INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom- Biochemikerin Eileen Reinz

geboren in Erfurt

Tag der mündlichen Prüfung:

Spatio-temporäre Analyse

des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors:

Modulation der Signaltransduktion

durch das humane Papillomavirus Typ 16 E5-Protein

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Angel Alonso am Institut für Angewandte Tumorvirolgie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg im Zeitraum von April 2007 bis Dezember 2010 durchgeführt.

Erstgutachter: PD Dr. Martin Müller
(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angel Alonso
(Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg)

Während der Anfertigung dieser Arbeit sind folgende Publikationen erschienen:

Schmidt-Glenewinkel H, Reinz E, Eils R, Brady NR.

Systems biological analysis of epidermal growth factor receptor internalization dynamics for altered receptor levels.

J Biol Chem. 2009 Jun 19;284(25):17243-52. Epub 2009 Mar 17.

Alonso A, Reinz E, Jenne JW, Fatar M, Schmidt-Glenewinkel H, Hennerici MG, Meairs S.

Reorganization of gap junctions after focused ultrasound blood-brain barrier opening in the rat brain.

J Cereb Blood Flow Metab. 2010 Jul;30(7):1394-402. Epub 2010 Mar 24.

<u>Veröffentlichung in Vorbereitung:</u>

Schmidt-Glenewinkel H, Reinz E, Bulashevska S, Beaudouin J, Legewie S, Alonso A, Eils R.

Multiparametric image analysis reveals role of Cav1 in endosomal progression rather than internalization of EGFR

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....8
Summary.....10
1. Einleitung.....12
1.1 Das Zervixkarzinom und humane Papillomaviren.....12
1.1.1 HPV-Infektion.....13
1.1.2 Karzinogenese 15
1.1.3 Funktion der viralen Onkoproteine E6 und E7.....17
1.1.4 Das Onkoprotein E5 von BPV1 und HPV16.....19
1.2 Signaltransduktion der ErbB-Rezeptorfamilie.....25
1.2.1 Die EGF vermittelte EGFR-Signaltransduktion.....29
1.3 Zielstellung 35
2. Material.....38
2.1 Biologische Materialien.....38
2.1.1 Bakterienstämme.....38
2.1.2 Zelllinien.....38
2.2 Kulturmedien und Zusätze.....39
2.2.1 Bakterienkultur.....39
2.2.2 Zellkultur.....39
2.3 Nukleinsäuren.....40
2.3.1 Plasmide.....40
2.3.2 Primer.....41
2.4 Chemikalien und Reagenzien.....41
2.5 Kits.....41
2.6 Größenstandards.....42
2.7 Enzyme und zugehörige Puffer.....42
2.8 Antikörper und Proteine.....43
2.8.1 Rekombinante Proteine.....43
2.8.2 Primärantikörper.....43
2.8.3 Sekundärantikörper.....44
2.9 Puffer und Lösungen.....45
2.10 Verbrauchsmaterialien.....49

2.11 Geräte....50

3. Methoden....52

3.1 Mikrobiologische Methoden....52

3.1.1 Lagerung und Kultur von Bakterien....52

3.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien....52

3.1.3 Transformation von E.coli DH5α, DH10B $T1^R$ und HB101 mittels Elektroporation....53

3.2 Molekularbiologische Methoden....53

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien....53

3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen....54

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren....54

3.2.4 Restriktionsanalyse....55

3.2.5 Agarosegelelektrophorese....56

3.2.6 Elution von DNA-Fragmenten....57

3.2.7 Ligation....57

3.2.8 Polymerasekettenreaktion....58

3.2.8.1 ReverseTranskription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)....58

3.3 Zellbiologische Methoden....59

3.3.1 Auftauen von Kryokonserven....59

3.3.2 Kultivierung adhärenter Zelllinien....59

3.3.3 Kryokonservierung einer Zelllinie....60

3.3.4 Zellzahlbestimmung....60

3.3.5 Herstellung stabiler Transfektanten mit FuGENE-HD....61

3.3.6 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion....62

3.3.7 Retrovirale Transduktion von Zelllinien....62

3.3.8 Zellkulturexperimente....63

3.3.8.1 Behandlung der Zellen mit AR, EGF, HRG und TGFα...63

3.3.8.2 Inhibitorexperimente....64

3.3.8.2.1 Behandlung mit Chlorpromazin, Methyl-β-cyclodextrin, Filipin und Nystatin....64

3.3.8.2.2 Behandlung mit Monensin....64

3.3.8.2.3 Behandlung mit Tyrphostin (AG1478)....65

3.3.8.3 Markierung von Oberflächenproteinen mit Biotin....65

3.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....66
3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten.....66
3.4.1.1 SDS-Extrakte.....66
3.4.1.2 RIPA-Extrakte.....67
3.4.1.3 M-PER-Extrakte.....67
3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....68
3.4.2.1 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay).....68
3.4.2.2 Bestimmung mit 2-D Quant Kit.....68
3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....69
3.4.4 Coomassie-Blaufärbung von Proteinen.....70
3.4.5 Silberfärbung von Proteinen.....70
3.4.6 Immunblot (Western Blot).....70
3.4.7 Immunpräzipitation und Coimmunpräzipitation.....72
3.4.8 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) 73
3.4.8.1 Färbung von intrazellulären Proteinen.....74
3.4.9 Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie.....74
3.4.10 In-Cell und On-Cell Western Blot (ICW bzw. OCW)……...76
4. Ergebnisse.....78
4.1 Einfluss des HPV16 E5-Proteins auf die EGF vermittelte EGFR-Signaltransduktion.....78
4.1.1 Nachweis der HPV16 E5-Expression.....79
4.1.2 Liganden abhängige EGF-Rezeptorphosphorylierung.....82
4.1.3 Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung von der Ligandenkonzentration.....84
4.1.4 Kinetische Analyse der Rezeptoraktivierung nach EGF-Stimulation.....86
4.1.5 Transport und Lokalisation des EGFR nach Aktivierung mit EGF.....93
4.1.6 Schlussfolgerung.....115
4.2 EGFR-Internalisierung.....117
4.2.1 Kinetische Analyse der Clathrin-abhängigen Internalisierung.....120

4.2.2 Kinetische Analyse der Clathrin-unabhängigen Internalisierung 134
4.3 Intrazellulärer Transport von EGFR.....143
4.3.1 Frühe Endosomen.....143
4.3.2 Multivesikuläre Körperchen.....155
4.3.3 Recycling.....162
4.4 EGFR-Inaktivierung und -Abbau.....168
4.4.1 Späte Endosomen und Lysosomen 168
4.5 Zusammenfassung der Effekte des HPV16 E5-Proteins auf die EGFR Signaltransduktion.....171
5. Diskussion.....174
5.1 Das Onkoprotein HPV16 E5 verursacht eine zellunspezifische, EGF-abhängige Überaktivierung von EGF-Rezeptoren.....175
5.2 Die Anwesenheit von HPV16 E5 verändert den endozytotischen Transport des EGF-Rezeptors.....184
5.3 Die E5-bedingte EGFR-Überaktivierung kann nicht auf ein verstärktes Recycling zurückgeführt werden.....193
5.4 In Gegenwart von HPV16 E5 wird eine Inhibierung des endozytotischen Transports zum späten Endosomen hervorgerufen.....195
5.5 Die Inaktivierung der EGF-Rezeptoren wird durch HPV16 E5 gehemmt.....198
5.6 Zusammenfassung der molekularen Mechanismen der HPV16 E5-bedingten EGFR-Überaktivierung.....200

Literaturverzeichnis.....202
Abkürzungsverzeichnis.....235
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....238
Danksagung.....243
Erklärung.....244

Zusammenfassung

Ursächlich für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist eine persistierende Infektion mit humanpathogenen Papillomaviren (HPV) des sogenannten Hochrisiko-Typs, deren DNA-Sequenzen in mehr als 65% aller Zervixkarzinome nachgewiesen werden konnten. Die HPV-Familie besteht aus mehr als 100 Typen, von denen vorwiegend die Typen 16 und 18 mit der tumoralen Entwicklung assoziiert sind. Verantwortlich für die Malignisierung des Epithels sind drei Onkogene des HPV-Typs 16, dazu zählt das kleine, hydrophobe Protein E5, welches hauptsächlich in der Membran von Golgi-Apparat und endosomaler Kompartimente lokalisiert ist. Das Protein besitzt selbst nur schwache transformierende Eigenschaften, ist aber in der Lage die Onkogenizität der beiden anderen Onkogene E6 und E7 zu potenzieren. Der Haupteffekt des E5-Onkogens ist eine Überaktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR), deren Folge eine gesteigerte Transkription mit anschließender Mitose ist.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der zellbiologischen Mechanismen, die durch E5 moduliert werden und eine verstärkte Aktivierung der EGF-Rezeptoren bewirken.

Die quantitative Analyse mittels Immunblot und On-Cell Western Blot zeigte in Anwesenheit von HPV16 E5 eine Zunahme an Oberflächen-assoziierten EGF-Rezeptoren. Folglich wurde im Vergleich zu den Kontroll-Zellen eine Verstärkung der Liganden-vermittelten EGFR-Aktivierung hervorgerufen, die über einen langen Zeitraum nach Zugabe von EGF anhielt und unabhängig von der Internalisierungsrate war. Zusätzlich zu den klassischen molekular- und zellbiologischen Methoden wurde eine neue Technologie eingesetzt, die eine spatio-temporäre Analyse der E5-bedingten Modulation der EGFR-Signaltransduktion ermöglichte. Mit Hilfe der automatisierten, quantitativen Analyse von drei-dimensionalen Multikanalbildern, die am konfokalen Mikroskop generiert wurden, konnte eine genaue Charakterisierung des endozytotischen Transports von aktivierten und Gesamt-EGFR in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen erfolgen. Der Einsatz von Vesikel-spezifischen Markern ermöglichte zudem die genaue Lokalisation der Rezeptoren innerhalb eines spezifischen zellulären Kompartiments. In Anwesenheit von E5 konnte eine stärkere und schnellere Fusion von EGFR-positiven Vesikeln mit dem frühen Endosomen nachgewiesen werden. Durch das

zügige Fortschreiten des endozytotischen Transports erreichte eine deutliche höhere Anzahl von phospho-EGFR-positiven Vesikeln frühzeitig die perinuklear lokalisierten multivesikulären Körperchen (MVB), ohne zuvor die zytoplasmatischen MVBs zu passieren. Zu den späten Zeitpunkten der EGF-Stimulation konnte eine Akkumulation von aktivierten Rezeptoren in perinuklearen Endosomen-ähnlichen Kompartimenten heterogener Struktur dokumentiert werden, die mit einer verminderten Dephosphorylierung von aktivierten Rezeptoren verbunden war und schließlich zu einer langanhaltenden Überaktivierung von EGF-Rezeptoren führte. Durch die Behandlung mit dem Recycling-Inhibitor Monensin konnte im Vergleich zu den Kontrollen keine Beeinträchtigung der Phosphorylierung von EGFR in E5-exprimierenden Zellen dokumentiert werden. Damit kann eine potentielle Zunahme des Recyclings von EGF-Rezeptoren als Ursache der E5-vermittelten Überaktivierung ausgeschlossen werden. Die hier dargestellten Ergebnisse beweisen, dass die verstärkte und langanhaltende Aktivierung von EGFR durch eine modifizierte Endozytose und Dephosphorylierung während des Transports der Rezeptoren von frühen Endosomen zu den multivesikulären Körperchen verursacht wird. Dadurch umgehen die Rezeptoren den Abbau in den Lysosomen und bewirken eine gesteigerte Transkription früher Gene im Nukleus, die in einer EGFR-vermittelten Deregulation der Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose resultiert.

Summary

The persistent infection by human papillomavirus (HPV) of mainly types 16 and 18 is the initial step for cervical cancer development, but additional genetic alterations are required for the progression to cervical carcinomas. The three HPV oncogenes E5, E6 and E7 are known to play a major role in cervical carcinogenesis causing deregulation of cell differentiation, proliferation and apoptosis and providing infected cells with a selective growth advantage. The small hydrophobic protein E5, largely located in the membranes of the Golgi apparatus and endosomal compartments, is characterized by weak transforming activity, but able to potentiate the oncogenic effects of E6 and E7. Main target of the E5 protein has been found to be the epidermal growth factor receptor (EGFR). It has been suggested that E5 causes a downregulation of EGFR ubiquitination and degradation leading to upregulation of its kinase activity.

Aim of the present work was the characterization of the molecular mechanisms that are modulated by E5 leading to EGFR overactivation.

Quantitative Immunblot analyses and On-Cell Western Blot analyses were performed to establish relative levels of surface, activated and total EGFR in E5-expressing human keratinocytes and in the corresponding controls. Upon EGF stimulation we observed in E5-expressing cells an upregulation of plasma membrane-associated receptors. The ligand-mediated overactivation lasted longer in cells expressing the viral gene compared to controls and was independent of the internalization ratio. In order to study the behavior of the receptors during trafficking, a novel technical approach of image analysis allowing spatio-temporal investigation of the E5-modulated EGFR-signaling was employed. This approach is based on the quantitative analysis of 3D pictures obtained by confocal microscopy simultaneously using antibodies specific for the receptor, total or phosphorylated, and for different cellular compartments. With this methodology we were able to depict a spatio-temporal picture of the receptor fate in control and E5-expressing cells. In the presence of E5 we detected a faster and stronger fusion of EGFR-positive vesicles with early endosomes, vesicles which were rapidly transported to multivesicular bodies. Further, in E5-expressing cells we found an accumulation of the receptor in perinuclear endosomal-like compartments of

heterogeneous structure. Further, we could demonstrate that E5-mediated EGFR overactivation was not affected in the presence of tyrosine kinase inhibitors. In addition, no changes were noticed in the recycling pattern of the receptors when trafficking was chemically suppressed. All these results indicate that HPV16 E5 modulates receptor trafficking and not, as has been currently accepted, receptor recycling. The impaired trafficking leads to a decreased receptor dephosphorylation and a long-lasting downstream signaling. The consequence is an increased transport of transcriptional factors to the nucleus resulting in altered gene expression and deregulated cell proliferation.

1. Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom und humane Papillomaviren

Die Diagnose Zervixkarzinom wird jährlich etwa bei 500.000 Frauen weltweit gestellt und zählt damit zur zweithäufigsten Krebserkrankung bei Frauen. Etwa 250.000 bis 280.000 Frauen sterben pro Jahr an den Folgen ihres Tumorleidens (Parkin et al. 2005; WHO 2008). In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankung auf ca. 6200 geschätzt (Globocan, 2002; Schneider et al., 2001).

Als Ursache für die Entstehung eines invasiven Zervixkarzinoms wird die persistierende Infektion mit humanpathogenen Papillomaviren (HPV) des sogenannten *high-risk* Typs angesehen, deren DNA in 99,7% aller Zervixkarzinome nachgewiesen werden konnte (Walboomers et al., 1999; Munoz et al., 2003). Der Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und einem Zervixkarzinom wurde erstmals 1976 postuliert (zur Hausen, 1976).

Die humanpathogenen Papillomaviren zählen zur Gruppe der DNA-Tumorviren. Die doppelsträngige, zirkuläre DNA liegt in einem ikosaedrischen Viruspartikel an Histone assoziiert vor. Nur einer der beiden DNA-Stränge des ca. 8kb großen Genoms ist für die Kodierung der viralen Proteine verantwortlich. Das HPV-Genom kennzeichnet sich durch acht *open reading frames* (ORFs) und kann in drei Abschnitte unterschiedlicher Funktionen unterteilt werden (Abb. 1.1.1):

1. Die frühe Genregion kodiert für die Proteine E1, E2, E4 und die Onkoproteine E5, E6, E7.

2. Die späte Genregion enthält die ORFs für die Translation der Kapsidproteine L1 und L2.

3. Die *long control region* (LCR), auch nicht kodierende Region genannt, ist gekennzeichnet durch die *cis*-aktiven Elemente für die Virusreplikation und Transkription der frühen Gene.

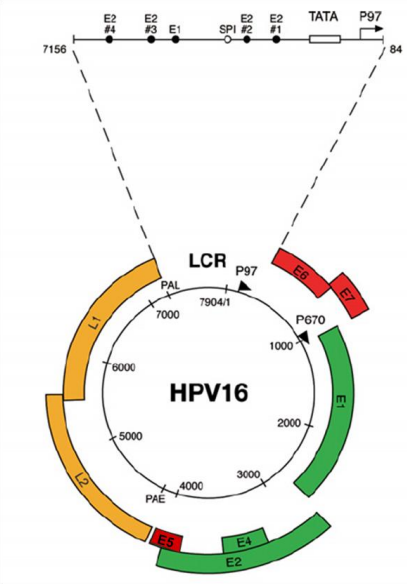


Abb. 1.1.1 Schematische Darstellung der Genomordnung von HPV 16 (modifiziert nach Doorbar, 2006)**.** Die frühen Gene E1, E2 und E4 sind grün, die Onkogene E5, E6 und E7 sind rot, die späten Gene L1 und L2 orange unterlegt. Die LCR liegt zwischen dem L1- und dem E6-ORF.

1.1.1 HPV-Infektion

Die Infektion mit humanen Papillomaviren beschränkt sich ausschließlich auf mehrschichtige Epithelien und die Drüsenepithelien der Schleimhäute (Broker & Botchan, 1986; Pfister, 1984). In Bezug auf ihren Gewebetropismus werden die Viren in cutane oder mucosale/genitale Typen eingeteilt. Jedoch existieren auch HPV-Typen, die beide Epithelien befallen können (de Villiers, 1989).

Zusätzlich kann für die mucosalen/genitalen Typen eine Unterteilung entsprechend ihres onkogenen Potentials in *low-risk* (LR)-HPV (z.B. 6 und 11) und *high-risk* (HR)-HPV (z.B. 16 und 18) erfolgen. Einige HPV-Typen (z.B. 26 und 66) werden zudem als potentiell karzinogen bzw. high-risk eingestuft (Munoz et al., 2003 und 2006).

Der Schweregrad einer HPV-Infektion reicht von gutartigen Warzen bis hin zu anogenitalen malignen Tumoren. Während gutartige Warzen hauptsächlich mit einer Infektion der cutanen humanen Papillomaviren in Verbindung gebracht werden, spielen bei der Ausbildung von Dysplasien und Tumoren vor allem die mucosalen/genitalen HPV-Typen eine entscheidende Rolle (Shah & Howley, 1996). An der Entstehung eines

Zervixkarzinoms sind jedoch ausschließlich die HR-HPV-Typen, insbesondere HPV16 und 18, beteiligt.

Die Infektion von undifferenzierten, teilungsfähigen Zellen des Stratum basale mit Papillomaviren findet über Mikroläsionen in den unteren Zellschichten des Epithels oder durch direkten Kontakt von exponierten Basalzellen statt (Abb. 1.1.2). Vermutlich dienen α6β4-Integrin, Glucosaminoglycane, Heparinsulfatproteoglycane sowie das L2-Epitop der Virushülle als Papillomavirusrezeptoren und unterstützen so eine Virus-Wirtszellinteraktion (Giroglou et al., 2001; Kawana et al., 2001). In den infizierten Basalzellen liegt die virale DNA episomal vor (Dürst et al., 1985). Sowohl die synchrone Replikation der viralen DNA zum Zellzyklus, als auch die Genexpression der viralen Proteine sind in der Basalzellschicht relativ gering.
Erst mit der Differenzierung der Epithelzellen im Stratum spinosum und Stratum granulosum findet eine erhöhte Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 statt (Dürst et al. 1992). Durch die Interaktion der Onkoproteine mit regulatorischen Wirtsproteinen wie z.B. p53 und Rb wird eine verstärkte DNA-Synthese, die unabhängig vom Zellzyklus und der Zelldifferenzierung ist, ausgelöst und die Apoptose der infizierten Zellen verhindert (Münger et al. 2002).

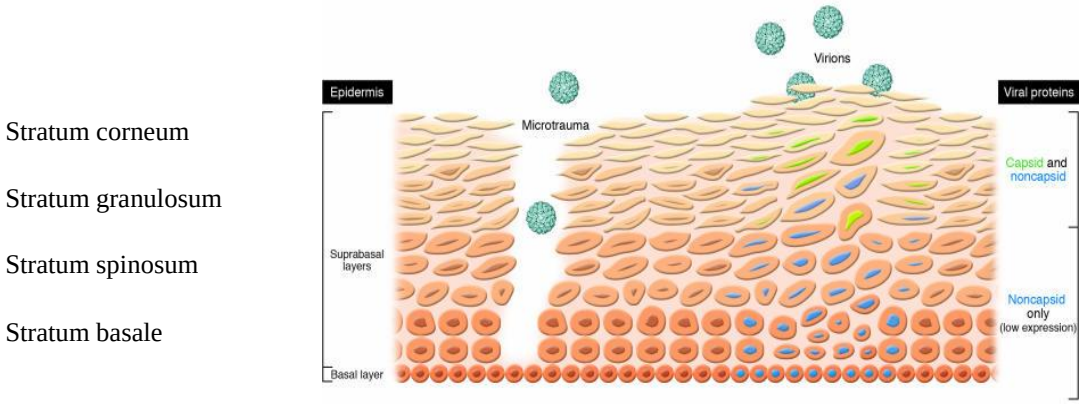


Abb. 1.1.2 Infektionszyklus der humanen Papillomaviren (modifiziert nach Lowy & Schiller, 2006)**.** Erläuterungen im Text.

Charakteristisch für die stark differenzierten Keratinozyten der äußeren Epithelschichten Stratum granulosum und Stratum corneum sind neben der erhöhten Replikation des Virusgenoms und Synthese der frühen Proteine, die zusätzliche Expression der Hüllproteine L1 und L2 und die Zusammenlagerung des Viruskapsids (Jansen & Shaw, 2004).

Schließlich werden die reifen, infektiösen Viren aus den terminal differenzierten, abgestorbenen Keratinozyten des Stratum corneum freigesetzt und bleiben außerhalb der Wirtszelle für lange Zeit stabil, was eine Infektion neuer Zellen begünstigt.

HPV-Infektionen finden favorisiert in der proliferierenden Transformationszone, am Übergang der Zylinderzellen der Endozervix zum squamösen Plattenepithel der Ektozervix, statt. Dort können sie die Bildung maligner Läsionen mit Progression zum invasiven Zervixkarzinom (Plattenepithelkarzinom) verursachen. In seltenen Fällen kommt es zur Entstehung eines Adenokarzinoms (Chew et al., 2005).

1.1.2 Karzinogenese

In der Bevölkerung sind HPV-Infektionen stark verbreitet, wobei die höchste HPV-Prävalenz bei Frauen im Alter von 20-25 Jahren zu beobachten ist (Shah & Howley; 1996). Trotz der starken Verbreitung verläuft die Mehrheit der Infektionen unauffällig. Nur etwa 20% der Frauen bilden eine Präkanzerose unterschiedlicher Ausprägung (zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN)) aus und 1-2% ein invasives Karzinom (Östör 1993; zur Hausen & Richart, 1995; Dürst, 2003). Oft finden sogar eine Regression von Dysplasien und die Genesung der HPV-Infektion statt (Östör, 1993).

Die Entstehung eines invasiven Zervixkarzinoms in Folge einer HPV-Infektion erfolgt über mehrere prämaligne Stufen, den sogenannten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN). Diese können aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie drei verschiedenen Schweregraden (CIN I, CIN II/CIN III und Carcinoma in situ) zugeordnet werden (Richart, 1973 und 1990), die ein unterschiedliches Progressions- und Regressionsverhalten aufweisen (Östör, 1993).
Seit 1988 existiert ein weiteres Klassifikationssystem unter der Bezeichnung squamöse intraepitheliale Läsion (SIL). Diese zytologische Einteilung unterscheidet nur zwischen zwei verschiedenen Schweregraden, leicht-gradige (low grade/ CIN I) und hoch-gradige (high grade/ CIN II/III und Carcinoma *in situ*) SIL (Darei et al., 2009).

Das Differenzierungsbild leichtgradiger Läsionen (CIN I) ähnelt dem des normalen Epithels. Mitotisch aktive Zellen sind jedoch nicht nur in der Basalzellschicht vorzufinden, sondern auch im unteren Drittel des Epithels (Abb. 1.1.3). In den oberen epithelialen Schichten treten bereits leichte Störungen in der Differenzierung auf. Sich selbst überlassen, bilden sich diese leichten, krankhaften Veränderungen in den meisten Fällen spontan zurück.

Während in den CIN I nur selten eine Progression zum Karzinom stattfindet, progredieren höhergradige Läsionen (CIN II und CIN III) häufiger zu schwergradigen Dysplasien und zum Zervixkarzinom. Hingegen tritt eine spontane Regression zum Normalgewebe in diesen fortgeschrittenen Stadien seltener auf (Östör, 1993).

Die Neoplasien der Stadien II und III kennzeichnen sich durch eine hohe Anzahl an mitotisch aktiven Zellen im gesamten Epithel und einer zunehmend fehlenden Differenzierung der Zellen aus (Abb. 1.1.3).

Der Übergang eines Carcinoma *in situ* zum invasiven Zervixkarzinom ist histologisch durch den Durchbruch der Basallamina in das umliegende Gewebe charakterisiert. Infolge der guten lymphatischen Versorgung des Gebärmutterhalses sind frühzeitige Metastasierungen des Zervixkarzinoms oft zu beobachten.

In seltenen Fällen können Karzinome auch ohne vorangehende Neoplasie entstehen (Koutsky et al., 1992).

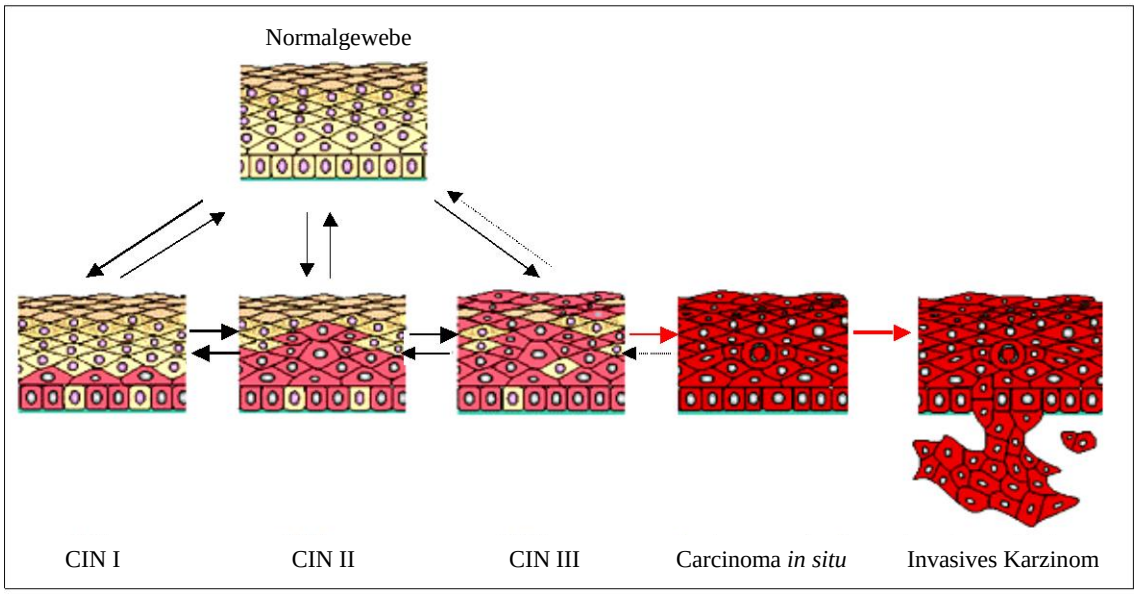


Abb. 1.1.3 Zervixkarzinogenese. Histologische Entwicklung des Epithels von leichtgradigen Läsionen bis hin zum invasiven Karzinom (modifiziert nach www.gesundheit.de)**.**

Das Potential einer Neoplasie zu progredieren bzw. zu regredieren hängt vor allem von dem HPV-Typ der Infektion ab. Infektionen mit HR-HPV-Typen weisen ein höheres Progressionspotential auf als LR-HPV-Infektionen.

Zudem sind auch noch andere Faktoren wie z.B. der Status des HPV-Genoms und die Anzahl der DNA-Kopien von großer Bedeutung. Die Integration viraler DNA in das Wirtszellgenom fortgeschrittener CIN hat oftmals eine Deletion oder Zerstörung der 3´Region der frühen Gene zur Folge, wodurch eine Expression von E2 nicht mehr möglich ist. Daraus resultieren eine Aufhebung der E2 bedingten Transkriptions-hemmung von E6 und E7 und schließlich eine verstärkte Expression beider Onkogene.

1.1.3 Funktion der viralen Onkoproteine E6 und E7

Die größte Bedeutung der Virusproteine E6 und E7 liegt in der Stimulation der Zellproliferation und der Fähigkeit Epithelzellen wie z.B. humane Keratinozyten zu immortalisieren (Münger et al., 1989). Gemeinsames strukturbildendes Merkmal der beiden Onkoproteine sind jeweils zwei Zink-Finger-Motive, die eine DNA-Protein-Wechselwirkung ermöglichen.

Die Schlüsselfunktion des ***Onkoproteins E6*** ist die Bindung an das Tumorsuppressor-Protein p53 und dessen Degradation. Unter Beteiligung an den grundlegenden Mechanismen i) Zellzykluskontrolle, ii) Apoptose und iii) Erhaltung der genetischen Stabilität schützt p53 vor zellulären Schäden und Störungen (Alberts et al., 2004). Die Interaktion von E6 mit p53 infolge einer HPV-Infektion bewirkt die Rekrutierung der Ubiquitin-Ligase E6-AP (E6-assoziiertes Protein), die p53 für den proteasomalen Abbau markiert (Huibregste et al., 1991). Zu dem verhindert E6 durch Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor p300/CBP eine p53-abhängige Transkriptionskontrolle und verursacht dadurch eine Herunterregulation von p53 (Lechner & Laimins, 1994; Zimmermann et al., 1999). Folglich kommt es in Anwesenheit von E6 durch Inhibierung der Apoptose und dem ungehinderten Fortschreiten des Zellzyklus zu einer uneingeschränkten Proliferation von Zellen. In HPV-positiven Zellen kann bei induzierten DNA-Schäden weder eine Arretierung des Zellzyklus, noch eine Initiation

des Zelltods stattfinden (Kessis et al., 1993). Eine Anhäufung von Mutationen in den infizierten Zellen ist die Folge.

Bedeutend ist auch die Wechselwirkung von E6 mit Proteinen der PDZ-Familie, die u.a. als Adapterproteine an der Signaltransduktion und am Zell-Zell-Kontakt (*tight junctions*) beteiligt sind (Nakagawa & Huibregtse, 2000; Lee et al., 2000). Im Kontext mit der Interaktion von E6 spielen diese Proteine bei der Immortalisierung und Erhöhung des Metastasierungspotentials von HPV-positiven Zellen eine wichtige Rolle (Nguyen et al. 2003).

Zudem besitzt E6 die Fähigkeit, hTERT, die katalytische Untereinheit der Telomerase, zu aktivieren. Eine enzymatische Aktivität wird normalerweise nur in embryonalen Zellen und Stammzellen vorgefunden. Ausgelöst wird die Aktivierung des hTERT-Promotors durch die Wechselwirkung von E6 mit dem Transkriptionsfaktor myc (Klingelhutz et al., 1996; Veldman et al., 2003). Infolge der wiedererlangten Telomerase-Aktivität wird die replikative Zellalterung (Seneszenz) in HPV-infizierten Zellen umgangen. In den Zellen kann eine ungehinderte Zellteilung stattfinden, die möglicherweise zur Anreicherung von Gendefekten führt.

Die Hauptfunktion des ***Onkoproteins E7*** beinhaltet die Bindung und Inaktivierung von Proteinen der *pocket*-Familie pRb, p130 und p170. Die Expression des Tumorsuppressor-Proteins besteht über den gesamten Zellzyklus, die Regulation der Aktivität erfolgt über den Phosphorylierungsstatus. Der unphosphorylierte Zustand erlaubt die Bindung des E2F/DP1-Transkriptionsfaktors, wodurch ein Fortschreiten des Zellzyklus von G1- in die S-Phase verhindert wird. Die Rekrutierung von pRB durch E7 löst eine Ubiquitin-abhängige Degradation des Proteins aus, infolge dessen kommt es zur Freisetzung von E2F/DP1 (Dyson et al., 1989; Wang et al., 2001). Zudem wirkt die Bindung von E7 an Histon-Deacetylase-Komplexen (HDACs) einer Deacetylierung und Repression des E2F-Promotors entgegen (Weintraub et al., 1995; Brehm et al., 1998).

Eine weitere Besonderheit von E7 ist die Fähigkeit, mit den Cyclin-Kinase-Inhibitoren p21 und $p27^{kip}$ zu interagieren (Davies et al., 1993; Funk et al., 1997). Die Inhibierung

von p21 und $p27^{kip}$ hat die Aufrechterhaltung der Cyclin-Cdk-Aktivität (Cdk: *Cyclin dependent kinase*) zur Folge.
Infolge der Unterbindung des Zellzyklus-Arrestes durch den Konzentrationsanstieg an zellulärem E2F und dem Fortbestand der Cyclin-Cdk-Aktivität wird eine unkontrollierte Zellproliferation initiiert (Nevins, 2001).

Insgesamt betrachtet, führt eine verstärkte Expression der beiden viralen Onkogene und deren Interaktion mit zellulären Proteinen zu einem selektiven Wachstumsvorteil der HPV-infizierten Zellen, indem sie eine Deregulation von Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose verursachen. Als Konsequenz der E6-gesteuerten p53-Degradation und der dadurch eingeschränkten DNA-Reparaturmechanismen kommt es zudem zur genetischen Instabilität, welche den Erwerb neuer Mutationen in den HPV-infizierten Zellen begünstigt. Durch die Anhäufung genetischer Veränderungen ist eine Aktivierung von weiteren Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen möglich, die eine Tumorprogression zusätzlich enorm vorantreiben können.

1.1.4 Das Onkoprotein E5 von BPV1 und HPV16

Ein weiteres Onkoprotein und Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen ist das virale Protein E5.
Bei dem viralen Onkogen E5 handelt es sich um ein stark hydrophobes, Membran assoziiertes Protein, welches vorwiegend im Golgi-Apparat, im Endoplasmatischen Retikulum und in der Kernmembran vorzufinden ist (Burkhardt et al., 1989; Conrad et al., 1993).
Das E5-Protein von BPV1 umfasst 44 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 7kD entspricht (Schlegel et al., 1986; Burkhardt et al., 1987). Das HPV16 E5-Protein ist aus 83 Aminosäuren (10kD) aufgebaut (Bubb et al., 1988). Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnten sowohl für BPV1 E5, als auch für HPV16 E5 Dimere dokumentiert werden (Schlegel et al., 1986; Burkhardt et al., 1987; Kell et al., 1994). Während die Ausbildung von BPV1 E5-Proteindimeren über Disulfidbrückenbindung erfolgt, sind für die Dimerisierung von HPV16 E5-Proteinen möglicherweise andere Mechanismen verantwortlich.

Anhand der Aminosäuresequenz konnten für HPV16 E5 mit Hilfe der Kyte-Doolittle- und TMHMM-Algorithmen drei hydrophobe Transmembran-Domänen vorausgesagt werden, die durch kurze hydrophile Abschnitte getrennt sind (Bubb et al., 1988; Ullman et al., 1994; Bravo et al., 2004; Abb. 1.1.4). Die C- und N-terminalen Enden ragen als kurze Abschnitte aus der Membran heraus, wobei der hydrophile C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist (Krawczyk et al., 2010).

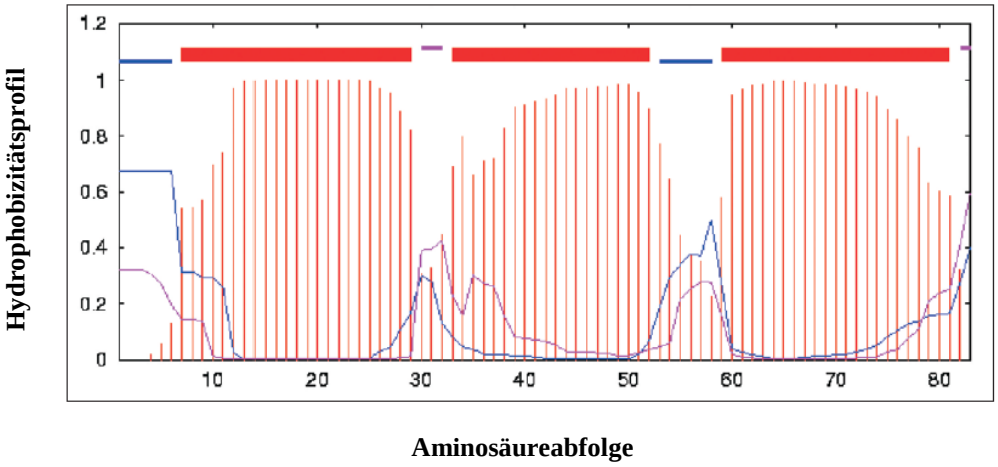


Abb. 1.1.4 Hydrophobizitätsprofil des HPV16 E5-Proteins (modifiziert nach Alonso, 2007)**.**

Modellierungsanalysen der ***HPV16 E5-Struktur*** mittels CD-Spektroskopie (CD: *circular dichroism*) ergaben eine starke Tendenz, dass die N- und C-terminalen Domänen des Proteins β-Faltblatt-Konformation annehmen (Alonso & Reed, 2002). Auch die zentrale Domäne von HPV16 E5 (AS 30-55) zeigte geringe Sekundärstrukturen, jedoch unterschied sich diese von den beiden äußeren Domänen. Möglicherweise liegen die Transmembran-Domänen als β-Schleifen vor, wobei sich die stark hydrophoben Außen-Domänen in Form von β-Faltblättern in der Membran befinden und über eine Schleife mit der weniger hydrophoben zentralen Domäne verbunden sind. Desweiteren konnten für die untersuchten Domänen LRR-Motive (LRR: *Leucin-Rich Repeat*) charakterisiert werden, die gewöhnlich α-β-Hufeisen-Struktur besitzen, und unterstützen damit zusätzlich die Hypothese der β-Konformation.

Für die ***Struktur des hydrophoben BPV1 E5-Protein*** wird hingegen eine α-helikale Struktur der Transmembrandomäne angenommen, die als Dimere *coiled-coil* Konfiguration einnehmen (Surti et al., 1998; Oates et al., 2008). Die Hauptfunktion des

BPV1 E5 ist die Interaktion mit dem β-Typ des *Platelet-derived growth factor*-Rezeptors (PDGF) und dessen Liganden-unabhängige Phosphorylierung durch Aktivierung der Tyrosinkinase (Schneider-Gadicke & Schwarz, 1986; Petti et al., 1991; Goldstein et al., 1994; DiMaio &Mattoon, 2001). Andere Interaktionspartner von BPV1 E5 sind z.B. der *Epidermal growth factor*-Rezeptor (EGFR), der *Colony stimulating factor*-1-Rezeptor oder das 16kD-Protein Ductin, eine Untereinheit der Protonen-ATPase (Martin et al., 1989; Goldstein & Schlegel, 1990; Goldstein et al., 1991; Cohen et al., 1993). Die Wechselwirkung mit E5 hat eine Verstärkung ihrer biologischen Aktivität zur Folge. Die zelltransformierende Wirkung ist jedoch vorwiegend auf die Bindung des PDGFβ-Rezeptors zurückzuführen.

Im Gegensatz zum E5-Protein der bovinen Papillomaviren (BPV), in denen E5 das wichtigste Onkoprotein darstellt, konnten für das HPV E5 bisher nur schwache ***transformierende Eigenschaften*** nachgewiesen werden (Pim et al., 1992; Leechanachai et al., 1992).

Das Onkogen E5 wurde ausschließlich in den mucosalen/genitalen HPV-Typen (α-Subtypen) gefunden, von denen es nur die α9-, α11-, α7-HR- und α10-LR-Typen exprimieren (Munoz et al., 2003; Schiffman et al., 2005). In den cutanen HPV-Typen (β-Subtypen), die bekanntlich für die Entstehung von Warzen und weniger von Tumoren verantworlich sind, konnte E5 nicht nachgewiesen werden.

Verschiedene Studien zeigten, dass dem HPV16 E5-Protein bei der Entstehung von Zervixkarzinomen auch eine wichtige Rolle zukommt. Für eine Vielzahl der HR-HPV-Typen konnte eine Expression von E5 nachgewiesen werden. Hingegen wurde für die Mehrheit der LR-HPV-Typen (ausgenommen der α10-Typen) eine Inhibierung der Translation von E5-Startcodons und/oder der Verlust des E5-ORFs beobachtet (Schiffman et al., 2005). Führere Studien postulierten, dass es infolge der Integration von HPV18-DNA ins Wirtszellgenom auch zu einer Zerstörung des E5-ORFs kommt. Demzufolge scheint das E5-Protein nicht für den Erhalt des malignen Phänotyps notwendig zu sein (Schwarz et al., 1985; Corden et al., 1999; Fehrmann & Laimins, 2003). Im Gegensatz zur HPV18-DNA liegt das HPV16-Genom in malignen Läsionen oftmals episomal vor (Choo et al., 1987; Matsukura et al., 1989; Fuchs et al., 1989;

Pirami et al., 1997). Ein Verlust der E5-Expression war daher in HPV16-positiven Neoplasien seltener zu verzeichnen. Neueren experimentellen Untersuchungen zufolge konnte vor allem für HPV16 E5, aber auch für HPV18 E5 festgestellt werden, dass eine Integration des HPV-Genoms nicht zur Deletion des E5-Onkogens führt (Auvinen et al., 1997; Bravo & Alonso, 2004; Schiffman et al., 2005).

