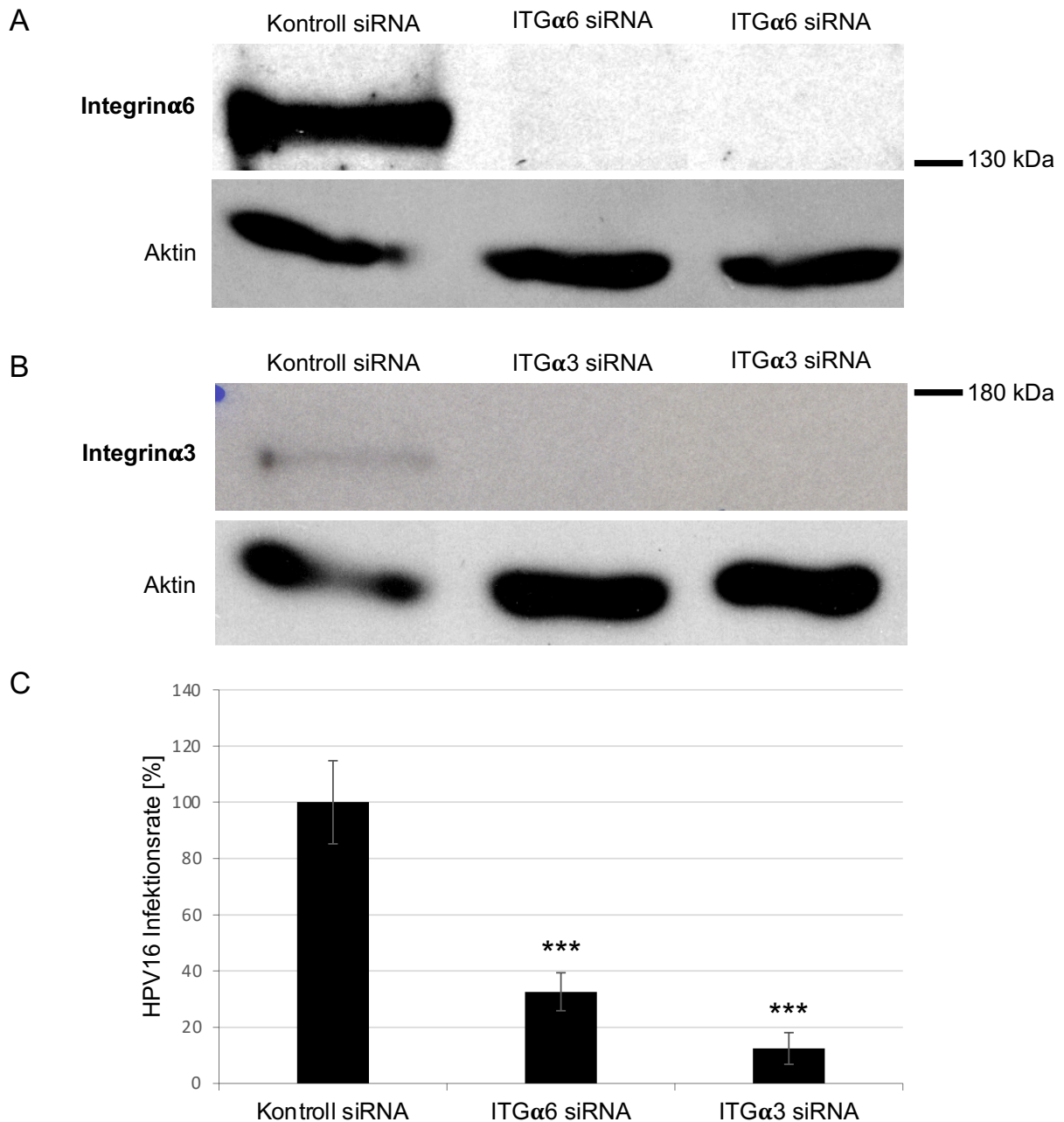
### 6.2.1 Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 beeinflussen die HPV16-Infektionsrate

Während für das Integrin $\alpha$ 6 bereits bekannt ist, dass es als Bindungspartner für HPV16 fungiert und als relevanter Faktor der Infektion gilt, ist die derzeitige Studienlage zu Integrin $\alpha$ 3 inkonsistent (Vgl. 2.3.2). Um eine Rolle im Infektionszyklus von HPV16 nachweisen zu können, wurden Integrin $\alpha$ 3-Knockdown-Zellen mit HPV16-PsV infiziert und anschließend auf die resultierende Infektionsrate hin untersucht. Vergleichend wurden Integrin $\alpha$ 6-Knockdown-Zellen verwendet.

Zuerst wurden 30.000 HaCaT-Zellen ausgesät. Anschließend wurde die siRNA-Transfektion mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX durchgeführt, wie in 5.2.3 beschrieben. Sowohl für Integrin $\alpha$ 6 als auch für Integrin $\alpha$ 3 wurde jeweils eine Kombination aus zwei verschiedenen siRNAs verwendet. Die beiden siRNAs Integrin $\alpha$ 3 #1 und Integrin $\alpha$ 3 #2 wurden in einem Mischverhältnis zu je 50 % eingesetzt und führen jeweils zu einem Knockdown von Integrin $\alpha$ 3. Die siRNAs Integrin $\alpha$ 6 #1 und Integrin $\alpha$ 6 #2 wurden analog dazu verwendet. Die Kontrollzellen wurden mit der Kontroll-siRNA behandelt. 48 Stunden später wurden die Zellen mit den HPV16-PsV infiziert. Um die HPV16-Infektionsrate zu ermitteln, wurde die Auswertung nach Kapitel 5.3 mit Hilfe des Luciferase basierten Reportergen-Assays angeschlossen. Zum qualitativen Nachweis des erfolgten Knockdowns der verwendeten siRNAs wurde außerdem eine SDS-PAGE mit nachfolgendem Western Blot durchgeführt. Als Ladekontrolle dient der Nachweis von  $\beta$ -Aktin. Die eingesetzten Antikörper sind zur verbesserten Verständlichkeit in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12: Primär- und Sekundärantikörper für den Nachweis des Integrin $\alpha$ 6- und Integrin $\alpha$ 3-Knockdowns im Western Blot**

Ziel	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<b>Integrin<math>\alpha</math>3</b>	Anti-Integrin $\alpha$ 3 (Maus)	Anti-Maus HRP (Ziege)
<b>Integrin<math>\alpha</math>6</b>	Anti- Integrin $\alpha$ 6 (Kaninchen)	Anti-Kaninchen HRP (Ziege)
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	Anti- $\beta$ -Aktin (Maus)	Anti-Maus HRP (Ziege)



**Abbildung 11: Darstellung der relativen HPV16-Infektionsrate nach siRNA-vermittelter Depletion von Integrin $\alpha$ 6 oder Integrin $\alpha$ 3**

**A** Western Blot nach SDS-PAGE zur Kontrolle des erfolgten Knockdowns von Integrin $\alpha$ 6 (ITG $\alpha$ 6) nach siRNA-Transfektion.

**Oben:** Gezeigt wird die Depletion des endogenen Integrin $\alpha$ 6 (Proteingröße etwa 130-140 kDa) im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen in zwei technischen Replikaten. Gefärbt mit dem Primärantikörper Anti-Integrin $\alpha$ 6 (Kaninchen) und dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen (Ziege, Konjugat HRP).

**Unten:** Die Ladekontrolle erfolgte mittels Aktin (etwa 48kDa), nachgewiesen mit dem Primärantikörper Anti- $\beta$ -Aktin (Maus) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus (Ziege, Konjugat HRP).

---

**B** Western Blot nach SDS-PAGE zur Kontrolle des erfolgten Knockdowns von Integrin $\alpha$ 3 (ITG $\alpha$ 3) nach siRNA-Transfektion analog zu **A**.

**Oben:** Dargestellt ist die Depletion des endogenen ITG $\alpha$ 3 (Proteingröße etwa 150 kDa) im Vergleich zu den mit Kontroll siRNA behandelten Zellen in zwei technischen Replikaten. Gefärbt mit dem Primärantikörper Anti-Integrin $\alpha$ 3 (Maus) und dem Sekundärantikörper Anti-Maus (Ziege, Konjugat HRP)

**Unten:** Die Ladekontrolle erfolgte mittels Anfärbung von Aktin (etwa 48kDa) analog zu **A**.

**C** Analyse der relativen HPV16-Infektionsrate nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Integrin $\alpha$ 6 (ITG $\alpha$ 6) oder Integrin $\alpha$ 3 (ITG $\alpha$ 3). HaCaT-Zellen wurden mit einer Mischung aus je zwei siRNAs für ITG $\alpha$ 6 oder ITG $\alpha$ 3 oder mit Kontroll-siRNA transfiziert. Es wurde Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX als Transfektionsreagenz verwendet. Nach 48 Stunden wurden die Zellen für 24 Stunden Inkubationszeit mit HPV16-PsV infiziert. Die HPV16-Infektionsrate wurde photometrisch mittels des Luciferase basierten Reporteragen-Assays ermittelt, wobei mit Hilfe einer LDH-Messung auf die Zellviabilität normalisiert wurde. Die hier dargestellten Ergebnisse setzen sich aus fünf unterschiedlichen Wiederholungen an biologischen Replikaten zusammen<sup>1</sup>. Sowohl die Depletion von ITG $\alpha$ 6 als auch von ITG $\alpha$ 3 verursacht jeweils eine signifikante Senkung der Infektionsrate durch HPV16.

Zur statistischen Auswertung wurde die Infektionsrate der mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen auf 100 % gesetzt.

\*\*\*-signifikant entspricht  $p < 0,001$  zu Zellen behandelt mit der Kontroll-siRNA