Untersuchungen am transgenen Maus-Modell zeigten bei Expression der drei Onkogene HPV16 E5, E6 und E7 in den basalen Zellen des Epithels eine höhere Inzidenzrate ein Zervixkarzinomen zu bekommen (Arbeit et al., 1994), als in Gegenwart von E6 und E7 allein (Riley et al., 2003). Zudem ist HPV16 E5 in der Lage, Hauttumore in transgenen Mäusen zu induzieren (Genther-Williams et al., 2005). Des Weiteren traten in E5 transgenen Mäusen nach Östrogenbehandlung deutlich mehr zervikale Neoplasien auf als in nicht-transgenen, Östrogen behandelten Mäusen (Maufort et al., 2010). In Gegenwart von E6 oder E7 war der onkogene Effekt von E5 deutlich stärker als für E5 allein, und auch umgekehrt verstärkte HPV16 E5 die onkogene Wirkung von E6 bzw. E7.

Auch im Zellkulturmodell konnte eine Verstärkung der E7 vermittelten Zelltransformation und -proliferation unter Einfluss von E5 nachgewiesen werden (Straight et al., 1993; Bouvard et al., 1994; Faulkner-Valle & Banks, 1995; Maufort et al., 2010).

Obwohl bereits einige ***Funktionen des E5-Proteins*** beschrieben sind, konnte die Bedeutung von E5 in der Zervixkarzinogenese bisher nicht aufgeklärt werden.

So konnte beobachtet werden, dass HPV16 E5 die ***Immortalisierung*** humaner Keratinozyten durch die Onkogene E6/ E7 verstärkt (Stöppler et al., 1996) und außerdem das ankerlose Wachstum von humanen Keratinozyten-Kolonien in Softagarose ermöglicht (Chen et al., 1996; Lewis et al., 2008). Zudem ist bekannt, dass E5 die Fusion von Zellen befähigt und damit die genetische Instabilität begünstigt (Hu et al., 2009 und 2010). Verursacht wird die ***Zell-Zell-Fusion*** möglicherweise durch die Interaktion von E5-Proteinen benachbarter Zellen, wobei der C-Terminus extrazellulär

vorliegen muss (Hu & Ceresa, 2009). Die Blockierung des extrazellulären Epitops durch Antikörper führte zu einer Abnahme der Anzahl binuklearer Zellen.

Des Weiteren ist E5 in der Lage, eine verminderte ***Präsentation von MHC-Molekülen*** auf der Wirtszelloberfläche ohne Veränderung der Gesamtmolekül-Anzahl hervorzurufen, indem es einen Komplex mit Calnexin und der großen Untereinheit von MHC-I bildet und den Transport zur Zelloberfläche verhindert (Cartin & Alonso, 2003; Ashrafi et al., 2006). Infolge dessen wird eine Immunantwort durch die Wirtszelle unterbunden (Zhang et al., 2003).

Außerdem besitzt HPV16 E5 die Fähigkeit, die ***gap-junction vermittelte Zell-Zell-Kommunikation*** zu unterdrücken, dadurch dass es die Phosphorylierung von Connexin 43 reduziert (Oelze et al., 1995). Zur Ausbildung von *gap-junctions* bilden sechs Connexin 43-Moleüle jeweils ein Connexon, welches die Pore umschließt und die Kommunikation mit der Nachbarzelle über das Connexon der benachbarten Membran ermöglicht.

Eine wichtige Rolle wird dem E5-Protein bei der ***Liganden-abhängigen Apoptose*** zugeschrieben (Kabsch & Alonso 2002; Kabsch et al., 2004). E5 inhibiert den TRAIL-vermittelten Zelltod, indem es die Formation von DISC-Komplexen und eine Weiterleitung des Signals unterbindet. Die Inhibierung der FasL-vermittelten Apoptose beruht auf einer verminderten Anzahl von Fas-Rezeptoren an der Zelloberfläche, welche auf eine E5-bedingte Hemmung der Transkription von Fas-Rezeptoren zurückzuführen ist. Zudem konnte eine Kolokalisation von E5 mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 nachgewiesen werden (Auvinen et al., 2004). Im Zusammenhang mit der Inhibierung der Wasserstoffperoxid induzierten Apoptose konnte eine verstärkte Degradation des anti-apoptotischen Proteins Bax in Gegenwart von E5 detektiert werden (Oh et al., 2010).

Eine weitere bedeutende Funktion von HPV16 E5 im Kontext der Karzinogenese ist die verstärkte ***Liganden-abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors*** (Straight et al., 1993; Suprynowicz et al., 2010). So konnte die Expression von HPV16 E5 mit einer verstärkten EGFR-Expression in CIN-Läsionen in Verbindung gebracht werden (Chang

et al., 2001). Die Mechanismen der E5 bedingten EGFR-Überaktivierung sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Unter anderem konnte eine Bindung von E5 an eine Untereinheit der vakuolären H+-ATPase (vATPase) nachgewiesen werden. Bei der vATPase handelt es sich um eine Protonenpumpe, die für die Azidifizierung von Endomembran-Kompartimenten wie Golgi-Apparat, sekretorischen Vesikeln, Endosomen und Lysosomen verantwortlich ist (Finbow & Harrison, 1997). Durch die Interaktion mit E5 kommt es zur Hemmung der Azidifizierung. Folglich lässt sich im Zellkulturmodell ein vermehrtes Recycling und eine gesteigerte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors beobachten (Faulkner-Valle & Banks, 1995; Straight et al., 1995; Auvinen et al., 1997). Hingegen fanden Suprynowicz und Mitarbeiter heraus, dass HPV16 E5 keine signifikante Bindung mit der 16kD-Untereinheit der vATPase in primären Keratinozyten eingeht. Zudem konnten sie zeigen, dass die Azidifizierung der Endosomen im Allgemeinen nicht durch E5 inhibiert wurde (Suprynowicz et al., 2010). Sie stellten die Hypothese auf, dass die E5 bedingte EGFR-Überaktivierung durch einen gestörten endozytotischen Transport ausgelöst wird, der pH-unabhängig ist.

Die Anwesenheit des EGF-Liganden sowie die Bindung von E5 an den EGF-Rezeptor führen in vitro ebenfalls zu einer Stabilisierung des Phosphorylierungsstatus des Rezeptors (Crusius et al., 1998). Dadurch wird möglicherweise eine schnelle Degradation des EGFR im Endosomen nach der Signalweiterleitung verhindert und das Recycling des Rezeptors an die Zelloberfläche begünstigt (Rodriguez 2000). In den humanen Keratinozyten konnte nicht nur eine Überaktivierung der EGF-Rezeptoren beobachtet werden, auch die *downstream*-Signalmoleküle der EGFR-Kaskade wie z.B. die *Mitogen activated protein*-Kinasen (MAPK) Erk1/2 wiesen eine stärkere Aktivität in Gegenwart von E5 auf (Gu & Matlashewski, 1995; Crusius et al., 1997). Zudem konnte eine Zunahme der Transkription von c-fos und c-jun dokumentiert werden.

Darüber hinaus wurde infolge der E5-Expression eine Inhibierung der Ubiquitinligase c-Cbl beobachtet (Zhang et al., 2005), möglicherweise verursacht durch eine Deregulation der kleinen GTPasen Rac1 und cdc42 (Cerione, 2004). Eine daraus resultierende Reduktion der Ubiquitinierung und Degradation von EGFR könnte wiederum die Überaktivierung der Rezeptoren begünstigen.

Die molekularen Mechanismen, die zu der Überaktivierung des EGF-Rezeptors in Gegenwart von HPV16 E5 führen, sind im Detail jedoch noch nicht geklärt und sollten in der vorliegenden Arbeit analysiert werden. Zuvor werden der EGF-Rezeptor und die von ihm vermittelte Signaltransduktion kurz vorgestellt.

1.2 Signaltransduktion der ErbB-Rezeptorfamilie

Die Signaltransduktion beschreibt einen Prozess der Zellkommunikation, bei dem extrazelluläre Signale über verschiedene Zwischenstufen in das Zellinnere weitergeleitet werden. Ausgangspunkt der Signalkaskade sind Zelloberflächen-Rezeptoren der Plasmamembran oder intrazelluläre Rezeptoren, die durch einen Stimulus in Form von Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Umgebungsstress wie osmotischer Schock, Temperaturveränderungen oder ionisierende Strahlung aktiviert werden. Die Signalweiterleitung erfolgt über Protein-Protein-Interaktionen und Aktivierung von zwischengeschalteten, bereits bestehenden Signalmolekülen durch deren Spaltung oder Phosphorylierung, die ihrerseits weitere zelluläre Effektoren aktivieren können. Die Umwandlung der extrazellulären in intrazelluläre Signale einer solchen Kaskade verläuft daher extrem schnell.

Eine wichtige Klasse der Zelloberflächen-Rezeptoren sind die Enzym-gekoppelten Rezeptoren, darunter zählen u.a. die der ***humanen ErbB-Rezeptorfamilie***. Diese setzt sich aus den vier Transmembran-Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB1 (EGFR, HER1), ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) zusammen (Olayioye et al., 2000; Abb. 1.2.1 A). Die Rezeptoren sind in viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzenzierung, Migration, Adhäsion oder Apoptose involviert (Yarden & Sliwkowski, 2001).
Charakteristisch für alle Mitglieder der Rezeptorfamilie sind die drei konservierten Domänen i) extrazelluläre Domäne, ii) Transmembran-Domäne und iii) intrazelluläre Domäne (Abb. 1.2.1 B).

Die extrazelluläre Domäne kennzeichnet sich durch zwei homologe Liganden-Bindedomänen (L) und zwei homologe Cystein-reiche Domänen (C) aus. Die Liganden-

Bindung wird vorwiegend durch die L2-Domäne unter geringer Beteiligung der L1-Domäne vermittelt (Lax et al., 1989; Kohda et al., 1993). Zudem konnte gezeigt werden, dass die C2-Domäne einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die Bindung des Liganden hat (Elleman et al., 2001). Die C1-Domäne ist vor allem an der Dimerisierung von Rezeptoren beteiligt (Ogiso et al., 2002).

Die Transmembran-Domäne besitzt eine α-helikale Struktur und verankert den Rezeptor mit der Membran. Außdem ist die Transmembran-Domäne auch an der Dimerisierung von EGFR beteiligt (Gerber et al., 2004; Escher et al., 2009). Dabei spielen möglicherweise zwei konservierte GxxxG-ähnliche Motive eine Rolle, die jeweils N- und C-terminal in der Transmembran-Domäne lokalisiert sind.

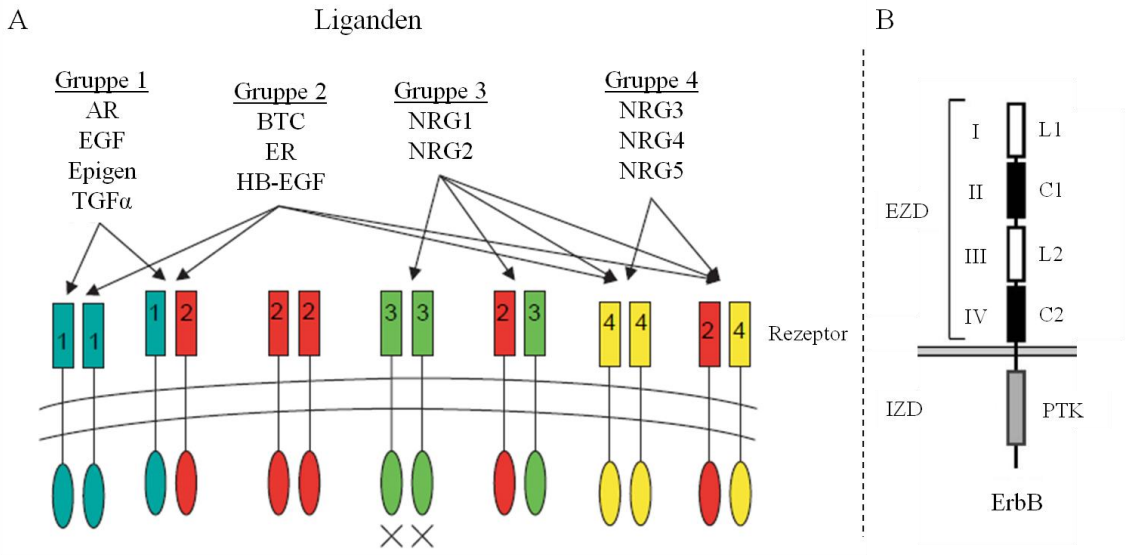


Abb. 1.2.1 ErbB-Rezeptorfamilie und Rezeptor-Aufbau (A: modifiziert nach Sanderson et al., 2006; B: modifiziert nach Warren & Landgraf, 2006)**. A:** Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie mit den möglichen Dimer-Partnern und ihren zugehörigen Liganden. **B:** Aufbau des ErbB-Rezeptors. EZD: extrazelluläre Domäne mit Cystein-reichen Domänen (C) II und IV und den Liganden-Bindedomänen (L) I und III; IZD: intrazelluläre Domäne mit Protein-Tyrosinkinase (PTK).

Die intrazelluläre Domäne ist durch eine Juxtamembran-Domäne und die Rezeptor-Tyrosinkinase charakterisiert (Ullrich et al., 1984). Sie besitzt zahlreiche Threonin-, Serin- und Tyrosin-Reste, die im Laufe der Aktivierung phosphoryliert werden können und die Interaktion mit weiteren Proteinen ermöglichen (Ushiro & Cohen, 1980). Die

katalytische Domäne der Tyrosin-Kinase besteht aus einem N-*lobe* und einem C-*lobe* und weist drei strukturelle Merkmale auf: Aktivierungsschleife, ATP-Bindetasche und katalytische Schleife. Im inaktiven Konformationszustand wird die ATP-Bindetasche durch die Aktivierungsschleife sterisch blockiert. Zusätzlich können auch die Juxtamembran-Domäne und die C-terminale Domäne inhibitorische Effekte auf die ATP-Bindetasche ausüben (Blume-Jensen & Hunter, 2001).

Entscheidend für die ***Aktivierung der ErbB-Rezeptoren*** ist die Dimerisierung infolge einer Liganden-Bindung oder einer erhöhten Rezeptor-Dichte durch Überexpression (Lemmon & Schlessinger, 1994).
In der Literatur sind mehr als 20 verschiedene Liganden beschrieben, die in der Lage sind, die Rezeptoren zu aktivieren. Sie alle haben eine EGF-ähnliche Domäne von 60 Aminosäuren gemeinsam (Barbacci et al., 1995). Die Einteilung der Liganden in vier unterschiedliche Gruppen erfolgt anhand des ErbB-Rezeptor-Typs, an den sie binden (Abb. 1.2.1 A). So interagieren EGF, *transforming growth factor α* (TGFα), Amphiregulin (AR) und Epigen mit dem EGFR (HER1) und gehören daher zur Gruppe 1 (DeLarco et al., 1980; Shoyab et al., 1988; Strachan et al., 2001). Die Gruppe 2 umfasst die Liganden *heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), Betacellulin (BTC) und Epiregulin (ER), welche sowohl an den EGFR, als auch an den HER4-Rezeptor binden (Higashiyama et al., 1991; Shing et al., 1993; Toyoda et al., 1995). Die Subfamilie der Neureguline (NRG) werden den Gruppen 3 und 4 zugeordnet und bilden aktivierte Komplexe mit dem HER3- bzw. HER4-Rezeptor (Uchida et al., 1999; Falls, 2003; Kinugasa et al., 2004).
Die Liganden-induzierte Strukturänderung ermöglicht die Dimerisierung der Rezeptoren über eine Dimerisierungsschleife der extrazellulären Cystein-reichen Domäne C1 (Ogiso et al., 2002, Walker et al., 2004). Auch die Dimerisierung hat eine Konformationsänderung zur Folge, welche die Affinität zum Liganden wiederum erhöht (Garrett et al., 2002).
Die Rezeptoren können sowohl Homo-, als auch Heterodimere mit anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptorfamilie ausbilden. Dadurch wird das Repertoire an Liganden-Selektivitäten und die Qualität der Signaltransduktion gesteigert und führt somit zu einer Vielfalt an Signalwegen. Während die ErbB2- und ErbB3-Homodimere aufgrund

der fehlenden Liganden-Bindedomäne bzw. Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität keine Signalkaskade aktivieren können (Guy et al., 1994; Kim et al., 1998), zeigen auch die ErbB1- und ErbB4-Homodimere nur schwache mitogene und transformierende Eigenschaften im Vergleich zu ihren Heterodimeren (Kokai et al., 1989; Riese et al., 1995; Pinkas-Kramarski et al., 1996). Die stärkste mitogene und transformierende Wirkung besitzen die ErbB1/3/4-ErbB2-Heterodimere.

Infolge der Rezeptordimerisierung und der damit verbundenen Konformationsänderung kommt es zur Ausbildung eines asymmetrischen Tyrosinkinase-Dimers, wobei der C-*lobe* der einen Kinase-Domäne (Donor) mit dem N-*lobe* der anderen Kinase-Domäne (Akzeptor) interagiert und so die Tyrosinkinase des Akzeptors allosterisch aktiviert (Zhang et al., 2006; Abb. 1.2.2). Durch die Wechselwirkung der Juxtamembran-Domäne des Akzeptors mit dem C-*lobe* des Donors wird das dabei entstehende asymmetrische Kinase-Dimer stabilisiert. Die aktivierte Kinase phosphoryliert die Threonin-, Serin- und Tyrosin-Reste der zytoplasmatischen Domäne des Donors, u.a. auch die der Juxtamembran-Domäne. Indem diese schließlich die Aktivierungsschleife und ATP-Bindetasche des Donors freigibt, wird die Donor-Tyrosinkinase aktiviert und ermöglicht die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten der intrazellulären Rezeptor-Domäne des Akzeptors.

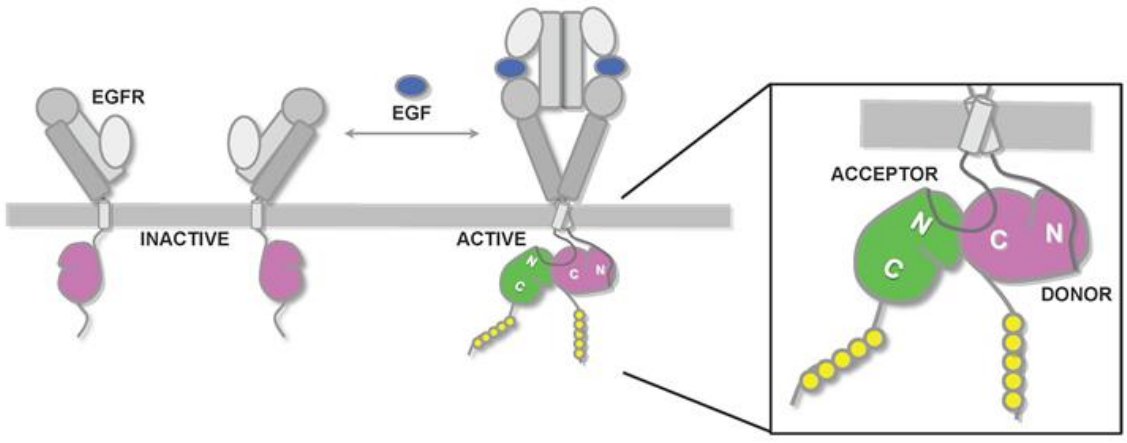
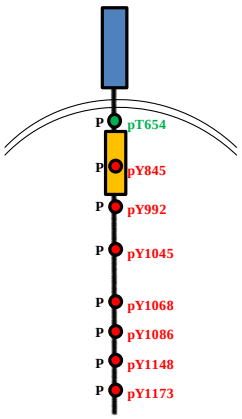


Abb. 1.2.2 Schema der EGFR-Aktivierung (modifiziert nach Zhang et al., 2010)**.** Infolge der Liganden-Bindung dimerisieren zwei Rezeptoren und bewirken eine Konformationsänderung, die zur Ausbildung eines asymmetrischen RTK-Dimers führt. Resultat ist eine Aktivierung der RTK und die Trans-Autophosphorylierung von Tyrosinen-Resten der intrazellulären Domäne.

Durch die Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten der C-terminalen Domäne werden neue Bindungsstellen für *downstream*-Signalmoleküle (Mediatoren) mit SH2- oder PTB-Domänen erzeugt (Abb. 1.2.3).

Durch intrazelluläre Mediatoren wie Grb2, Src oder PKC, die ihrerseits phosphoryliert und aktiviert werden, wird das Signal ins Zellinnere weitergeleitet. In Abhängigkeit von Ligand, Rezeptor und gebundenem *downstream*-Molekül werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden induziert, die unterschiedliche zelluläre Prozesse steuern (Yarden & Sliwkowski, 2001; Holbro & Hynes, 2004; Abb. 1.2.3). Einige dieser initiierten Signalwege sind in Abschnitt 1.2.1 aufgeführt.

A



B

Phosphorylierung	Bindungsstelle von	Funktion
pT654	PKC	Inhibierung der a) Cbl-Interaktion, b) Rezeptor-Inaktivierung, c) Tyrosinkinase-Aktivität
pY845	Src	Tyrosinkinase-Aktivierungsstelle
pY992	PLCγ	Möglicherweise: Pro-Proliferation/Überleben; Pro-Migration
pY1045	Cbl	Pro-Degradation (Ubiquitinierung)
pY1068	Grb2	Pro-Proliferation; Pro-Migration
pY1086	Grb2	Pro-Proliferation; Pro-Migration
pY1148	Shc	Pro-Proliferation
pY1173	Shc, SHP1, PLCγ	In Abhängigkeit vom Interaktionspartner: Anti-Proliferation; Pro-Proliferation

Abb. 1.2.3 Phosphorylierungsstellen am zytoplasmatischen C-Terminus des ErbB-Rezeptors (modifiziert nach Olayioye et al. 2000; www.biosource.com)**. A:** Phospho-Threonin- und Phospho-Tyrosin-Reste als Bindungsstellen für Proteine mit SH2- oder PTB-Domäne. **B:** Interaktionspartner der phosphorylierten AS-Reste und deren biologische Funktion.

1.2.1 Die EGF-vermittelte EGFR-Signaltransduktion

Einer der Hauptsignaltransduktionswege, die durch Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor aktiviert werden kann, ist der ***Ras-Raf-MEK-Erk-Signalweg*** (Alroy &Yarden, 1997; Kolch et al., 2002). Über das Adapterprotein Grb2, das entweder direkt über seine

SH2-Domäne oder indirekt durch Shc mit dem EGFR verbunden ist, wird Sos aktiviert. Sos ermöglicht den Austausch von Ras gebundenem GDP gegen GTP und bewirkt dadurch dessen Aktivierung (Saltiel & Ohmichi, 1993; Adjei, 2001). Die Bindung und Aktivierung von Raf, eine Serin/ThreoninKinase, an aktiviertes Ras löst eine abwärts gerichtete Reihe von Serin/Threonin-Phosphorylierungen aus und bewirkt die Aktivierung der MEK-Erk-Kaskade (Stoke et al., 1994; Alberts et al., 2004). Durch die Translokation von Erk wird das Phosphorylierungssignal in den Zellkern weitergeleitet, um dort schließlich Transkriptionfaktoren wie Elk-1 oder c-Fos zu aktivieren und somit die Expression proliferationsfördender Gene zu induzieren (Saltiel & Ohmichi, 1993; Pawson & Schlessinger, 1993; Lange-Carter et al., 1993; Wilson 1994).

Eine weitere bedeutende Signalkaskade, die durch EGF initiiert wird, ist die ***PI3K-Akt-Kaskade***. Die Posphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bindet über seine SH2-Domänen innerhalb der Konensus-Sequenz pTyr-X-X-Met des EGFR (Kapeller & Cantley, 1994). Durch die Interaktion mit dem Rezeptor wird die Lipidkinase aktiviert und bewirkt u.a. die Phosphorylierung von membranständigem Phosphotidylinositol-4,5-biphosphat zu Phosphotidylinositol-3,4,5-triphosphat, ein Adapterprotein der Proteinkinase-B (PKB, Akt) (Auger et al., 1989; Cantley et al., 1991). Die PKB bindet über ihre PH-Domänen an Phosphotidylinositol-3,4,5-triphosphat und kann durch die Proteinkinase PDK1, die ebenfalls an ein Phosphotidylinositol-3,4,5-triphosphat-Molekül in unmittelbarer Nähe zu PKB gebunden ist, phosphoryliert bzw. aktiviert werden (Alberts et al., 2004). Infolge der Aktivierung diffundiert die PKB von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ab, um u.a. das pro-apoptotische Protein Bad und die Caspase 9 zu phosphorylieren. Die Inaktivierung dieser Proteine hat schließlich eine Inhibierung der Apoptose zur Folge (Datta et al., 1997; Cardone et al., 1998). Zudem wurde im Zusammenhang mit der EGF vermittelten Aktivierung von Akt eine Stimulation der Zellproliferation über mTOR und dem *Forkhead*-Transkriptionsfaktor beobachtet (Brunet et al., 1999; Dobashi et al., 2009).

Des Weiteren wird infolge der EGFR-Phosphorylierung die Aktivierung der ***PLCγ-Signalkaskade*** ausgelöst, indem die Phospholipase C-γ (PLCγ) mittels SH2-Domäne an den aktivierten EGF-Rezeptor bindet und durch die Rezeptor-Tyrosinkinase an

mehreren Tyrosin-Resten phosphoryliert wird (Rhee, 2001; Wang et al., 2001; Maffucci & Falasca, 2007). Die aktivierte PLCγ hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), die als *second messenger* (Mediatoren) wirken. Während IP_3 eine Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum verursacht, ist DAG als Cofaktor an der Aktivierung der Proteinkinase C beteiligt (Kim et al., 2000; Alberts et al., 2004). Schließlich führt die Aktivierung des PLCγ-Signaltransduktionsweges zur Zellzyklus-Progression, Transformation, Differenzierung und Apoptose von Zellen.

Die EGFR-vermittelte Signalweiterleitung kann auf verschiedene Wege deaktiviert werden. Entweder werden die Rezeptoren direkt durch Protein-Tyrosinphosphatasen wie PTB1B dephosphoryliert und inaktiviert (Liu & Chernoff, 1997; Eden et al., 2009), oder sie werden internalisiert und durch den lysosomalen oder proteasomalen Abbau aus dem Signaltransduktionsprozess beseitigt (Longva et al., 2002; Mosesson et al., 2003; Alwan & van Leeuwen 2007). In Abb. 1.2.4 ist die EGFR-Endozytose von Aktivierung bis lysosomalen Abbau im zeitlichen Verlauf schematisch dargestellt.

Die ***Internalisierung der Rezeptoren nach Liganden-abhängiger Aktivierung*** startet mit der direkten oder über Grb2 vermittelten Bindung von Cbl an phosphorylierte Tyrosine-Reste des EGFR (Levkowitz et al., 1998; Thien & Langdon, 2001). Bei dem Protein Cbl handelt es sich um eine E3-Ubiquitin-Ligase, die durch Rekrutierung eines E2-Ubiquitin-konjugierten Enzymes die Ubiquitinierung des Rezeptors bewirkt (Levkowitz et al. 1999; Umebayashi et al., 2008). Ubiquitin ist ein Signal zur Herunterregulation aktivierter Plasmamembran-Proteine (Umebayashi, 2003; Mukhopadhyay & Riezman, 2007). Infolge der Cbl-Bindung kommt es zur Einstülpung der Membran und Ausbildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln (Abb. 1.2.4 und 1.2.5; de Melker et al., 2001). Dieser Endozytose-Weg wird daher auch als **Clathrin-abhängige Internalisierung** bezeichnet. Für die Rekrutierung des EGF-EGFR-Cbl-Komplexes in Clathrin-beschichtete Vesikel ist das Protein AP-2, ein Clathrin-Adapterprotein, von großer Bedeutung (Rappoport & Simon, 2009).
Sobald die Clathrin-beschichteten Vesikel, die EGF-EGFR-Komplexe transportieren, ihre Hülle abgestreift haben, fusionieren sie mit dem frühen Endosomen (EE: *early*

endosome) (Hopkins et al., 1985). Frühe Endosomen sind periphere Kompartimente mit heterogener Morphologie, die sowohl vesikuläre als auch tubuläre Membranen besitzen (Dunn & Hubbard, 1984; Miller et al., 1986). Der internalisierte EGF-EGFR-Komplex in den frühen Endosomen liegt autophosphoryliert vor und ist weiterhin katalytisch aktiv und in der Lage die Signaltransduktion fortzuführen (Cohen & Fava, 1985; Kay et al., 1986; Lai et al., 1989). Neben den aktivierten Rezeptoren gelangen auch die an ihnen gebundenen *downstream*-Signalmoleküle wie Grb2, Shc und Cbl in die frühen Endosomen (Di Guglielmo et al., 1994; Fukazawa et al., 1996; Wang et al., 1996; Levkowitz et al., 1998; Burke et al., 2001; Clague & Urbe, 2001; Sorkin, 2001).

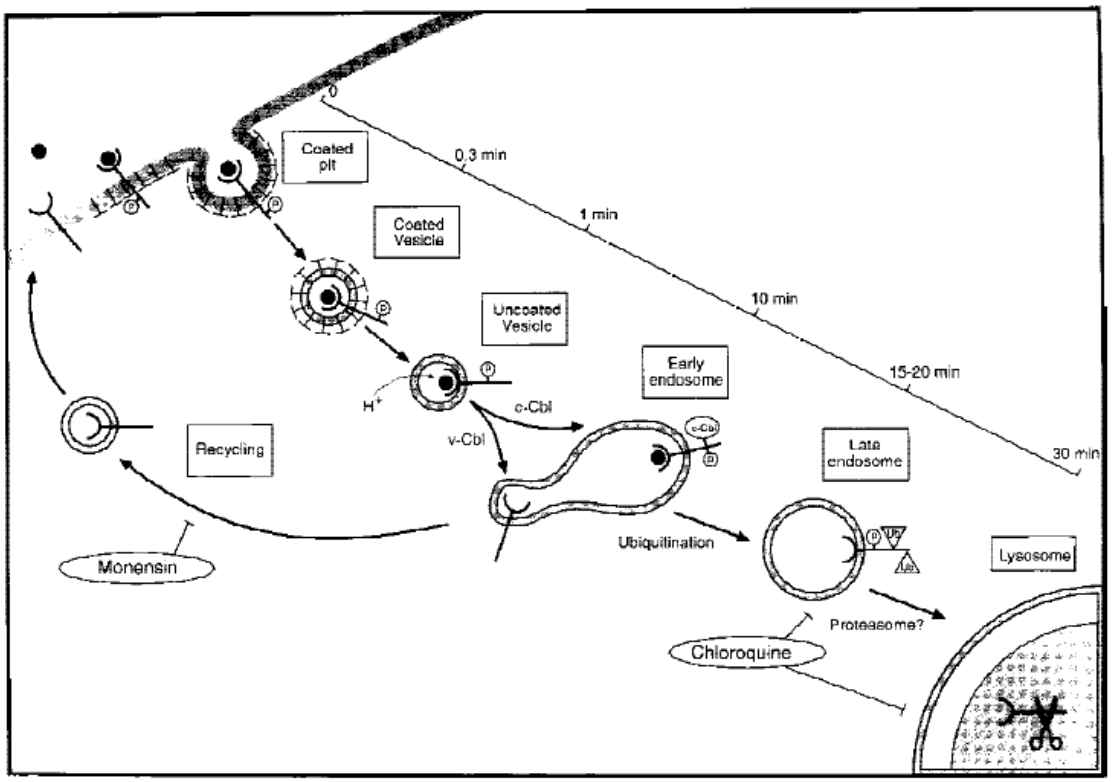


Abb. 1.2.4 Modell des Liganden-abhängigen Transports von EGFR im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation (modifiziert nach Levkowitz et al. 1998)**.**

Das frühe Endosomen ist das Kompartiment an dem entschieden wird, ob die EGF-Rezeptoren zurück zur Plasmamembran (Recyling) oder weiter über multivesikuläre Körperchen/späte Endosomen (MVB: *multivesicular bodies*/LE: *late endosome*) zu den Lysosomen (Degradation) transportiert werden (Abb.1.2.4 und 1.2.5). Die frühen Endosomen kennzeichnen eine hohe Dynamik und ein schnelles Recycling von Rezeptor und Ligand aus. Auch können EGF-EGFR-Komplexe über Recycling-

Endosomen zur Plasmamembran zurücktransportiert werden, wenn der Ligand nicht eindeutig vom Rezeptor dissoziiert ist (Sorkin et al., 1991).

Während der Reifung der frühen Endosomen zu multivesikulären Körperchen und späten Endosomen findet die zielgerichtete Sortierung internalisierter Rezeptoren statt. Polyubiquitinierte EGFR werden zum Abbau ins Proteasomen transportiert, multi-monoubiquitinierte Rezeptoren hingegen ins Lysosomen (Longva et al., 2002; Mosesson et al., 2003; Alwan & van Leeuwen, 2007).

Die Reifung von MVBs erfolgt durch die Fusion von frühen Endosomen und die Invagination der Membranen unter Abnahme des pH-Wertes (Alberts et al., 2004). Die MVBs befinden sich im perinuklearen Zellbereich und sind charakterisiert durch die Akkumulation von EGF und EGFR in intralumenalen Membranen (Dunn & Hubbard, 1984; Miller et al., 1986; Carpentier et al., 1987). Bevor die Membranen beginnen sich einzustülpen, bindet der ESCRT-0-Komplexes über die Ubiquitin-Bindedomäne (UBD) der Proteine HRS und STAM1/2 an den EGFR und führt zur Rekrutierung von Eps15b, Clathrin sowie ESCRT-I-, -II- und -III-Komplexen. Dadurch wird die Dephosphorylierung und Deubiquitinierung der Rezeptoren angetrieben (Bache et al., 2003 und 2006; Slagsvold et al., 2005). Infolge der Dephosphorylierung von EGFR durch die Protein-Tyrosinphosphatasen PTPκ und PTP1B kommt es zur Dissoziation von Ligand und Rezeptor, bevor sie das späte Endosomen erreichen (Xu et al., 2005; Eden et al., 2009). In den MVBs besteht die letzte Möglichkeit zum Recycling von Rezeptoren, ehe sie mit den späten Endosomen das Lysosomen erreichen und abgebaut werden (Abb. 1.2.4 und 1.2.5). Nicht-dissoziierte EGF-EGFR-Komplexe werden über späte, Rab11-positive Recycling-Endosomen (RE) langsam zur Plasmamembran zurücktransportiert (Dickson et al. 1983; Hopkins & Trowbridge, 1983; Sorkin et al., 1988; Hopkins, 1992).

Die späten Endosomen zeichnen sich durch eine erneute Abnahme des pH-Wertes aus, denn internalisiertes Material aus den verschiedensten Kompartimenten wie EE und MVB, trans-Golgi-Apparat oder Phagosomen werden auf dem Weg zum Lysosomen über späte Endosomen transportiert (Stoorvogel et al., 1991). Durch die Fusion von Transportvesikeln aus dem trans-Golgi-Netzwerk, die u.a. Lipasen und Proteasen beinhalten, mit den späten Endosomen entstehen schließlich die Lysosomen (Alberts et al., 2004). Der Abbau der im späten Endosomen eingeschlossenen Membranen und deren Bestandteile wie der EGFR wird durch diese Enzyme ermöglicht.

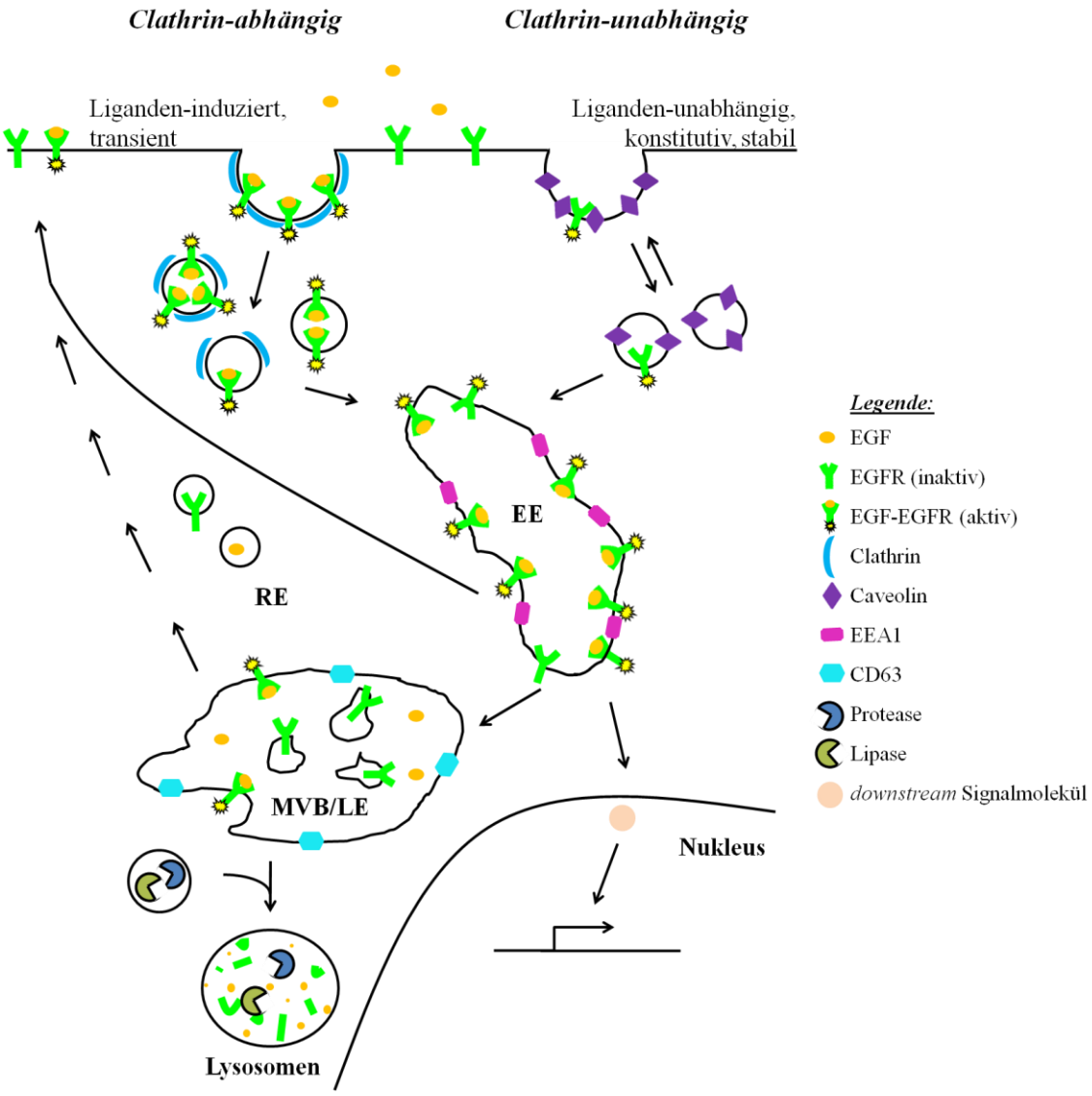


Abb. 1.2.5 Schematische Darstellung der EGFR-Endozytose nach Liganden-abhängiger und -unabhängiger Aktivierung. Die Liganden induzierte Aktivierung der Rezeptoren verursacht die Einstülpung der Plasmamembran und Ausbildung von Clathrin-beschichteten Vesikeln. Nach Abstreifen der Clathrin-Hülle fusionieren die Vesikel miteinander. Schließlich verschmelzen die Vesikel mit dem frühen Endosomen (EE: *early endosome*). Zusätzlich können unabhängig vom Liganden z.B. durch oxidativen Stress Rezeptoren aktiviert werden, die über Caveolin-haltige Vesikel ins Zellinnere gelangen und möglicherweise auch mit dem frühen Endosomen fusionieren. In den frühen Endosomen dissoziert ein Anteil der Liganden von den Rezeptoren ab und sowohl Ligand, als auch Rezeptor werden über Recycling-Endosomen (RE: *recycling endosome*) schnell zur Plasmamembran zurück transportiert. Der Großteil der aktivierten Rezeptoren im frühen Endosomen sendet das Signal weiter und phosphoryliert bzw. aktiviert *downstream* Signalmoleküle. Die Weiterleitung des Signals kann bis zum Nukleus erfolgen. Daran anschließend reift das frühe Endosomen zu sogenannten multivesikulären Körperchen (MVB: *multivesicular bodies*) und zum späten Endosomen (LE: *late endosome*) heran. Es kommt zur Invagination der Membran, d.h. die Membran stülpt sich ein und wird mit den Rezeptoren im Inneren eingeschlossen. Der Transport des EGFR endet mit der Fusion von Transportvesikeln aus dem trans-Golgi-Netzwerk und dem späten Endosomen zu Lysosomen. Die Transportvesikel beinhalten Lipasen und Proteasen und ermöglichen den Abbau der im späten Endosomen eingeschlossenen Membranen und deren Bestandteile wie den EGF-Rezeptor.

Ein weiterer Internalisierungsweg aktivierter EGFR ist ***Clathrin-unabhängig*** und erfolgt über Caveolin-haltige Vesikel, sogenannte Caveolae (Abb. 1.2.5). Caveolae entstehen möglicherweise durch Assoziation von Caveolin mit Lipid-Flößen (lipid rafts), Mikrodomänen reichhaltig an Cholesterin und Sphingolipiden (Alberts et al., 2004). Sigismund et al. konnten zeigen, dass durch die Bindung von Eps15/Eps15R und Epsin an den ubiquitibinierten EGF-EGFR-Komplex eine Relokalisation in Caveolae induziert wird (Sigismund et al., 2005). Die Caveolae schnüren sich von der Plasmamembran ab, um schließlich mit dem frühen Endosomen zu verschmelzen und den endozytotischen Transport wie oben beschrieben fortzusetzen. Die ***Liganden-unabhängige Internalisierung*** von aktiviertem EGFR über Caveolin-haltige Vesikel wird durch die Aktivierung der Src-Kinase infolge von oxidativem Stress oder ionisierender Strahlung ausgelöst (Dittmann et al., 2008). Src führt schließlich zur Phosphorylierung von EGFR gebundenem Caveolin, die zur Ausbildung von Caveolae erforderlich ist (Parton & Simons, 2007). Die Internalisierung der aktivierten EGFR durch Caveolae resultiert schließlich in einer perinuklearen Akkumulation von EGFR und einen Transport von einigen Rezeptoren in den Zellkern (Dittmann et al., 2008).

Auch für die Clathrin-abhängige Internalisierung wurde eine Translokation von EGFR aus dem Zytoplasma in den Zellkern nachgewiesen (Lin et al., 2001; Lo et al., 2006a und 2006b). Möglicherweise findet die EGFR-Translokation in den Zellkern über den Sec61-Komplex statt (Liao & Carpenter, 2007).

1.3 Zielstellung

Die Systembiologie ist ein neues interdisziplinäres Forschungsfeld und vereinigt die verschiedenen Wissenschaftsbereiche wie z.B. Bioinformatik, Ingenieurswissenschaft, Genom- und Proteomanalyse. Ziel der Systembiologie ist ein Ansatz zur spatio-temporären und quantitativen Analyse biologischer Reaktionen bzw. Prozesse eines Organismus oder einer Zelle im Gesamtkomplex, welcher durch ein mathematisches Modell beschrieben werden kann (Lottspeich & Engels, 2006). Dieses Modell soll u.a. die Möglichkeit bieten, experimentelle Vorhersagen durch Veränderung einer

Systemkomponente zu treffen oder das Design und die Entwicklung eines pharmakologischen Wirkstoffs erleichtern.

Ziel dieser Arbeit war die Liganden-abhängige Signaltransduktion des EGF-Rezeptors unter Einfluss von HPV16 E5 systembiologisch zu untersuchen.
Das kleine, hydrophobe E5-Onkoprotein besitzt schwache, transformatierende Eigenschaften und spielt vor allem im Kontext mit der frühen Zervixkarzinogenese eine Rolle (Chang et al., 2001; Maufort et al., 2010). Die wichtigste Funktion von HPV16 E5 ist jedoch die Überaktivierung der EGF-vermittelten EGFR-Signaltransduktion, deren Ursache bzw. molekularen Mechanismen bis dato nicht vollständig geklärt sind (Pim et al., 1992; Straight et al, 1993). Es wurde postuliert, dass die Bindung von E5 an die 16kD-Untereinheit der vATPase ein verstärktes Recycling hervorruft und dadurch der EGF-Rezeptor stärker und langanhaltend phosphoryliert bleibt (Faulkner-Valle & Banks, 1995; Straight et al., 1995; Auvinen et al., 1997). Auch eine verminderte Degradation wurde im Zusammenhang mit der EGFR-Überaktivierung beschrieben (Rodriguez et al., 2000).

Um den molekularen Mechanismen auf den Grund zu gehen, sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst molekularbiologische Experimente zur Untersuchung der E5-bedingten EGFR-Überaktivierung durchgeführt werden. Da mittels molekularbiologischer Methoden eine Untersuchung der Lokalisation von aktivierten Rezeptoren in der Zelle nicht möglich ist, wurde auf Mikroskopie-Analysen zurückgegriffen. Eine quantitative Analyse und Interpretation von Mikroskopie-Bildern erwies sich jedoch im Gegensatz zu den molekularbiologischen Methoden bisher als sehr schwierig und wenig aussagekräftig. In Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe *Biomedical Computer Vision* aus dem Bioquant der Universität Heidelberg (Prof. Dr. K. Rohr, Dr. S. Wörz) wurde ein neuer Ansatz zur quantitativen Analyse der Aktivierung, Lokalisation und des Transports von EGF-Rezeptoren anhand von 3D-Mikroskopie-Bildern etabliert. Diese Methode ermöglicht die automatische und zudem sehr genaue Quantifizierung von Kolokalisationen in drei-dimensionalen Multikanal-Bildern (Wörz et al., 2010). Die quantitative Analyse basiert auf der Abschätzung der geometrischen Form zellulärer Strukturen und der Differenzierung verschiedener Typen von Kolokalisationen.

In dieser Arbeit sollten die Möglichkeiten dieses neuen Verfahrens benutzt werden, um in Verbindung mit den biochemischen Methoden den endozytotischen Transport der EGF-Rezeptoren in seiner Gesamtheit und die Modulation durch das humane Papillomavirus Typ 16 E5-Proteins zu analysieren und rekonstruieren. Durch die Immunfluoresenzfärbung spezifischer Marker verschiedener zellulärer Kompartimente wie Clathrin- und Caveolin-haltigen Vesikeln, frühen Endosomen und multivesikulären Körperchen sollte die Lokalisation von aktivierten und Gesamt-EGFR innerhalb der Zelle charakterisiert werden. Die Quantifizierung und statistische Analyse von Vesikelgröße, -intensität und Distanz zum Nukleus anhand der dreidimensionalen Bilder ermöglichten signifikante Unterschiede zwischen Leervektor- und E5-transduzierten Zellen aufzuzeigen. Die Normalisierung und Statistik der Daten aus der 3D-Bildanalyse wurde in Kooperation mit der Bioquant-Forschungsgruppe *Modeling* (Dr. L. Kaderali, G. Suryavanshi) durchgeführt. Zum ersten Mal konnten damit Daten gewonnen werden, die nicht nur den Effekt des viralen Proteins wiedergeben, sondern auch die Prozesse in zeitlichen und räumlichen Perspektiven innerhalb der Zellen darstellen.

2. Material

2.1 Biologische Materialien

2.2.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
E.coli DH5α	F^- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^-, m_k^+) gal$^-$ phoA supE44 λ$^-$ thi$^-$1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Carlsbad (USA)
E.coli DH10B-T1^R	F^- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ$^-$ rpsL nupG tonA	Invitrogen, Carlsbad (USA)
E.coli HB101	F^- mcrB mrr hsdS20 (r_B^-, m_B^-) recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xy15 λ$^-$ leu mtl1	Invitrogen, Carlsbad (USA)

2.2.2 Zelllinien

Linie	Herkunft	Quelle
HaCaT	In vitro spontan transformierte humane Keratinozyten	P. Boukamp, DKFZ, Heidelberg
HeLa	Humanes Zervix-Adenokarzinom, HPV18 positiv	K. Hoppe-Seyler, DKFZ, Heidelberg
$Phoenix_{ampho}$	Variante der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK 293T, stabile Expression der Moloney Maus Leukämie-Retrovirus-Gene: gag, pol, env	M. Tommassino, IARC, Lyon (Frankreich)

2.2 Kulturmedien und Zusätze

2.2.1 Bakterienkultur

LB-Medium:	10g	Bakto-Trypton
(Luria Bertani)	5g	Bakto-Hefe-Extrakt
	5g	Natriumchlorid
	ad 1 l	Aqua bidest.

LB-Agar:	1,5% (w/v)	Bakto-Agar
		LB-Medium

für Selektion: 0,1 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin

2.2.2 Zellkultur

1. HaCaT- und HeLa-Zellen:

D-MEM mit Gln und 1500 mg/l Glukose	[Sigma-Aldrich, Steinheim]
10% (v/v) FCS	[PAN Biotech, Aidenbach]
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	[Gibco, Karlsruhe]

2. Phoenix$_{ampho}$-Zellen:

D-MEM mit Gln und 4500 mg/l Glukose	[Sigma-Aldrich, Steinheim]
10% (v/v) FCS	[PAN Biotech, Aidenbach]
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	[Gibco, Karlsruhe]

3. HaCaT-Zellen:

KGM-2	[PromoCell, Heidelberg]
1x Supplement-Mix	[PromoCell, Heidelberg]
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin	[Gibco, Karlsruhe]

für Selektion von HeLa-Zellen: 400 µg/ml Geneticin (G418) oder 2 µg/ml Puromycin
für Selektion von HaCaT-Zellen: 800 µg/ml Geneticin oder 1 µg/ml Puromycin

4. Einfriermedium:

60% (v/v) Kulturmedium
30% (v/v) FCS [PAN Biotech, Aidenbach]
10% (v/v) DMSO [Merck, Darmstadt]

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 Plasmide

Name	Beschreibung	Insert	Quelle
pLXSN	Retroviraler Expressions-vektor mit SV40-Promotor, Neo^R, Amp^R; Größe: 5,9 kb		M. Tommasino, IARC, Lyon (Frankreich)
pL(eGFP)SN	s.o.	eGFP (~720 bp)	N. Weidner, Regensburg
pL(AU1-16E5)SN	s.o.; *tag*: AU1	AU1-HPV16 E5 (~270 bp)	Labor-intern kloniert
pL(Flag-16E5)SN	s.o.; *tag*: Flag	Flag-HPV16 E5 (~273 bp)	Labor-intern kloniert
pBabe	Retroviraler Expressions-vektor mit SV40-Promotor, $Puro^R$, Amp^R; Größe: 5,1 kb		A. Marchini, DKFZ Heidelberg
pBabe-AU1-16E5	s.o.; *tag*: AU1	AU1-HPV16 E5 (~270 bp)	Im Rahmen der Arbeit kloniert
pEGFR-eGFP-N1	Expressionsvektor mit CMV- und SV40-Promotor, Neo^R, Kan^R; Größe: 8,5 kb	EGFR-eGFP (~3859 bp)	Labor-intern kloniert
pCI-16E5	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Amp^R; Größe pCI-Vektor: 4,0 kb	HPV16 E5 (~250 bp)	Labor-intern kloniert

2.3.2 Primer

HPV16 E5 (Kirsten Kabsch)

sense (1-20)	5‘	ATGACAAATCTTGATACTGC	3‘
antisense (239-220)	5‘	AAGCGTGCATGTGTATGTAT	3‘

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien werden unter den Abschnitten Kulturmedien und Zusätze (2.2), Puffer und Lösungen (2.9) oder in den Kapiteln 3 bzw. 4 beschrieben und an dieser Stelle nicht einzeln aufgelistet. Bezogen wurden die Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen: AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Gerbu (Gaiberg), Gibco (Karlsruhe), Invitrogen (Carlsbad, USA), J.T. Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim), Thermo Scientific (Rockfeld, USA) und VWR (Briare, Frankreich).

2.5 Kits

2-D Quant Kit	[Amersham Bioscience, Buckinghamshire (UK)]
Pierce® BCA Protein Assay Kit	[Thermo-Scientific (Pierce), Rockford (USA)]
Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit	[Thermo-Scientific (Pierce), Rockford (USA)]
BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit	[BD Bioscience, San Diego (USA)]
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	[Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)]
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	[QIAGEN, Hilden]
iScript™ One Step RT-PCR Kit	[Bio-Rad, München]
QIAprep® Spin Miniprep Kit	[QIAGEN, Hilden]

QIAEX® II Gel Extraction Kit	[QIAGEN, Hilden]
RNeasy® Mini Kit	[QIAGEN, Hilden]
SilverQuest™ Silver Staining Kit	[Invitrogen, Carlsbad (USA)]

2.6 Größenstandards

DNA-Größenstandard:

100 bp DNA ladder	[NEB, Frankfurt/Main]
1 kb DNA ladder	[NEB, Frankfurt/Main]

Protein-Größenstandard:

Precision Plus Protein™ Standard	[Bio-Rad, München]

2.7 Enzyme und zugehörige Puffer

2x RT-PCR Reaction Mix	[Bio-Rad, München]
10x Enzympuffer für Restriktionsendonukleasen	[MBI Fermentas, St. Leon-Roth]
	[NEB, Frankfurt/Main]
10x T4-DNA-Ligasepuffer	[MBI Fermentas, St. Leon-Roth]
100x BSA	[NEB, Frankfurt/Main]
iScript™ Reverse Transciptase	[Bio-Rad, München]
iTaq™ DNA Polymerase	[Bio-Rad, München]
Restriktionsendonukleasen	[MBI Fermentas, St. Leon-Roth]
	[NEB, Frankfurt/Main]
RNase-Free DNase Set	[QIAGEN, Hilden]
T4-DNA-Ligase	[MBI Fermentas, St. Leon-Roth]

2.8 Antikörper und Proteine

2.8.1 Rekombinante Proteine

Recombinant human EGFR (Sf9) aa 25-647	[ProSpec, Rehovot (Israel)]
Recombinant human EGFR (active, Sf9) aa 695-1210	[Abcam, Cambridge (UK)]

2.8.2 Primärantikörper

Name	Anwendung/ Verdünnung	Quelle
anti-Aktin Kaninchen polyclonal	IB 1:1000	Abcam, Cambridge (UK)
anti-Aktin Maus monoclonal	IB 1:500	Abcam, Cambridge (UK)
anti-AU1-PRB-130P Kaninchen polyclonal	IB 1:1000	Covance, Princeton (USA)
anti-AU1-MMS-130R Maus monoclonal	IB, IF 1:1000; IP 1:150 FACS 1 µg/100 µl	Covance, Princeton (USA)
anti-Caveolin Kaninchen polyclonal	IF 1:500	Abcam, Cambridge (UK)
anti-CD63 Kaninchen polyclonal	IF 1:100	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
anit-Clathrin Kaninchen polyclonal	IF 1 µg/ml	Abcam, Cambridge (UK)
anti-EEA1 Maus monoclonal	IF 1:100	BD Transduction Lab., San Diego (USA)
anti-EGFR (1005) Kaninchen polyclonal	IB 1:500; IF, FACS 1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, (USA)
anti-EGFR (R1) Maus monoclonal	IB, IP, IF, FACS, ICW/OCW 1:2 (Hybridomüberstand)	H. W. Zentgraf, DKFZ Heidelberg

Legende: *IB (Immunblot); ICW/OCW (In-Cell/On-Cell Western Blot); IF (Immunfluoreszenz); IP (Immunpräzipitation); FACS (Durchflusszytometrie)*

Name	Anwendung/ Verdünnung	Quelle
anti-Flag Kaninchen polyclonal	IB 1:1000; IF 1:500; IP 4 µg/ml FACS 1:400	Sigma-Aldrich, München
anti-Flag M1 Maus monoclonal	IB 10 µg/ml	Sigma-Aldrich, München
anti-GFP Kaninchen polyclonal	IB 1:1000	Cell Signaling-NEB, Frankfurt/Main
anti-Histon H3 Kaninchen polyclonal	IB 1:10000, 1h RT	Biozol, Eching
anti-Phospho-EGFR (Tyr1068) Kaninchen monoclonal	IF 1:100	Cell Signaling-NEB, Frankfurt/Main
anti-Phospho-EGFR (Tyr1068) Kaninchen polyclonal	IB 1:1000; IF, ICW 1:100 FACS 1:200	Cell Signaling-NEB, Frankfurt/Main
anti-Phospho-EGFR (Tyr1068) Maus monoclonal	IF 1:100	Cell Signaling-NEB, Frankfurt/Main
anti-Phospho-EGFR (Tyr1173) (53A5) Kaninchen polyclonal	IB 1:1000; IF, ICW 1:100	Cell Signaling-NEB, Frankfurt/Main
anti-Phospho-EGFR (Tyr1086) Kaninchen monoclonal	IF, ICW 1:100	Epitomics, Burlingame (USA)
anti-Phosphotyrosin (4G10) Maus monoclonal	IB, IP 1:2 (Hybridomüberstand)	F. D. Böhmer, FSU Jena
anti-Vinculin Kaninchen polyclonal	IB 5 µg/ml	Sigma-Aldrich, München

Legende: *IB (Immunblot); ICW (In-Cell Western Blot); IF (Immunfluoreszenz); IP (Immunpräzipitation); FACS (Durchflusszytometrie)*

2.8.3 Sekundärantikörper

Name	Anwendung/ Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Maus IgG, Alexa-488 konjugiert	FACS 1:1000 IF 1:400-1:600	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa-488 konjugiert	FACS 1:1000 IF 1:400-1:600	Invitrogen, Karlsruhe

Legende: *IB (Immunblot); ICW (In-Cell Western Blot); IF (Immunfluoreszenz); IP (Immunpräzipitation); FACS (Durchflusszytometrie)*

Name	Anwendung/ Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Maus IgG, Alexa-594 konjugiert	FACS 1:1000 IF 1:400-1:600	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa-594 konjugiert	FACS 1:1000 IF 1:400-1:600	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-anti-Maus IgG, IRDye680 konjugiert	IB 1:10000 ICW 1:1000	LI-COR Bioscience, Lincoln (USA)
Ziege-anti-Kaninchen IgG, IRDye680 konjugiert	IB 1:10000 ICW 1:1000	LI-COR Bioscience, Lincoln (USA)
Ziege-anti-Maus IgG, IRDye800^{CW} konjugiert	IB 1:10000 ICW 1:1000	LI-COR Bioscience, Lincoln (USA)
Ziege-anti-Kaninchen IgG, IRDye800^{CW} konjugiert	IB 1:10000 ICW 1:1000	LI-COR Bioscience, Lincoln (USA)
Esel-anti-Ziege IgG, IRDye800^{CW} konjugiert	IB 1:10000	LI-COR Bioscience, Lincoln (USA)

Legende: *IB (Immunblot); ICW (In-Cell Western Blot); IF (Immunfluoreszenz); IP (Immunpräzipitation); FACS (Durchflusszytometrie)*

2.9 Puffer und Lösungen

DNA-Gelelektrophorese

Elektrophoresepuffer:

TAE-Puffer 10x:	400 mM	Tris
	20 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA
		Aqua bidest.
	Mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen	

TBE-Puffer 10x:	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA (pH 8,0)
		Aqua bidest.

Agarosegel (1%)	1% (w/v)	Agarose
		1x Elektrophoresepuffer
	Nach Abkühlen 1µg/ml Ethidiumbromid	
DNA-Gel-Ladepuffer 6x:	0,25% (w/v)	Bromphenolblau oder Xylencyanol
	30% (w/v)	Glycerin
		Aqua bidest.

Proteinextraktion

RIPA-Lysepuffer:	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EGTA
	1 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	Natriumdesoxycholat
	1% (w/v)	NP-40
	0,1% (w/v)	SDS
		Aqua bidest.
	Aufbewahrung bei -20°C, vor Gebrauch auf 10 ml Lysepuffer je 1 Tablette von Phosphatase- und Protease-Inhibitoren zugeben	

Protein-Gelelektrophorese

Protein-Gel-Ladepuffer:	6,25 µl	4x NuPAGE® LDS Sample Buffer
	2,5 µl	10x NuPAGE® Reducing Agent
	x µl	Gesamtproteinlysat (20 µg)
	ad 25 µl	Aqua bidest.

Protein-Gel-Ladepuffer 2x:	15 µl	4x NuPAGE® LDS Sample Buffer
	6 µl	10x NuPAGE® Reducing Agent
	9 µl	Aqua bidest.
Laufpuffer (Anode) 1x:	50 ml	20x NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer
	ad 1 l	Aqua bidest.
Laufpuffer (Kathode) 1x:	200 ml	1x Laufpuffer (Anode)
	500 µl	NuPAGE® Antioxidant

Immunblot

Anodenpuffer I:	30 mM	Tris
	20% (v/v)	Methanol
		Aqua bidest.
Anodenpuffer II:	2,5 mM	Tris
	20% (v/v)	Methanol
		Aqua bidest.
Kathodenpuffer:	40 mM	DL-Norleucin
	20% (v/v)	Methanol
		Aqua bidest.
Blockpuffer:	5% (w/v)	BSA in 1x TBS
	(oder 1x TBS-T für Cell Signaling-Antikörper)	

TBS 10x:	200 mM	Tris
	1,37 M	NaCl
		Aqua bidest.
	Mit HCl auf pH 7,6 einstellen	
TBS-T:	0,1% (v/v)	Tween-20 in 1x TBS

Immunfluoreszenz und In-Cell bzw. On-Cell Western Blot

Fixierlösung:	3% (w/v)	Paraformaldehyd in 1x PBS pH 7,2
Absättigung Aldehydgruppen:	50 mM	Ammoniumchlorid in 1x PBS pH 7,2
Permeabilisierungslösung:	0,2% (w/v)	Triton X-100 in 1x PBS pH 7,2
Blockpuffer:	0,3% (w/v)	BSA in 1x PBS pH 7,2
PBS 10x:	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	81 mM	Na_2HPO_4
	18 mM	KH_2PO_4
		Aqua bidest.

Durchflusszytometrie

FACS-Puffer:	1% (w/v)	BSA in 1x PBS pH 7,2

2.10 Verbrauchsmaterialien

Anti-Flag® M2 Affinity Gel	[Sigma-Aldrich, Steinheim]
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	[Roche Diagnostics, Mannheim]
Deckgläschen Ø 12 mm	[Langenbrinck, Emmendingen]
Einfrierbox	[Nalgene, Rochester (USA)]
Einweghandschuhe Gentle Skin™	[Meditrade, Kiefersfelden]
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	[Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (USA)]
Einwegpipettenspitzen	[Greiner, Frickenhausen]
Einwegpipettenspitzen mit Filter	[Starlab, Ahrensburg]
Einwegskalpelle	[PFM, Köln]
Einwegspritzen	[Terumo, Leuven (Belgien)]
Elektroporationsküvetten	[Greiner, Frickenhausen]
Einwegfilter für Spritzen (0,45 µm)	[Renner, Dannstadt]
Fluoprep	[BioMerieux, Marcyl'Etiole (Frankreich)]
Glaswaren	[Schott, Mainz]
Kanülen	[Becton Dickinson, Fraga (Spanien)]
Kryoröhrchen	[Nalgene, Rochester (USA)]
M-PER®	[ThermoScientific, Rockford (USA)]
NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris-Gel	[Invitrogen, Carlsbad (USA)]
Objektträger	[Langenbrinck, Emmendingen]
OP-Gesichtsmasken	[Meditrade, Kiefersfelden]
Parafilm	[Pechiney, Chicago (USA)]
Pasteurpipetten	[WU, Mainz]
Petrischalen	[Greiner, Frickenhausen]
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	[Roche Diagnostics, Mannheim]
Pipetten	[Gilson,
Plastikröhrchen (PP; 15 ml, 30 ml)	[Greiner, Frickenhausen]

Protein A-Sepharose™ 4 Fast Flow	[GE Healthcare, Uppsala (Schweden)]
Protein G-Sepharose™ 4 Fast Flow	[GE Healthcare, Uppsala Schweden]
PVDF-Membran (Immobilon-P; 0,45 µm)	[Millipore, Bedford (USA)]
QIAshredder™	[QIAGEN, Hilden]
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	[Eppendorf, Hamburg]
Sterilfilter	[Corning Inc., Corning (USA)]
Streptavidin HP SpinTrap	[GE Healthcare, Uppsala (Schweden)]
Streptavidin-Sepharose™ HP	[GE Healthcare, Uppsala Schweden]
Whatman-Filterpapier (3 mm)	[Schleicher & Schuell, Dassel]
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	[Sarstedt, Newton (USA)]
Zellkulturplatten (6well, 12well, 24well, 48well, 96well)	[Corning Inc., Corning (USA)]
Zellschaber	[Sarstedt, Newton (USA)]
Zellsiebe (cell strainer)	[Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (USA)]

2.11 Geräte

Agarosegelkammer	[PeqLab, Erlangen]
Analysenwaage GT 410	[NeoLab, Heidelberg]
Autoklav	[MMM GmbH, München]
Bakterienschüttler TR 125	[Infors, Bottmingen (Schweiz)]
Brutschrank	[Labotect, Göttingen]
Durchflusszytometer FACSCalibur	[Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)]
Durchflusszytometer Cytomics FC500 MPL	[Beckman Coulter, Brea (USA)]
Eismaschine	[Hoshizaki, Amsterdam (Niederlande)]
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac 1000	[Bio-Rad, München]

Gene Pulser™ II (Elektroporator)	[Bio-Rad, München]
Kühl- und Tiefkühlgeräte	[Liebherr, Biberach; Heraeus Christ, Osterode]
Magnetrührer	[Heidolph, Heidelberg]
Mikroskop DMIL	[Leica Microsystems, Wetzler]
Mikroskop Zeiss LSM 710 ConfoCor 3	[Carl Zeiss AG, Oberkochen]
Mikroskop Leica SP5	[Leica Microsystems, Wetzler]
Mikrowelle	[Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe]
Minifuge	[Heraeus Christ, Osterode]
Nanodrop ND-1000	[ThermoScientific, Wilmington (USA)]
Neubauer Zählkammer	[NeoLab, Heidelberg]
Odyssey Imaging System	[LI-COR Bioscience, Lincoln (USA)]
pH-Meter PB-11	[Sartorius, Göttingen]
PCR-Thermocycler (MJ Mini)	[Bio-Rad, München]
Rotator	[Snijders, Tilburg (Niederlande)]
Schüttler	[Tecnomara, Zürich (Schweiz)]
Sterile Werkbank BSB 4A	[Gelaire Flow Laboratories, Opera (Italien)]
Stickstofftank	[Messer, Krefeld]
Thermomixer 5436	[Eppendorf, Hamburg]
Tischzentrifuge 5417R	[Eppendorf, Hamburg]
TransBlot® SD (Halbtrocken-Elektroblotter)	[Bio-Rad, München]
UV-Geldokumentation	[Herolab, Wiesloch]
UV-Tische (254 nm und 360 nm)	[Vetter, Wiesloch]
Vortexer	[Heidolph, Heidelberg]
Wasserbad (Thermomix 1460)	[B. Braun, Melsungen]
XCell SureLock™ Mini-Elektrophoresekammer	[Invitrogen, Carlsbad (USA)]
Zentrifuge 03400	[Heraeus Christ, Osterode]
Zentrifuge RC5C (Rotoren: SLA-3000, HB-6)	[Sorvall Du Pont, Wilmington (USA)]

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Lagerung und Kultur von Bakterien

Zur Vervielfältigung der gewünschten Plasmid-DNA war eine Transformation in Bakterienzellen erforderlich. Geeignete Bakterienstämme zur Transformation und Vermehrung von Plasmiden sind u.a. die *E.coli*-Stämme HB101 oder DH5α.
Zur Kultivierung der Bakterien wurden LB-haltige Agarplatten oder zur Flüssigkultur LB-Nährmedium verwendet. Die Anzucht der Kultur erfolgte über Nacht bei 37°C in Gegenwart des entsprechenden Selektionsantibiotikums.
Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden 50 µl der 1:200 verdünnten Bakteriensuspension unter Verwendung eines Drigalskispatels auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Das Animpfen des LB-Nährmediums zur Herstellung einer 5 ml Flüssigkultur (Startkultur) erfolgte mit einer Impföse, mit der eine geeignete Kolonie von der Platte gepickt und dem Medium zugeführt wurde. Zur Inokulation einer Hauptkultur wurden für high-copy Plasmide 250 ml LB-Medium mit 250 µl der Startkultur und für low-copy Plasmide 500 ml Medium mit 1000 µl Startkultur versetzt.

Die Flüssigkultur kann bis zu zwei Wochen, die Plattenkultur bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden. Für eine langfristige Lagerung wurden von der Flüssigkultur Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden 0,6 ml der Flüssigkultur mit 0,4 ml 86%igem Glycerin vermischt und sofort bei -20°C tiefgefroren.

3.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Einschleusung fremder DNA in Bakterien erfordert Kompetenz.
Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 15 ml einer Übernachtkultur des gewünschten Bakterienstammes (DH5α oder HB101) zu 500 ml LB-Medium hinzugegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 15 minütigem Abkühlen der Kultur auf Eis erfolgte die Sedimentation im vorgekühlten Rotor bei 6000 x g und 4°C für 5 min. Das Bakterienpellet wurde zunächst einmal mit 500 ml eiskaltem Aqua bidest. und im Anschluss zweimal mit

20 ml 10%igem eiskaltem Glycerin gewaschen. Die Resuspension der Bakterien wurde in 2,5 ml 10%igem eiskaltem Glycerin durchgeführt. Zur Langzeitlagerung bei -80°C wurden jeweils 50 µl der Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Wiederauftauen der tiefgefrorenen, elektrokompetenten Bakterien für eine Transformation erfolgte langsam auf Eis.

3.1.3 Transformation von E.coli DH5α, DH10B T1^R und HB101 mittels Elektroporation

Zur Transformation wurden 50 µl auf Eis aufgetaute, elektrokompetente Bakterien mit 50 ng Plasmid-DNA oder 1-2 µl Ligationsansatz versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 2 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω, dabei sollte die Zeitkonstante etwa 4,7 ms betragen. Die Transformanten wurden danach sofort mit 1 ml LB-Medium resuspendiert, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 37°C für 1h im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Transformationsansatzes auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37°C wurde eine Startkultur hergestellt, die zur Inokulation einer Hauptkultur diente.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Überprüfung der Transformationseffizienz (*oder:* des Transformationserfolges) wurden zunächst mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits geringe Mengen an Plasmid-DNA aus 1,5 ml Startkultur gewonnen und in einer Restriktionsanalyse (3.2.4) auf Richtigkeit geprüft. Die Isolierung wurde wie im QIAGEN Protokoll beschrieben durchgeführt.

Um Restriktions- und Ligationsfehler auszuschließen erfolgte bei neuen Plasmid-Konstrukten zusätzlich die Sequenzierung der DNA durch die Firma GATC Biotech (Konstanz).

Zur Gewinnung größerer Mengen DNA für experimentelle Zwecke wurde eine DNA-Maxipräparation mittels Endofree Plasmid Maxi Kit durchgeführt. Für die Aufreinigung der Plasmid-DNA wurden 500 ml Hauptkultur verwendet und entsprechend dem QIAGEN Protokoll aufgearbeitet.

3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Zur Transkriptionsanalyse des HPV16 E5-Gens zu verschiedenen Zeitpunkten nach retroviraler Transduktion (3.3.7) wurde totale RNA aus HaCaT-Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale isoliert.
Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS/0,05% EDTA gewaschen und für 10 min mit Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in 4 ml Kulturmedium aufgenommen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und das Zellpellet bei -80°C bis zur Weiteraufarbeitung weggefroren.
Zur Aufreinigung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Das aufgetaute Pellet wurde in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und die RNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Für weiterführende Experimente wurde die RNA bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte photometrisch mit Hilfe des Nanodrop. Sie basiert auf dem Absorptionsmaximum von RNA und DNA bei einer Wellenlänge von λ= 260 nm, und ausgehend von einem 1 cm Lichtweg gelten folgende Richtlinien:

OD_{260}= 1 entspricht:	50 µg/ml	doppelsträngiger DNA
	40 µg/ml	einzelsträngiger DNA
	33 µg/ml	einzelsträniger RNA

Daraus errechnet sich die Konzentration folgendermaßen:

$$\mathbf{c_{Nukleinsäure} = OD_{260} \times K_{Nukleinsäure} \times F}$$

$c_{Nukleinsäure}$: Konzentration der unbekannten Nukleinsäure-Lösung

OD_{260}: Optische Dichte (Absorption bei 1 cm Lichtweg) bei λ=260 nm

$K_{Nukleinsäure}$: Nukleinsäurekonzentration bei OD_{260} = 1 (s. oben)

F: Verdünnungsfaktor

Zur Konzentrationsvermessung der Probe war zunächst eine Kalibrierung mit destilliertem Wasser und dem Lösungsmittel der Probe erforderlich.

Um den Reinheitsgehalt der Nukleinsäurelösung zu bestimmen, wurde zusätzlich die OD bei einer Wellenlänge von λ=280 nm ermittelt und der Quotient OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Für DNA sollte dieser Wert bei 1,8 liegen, für RNA bei 2,0. Die Verunreinigung mit Proteinen würde zu deutlich kleineren Werten führen.

3.2.4 Restriktionsanalyse

Das enzymatische Schneiden von doppelsträngiger DNA mit Hilfe bakterieller Restriktionsendonukleasen ist eine ideale Methode zur Charakterisierung, Identifizierung und Isolierung der DNA. Restriktionsendonukleasen besitzen die Eigenschaft vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang spezifisch zu erkennen und zu schneiden. Dabei können durch Schnitte an gleicher Stelle glatte Strangenden (*blunt ends*) oder durch versetztes Schneiden 5‘- oder 3‘-Überhänge (*sticky ends*) entstehen.

Zur Kontrolle der Plasmid-DNA aus der Minipräparation wurde eine analytische Restriktion mit einer und/oder zwei Restriktionsendonucleasen durchgeführt, die das Plasmid jeweils nur einmal schneiden. Die linearisierte Plasmid-DNA sowie die DNA-Fragmente wurden in einer Agarosegelelektrophorese (3.2.5) aufgetrennt und auf Richtigkeit geprüft.

Für die Isolierung definierter DNA-Fragmente zur Klonierung in Vektoren erfolgte eine präparative Restriktionsanalyse. Dazu wurde ebenfalls ein Enzympaar verwendet, das die Vektor- und Insert-DNA nur einfach schneidet. Die Schnittstellen für Vektor und Insert wurden so gewählt, dass die geschnittene DNA die gleichen Enden aufwiesen.

In beiden Fällen fand die Restriktionsanalyse nach Protokoll des Herstellers unter Verwendung der geeigneten Enzympuffer und stets bei Enzymüberschuss statt, jedoch ohne Überschreitung einer Glycerinkonzentration von 5%. Die Inkubation wurde bei 37°C für 1h durchgeführt. Das Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch Erhitzen auf 65°C für 20 min.

Analytische Restriktion	**Präparative Restriktion**
1-3 µg DNA	5 µg Vektor- oder 10 µg Insert-DNA
3 µl 10x Enzympuffer	5 µl 10x Enzympuffer
0,3 µl 100x BSA*	0,5 µl 100x BSA*
1-3 U Enzym	5 U Enzym (Vektor) oder 10 U (Insert)
ad 30 µl Aqua bidest.	ad 50 µl Aqua bidest.

* Die Zugabe von BSA erfolgte in Abhängigkeit vom Enzym.

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung und Größenverteilung aufzutrennen und ggf. zu präparieren. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Fragmentgröße. Bei Plasmid-DNA wird zudem das Laufverhalten im Gel von der Plasmidform beeinflusst. Um eine möglichst gute Auftrennung zu erreichen, wurden je nach Fragmentgröße verschiedene Agarose-Konzentrationen eingesetzt.

100 - 1000 bp:	1,7% Agarosegel
1 – 2 kb:	1,5% Agarosegel
2 – 6 kb:	1% Agarosegel

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die entsprechende Agarosemenge mit 1x Elektrophorespuffer bis zur Entstehung einer homogenen Lösung in der Mikrowelle aufgekocht. Zur Detektion der Nukleinsäure-Fragmente wurde dem Agarose-Puffergemisch nach Abkühlen auf ca. 60°C Ethidiumbromid (c_{End}= 1 µg/ml) zugesetzt und in eine Gelkammer mit Gelkämmen überführt. Das Färbereagenz interkaliert in die Nukleinsäuren und ermöglicht eine Visualisierung unter UV-Bestrahlung. Nach

Erstarren der Agarose wurde das Gel mit den Proben beladen, die zuvor mit DNA-Gel-Ladepuffer versetzt und bei Bedarf mit Aqua bidest. aufgefüllt wurden. Die Laufzeit der Gelelektrophorese variierte in Abhängigkeit von der Fragmentgröße, der Agarosekonzentration und der Fragestellung des Gels. Die Agarosegelelektrophorese wurde in 1x Elektrophoresepuffer (1x TAE für Nukleinsäuren $\geq$ 3 kb, 1x TBE für Nukleinsäuren < 3 kb) durchgeführt, die angelegte Spannung betrug 10 V/cm. Die Größe der Fragmente wurde anhand eines entsprechenden Größenstandards (100 bp oder 1 kb DNA ladder) abgeschätzt.

3.2.6 Elution von DNA-Fragmenten

Für die anschließende Ligation (3.2.7) wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente der entsprechenden Bandengröße durch Visualisierung des Gels auf dem UV-Tisch mit einem Einweg-Skalpell heraus präpariert. Die Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel wurde mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.7 Ligation

Die Ligation der linearisierten Vektor-DNA mit der Insert-DNA erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase. Das eingesetzte, molare DNA-Verhältnis von Vektor und Insert betrug 1:5. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte über Nacht bei 16°C. Zur Überprüfung der Ligation wurde 1/6 der Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert.

Ligationsansatz:		
	100 ng	Vektor-DNA
	x ng	Insert-DNA
	2 µl	10x T4-DNA-Ligasepuffer
	1 U	T4-DNA-Ligase
	ad 20 µl	Aqua bidest.

Zur Vervielfältigung des Plasmids wurde die DNA durch Elektroporation in kompetente Bakterien eingebracht (3.1.3), eine Plattenkultur angelegt und wie in 3.1.1, 3.2.1 und 3.2.3 beschrieben fortgeführt.

3.2.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion oder kurz PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur enzymatischen Amplifikation von Nukleinsäuren. Die Template-abhängige Neusynthese von DNA erfolgt durch bakterielle, thermostabile DNA-Polymerasen. Voraussetzung ist die Kenntnis der flankierenden Sequenzen für die Synthese der komplementären Oligonukleotid-Primer, die jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden Abschnitts mit dem (+)-Strang bzw. (-)-Strang hybridisieren und der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Reaktion dienen.
Der typische Ablauf einer PCR besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen (1. DNA-Denaturierung, 2. Primer-Annealing, 3. Elongation), die zyklisch in einem Thermocycler 30-45 Mal wiederholt werden.

In dieser Arbeit wurde die PCR als Werkzeug zur Amplifikation von RNA eingesetzt (3.2.8.1).

3.2.8.1 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Für die RNA-Amplifikation muss die RNA zunächst mit Hilfe von reversen Transkriptasen in DNA umgeschrieben werden, da die Ausgangs-RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase genutzt werden kann. Der bei der reversen Transkription (RT) gebildete DNA-Strang wird als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet.
Die RT-PCR wurde unter Verwendung des iScript One Step RT-PCR Kits durchgeführt, d.h. die Synthese und spezifische Amplifikation der cDNA erfolgten in einem und demselben Reaktionsgefäß. Zunächst wurde die entsprechende Menge an Nuklease-freiem Wasser vorgelegt und mit 31 µl Mastermix versetzt.

Reaktionsansatz für eine Probe:

25 µl	2x RT-PCR Reaction Mix
2,5 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)
2,5 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	iScript Reverse Transcriptase (RTase)
31 µl	Mastermix

Abschließend wurden 1 µg totale RNA zum Reaktionsansatz zugegeben. Alle Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis zusammenpipettiert. Die RT-PCR fand unter folgenden Bedingungen statt:

Reverse Transkription:	cDNA-Synthese:	10 min bei 50°C
	RTase-Inaktivierung:	5 min bei 95°C
PCR (45 Zyklen):	Denaturierung:	10 s bei 95°C
	Annealing/Elongation:	30 s bei 57°C

Die amplifizierten cDNA-Proben wurden schließlich in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und die Banden unter UV-Bestrahlung visualisiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Auftauen von Kryokonserven

Aufgrund der zelltoxischen Wirkung von DMSO ist ein schnelles Arbeiten beim Auftauen von Zellen, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, unerlässlich.
Die Zellen wurden in 5 ml nicht vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 500 x g für 4 min bei 4°C zentrifugiert und das überschüssige Medium abgenommen. Das Zellpellet wurde nach einem Waschschritt mit PBS in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in eine 10 cm Zellkulturschale gegeben. Sobald sich die Zellen am Boden der Zellkulturschale angeheftet hatten, wurde zur Entfernung der DMSO-Reste ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.3.2 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die Kultivierung von adhärenten Zellen als Einzelzellschicht erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Anteil in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. In Abständen von zwei bis drei Tagen wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium versorgt. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml vorgewärmten 1x PBS/0,05% EDTA gewaschen.

Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA wurden die Zellen je nach Zelltyp 3-10 min im Brutschrank inkubiert, um Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Verbindungen zu lösen. Zum Abstoppen der proteolytischen Reaktion erfolgte eine Resuspension der Zellen in 4 ml Kulturmedium. Je nach Bedarf wurde ein Zehntel, ein Fünftel oder die Hälfte der Zellsuspension einer 10 cm Zellkulturplatte mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und weiter kultiviert.