---

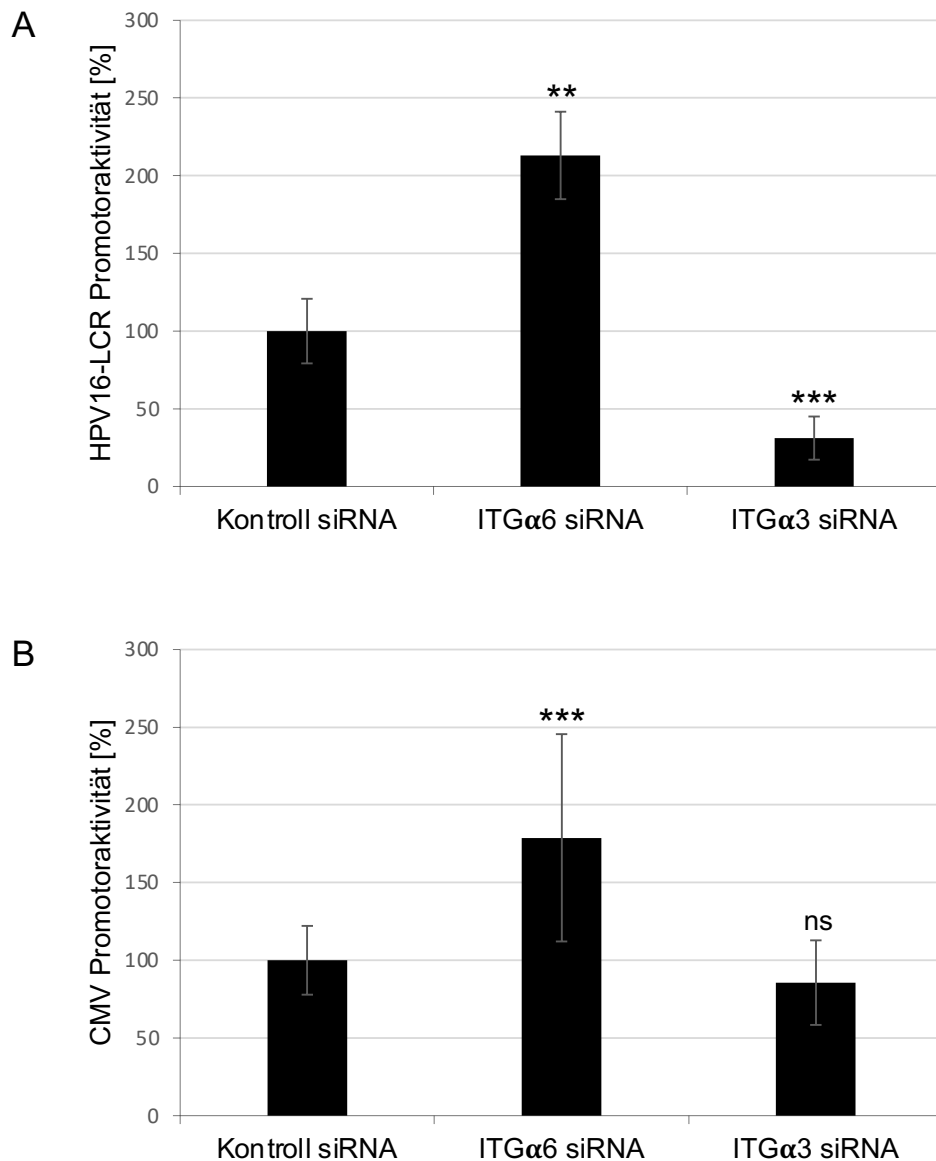
<sup>1</sup> Von den insgesamt 20 Einzelmessungen wurden 10 durch Anna-Lena Franke selbst generiert, die restlichen 10 wurden durch Mitglieder der AG Florin getätigt und wurden der Autorin zur Darstellung in dieser Dissertation überlassen.

---

### 6.2.2 Regulation der Promotoraktivität von HPV16 und CMV

Da Integrine, wie auch Wachstumsfaktorrezeptoren, als Transmembranproteine an zellulären Signalprozessen durch Signaltransduktion beteiligt sein können, wurde im Anschluss untersucht, ob Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 ebenfalls eine regulierende Funktion auf die Genexpression von HPV16 einnehmen. Daher wurde der direkte Einfluss einer siRNA-vermittelten Depletion der Integrine auf die Aktivität des HPV16-LCR Promotors untersucht. Hierzu wurde wieder das pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmid* in die siRNA behandelten Zellen transfiziert. Zum Vergleich wurde die CMV-Promotor-Aktivität parallel getestet.

70.000 HaCaT-Zellen wurden analog zu 6.2.1 mit den gleichen siRNAs behandelt. 24 Stunden später das pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmid* oder das pcDNA3.1(+)/*luciferase reporter plasmid*, in dem das Luciferasegen unter der Kontrolle des CMV Promotors steht, in die Zellen transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde PEI verwendet. Die Promotoraktivität von HPV16 und CMV wurde photometrisch anhand eines Luciferase basierten Reporter-Gen-Assays bestimmt, wie in Kapitel 5.3 beschrieben.



**Abbildung 12: Beeinflussung der Promotoraktivität des HPV16-LCR- und des CMV-Promotors durch die siRNA-vermittelte Depletion von Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3**

**A** Darstellung der relativen HPV16-LCR Promotoraktivität nach dem Knockdown von Integrin $\alpha$ 6 (ITG $\alpha$ 6) oder Integrin $\alpha$ 3 (ITG $\alpha$ 3). HaCaT-Zellen wurden mit einer Mischung aus je zwei siRNAs für ITG $\alpha$ 6 oder ITG $\alpha$ 3 oder der Kontroll siRNA transfiziert. Es wurde Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX als Transfektionsreagenz verwendet. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion des pGL4.20 HPV16-LCR-*luciferase reporter plasmid*. Die HPV16-LCR Promotoraktivität wurde photometrisch mit dem Luciferase basierten Reportergen-Assay ermittelt, wobei mit Hilfe einer LDH-Messung auf die Zellviabilität normalisiert wurde. Die Depletion von ITG $\alpha$ 6 führt zu einer signifikanten Steigerung der Promotoraktivität im Vergleich zu der Depletion von ITG $\alpha$ 3, welche zu einer reduzierten Promotoraktivität führt.



**B** Analyse der relativen CMV-Promotoraktivität in ITG $\alpha$ 6- und ITG $\alpha$ 3-Knockdown-Zellen analog zu **A**, wobei pcDNA3.1(+)/ *luciferase reporter plasmid* mit dem CMV-Promotor transfiziert wurde. Für die ITG $\alpha$ 6-Knockdown-Zellen wurde eine signifikante Aktivierung des CMV-Promotors ermittelt, wohingegen die Depletion des ITG $\alpha$ 3 zu keinem signifikanten Effekt führt.

Zur statistischen Auswertung wurde jeweils die Promotoraktivität der mit der Kontroll siRNA behandelten Zellen auf 100% gesetzt.

\*\* entspricht signifikant ( $p < 0,01$ ) zu Zellen behandelt mit der Kontroll siRNA

\*\*\* entspricht signifikant ( $p < 0,001$ ) zu Zellen behandelt mit der Kontroll siRNA

Die These, dass die beiden Integrine eine signalgebende Funktion in Bezug auf die Aktivierung des HPV16-Promotors einnehmen und dadurch eine siRNA-vermittelte Depletion zu einer reduzierten Promotoraktivität führt, kann für das Integrin $\alpha$ 3 bestätigt werden. Für die Integrin $\alpha$ 6-Knockdown-Zellen wurde keine Reduktion der Promotoraktivität nachgewiesen. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf eine gesteigerte Aktivität hin, die neben dem HPV16-LCR- auch den CMV-Promotor betrifft. Im Gegensatz dazu wurde für die Integrin $\alpha$ 3-Knockdown-Zellen keine veränderte Aktivität des CMV-Promotors ermittelt. Die reduzierende Wirkung der Integrin $\alpha$ 3 siRNA im Infektionsversuch (Vgl. Abbildung 11) kann demnach unter anderem auf die reduzierte Promotoraktivität zurückgeführt werden. Integrin $\alpha$ 3 wirkt dementsprechend aktivierend auf den HPV16-LCR. Im Gegensatz dazu muss Integrin $\alpha$ 6 schon früher im Infektionsverlauf wirken, wie beispielsweise bei der Virusbindung an die Zelle. Integrin $\alpha$ 3 hingegen wirkt zusätzlich zur Promotoraktivierung auch auf die Bildung der viralen Eintrittsplattform. Dies wurde im Rahmen einer Kooperation der AG Florin mit der AG Lang aus Bonn weiter untersucht und die Analysen gemeinsam mit den Ergebnissen meiner Arbeit publiziert (8).

---

## 7 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der humanen Transmembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Infektionszyklus von HPV16 mit Hilfe von Zellkulturen der HaCaT-Zelllinie untersucht. Die ausgewählten Proteine wurden durch siRNA-vermittelte Depletion aus den Zellen entfernt. Im Anschluss wurden Infektionen durch die Verwendung von eigenständig hergestellten HPV16-Pseudoviren *in vitro* nachgebildet. Dadurch wurde die Beeinflussung des Infektionszyklus durch ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Vergleich zu Kontrollzellen analysiert.

Die oben erwähnten Transmembranproteine können an signalgebenden Prozessen beteiligt sein. Da solche Prozesse für die produktive virale Infektion von humanen Papillomviren essentiell sind, wurde weiterhin exploriert, ob die Proteine die Aktivität des HPV16-LCR Promotors und damit die virale Genexpression beeinflussen. Dafür wurden vergleichende Promotoranalysen eingesetzt. In ErbB2-, Integrin $\alpha$ 6- oder Integrin $\alpha$ 3-Knockdown-Zellen oder in ErbB2 überexprimierenden Zellen wurden LCR-Reporterplasmide transfiziert. Diese enthalten, wie die HPV16-PsV, ein Pseudogenom mit Luciferase als Reporter gen unter der Kontrolle einer viralen Kontroll- und Promotorregion LCR. Die Aktivität des jeweiligen Promotors wurde mit Hilfe der Luciferaseaktivität bestimmt. Es wurden die Promotoren von den humanen Papillomvirustypen 16, 18, und 11, sowie vom humanen Cytomegalievirus (CMV) verwendet.

ErbB2 wurde als neue Komponente des HPV16 Rezeptorkomplexes identifiziert, der gemeinsam mit dem Tetraspanin CD151 und HPV16 auf der Plasmamembran kolokalisiert und in die Zelle aufgenommen wird (Vgl. 6.1.1 und 6.1.2). Zudem wird der HPV16-LCR Promotor durch ErbB2-vermittelte Signaltransduktion aktiviert. Dies konnte durch Promotorstudien in ErbB2-überexprimierenden Zellen gezeigt werden (s. 6.1.3.2). In ErbB2-Knockdown-Zellen zeigte sich nur auf den HPV18 LCR eine signifikante Aktivitätsreduktion, während die Aktivität des HPV16 und HPV11-LCRs nur leicht und nicht signifikant beeinträchtigt wurde (Vgl. 6.1.4 und 6.1.5).

Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 sind relevant für eine produktive Infektion durch HPV16. Dies lässt sich durch eine deutlich reduzierte Infektionsrate in entsprechenden Knockdown-Zellen nachweisen (s. 6.2.1). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich in Integrin $\alpha$ 3-depletierten Zellen auch die HPV16-LCR Promotoraktivität reduziert, wohingegen sich

diese in Integrin $\alpha$ 6-depletierten Zellen erhöht (Vgl. 6.2.2). Diese Studien demonstrieren, dass Integrin $\alpha$ 6 wichtig für die initialen Schritte der Infektion ist, indem es zum Beispiel als Rezeptor für HPV16 fungiert und Integrin $\alpha$ 6 vermittelte Signaltransduktion die Aktivität des LCR schwächt. Auf der anderen Seite zeigen die vorliegenden Daten, dass Integrin $\alpha$ 3 unter anderem wichtig ist für die frühe Genexpression von humanen Papillomviren.

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich an HaCaT-Zellen *in vitro* durchgeführt. Eine Wiederholung der Versuche an primären Zellkulturen würde die Aussagekraft sowie die Übertragbarkeit zu einem *in vivo* Modell erheblich verbessern. Zudem wurde die Anzahl an Wiederholungen durch die begrenzten finanziellen Mittel limitiert. Es wurden jedoch stets mindestens drei Wiederholungen an biologischen Replikaten durchgeführt, um eine statistische Aussagekraft zu ermöglichen. Aufgrund des explorativen Charakters dieser Arbeit wurde weiterhin keine *a priori* Berechnung der Stichprobengröße oder der Teststärke vorgenommen. Eine höhere Anzahl an Wiederholungen würde Schwankungen und Messunsicherheiten besser ausgleichen und wäre daher für zukünftige Experimente zu bevorzugen. Die Immunfluoreszenz-Bildgebungen sowie die verwendeten Western Blots wurden ausschließlich als qualitative Methode verwendet und nicht quantitativ ausgewertet.

## **7.1 Die Rolle des Wachstumsfaktorrezeptors ErbB2 im Infektionszyklus von HPV**

### **7.1.1 ErbB2 ist Bestandteil der Eintrittsplattform von HPV16**

Epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren werden schon länger als relevant bei der Infektion mit HPV16 angesehen. Vor allem für EGFR (=ErbB1) wurde durch Surviladze et al. eine Wechselwirkung mit HPV16 auf der Plasmamembran sowie die Aktivierung von EGFR-abhängigen Signalwegen durch die humanen Papillomviren gezeigt (37). Durch die quantitative Proteomanalyse der AG Florin (91) wurde neben dem EGFR ein weiteres Mitglied der ErbB-Familie als Kandidat für den Rezeptorkomplex von HPV16 identifiziert. Es zeigt sich, dass ErbB2 in frühen Endosomen von HPV16 infizierten Keratinozyten im Vergleich zu Kontrollzellen angereichert vorliegt (AG Florin, Manuskript eingereicht). Daher stellt sich die Frage, ob ErbB2 tatsächlich Teil des Rezeptorkomplexes von HPV16 ist und ob es einen relevanten Faktor für den Infektionszyklus der HPV16 darstellt.

Es gibt einige Gründe, weswegen ErbB2 als aussichtsreicher Kandidat für eine Rolle im Rahmen der HPV-Infektion gilt. ErbB2 wird in Epithelzellen ausschließlich basolateral exprimiert (140, 141). Da HPV polare Keratinozyten nur basal infizieren, könnte ErbB2 daher ein geeigneter Interaktionspartner sein. Außerdem ist EGFR, mit dem ErbB2 häufig als Heterodimer agiert, an der Internalisierung von HPV beteiligt. Weiterhin wurden für die ErbB-Rezeptoren Interaktionen mit verschiedenen Tetraspaninen wie CD9, CD82 und CD151 gezeigt (142-146). Dabei wird vermutet, dass die Tetraspanine regulatorisch auf die ErbB-vermittelten Signalprozesse wirken (99). Insbesondere für das ErbB2 ist eine Interaktion mit CD151 bekannt (146, 147), dem eine Schlüsselrolle bei der Internalisierung von HPV zugeschrieben wird (s. 2.2.2). ErbB-Rezeptoren können zudem beispielsweise CMV binden und über Signalkaskaden den viralen Eintritt unterstützen (37, 148). Zuletzt scheint ErbB2 eine Rolle im onkogenen Transformationsprozess von infizierten Zellen inne zu haben. Es wurde eine Kooperation mit den Onkoproteinen E6 und E7 von HPV16 gezeigt, die zu EGF-unabhängigem Zellwachstum führt (149, 150).

Um eine direkte Interaktion des ErbB2 mit HPV16 darstellen zu können, wurden Immunfluoreszenzaufnahmen erstellt. HaCaT-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, sodass diese grün fluoreszierendes ErbB2 (ErbB2-EGFP) exprimieren, und mit HPV16-PsV zu drei verschiedenen Zeitpunkten infiziert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde ErbB2-EGFP als grünes Signal und das angefärbte L1 Kapsidprotein von HPV16 als rotes Signal in verschiedenen Fluoreszenzkanälen sichtbar gemacht. Die Überlagerung beider Kanäle zeigte eine Kolokalisation von ErbB2-EGFP und L1 in endosomalen Strukturen. Dies wird daher als Indikator für eine gemeinsame Aufnahme in die Zelle gewertet.

Abbildung 5 zeigt für jeden Infektionszeitpunkt jeweils eine repräsentative Aufnahme. Zehn Minuten nach der Infektion mit den HPV16-PsV verteilt sich das rote Signal über die ganze Zelle und es sind kaum gelbe Signale erkennbar. Dies war zu erwarten, da HPV initial an HSPGs und Integrin $\alpha$ 6 bindet und erst nach Stunden an seinen sekundären Rezeptor übergeben wird (40). Nach drei Stunden ist hingegen eine sehr deutliche Kolokalisation an definierten Strukturen zu sehen. Einige Signale verdichteten sich zum Teil zu größeren Patches, die Eintrittsplattformen für die HPV16 darstellen könnten. Die meisten Signale wurden allerdings als endosomale Strukturen interpretiert. Insgesamt kann man erkennen, dass das ausschließlich rote Signal im zeitlichen Verlauf zunehmend verschwindet. Die Aufnahmen deuten darauf hin, dass sich die HPV16-PsV zunehmend an Stellen mit ErbB2 konzentrieren. Nach sechs Stunden ist insgesamt nur

noch wenig gelbes Signal erkennbar, welches sich um den Zellkern herum zu konzentrieren scheint. Dies spricht für die Lokalisation in späten endosomalen Vesikeln. Für die Permeabilisierung wurde neben PFA auch Triton X-100 verwendet. Dadurch ist sowohl die Zellmembran als auch die nukleare Membran für die Antikörper durchlässig geworden, mit denen L1 angefärbt wurde. Dadurch können die detektierten Signale in Bezug auf die Zelle nicht eindeutig räumlich zugeordnet werden. Ein Vergleich der Verteilung der Signale im zeitlichen Verlauf deutet jedoch auf eine zunehmende Kolo-kalisation an der Plasmamembran und anschließende Kointernalisierung von ErbB2 mit HPV16 hin. Dieses Ergebnis ist konsistent zu confocalen Laserscanningmikroskopie (cLSM) Aufnahmen und den Proteomanalysen der AG Florin und bestätigt ErbB2 als Bestandteil der Eintrittsplattform von HPV16.

Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass die Aufnahmen ausschließlich qualitativ ausgewertet wurden. Dafür wurden die angefertigten Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auf repräsentative Zellen hin untersucht. Die unterschiedlichen Zeitpunkte, die in Abbildung 5 gezeigt werden, stellen dabei Momentaufnahmen von verschiedenen Zellen dar. Die Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen würde die Interaktion von ErbB2 mit den HPV16 genauer abbilden und damit die Aussagekraft erhöhen. Weiterhin würde eine quantitative Auswertung der Signale eine präzisere Information über den Umfang der Kolo-kalisation liefern. Eine Kofärbung mit zellulären Endosomenmarkern würde die Annahme stärken, dass es sich bei den kernnahen Strukturen um Endosomen handelt.

Um eine möglichst exakte Darstellung der Interaktion von ErbB2 und HPV16 zu erhalten, wäre eine Untersuchung des endogenen ErbB2 von Vorteil. Zuerst wurde dieses über eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung in den Zellen angefärbt. Allerdings wurde dadurch nur ein schwaches Farbsignal erkennbar. Daraufhin wurde die Methode verändert, um über eine DNA-Transfektion die Expression von grün fluoreszierendem ErbB2-EGFP zu erreichen, das direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist. Es ist unwahrscheinlich, jedoch nicht gänzlich auszuschließen, dass sich endogenes ErbB2 anders verhält, als das zusätzlich exprimierte ErbB2-EGFP. In den bereits beschriebenen Proteomanalysen und den confocalen Laserscanningmikroskopie (cLSM) Aufnahmen wurde endogenes ErbB2 detektiert, was die Aussagekraft der hier beschriebenen Versuche verdeutlicht (AG Florin, unveröffentlichte Daten).

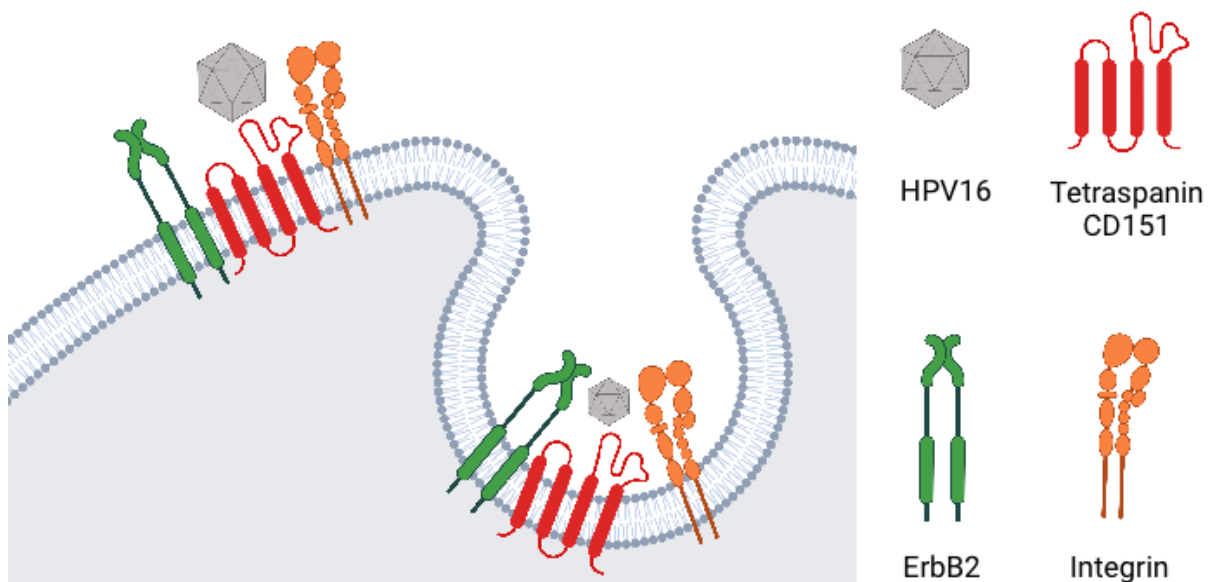
Es ist bereits bekannt, dass das Tetraspanin CD151 eine essentielle Rolle in der Eintrittsplattform und bei der Internalisierung von HPV16 einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass eine HPV16-induzierte Eintrittsplattform entsteht, in die CD151 Proteincluster rekrutiert werden (56). Aufgrund einer bekannten Interaktion von ErbB2 mit CD151, stellt sich die Frage, ob ErbB2 gemeinsam mit CD151 in die Eintrittsplattform eingebaut wird (146, 147). Dies wurde durch weitere Immunfluoreszenzaufnahmen geprüft, bei denen neben ErbB2 und L1 auch das Tetraspanin CD151 dargestellt wurde. Dafür wurden die Fluoreszenzkanäle einzeln sowie überlappend untersucht. Dabei zeigt sich eine starke Überlagerung von ErbB2 mit CD151 als gelbes Signal, als auch eine Kollokalisierung von ErbB2 mit CD151 und L1 (s. Abbildung 6). Insbesondere die Kollokalisierung aller drei Faktoren weist auf eine Beteiligung von ErbB2 an der HPV-induzierten Eintrittsplattform sowie die Kointernalisierung mit CD151 und den HPV16 hin und stützt die bisherigen Ergebnisse und die Hypothese von ErbB2 als Komponente der HPV16-Eintrittsplattform.

Die Zellen wurden dafür sechs Stunden nach der Infektion mit den HPV16-PsV fixiert. Es wird kontrovers diskutiert, wie lange die Aufnahme von HPV in Keratinozyten dauert. Nach Schelhaas et al. ist die infektiöse Aufnahme ein langsamer und asynchroner Prozess, für den eine vorgebundene Viruskohorte mindestens 20 Stunden benötigt (54). Allerdings wird unter anderem von Culp und Christensen beschrieben, dass bereits nach wenigen Stunden eine nachweisbare Menge an Virionen intrazellulär nachgewiesen werden kann (151). Da die zuvor erstellten Immunfluoreszenzaufnahmen bereits für eine Inkubationszeit von drei Stunden eine deutliche Kollokalisierung von ErbB2 mit den HPV16 zeigen und auf eine zunehmende Internalisierung innerhalb von sechs Stunden hinweisen, wurde ein Infektionszeitraum von sechs Stunden als geeignet befunden.