3.3.3 Kryokonservierung einer Zelllinie

Mit zunehmender Kultivierungsdauer können infolge von Mutationen Veränderungen im Phänotyp auftreten. Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine Kultur durch Kontamination mit Mikroorganismen verloren geht. Aus diesen Gründen ist es erforderlich, Kryokonserven einer frühen Passage anzulegen, auf die bei Bedarf zurückgegriffen werden kann.
Die subkonfluenten Zellen wurden mit 1x PBS/0,05% EDTA gewaschen, trypsiniert und in ausreichend Medium aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension bei 500 x g für 4 min bei 4°C. Das überschüssige Medium wurde abgenommen, das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und auf zwei 1,5 ml Kryokonservierungsröhrchen aufgeteilt. Die Zellen wurden in einer vorgekühlten Isopropanol-Box bei -80°C langsam eingefroren und nach zwei Tagen zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Eine Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit von zellbiologischen Experimenten ist das Einsetzen derselben Anzahl von Zellen von Experiment zu Experiment.
Zum Auszählen der Zellen wurden wenige µl der Zellsuspension mittels einer sterilen Pasteurpipette in die Neubauer Zählkammer überführt. Zur genauen Bestimmung der Zellzahl wurden vier Großquadranten ausgezählt und der arithmetische Mittelwert errechnet. Dieser Wert entspricht der Anzahl an Zellen in 0,1 µl Suspension, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor 10^4 erhält man die Zellzahl pro ml.

3.3.5 Herstellung stabiler Transfektanten mit FuGENE-HD

Im Rahmen der Arbeit sollten für Mikroskopieanalysen HaCaT-Zellen erzeugt werden, die in der Lage sind den grünfluoreszierenden epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR-eGPF) stabil zu exprimieren. Dafür wurden die Zellen unter Verwendung des FuGENE HD Transfektionsreagenz mit dem Vektor pEGFR-eGFP-N1 transfiziert. Die Plasmid-DNA wurde zunächst durch Restrikition mit Ase I linearisiert, um eine Beschädigung des Genetecinresistenzgens bei Integration der DNA ins Genom zu verhindern.

Zur optimalen Transfektion sollten die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase vorliegen. Dazu wurden am Vortag $5x10^6$ Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bis zu einer Konfluenz von 80% im Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion wurden 10 µg linearisierte DNA mit DMEM ad 500 µl verdünnt und anschließend mit 40 µl FuGENE HD Transfektionsreagenz versetzt. Der Transfektionsansatz wurde durch Vortexen gut gemischt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Der Transfektionskomplex wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellkulturschale dabei vorsichtig hin- und herbewegt. Nach 48stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen trypsiniert und im Verhältnis 1:4 unter G418-Selektion für 12 Tage subkultiviert. Die Transfektanten wurden für 16 h in serum-freies Kulturmedium überführt und im Anschluss mit 200 ng/ml EGF stimuliert. Die Aufkonzentration von grünfluoreszierendem EGFR in einem Zellkompartiment erleichterte das Auffinden von positiven Klonen. In drei dieser Durchgänge wurden insgesamt 38 EGFR-eGFP positive Klone gepickt, in eine 48well-Zellkulturplatte transferiert und bis zur Überführung in 10 cm Zellkulturschalen weiter unter G418-Selektion subkultiviert. Zur Gewinnung von SDS-Extrakten (3.4.1.1) wurde je eine 10 cm Zellkulturschale der stabilen Transfektanten erneut für 12 h in serum-freiem Medium inkubiert und mit EGF stimuliert. Mit Hilfe einer SDS-PAGE und eines anschließenden Immunblots wurde die GFP-Expression der verschiedenen Klone überprüft. Für die Weiterkultur und fortführende Experimente wurde der Klon mit der stärksten GFP-Expression ausgewählt. So wie die restlichen Klone wurde auch ein Teil dieses Klons in mehrfacher Ausführung bei -80°C eingefroren.

3.3.6 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion

Die Kalzium-Phosphat-Transfektion beruht auf der Tatsache, dass Plasmid-DNA mit Kalzium-Phosphat Präzipitate ausbildet, welche sehr effizient von adhärenten eukaryotischen Zellen über Endozytose aufgenommen werden können.
Zur Produktion retroviraler Überstände wurden unter Verwendung der Kalzium-Phosphat-Methode subkonfluente $Phoenix_{ampho}$-Zellen mit 10 µg der retroviralen Vektoren pLXSN, pL(eGFP)SN, pL(AU1-16E5)SN, pL(Flag-16E5), pBabe und pBabe-AU1-16E5 transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 10 cm Zellkulturschalen mit Hilfe des CalPhos Mammalian Transfection Kits und wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Durch den Einsatz von 25 nM Chloroquin zu frischem Kulturmedium 30 min vor Zugabe des DNA-Kalzium-Phosphat-Präzipitats konnte die Transfektionseffizienz gesteigert werden. Zur Erhöhung des Virustiters wurden die Zellen 8-10 h nach Transfektion in 5 ml Kulturmedium weiter inkubiert. Für die retrovirale Transduktion (3.3.7) wurde der Virusüberstand 24 h und 48 h nach Transfektion geerntet, durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert, bei -80°C eingefroren oder weiterverarbeitet.

3.3.7 Retrovirale Transduktion von Zelllinien

Die Transduktion ist eine Methode mit deren Hilfe spezifische DNA-Sequenzen durch retrovirale Infektion in die Wirtszellen eingeschleust werden können und eine stabile Expression des gewünschten Gens ermöglichen.
Dazu wurden die Zielzellen (HaCaT- und HeLa-Zellen) am Vortag entsprechend so ausgesät, dass sie am Tag der Transduktion zu 50-60% konfluent waren. Zur Erhöhung der Zellmembranpermeabilität und Erleichterung der Transduktion wurde der geerntete und filtrierte 48 h Virusüberstand zunächst mit 6 µg/ml Polybren versetzt und anschließend auf die Zielzellen gegeben (1. Transduktion). Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C und 5% CO_2-Sättigung wurde der Virusüberstand im Verhältnis 1:2 mit Kulturmedium verdünnt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die 2. Transduktion der Zellen wie oben beschrieben unter Verwendung des 24 h Virusüberstandes und Zugabe von Polybren. Die Selektion der transduzierten Zellen wurde 48 h nach der 1. retroviralen Transduktion in Anwesenheit von G418 (für 7 Tage) oder Puromycin

(für 3 Tage) durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht-transduzierte Zellen in Selektionsmedium kultiviert, bis sie in Seneszenz übergegangen (G418) oder vollständig abgestorben (Puromycin) waren.

Die Transduktionseffizienz wurde anhand der eGFP- und *tag*-16E5-Expression mittels Durchflusszytometrie (3.4.8) oder Fluoreszenzmikroskopie (3.4.9) kontrolliert. Zusätzlich erfolgte eine RT-PCR (3.2.8) zum Nachweis von E5-RNA.

3.3.8 Zellkulturexperimente

Aufgrund der Tatsache, dass FKS je nach Charge eine nicht genau zu definierende Konzentration an Wachstumsfaktoren, Hormonen, etc. beinhaltet, wurden die Zellen in den nachfolgend beschriebenen Experimenten zunächst für etwa 16 h in serum-freies Kulturmedium überführt und anschließend wie in Abschnitt 3.3.8.1 bis 3.3.8.3 behandelt. Damit wurde ausgeschlossen, dass die ihm FKS enthaltenen Faktoren bereits Einfluss auf die Versuchsergebnisse nehmen. Zudem wurde dadurch der Zellzyklus in eine Art Ruhezustand versetzt und die Basalaktivität der Kinasen und anderer zellulärer Enzyme auf ein Minimum reduziert.

3.3.8.1 Behandlung der Zellen mit AR, EGF, HRG und TGFα

Die Aktivierung der EGF-Rezeptoren erfolgte unter Einsatz verschiedener Liganden (Tabelle 3.3.1).

Tabelle 3.3.1 Liganden und deren Endkonzentrationen zur EGFR-Stimulation von HaCaT- und HeLa-Zellen.

Zelltyp / Ligand	HaCaT	HeLa
AR	57 ng/ml	
EGF	100 ng/ml	50 ng/ml
HRG	75 ng/ml	
TGFα	30 ng/ml	

Dazu wurden die Zellen je nach Zelltyp für verschiedene Zeitdauer (2-120 min) mit dem Liganden, falls nicht anders beschrieben, bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch Überführung der Zellen auf Eis und das Waschen mit eiskaltem 1x PBS wurde die Liganden abhängige EGFR-Aktivierung abgestoppt. Anschließend wurden Proteinextrakte hergestellt (3.4.1.), die Zellen für Durchflusszytometrie geerntet (3.4.8) oder für Mikroskopie-Analysen (3.4.9) bzw. einen sogenannten In-Cell oder On-Cell Western Blot (ICW/OCW, 3.4.10) fixiert.

3.3.8.2 Inhibitorexperimente

Zur Blockierung bzw. Hemmung verschiedener Proteinaktivitäten kamen unterschiedliche Inhibitoren zum Einsatz, mit denen die Zellen vor, während und/oder nach der Stimulation mit dem Liganden inkubiert wurden.

3.3.8.2.1 Behandlung mit Chlorpromazin, Methyl-β-cyclodextrin, Filipin und Nystatin

Bei den oben genannten Chemikalien handelt es sich um Inhibitoren der EGFR-Endozytose. Während Chlorpromazin und Methyl-β-cyclodextrin vorwiegend die Clathrin-abhängige Internalisierung blockieren, führen Filipin und Nystatin zur Hemmung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung des EGF-Rezeptors.
Zur Hemmung der EGFR-Endozytose wurden die Zellen mit 5 µg/ml Filipin oder 5 µg/ml Nystatin für 30 min bzw. mit 10 µM Chlorpromazin oder 10 µM Methyl-β-cyclodextrin für 1 h im Brutschrank vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit des Inhibitors mit EGF stimuliert. Der Behandlung folgte eine Extraktion von Proteinen (3.4.1) oder die Fixierung der Zellen für einen ICW bzw. OCW (3.4.10).

3.3.8.2.2 Behandlung mit Monensin

Monensin wurde eingesetzt, um das Rezeptorrecycling und -Trafficking ausgehend vom frühen Endosomen zu blockieren.
Dazu wurden die HaCaT-Zellen mit 100 µM und HeLa-Zellen mit 10 µM des Inhibitors für 30 min im Brutschrank vorinkubiert. Die darauffolgende Stimulation mit EGF

erfolgte in Gegenwart von Monensin. Danach wurde entweder eine Proteinextraktion (3.4.1) durchgeführt oder die Zellen wurden für einen ICW bzw. OCW fixiert (3.4.10).

3.3.8.2.3 Behandlung mit Tyrphostin (AG1478)

Die Anwendung von Tyrphostin AG1478 diente zur spezifischen Inhibierung der Tyrosinkinasen des EGF-Rezeptors.
Zunächst wurden die Zellen für 15 min auf Eis mit EGF behandelt. In dieser Zeit bindet der Ligand an die EGF-Rezeptoren der Zellmembran, wird aber nicht internalisiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, für verschiedene Zeitperioden mit serum-freiem Medium und 1 µM AG1478 im Brutschrank bei 37°C inkubiert und Proteinextrakte (3.4.1) hergestellt.

3.3.8.3 Markierung von Oberflächenproteinen mit Biotin

Um die relative Anzahl aktivierter EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche zu bestimmen, wurden die Rezeptoren unter Verwendung des Cell Surface Protein Isolation Kits biotinyliert und aus dem Gesamtproteinextrakt isoliert.
Zuerst wurde eine 15 minütige EGF-Behandlung auf Eis durchgeführt, gefolgt von einem Waschschritt mit eiskaltem 1x PBS. Zur Internalisierung der Liganden-Rezeptor-Komplexe wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitdauer im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und mit dem Sulfo-NHS-SS-Biotin auf Eis für 30 min inkubiert. Die Biotinylierung wurde durch Zugabe der Quenchinglösung gestoppt. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 500 x g und 4°C für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem 1x TBS gewaschen, schließlich in 100 µl Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse der Zellen wurde durch Ultraschallbehandlung im Eisbad (5x 1 s) auf niedriger Stufe unterstützt. Schließlich wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und alle 5 min gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10000 g und 4°C für 2 min wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und entweder die Gesamtproteinkonzentration (3.4.2) bestimmt oder bei -20°C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

Für die Isolierung der biotinylierten Oberflächenproteine aus dem Gesamtlysat wurden 700 µg Protein auf die mit 300 µl NeutrAvidin-Gel immobilisierte Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 1 h rotiert. Die nicht biotinylierten Proteine wurden durch entrifugation (bei 1000 x g, 1 min) entfernt. Nach vier Waschschritten in 500 µl Waschpuffer mit Protease-Inhibitoren wurden die biotinylierten Proteine durch Zugabe von 2x Protein-Gel-Ladepuffer aus der Säule eluiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (3.4.3).

Für nachfolgende Versuche wurde das Protokoll abgeändert. Nach dem Abstoppen der Biotinylierung mit Quenchinglösung wurden die Zellen einmal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und direkt in M-PER-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren lysiert (3.4.1.3). Die Isolierung der biotinylierten Proteine erfolgte entweder durch Streptavidin-Sepharose-Beads oder über eine Streptavidin-Sepharose-Säule. Die biotinylierten Proteine wurden nach mehrmaligem Waschen durch M-PER-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren ebenfalls in 2x Protein-Gel-Ladepuffer eluiert.

3.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur biochemischen und funktionellen Analyse von Proteinen nach der Behandlung mit Liganden oder ähnlichem wurden Ganzzellproteinextrakte durch Lysieren der Zellen in verschiedenen Puffern angefertigt.

3.4.1.1 SDS-Extrakte

SDS-Proteinextrakte eignen sich nicht nur sehr gut für Immunblot-Analysen (3.4.3 und 3.4.6) aufgrund ihrer relativen Unempfindlichkeit gegenüber mehrmaligen Einfrieren und Auftauen, sondern sind auch einfach und schnell herzustellen. Zudem werden nahezu alle zellulären Proteine solubilisiert und denaturiert. Für Immun- oder Affinitätspräzipitationen sind SDS-Extrakte ungeeignet, diese erfordern den möglichst nativen Zustand der Proteine.

Zur Proteinextraktion wurden Zellen mit einer Konfluenz von 80-90% verwendet. Zunächst wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 95°C heißem 1%igem SDS (500 µl für 10 cm Zellkulturschalen, 200 µl pro Loch einer 6well-Zellkulturplatte) lysiert. Die Zellen wurden sofort mit einem Zellschaber abgekratzt und zweimal durch eine QIAshredder-Säule bei maximaler Umdrehung für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt diente zum Scheren der enthaltenen zellulären DNA und zur Homogenisierung des Lysats. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 10 µl Proteinlysat entnommen, der Rest wurde bei -80°C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

3.4.1.2 RIPA-Extrakte

Für Immunpräzipitationen (3.4.7) sollte der Gehalt an Detergenzien des Lysepuffers gering sein, so dass die Proteine in einer möglichst nativen Form vorliegen.
Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden nahezu konfluente Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren für 15 min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 10000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Lysatüberstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren, zuvor wurden 10 µl Lysat zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen.

3.4.1.3 M-PER-Extrakte

Nach ersten Experimenten wurden Proteinextrakte durch Lyse mit M-PER-Puffer hergestellt. Diese Proteinlysate erzielen eine quantitativ und qualitativ bessere Ausbeute an Proteinen und können sowohl für einfache Immunblot-Analysen (3.4.6), als auch für Immunpräzipitationen (3.4.7) eingesetzt werden.
Die Durchführung der Proteinextraktion erfolgte wie in 3.4.1.2 beschrieben unter Verwendung des M-PER-Puffers mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren. Die M-PER-Extrakte wurden zur kurzfristigen Lagerung bei -20°C, langfristig bei -80°C aufbewahrt.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der quantitative Nachweis des Proteingehalts von Gesamtproteinlysaten beruht auf Farbreaktionen funktioneller Gruppe mit Farbstoff bildenden Reagenzien. Die Proteinkonzentration korreliert direkt mit der Farbstoffintensität, welche exakt photometrisch bestimmt werden kann.

3.4.2.1 Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)

In der Regel wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits ermittelt. Grundlage dieser Quantifizierungsmethode ist die Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+}-Ionen in alkalischer Lösung zu Cu^{+}-Ionen reduziert werden. Verantwortlich für die Reduktion der Kupfer-Ionen in Gegenwart von BCA sind Cystein, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindungen der Proteine. Die Bicinchoninsäure bildet spezifisch mit den Cu^{+}-Ionen einen violetten Farbkomplex, dessen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm liegt. Intensität des Farbkomplexes und Konzentration des Proteinlysats sind zueinander proportional.
Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Duplikat (2x 5 µl Proteinlysat) anhand einer Eichkurve mit bovinen Serumalbumin (BSA) als Standard und wurde nach Herstellerprotokoll im 96well-Format durchgeführt.

3.4.2.2 Bestimmung mit 2-D Quant Kit

Da komplexbildende Reagenzien (z.B. EDTA), reduzierende Stoffe wie Glukose oder DTT und eine Reihe von Pharmaka (u.a. Chlorpromazin, Penicillin) in hohen Konzentrationen störend wirken, wurde ein Teil der Proteinkonzentrations-bestimmungen mit dem 2-D Quant Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Quantifizierung des Proteingehaltes beruht ebenfalls auf einer Art Biuret-Reaktion, d.h. Bindung von Kupfer-Ionen vorwiegend durch Cystein-, Tryptophan- und Tyrosinreste, aber ohne Reduktion der Kupfer-Ionen.
Die Proteine wurden zunächst präzipitiert, dabei bleiben die störenden und interferierenden Substanzen im Überstand zurück. Das Präzipitat wurde in einer Kupferlösung resuspendiert und nicht gebundene Kupfer-Ionen mit Hilfe eines

Färbereagenz bei einer Wellenlänge von 480 nm detektiert. Die Proteinkonzentration verhält sich umgekehrt proportional zur Farbstoffintensität und wurde im Duplikat (2x 5 µl Lysat) anhand einer BSA-Eichkurve bestimmt.

3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE können Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch den Zusatz von SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat), dessen stark negative Eigenladung und Bindung an die Proteine, wird die unterschiedliche, native Proteinladung maskiert. Die entstehende negative Gesamtladung ist proportional zur Proteingröße. Die Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen und die Aufspaltung von Schwefelbrücken werden durch Erhitzen der SDS-haltigen Proben bei 95°C in Gegenwart reduzierender Thiolverbindungen erreicht. Die Qualität der Proteinauftrennung im Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes ist abhängig vom Vernetzungsgrad des Gels. Während Proteine geringer Größe sich gut in einem 12%igen Polyacrylamidgel auftrennen lassen, eignen sich für Proteine mit einem großen Molekulargewicht 4-7%ige Polyacrylamidgele. Optimale Trennungsergebnisse liefern Gradientengele, deren gesamter und linearer Trennbereich erheblich weiter ist als bei Gelen konstanter Porengröße. Zudem wirken Gradientengele der Diffusion entgegen und weisen schärfere Banden auf.

Zur funktionellen Analyse der Proteine wurden 20 µg Gesamtproteinlysat mit Protein-Gel-Ladepuffer versetzt und ggf. mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend bei 70°C für 10 min denaturiert, kurz abzentrifugiert und in einem 4-12%igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientengel aufgetrennt. Als Laufpuffer in der Anodenkammer wurde MOPS-SDS-Puffer verwendet, in der Kathodenkammer wurde dem MOPS-SDS-Puffer 20x NuPAGE Antioxidant zugesetzt. Die Elektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen in einer XCell SureLock Mini-Elektrophoresekammer bei 125 V für ca. 2h durchgeführt. Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine wurde als Größenstandard der Precision Plus Protein Standard verwendet.

3.4.4 Coomassie-Blaufärbung von Proteinen

Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss des Proteintransfers auf eine PVDF-Membran (Immunblot, 3.4.6) durch das GelCode Blue Stain-Färbereagenz (Thermo-Scientific, Wilmington (USA)) im Gradientengel sichtbar gemacht. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 µg/mm^2.
Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel zunächst mit Aqua bidest. gespült und anschließend für 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung des Gels erfolgte mit Aqua bidest, das in regelmäßigen Abständen gewechselt wurde, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren.

3.4.5 Silberfärbung von Proteinen

Die Silberfärbung ist eine hoch-sensitive Methode zum Färben geringer Proteinmengen in einem Polyacrylamidgel mit einer Nachweisgrenze von 1-30 ng/mm^2.
Das Anfärben der Proteine erfolgte nach dem Standardprotokoll des SilverQuest Silver Staining Kits.

3.4.6 Immunblot (Western Blot)

Unter einem Immunblot versteht man den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen eines Polyacrylamidgels auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon mit anschließender immunochemischer Detektion durch spezifische Antikörper. Für die quantitative Immunblot-Analyse von Gesamt- und aktiviertem EGF-Rezeptor sowie „*downstream*“-Signalmolekülen in transduzierten Zellen wurde das Halbtrockenblotsystem von Bio-Rad angewendet.
Zunächst wurden je ein Whatman-Filterpapier in Anodenpuffer I und Anodenpuffer II sowie zwei Whatman-Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung 1 min in 100% Methanol geschwenkt und zur Equilibrierung anschließend in Anodenpuffer II überführt. Das Gel wurde für einige Minuten in Kathodenpuffer equilibriert.

Der Aufbau der einzelnen Komponenten wurde folgendermaßen vorgenommen:

Kathode (-)
2 Filterpapiere in Kathodenpuffer
Gel
PVDF-Membran
1 Filterpapier in Anodenpuffer II
1 Filterpapier in Anodenpuffer I
Anode (+)

Der Proteintransfer wurde bei 20 V für 1,5 h durchgeführt und die Membran anschließend für 2 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer geschwenkt. Die Inkubation in Blockpuffer diente der Absättigung freier, unspezifischer Bindungskapazitäten. Zur Immundetektion bestimmter Proteine wurde die Membran mit spezifischen Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung in Blockpuffer über Nacht bei 4°C inkubiert (2.8.2). Ungebundene Primärantikörper wurden durch viermaliges Waschen in 1x TBS-T und einmaliges Waschen in 1x TBS für je 5 min entfernt. Durch Zusatz von 0,02% NaN_3 wurden die Primärantikörperlösungen konserviert und konnten mehrmals genutzt werden. Als Sekundärantikörper wurden Antikörper verwendet, die mit einem Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind und eine direkte quantitative Auswertung gewährleisten. Die sekundären Antikörper wurden in Blockpuffer 1:10000 verdünnt. Je nach Typ des Erstantikörpers (Maus oder Kaninchen) erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper lichtgeschützt für 1 h bei Raumtemperatur. Schließlich wurde die Membran erneut für je 5 min viermal in 1x TBS-T und einmal in 1x TBS gewaschen und die Antikörper-Protein-Komplexe mittels Odyssey Infrared Imaging System bei entsprechender Wellenlänge (680 oder 800 nm) und einer Auflösung von 84 µm detektiert.

Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe der Odyssey-Software (Version 2.0). Für die Auswertung wurde die durchschnittliche Hintergrundintensität von der durchschnittlichen Bandenintensität des gesuchten Proteins subtrahiert und die relative Intensität von aktiviertem EGFR zu Gesamt-EGFR für die jeweiligen Zeitpunkte ermittelt. Für mehrere Replikate wurden der arithmetische Mittelwert und der

zugehörige Standardfehler bestimmt. In Abhängigkeit von der Größe des analysierten Proteins dienten als Referenz bzw. Ladekontrolle die „*housekeeping*“-Proteine Vinculin, Aktin oder Histon H3.

3.4.7 Immunpräzipitation und Coimmunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist die Isolierung bestimmter Proteine aus Gesamtproteinlysaten durch Bindung an die F_{ab}-Region des spezifischen Antikörpers möglich. Bei einer Coimmunpräzipitation bindet zudem die F_c-Region des entsprechenden Immunglobulins an eine mit Strepatavidin oder Protein A bzw. G beschichtete Sepharosematrix (Säule oder *Beads*). Durch Abzentrifugieren wird der Protein-Antikörper-Komplex schließlich aus dem Proteingemisch präzipitiert. Die gebundenen Proteine können durch Erhitzen der Proben in 2x Protein-Gel-Ladepuffer eluiert und in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und analysiert werden. Die Immun- und Coimmunpräzipitation wurde angewendet, um biotinylierte Oberflächenproteine bzw. EGF-Rezeptoren in aktiver oder inaktiver Form aus einem Gesamtproteinlysat zu isolieren.

Während die biotinylierten Proteine direkt an eine Streptavidin-Sepharose-Matrix gebunden wurden, erfolgte die Isolation von EGFR über eine Protein-G-Sepharose-Matrix in Gegenwart des entsprechenden Antikörpers. Zunächst wurde die Sepharose-Matrix (eine Säule oder 50 µl Beads pro Ansatz) dreimal in 500 µl Lysepuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren gewaschen und mit 500-1000 µg Proteinlysat und ggf. Antikörper vesetzt. Der Mix wurde auf ein Endvolumen von 500 µl (ggf. 1000 µl) mit Lysepuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren aufgefüllt und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat bei 1000 x g und 4°C für 3 min abzentrifugiert. Von dem Lysatüberstand wurden 10 µl für die SDS-PAGE abgenommen, der Rest wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt. Das pelletierte Präzipitat wurde mindestens dreimal in Lysepuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren gewaschen und die gebundenen Proteine in 2x Protein-Gel-Ladepuffer bei 70°C für 10 min eluiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 4-12%igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientgel und MOPS-SDS-Puffer unter reduzierenden Bedingungen. Zur Kontrolle wurden zusätzlich die 10 µl Lysatüberstand

aufgetragen. Zur Detektion und Analyse der Proteine wurde ein Immunblot (3.4.6) durchgeführt.

Die Co-Immunpräziptation wurde außerdem zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet. Dazu wurden Gesamtproteinlysate von E5- und Leervektor-exprimierenden HaCaT-Zellen mit anti-AU1-Antikörper und Protein-G-Sepharose wie oben beschrieben inkubiert. Die eluierten Proteine und Lysatüberstände wurden in einem 4-12%igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientgel und MOPS-SDS-Puffer unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Silberfärbung (3.4.5) sichtbar gemacht. Banden, die in den E5-exprimierenden Zellen, aber nicht in der Kontrolle erkennbar waren und umgekehrt, wurden ausgeschnitten, entfärbt und mit ESI-MS/MS (3.4.11) analysiert.

3.4.8 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Einzelzellanalyse großer Zellpopulationen bzgl. Größe, Anzahl, Granularität sowie Funktion (durch Färbung von Oberflächenmarkern oder intrazellulären Proteinen). Zudem kann der Einfluss verschiedener Pharmaka und die Dynamik zellulärer Prozesse auf Einzelzellbasis direkt untersucht werden.
Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die intrazelluläre Expression von HPV16 E5 nach Transduktion in HaCaT- und HeLa-Zellen nachzuweisen. Des Weiteren erfolgte eine Quantifizierung von aktiviertem und Gesamt-EGFR in E5-exprimierenden Zellen und Kontrollen. Die Messungen wurden am BD FACSCalibur-Durchflusszytometer oder am Cytomics FC500 MPL von Beckman Coulter durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurden die Programme CellQuest (BD Bioscience, San Jose (USA)) bzw. CXP-Analysis (Beckman Coulter, Brea (USA)) verwendet.
Ungefärbte Zellen dienten zur Analyse der Eigenfluoreszenz der Zellen. Zur Kontrolle und Detektion des Signalhintergrundes der eingesetzten Antikörper erfolgte die Färbung von Zellen mit Sekundärantikörpern ohne Vorinkubation mit Primärantikörper bzw. ausschließlich mit Primärantikörper.

3.4.8.1 Färbung von intrazellulären Proteinen

Die Untersuchung der HPV16 E5-Expression sowie der EGFR-Aktivierung und -Internalisierung erforderte zusätzlich zur Fixierung eine Permeabilisierung der geernteten Zellen. Zur Färbung intrazellulärer Proteine wurde das BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.4.9 Indirekte Immunfluoreszenz und konfokale Mikroskopie

Die indirekte Immunfluoreszenz (IF) erlaubt die Untersuchung der Expression und Lokalisation von Proteinen in der Zelle. Auch Interaktionen (Kolokalisationen) von verschiedenen Proteinen können analysiert werden. Zudem ist mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie eine quantitative 3D-Analyse von Zellen und ihren Bestandteilen möglich.

Um Aktivierung und Lokalisation von EGF-Rezeptoren in der Zelle untersuchen zu können, wurden transduzierte HeLa-Zellen auf runden Deckgläschen (Ø 12 mm) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach einer 16stündigen Inkubation im serum-freien Kulturmedium wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitperioden mit 50 ng/ml EGF stimuliert und anschließend zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Fixierlösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 1x PBS wurden die Zellen mit 50 mM Ammoniumchlorid in 1x PBS für 10 min bei Raumtemperatur behandelt. Dieser Schritt wurde zur Absättigung bzw. Inaktivierung der freien Aldehydgruppen durchgeführt. Die Zellen wurden erneut mit 1x PBS gewaschen und für 5 min mit Permeabilisierungslösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 0,3% BSA in 1x PBS in einer feuchten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Der Primärantikörper wurde in Blockpuffer verdünnt, auf einen Parafilm in einer feuchten Kammer getropft und die Zellen darauf über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Diesem Schritt schlossen sich wiederum drei Waschschritte in 1x PBS für je 5 min an. Die Detektion verschiedener Proteine erfolgte durch eine aufeinanderfolgende Inkubation mit der jeweiligen spezifischen Primärantikörperlösung und wurde durch dreimaliges Waschen in 1x PBS unterbrochen. Die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem

Sekundärantikörper (1:400 bis 1:600) und DAPI (1:800 zur DNA-Färbung) in Blockpuffer erfolgte ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Abschließend wurden die Deckgläschen für je 5 min dreimal in 1x PBS und einmal in Aqua bidest. gewaschen und in einem Tropfen Fluorprep auf einem Objektträger eingebettet. Durch Umrandung der Deckgläschen mit Nagellack konnte ein Austrocknen verhindert werden. Zur Überprüfung der Hintergrundsignalintensität wurden Zellen nur mit Sekundärantikörper und DAPI gefärbt. Die Objektträger konnten ohne Verlust der Fluoreszenzintensität für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

Zu Beginn der Arbeit wurde ein Teil der Aufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop SP5 von Leica in Zusammenarbeit mit H. Schmidt-Glenewinkel (Bioquant Heidelberg, AG R. Eils) durchgeführt und zur zwei-dimensionalen Analyse des EGF-EGFR-Transports herangezogen.

Zur quantitativen 3D-Analyse wurden Z-Stapel mit 0,15 bis 0,22 µm Abstand zwischen den einzelnen Z-Ebenen und einer Auflösung von 0,132 µm x 0,132 µm am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 von Zeiss bei 630facher Vergrößerung aufgenommen und in Kooperation mit dem Bioquant ausgewertet. Die Bildanalyse und Quantifizierung im 3D-Format wurde unter Verwendung der Cell Segmentation 3D Software von S. Wörz (Bioquant Heidelberg, AG K. Rohr) vorgenommen. Die Einstellungen für die einzelnen Kanäle setzten sich folgendermaßen zusammen:

Ch00 (Nukleus):

Rauschreduktion mit Median-Filter (3x3x3) und Gauss-Filter (Standardabweichung $\sigma = 1$)

Ch01 und Ch02 (Intrazelluläre Proteine):

Spotdetektion mit anisotropischem Spotverstärker-Filter (Laplace-Gauss $\sigma \sim 2/2/1$), gefolgt von Hintergrundabzug ($c = 1{,}7$) und der Suche nach dem lokalem Maximum (5x5x5 ROI)

Quantifizierung der Spots basiert auf Modellanpassung nach dem 3D Gauss-Intensitätsmodell

Geometrische Quantifizierung von Kolokalisationen:

Grundlage sind die quantifizierten und angepassten Spots der Kanäle Ch01 und Ch02

Arten:	c1	Zentrum des Spots 1 liegt im Zentrum des Spots 2
	c2	Partielle Überlappung von Spot 1 und 2

Die Normalisierung und Statistik der 3D-Analyse erfolgte durch G. Suryavanshi (Bioquant Heidelberg, Nachwuchsgruppe L. Kaderali).

3.4.10 In-Cell und On-Cell Western Blot (ICW bzw. OCW)

Bei einem *In-Cell Western Blot* handelt es sich um einen immunzytochemischen Assay, der im 96well-Format durchgeführt wird und unter Verwendung des Odyssey-Detektionssystems eine quantitative Analyse von Proteinen in ihrem zellulären Kontext erlaubt. Der *On-Cell Western Blot* ist eine leicht abgewandelte Form des ICW und ermöglicht die Färbung von Oberflächen-Proteinen.

Im Rahmen dieser Arbeit diente der ICW bzw.OCW als ein weiterer quantitativer Assay zur Unterstützung der quantifizierten Daten aus Immunblot-, FACS- und Mikroskopie-Analyse und ermöglicht aus einem experimentellen Ansatz große, reproduzierbare Datenmengen zu produzieren. Für einige Zelllinien liegen bereits etablierte Protokoll bei LI-COR Bioscience vor, an denen sich orientiert wurde.

HaCaT- und HeLa-Zellen wurden in eine 96well-Zellkulturplatte (22500 und 15000 Zellen pro Loch) ausgesät und für ca. 2-3 Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte am Tag der Behandlung von Loch zu Loch annähernd gleich war. Die Zellen wurden für 16 h in serum-freiem Kulturmedium inkubiert und anschließend mit EGF und den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen einmal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Wie bei der Immunfluoreszenz (3.4.9) wurden im ICW die freien Aldehydgruppen mit Ammoniumchlorid abgesättigt und die Zellen durch Tritonbehandlung permeabilisiert. Zwischen jedem Schritt wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen. Für den OCW wurde keine Absättigung der Aldehydgruppen und Permeabilisierung der Zellen durchgeführt, sondern direkt nach der Fixierung mit der Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen. Zur Blockierung wurde mit Blockpuffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls in Blockpuffer. In Abhängigkeit vom Antikörper wurde die

Inkubation mit Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Detektion von zwei verschiedenen Proteinen wurden die Zellen nacheinander mit dem Primärantikörper des entsprechenden Proteins inkubiert und zwischendurch dreimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS-T gewaschen und mit Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurden die Zellen für je 5 min fünfmal in 1x PBS-T und einmal in 1x PBS gewaschen. Der Waschpuffer wurde komplett entfernt und die 96well-Zellkulturplatte mittels Odyssey Infrared Imaging System bei entsprechender Wellenlänge detektiert.

Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls unter Nutzung der Odyssey Software (Version 2.0). Zum Abgleich der Signalintensität wurde eine Reihe der 96well-Platte nur mit Sekundärantikörper gefärbt. Für die Auswertung wurde diese durchschnittliche Hintergrundintensität von der durchschnittlichen Signalintensität des Proteins subtrahiert. Zur Normalisierung bzw. Relativierung der aktivierten EGF-Rezeptoren wurde die durchschnittliche Signalintensität des Gesamt-EGFR verwendet.

4. Ergebnisse

Bereits 1992 konnte durch Pim und Mitarbeiter gezeigt werden, dass HPV16 E5 in EGF-Rezeptor-überexprimierenden NIH3T3-Zellen eine Erhöhung der Zellproliferation in Gegenwart von EGF bewirkt. Zudem waren die HPV16 E5-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen sensitiver gegenüber niedrigen Liganden-konzentrationen. Möglicherweise verstärkt HPV16 E5 nach EGF-Behandlung durch Interaktion mit verschiedenen „*downstream*"-Signalmolekülen die mitogenen Signale des EGF-Rezeptors (Pim et al., 1992). Auch andere Gruppen konnten eine Überaktivierung der EGF vermittelten EGFR-Signaltransduktion durch HPV16 E5 nachweisen (Straight et al., 1993; Crusius et al., 1998, 2000). Da die molekularen Mechanismen dieser E5-vermittelten EGFR-Überaktivierung weitestgehend unbekannt sind, sollte diese Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung leisten. Dabei wurden folgende Fragestellungen berücksichtigt:

a) Hat HPV16 E5 Einfluss auf die Internalisierung von aktivierten EGF-Rezeptoren?

b) Ist der Effekt des Onkogens auf Veränderung im Recycling und Transport von Ligand und Rezeptor zurückzuführen?

c) Bewirkt E5 eine Verminderung der EGFR-Inaktivierung und -Degradation?

d) Existieren Interaktionspartner, die an einem oder mehreren der oben genannten Wirkungen teilhaben?

4.1 Einfluss des HPV16 E5-Proteins auf die EGF vermittelte EGFR-Signaltransduktion

Um die Effekte von E5 auf die Aktivierung des Rezeptors unter unseren experimentellen Bedingungen zu analysieren, wurde eine Reihe von Vorexperimenten durchgeführt. Primäre Keratinozyten wurden mit HPV16 E5 retroviral transduziert, die Aktivierung von EGFR und Erk1/2 analysiert und u.a. eine Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in Anwesenheit von HPV16 E5 festgestellt. Die Subkultivierung von

primären Keratinozyten ist auf ca. 15 Verdopplungszyklen begrenzt und zudem erweist sich das Einbringen von Fremd-DNA in diese Zellen als schwierig. Aus diesem Grund wurde auf HaCaT- und HeLa-Zellen zurückgegriffen, um die entsprechenden Experimente durchzuführen. HaCaT-Zellen sind spontan immortalisierte, HPV-negative Keratinozyten und ermöglichen den alleinigen Effekt von HPV16 E5 zu untersuchen. Pro Zelle weisen sie etwa $1x10^6$ EGF-Rezeptoren auf. HeLa-Zellen entstammen einem HPV18-positivem Zervix-Adenokarzinom, exprimieren nur die Onkogene E6 und E7 und ermöglichen die Funktion des E5-Proteins im Kontext einer HPV-Infektion zu analysieren. Sie besitzen jedoch ehrheblich weniger EGF-Rezeptoren, ca. $5x10^4$ pro Zelle.

4.1.1 Nachweis der HPV16 E5-Expression

Als Grundlage für die folgenden Untersuchungen wurde zunächst in HaCaT-Zellen die Transkription des HPV16 E5-Gens nach retroviraler Transduktion mittels RT-PCR überprüft. Die eGFP-, Leervektor- und HPV16 E5-transduzierte Zellen wurden 48 h, 96 h, 120 h und 144 h nach der 1. Transduktion geerntet und einer RNA-Extraktion unterzogen. Mit Hilfe reverser Transkriptasen und unter Verwendung von E5 spezifischen Primern wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und in einer direkt anschließenden PCR amplifiziert. Als Kontrolle wurde zusätzlich die RNA untransduzierter Zellen analysiert. Das Plasmid pCI-E5 wurde als Positivkontrolle für E5-DNA eingesetzt.

Wie in Abb. 4.1.1 gezeigt, konnte eine E5-spezifische Bande von ca. 270 bp nachgewiesen werden (Abb. 4.1.1, Spuren 11-12, 14-16 bzw. 20). Das bedeutet, die Zellen sind in der Lage E5-RNA zu exprimieren. In den eGFP- und Leervektor-transduzierten bzw. untransduzierten Zellen sowie der Negativkontrolle konnte keine E5-Bande detektiert werden (Abb. 4.1.1, Spuren 1-4, 6-10 bzw. 17-19).

Da es sich bei dem E5-Protein um ein hydrophobes Membranprotein handelt, existieren keine Antikörper, um E5 direkt nachweisen zu können. Zur Herstellung von retroviralen Überständen wurden $Phoenix_{ampho}$-Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert, die eine Expression von *tag*-E5-Fusionsproteinen und damit einen Nachweis ermöglichen.

Abb. 4.1.1 Nachweis der E5-Transkription mittels RT-PCR in HPV16 E5 retroviral transduzierten HaCaT-Zellen. Die Gesamt-RNA von Kontroll- und E5-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der 1. Transduktion wurde mit E5 spezifischen Primern in einer Ein-Schritt-RT-PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Zur Visualisierung des PCR-Produktes wurden 10 µl pro Probe in einem 1,7%igem TBE-Agarosegel aufgetrennt. Als Positivkontrolle fungierte die Plasmid-DNA pCI-E5, als Negativkontrolle wurde Aqua bidest. eingesetzt.

Zur Überprüfung der Transduktionseffizienz und E5-Proteinexpression wurde in HaCaT- und HeLa-Zellen nach Transduktion und mehrtägiger Selektion eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen geerntet, fixiert und intrazelluläres *tag*-E5 mit spezifischen Primärantikörpern gegen das entsprechende *tag* und den zugehörigen Sekundärantikörpern gefärbt. Mit Hilfe des FACS-Gerätes wurden ca. 10000 Zellen auf eGFP- und E5-Expression untersucht. Der positive Erfolg einer Transduktion bzw. die Expression des entsprechenden Proteins kann durch eine x-axiale Rechtsverschiebung der Zellpopulation im Vergleich zu ungefärbten Zellen verfolgt werden (Abb.4.1.2).