Da die Darstellung des endogenen ErbB2 im Vergleich zu den Signalen von CD151 und L1 in den ersten Experimenten lediglich zu schwachen Signalen geführt hat, wurde erneut die Transfektion von ErbB2-Plasmiden verwendet. Um jedoch ausschließen zu können, dass die Kopplung des ErbB2 an EGFP zu einer veränderten Interaktion mit HPV16 führt, wurde stattdessen die Expression von ebenfalls grün fluoreszierendem ErbB2-Emerald initiiert. Es wurde wiederum ausschließlich qualitativ ausgewertet, indem die Objektträger auf repräsentative Zellen hin untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass es lediglich eine begrenzte Anzahl an Zellen gab, in denen sowohl das ErbB2-Emerald als auch das angefärbte endogene CD151 ein ausreichendes Signal lieferte. Daraus resultiert eine insgesamt eingeschränkte Stichprobengröße.

Unabhängig von der Anwesenheit von HPV weisen diverse Studien auf eine Interaktion zwischen CD151 und ErbB2 hin. Yang et al. beschreiben beispielsweise eine Aktivierung des ErbB2 in ErbB2-positiven-Brustkrebszellen in Anwesenheit von CD151 (146). Obwohl auch Berditchevski und Odintsova in einem Review von 2016 über die Beeinflussung der ErbB2-Signalgebung durch CD151 berichten, konnte bisher nach Ansicht der Autoren keine direkte physikalische Assoziation zwischen den Proteinen beobachtet werden (99). Die Kolokalisation von CD151 und ErbB2 könnte daher durch HPV16 induziert sein. Weitergehende Untersuchungen über die Dynamik und den Aufbau der HPV16-induzierten Eintrittsplattform sind notwendig, um die genaue Beteiligung von ErbB2 daran zu klären. Außerdem wurden für die hier vorgestellten Immunfluoreszenzaufnahmen ausschließlich infizierte Zellen verwendet. Eine Wiederholung der Methode unter Einschluss von nicht infizierten Kontrollzellen würde eine viral induzierte Interaktion von ErbB2 und CD151 aufdecken.

Insgesamt unterstützen die hier vorgelegten Ergebnisse jedoch die These, dass ErbB2 einen Komplex mit HPV16 und CD151 formt und dadurch an der Ausbildung der HPV-induzierten Eintrittsplattform beteiligt ist.



**Abbildung 13: Modell der HPV16-induzierten Eintrittsplattform (Eigene Abbildung)**

Vereinfachtes Modell der Eintrittsplattform von HPV16 unter Einbeziehung des Tetraspanins CD151 (in Rot) und dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 als Heterodimer mit EGFR (in Grün). HPV16 kolokalisiert auf der Plasmamembran mit CD151 und ErbB2. CD151 konzentriert weitere Interaktionspartner der Viren, wie z.B. die Laminin-bindenden Integrinkomplexe  $\alpha3\beta1$  und  $\alpha6\beta4$ , in einer *tetraspanin-enriched microdomain*, die im Anschluss mit den Viren kointernalisiert wird.

## **7.1.2 Der Einfluss des ErbB2 auf den HPV16-Promotor**

Da das Plasmamembranprotein ErbB2 selbst keine Bindungsstelle für Liganden aufweist, stellt sich zudem die Frage, welche genaue Funktion ErbB2 im Infektionszyklus einnehmen könnte. ErbB2 kann mit EGFR ein Heterodimer bilden und dadurch die Bindung eines Liganden an EGFR verstärken. Eine Wechselwirkung von EGFR mit HPV16 ist beschrieben und führt über die Aktivierung von Signalprozessen beispielsweise zu einer effizienten viralen Internalisierung (31, 37). Tetraspanine sind als Regulatoren der Signalübertragung durch EGFR beschrieben (31). Da auch ErbB2 mit verschiedenen Tetraspaninen interagieren kann und an der Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wie RAS/RAF/MEK/ERK oder PI3K/AKT/TOR beteiligt sein kann, erscheint eine signalgebende Funktion im Infektionszyklus der Humanen Papillomviren möglich und wahrscheinlich (104-107, 142-146). Dies könnte zur viralen Genexpression führen, für die zuerst die virale Kontrollregion LCR und damit der virale Promotor aktiviert werden muss. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ErbB2 die Promotoraktivität des HPV16-LCR beeinflusst.

### **7.1.2.1 Eine Überexpression von ErbB2 führt zu erhöhter Aktivität des LCR-Promotors**

Es wurde die These aufgestellt, dass ErbB2 benötigt wird, um den HPV16-LCR Promotor zu aktivieren. Dafür wurden Promotoranalysen in ErbB2 überexprimierenden Zellen durchgeführt (s. 6.1.3.2). Dabei wurde erwartet, dass eine Erhöhung des zellulär vorhandenen ErbB2 zu einer gesteigerten Aktivität des Promotors führt.

Die Auswertung mit Hilfe des Luciferase-basierten Reporter-gen-Assays bestätigt diese These. Die Überexpression von ErbB2 verursacht eine vierfach gesteigerte Aktivität des HPV16-LCR Promotor im Vergleich zu den Kontrollzellen (Vgl. Abbildung 8). Dies bestätigt eindrücklich eine signalgebende Funktion des ErbB2 im Rahmen des Infektionszyklus von HPV16.

Eine solche signalgebende Funktion des ErbB2 könnte über zwei verschiedene Wege zu einer Regulierung des HPV-Promotors führen. Zum einen ist ein indirekter Weg denkbar, bei dem Signalkaskaden induziert werden, die letztendlich zu einer Aktivierung des Promotors führen. Zum anderen ist ein direkter Weg möglich, indem ErbB2 als Transkriptionsfaktor wirkt (vgl. 2.3.1). Ein Transkriptionsfaktor kann im Zellkern Kontakt zum Genom herstellen und mit diesem direkt interagieren. Da bekannt ist, dass ErbB2 vermittelt durch ein nukleares Lokalisierungssignal (NLS) in den Zellkern importiert



---

werden kann, wurden vergleichende Analysen zu ErbB2 und der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS durchgeführt, wobei die Mutante die NLS-Sequenz nicht enthält (103). Die Mutante kann somit nicht als direkter Transkriptionsfaktor wirken.

#### **7.1.2.2 Das Kernlokalisierungssignal von ErbB2 ist für die LCR-Promotoraktivität entbehrlich**

Es wurden zuerst Immunfluoreszenzaufnahmen erstellt, mit denen die Expression von ErbB2 sowie der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS in den Keratinozyten abgebildet wurde. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde dabei nicht das endogene ErbB2 angefärbt. Stattdessen wurde analog zur Verwendung der Mutante eine DNA-Transfektion durchgeführt, die der Überexpression des ErbB2 dient. Dabei wurden DNA-Plasmide transfiziert, die zur Expression von grün fluoreszierendem ErbB2-EGFP oder ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP führt. Durch die Analyse von nicht-infizierten Kontrollzellen wurde eine vergleichbare Expression der ErbB2-Varianten sowie eine ähnliche Transfektionseffizienz sichergestellt (s. Abbildung 7 A).

Weitere Zellen wurden anschließend für sechs Stunden mit HPV16-PsV infiziert, bevor sie fixiert wurden (s. Abbildung 7 B). Es wurde hierbei insbesondere auf die Interaktion mit dem angefärbten L1 Kapsidprotein der HPV16 geachtet. Es zeigt sich, dass sowohl das ErbB2-EGFP, als auch die Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP mit L1 kolokalisieren. Dies spricht dafür, dass beide ErbB2-Varianten gleichermaßen mit den HPV16-PsV interagieren und mit diesen internalisiert werden.

Die in 7.1.2.1 beschriebenen Promotor-Analysen wurden vergleichend ebenfalls mit der Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS durchgeführt. Dies sollte einen möglichen Unterschied zwischen beiden ErbB2-Varianten aufzeigen und zur Aufklärung der Relevanz der NLS-Sequenz für die HPV-Infektion dienen. Wie in Abbildung 8 dargestellt, aktiviert auch die Mutante den HPV16-LCR Promotor stark. Damit scheint die hauptsächliche Relevanz des ErbB2 nicht in der Eigenschaft als direkter Transkriptionsfaktor zu liegen. Diese Funktion kann die Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS nicht einnehmen, da sie den Zellkern und damit das transfizierte LCR-Plasmid aufgrund der fehlenden NLS-Sequenz nicht erreichen kann. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass in den Zellen, denen die Mutante ErbB2 $\Delta$ NLS transfiziert wurde, zudem noch endogenes ErbB2 exprimiert wird. Gegebenenfalls reicht die Menge des endogenen ErbB2 aus, um als direkter Transkriptionsfaktor im Zellkern wirken zu können. Dies wird jedoch nicht als wahrscheinlich angesehen, da der Unterschied zu den Kontrollzellen sehr eindeutig ist.

Da die verwendeten ErbB2-Plasmide für eine Verknüpfung von ErbB2 mit EGFP kodieren, wurde eine mögliche Beeinflussung des HPV16-Promotors durch das EGFP durch die Verwendung des pEGFP-N3 Plasmids als Kontrolle ausgeschlossen. Um die Expression von ErbB2-EGFP und ErbB2 $\Delta$ NLS-EGFP im Vergleich zu den Kontrollzellen darstellen zu können, wurden eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Es ist darauf hinzuweisen, dass im Rahmen dieser Arbeit keine quantitative Analyse der Western Blots und damit der Transfektionseffizienz erfolgte. Allerdings wurde diese durch eine erfahrene Kollegin im Labor vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass normalisiert auf die Transfektionseffizienz kein signifikanter Unterschied zwischen ErbB2 und ErbB2 $\Delta$ NLS berechnet werden kann (AG Florin, Manuskript eingereicht).

### **7.1.2.3 ErbB2-Depletion hat nur einen geringen Effekt auf die LCR-Promotoraktivität von HPV16, HPV18 und HPV11**

Es wurde die These aufgestellt, dass ErbB2 benötigt wird, um den HPV16-LCR Promotor zu aktivieren. Dafür wurden Promotoranalysen in ErbB2-Knockdown-Zellen durchgeführt. Um ausschließlich die Regulation der Promotoraktivität untersuchen zu können, wurden die Zellen nicht infiziert, sondern mit Reporterplasmiden transfiziert. Diese enthalten den HPV16-LCR Promotor, der die Expression einer Luciferase als Reporter gen reguliert. Durch die Aktivierung des Promotors erfolgt die Genexpression des Luciferase-Gens. Dadurch wird das gleichnamige Luciferase-Enzym in den Zellen synthetisiert. Wird den Zellen anschließend Luciferin zugegeben, wird dieses durch die Luciferase oxidiert, wobei Biolumineszenz entsteht. Diese Lichtemission wird in einem Luminometer gemessen und dient als Maß für die Promotoraktivität. Durch die direkte Transfektion der Reporterplasmide in die Zellen wurden die Vorgänge, die durch die Internalisierung der Viren ausgelöst werden, aus den Versuchen eliminiert.