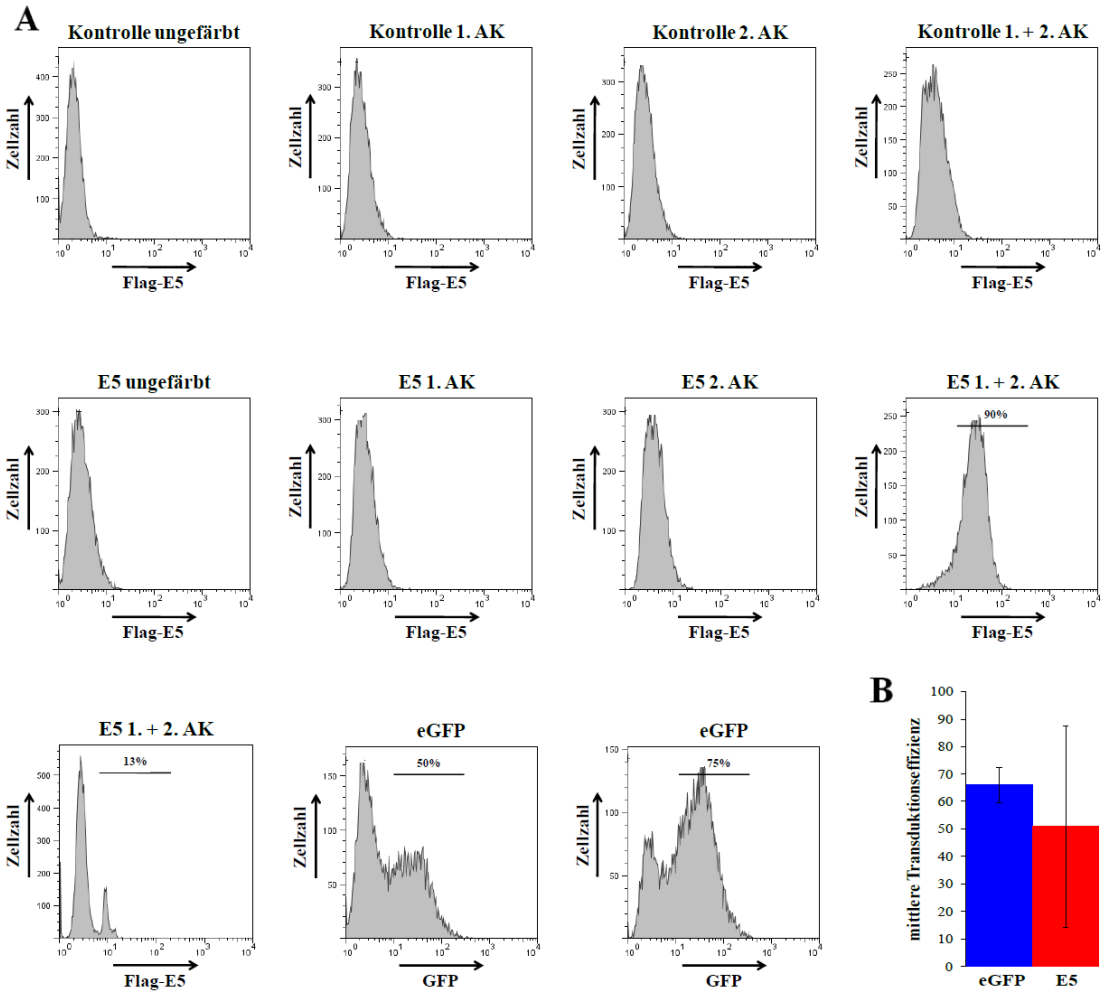


Abb. 4.1.2 FACS-Analyse in HaCaT-Zellen zur Kontrolle von Transduktionseffizienz und E5-Expression. Die Leervektor-, eGFP- und E5-transduzierten Zellen wurden nach Selektion geerntet, mit 3% PFA in 1x PBS fixiert und gegen das entsprechende *tag* des E5-Proteins gefärbt. **A:** Die Untersuchung der eGFP- und E5-Expression erfolgte am FACSCalibur oder am Cytomics FC500 MPL. **B:** Die mittlere Transduktionseffizienz wurde aus insgesamt sechs Replikaten berechnet.

Wie in Abb. 4.1.2 A zu sehen, wurde für HaCaT-Zellen nach eGFP- und E5-Transduktion eine deutliche Rechtsverschiebung im Vergleich zu Leervektor-transduzierten Zellen beobachtet (Histogramme Kontrolle, E5 1. + 2. AK bzw. eGFP). Diese Verschiebung erlaubte die Quantifizierung der positiv-transduzierten Zellen. Die mittlere Transduktionseffizienz aus zwei technischen mit jeweils drei biologischen Replikaten lag für eGFP bei 66% und für E5 bei 51% (Abb. 4.1.2 B).

In E5-transduzierten HeLa-Zellen konnte mit Hilfe der FACS-Analyse eine mittlere Transduktionseffizienz von ca. 40% nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Liganden-abhängige EGF-Rezeptorphosphorylierung

Experimentelle Ergebnisse haben gezeigt, dass die Expression von HPV16 E5 mit einer Zunahme der EGFR-Phosphorylierung bzw. -Aktivierung in Anwesenheit von EGF einhergeht (Straight et al., 1993; Crusius et al., 1998, 2000; Zhang et al., 2002). In wie weit andere Liganden wie Amphiregulin (AR), Heregulin (HRG) oder TGFalpha (TGFα) zu einer erhöhten Aktivierung von EGF-Rezeptoren führen, war bis heute unbekannt und wurde zunächst im Rahmen dieser Arbeit geprüft.
Retroviral transduzierte HaCaT-Zellen wurden nach mehrtägiger Selektion in serum-freies Kulturmedium überführt. Nach 16 h wurden die Zellen für verschiedene Zeitintervalle mit dem entsprechenden Liganden behandelt und Gesamtproteinextrakte hergestellt. In einem Immunblot wurde die Aktivierung des EGFR unter Verwendung von phospho-Tyrosin spezifischen Primärantikörpern (pY; 4G10) analysiert. Zur Berechnung der mittleren Intensität wurde zunächst die durchschnittliche Hintergrundintensität von der durchschnittlichen Signalintensität der Bande subtrahiert. Schließlich wurde der Mittelwert aus mindestens drei Replikaten errechnet und der dazugehörige Standardfehler bestimmt. Aus den mittleren Intensitäten des zeitlichen Verlaufs wurde eine approximierte Kurve erstellt (Abb. 4.1.3).

Die quantitative Immunblot-Analyse der Menge von aktiviertem und Gesamt-EGFR in EGF behandelten Zellen erfolgte anhand von fünf Experimenten und zeigte nach 15 und 30 min eine deutliche Phosphorylierung bzw. Aktivierung der EGF-Rezeptoren (Abb. 4.1.3 A, EGF). Die mittlere Intensität betrug in E5-exprimierenden Zellen (rot) nach 15 min etwa das 31fache, nach 30 min nur noch das 22fache von t_0. Die Kontroll-Zellen (blau) hingegen erreichten nach 15 min ein Phosphorylierungs-Level, dessen mittlere Intensität nur ca. das 20fache von t_0 aufwies. Jedoch zeigten sie einen ehrheblich geringeren Abfall zwischen t_{15} und t_{30}. Die mittlere Intensität nach 30 min betrug etwa das 16fache von t_0. Nach 120 minütiger EGF-Stimulation war die Intensität der Bande in beiden Zellpopulationen auffällig verringert und wies nur noch ein Drittel des Intensitätsmaximums bei t_{15} auf. In den E5-exprimierenden Zellen konnte nach EGF-Stimulation eine dauerhaft stärkere Rezeptoraktivierung (Überaktivierung) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die mittlere Intensität betrug im Durchschnitt etwa das 1,6fach der mittleren Intensität in Kontroll-Zellen.

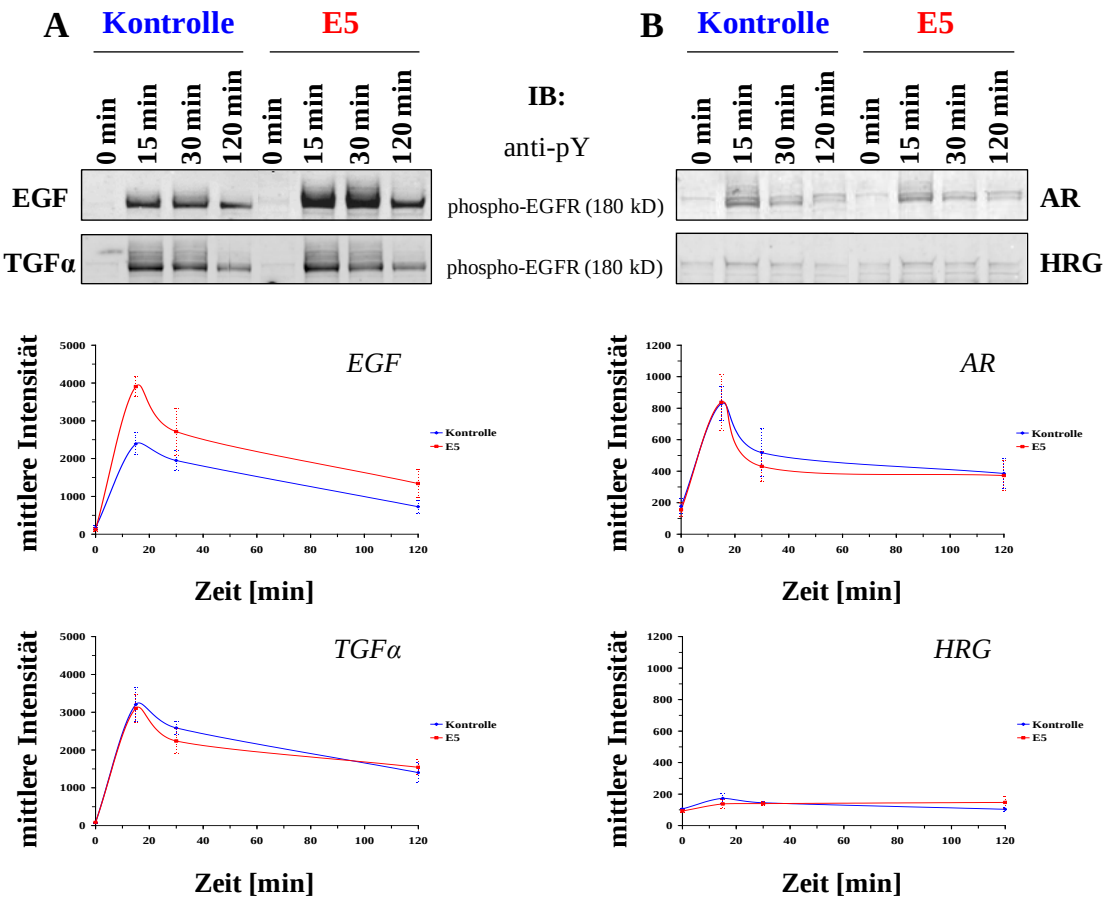


Abb. 4.1.3 Quantitative Immunblot-Analysen zur Aktivierung von EGFR in HaCaT-Zellen. Leervektor (Kontrolle)- und E5- transduzierte HaCaT-Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium mit **A:** EGF (100 ng/ml) oder TGFα (30 ng/ml), **B:** AR (57 ng/ml) bzw. HRG (75 ng/ml) für 15, 30 und 60 min behandelt und anschließend Gesamtproteinextrakte in 1% SDS hergestellt. Mittels SDS-PAGE wurden 20 µg der Proteine in einem 4-12%igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientengel aufgetrennt und ein Immunblot mit pY (4G10)-Antikörpern und IRDye680 konjugierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Detektion und Quantifizierung der Banden erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System. Die mittlere Signalintensität wurde für mindestens drei Replikate bestimmt.

Nach Stimulation mit den Liganden AR und TGFα konnte in drei unabhängigen Experimenten mittels Immunblot ebenfalls eine Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden, die sich für Kontroll-Zellen und E5-exprimierende Zellen kaum voneinander unterschied (Abb. 4.1.3 A, TGFα und B, AR). Sowohl für TGFα-, als auch für AR-stimulierte Zellen konnte nach 15 min die stärkste EGFR-Phosphorylierung beobachtet werden. Nach 120 min war nur noch eine schwache Bande im Immunblot sichtbar.

Die Behandlung mit TGFα in den Leervektor- und E5-transduzierte Zellen zeigte ähnliches Aktivierungsmuster wie die Kontroll-Zellen nach EGF-Stimulation (4.1.3 A).

Nach 15 min konnte ein Anstieg der mittleren Intensität um das 40fache von t_0, nach 30 minütiger TGFα-Behandlung noch etwa das 30fache von t_0, beobachtet werden (4.1.3 A, TGFα). Schließlich war in beiden Zellpopulationen nach 120 min die mittlere Intensität auf die Hälfte der mittleren Intensität des Zeitpunktes t_{15} gesunken.

Die Stimulation mit AR führte im Vergleich zur EGF- und TGFα-Behandlung sowohl in den Kontroll-Zellen, als auch in den E5-exprimierenden Zellen zu einer deutlich geringeren Aktivierung der EGF-Rezeptoren (4.1.3 B, AR). Beide Zellpopulationen wiesen nach 15 min ein Aktivitätsmaximum mit 4facher mittlerer Intensität zu t_0 auf. Bereits nach 30 min betrug die Intensität nur noch die Hälfte des Maximums.

Die Behandlung mit HRG zeichnete sich durch eine sehr schwache und konstante Rezeptoraktivierung aus (4.1.3 B, HRG). In beiden Zellpopulationen konnte über den zeitlichen Verlauf eine 1,5fache mittlere Intensität im Vergleich zu t_0 detektiert werden. Die Quantifizierung der Immunblots basierte auf drei Experimente.

Während in E5-exprimierenden Zellen nach EGF-Stimulation eine langandauernde Überaktivierung der EGF-Rezeptoren zu beobachten war, konnte nach AR-, HRG- und TGFα-Behandlungen keine veränderte EGFR-Aktivierung im Vergleich zu den Kontroll-Zellen nachgewiesen werden. Daraus resultiert, dass die Veränderungen der EGFR-Signaltransduktion in Anwesenheit von E5 im Zusammenhang mit der EGF-vermittelten Aktivierung von Rezeptoren und „downstream“-Signalmolekülen steht. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Experimente ausschließlich in EGF-behandelten Zellen durchgeführt.

4.1.3 Abhängigkeit der Rezeptoraktivierung von der Ligandenkonzentration

Wie in der Einleitung beschrieben erfolgt die Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren erst nach Bindung des Liganden an den Rezeptor, indem eine Konformationsänderung ausgelöst und dadurch die Kinase des Rezeptors aktiviert wird. Die EGF-Rezeptoren liegen nach der Ligandenbindung als Dimere vor. Dies ermöglicht den aktivierten Kinasen wiederum die Kreuzphosphorylierung der EGFR-Dimere an verschiedenen Tyrosinen, Serinen und Threoninen. Für die Aktivierung der Rezeptoren und der EGFR-Signalkaskade sind hauptsächlich die Tyrosine entscheidend. Aufgrund der Tatsache, dass die Rezeptoraktivierung eine enzymatisch gesteuerte Reaktion ist und die

Enzymkinetik einer Konzentrationsabhängigkeit unterliegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Abhängigkeit der Rezeptorphosphorylierung von der EGF-Konzentration untersucht.

Leervektor- und E5-transduzierte HaCaT-Zellen wurden nach 16 h im serum-freien Kulturmedium mit 25 ng/ml oder 150 ng/ml EGF für 5, 15, 30, 60 und 120 min behandelt. Der quantitative Immunblot wurde wie in 4.1.2 beschrieben durchgeführt und die Intensität der phospho-EGFR-Bande bestimmt.

Die Behandlung mit 25 ng/ml EGF zeigte in beiden Zellpopulationen nach 5 min mit einer Intensität von ca. 6000 pixels/mm^2 eine deutliche Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (Abb. 4.1.4 A). Die Intensität stieg im Verlauf der EGF-Stimulation weiter an. Während in den Kontroll-Zellen nach 30 minütiger EGF-Behandlung eine Sättigung der Intensität bzw. Phosphorylierung bei etwa 7000 pixels/mm^2 eingetreten war, konnte in den E5-exprimierenden Zellen erst nach 120 min bei ca. 8000 pixels/mm^2 eine Sättigung beobachtet werden. In den Kontrollen war zu diesem Zeitpunkt bereits eine leichte Abnahme der Intensität und EGFR-Phosphorylierung zu verzeichnen.

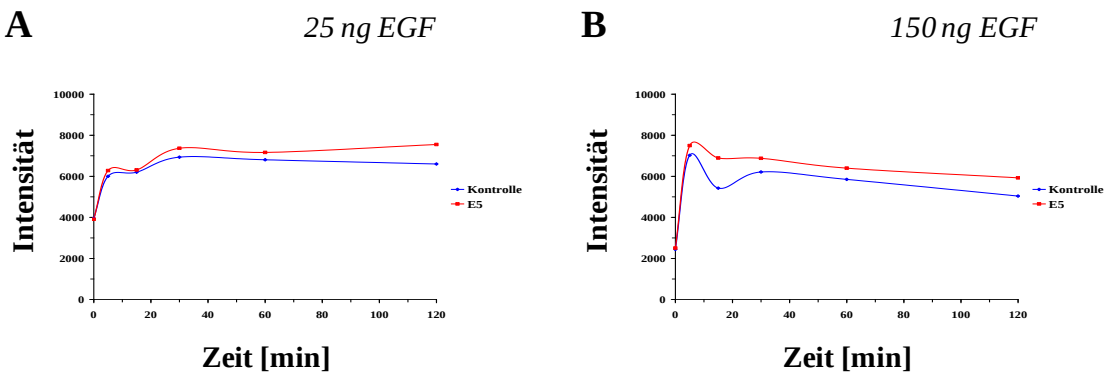


Abb. 4.1.4 Quantitatifizierung eines Immunblots zur Untersuchung der Abhängigkeit der EGFR-Phosphorylierung von der EGF-Konzentration. Leervektor- und E5-transduzierte HaCaT-Zellen wurden für 16 h mit serum-freiem Medium inkubiert und anschließend für 5, 15, 30, 60 und 120 min mit **A:** 25ng/ml bzw. **B:** 150 ng/ml EGF stimuliert. Gesamtproteinextrakte wurden gewonnen und 20 µg der Proteine in einem 4-12%igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientgel aufgetrennt. Die Immunblot-Analyse erfolgte unter Verwendung von pY-Primärantikörpern und IRDye680 konjugierten Sekundärantikörpern, um eine Detektion und Quantifizierung mit dem Odyssey Infrared Imaging System zu gewährleisten.

In den Zellen, die mit 150 ng/ml EGF stimuliert wurden, konnte in beiden Zellpopulationen bereits nach 5 min die maximale Intensität von fast 8000 pixels/mm^2 und damit eine Sättigung der EGFR-Phosphorylierung detektiert werden (Abb. 4.1.4 B). Nach 15 minütiger Behandlung war die Intensität in den Kontroll-Zellen auf ca. 5500 pixels/mm^2 gesunken, in den E5-exprimierenden Zellen nur auf etwa 7000 pixels/mm^2. Die Abnahme der Intensität setzte sich für beide Zellpopulationen im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation fort, jedoch erfolgte sie in den E5-exprimierenden Zellen langsamer. Eine Überaktivierung im Vergleich zur Kontrolle konnte noch nach 120 min nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse beweisen, dass durch die eingesetzte Menge von 25 ng/ml EGF in HaCaT-Zellen keine vollständige Aktivierung erreicht wurde, während 150 ng/ml EGF zu einer deutlichen Sättigung der EGFR-Phosphorylierung führte. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die EGFR-Überaktivierung in Anwesenheit von E5 unabhängig von der Konzentration des Liganden war. Daher wurde für weiterführenden Experimente in HaCaT-Zellen eine EGF-Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, in HeLa-Zellen hingegen 50 ng/ml.

4.1.4 Kinetische Analyse der Rezeptoraktivierung nach EGF-Stimulation

Die systembiologische Analyse von Signaltransduktionsprozessen erfordert eine genaue quantitative Untersuchung von Teilprozessen des komplexen Systems. Besonders interessant sind die dynamischen Interaktionen der einzelnen Komponenten. Zum besseren Verständnis der EGF vermittelten EGFR-Aktivierung wurden kinetische Analysen zur Quantifizierung von Rezeptorphosphorylierung sowie Oberflächen- und Gesamt-EGFR in Kontroll- und E5-exprimierenden Zellen mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze durchgeführt.

Zunächst wurden retroviral transduzierte und selektionierte HaCaT- und HeLa-Zellen nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium für 5, 10, 15, 30, 40, 50, 60 und 120 min mit EGF stimuliert und eine quantitative Immunblot-Analyse zuerst mit phospho-Tyrosin- und anschließend mit EGFR-spezifischen Primärantikörpern durchgeführt. Als Ladekontrolle diente Vinculin, ein 116 kD großes, zelluläres

Strukturprotein. Die Detektion und Quantifizierung der spezifischen Banden wurde mit dem Odyssey Infrared Imaging System durchgeführt (Abschnitt 3.4.6). In HaCaT-Zellen wurde die mittlere Intensität für phospho-EGFR und Gesamt-EGFR wie in 4.1.2 beschrieben aus acht Experimenten ermittelt. Zur Bestimmung der mittleren Intensität in HeLa-Zellen wurden vier Experimente herangezogen.

Wie aus den Daten in Abbildung 4.1.5 hervorgeht, konnten in allen untersuchten Ansätzen eine EGFR-Phosphorylierung nach EGF-Stimulation nachgewiesen werden. In den E5-exprimierenden HaCaT- (Abb. 4.1.5 A) und HeLa-Zellen (Abb. 4.1.5 D) wurde bereits nach 5 min eine ehrheblich stärkere Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontroll-Zellen beobachtet, die über dem gesamten Zeitraum der EGF-Behandlung nachweisbar war. Während das Aktivitäts- bzw. Intensitätsmaximum in HaCaT-Zellen erst nach 15 minütiger EGF-Stimulation vorzufinden war, wurde in den HeLa-Zellen die maximale Aktivität und mittlere Intensität nach 5 min detektiert. Nach 120 min betrug die mittlere Intensität in HeLa-Zellen nur noch die Hälfte des Intensitätsmaximums. In HaCaT-Zellen hingegen war die mittlere Intensität um ein Drittel der maximalen Intensität reduziert.

Dieselbe Membran zur Bestimmung der EGFR-Phosphorylierung wurde auch zur quantitativen Immunblot-Analyse von Gesamt-EGFR verwendet (Abb.4.1.5 B und E). Das Proteinlevel an Gesamt-EGFR war sowohl in HaCaT- (Abb. 4.1.5 B), als auch HeLa-Zellen (4.1.5 E) für beide Zellpopulationen annähernd gleich und im zeitlichen Verlauf der EGF-Behandlung weitestgehend konstant.
Weiterhin auffällig ist die deutlich geringere mittlere Intensität für Gesamt-EGFR in HeLa-Zellen (Abb. 4.1.5 E) im Vergleich zu den HaCaT-Zellen (Abb. 4.1.5 B). Zurückzuführen ist diese Beobachtung auf die um den Faktor 20 geringere Anzahl an EGF-Rezeptoren in HeLa-Zellen.

Um die Daten der phosphorylierten EGF-Rezeptoren zu normalisieren, wurden die mittleren Intensitäten der Gesamt-EGFR herangezogen. Die mittlere relative Intensität des jeweiligen Zeitpunktes (t) ergab sich folgendermaßen:

$$\textbf{mittlere relative Intensität}_t\ [\%] = \frac{\text{mittlere Intensität [phospho-EGFR]}_t \times 100\%}{\text{mittlere Intensität [Gesamt-EGFR]}_t}$$

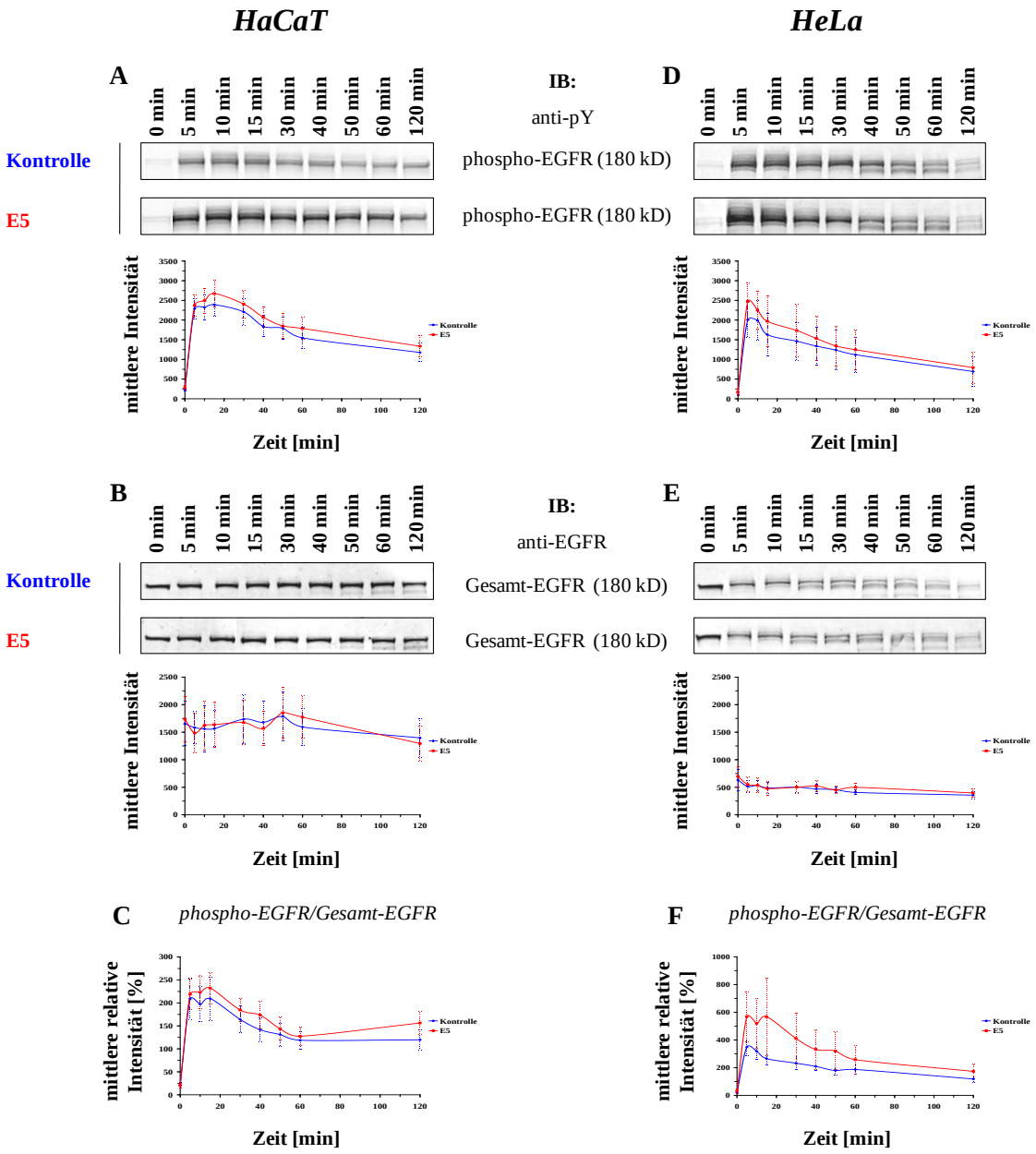


Abb. 4.1.5 Quantitativer Immunblot zur kinetischen Analyse der EGFR-Aktivierung in A-C: HaCaT-Zellen und D-F: HeLa-Zellen. Retroviral transduzierte Zellen wurden nach mehrtägiger Selektion für 16 Stunden in serum-freies Kulturmedium überführt und anschließend für 5, 10, 15, 30, 40, 50, 60 und 120 min mit EGF stimuliert. Die Gesamtproteinextraktion erfolgte in M-PER-Puffer. Zur Immunblot-Analyse wurden 20 µg Protein in einem 4-12%igem NuPAGE Novex Bis-Tris Gradientengel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Unter Einsatz von pY (4G10)- und EGFR-Antikörpern und den entsprechenden IRDye konjugierten Sekundärantikörpern wurden phospho-EGFR (**A** und **D**) und Gesamt-EGFR (**B** und **E**) mittels Odyssey Infrared Imaging System detekiert und die mittlere Signalintensität aus acht (**A-C**) bzw. vier (**D-F**) Replikaten bestimmt. Die mittlere relative Intensität spiegelt das Verhältnis von phosphoryliertem EGFR zu Gesamt-EGFR wider und ist in Prozent angegeben (**C** und **F**).

Aus den einzelnen Experimenten wurde für den jeweiligen Zeitpunkt ebenfalls der Mittelwert und Standardfehler berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 4.1.5 C und F). In HaCaT- und HeLa-Zellen konnte für die E5-exprimierenden Zellen eine dauerhafte Erhöhung der mittleren relativen Intensität im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 4.1.5 C und E).
Das Verhältnis aktivierter zu Gesamt-EGFR war über den Zeitraum der EGF-Behandlung in E5-exprimierenden HaCaT-Zellen um das 1,1 bis 1,3fache größer als in den Leervektor-transduzierten Zellen (Abb. 4.1.5 C). Zu den Zeitpunkten t_{10} und t_{40} konnten die größten Abweichungen zur Kontrolle festgestellt werden.
Deutlicher wurden die Unterschiede zwischen E5- und Leervektor-transduzierten HeLa-Zellen (Abb. 4.1.5 E). Zu Beginn der EGF-Stimulation zeigten die E5-exprimierenden Zellen ein etwa 1,6fach stärkeres Phosphorylierungslevel. Nach 15 min stieg die mittlere relative Intensität im Vergleich zur Kontrolle sogar auf das 2,1fache an. Im weiteren Verlauf der Stimulationsreihe konnten 1,6 bis 1,8fache mittlere relative Intensitäten ermittelt werden. Zu den Zeitpunkten t_{60} und t_{120} war sie immer noch 1,4-mal so groß.

Die Bestimmung der mittleren relativen Intensität ergab Werte größer als 100%. Zurückzuführen ist das, auf die ehrheblich größeren mittleren Intensitäten für phospho-EGFR gegenüber Gesamt-EGFR. Das Odyssey Infrared Imaging System ermöglicht eine Zweifarben-Detektion, d.h. verschiedene Antigene können in einem und demselben Immunblot durch gleichzeitige oder aufeinanderfolgende Inkubation mit unterschiedlich IRDye-konjugierten Sekundärantikörpern nachgewiesen werden. Die Detektion von phospho- und Gesamt-EGFR wurde auf diese Weise durchgeführt. Die verwendeten IRDye680- und IRDye800CW-konjugierten Sekundärantikörper wiesen jedoch unterschiedliche Hintergrund- und Signalintensitäten auf. Zudem ist bekannt, dass die eingesetzten Primärantikörper zum Nachweis von phospho- und Gesamt-EGFR unterschiedliche Bindungsaffinitäten besitzen. Der Antikörper gegen phospho-Tyrosin zeigte eine deutlich höhere Affinität zur Bindung des Antigens als der Antikörper gegen Gesamt-EGFR.

Ein neuer Ansatz zur Erforschung von Signaltransduktionsprozessen in ihrem zellulären Kontext stellt der In-Cell bzw. On-Cell Western Blot dar. Durch diese alternativen Methoden können Problemen bezüglich Löschlichkeit oder Extrahierbarkeit der

verschiedenen Prorteinen umgangen werden. Dieser zellbasierte Assay, der in der Regel im 96well-Format durchgeführt wird, ermöglicht die Analyse unter verschiedenen experimentellen Bedingungen im Hochdurchsatzverfahren. Zur Untersuchung der EGFR-Aktivierung wurden retroviral transduzierte HaCaT-Zellen für 16 h in serum-freies Kulturmedium überführt und danach für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min einer EGF-Stimulation unterzogen. Die fixierten Zellen wurden anschließend entweder mit Triton permeabilisiert und bezüglich EGFR-Phosphorylierung untersucht (ICW) oder ohne Permeabilisierung quantitativ auf Oberflächen-EGFR analysiert (OCW). Zur Normalisierung erfolgte die Färbung von Gesamt-EGFR, dazu wurden die Zellen des OCW nachträglich permeabilisiert. Die Detektion und Analyse wurde mit dem Odyssey Infrared Imaging System durchgeführt und die mittleren Intensitäten für phospho-, Oberflächen- und Gesamt-EGFR bestimmt. Die mittlere relative Intensität wurde wie oben beschrieben errechnet.

Die Resultate aus vier biologischen Replikaten sind in Abb. 4.1.6 dargestellt und zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine ehrhebliche Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in E5-exprimierenden Zellen (Abb. 4.1.6 A). Die mittlere Intensität für phospho-EGFR betrug im Verlauf der EGF-Behandlung 10-20% mehr als die mittlere Intensität in Leervektor-transduzierten Zellen. Hingegen konnte für Gesamt-EGFR ein annähernd gleiches Level in Kontroll- und E5-Zellen beobachtet werden, dass sich maximal um 6% voneinander unterschied (Abb. 4.1.6 B).

Nach der Normalisierung von phospho-EGFR gegen Gesamt-EGFR fiel auf, dass die EGFR-Aktivierung in E5-exprimierenden Zellen bereits zum Zeitpunkt t_0 deutlich erhöht war (Abb. 4.1.6 C). Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass HPV16 E5 seit mindestens einer Woche seine onkogene Wirkung auf die Zellen ausüben und die EGFR-Aktivierung beeinflussen konnte. Mit Ausnahme des Zeitpunktes t_{120} konnte im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen eine langanhaltend stärkere Rezeptoraktivität der E5-exprimierenden Zellen dokumentiert werden. Die größten Differenzen waren zu den Zeitpunkten t_2, t_5 und t_{30} nachweisbar.

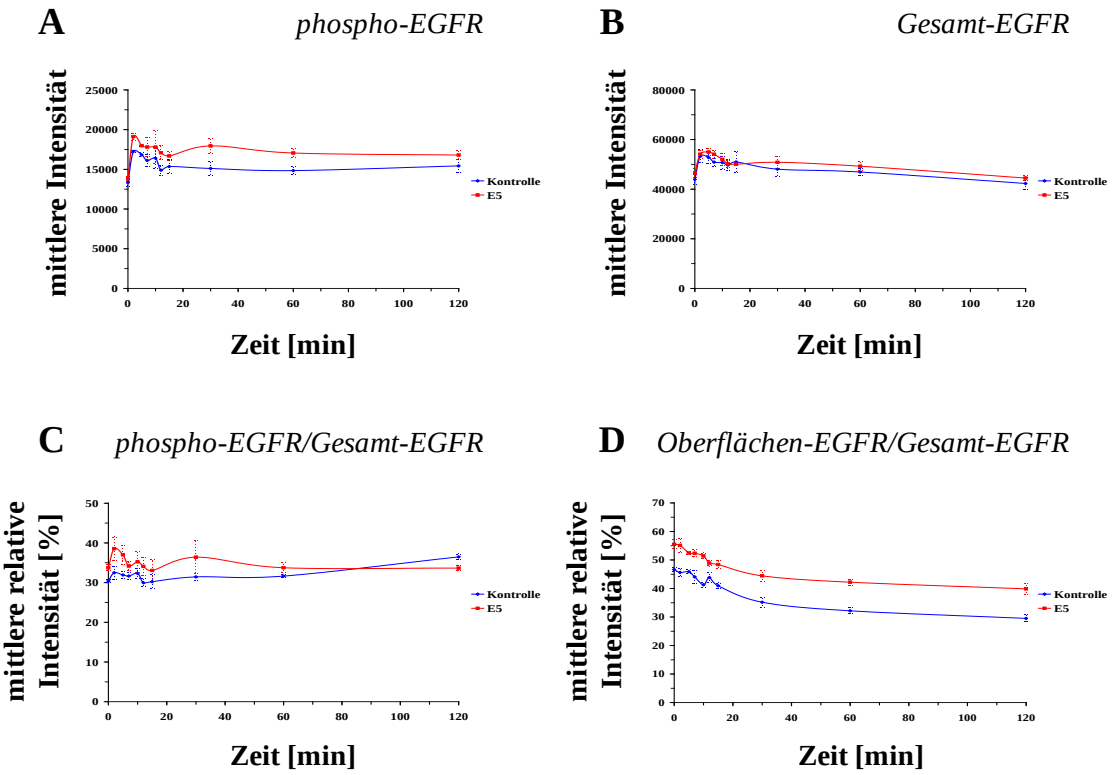


Abb. 4.1.6 Quantifizierung von In-Cell und On-Cell Western Blot zur Untersuchung von EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach EGF-Behandlung in HaCaT-Zellen. Leervektor- und E5-transduzierte HaCaT-Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium mit 100 ng/ml EGF für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min behandelt und anschließend mit 3% PFA fixiert. Unter Verwendung von phospho-EGFR (Tyr1086) und EGFR (R1) spezifischen Antikörpern folgte entweder ein In-Cell Western Blot (**A-C**) zur Quantifizierung von phospho- und Gesamt-EGFR oder ein On-Cell Western Blot (**D**) zur quantitativen Analyse der Oberflächen-EGFR. Die Detektion und Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit dem Odyssey Infrared Imaging System. Die mittlere Intensität wurde anhand von vier biologischen Replikaten bestimmt.

Die Analyse der Oberflächen-Rezeptoren zur Überprüfung der Intenalisierung zeigte über den gesamten Stimulationszeitraum ein signifikant größeres Verhältnis von Oberflächen- zu Gesamt-EGFR in Anwesenheit von HPV16 E5 (Abb. 4.1.6 D). Im Vergleich zur Kontrolle betrug die mittlere relative Intensität in den E5-exprimierenden Zellen das 1,2 bis 1,3fache. Die Kinetik der beiden Zellpopulationen hingegen war nahezu identisch. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass HPV16 E5 keinen Einfluss auf die Internalisierung des Rezeptors hat.

Um die vorherigen Experimente zu untermauern, haben wir Durchflusszytometrie-Analysen (FACS) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen, kann

man Oberflächen-, Gesamt- oder aktivierte Rezeptoren unter *in-situ* Bedingungen nachweisen. Leervektor- und E5-transduzierte HeLa-Zellen wurden nach Inkubation im serum-freien Kulturmedium einer EGF-Behandlung unterzogen und geerntet. Anschließend erfolgte eine Doppelfärbung zum Nachweis von phospho-EGFR und AU1-16E5 bzw. Gesamt-EGFR und AU1-16E5.

Die Untersuchung der EGFR-Aktivierung und Gesamt-EGFR-Menge in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen zeigte keine Überaktivierung der Rezeptoren oder Veränderungen der absoluten Mengen an EGF-Rezeptoren vor oder nach der Behandlung mit EGF durch HPV16 E5 (Abb. 4.1.7 A und B). Grund dafür war möglicherweise eine niedrige Transduktionseffizienz von 30%. Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine zusätzliche Färbung mit AU1 durchgeführt. Dadurch bestand die Möglichkeit E5-positive von E5-negativen Zellen im FACS zu differenzieren und bezüglich phospho- und Gesamt-EGFR zu analysieren. Die Messung ergab eine signifikante EGFR-Überaktivierung in den E5 positiven Zellen, während die E5 negativen Zellen das gleiche Phosphorylierungsmuster wie die Kontrollen aufwiesen (Abb. 4.1.7 C). In den E5-positiven Zellen konnte in dem ersten Drittel der Stimulationsreihe eine bis zu 1,4fach größere mittlere Intensität beobachtet werden als in den Kontrollen oder E5 negativen Zellen. Im weiteren Verlauf der EGF-Behandlung betrug die mittlere Intensität in Anwesenheit von HPV16 E5 das 1,3fache. In dem Zeitraum zwischen t_{15} und t_{120} belief sich die mittlere Intensität in den E5-exprimierenden Zellen auf das 1,2fache der Leervektor-exprimierenden Zellen.

In Abb. 4.1.7 D sind die Ergebnisse zur Untersuchung von Gesamt-EGFR in Kontroll-, E5-negativen und E5-positiven Zellen dargestellt. In den E5-positiven Zellen konnte über den gesamten Stimulationszeitraum eine deutliche Erhöhung der absoluten Menge an EGF-Rezeptoren dokumentiert werden. Im Vergleich zur Kontrolle und den E5 negativen Zellen wurde im Durchschnitt eine 1,4fach größere mittlere Intensität festgestellt. Dies lässt vermuten, dass die erhöhte Intensität der phospho-EGFR nicht durch eine verstärkte Phosphorylierung bzw. Aktivierung des Rezeptors an sich verursacht wird, sondern auf die Zunahme der Gesamt-EGFR-Menge in E5-transduzierten Zellen zurückzuführen ist, die infolge von EGF schließlich aktiviert werden können.

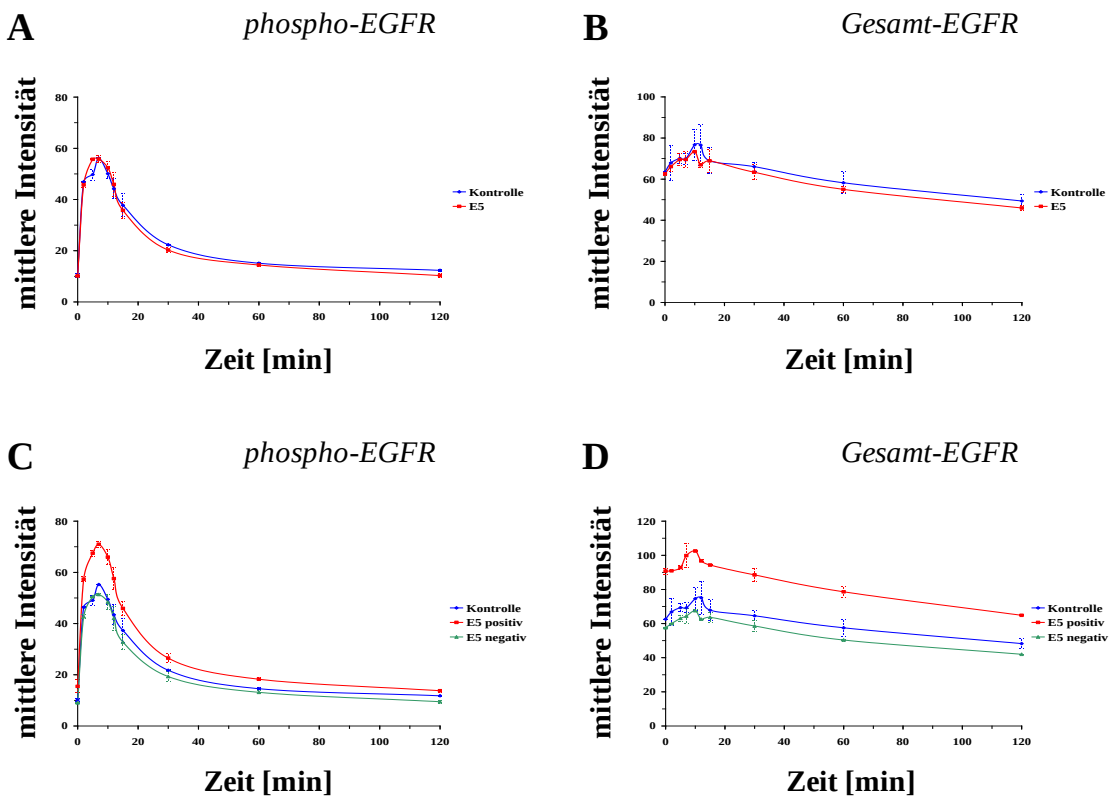


Abb. 4.1.7 Quantitative Durchflusszytometrie zur Analyse der phospho- und Gesamt-EGFR-Level. Retroviral transduzierte HeLa-Zellen wurden für 16 h in serum-freies Medium überführt, anschließend mit 50 ng/ml EGF für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min stimuliert und die Zellen geerntet. Die Färbung von intrazellulären Proteinen erfolgte mit Hilfe des BD Cytofix/Cytoperm Fixation/ Permeabilization Kits unter Verwendung von phospho- EGFR (Tyr1068) und EGFR (R1) spezifischen Antikörpern. Zur Untersuchung der Proteinlevel von phospho- und Gesamt-EGFR in Leervektor- und E5-exprimierenden Zellen wurde zusätzlich eine AU1-Färbung durchgeführt, um E5 positive von E5 negativen Zellen zu unterscheiden. Die Zellen wurden am Cytomics FC500 MPL vermessen und die Daten mit der CXP-Analysis Software ausgewertet. Die mittlere Intensität wurde aus zwei biologischen Replikaten berechnet. **A:** Nachweis von phospho-EGFR in Leervektor und E5 transduzierten Zellen. **B:** Analyse von Gesamt-EGFR in Leervektor und E5 transduzierten Zellen. **C:** Bestimmung des phospho-EGFR-Levels in Kontroll-Zellen sowie E5 negativen und E5 positiven HeLa-Zellen. **D:** Quantitative Untersuchung von Gesamt-EGFR in Kontrolle, E5 negativen und E5 positiven Zellen.

4.1.5 Transport und Lokalisation des EGFR nach Aktivierung mit EGF

Zur Untersuchung des endozytotischen Transports von EGF-Rezeptoren wurden 3D-Bilder mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie erstellt und unter Verwendung einer automatisierten Bildanalyse-Software quantifiziert werden. Die Mikroskopie-Analyse ermöglicht somit nicht nur die Bestimmung der Lokalisation von Rezeptoren in der Zelle, sondern gleichzeitig auch deren Aktivierung. Anhand der Größe und Intensität

der Vesikel sowie deren Distanz zum Nukleus wurden die Endozytose von aktiviertem und Gesamt-EGFR charakterisiert.

Um sich zunächst einen Überblick über den zellulären Transport von Ligand und Rezeptor verschaffen zu können, wurden Leervektor- und E5-transduzierte HaCaT-EGFR-eGFP-Zellen nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium mit Rhodamin-gekoppeltem EGF für 5, 10, 15, 30, 40, 50 und 60 min behandelt und anschließend fixiert. Die Bildanalyse erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop SP5 von Leica.
In Abb. 4.1.8 ist die mittlere Z-Ebene für Kontroll- und E5-Zellen dargestellt. In den unbehandelten Zellen (t_0) beider Populationen beschränkte sich die Lokalisation des EGF-Rezeptors vorwiegend auf die Plasmamembran bzw. intrazelluläre Regionen nahe der Plasmamembran. Nach 5 minütiger EGF-Stimulation konzentrierten sich Ligand und Rezeptor vorwiegend an der Plasmamembran. In beiden Zellpopulationen konnte eine starke Rezeptoraktivierung, d.h. eine starke Kolokalisation von EGF und EGFR, an der Plasmamembran beobachtet werden. In den E5-exprimierenden Zellen zeigten sich zudem Vesikel mit aktivierten Rezeptoren, die bereits begannen zu internalisieren. In den Kontrollen konnte eine Internalisierung von EGF-EGFR-Komplexen erst nach 10 min festgestellt werden. Das lässt vermuten, dass die Internalisierung in E5-Zellen verglichen mit den Kontrollen bereits von Beginn der EGF-Stimulation an modifiziert ist. Während die Kontroll-Zellen teilweise noch starke Kolokalisationen von Ligand und Rezeptor an der Plasmamembran aufwiesen, waren die aktivierten Rezeptoren in den E5-transduzierten Zellen zum Zeitpunkt t_{10} nahezu komplett internalisiert. Zudem begannen die Vesikel an Größe zuzunehmen, während sie in den Leervektor-transduzierten Zellen relativ klein und stark in der Zelle zerstreut waren. Nach 15 minütiger Stimulation zeigten sich gravierende Unterschiede bezüglich Anzahl, Größe und Verteilung von Vesikeln mit aktivierten Rezeptoren in Kontroll- und E5-Zellen. In letzteren konnte eine größere Anzahl an Vesikeln enormer Größe beobachtet werden, die sich relativ nah zum Nukleus aufhielten. In den Kontrollen hingegen beschränkte sich die Kolokalisation von EGF-EGFR-Komplexen weiterhin auf die Plasmamembran und deren nahe Umgebung. Die Anzahl der Vesikel war deutlich kleiner und von geringerer Größe.

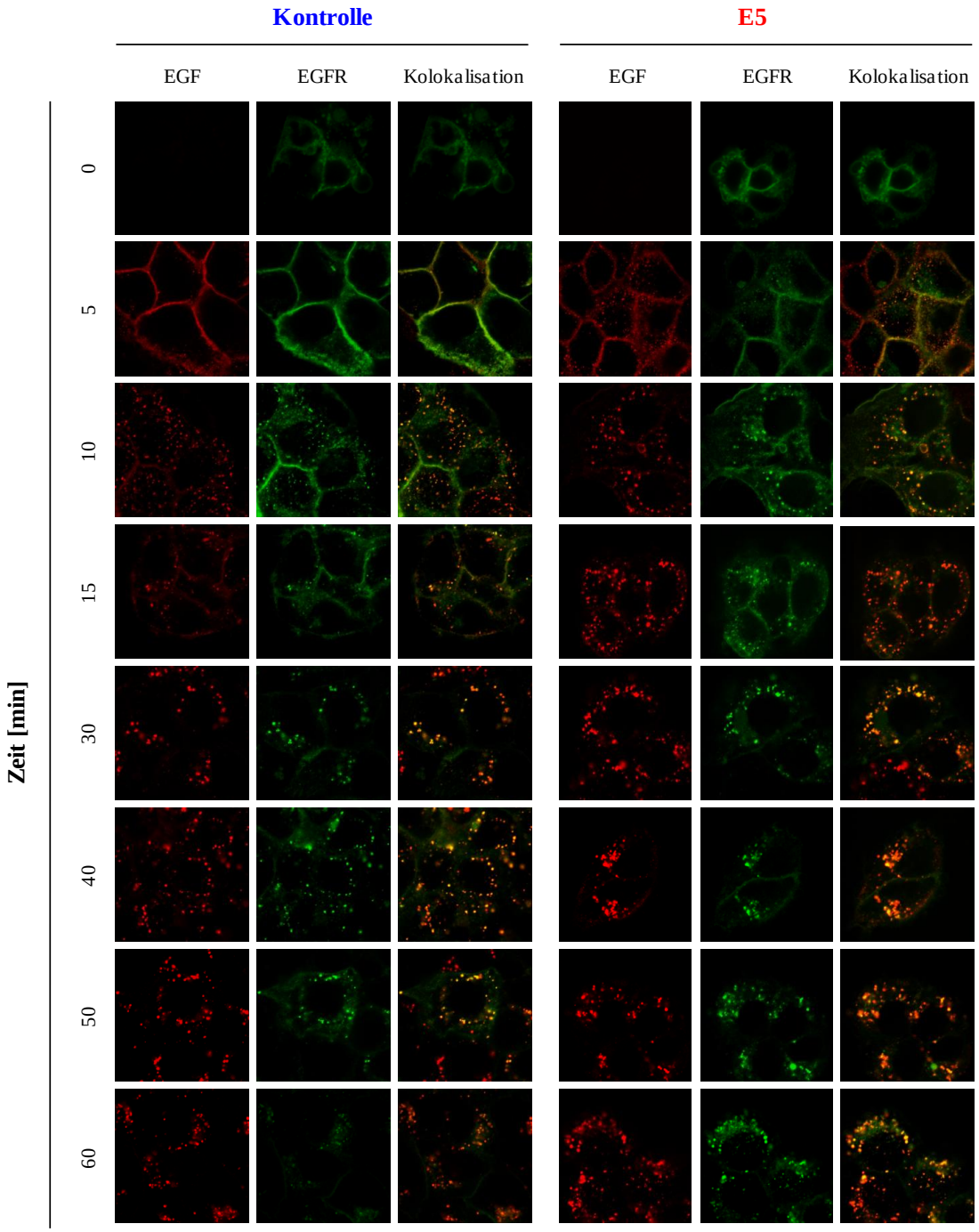


Abb. 4.1.8 Internalisierung und intrazellulärer Transport von EGF und EGFR in HaCaT-Zellen. Stabil EGFR-eGFP-exprimierende HaCaT-Zellen wurden retroviral transduziert und für mehrere Tage selektioniert. Die Leervektor- und E5-transduzierten Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium mit 100 ng/ml Rhodamin konjugiertem EGF für die aufgeführten Zeitintervalle behandelt und schließlich mit 3% PFA fixiert. Die Aufnahmen wurden am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop SP5 von Leica aufgenommen. Die hier dargestellten Bilder zeigen die mittlere Z-Ebene der Zelle.

Erst nach 30 min konnte eine Größenzunahme der Vesikel mit EGF-EGFR-Komplexen dokumentiert werden. Dennoch waren in den E5-exprimierenden Zellen ehrheblich mehr Vesikel nachweisbar, die weiter miteinander fusionierten. Die Fusion von Vesikeln aktivierter Rezeptoren erreichte ihren Höhepunkt zum Zeitpunkt t_{40}. In den E5-exprimierenden Zellen wurden große Cluster in unmittelbarer Nähe zum Nukleus beobachtet. Währenddessen waren die Vesikel in den Kontroll-Zellen nach 40 und 50minütiger EGF-Behandlung sehr zerstreut, befanden sich aber auch in Kernnähe. Nach 60 min zeigte sich in den Leervektor-transduzierten Zellen eine deutliche Reduktion der Vesikel, die eine Kolokalisation von Ligand und Rezeptor aufweisen. In den E5-Zellen konnte nach 50 und 60 min der EGF-Behandlung noch eine äußerst große Anzahl an Vesikeln mit aktivierten Rezeptoren festgestellt werden, die sich in Kernnähe als Cluster formierten.

Mit der Kolokalisation von EGF und EGFR konnte nur indirekt eine Aussage zur Rezeptoraktivierung getroffen werden, daher wurden zusätzlich Doppel-immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis von phospho- und Gesamt-EGFR durchgeführt. Am Besten für Immunfluoreszenzen geeignet waren HeLa-Zellen. Sie zeigten in der Doppelfärbung sowohl für phospho-EGFR, als auch Gesamt-EGFR gut detektierbare und spezifische Signale. Zudem konnte so die Funktion des HPV16 E5-Proteins im Kontext einer HPV-Infektion und unter Einfluss der Onkogene E6 und E7 untersucht werden.

Retroviral transduzierte HeLa-Zellen wurden nach mehrtägiger Selektion auf Deckgläschen in 6well-Zellkulturplatten ausgesät und bei 80%iger Konfluenz für 16 h in serum-freies Kulturmedium überführt. Schließlich wurden sie für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30 und 60 min mit 50 ng/ml EGF behandelt und in 3% PFA fixiert. Danach wurden die Zellen mit Triton permeablisiert und unter Verwendung von phospho- und Gesamt-EGFR spezifischen Antikörpern (Tyr1068 und R1) gefärbt. Zusätzlich wurde der Nukleus durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die 3D-Aufnahmen wurden am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 von Zeiss durchgeführt. Die Bildanalyse erfolgte wie in Abschnitt 3.4.9 beschrieben in Kooperation mit Dr. S. Wörz (Wörz et al., 2010).

Eine Abfolge ist in Abb. 4.1.9 dargestellt. Die Aufnahmen der gefärbten Zellen erfolgten schichtweise in 0,15 bis 0,22 µm Abstand für jeden Kanal separat (Ch00: Nukleus, Ch01: EGFR, Ch02: phospho-EGFR). Für jeden Kanal wurden Anzahl, Volumen und Summe der Intensitäten der detektierten Vesikel bestimmt. Zusätzlich wurde der Abstand zur Kernmembran gemessen und für die Kanäle Ch01 und Ch02 Vesikel bestimmt, die miteinander kolokalisieren (Abschnitt 3.4.9).

Für die ursprünglichen Bilder (Abb. 4.1.9 A-C) wurde eine an den Kanal individuell angepasste Segmentierung vorgenommen (Abb. 4.1.9 F-G) und der Mittelpunkt für die Z-Ebene der detektierten Vesikel ermittelt (Abb. 4.1.9 J-K). Je größer das schwarze Quadrat, desto näher am Vesikel-Zentrum. Zusätzlich wurden elliptische Konturen und der xy-Mittelpunkt nach Gauß bestimmt (Abb. 4.1.9 N-O).

Die Markierung der Vesikelkonturen und der Mittelpunkte diente zur Volumenbestimmung der Vesikel. Zudem waren die xy- und z-Mittelpunkte für die Ermittlung der Distanz und Kolokalisationsstudien von Bedeutung. Zur Distanzbestimmung wurden zunächst die Randlinien des Nukleus charakterisiert (Abb. 4.1.9 E). Anschließend erfolgte die Erstellung eines Binär- und Voronoi-Bildes (Abb. 4.1.9 I). Die Binär-Darstellung diente dem Abgleich von Vorder- und Hintergrund. Das Voronoi-Bild wurde zur Zerlegung des Raumes angewandt. Jeder Pixel wurde dem am nächsten liegenden Zellkern zugeordnet.

In Bezug auf die Distanzbestimmungen wurde eine Distanztransformation durchgeführt (Abb. 4.1.9 M). Diese Operation diente der Segmentierung und Separation der Zelle. Pixel mit gleicher Distanz zum nächsten nullwertiges Pixel (Randlinie des Nukleus) befinden sich auf einer Linie, die sich elliptisch oder kreisförmig um den Zellkern zieht.

In Abb. 4.1.9 D und H sind die Überlappungen der drei Kanäle als maximale Intensitätsprojektion oder durch die mittlere Zellschicht dargestellt. Eine 3D-Ansicht zeigt die Abb. 4.1.9 L. Die Kolokalisationsbereiche, die durch zentrale oder partielle Überlappung der Vesikel von Ch01 und Ch02 zustande kamen, sind in der Abb. 4.1.9 P aufgeführt.

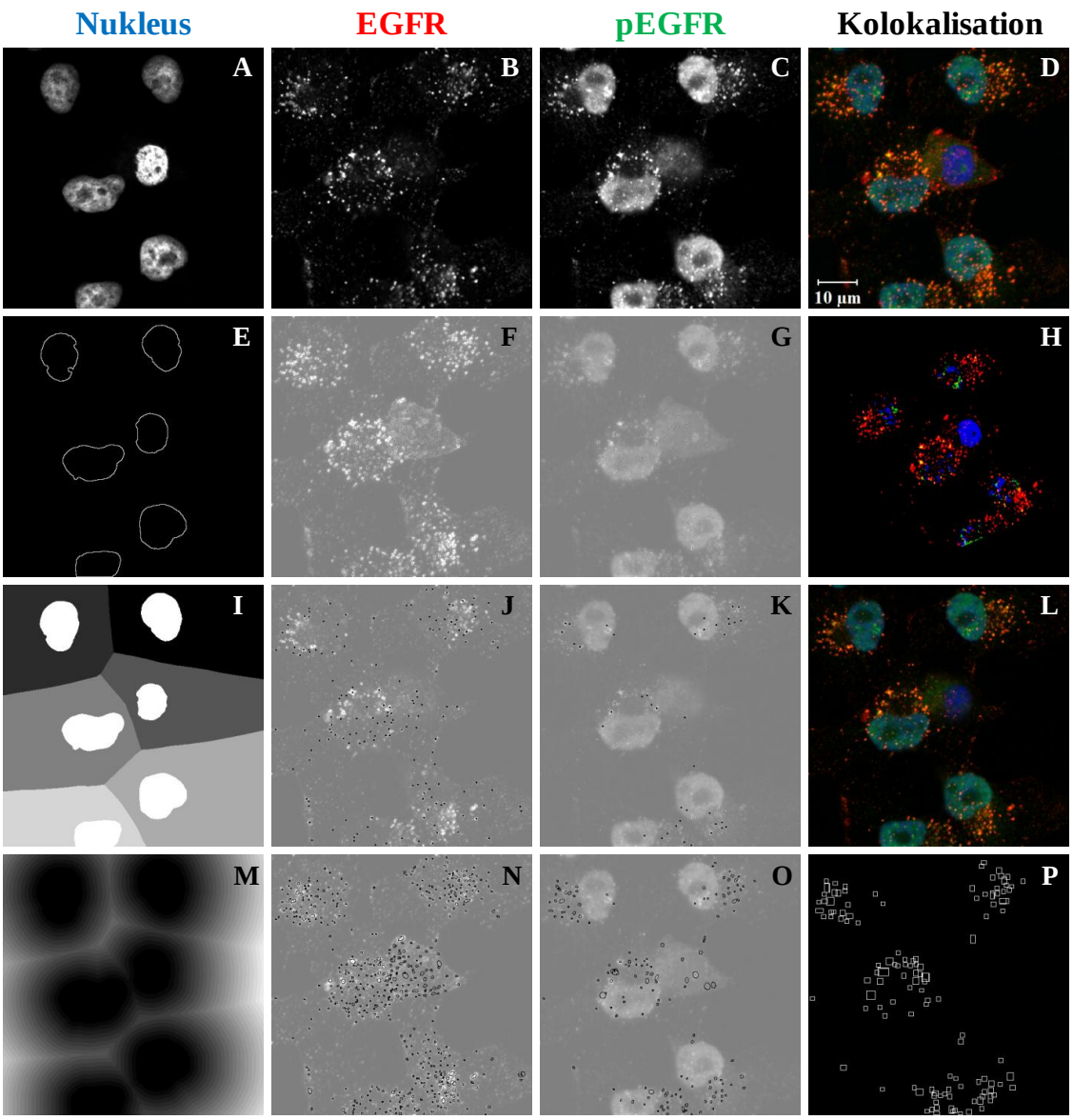


Abb. 4.1.9 Beispielhafte Darstellung zur Abfolge der 3D-Bildanalyse. Für die drei-dimensionale Bildanalyse wurden Doppelimmunfluoreszenzen (Protein 1; Protein 2) mit zusätzlicher Färbung des Nukleus durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten in Schichten mit 0,15 µm Abstand und für jeden Kanal separat. **A-C:** Maximale Intensitätsprojektion (MIP) der Ausgangsbilder für die verschiedenen Kanäle **D:** MIP der Überlappung aller drei Kanäle **E:** Äußere Randlinien der Zellkerne **F-G:** MIP der einzelnen Kanäle nach der Segmentierung **H:** 3D-Ansicht **I:** Kombination aus Binär- und Voronoi-Bild **J-K:** Mittelpunktbestimmung der Vesikel nach der Segmentierung **L:** Überlappung der drei Kanäle durch die mittlere Zellschicht **M:** Distanztransformation **N-O:** Konturen der Vesikel nach Gauß-Funktion **P:** Kolokalisationsbereiche der Vesikel des EGFR- und pEGFR-Kanals

Die 3D-Bildanalyse zur Untersuchung der EGFR-Aktivierung in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen zeigte eine deutlich Überaktivierung der Rezeptoren in Anwesenheit von HPV16 E5 (Abb. 4.1.10). Während zu Beginn der EGF-Stimulation (t_0 bis t_5) keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen zu beobachten waren, konnten nach 7 min signifikante Differenzen analysiert werden. Sowohl die Menge und Intensität an Gesamt-EGFR-Vesikeln, als auch an phospho-EGFR-Vesikeln war in E5-exprimierenden Zellen größer als in den Kontrollen. Die Mehrheit der Vesikel formierte sich in Cluster um den Zellkern. In den Kontrollen waren die Vesikel vergleichsweise klein und im Zytoplasma verstreut. Im Vergleich zu den E5-Zellen befanden sich erheblich weniger Vesikel größeren Volumens in der Nähe des Nukleus. Ähnliches konnte für die Leervektor- und E5-transduzierten Zellen auch zum Zeitpunkt t_{12} und t_{15} dokumentiert werden. Nach 30 minütiger EGF-Behandlung glichen sich Menge und Intensität von phospho- und Gesamt-EGFR-Vesikeln in beiden Zellpopulationen wieder an. Zum Zeitpunkt t_{60} konnten geringfügige Unterschiede festgestellt werden. In Anwesenheit von E5 konnten noch einige kleine Vesikel aktivierter Rezeptoren nachgewiesen werden, die jedoch eine sehr geringe Intensität zeigten. Die Rezeptoren der Kontrollen waren nahezu vollständig inaktiviert und auf das Ausgangslevel reduziert.

Zur detaillierten Analyse der EGFR-Aktivierung in Kontroll- und E5-Zellen wurden zunächst die Summe der Intensitäten sowie Anzahl der Vesikel über den gesamten Stimulationszeitraum ermittelt und zum Vergleich der Median und die zugehörigen Quartile graphisch dargestellt (Abb. 4.1.11).

In den Kontroll-Zellen nahm die mittlere Intensität der phospho-EGFR enthaltenen Vesikel im Zytoplasma zunächst stark zu (Abb. 4.1.11 A). Die maximale mittlere Intensität wurde nach 10 min beobachtet. Danach konnte ein schneller und starker Abfall nachgewiesen werden. Die mittlere Intensität in Zellkernnähe zeigte einen ähnlichen Verlauf (Abb. 4.1.11 B). Die Kinetik in den E5-exprimierenden Zellen war annähernd gleich, jedoch konnte eine stärkere und länger anhaltende Zunahme der mittleren Intensität in der Nähe des Nukleus detektiert werden (Abb. 4.1.11 B). Das Intensitätsmaximum war ebenfalls nach 10 min zu verzeichnen und betrug etwa das 1,4fache der mittleren Intensität der Kontrollen.

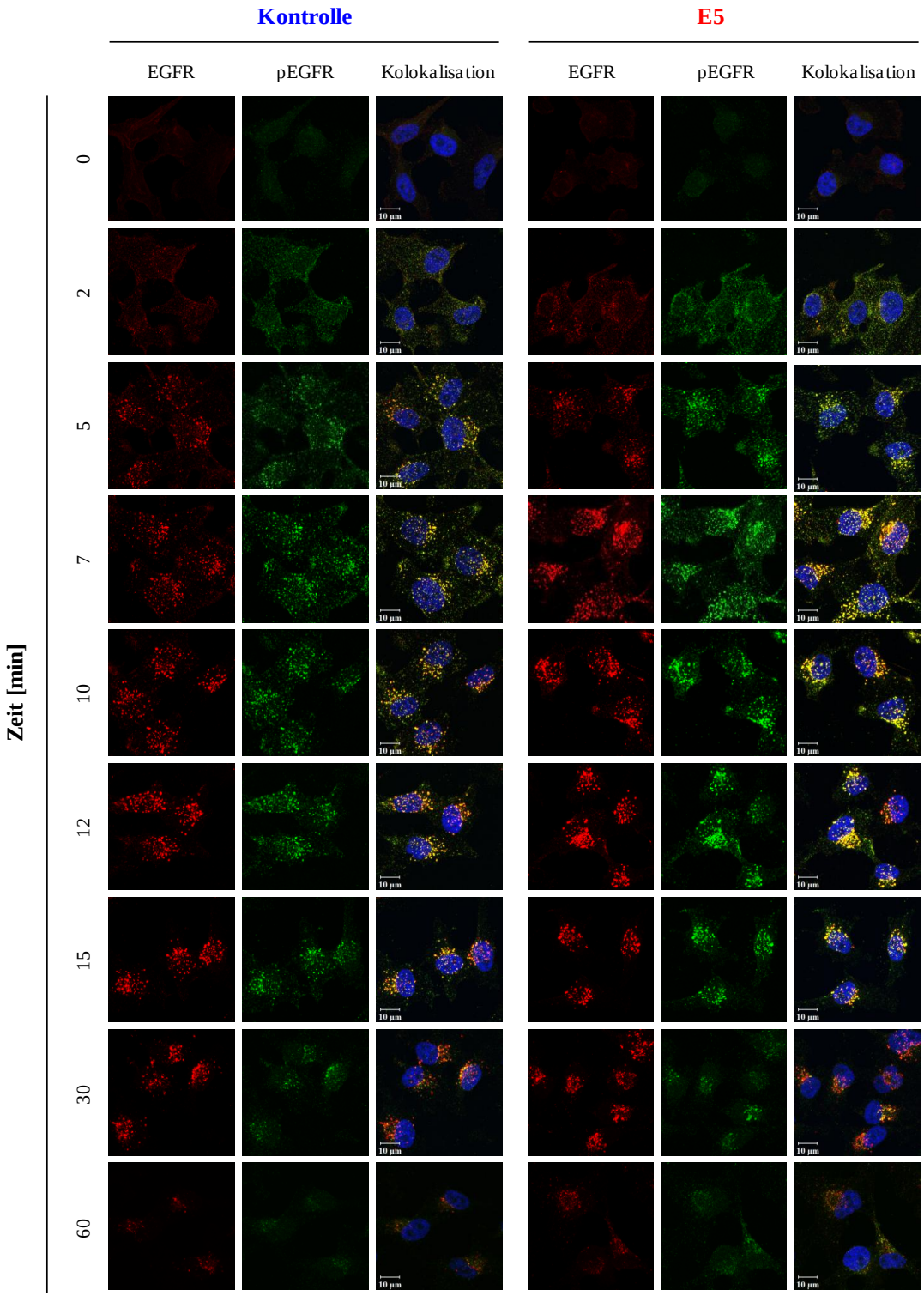


Abb. 4.1.10 3D-Bildanalyse zur Untersuchung der Rezeptoraktivierung in HeLa-Zellen. Leervektor- und E5-transduzierte HeLa-Zellen wurden auf den Deckgläschen ausgesät, für 16 h in serum-freies Kulturmedium überführt und im Anschluss für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30 und 60 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Die fixierten Zellen wurden durch Tritonbehandlung permeabilisiert. Die Doppelimmunfluoreszenz erfolgte mit phospho-EGFR (Tyr1068)- und EGFR (R1)-spezifischen Antikörpern. Zudem wurde der Nukleus mit DAPI sichtbar gemacht und die Zellen im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM710 von Zeiss dokumentiert. Die aufgeführten Bilder sind maximale Intensitätsprojektionen der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung und stellen ein Beispiel von 13 Aufnahmen dar.

Im Zytoplasma der E5-exprimierenden Zellen konnte eine schnellere und langanhaltende Erhöhung der mittleren Vesikelintensität festgestellt werden, die erheblich über der Intensität der Kontroll lag (Abb. 4.1.11 A). Nach 7, 12 und 15 minütiger EGF-Behandlung war sie ca. zweimal so stark. Zum Zeitpunkt t_{30} und t_{60} glichen sich die Intensitäten in E5- und Kontroll-Zellen wieder einander an.

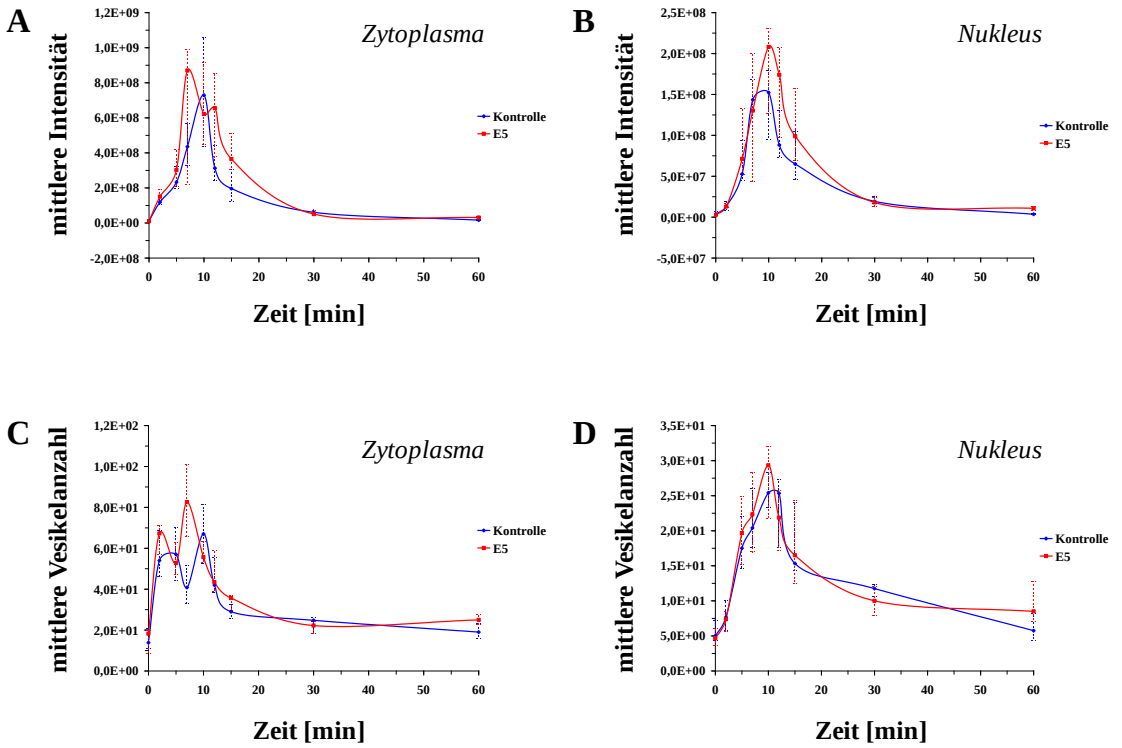


Abb. 4.1.11 Mittlere Intensität und Anzahl von phospho-EGFR-positiven Vesikeln im Zytoplasma und in Kernnähe. Die Quantifizierung erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.1.10. Pro Zeitpunkt wurden im Durchschnitt 30-50 Zellen aufgenommen und analysiert. Bestimmt wurde der Median (Rhombus oder Quadrat) und die zugehörigen Quartile (Balken).

Ein Vergleich der Vesikelanzahl in Bezug auf die Intensität bringt Interessantes zum Vorschein. Während in Kernnähe die Intensität für beide Zellpopulationen mit steigender Vesikelanzahl zunahm (Abb. 4.1.11 D), konnte im Restzytoplasma ein gegensätzliches Bild dokumentiert werden (Abb. 4.1.11 C). Zunächst schien auch im Zytoplasma die Intensität mit der Vesikelanzahl zu steigen, d.h. die Internalisierung des aktivierten Rezeptors durch Abspaltung von Vesikel der Plasmamembran setzte ein. Im weiteren Verlauf konnte jedoch beobachtet werden, dass die Zunahme der Intensität mit stagnierender bzw. sinkender Anzahl an Vesikeln einherging (Abb. 4.1.11 A und C).

Dies kann als Beweis für die Fusion von Vesikeln angenommen werden. Zum Zeitpunkt der Intensitätsmaxima zeigte sich wieder ein deutlicher Anstieg der Vesikelanzahl, was auf die Abspaltung von Vesikeln zurückzuführen sein könnte. In beiden Zellpopulationen nahm die Vesikelanzahl nach 12 bis 15 min stark ab. Die Intensität in den E5-exprimierenden Zellen blieb im Vergleich zur Kontrolle zu diesen Zeitpunkten deutlich erhöht und deutet erneut eine Fusion von Vesikeln an (Abb. 4.1.11 A und C). Auch in Kernnähe konnte dieses Phänomen in E5-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 4.1.11 B und D). Diese Ergebnisse deuten stark auf einen differenzierten Transport von Vesikeln mit aktivierten EGFR in E5-exprimierenden Zellen verglichen mit den Leervektor-transduzierten Zellen.

Die Analyse der mittleren Intensität von Gesamt-EGFR-Vesikeln im Zytoplasma zeigte zunächst ebenfalls eine Zunahme in beiden Zellpopulationen, wobei die Intensität zum Zeitpunkt t_7 in E5-exprimierenden Zellen fast doppelt so groß war wie die der Kontrollen (Abb. 4.1.12 A). Das Intensitätsmaximum erreichten die Kontroll-Zellen bereits nach 10 min, in Anwesenheit von E5 wurde erst nach 12 min die maximale mittlere Intensität detektiert. Verglichen mit der Vesikelintensität von phospho-EGFR nahm die Intensität der Gesamt-EGFR-Vesikel im weiteren Verlauf deutlich langsamer ab (Abb. 4.1.11 A und Abb. 4.1.12 B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bereits zum Zeitpunkt t_{12} die Mehrheit der Rezeptoren dephosphoryliert und inaktiviert vorlagen. In den E5-exprimierenden Zellen konnte jedoch im Vergleich zur Kontrolle nach 30 min eine deutlich größere Vesikelintensität für Gesamt-EGFR dokumentiert werden (Abb. 4.1.12 A), während für phospho-EGFR die Intensitäten annähernd gleich waren (Abb. 4.1.11 A). Dies deutet auf eine verminderte Degradation des Rezeptors hin.

Im Vergleich zum Zytoplasma zeigten die mittleren Intensitäten der EGFR-Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Nukleus nur wenige Unterschiede in der Kinetik, die hauptsächlich in den ersten 15 min der EGF-Behandlung zu beobachten waren (Abb. 4.1.12 B). Zum Zeitpunkt t_7 konnte in den Kontrollen eine stärkere Vesikelintensität zu den E5-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Letztere waren nach 10 min erst erheblich über dem Intensitätsniveau der Kontroll-Zellen. Nach 12 und 15minütiger EGF-Stimulation glichen sich die mittleren Intensitäten beider Zellpopulationen

einander an. Erst zum Zeitpunkt t_{30} konnte in den E5-exprimierenden Zellen eine deutlich größere Intensität zur Kontrolle festgestellt werden.

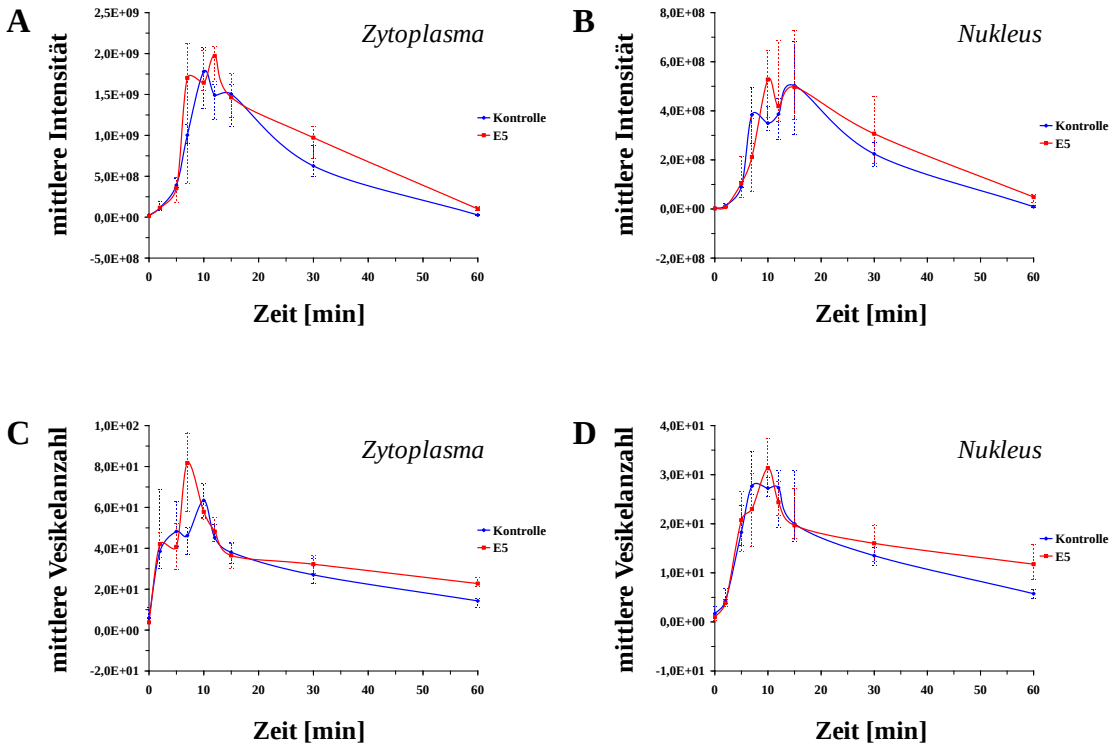


Abb. 4.1.12 Mittlere Intensität und Anzahl von Gesamt-EGFR-positiven Vesikeln im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus. Die quantitative Bestimmung beruht auf dem Experiment aus Abb. 4.1.10. Durchschnittlich wurden pro Zeitpunkt 30-50 Zellen aufgenommen und analysiert. Der Median ist als Rhombus bzw. Quadrat dargestellt und die zugehörigen Quartile als Balken.

Die Kinetik der Vesikelanzahl unterschied sich kaum im Vergleich zu der von phospho-EGFR (Abb. 4.1.12 C und D bzw. Abb. 4.1.11 C und D) und ist vermutlich ebenso von Fusion und Abspaltung der Vesikel geprägt. Die einzige Differenz bestand in der Vesikelanzahl ab dem Zeitpunkt t_{15}. Sowohl im Zytoplasma, als auch in Kernnähe nahm die Anzahl an Gesamt-EGFR-Vesikeln langsamer ab als die der phospho-EGFR-Vesikel.

Die Analyse der Intensität von Vesikeln, die eine Kolokalisation von phospho- und Gesamt-EGFR aufwiesen, konnte nicht direkt aus den Bildern erfolgen. Für die Doppelfärbung von phospho- und Gesamt-EGFR wurden Epitop-spezifische

Primärantikörper mit unterschiedlichen Bindungsaffinitäten verwendet, die durch verschiedene Sekundärantikörper detektiert werden konnten. Aus diesem Grund waren die Intensitäten nicht vergleichbar und zeigten deutliche Differenzen. Um dennoch Vesikelintensitäten für Kolokalisationen in Kontroll- und E5-Zellen analysieren und vergleichen zu können, wurde die Bestimmung der Intensität wie in Tabelle 4.1.1 aufgeführt vorgenommen.

Zunächst wurde der prozentuale Anteil an kolokalisierenden Vesikel zur Vesikelanzahl von Gesamt-EGFR berechnet, welche im Rahmen der 3D-Analyse ermittelt wurden (Tabelle 4.1.1, Schritt 1). Anhand des Beispiels aus der Tabelle wäre der prozentuale Anteil 4% bzw. 0,04. Ausgehend davon, dass die Summe der Intensitäten und die Anzahl miteinander korrelieren, ergibt dieser Faktor multipliziert mit der Intensität der Gesamt-EGFR-Vesikel die „Intensität kolokalisierender Vesikel“ (Tabelle 4.1.1, Schritt 2). Für die graphische Darstellung in Abb. 4.1.13 wurde ebenfalls der Median und die zugehörigen Quantile ermittelt.

Tabelle 4.1.1 Beispiel zur Berechnung der Intensität in Bezug auf Kolokalisationen. Zunächst wurde der Prozentsatz aus dem Anteil kolokalisierender phospho- und Gesamt-EGFR-Vesikel zu Gesamt-EGFR-Anteil ermittelt. Dieser Prozentsatz wurde verwendet, um die Intensität „kolokalisierender“ Vesikel als Anteil der Gesamt-EGFR-Intensität zu bestimmen.