Die Auswertung der Promotoranalysen ergibt entgegen der Erwartung keine signifikant reduzierte HPV16-LCR Promotoraktivität in den ErbB2-Knockdown-Zellen. Allerdings zeigt sich für zwei der verwendeten siRNAs, #1 und #3, eine leichte Tendenz dazu in einzelnen Messungen bei insgesamt hoher Standardabweichung in allen Gruppen, einschließlich der Kontrollzellen (s. Abbildung 9 B). Um den Erfolg der siRNA-vermittelten Depletion von ErbB2 kontrollieren zu können, wurde zudem ein Western Blot nach einer SDS-PAGE durchgeführt. Dieser bestätigt den erfolgreichen ErbB2-Knockdown im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (s. Abbildung 9 A). Mit Hilfe der standardmäßig erfolgten Ladekontrolle wurde eine vergleichbare Proteinmenge in den

unterschiedlichen Gruppen sichergestellt. Da die Überexpressionsversuche, die zeitlich nach den siRNA Versuchen durchgeführt wurden, klar zeigen, dass ErbB2 die HPV16 LCR-Promotoraktivität verstärkt, wurde vermutet, dass die noch fehlende Expertise bei der praktischen Durchführung die hohe Standardabweichung verursachte und das Ergebnis dementsprechend verfälschte.

Da unveröffentlichte Daten der AG Florin vermuten lassen, dass ErbB2 auch bei der Infektion durch HPV11 und HPV18 eine relevante Rolle einnimmt, wurden die Promotoranalysen analog zu HPV16 für die beiden HPV Subtypen wiederholt. Da HPV11 zu den Niedrigrisiko-Typen und HPV18 zu den Hochrisiko-Typen gerechnet wird, soll die Auswahl dieser Subtypen zudem die Möglichkeit bieten, die Ergebnisse auf alle HPV-Typen übertragen zu können.

Zuerst wurden die Untersuchungen für den HPV11-LCR-Promotor durchgeführt (s. Abbildung 10 A). Hierbei ergibt sich ebenfalls für die siRNAs #1 und #3 die Tendenz zu einer reduzierten HPV11 Promotoraktivität in Einzelmessungen. Aufgrund der weiterhin hohen Standardabweichung zeigt sich jedoch auch hier keine signifikante Reduktion in den ErbB2-Knockdown-Zellen. Im Anschluss wurde die Methode für die Analyse der Aktivität des HPV18-LCR-Promotors verwendet (s. Abbildung 10 B). Für die siRNA #3 wurde dabei eine deutlich signifikante Reduktion der HPV18-Promotoraktivität gemessen. Es wird vermutet, dass die zunehmende praktische Expertise zu genaueren Ergebnissen führte. Um mögliche Fehler in der Durchführung identifizieren zu können, wurde diese durch eine erfahrene Mitarbeiterin im Labor beaufsichtigt. Dabei wurden keine Fehler in der Methodik detektiert. Mittlerweile wurden die Analysen von der Mitarbeiterin, die bereits seit Jahren mit der praktischen Laborarbeit und der Arbeit mit Zellkulturen vertraut ist, noch einmal wiederholt. Im Zuge dessen wurde für alle drei Promotoren, HPV11-LCR, HPV16-LCR und HPV18-LCR, eine deutlich signifikant reduzierte Promotoraktivität in den ErbB2-Knockdown-Zellen nachgewiesen (AG Florin, Manuskript eingereicht). Zusammengenommen spricht dies für verfälschte Ergebnisse in den hier dargestellten Promotoranalysen aufgrund von fehlender praktischer Erfahrung in der Anwendung der Methodik. Da jedoch der Western Blot nach der SDS-PAGE eine erfolgreiche siRNA-Transfektion bestätigt, erscheint insbesondere die Auswertung mit Hilfe des Luciferase-basierendem Reporter-Gen-Assay durch einen unerfahrenen Anwender fehlerbehaftet zu sein.

Insgesamt stützen die Ergebnisse der Labor-Mitarbeiterin, die Tendenz in den Einzelmessungen, sowie die Überexpressionsexperimente die These, dass ErbB2 im Rahmen der HPV-Infektion vor allem für die Regulation der viralen Genexpression verantwortlich ist. Da die NLS von ErbB2 dafür nicht benötigt wird, ist davon auszugehen, dass ErbB2 über Signaltransduktion wirkt. Auch dies konnte mittlerweile durch Studien der AG Florin gezeigt werden (AG Florin, Manuskript eingereicht).

Zusammenfassend deuten die Daten daher darauf hin, dass ErbB2 über einen indirekten Signalprozess einen aktivierenden Einfluss auf den HPV16-Promotor einnimmt. Dass die Promotoranalysen in den ErbB2-Knockdown-Zellen jedoch nur eine reduzierte Promotoraktivität zeigen konnten, könnte sich auch darin begründen, dass die Funktion des ErbB2 durch andere Proteine, wie beispielsweise EGFR, ErbB3 oder ErbB4, übernommen werden kann. Surviladze et al. schlussfolgerten bereits 2012, dass es nicht nur einen einzigen Signalweg gibt, der für die HPV16-Infektion essentiell ist (37). Diese These wird gestützt durch die Vielzahl der bisher bekannten zellulären Kofaktoren der HPV Infektion, die Signalwege aktivieren können. Hierzu zählen auch die Laminin-bindenden Integrine (33). Daher lassen die bisherigen Kenntnisse über Humanen Papillomviren darauf schließen, dass auch in Bezug auf die Regulation des LCR-Promotors diverse Proteine und Signalwege eine aktivierende Funktion übernehmen.

Die verstärkte Expression des Onkogens ErbB2 ist zudem ein bekannter Prognosefaktor bei menschlichen Krebsarten und insbesondere für Brustkrebs untersucht (100). Hierbei stellt die Amplifikation von ErbB2 beispielsweise einen Risikofaktor für frühe Metastasierung dar (152). Interessanterweise werden HPV-Infektionen ebenfalls mit der Entstehung von Brustkrebs in Verbindung gebracht. Dabei ist die Prävalenz von HPV-Infektionen bei Brustkrebs-Patienten weltweit jedoch stark umstritten, weshalb weitere epidemiologische Untersuchungen notwendig sind, um die exakte Korrelation von HPV-Infektion und Brustkrebs zu bestätigen (153, 154). Allerdings konnte bereits die Expression der E6 und E7 Onkoproteine von HPV bei Brustkrebs gezeigt werden (155, 156). Weitere Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass ErbB2 mit den Onkoproteinen E6 und E7 und dem EGFR kooperiert, wodurch die maligne Transformation von Zellen unterstützt wird (149, 153, 157). Diese Ergebnisse weisen zusammen mit den hier dargestellten Daten darauf hin, dass ErbB2 über einen indirekten Signalprozess einen aktivierenden Einfluss auf den HPV16 LCR- Promotor einnimmt, der dadurch die Genexpression der viralen Onkoproteine E6 und E7 aktiviert. Dieser

Mechanismus kann in den infizierten Zellen zur malignen Transformation führen und somit sowohl bei der Entstehung von menschlichem Brustkrebs, als auch von Gebärmutterhalskrebs, eine relevante Rolle einnehmen. Daher können spezifische ErbB2-Inhibitoren, wie beispielsweise Tucatinib, das bereits zur Behandlung von ErbB2-positiven Brustkrebs eingesetzt werden kann, eine mögliche Behandlungsoption von HPV induzierten Krebserkrankungen darstellen (158, 159).

## 7.2 Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Infektionszyklus der HPV16

### 7.2.1 Laminin-bindende Integrine sind wichtige Kofaktoren der HPV16-Infektion

Integrin $\alpha$ 6 wurde bereits 1997 als Rezeptor für humane Papillomviren, wie beispielsweise den Subtyp HPV16, identifiziert und in zahlreichen Studien untersucht (8, 38, 59, 72-74). Spoden et al. konnten 2008 zeigen, dass HPV16 über eine *tetraspanin-enriched microdomain* (TEM) endozytiert werden. Seitdem wird die Bildung einer HPV-induzierten Eintrittsplattform unter essentieller Einwirkung von Tetraspaninen, wie dem Tetraspanin CD151, vermutet (58, 59). Die AG um Finke et al. untersuchte 2020 diese Plattformen mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie genauer und dokumentierte eine räumliche Nähe von Nanoclustern aus CD151, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 (8). Aufgrund einer bereits bekannten Interaktion der beiden Laminin-bindenden Integrine mit CD151 ist diese Assoziation nicht unerwartet (120, 160, 161).

Die Relevanz von Laminin-bindenden Integrin Komplexen  $\alpha$ 6 $\beta$ 1/4 und  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 für die HPV16-Infektion wurde zudem 2013 von der AG Florin für HeLa-Zellen nachgewiesen (59). Dabei resultierte eine signifikant reduzierte Infektionsrate durch HPV16 in Integrin  $\alpha$ 6- und  $\alpha$ 3-Knockdown-Zellen. Allerdings konnten Aksoy et al. diese Ergebnisse in eigenen Untersuchungen 2014 an HaCaT-Zellen nur für Integrin $\alpha$ 6 $\beta$ 4, nicht jedoch für die Integrin-Untereinheiten  $\alpha$ 3 oder  $\beta$ 1, bestätigen (162). Die Autoren schlussfolgerten, dass Integrin $\alpha$ 3 ausschließlich für die Infektion von HeLa-Zellen durch HPV16 relevant sei.

Um die Relevanz des Integrin $\alpha$ 3 für die HPV16 Infektion in Keratinozyten zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit erneut Infektionsversuche in Integrin $\alpha$ 3-depletierten HaCaT-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine um 87,6 % reduzierte Infektionsrate für HPV16-PsV. Damit sind die Ergebnisse konsistent zu den vorherigen Untersuchungen der AG Florin für HeLa-Zellen. Die Divergenz zu den Beobachtungen von Aksoy et al.

könnte sich durch die verwendete Methodik erklären lassen. Für die PsV wurde ein GFP-basiertes Reportersystem verwendet in Kombination mit der Durchflusszytometrie als Auswertemethode. Im Gegensatz dazu basieren die Ergebnisse der AG Florin auf einem Luciferase-basierten Reporter-Gen-Assay (s. 5.3).

Während der Durchführung wurde beobachtet, dass bei hohen Raumtemperaturen über 26 °C eine weniger stark reduzierte Infektionsrate gemessen wurde. Es erscheint möglich, dass die Knockdown-Effizienz bei steigenden Temperaturen ineffizienter wird. Da die Inkubation der Zellen mit dem siRNA-Ansatz jederzeit bei 37 °C erfolgte, wurde vermutet, dass die Raumtemperatur während der Vorbereitung des siRNA-Ansatzes die Knockdown-Effizienz beeinträchtigte. Daraufhin wurde der siRNA-Ansatz kontrolliert bei 23 °C im Thermoblock inkubiert, bevor er zu den Zellen gegeben wurde. Dies führte in der Wiederholung des Versuchs mit weiteren fünf biologischen Replikaten, die in Abbildung 11 C dargestellt sind, zu einer durchgängig stark reduzierten HPV16-Infektionsrate. Dabei wurde zum Ausschluss von methodischen Fehlern ein Teil der Replikate von anderen Mitgliedern der AG Florin analog zu dem beschriebenen Protokoll behandelt und ausgewertet (vgl. 6.2.1).