Vesikelanzahl	**Gesamt-EGFR**	**Phospho-EGFR**	**Kolokalisation**
t_n	**50**	~~2~~ **1.**	**2**
Intensität	**Gesamt-EGFR**	**Phospho-EGFR**	**Kolokalisation**
t_n	**10000**	~~1000~~ **2.**	**400**

Die Kinetik der kolokalisierenden Vesikel bezüglich Intensität und Anzahl im Zytoplasma und Kernnähe ist ein Ebenbild der Kinetik von Gesamt-EGFR-Vesikeln (Abb. 4.1.12 und Abb. 4.1.13). Zunächst stiegen die Intensitäten kontinuierlich in beiden Zellpopulationen an (Abb. 4.1.13 A und B). Bis zum Zeitpunkt t_5 waren keine

Intensitätsunterschiede zwischen Kontroll- und E5-Zellen zu verzeichnen. Danach konnte im Zytoplasma eine deutlich stärkere Intensität von E5-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, die sich nahezu über den gesamten Stimulationszeitraum fortsetzte (Abb. 4.1.13 A). Die E5-exprimierenden Zellen zeigten eine erhebliche Überaktivierung des EGF-Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle. Nach 60 min waren die Intensitäten der beiden Zellpopulationen auf annähernd gleichem Niveau. In unmittelbarer Nähe des Nukleus konnte Ähnliches dokumentiert werden (Abb. 4.1.13 B). Jedoch war in den E5-exprimierenden Zellen erst ab dem Zeitpunkt t_{10} eine stärkere Intensität im Vergleich zu Kontrolle erkennbar.

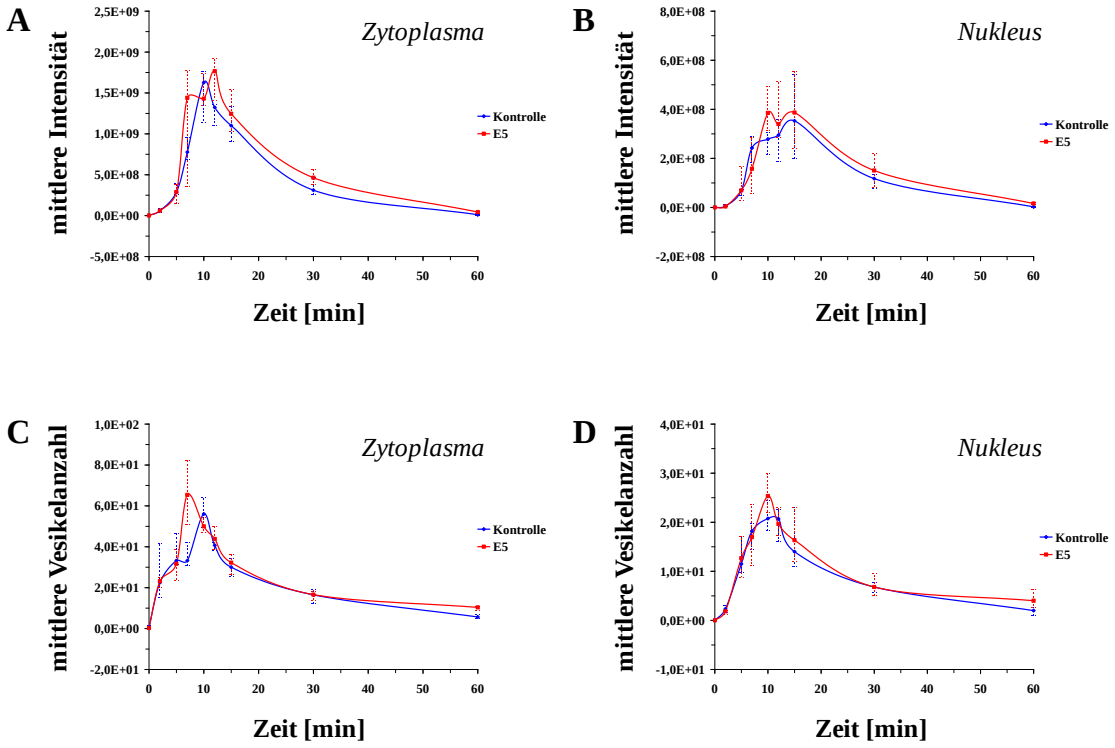


Abb. 4.1.13 Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe kolokalisieren. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.1.10. Im Durchschnitt betrug die Anzahl an aufgenommenen und analysierten Zellen pro Zeitpunkt 30-50. Der Median ist durch Rhombus bzw. Quadrat im Diagramm wiedergegeben, die Quartile durch Balken.

In Bezug auf die Vesikelanzahl konnte anfangs auch eine Zunahme der Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe nachgewiesen werden (Abb. 4.1.13 C und D), wobei in den E5-Zellen die maximale Anzahl an zytoplasmatischen Vesikeln nach 10 min, in den

Kontrollen erst nach 12 min registriert wurde (Abb. 4.1.13 C). In unmittelbarer Nähe des Nukleus konnte für beide Zellpopulationen ein Maximum zum Zeitpunkt t_{10} detektiert werden (Abb. 4.1.13 D). Sowohl im Zytoplasma, als auch in Kernnähe glich sich die Vesikelanzahl beider Zellpopulationen im weiteren Verlauf der EGF-Behandlung einander an. Nach 60 min zeigten sich erneut Differenzen in der Vesikelanzahl der E5- und Leervektor-transduzierten Zellen. In E5-Zellen war die Anzahl kolokalisierender Vesikel leicht erhöht, d.h. das die Rezeptoren länger phosphoryliert bzw. aktiv blieben.

Da sich die Kinetiken von Intensität und Anzahl im Zytoplasma und in Kernnähe kaum voneinander unterschieden, wurden die Ergebnisse der einzelnen Kompartimente zusammengefasst und in Abb. 4.1.14 A graphisch dargestellt. Zudem wurde der mittlere relative Anteil an kolokalisierenden Vesikeln zur Anzahl an Gesamt-EGFR-Vesikeln ermittelt. Die Resultate sind in Abb. 4.1.14 B wiedergegeben.

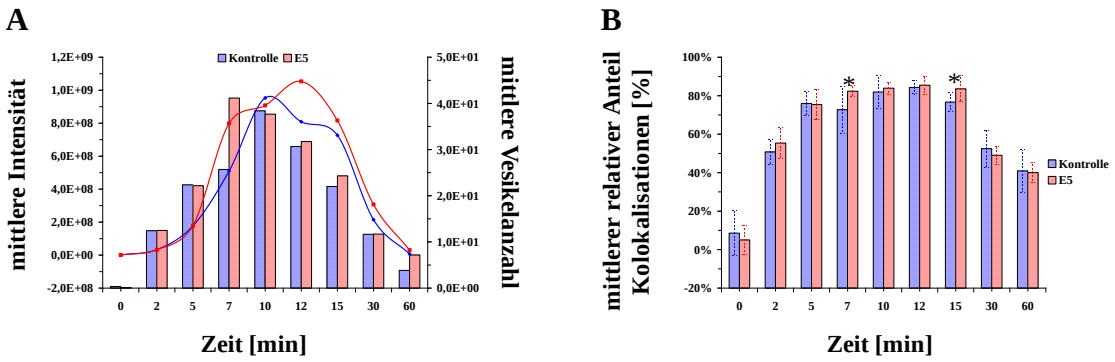


Abb. 4.1.14 Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel kolokalisieren. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.1.10. Im Durchschnitt betrug die Anzahl an aufgenommenen und analysierten Zellen pro Zeitpunkt 30-50. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. **A:** Die Linien beschreiben die mittlere Intensität, die Balken die mittlere Vesikelanzahl im zeitlichen Verlauf der EGF-Behandlung. **B:** Bestimmung des relativen Anteil an kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zum Gesamt-EGFR-Anteil.

Vor Beginn der EGF-Behandlung waren der absolute und relative Anteil kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen etwas erniedrigt, während sich die mittlere Intensität der Vesikel nicht voneinander unterschied. Nach 2 min stieg der relative Anteil in E5-Zellen um das 12fache von t_0 an,

in den Kontrollen etwa um das 6fache. Auch die absolute Vesikelanzahl stieg deutlich an und zeigte in E5-Zellen eine geringfügige Erhöhung, bei annähernd gleichbleibenden Intensitäten. Zum Zeitpunkt t_5 konnten keine Differenzen zwischen E5- und Leervektor-exprimierenden Zellen in Bezug auf Intensität, absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel beobachtet werden. Im Vergleich zu t_2 war für alle drei Parameter ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Die ersten Minuten der Stimulation waren vorwiegend durch die Internalisierung der aktivierten Rezeptoren geprägt.

Nach 7minütiger EGF-Stimulation zeigten sich die stärksten Unterschiede hinsichtlich Intensität, absolute und relative Vesikelanzahl. Im Vergleich zur Kontrolle konnte in den E5-exprimierenden Zellen die 1,8fache Vesikelintensität und 1,6fache Vesikelanzahl nachgewiesen werden. In Relation zu den Gesamt-EGFR-Vesikeln betrug der Anteil kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen etwa das 1,1fache. Bezüglich der absoluten Anzahl stellte dieser Zeitpunkt das Maximum an kolokalisierenden Vesikeln in E5-Zellen dar. Während zwischen t_7 und t_{10} die absolute Vesikelanzahl in den Kontrollen drastisch Anstieg, konnte in Anwesenheit von E5 eine Abnahme detektiert werden, dennoch war die relative Anzahl kolokalisierender Vesikel in beiden Zellpopulationen näherungsweise gleich. Auch die Intensitäten unterschieden sich kaum. Zum Zeitpunkt t_{12} nahm die absolute Menge an Vesikeln in beiden Populationen ab, der Anteil war konstant. Die Unterschiede wurden in Bezug auf die mittlere Intensitäten deutlich. In den E5-transduzierten Zellen konnte eine weitere Verstärkung der Intensität bei gleichbleibender relativer und sinkender absoluter Vesikelanzahl dokumentiert werden. In den Kontrollen hingegen wurde eine leichte Abnahme der Intensität und absoluten Anzahl der Vesikel beobachtet, bei nahezu konstanter relativer Vesikelanzahl. Zum Zeitpunkt t_{10} und t_{12} waren in beiden Zellpopulationen etwa 90% der vorhandenen zellulären Rezeptoren phosphoryliert bzw. aktiv. Nach 15 min konnte eine weitere Abnahme der absoluten und relativen Vesikelanzahl in Leervektor-transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Die Intensität war im Vergleich zu t_{12} nur geringfügig reduziert. In den E5-exprimierenden Zellen nahm die absolute Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln ebenfalls ab, war jedoch deutlich größer als die Vesikelanzahl der Kontrollen. Die relative Anzahl blieb hingegen konstant hoch bei etwa 85%. In Hinsicht auf die mittlere Intensität konnte eine relativ starke Reduktion im Vergleich zu t_{12} dokumentiert werden, die dennoch oberhalb des Intensitätsniveaus der Leervektor-transduzierten Zellen lag und in etwa der mittleren Intensität zum Zeitpunkt

t_7 entsprach. Zusammenfassend war der Stimulationszeitraum von t_7 bis t_{15} vorwiegend durch die Zunahme der Phosphorylierung bzw. Rezeptoraktivierung und von Vesikelfusionen gekennzeichnet. Dabei fiel besonders die Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in den E5-exprimierenden Zellen auf.

Nach 30 und 60minütiger EGF-Behandlung wurde in beiden Zellpopulationen eine starke Abnahme der Intensität, absoluten und relativen Anzahl kolokalisierender Vesikel festgestellt, wobei die Intensität in E5-exprimierenden Zellen gegenüber der Kontroll-Zellen immer noch größer war. Die absolute Vesikelanzahl nahm im Vergleich zur Kontrolle auch erheblich weniger ab, dies war besonders zum Zeitpunkt t_{60} ersichtlich. Die relative Anzahl der E5-Zellen hingegen zeichnete sich verglichen mit den Kontrollen durch geringfügig niedrigere Werte zum Ende der EGF-Stimulationsreihe aus. Die Letzte Phase charakterisiert die Dephosphorylierung und Inaktivierung der Rezeptoren mit anschließender Degradation. Dieser Vorgang schien in den E5-exprimierenden Zellen verändert zu sein.

Um die Vorgänge wie Internalisierung, intrazellulärer Transport und Inaktivierung bzw. Degradation der Rezeptoren nach deren Aktivierung besser verstehen zu können, wurden zusätzlich die Distanzen zur Kernmembran und die Volumina der kolokalisierenden Vesikel mit Hilfe der 3D-Bildanalyse untersucht. In Abb. 4.1.15 A bis D sind die Streudiagramme der einzelnen Distanzen und Volumina für Leervektor- und E5-transduzierte Zellen für die verschiedenen Zeitintervalle der EGF-Stimulation dargestellt. Die Abb. 4.1.15 E gibt die mittlere Distanz und das mittlere Volumen beider Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf wieder.

Die Streudiagramme bezüglich der Distanzen kolokalisierender Vesikel zur Kernmembran in Kontroll- und E5-Zellen wiesen auffällige Differenzen zu den Zeitpunkten t_7, t_{12}, t_{15} und t_{60} (Abb. 4.1.15 A und B) auf. Während nach 7 und 60 min die Distanz der Vesikel in E5-exprimierenden Zellen größer erschien als in den Kontrollen, konnten nach 12 bis 15minütiger EGF-Behandlung kürzere Distanzen im Vergleich zu den Leervektor-exprimierenden Zellen beobachtet werden.

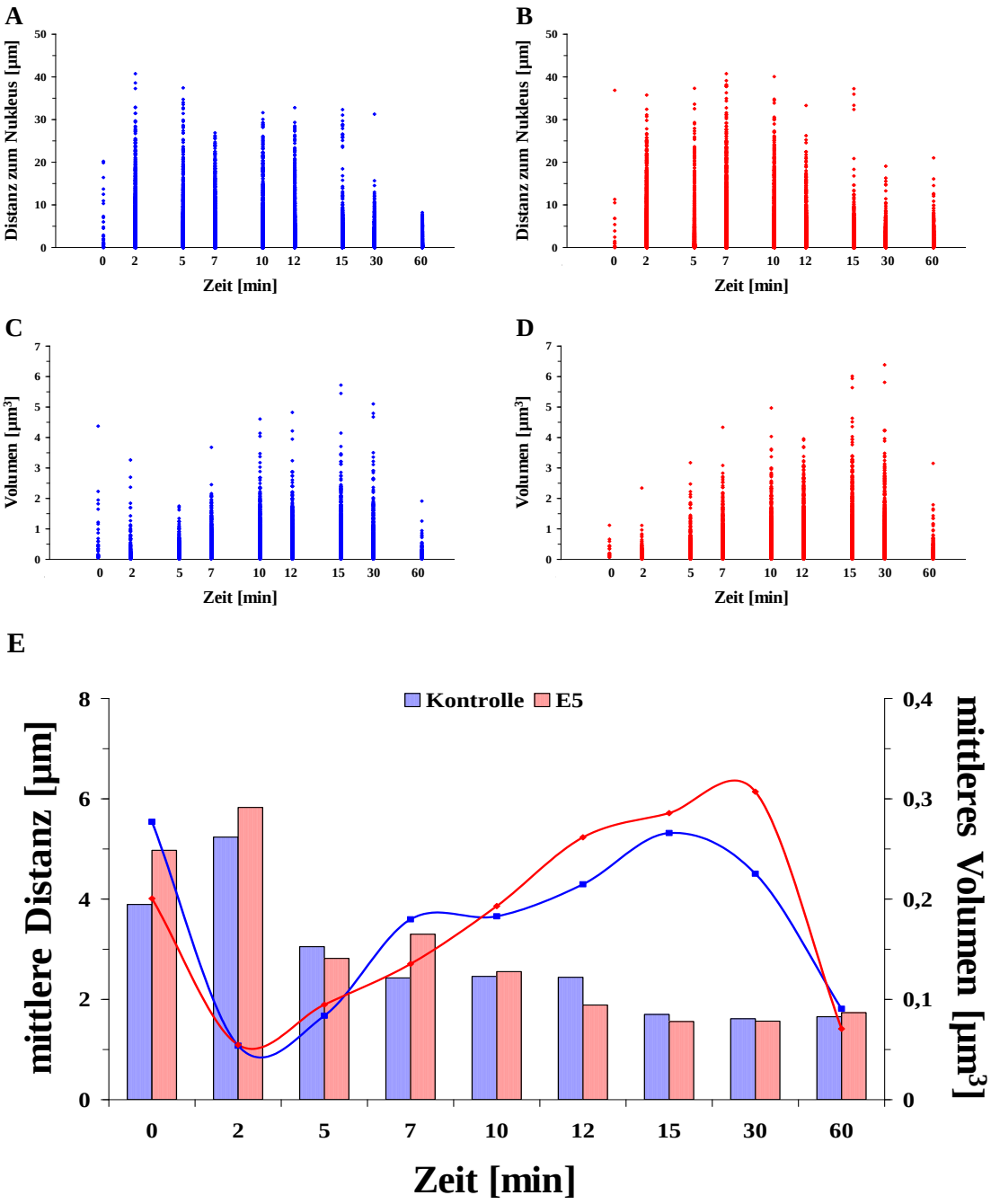


Abb. 4.1.15 Distanzen und Volumina von phospho-EGFR-Vesikeln, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel kolokalisieren. Die Quantifizierung der mittleren Distanz und Volumina erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.1.10. Im Durchschnitt betrug die Anzahl an aufgenommenen und analysierten Zellen pro Zeitpunkt 30-50. **A-D:** Streudiagramm aller Distanzen und Volumina kolokalisierender Vesikel im Stimulationszeitraum für Leervektor- und E5-exprimierende Zellen. **E:** Die Balken beschreiben die mittlere Distanz, die Linien das mittlere Volumen im Verlauf der EGF-Behandlung.

Ein Vergleich der Volumina, die durch die Streudiagramme in Abb. 4.1.15 C und D beschrieben wurden, zeigten im Verlauf der EGF-Stimulation mit Ausnahme von t_0 und t_2 deutlich voluminösere Vesikel in den E5-Zellen gegenüber den Kontrollen (Abb. 4.1.15 C und D). Zum Zeitpunkt t_0 und t_2 war das Gegenteil der Fall.

Die mittleren Distanzen und Volumina kolokalisierender Vesikel (Abb. 4.1.15 E) verdeutlichten ein ähnliches Bild wie die Streudiagramme der Einzelwerte. Die größten Unterschiede in der Distanz waren zum Zeitpunkt t_7 und t_{12} zu verzeichnen. Nach 7 min betrug die mittlere Distanz der kolokalisierenden Vesikel in E5-Zellen das 1,4fache der Distanz in Kontroll-Zellen. Nach 12minütiger Stimulation mit EGF war hingegen die Distanz der Vesikel in Leervektor-transduzierten Zellen 1,3-mal so groß wie die in Anwesenheit von E5. Für die mittleren Volumina konnten vor allem zu den Zeitpunkten t_7, t_{12} bis t_{30} Differenzen zwischen Leervektor- und E5-transduzierten Zellen dokumentiert werden. Während in den E5-Zellen nach 7 min die Vesikel ein erheblich geringeres Volumen als die kolokalisierenden Vesikel der Kontrollen besaßen, konnte im Zeitraum zwischen t_{12} und t_{30} eine gravierende Volumenzunahme der Vesikel in E5-Zellen gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. Das Volumen der Vesikel betrug im Durchschnitt etwa das 1,2fache.

Im Allgemeinen konnte beobachtet werden, dass die Vesikel zum Zeitpunkt t_2 in beiden Zellpopulationen die längsten Distanzen zur Kernmembran zurücklegten und das geringste Volumen aufwiesen (Abb. 4.1.15 E). Im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation verkürzte sich die Distanz der Vesikel zur Kernmembran und die Volumina nahmen deutlich zu. In den Kontrollen war das maximale mittlere Volumen kolokalisierender Vesikel nach 15 min erreicht und betrug etwa 0,25 μm^3. In den E5-Zellen konnte erst nach 30 min ein Volumenmaximum von ca. 0,3 μm^3 detektiert werden. Nach 60 min war das mittlere Volumen der Vesikel bei gleichbleibender mittlerer Distanz von etwa 2 µm zur Kernmembran in beiden Zellpopulationen deutlich verringert.

Desweiteren wurden Volumen-Distanz-Korrelationsdiagramme erstellt. Die Diagramme sollten klären, ob ein Zusammenhang zwischen Vesikelgröße und Entfernung der Vesikel zur Kernmembran im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation existiert. Als

Maß diente die Regressionsgerade. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einem Wertepaar. Die aus den Wertepaaren entstehende Punktwolke zeigt durch ihre Form und Lage im Diagramm an, ob eine Abhängigkeit zwischen den beiden Faktoren Volumen und Distanz besteht. Je näher sich die Punkte an der Regressionsgeraden befinden, desto stärker ist die Korrelation der untersuchten Faktoren. Bei einem Korrelationskoeffizienten R = 0,5 spricht man von einer schwachen positiven Korrelation, während R = -0,5 eine schwache negative Korrelationen anzeigt. Korrelationskoeffizienten mit R = 1 bzw. R = -1 deuten auf eine starke positive bzw. negative Korrelation hin. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt eine Näherung an, wie viel Prozent der Unterschiede des einen Faktors durch die Unterschiede des anderen Faktors beschrieben werden können. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ab einem $R^2 \leq -0,25$ von einer schwachen negativen Korrelation gesprochen werden kann.

In Bezug auf die Volumen-Distanz-Korrelationsdiagramme der kolokalisierenden Vesikel in Abb. 4.1.16 konnten teilweise lineare Zusammenhänge zwischen dem Volumen und der Distanz zur Kernmembran nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um negative Korrelationen, d.h. je größer das Volumen, desto kleiner die Entfernung zum Kern und umgekehrt.

Die stärkste negative Korrelation konnte für beide Zellpopulationen zum Zeitpunkt t_2 beobachtet werden. Das Bestimmtheitsmaß betrug etwa -0,6. Das heißt, 60% der kolokalisierenden Vesikel zeigten eine große Distanz zur Kernmembran, während das Vesikelvolumen sehr gering war. Nach 5 min konnte bereits eine leichte Abnahme der Distanz bei schwach ansteigendem Volumen dokumentiert werden. Zum Zeitpunkt t_7 konnte in den Kontroll-Zellen keine lineare Korrelation festgestellt werden. In den E5-exprimierenden Zellen war weiterhin eine schwache negative Korrelation zwischen Volumen und Distanz zu verzeichnen. Im Stimulationszeitraum von t_{10} bis t_{15} war für beide Zellpopulationen keine lineare Korrelation nachweisbar. In der Kontrolle konnte nach 30 minütiger EGF-Stimulation wieder eine negative Volumen-Distanz-Korrelation nachgewiesen werden. Etwa 35% der kolokalisierenden Vesikel wiesen ein großes Volumen auf und befanden sich in unmittelbarer Nähe zum Zellkern. Für die restlichen 65% der kolokalisierenden Vesikel konnte ein relativ großer Abstand zum Kern und vergleichsweise geringes Vesikelvolumen beobachtet.

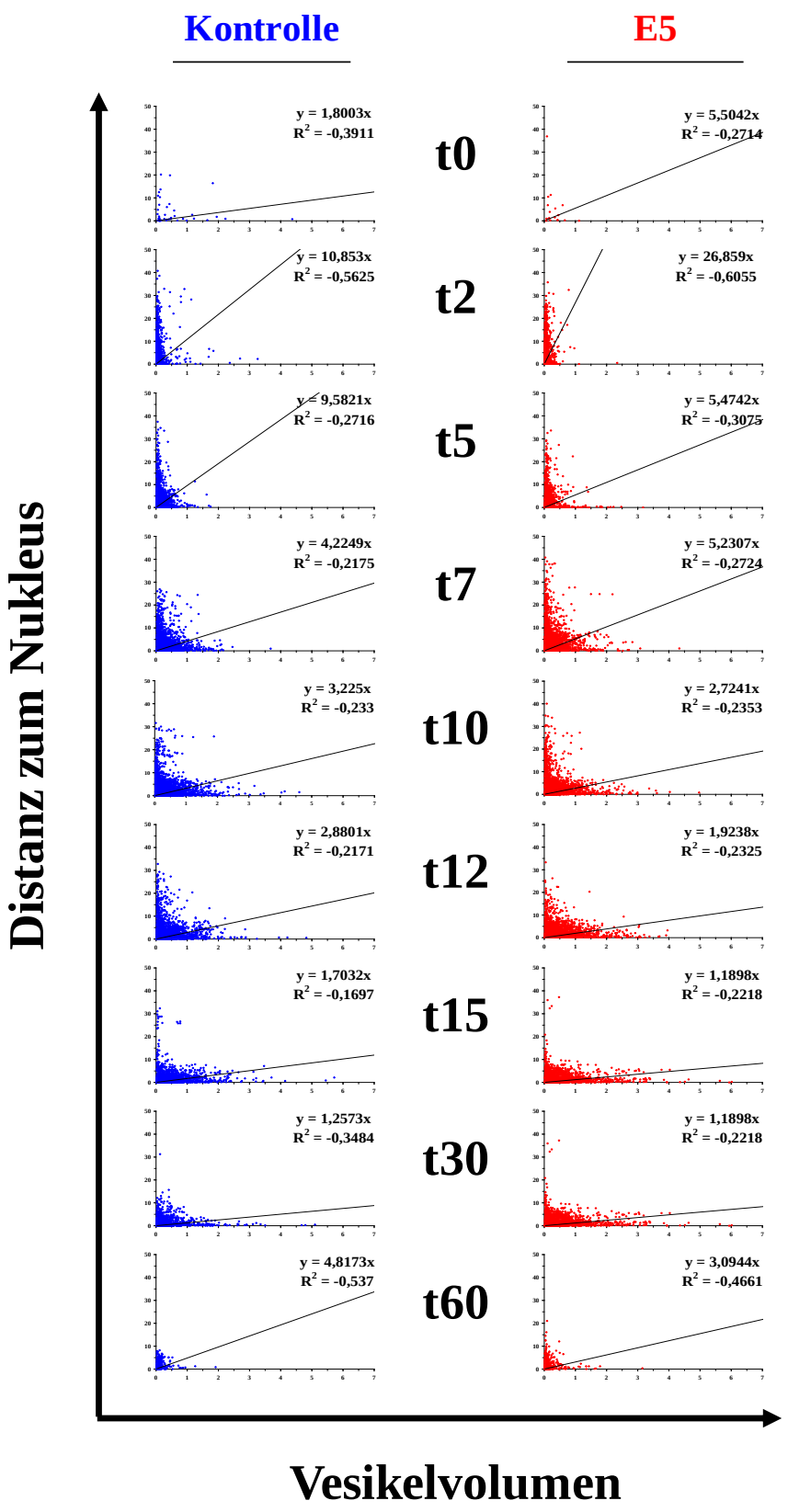


Abb. 4.1.16 Volumen-Distanz-Korrelationsdiagramm von phospho-EGFR-Vesikeln, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel kolokalisieren. Die mittleren Distanzen und Volumina aus Abb. 4.1.14 E wurden gegeneinander im xy-Koordinatensystem aufgetragen und der Anstieg der Regressionsgeraden analysiert.

In den E5-exprimierenden Zellen war dies erst nach 60 min ersichtlich. Zum Zeitpunkt t_{60} betrug das Bestimmtheitsmaß in beiden Zellpopulationen etwa -0,5. Für die Hälfte der kolokalisierenden Vesikel, die sich in Kernnähe befanden, war ein relativ großes Volumen nachweisbar. Die andere Hälfte zeichnete sich durch ein kleines Volumen und einem größeren Abstand zur Kernmembran aus.

Schließlich wurde die 3D-Bildanaylse der EGFR-Aktivierung mit dem Vergleich von Intensität und Volumen bzw. Distanz sowie Vesikelanzahl und Volumen bzw. Distanz abgerundet (Abb. 4.1.17). Diese Diagramme sollten Aufschluss bezüglich der unterschiedlichen EGFR-Aktivierung in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen geben und eventuelle Differenzen in Hinsicht auf Vesikelfusion und -degradation sowie Vesikeltransport aufzeigen.

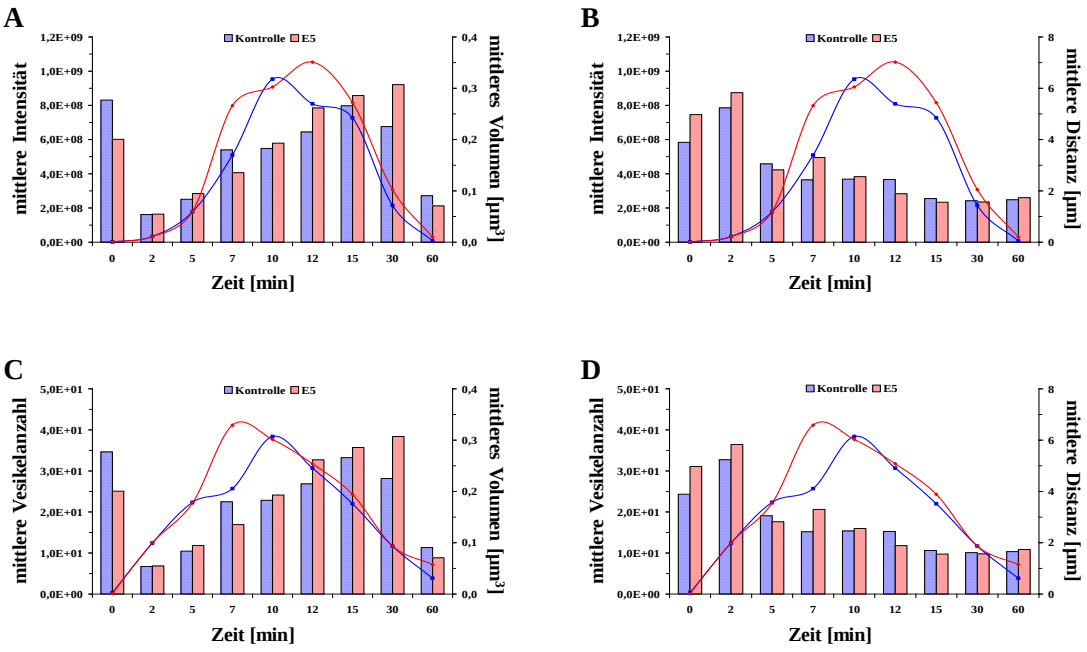


Abb. 4.1.17 Analyse der mittleren Intensität und Vesikelanzahl in Bezug zur Distanz bzw. zum Volumen kolokalisierender Vesikel. Zur Erstellung der Diagramme wurden die Daten aus Abb. 4.1.13 A und 4.1.14 E herangezogen.

In Bezug auf die mittlere Intensität und das mittlere Volumen konnte mit zunehmender Intensität ein Anstieg des Volumens beobachtet werden (Abb. 4.1.17 A). Zum Zeitpunkt t_7 fiel jedoch auf, dass die mittlere Intensität in den Kontrollen geringer war als in den

E5-Zellen. Hingegen konnte in Leervektor-transduzierten Zellen ein deutlich größeres Volumen als in den E5-exprimierenden Zellen dokumentiert werden. Zu diesem Zeitpunkt war in den Kontrollen eine leichte Stagnation der Vesikelanzahl zu verzeichnen (Abb. 4.1.17 C). In den E5-transduzierten Zellen stieg die Vesikelzahl auf das 1,6fache zur Kontrolle an. Nach 10 min begann in Anwesenheit von E5 die Vesikelanzahl bei steigendem Wachstum von Intensität und Volumen abzunehmen (Abb. 4.1 17 A und C). In den Kontrollen konnte dieser Zusammenhang erst zu t_{12} detektiert werden. Ein weiterer Unterschied in Bezug auf Volumen und Intensität zwischen E5- und Kontroll-Zellen wurde nach 15 und 30minütiger EGF-Stimulation deutlich (Abb. 4.1.17 A). In Anwesenheit von E5 konnte eine weitere Volumenzunahme bei abnehmender Intensität nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Fusion von Vesikeln mit einer Zunahme an Volumen bei gleichzeitiger Reduktion der Vesikelanzahl einhergeht, begann die Vesikelfusion in E5-Zellen bereits nach 10 min und in den Kontrollen erst nach 12minütiger EGF-Stimulation. Die starke Abnahme von Intensitäten, Vesikelanzahl und Volumen nach 30 min deutet möglicherweise auf die Degradation von EGFR-Vesikeln in den Leervektor-transduzierten Zellen hin (Abb. 4.1.17 A und C). In den E5-Zellen hingegen stieg das Volumen der Vesikel bei abnehmender Anzahl und Intensität erneut an. Die Vesikel schienen weiter zu fusionieren. Erst nach 60 min waren Intensität und Volumen in etwa auf das Niveau von t_2 gesunken. In Gegenwart von E5 konnte jedoch ein geringeres Vesikelvolumen und eine erhöhte Anzahl kolokalisierender Vesikel beobachtet werden bei annähernd gleicher mittlerer Intensität wie in den Kontroll-Zellen.

Hinsichtlich der mittleren Intensität bzw. Vesikelanzahl und Distanz kolokalisierender Vesikel zum Nukleus konnte mit Zunahme der Intensität und Anzahl der Vesikel beobachtet werden, dass die Distanz zum Kern im Verlauf der EGF-Behandlung abnimmt (Abb. 4.1.17 B und D). Die stärksten Differenzen zwischen Kontroll- und E5-Zellen in Bezug auf Intensität, Anzahl und Distanz wurden zum Zeitpunkt t_7 und t_{12} festgestellt. Nach 7 min waren im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen alle drei Parameter in E5-Zellen deutlich größer. Nach 12minütiger EGF-Stimulation konnte in den E5-exprimierenden Zellen eine erheblich stärkere Intensität beobachtet werden, jedoch war die Vesikelanzahl annähernd gleich zu der in den Kontrollen. Die

Distanz der kolokalisierenden Vesikel zum Kern in Anwesenheit von E5 war zu diesem Zeitpunkt eindeutig geringer als in den Kontroll-Zellen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Transport von Vesikeln mit aktiviertem EGFR in E5-transduzierten Zellen vermutlich anders verlief als in Leervektor-transduzierten Zellen.

4.1.6 Schlussfolgerung

Eine Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in Anwesenheit von HPV16 E5 war sowohl molekularbiologisch (Immunblot), als auch zellbiologisch (ICW, FACS und Mikroskopie) nachweisbar. Die Aktivierung der EGF-Rezeptoren durch verschiedene Liganden zeigte, dass die Überaktivierung in E5-exprimierenden Zellen nur durch EGF induziert werden konnte und unabhängig von der Konzentration des Liganden war. Zudem konnte durch die kinetische Analyse mittels Immunoblot und Durchflusszytometrie bewiesen werden, dass die langanhaltende Überaktivierung nicht nur in E5-transduzierten HaCaT-Zellen, sondern auch in E5-positiven HeLa-Zellen (E5-transduzierte Zellen, die im FACS positiv für AU1-16E5 analysiert werden konnten) zu beobachten war. Es konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Überaktivierung nicht zellspezifisch stattfindet. Nicht nur in den E5-transduzierten HaCaT-Zellen, sondern auch in den E5-exprimierenden HeLa-Zellen konnte eine signifikant stärkere Phosphorylierung von EGFR im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Zudem ergab die quantitative 3D-Mikroskopie-Analysen einen schnelleren und stärkeren Transport von phospho-EGFR-Vesikeln, die vor allem als perinuklearen Clustern in der Zelle lokalisiert waren. Eine langanhaltende Überaktivierung konnte ebenfalls mit der mikroskopischen Analyse dokumentiert werden.

Es ist bekannt, dass HPV16 E5 in der Membran von Golgi-Apparat und endosomaler Kompartimente lokalisiert ist und mit der 16kD-Untereinheit der vATPase und dem phosphorylierten EGFR interagiert (Abb. 4.1.18). Es wurde bisher vermutet, dass HPV16 E5 infolge dieser Interaktionen den Phosphorylierungsstatus stabilisiert und möglicherweise das Recycling verstärkt und/oder die Degradation des EGFR inhibiert. Die molekularen Mechanismen sind bis dato unbekannt. Um die zell- und molekularbiolgischen Mechanismen zu klären, die zur EGFR-Überaktivierung in

Gegenwart von HPV16 E5 führen, wurde die EGFR-Signaltransduktion systematisch untersucht. Zunächst wurde die Internalisierung des EGFR genauer analysiert und geprüft, ob die aktivierten Rezeptoren in Anwesenheit von E5 eventuell alternative Internalisierungswege einschlagen.

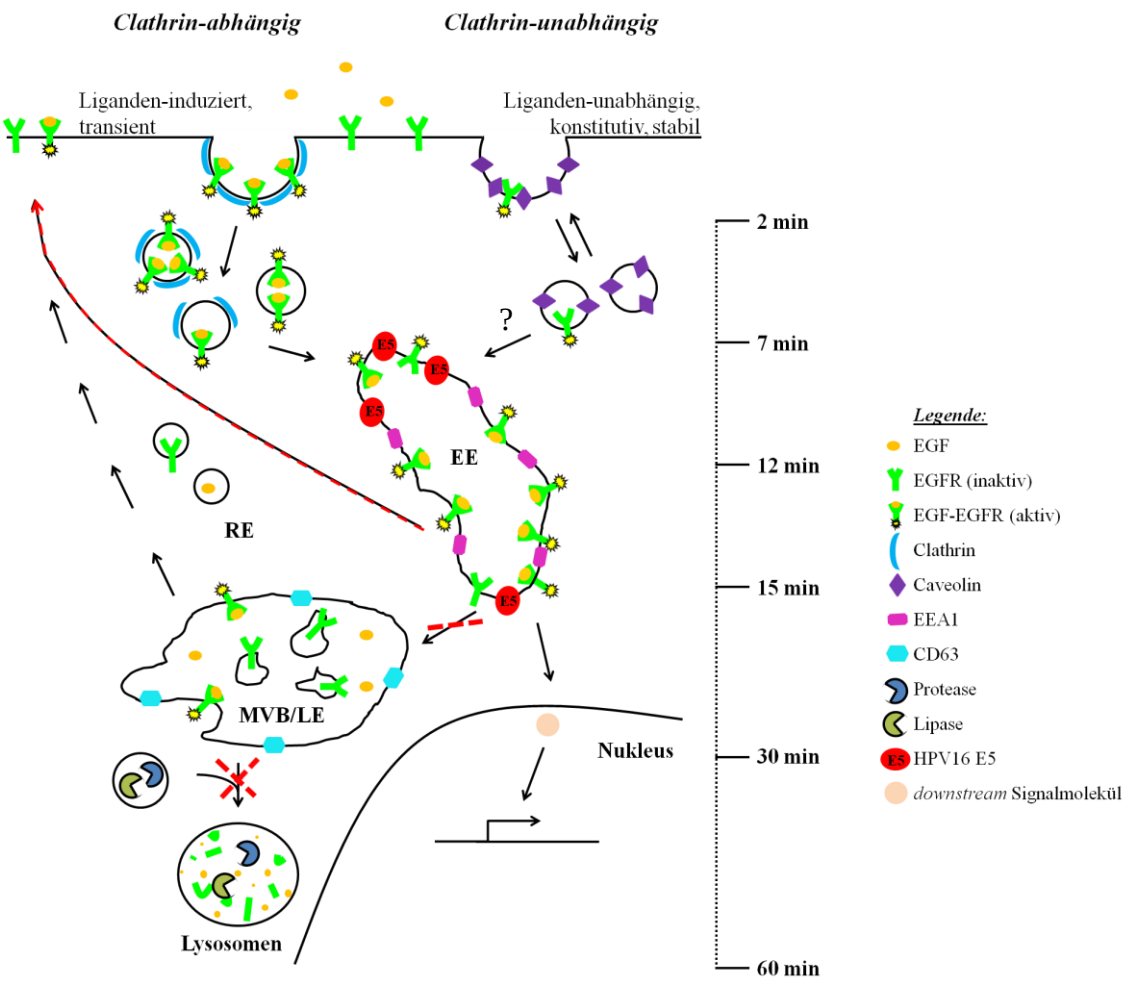


Abb. 4.1.18 Vereinfachte Darstellung des EGFR-Transports nach seiner Aktivierung an der Plasmamembran und die bisher postulierten Effekte von HPV16 E5 auf die EGFR-Aktivierung. Das HPV16 E5-Protein, welches in der Membran von Golgi und endosomaler Kompartimente lokalisiert ist und zur Überaktivierung der EGF-Rezeptoren führt, bewirkt möglicherweise eine Verminderung der EGFR-Degradation und/oder eine Verstärkung des Recycling.

4.2 EGFR-Internalisierung

Die Internalisierung der Rezeptoren beginnt mit deren Aktivierung durch den Liganden und der Einstülpung der Plasmamembran (Abb. 4.1.18). Die Invagination der Membran führt schließlich zur Ausbildung und Abschnürung von Clathrin beschichteten Vesikel, die den aktivierten Rezeptor mit sich führen (Calthrin-abhängige Internalisierung). Nach Entfernen der Clathrin-Hülle fusionieren die Vesikel miteinander und verschmelzen mit dem frühen Endosomen. Die Aktivierung der Rezeptoren kann jedoch auch unabhängig vom Liganden erfolgen und z.B. durch oxidativen Stress ausgelöst werden (Khan et al., 2006; Abb. 4.1.18). Folglich kommt es zur Bindung und Phosphorylierung von Caveolin durch die aktivierten Rezeptoren und zur Entstehung von sogenannten Caveolae, die ebenfalls eine Internalisierung des Rezeptors ermöglichen (Clathrin-unabhängige/ Caveolin-abhängige Internalisierung). Experimentelle Untersuchungen zeigten in Gegenwart von Caveolin eine Akkumulation von aktivierten Rezeptoren in perinuklearen Kompartimenten, die mit einer verlängerten EGFR-Aktivierung und Signaltransduktion einhergingen (Khan et al., 2006).