Die Infektionsversuche wurden außerdem parallel in Integrin $\alpha$ 6-Knockdown-Zellen durchgeführt, wobei sich eine um 67,4 % reduzierte Infektionsrate durch HPV16-PsV zeigt. Dieses Ergebnis ist konsistent zu den bisherigen Untersuchungen zur Relevanz von Integrin $\alpha$ 6 für die Infektion von humanen Papillomviren.

Finke et al. konnten zudem zeigen, dass die beiden Integrine unterschiedliche Funktionen innehaben. Das Integrin $\alpha$ 6, welches als Rezeptor fungiert, ist für die Bindung der HPV16 an die Keratinozyten zuständig. Im Gegensatz dazu ist das Integrin $\alpha$ 3 nicht an der viralen Anheftung beteiligt, sondern unterstützt die Bildung der HPV16-Eintrittsplattform (8). Es stellt sich darüber hinaus die Frage, ob die beiden Integrine noch weitere Funktionen für die HPV16-Infektion innehaben.

### **7.2.2 Die Beeinflussung des HPV16-LCR Promotors**

Integrine können als Transmembranproteine auch an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt sein. Das humane Herpesvirus Typ 8 nutzt beispielsweise die Interaktion mit dem  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Integrin, um die Integrin-abhängige FAK zu aktivieren. Die dadurch

---

ausgelösten Signalprozesse scheinen für die virale Internalisierung relevant zu sein (163, 164), jedoch nicht für die virale Genexpression (165). Wie bereits in 2.4 ausführlich beschrieben wurde, ist die Aktivierung zellulärer Signalprozesse im Allgemeinen sehr relevant für die produktive Infektion von HPV16. Analog zu den Untersuchungen zur Funktion des ErbB2 wurde daher der Einfluss von Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 auf die Regulation des HPV16-LCR Promotors und damit auf die virale Genexpression geprüft.

Dazu wurde erneut die siRNA-vermittelte Depletion von Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 verwendet. Um die Beeinflussung des Promotors zu prüfen und Effekte auf die Internalisierung ausschließen zu können, wurden Promotoranalysen durchgeführt. Dafür wurde das Reporterplasmid mit dem HPV16-LCR Promotor direkt in die Zellen transfiziert. Da die HPV16-PsV, mit denen bisher oft in der AG Florin gearbeitet wurde, als Pseudogenom das Reportergen Luciferase unter der Regulation eines CMV-Promotors enthalten, wurde die Auswirkung auf die CMV-Promotoraktivität vergleichend ebenfalls untersucht.

Für die Integrin $\alpha$ 3 Knockdown-Zellen konnte eine um 68,9 % reduzierte Promotoraktivität des HPV16-LCR Promotors ermittelt werden. Dadurch zeigt sich das Integrin $\alpha$ 3 als relevanter Induktor der viralen Genexpression. Im Gegensatz dazu konnte eine Beeinflussung des CMV-Promotors durch Integrin $\alpha$ 3 nicht nachgewiesen werden. Entgegen der Erwartung zeigt sich in den Integrin $\alpha$ 6-Knockdown-Zellen sowohl für den HPV16-LCR- als auch den CMV-Promotor eine Aktivierung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Vor dem Hintergrund der Infektionsversuche, bei dem in Integrin $\alpha$ 6-Knockdown-Zellen insgesamt eine deutlich reduzierte Infektionsrate resultiert, lassen die Ergebnisse auf eine essentielle Rolle des Integrin $\alpha$ 6 für initiale Infektionsschritte schließen. Die Ergebnisse meiner Arbeit zusammen mit den Beobachtungen der AGs Lang und Florin ergaben eine gemeinsame Publikation, die nochmals bestätigten, dass Integrin $\alpha$ 6 die HPV-Bindung an die Zelle vermittelt und Integrin $\alpha$ 3 indirekt, höchst wahrscheinlich über Signaltransduktion, sowohl die Bildung der HPV16-Eintrittsplattform als auch die virale Genexpression unterstützt (8).

---

### 7.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen zwischen den Plasmamembranproteinen ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 mit humanen Papillomviren Typ 16 liefern weitere Informationen über dessen komplexen Infektionszyklus. Dabei wurde der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 als neuer Faktor im Rahmen der Infektion durch humane Papillomviren identifiziert. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass die Untersuchungen vor allem für den Subtyp 16 durchgeführt wurden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass ebenfalls die Hochrisiko-Typen HPV18 und 31 ähnliche Mechanismen verwenden und es wird vermutet, dass der Prozess auf viele, wenn nicht sogar alle, humanpathogene Papillomviren übertragen werden kann (29). Die Interaktion von ErbB2 mit anderen HPV-Subtypen sollte jedoch weiter untersucht werden.

Insbesondere die zellulären Signalprozesse, die durch ErbB2 und Integrin $\alpha$ 3 aktiviert werden, können eine produktive Infektion durch die Aktivierung des HPV16-Promotors unterstützen. Allerdings sind sowohl ErbB2, als auch das Tetraspanin CD151 und die Laminin-bindenden Integrine an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt. Da in dieser Arbeit einzig die Aktivität des HPV16 Promotors untersucht wurde, lässt sich noch keine definitive Aussage treffen, über welchen Signalprozess ErbB2 und Integrin $\alpha$ 3 tatsächlich Einfluss auf die virale Genexpression nehmen. Zur Vervollständigung des Wissens über den Infektionszyklus und die exakte Interaktion der humanen Papillomviren mit den zellulären Proteinen, sollten die Signalprozesse weiter untersucht werden. Beispielsweise könnte in Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen die Phosphorylierung von ErbB2 und den Zielproteinen der unterschiedlichen Signalwege wie zum Beispiel ERK und Akt mit Hilfe von Immunoblot-Analyse bestimmt werden. Alternativ könnten spezifische Inhibitoren eingesetzt werden, um einzelne Signalwege zu blockieren.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ErbB2 und Integrin $\alpha$ 3 den HPV16-LCR aktivieren und dieser die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 kontrolliert, sollten Inhibitoren von ErbB2 und Integrin $\alpha$ 3 zur Behandlung von HPV-induzierten Tumoren getestet werden. Erste Studien mit dem ErbB2-Inhibitor Tucatinib, der bereits zur Behandlung von ErbB2(Her2/neu)-positivem Brustkrebs eingesetzt wird, werden nun auch in klinischen Studien gegen andere Tumorentitäten getestet. Meine Daten lassen vermuten, dass das Zervixkarzinom, das ursächlich durch HPV hervorgerufen wird, gut auf eine Behandlung mit Tucatinib ansprechen sollte.



## 8 Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine DNA-Viren, die sexuell übertragbare Erkrankungen auslösen, wobei viele HPV-Infektionen asymptomatisch verlaufen. Jedoch besitzen die Hochrisiko-Typen, darunter insbesondere HPV16, onkogenes Potential und sind weltweit für etwa 5 % der Krebserkrankungen verantwortlich. Der genaue Mechanismus der Infektion durch humane Papillomviren sowie deren Interaktion mit Faktoren der Wirtszelle sind noch nicht umfassend geklärt. Die vorliegende Arbeit liefert hierzu neue Erkenntnisse, indem die Rolle der humanen Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 im Rahmen des Infektionszyklus von HPV16 analysiert wurde. An HaCaT-Zellkulturen, einer Zelllinie humaner Keratinozyten, wurde die siRNA-vermittelte Depletion der Proteine Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3 ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit eigenständig hergestellten HPV16-Pseudoviren infiziert. Dadurch wurde die Infektion gefahrlos *in vitro* abgebildet und der Effekt der ausgewählten Proteine durch den Vergleich mit Kontrollzellen beurteilt.

Um zu klären, ob die Proteine über ihre Beteiligung an zellulären Signalprozessen eine Beeinflussung des HPV16 Promotors und damit einhergehend der viralen Genexpression verursachen, wurden Promotoranalysen an ErbB2-, Integrin $\alpha$ 6- oder Integrin $\alpha$ 3-Knockdown-Zellen sowie ErbB2 überexprimierenden Zellen vorgenommen. Dazu wurden Reporterplasmide, die Luciferase als Reportergen unter der Kontrolle eines viralen Promotors als Pseudogenom beinhalten, in die Zellen transfiziert. Mit Hilfe eines Luciferase basierten Reportergen-Assays wurde anschließend die Aktivität des Promotors bestimmt. Dadurch wurde der Einfluss der Plasmamembranproteine auf die Regulation des viralen Promotors analysiert. Der HPV16-LCR Promotor wurde dabei mit den LCR-Promotoren von HPV11, HPV18 und dem CMV-Promotor verglichen. Ziel dieser Untersuchungen war, zum Vervollständigen des Wissens über den genauen Infektionsmechanismus durch humane Papillomviren beizutragen, sowie die genaue Funktion der ausgewählten zellulären Proteine während der HPV16 Infektion inklusive der viralen Genexpression zu analysieren.

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 als möglicher Interaktionspartner von HPV16 neu identifiziert. ErbB2 kolokalisiert auf der Plasmamembran sowohl mit HPV16 als auch mit dem Tetraspanin CD151. Dieses nimmt in der Internalisierung von HPV eine essentielle Funktion ein. Die

Ergebnisse deuten darauf hin, dass ErbB2 dementsprechend ein Bestandteil der HPV-induzierten Eintrittsplattform, einer *tetraspanin-enriched microdomain*, ist und mit dieser kointernalisiert wird. Zudem wurde für ErbB2 eine Beeinflussung des HPV16-Promotors gezeigt. Es wird vermutet, dass dies durch die Aktivierung von zellulären Signalprozessen vermittelt wird. Indem die virale Genexpression in Anwesenheit von ErbB2 aktiviert wird, wird eine produktive Infektion unterstützt. Da die LCR-Promotoraktivität auch die Expression der viralen Onkogene reguliert, unterstützt ErbB2 auch die Tumortransformation infizierter Zellen. Hier könnte eine Antitumor-Therapie ansetzen. Für die Abwesenheit von ErbB2 konnte in vergleichenden Analysen der Promotoren von HPV11, 16 und 18 eine Tendenz zur reduzierten Promotoraktivität in Einzelmessungen gezeigt werden.

Für die Laminin-bindenden Integrine Integrin $\alpha$ 6 und Integrin $\alpha$ 3, die ebenfalls bekannte Interaktionspartner des Tetraspanins CD151 sind, wurde gleichermaßen eine essentielle Rolle im Infektionszyklus von HPV16 gezeigt. Ihre zelluläre Depletion führte zum starken und signifikanten Infektionsrückgang. Die beiden Integrine scheinen indessen unterschiedliche Funktionen im Infektionszyklus von HPV innezuhaben. Integrin $\alpha$ 6 wirkt als Rezeptor für die Viren, wird mit diesen kointernalisiert und besitzt keinen aktivierenden Einfluss auf den HPV16-Promotor. Im Gegenteil: Die Integrin $\alpha$ 6 Depletion führte zu einer Erhöhung der viralen Promotoraktivität. Für das Integrin $\alpha$ 3 wurde im Gegensatz dazu eine relevante Beeinflussung des HPV16-LCR Promotors und damit der viralen Genexpression nachgewiesen. Auch hier wäre es denkbar, dass Integrin $\alpha$ 3-Inhibitoren zur Behandlung von HPV-induzierten Tumoren genutzt werden könnten. ErbB2 und Integrin $\alpha$ 3 stellen damit neue Angriffspunkte bei der Therapie des Zervixkarzinoms, einem der häufigsten Tumorarten bei Frauen, dar.

---

## 9 Literaturverzeichnis

1. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;772:3-12.
2. Scheffer KD, Berditchevski F, Florin L. The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. *Viruses*. 2014;6(2):893-908.
3. Koch-Institut R. RKI-Ratgeber Humane Papillomviren 2018 [01.07.2022]. Available from:  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HPV.html#doc11064408bodyText3](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HPV.html#doc11064408bodyText3).
4. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis*. 2014;41(11):660-4.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
6. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
7. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017;141(4):664-70.
8. Finke J, Mikulicic S, Loster AL, Gawlitza A, Florin L, Lang T. Anatomy of a viral entry platform differentially functionalized by integrins alpha3 and alpha6. *Sci Rep*. 2020;10(1):5356.
9. Van Doorslaer K, Chen Z, Bernard HU, Chan PKS, DeSalle R, Dillner J, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*. 2018;99(8):989-90.
10. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.
11. McBride AA. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(2):95-108.
12. Wang JW, Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013;445(1-2):175-86.
13. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J*. 1991;60(6):1445-56.

14. Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven AC, Schiller JT, et al. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol.* 2008;82(11):5190-7.
15. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* 2003;77(8):4818-26.
16. Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology.* 2013;445(1-2):169-74.
17. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 2002;21(18):4754-62.
18. Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G, Harrison SC. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell.* 2000;5(3):557-67.
19. Goetschius DJ, Hartmann SR, Subramanian S, Bator CM, Christensen ND, Hafenstein SL. High resolution cryo EM analysis of HPV16 identifies minor structural protein L2 and describes capsid flexibility. *Sci Rep.* 2021;11(1):3498.
20. Egawa N, Nakahara T, Ohno S, Narisawa-Saito M, Yugawa T, Fujita M, et al. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome. *J Virol.* 2012;86(6):3276-83.
21. Ozbun MA, Meyers C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology.* 1998;248(2):218-30.
22. McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology.* 2013;445(1-2):57-79.
23. Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* 2013;445(1-2):80-98.
24. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.
25. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 1990;248(4951):76-9.
26. Leechanachai P, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene.* 1992;7(1):19-25.
27. 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.
28. Graham SV. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. *Clin Sci (Lond).* 2017;131(17):2201-21.

29. Spoden G, Kuhling L, Cordes N, Frenzel B, Sapp M, Boller K, et al. Human papillomavirus types 16, 18, and 31 share similar endocytic requirements for entry. *J Virol.* 2013;87(13):7765-73.
30. Shope RE, Hurst EW. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med.* 1933;58(5):607-24.
31. Ozbun MA. Extracellular events impacting human papillomavirus infections: Epithelial wounding to cell signaling involved in virus entry. *Papillomavirus Res.* 2019;7:188-92.
32. Hong S, Laimins LA. Regulation of the life cycle of HPVs by differentiation and the DNA damage response. *Future Microbiol.* 2013;8(12):1547-57.
33. Mikulicic S, Strunk J, Florin L. HPV16 Entry into Epithelial Cells: Running a Gauntlet. *Viruses.* 2021;13(12).
34. Florin L, Lang T. Tetraspanin Assemblies in Virus Infection. *Front Immunol.* 2018;9:1140.
35. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000318.
36. Richards KF, Bienkowska-Haba M, Dasgupta J, Chen XS, Sapp M. Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 2013;87(21):11426-37.
37. Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog.* 2012;8(2):e1002519.
38. Abban CY, Meneses PI. Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection. *Virology.* 2010;403(1):1-16.
39. Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *J Virol.* 2009;83(5):2067-74.
40. Selinka HC, Florin L, Patel HD, Freitag K, Schmidtke M, Makarov VA, et al. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces noninfectious uptake of human papillomavirus. *J Virol.* 2007;81(20):10970-80.
41. Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 2001;75(3):1565-70.

42. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol.* 2006;80(18):8940-50.
43. Cerqueira C, Liu Y, Kuhling L, Chai W, Hafezi W, van Kuppevelt TH, et al. Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cell Microbiol.* 2013;15(11):1818-36.
44. Broutian TR, Brendle SA, Christensen ND. Differential binding patterns to host cells associated with particles of several human alphapapillomavirus types. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 2):531-40.
45. Richards KF, Mukherjee S, Bienkowska-Haba M, Pang J, Sapp M. Human papillomavirus species-specific interaction with the basement membrane-resident non-heparan sulfate receptor. *Viruses.* 2014;6(12):4856-79.
46. Selinka HC, Giroglou T, Nowak T, Christensen ND, Sapp M. Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol.* 2003;77(24):12961-7.
47. Bienkowska-Haba M, Patel HD, Sapp M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(7):e1000524.
48. Cerqueira C, Samperio Ventayol P, Vogeley C, Schelhaas M. Kallikrein-8 Proteolytically Processes Human Papillomaviruses in the Extracellular Space To Facilitate Entry into Host Cells. *J Virol.* 2015;89(14):7038-52.
49. Richards RM, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1522-7.
50. Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin-precleaved papillomavirus capsids. *J Virol.* 2008;82(24):12565-8.
51. Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20458-63.
52. Fothergill T, McMillan NA. Papillomavirus virus-like particles activate the PI3-kinase pathway via alpha-6 beta-4 integrin upon binding. *Virology.* 2006;352(2):319-28.

53. Smith JL, Lidke DS, Ozbun MA. Virus activated filopodia promote human papillomavirus type 31 uptake from the extracellular matrix. *Virology*. 2008;381(1):16-21.
54. Schelhaas M, Shah B, Holzer M, Blattmann P, Kuhling L, Day PM, et al. Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002657.
55. Bannach C, Brinkert P, Kuhling L, Greune L, Schmidt MA, Schelhaas M. Epidermal Growth Factor Receptor and Abl2 Kinase Regulate Distinct Steps of Human Papillomavirus 16 Endocytosis. *J Virol*. 2020;94(11).
56. 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.
57. Surviladze Z, Sterkand RT, Ozbun MA. Interaction of human papillomavirus type 16 particles with heparan sulfate and syndecan-1 molecules in the keratinocyte extracellular matrix plays an active role in infection. *J Gen Virol*. 2015;96(8):2232-41.
58. Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C, et al. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One*. 2008;3(10):e3313.
59. Scheffer KD, Gawlitza A, Spoden GA, Zhang XA, Lambert C, Berditchevski F, et al. Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus type 16 endocytosis. *J Virol*. 2013;87(6):3435-46.
60. Florin L, Sapp M, Spoden GA. Host-cell factors involved in papillomavirus entry. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201(4):437-48.
61. Levy S, Shoham T. Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:218-24.
62. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58(9):1189-205.
63. Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 17):3641-8.
64. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(10):801-11.
65. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:397-422.

66. Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today*. 1994;15(12):588-94.
67. Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal*. 2003;15(6):559-64.
68. Fast LA, Lieber D, Lang T, Florin L. Tetraspanins in infections by human cytomegalo- and papillomaviruses. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(2):489-97.
69. Zhu YZ, Luo Y, Cao MM, Liu Y, Liu XQ, Wang W, et al. Significance of palmitoylation of CD81 on its association with tetraspanin-enriched microdomains and mediating hepatitis C virus cell entry. *Virology*. 2012;429(2):112-23.
70. Nydegger S, Khurana S, Kremmentsov DN, Foti M, Thali M. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol*. 2006;173(5):795-807.
71. Earnest JT, Hantak MP, Park JE, Gallagher T. Coronavirus and influenza virus proteolytic priming takes place in tetraspanin-enriched membrane microdomains. *J Virol*. 2015;89(11):6093-104.
72. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283(3):668-73.
73. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997;71(3):2449-56.
74. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*. 1999;261(2):271-9.
75. Dziduszko A, Ozbun MA. Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes. *J Virol*. 2013;87(13):7502-15.
76. Woodham AW, Da Silva DM, Skeate JG, Raff AB, Ambroso MR, Brand HE, et al. The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One*. 2012;7(8):e43519.
77. Wustenhagen E, Hampe L, Boukhallouk F, Schneider MA, Spoden GA, Negwer I, et al. The Cytoskeletal Adaptor Obscurin-Like 1 Interacts with the Human Papillomavirus 16 (HPV16) Capsid Protein L2 and Is Required for HPV16 Endocytosis. *J Virol*. 2016;90(23):10629-41.



78. Bienkowska-Haba M, Williams C, Kim SM, Garcea RL, Sapp M. Cyclophilins facilitate dissociation of the human papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry. *J Virol.* 2012;86(18):9875-87.
79. Muller KH, Spoden GA, Scheffer KD, Brunnhofer R, De Brabander JK, Maier ME, et al. Inhibition by cellular vacuolar ATPase impairs human papillomavirus uncoating and infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2905-11.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. Uhlorn BL, Jackson R, Li S, Bratton SM, Van Doorslaer K, Campos SK. Vesicular trafficking permits evasion of cGAS/STING surveillance during initial human papillomavirus infection. *PLoS Pathog.* 2020;16(11):e1009028.
85. Schneider MA, Spoden GA, Florin L, Lambert C. Identification of the dynein light chains required for human papillomavirus infection. *Cell Microbiol.* 2011;13(1):32-46.
86. Florin L, Becker KA, Lambert C, Nowak T, Sapp C, Strand D, et al. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *J Virol.* 2006;80(13):6691-6.
87. Aydin I, Weber S, Snijder B, Samperio Ventayol P, Kuhbacher A, Becker M, et al. Large scale RNAi reveals the requirement of nuclear envelope breakdown for nuclear import of human papillomaviruses. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004162.
88. 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.

89. 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.
90. 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.
91. 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 Mol Biol.* 2013;1064:101-13.
92. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990;61(2):203-12.
93. Williams CC, Allison JG, Vidal GA, Burow ME, Beckman BS, Marrero L, et al. The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol.* 2004;167(3):469-78.
94. Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science.* 2001;294(5549):2179-81.
95. Offterdinger M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol.* 2002;157(6):929-39.
96. Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(2):143-8.
97. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):802-8.
98. Lee HJ, Jung KM, Huang YZ, Bennett LB, Lee JS, Mei L, et al. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6318-23.
99. Berditchevski F, Odintsova E. ErbB receptors and tetraspanins: Casting the net wider. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;77(Pt A):68-71.
100. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235(4785):177-82.
101. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by

- 
- Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5276-87.
102. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 1997;16(7):1647-55.
103. Chen QQ, Chen XY, Jiang YY, Liu J. Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein. *Cell Res.* 2005;15(7):504-10.
104. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014;25(3):282-303.
105. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(8):553-63.
106. Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.* 1995;14(17):4267-75.
107. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene.* 1995;10(9):1813-21.
108. Wang SC, Lien HC, Xia W, Chen IF, Lo HW, Wang Z, et al. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell.* 2004;6(3):251-61.
109. Kajiji S, Tamura RN, Quaranta V. A novel integrin (alpha E beta 4) from human epithelial cells suggests a fourth family of integrin adhesion receptors. *EMBO J.* 1989;8(3):673-80.
110. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 1990;4(11):2868-80.
111. Giancotti FG. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: charting the path between laminin binding and nuclear events. *J Cell Sci.* 1996;109 ( Pt 6):1165-72.
112. Mainiero F, Pepe A, Wary KK, Spinardi L, Mohammadi M, Schlessinger J, et al. Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *EMBO J.* 1995;14(18):4470-81.
113. Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1993;120(3):577-85.

114. Giancotti FG, Mainiero F. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1198(1):47-64.
115. Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars LH, de Melker AA, Delwel GO, Hulsman EH, et al. The alpha 6 beta 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res*. 1994;211(2):360-7.
116. Spinardi L, Einheber S, Cullen T, Milner TA, Giancotti FG. A recombinant tail-less integrin beta 4 subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress alpha 6 beta 4-mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol*. 1995;129(2):473-87.
117. Zhang XA, Kazarov AR, Yang X, Bontrager AL, Stipp CS, Hemler ME. Function of the tetraspanin CD151-alpha6beta1 integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell*. 2002;13(1):1-11.
118. Yauch RL, Berditchevski F, Harler MB, Reichner J, Hemler ME. Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell*. 1998;9(10):2751-65.
119. Yauch RL, Kazarov AR, Desai B, Lee RT, Hemler ME. Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9230-8.
120. Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths MR, Fitter S, Ashman L, Jenner SJ. Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41165-74.
121. Marsh M, Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006;124(4):729-40.
122. Payne E, Bowles MR, Don A, Hancock JF, McMillan NA. Human papillomavirus type 6b virus-like particles are able to activate the Ras-MAP kinase pathway and induce cell proliferation. *J Virol*. 2001;75(9):4150-7.
123. 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.
124. 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.
125. Buck CB, Thompson CD, Roberts JN, Muller M, Lowy DR, Schiller JT. Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. *PLoS Pathog*. 2006;2(7):e69.
126. 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.
127. 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.
128. Schweiger MR, Ottinger M, You J, Howley PM. Brd4-independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. *J Virol.* 2007;81(18):9612-22.
129. Giri DK, Ali-Seyed M, Li LY, Lee DF, Ling P, Bartholomeusz G, et al. Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol.* 2005;25(24):11005-18.
130. Boone JJ, Bhosle J, Tilby MJ, Hartley JA, Hochhauser D. Involvement of the HER2 pathway in repair of DNA damage produced by chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(11):3015-23.
131. Rommel O, Dillner J, Fligge C, Bergsdorf C, Wang X, Selinka HC, et al. Heparan sulfate proteoglycans interact exclusively with conformationally intact HPV L1 assemblies: basis for a virus-like particle ELISA. *J Med Virol.* 2005;75(1):114-21.
132. 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 Lett.* 2003;536(1-3):120-4.
133. Karamatic Crew V, Burton N, Kagan A, Green CA, Levene C, Flintner F, et al. CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood.* 2004;104(8):2217-23.
134. Muthuswamy SK, Gilman M, Brugge JS. Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol.* 1999;19(10):6845-57.
135. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761-71.
136. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J Virol.* 2004;78(2):751-7.
137. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(16):7297-301.

138. Spoden GA, Besold K, Krauter S, Plachter B, Hanik N, Kilbinger AF, et al. Polyethylenimine is a strong inhibitor of human papillomavirus and cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):75-82.
139. Carter MS, J. Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition), Chapter 15 - Biochemical Assays and Intracellular Signaling. Matt Carter JS, editor: Academic Press; 2015.
140. Borg JP, Marchetto S, Le Bivic A, Ollendorff V, Jaulin-Bastard F, Saito H, et al. ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nat Cell Biol.* 2000;2(7):407-14.
141. Dillon C, Creer A, Kerr K, Kumin A, Dickson C. Basolateral targeting of ERBB2 is dependent on a novel bipartite juxtamembrane sorting signal but independent of the C-terminal ERBIN-binding domain. *Mol Cell Biol.* 2002;22(18):6553-63.
142. Murayama Y, Shinomura Y, Oritani K, Miyagawa J, Yoshida H, Nishida M, et al. The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol.* 2008;216(1):135-43.
143. Park SY, Yoon SJ, Freire-de-Lima L, Kim JH, Hakomori SI. Control of cell motility by interaction of gangliosides, tetraspanins, and epidermal growth factor receptor in A431 versus KB epidermoid tumor cells. *Carbohydr Res.* 2009;344(12):1479-86.
144. Chen S, Sun Y, Jin Z, Jing X. Functional and biochemical studies of CD9 in fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem.* 2011;350(1-2):89-99.
145. Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol.* 2000;10(16):1009-12.
146. Yang XH, Flores LM, Li Q, Zhou P, Xu F, Krop IE, et al. Disruption of laminin-integrin-CD151-focal adhesion kinase axis sensitizes breast cancer cells to ErbB2 antagonists. *Cancer Res.* 2010;70(6):2256-63.
147. Mieszkowska M, Piasecka D, Potemski P, Debska-Szmich S, Rychlowski M, Kordek R, et al. Tetraspanin CD151 impairs heterodimerization of ErbB2/ErbB3 in breast cancer cells. *Transl Res.* 2019;207:44-55.
148. Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature.* 2003;424(6947):456-61.
149. Woods Ignatoski KM, Dziubinski ML, Ammerman C, Ethier SP. Cooperative interactions of HER-2 and HPV-16 oncoproteins in the malignant transformation of human mammary epithelial cells. *Neoplasia.* 2005;7(8):788-98.

150. Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*. 2007;26(21):2988-96.
151. Culp TD, Christensen ND. Kinetics of in vitro adsorption and entry of papillomavirus virions. *Virology*. 2004;319(1):152-61.
152. Tiwari RK, Borgen PI, Wong GY, Cordon-Cardo C, Osborne MP. HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res*. 1992;12(2):419-25.
153. Blanco R, Carrillo-Beltran D, Munoz JP, Corvalan AH, Calaf GM, Aguayo F. Human Papillomavirus in Breast Carcinogenesis: A Passenger, a Cofactor, or a Causal Agent? *Biology (Basel)*. 2021;10(8).
154. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res*. 2005;7(1):R1-11.
155. Lawson JS, Glenn WK, Salyakina D, Delprado W, Clay R, Antonsson A, et al. Human Papilloma Viruses and Breast Cancer. *Front Oncol*. 2015;5:277.
156. Ngan C, Lawson JS, Clay R, Delprado W, Whitaker NJ, Glenn WK. Early Human Papilloma Virus (HPV) Oncogenic Influences in Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9:93-7.
157. Yasmeen A, Bismar TA, Dekhil H, Ricciardi R, Kassab A, Gambacorti-Passerini C, et al. ErbB-2 receptor cooperates with E6/E7 oncoproteins of HPV type 16 in breast tumorigenesis. *Cell Cycle*. 2007;6(23):2939-43.
158. Schlam I, Swain SM. HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer*. 2021;7(1):56.
159. Kulukian A, Lee P, Taylor J, Rosler R, de Vries P, Watson D, et al. Preclinical Activity of HER2-Selective Tyrosine Kinase Inhibitor Tucatinib as a Single Agent or in Combination with Trastuzumab or Docetaxel in Solid Tumor Models. *Mol Cancer Ther*. 2020;19(4):976-87.
160. Stipp CS. Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev Mol Med*. 2010;12:e3.
161. Sterk LM, Geuijen CA, Oomen LC, Calafat J, Janssen H, Sonnenberg A. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol*. 2000;149(4):969-82.

- 
162. Aksoy P, Abban CY, Kiyashka E, Qiang W, Meneses PI. HPV16 infection of HaCaTs is dependent on beta4 integrin, and alpha6 integrin processing. *Virology*. 2014;449:45-52.
  163. Krishnan HH, Sharma-Walia N, Streblov DN, Naranatt PP, Chandran B. Focal adhesion kinase is critical for entry of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus into target cells. *J Virol*. 2006;80(3):1167-80.
  164. Sharma-Walia N, Naranatt PP, Krishnan HH, Zeng L, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 envelope glycoprotein gB induces the integrin-dependent focal adhesion kinase-Src-phosphatidylinositol 3-kinase-rho GTPase signal pathways and cytoskeletal rearrangements. *J Virol*. 2004;78(8):4207-23.
  165. Naranatt PP, Akula SM, Zien CA, Krishnan HH, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *J Virol*. 2003;77(2):1524-39.



---

## 10 Anhang

### 10.1 Publikation zu Ergebnissen dieser Arbeit

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Integrine wurden bereits teilweise publiziert:

Finke J, Mikulicic S, Loster AL, Gawlitza A, Florin L, Lang T. Anatomy of a viral entry platform differentially functionalized by integrins alpha3 and alpha6. Sci Rep. 2020;10(1):5356.

Weiterhin sind Ergebnisse aus dieser Dissertationsschrift zu den Untersuchungen von ErbB2 Bestandteil eines am 28.09.2023 eingereichten Manuskripts:

„ErbB2/HER2 receptor tyrosine kinase regulates human papillomavirus gene expression“  
von Snježana Mikuličić, Merha Shamun, Annika Massenber, Anna-Lena Franke, Kirsten Freitag, Tatjana Döring, Johannes Strunk, Stefan Tenzer, Thorsten Lang und Luise Florin

## 10.2 Genehmigungen der Abbildungen aus zitierten Publikationen

Abbildung 1:

adaptiert aus Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Volume 772, Mallory E. Harden und Karl Munger, Human papillomavirus molecular biology, Seiten 3-12, Figure 1, Copyright Elsevier (2017) (1).

Mar 10, 2023

This Agreement between Mrs. Anna-Lena Franke ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5505261246430
License date	Mar 10, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Mutation Research/Reviews in Mutation Research
Licensed Content Title	Human papillomavirus molecular biology
Licensed Content Author	Mallory E. Harden,Karl Munger
Licensed Content Date	April–June 2017
Licensed Content Volume	772
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	10
Start Page	3
End Page	12
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	2
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	Die Rolle der Plasmamembranproteine ErbB2, Integrin <sup>β1</sup> 6 und Integrin <sup>β1</sup> 3 im Infektionszyklus der humanen Papillomviren
Institution name	Institut für Virologie der Universitätsmedizin Mainz
Expected presentation date	Apr 2023
Order reference number	1
Portions	Fig. 1. HPV16 Genome Organization and Protein Function Fig. 2. The HPV Lifecycle in Differentiating Squamous Epithelium
Specific Languages	German
Requestor Location	Mrs. Anna-Lena Franke St.-Georg-Str. 1  Mainz, 55128 Germany Attn: Mrs. Anna-Lena Franke
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	<b>0.00 EUR</b>
Terms and Conditions	

Abbildung 2:

aus Mutation Research/Reviews in Mutation Research, Volume 772, Mallory E. Harden und Karl Munger, Human papillomavirus molecular biology, Seiten 3-12, Figure 2, Copyright Elsevier (2017) (1). Die Abbildung wurde unverändert verwendet.

---

Abbildung 3:

aus *Viruses*, 6(2), Konstanze D. Scheffer, Fedor Berditchevski und Luise Florin, The Tetraspanin CD151 in Papillomavirus Infection, Seiten 893-908, Figure 2, (2014) (2). Es handelt sich um einen *open access article* nach der *Creative Commons Attribution License* (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Die Abbildung wurde unverändert verwendet.

Abbildung 4:

Eigene Abbildung, die mit BioRender.com erstellt wurde.

Abbildung 13:

Eigene Abbildung, die mit BioRender.com erstellt wurde.