In wie weit die E5-bedingte EGFR-Überaktivierung Folge einer veränderten Internalisierung ist, sollte zunächst mittels Immunblot-Analysen geklärt werden.
Leervektor und E5 transduzierte HaCaT-Zellen wurden nach 16 h im serum-freien Kulturmedium wie in Abschnitt 3.3.8.2.1 beschrieben mit den Inhibitoren Chlorpormazin (C), Methyl-β-cyclodextrin (M), Nystatin (N) oder Filipin (F) vorinkubiert und anschließend in Gegenwart des Inhibitors für 15 min mit EGF stimuliert. Die Immunblot-Analyse erfolgte unter Verwendung von phospho-Tyrosin spezifischen Primärantikörpern. Die Detektion und Quantifizierung der Banden wurde mit dem Odyssey Infrared Imaging System durchgeführt.

Die Inhibitoren Chlorpromazin und Methyl-β-cyclodextrin bewirken eine Inhibierung der Clathrin-abhängigen Internalisierung der EGF-Rezeptoren. Nystatin und Filipin verursachen hingegen eine Hemmung der Clathrin-unabhängigen/ Caveolin-abhängigen Internalisierung. Während Chlorpromazin die Zusammenlagerung von Clathrin und damit die Ausbildung von Clathrin-beschichteten Vesikel verhindert, bildet Methyl-β-cyclodextrin Komplexe mit Cholesterol und bewirkt die Auflösung von sogenannten

lipid rafts. Die Inhibitoren Nystatin und Filipin verursachen auch eine Reduktion des freien Cholesterol in der Plasmamembran, indem sie Cholesterol binden. Jedoch verbleiben die Komplexe in der Membran. Alle vier Inhibitoren haben eine Störung der EGFR-Internalisierung bzw. des endozytotischen EGFR-Transports in der Zelle zur Folge.

Die in Abb. 4.2.1 dargestellten Immunblots repräsentieren jeweils eines von drei Experimenten zur Untersuchung der Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Internalisierung aktivierter EGF-Rezeptoren. Die Quantifizierung der mittleren Intensitäten erfolgte anhand aller durchgeführten Experimente. Für alle experimentellen Ansätze konnte eine Phosphorylierung und Aktivierung der EGF-Rezeptoren nach EGF-Stimulation beobachtet werden. Sowohl für die Clathrin-abhängige, als auch für die Clathrin-unabhängige Internalisierung konnte jedoch in den E5-exprimierenden Zellen keine EGFR-Überaktivierung im Immunblot nach Inkubation mit den Inhibitoren und 15minütiger EGF-Behandlung nachgewiesen werden.

Die mittlere Intensitäten nach Inhibierung der Clathrin-abhängigen Internalisierung war in E5-exprimierenden Zellen auf das Niveau der Kontrollen gesunken (Abb. 4.2.1 links und Diagramm). Nach der Chlorpromazin-Behandlung betrug die mittlere Intensität zum Zeitpunkt t_{15} etwa 700 pixels/mm^2. Nach der Methyl-β-cyclodextrin konnte für beide Zellpopulationen eine mittlere Intensität von ca. 1000 pixels/mm^2 ermittelt werden, die damit 1,4-mal so groß war wie die der Chlorpromazin behandelten Zellen.

Bezüglich der Clathrin-unabhängigen Internalisierung konnte in den E5-exprimierenden Zellen ebenfalls eine Abnahme der mittleren Intensität etwas unterhalb des Niveaus der Kontroll-Zellen von etwa 450 pixels/mm^2 dokumentiert werden (Abb. 4.2.1 rechts und Diagramm). Nach Filipin-Behandlung betrug die mittlere Intensität in den E5-Zellen nur ca. 350 pixels/mm^2.

Infolge der Behandlung konnte keine 100% Inhibierung der Endozytose durch die vier Inhibitoren hervorgerufen werden. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass sowohl Clathrin, als auch Caveolin bei der Endozytose aktivierter Rezeptoren eine Rolle spielen.

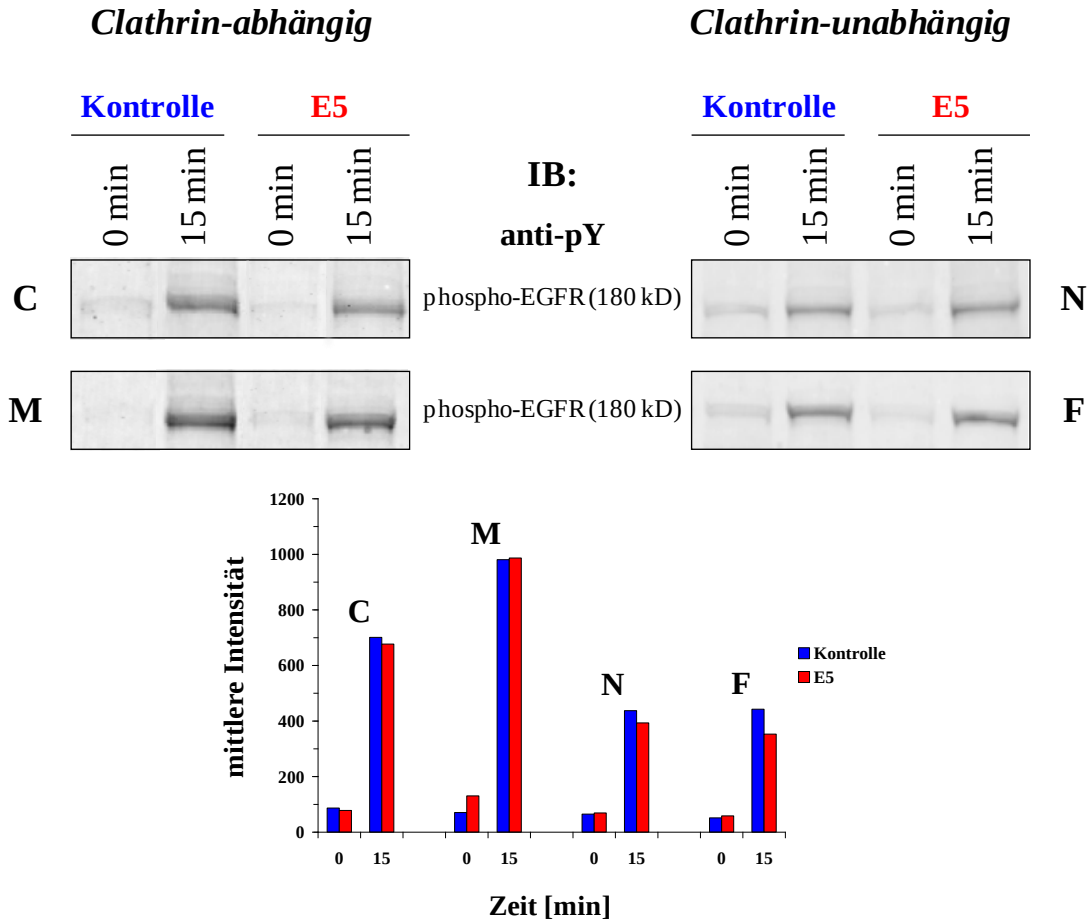


Abb. 4.2.1 Quantitative Immunblots zur Analyse der Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Internalisierung von aktivierten EGF-Rezeptoren. Retroviral transduzierte HaCaT-Zellen wurden mit Inhibitoren zur Hemmung der Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Internalisierung behandelt und mit EGF für 15 min stimuliert. Die extrahierten und aufgetrennten Proteine wurde im Immunblot mit pY-Primärantikörpern analysiert. Die Detektion und Quantifizierung der Daten erfolgte mittels Odyssey Infrared Imaging System. Der Immunblot ist repräsentativ für ein Experiment, das Diagramme gibt die Daten aus drei unabhängigen Experimenten wieder.

Bei einem Vergleich der mittleren Intensitäten zwischen Clathrin-abhängiger und -unabhängiger Internalisierung fiel auf, dass die Intensitäten nach der Behandlung mit Chlorpromazin- und Methyl-β-cyclodextrin 1,5 bzw. 2,2-mal so groß waren wie die der Nystatin- und Filipin behandelten Zellen (Abb. 4.2.1 Diagramm). Um eine sichere These über die Ursache dieser verminderten EGFR-Aktivierung nach Inhibierung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung aufstellen zu können, sind weitere Experimente erforderlich.

4.2.1 Kinetische Analyse der Clathrin-abhängigen Internalisierung

Um eindeutige Aussagen über die Clathrin-abhängige Internalisierung in E5- und Leervektor-transduzierten Zellen treffen zu können, wurden kinetische Untersuchungen bezüglich der EGFR-Aktivierung und Oberflächenrezeptor-Verteilung durchgeführt. Dazu wurden die retroviral transduzierten HaCaT-Zellen mit dem entsprechenden Inhibitor Chlorpromazin oder Methyl-β-cyclodextrin vorinkubiert und im Anschluss in Anwesenheit des Inhibitors für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min mit EGF stimuliert. Die Durchführung des ICW bzw. OCW erfolgte wie in Abschnitt 3.4.10 beschrieben. Die Resultate von zwei biologischen Replikaten sind in Abb. 4.2.2 dargestellt und zeigen das Verhältnis aus phospho- und Gesamt-EGFR bzw. Oberflächen- und Gesamt-EGFR.

Nach Inhibierung mit Chlorpromazin konnte zum Zeitpunkt t_2 in den E5-Zellen eine leichte EGFR-Überaktivierung im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abb. 4.2.2 A) beobachtet werden. Nach 5minütiger EGF-Stimulation war die Intensität bereits auf das Niveau der Kontrolle gesunken. Im restlichen Stimulationszeitraum konnten keine Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen in Bezug auf die mittlere Intensität detektiert werden. Nach 10 min zeigten beide Zellpopulationen eine starke Abnahme der Intensität, die nur noch 80% der Ausgangsintensität betrug. Danach pegelte sich die mittlere Intensität wieder auf etwa 90% des Ausgangsniveaus ein. Während in der Kontrolle die Internalisierung von aktivierten Rezeptoren durch Chlorpromazin vollständig inhibiert wurde, konnten die aktivierten EGFR in den E5-Zellen zunächst normal internalisiert werden. Eine langanhaltende Aktivierung in Anwesenheit von E5 wurde jedoch nicht dokumentiert. Bereits zum Zeitpunkt t_5, direkt nach der Internalisierung, waren die Rezeptoren deaktiviert.

Die Kinetik der Oberflächenrezeptoren nach Chlorpromazin-Behandlung wies keine Unterschiede zu den unbehandelten Zellen auf (Abb.4.2.2 C und Abb. 4.1.6 D). In Bezug auf die mittlere relative Intensität konnte in den E5-exprimierenden Zellen nach Chlorpromazin-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten E5-Zellen eine schwächere Intensität dokumentiert werden, die annähernd dem Level der Chlorpromazin behandelten Kontroll-Zellen entsprach. Im Verlauf der EGF-Stimulation betrug das Verhältnis Oberflächen-EGFR zu Gesamt-EGFR im Durchschnitt das 1,1fache der Chlorpromazin behandelten Kontrolle. Insgesamt fiel, verglichen mit den

unbehandelten Zellen, nach Inhibierung mit Chlorpormazin eine schnellere und stärkere Abnahme der mittleren relativen Intensität von Oberflächenrezeptoren auf. Das Intensitätsniveau unbehandelter Zellen zum Zeitpunkt t_{60} wurden in Chlorpromazin behandelten Zellen bereits nach 15 min erreicht.

Die Aktivierung und Clathrin-abhängige Internalisierung von Rezeptoren konnte durch Chlorpromazin gehemmt werden. Daher findet die Internalisierung vermutlich über Clathrin-haltige Vesikel statt.

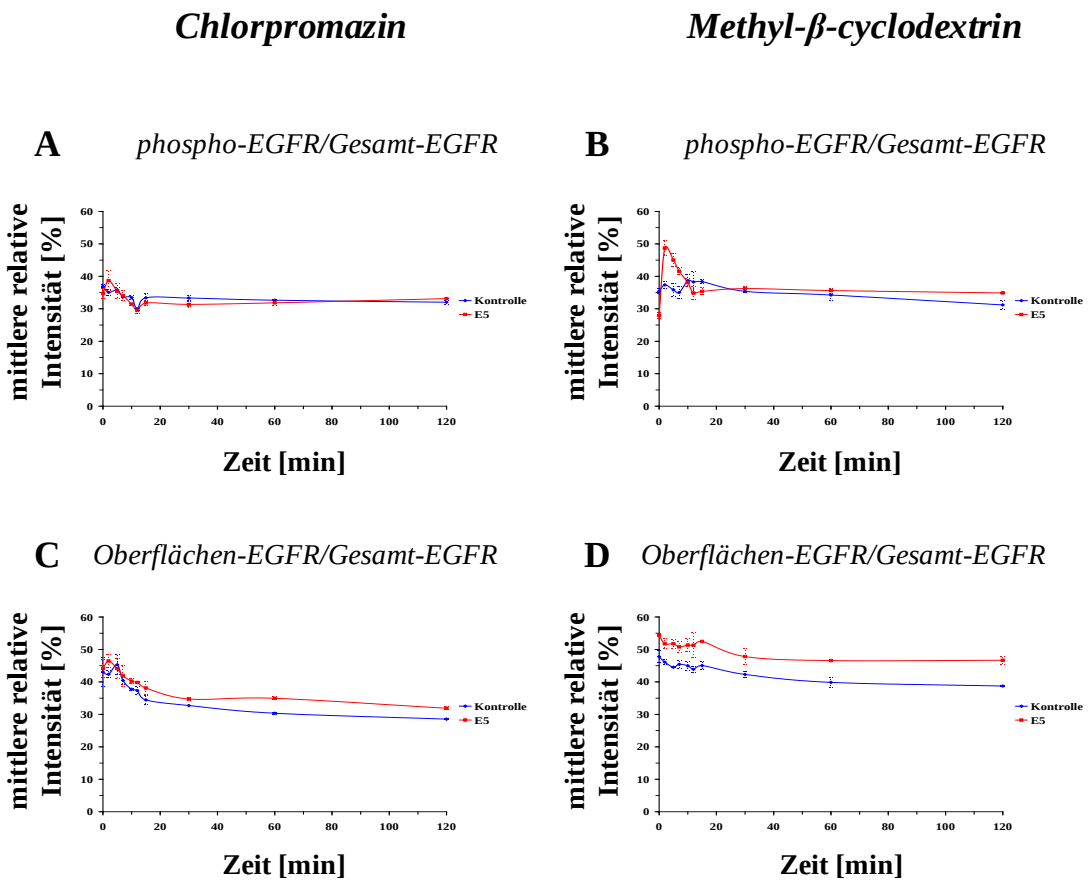


Abb. 4.2.2 Kinetik der EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach Inhibierung der Clathrin-abhängigen Internalisierung. Retroviral transduzierte HaCaT-Zellen wurden nach Vorinkubation mit **A und C:** Chlorpromazin oder **B und D:** Methyl-β-cyclodextrin für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min mit EGF behandelt und mit Hilfe des In- bzw. On-Cell Western Blots auf phospho-, Gesamt- und Oberflächen-EGFR analysiert. Die mittlere relative Intensität wurde anhand von zwei biologischen Replikaten ermittelt.

Die Inhibierung mit Methyl-β-cyclodextrin, das die Komplexierung von Cholesterol in den zellulären Membranen und die Freilassung von *lipid raft* gebunden Rezeptoren bewirkt, führte zu Beginn der EGF-Behandlung zu einer starken EGFR-Überaktivierung

in den E5-exprimierenden Zellen (Abb. 4.2.2 B). Zu den Zeitpunkten t_2 und t_5 betrugen die mittleren relativen Intensitäten das 1,3fache der Kontroll-Zellen. Nach 7 min war die Intensität noch etwa 1,2-mal so groß. In den Kontroll-Zellen konnten ähnliche Aktivierungslevel wie in den unbehandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.2.2 C und Abb. 4.1.6 C). Zu den Zeitpunkten t_{10} und t_{12} wurde in Anwesenheit von E5 nur noch eine 90%ige Intensität zu der von Leervektor-transduzierten Zellen beobachtet. Nach 30 bis 120 min konnten keine Intensitätsunterschiede in E5- und Kontroll-Zellen nachgewiesen werden. Weder in den Leervektor-transduzierten Zellen, noch in den E5-transduzierten Zellen konnte eine Inhibierung der Internalisierung aktivierter Rezeptoren durch Methyl-β-cyclodextrin dokumentiert werden. In Bezug auf E5 fiel auf, dass die Überaktivierung auf die ersten Minuten beschränkt war. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen konnte keine langanhaltende Überaktivierung festgestellt werden.

Auch die Kinetik der Oberflächen-EGFR von Methyl-β-cyclodextrin behandelten Zellen zeigten keine Unterschiede zu den unbehandelten Leervektor- und E5-transduzierten HaCaT-Zellen (Abb. 4.2.2 D und Abb. 4.1.6 D). Jedoch fiel im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf, dass die Abnahme der mittleren relativen Intensität von Oberflächenrezeptoren insgesamt deutlich langsamer erfolgte. Nach 120 min entsprach die mittlere relative Intensität der Methyl-β-cyclodextrin behandelten Zellen dem Intensitätslevel von t_{15} in unbehandelten Zellen. Die E5-Zellen wiesen nach Methyl-β-cyclodextrin-Behandlung zum Zeitpunkt t_{120} eine mittlere relative Intensität von etwa 47% auf. In den Kontroll-Zellen betrug die mittlere relative Intensität nach 120 min etwa 40%. Der Vergleich des Verhältnisses von Oberflächen- zu Gesamt-EGFR in Methyl-β-cyclodextrin behandelten Kontroll- und E5-Zellen zeigte im Laufe der EGF-Stimulation eine etwa 1,1 bis 1,2-mal so große mittlere relative Intensität von Oberflächenrezeptoren in Anwesenheit von E5. Ähnliche Verhältnisse konnten auch in den unbehandelten Zellen beobachtet werden.

Die Daten zeigen, dass die Aktivierung der Rezeptoren nicht duch Methyl-β-cyclodextrin inhibiert wurde, jedoch konnte keine Internalisierung der Rezeptoren über Clathrin erfolgen.

Um diese Ergebnisse zu bekräftigen wurde eine 3D-Bildanalyse von retroviral transduzierten HeLa-Zellen, die nach der EGF-Behandlung fixiert und permeabilisiert wurden, um anschließend eine gleichzeitigen Färbung von Clathrin und phospho- oder Gesamt-EGFR durchzuführen.

Zunächst wurde die Kolokalisation von Clathrin und aktivierten Rezeptoren im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation und deren Lokalisation in der Zelle untersucht. Wie bereits die Bildanalyse in Abschnitt 4.1.5 und Abb. 4.1.10 zeigte, konnte in Anwesenheit von HPV16 E5 eine langanhaltende Überaktivierung der EGF-Rezeptoren beobachtet werden. Da sich Aktivierung, Vesikelintensitäten, -größen usw. im Verlauf des endozytotischen Transports nicht von denen aus Abb. 4.1.10 gewonnenen Daten unterschied, wird an dieser Stelle und in den nachfolgenden 3D-Bildanalysen auf eine ausführliche Beschreibung bezüglich der EGFR-Phosphorylierung sowie der zeitlichen und räumlichen Verteilung der phospho-EGFR-Vesikel verzichtet. Zudem sind im Rahmen dieser und der folgenden Bildanalysen vor allem die Kurvenverläufe der quantifizierten Daten (Vesikelgröße und Vesikelintensität) im Kontext der EGF-Stimulation von Bedeutung, Standardabweichungen oder Ähnliches spielen eine untergeordnete Rolle.

Der Fokus der 3D-Bildanalyse war hauptsächlich auf die Kolokalisation von Clathrin- und phospho-EGFR-Vesikeln gerichtet (Abb. 4.2.3). Nach 2 minütiger EGF-Stimulation konnten in beiden Zellpopulationen kaum Kolokalisationen nachgewiesen werden. Die wenigen kolokalisierenden Vesikel konzentrierten sich vorwiegend auf den zytoplasmatischen Bereich nahe der Plasmamembran. In den E5-Zellen konnte bereits nach 5 min eine starke Kolokalisation von phospho-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln beobachtet werden, die als Cluster in der Nähe des Nukleus lokalisiert waren. Stattdessen wurde in den Kontrollen erst nach 7 min eine große Anzahl internalisierter, kolokalisierender Vesikel in Kernnähe dokumentiert. In beiden Zellpopulationen konnte eine starke Kolokalisation von Clathrin- und phospho-EGFR-haltigen Vesikeln im Zeitintervall von 15 min nachgewiesen werden. Jedoch fiel vor allem für die E5-exprimierenden Zellen auf, dass die kolokalisierenden Vesikeln nach 7 min weniger in Clustern in Kernnähe angeordnet waren, sondern in der Zelle verstreut auftraten. Nach 30 und 60 min wurden in beiden Zellpopulationen nur noch eine geringe Anzahl kleiner phospho-EGFR-Vesikel detektiert, die mit Clathrin-Vesikel kolokalisieren.

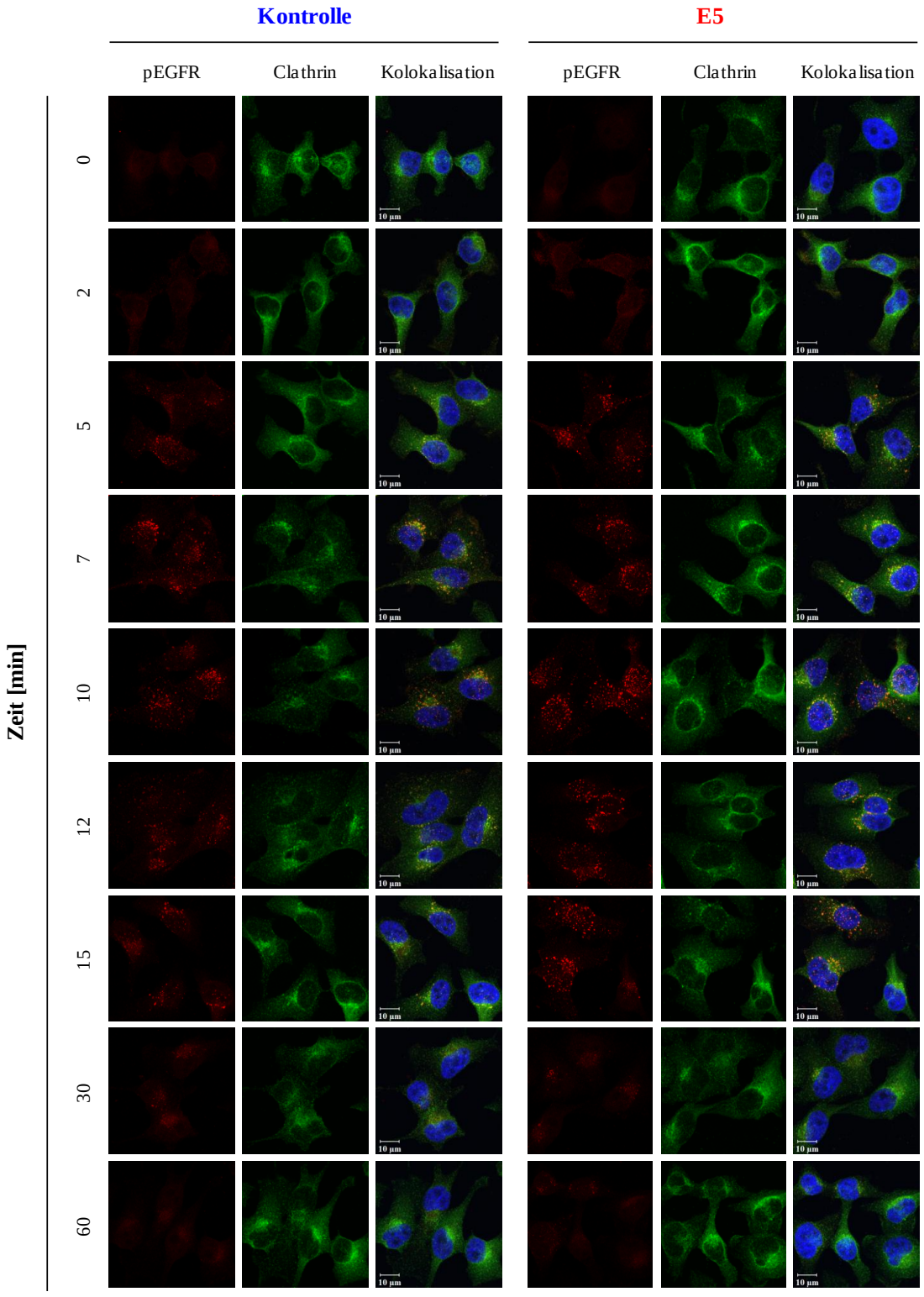


Abb. 4.2.3 Drei-dimensionale Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Clathrin-abhängigen Internalisierung nach Rezeptoraktivierung in HeLa-Zellen. Leervektor- und E5-transduzierte HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Medium für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30 und 60 min mit EGF behandelt und schließlich in einer Doppelimmunfluoreszenz Clathrin und phospho-EGFR angefärbt. Der Nukleus wurde mit DAPI sichtbar gemacht und pro Zeitpunkt etwa 30 bis 50 Zellen am LSM710 von Zeiss aufgenommen. Die dargestellten Bilder sind maximale Intensitätsprojektionen der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung.

Die quantitative Analyse der 3D-Bilder erfolgte wie in Abschnitt 4.1.5 und Tabelle 4.1.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2.4 aufgeführt. Zunächst wurden wie in der vorigen Bildanalyse die Kompartimente Nukleus (Zytoplasma in unmittelbarer Nähe zum Zellkern; Abb. 4.2.4 B und D) und Zytoplasma (restliche Zytoplasma, nicht in Kernnähe; Abb. 4.2.4 A und C) separat betrachtet.

Verglichen mit den Kontroll-Zellen konnte im Zytoplasma der E5-exprimierenden Zellen zu Beginn der EGF-Stimulation eine stärkere Zunahme der Vesikelintensität und -anzahl beobachtet werden (Abb. 4.2.4 A und C). Die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel zum Zeitpunkt t_5 betrug in den E5-Zellen etwa das Doppelte, während die Vesikelanzahl ca. das 1,5fache der Kontrolle betrug.

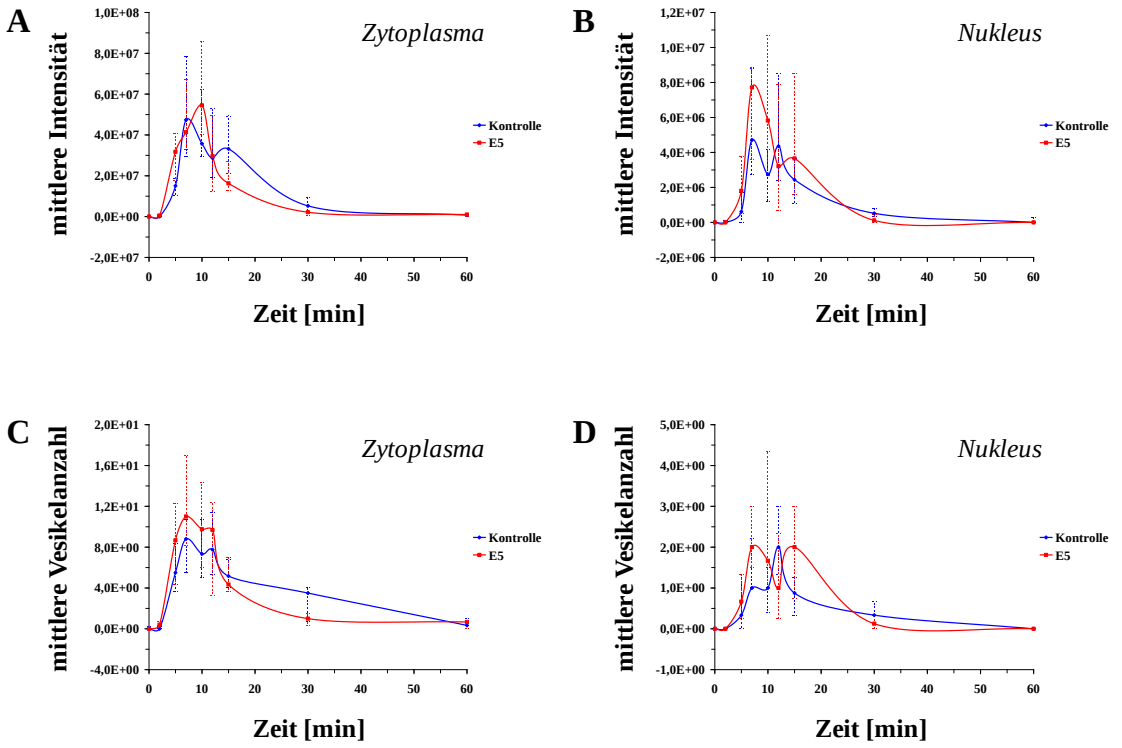


Abb. 4.2.4 Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit Clathrin-Vesikel im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus kolokalisieren. Die Quantifizierung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.2.3. Die Anzahl aufgenommener und analysierter Zellen pro Zeitpunkt betrug zwischen 30-50. Der Median wird durch Rhombus bzw. Quadrat angezeigt, die Quartile sind als Balken wiedergegeben.

Nach 7 min war die mittlere Intensität in beiden Zellpopulationen auf ein annähernd gleiches Niveau angestiegen. Die Vesikelanzahl nahm ebenfalls in beiden Zellpopulationen zu, wobei sie in den E5-Zellen etwa 1,3-mal so groß war wie in den Kontroll-Zellen. Während nach 10 min die Anzahl kolokalsierender Vesikel in beiden Zellpopulationen langsam abnahm, konnte bezüglich der Vesikelintensitäten in den E5-Zellen eine weitere Zunahme, in den Kontrollen hingegen eine starke Verringerung der Intensität dokumentiert werden. Im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen betrug die mittlere Intensität der E5-exprimierenden Zellen ca. das 1,5fache. Zum Zeitpunkt t_{12} waren die Intensitäten beider Zellpopulation auf etwa gleiches Level gesunken. Die Vesikelanzahl blieb dagegen konstant. Nach 15 min konnte in Hinsicht auf die Vesikelintensität und -anzahl im Zytoplasma eine Wendung beobachtet werden. Sowohl die Intensität, als auch die Anzahl kolokalisierender Vesikel nahm in den E5-exprimierenden Zellen stärker ab als in den Kontroll-Zellen. Die mittlere Intensität war in der Kontrolle 1,3-mal so groß wie in den E5-Zellen. Die Vesikelanzahl betrug etwa das 1,2fache. Nach 30 min glichen sich die Intensitäten kolokalisierender Vesikel in den E5- und Kontroll-Zellen einander wieder an. Die mittlere Intensität entsprach in etwa dem Ausgangslevel. Die Vesikelanzahl in den Kontrollen nahm im Vergleich zu den E5-exprimierenden Zellen nur langsam ab und war etwa doppelt so groß. Zum Zeitpunkt t_{60} konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen in Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel festgestellt werden. Nach 60 min war schließlich das Ausgangsniveau erreicht.

Die Kinetiken der Intensität und Anzahl in Kernnähe waren zu Beginn und Ende der EGF-Behandlung identisch mit der im Zytoplasma (Abb. 4.2.4). Nach 12 und 15 min wurden jedoch Unterschiede zum Zytoplasma beobachtet. Sowohl die Vesikelanzanhl, als auch die Intensität kolokalisierender Vesikel waren zum Zeitpunkt t_{12} in den E5-exprimierenden Zellen deutlich geringer als in den Kontroll-Zellen (Abb. 4.2.4 D). Für die mittlere Intensität konnte in den Leervektor transduzierten Zellen das 1,3fache festgestellt werden (Abb. 4.2.4 C). Die Vesikelanzahl in den Kontrollen betrug sogar das Doppelte der Anzahl in E5-Zellen. Nach 15 minütiger EGF-Stimulation war das Gegenteil der Fall. Die Vesikelanzahl in E5-Zellen stieg um das Doppelte zu t_{12} an und war im Vergleich zur Kontrolle etwa 2,3-mal so groß. Verglichen mit t_{12} nahm die Intensität in E5-exprimierenden Zellen nur geringfügig zu, während in den Kontrollen

eine starke Abnahme zu beobachten war. In den E5-Zellen konnte eine 1,5fache Intensität gegenüber den Kontroll-Zellen dokumentiert werden.

Diese Daten zeigen eine deutliche Disposition von Clathrin zu den frühen Zeitpunkten der EGF-vermittelten EGFR-Aktivierung und Internalisierung. In Gegenwart von E5 wurde die Clathrin-abhängige Internalisierung von EGFR deutlich vorangetrieben.

Schließlich wurden die Ergebnisse der mittleren Intensität und Vesikelanzahl für die einzelnen Kompartimente zusammengefasst und in Abb. 4.2.5 A zum Vergleich in einem Diagramm wiedergegeben. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an kolokalisierenden Vesikeln zur Gesamtanzahl von phospho-EGFR-Vesikeln ermittelt (Abb. 4.2.5 B). So können Rückschlüsse über die prozentuale Verteilung von aktivierten Rezeptoren in den verschiedenen zellulären Kompartimenten zu einem bestimmten Zeitpunkt getroffen werden.

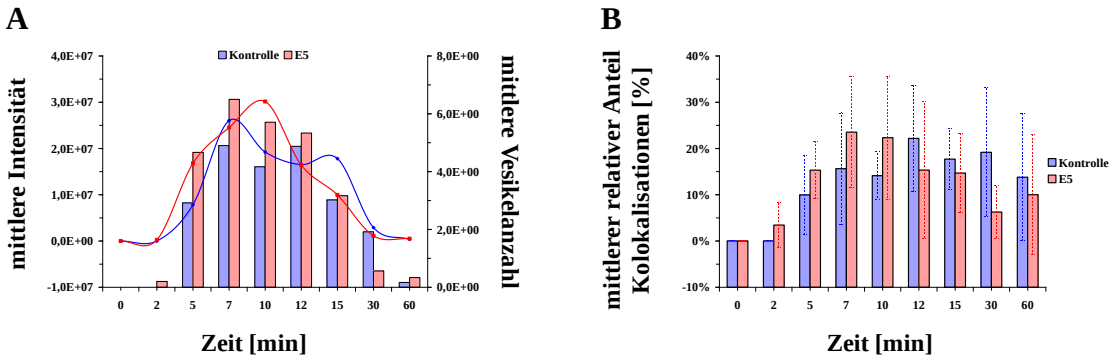


Abb. 4.2.5 Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel, die mit Clathrin-haltigen Vesikeln kolokalisieren in Unabhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel aus durchschnittlich 30-50 aufgenommen und analysierten Zellen basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.2.3. **A:** Die Linien geben die mittlere Intensität im zeitlichen Verlauf wieder. Die mittlere Vesikalanzahl der entsprechenden Zeitpunkte ist in Form von Balken dargestellt. **B:** Quantifizierung des prozentualen Anteils von kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zum gesamten phospho-EGFR-Anteil.

Vor Beginn der EGF-Stimulationen waren in beiden Zellpopulationen keine kolokalisierenden Vesikel nachweisbar (Abb. 4.2.5). Während in den E5-Zellen bereits nach 2 min etwa 3% der phospho-EGFR Vesikel mit Clathrin-haltigen Vesikeln kolokalisieren, waren in den Kontrollen weiterhin keine kolokalisierenden Vesikel detektierbar. Erst nach 5 min konnten in den Kontroll-Zellen Kolokalisationen

nachgewiesen werden. Dennoch betrug in den E5-exprimierenden Zellen der relative und absolute Anteil kolokalisierenden Vesikel im Vergleich zu den Kontrollen das 1,5 bzw. 2fache. Verglichen mit der Kontrolle konnte für die mittlere Intensität in den E5-Zellen ebenfalls das Doppelte beobachtet werden. Nach 7 minütiger EGF-Stimulation waren die mittleren Intensitäten kolokalisierender Vesikel in beiden Zellpopulationen gleich. Die absolute und relative Vesikelanzahl in E5-exprimierenden Zellen erreichte zum Zeitpunkt t_7 die maximale Anzahl kolokalisierender Vesikel und betrug das 1,6fache im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen. Nach 10 min konnte bezüglich der Vesikelanzahl ähnliche Verhältnisse zwischen E5- und Kontroll-Zellen beobachtet werden. Für die Intensität der kolokalisierenden Vesikel konnte in den E5-exprimierenden Zellen das Maximum detektiert werden, während die Intensität der Kontroll-Zellen im Vergleich zu t_7 um das 1,4fache reduziert war.

Der Zeitpunkt t_{12} kennzeichnete in Hinsicht auf die mittlere Intensität und den relativen Anteil kolokalisierender Vesikel einen Wendepunkt. Während die absolute Vesikelanzahl in E5-Zellen immer noch oberhalb der Anzahl in den Kontrollen lag, war der relative Anteil kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen um das 1,5fache niedriger. Für beide Zellpopulationen konnte nach 12 min in etwa die gleiche mittlere Intensitäten beobachtet werden. Im Vergleich zum Zeitpunkt t_{10} blieb die Intensität der Kontrollen nahezu konstant, in Anwesenheit von E5 war eine 1,8fache Reduktion der Intensität nachweisbar. Während nach 15 min die Intensität in den E5-exprimierenden Zellen weiter gesunken war, zeigte die Intensität der Leervektor transduzierten Zellen keine Veränderung. In Bezug auf die absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel konnten ebenfalls keine großen Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen dokumentiert werden. Der relative Anteil hingegen war in den Kontrollen 1,3-mal so groß wie der in Gegenwart von E5. Verglichen mit den E5-Zellen betrug nach 30 min sowohl der relative, als auch absolute Anteil kolokalisierender Vesikel in den Leervektor transduzierten Zellen ca. das 3fache. Die mittleren Intensitäten entsprachen nach 30 und 60 minütiger EGF-Stimulation in etwa dem Ausgangslevel. Die absolute Vesikelanzahl war ebenfalls auf Ausgangsniveau gesunken. Etwa 10 bis 15% der phospho-EGFR-Vesikel kolokalisierten nach 60 min noch mit Clathrin-haltigen Vesikeln.

Als nächstes wurde geprüft, in wie weit Gesamt-EGFR- und Clathrin-haltige Vesikel miteinander kolokalisierten und ob sich die Kinetiken zu phospho-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln unterschieden. Die Abb. 4.2.6 stellt ein Beispiel von jeweils 30 bis 50 aufgenommen Zellen pro Zeitpunkt dar. Das Hauptaugenmerk der Untersuchung war auf die Lokalisation und Kolokalisation von EGFR und Clathrin in der Zelle im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation gerichtet.

Nach 2minütiger Stimulation konnten in beiden Zellpopulationen nur vereinzelt kolokalisierende Vesikel schwacher Intensität detektiert werden. Im Zeitintervall von 5 bis 12 min waren sowohl in den Kontroll-Zellen, als auch in den E5-Zellen starke Kolokalisationen nachweisbar. Zunächst formierten die Vesikel in großen Clustern in der Nähe des Nukleus, später waren sie mehr verstreut um den Zellkern angeordnet. Während in den Kontrollen nach 15 min noch starke Kolokalisationen beobachtet werden konnten, waren in den E5-Zellen vergleichsweise wenig kolokalisierende Vesikel sichtbar. Nach 30 und 60 minütiger EGF-Stimulation konnten in beiden Zellpopulationen nur noch vereinzelt Kolokalisationen von EGFR und Clathrin dokumentiert werden. Zudem hatte sich die Intensität, Anzahl und Größe von EGFR-Vesikeln im Vergleich zu den Zeitpunkten t_7 bis t_{30} nach 60 min deutlich reduziert. Auch die Clathrin-Vesikel zeigte nach 30 und 60 min eine Abnahme der Vesikelgröße und Intensität verglichen mit dem mittleren Stimulationszeitraum. Während die Clathrin-Vesikel zu Beginn und Ende der EGF-Stimulation klein und in der Zelle größtenteils verstreut waren, wurden sie zu den Zeitpunkten t_7 bis t_{15} vorwiegend in Kernnähe in Form von großen Vesikel mit starker Intensität sichtbar. Das lässt vermuten, dass die Zellen mit den frühen Endosomen fusionierten.

Die in Abb. 4.2.7 quantifizierten Daten der 3D-Bildanalyse zeigen die mittlere Intensität und Anzahl von kolokalisierenden Vesikeln der entsprechenden Kompartimente. Auffällig für die Kinetik der kolokalisierenden Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe von E5-Zellen war eine schnelle und starke Zunahme der mittleren Intensität, die in eine fast genauso schnelle und starke Abnahme überging (Abb. 4.2.7 A und B). Während im Zytoplasma der E5-Zellen die maximale Intensität zum Zeitpunkt t_{10} verzeichnet werden konnte, war das Intensitätsmaximum der Vesikel E5-exprimierender Zellen in Kernnähe erst nach 12 min zu beobachten.

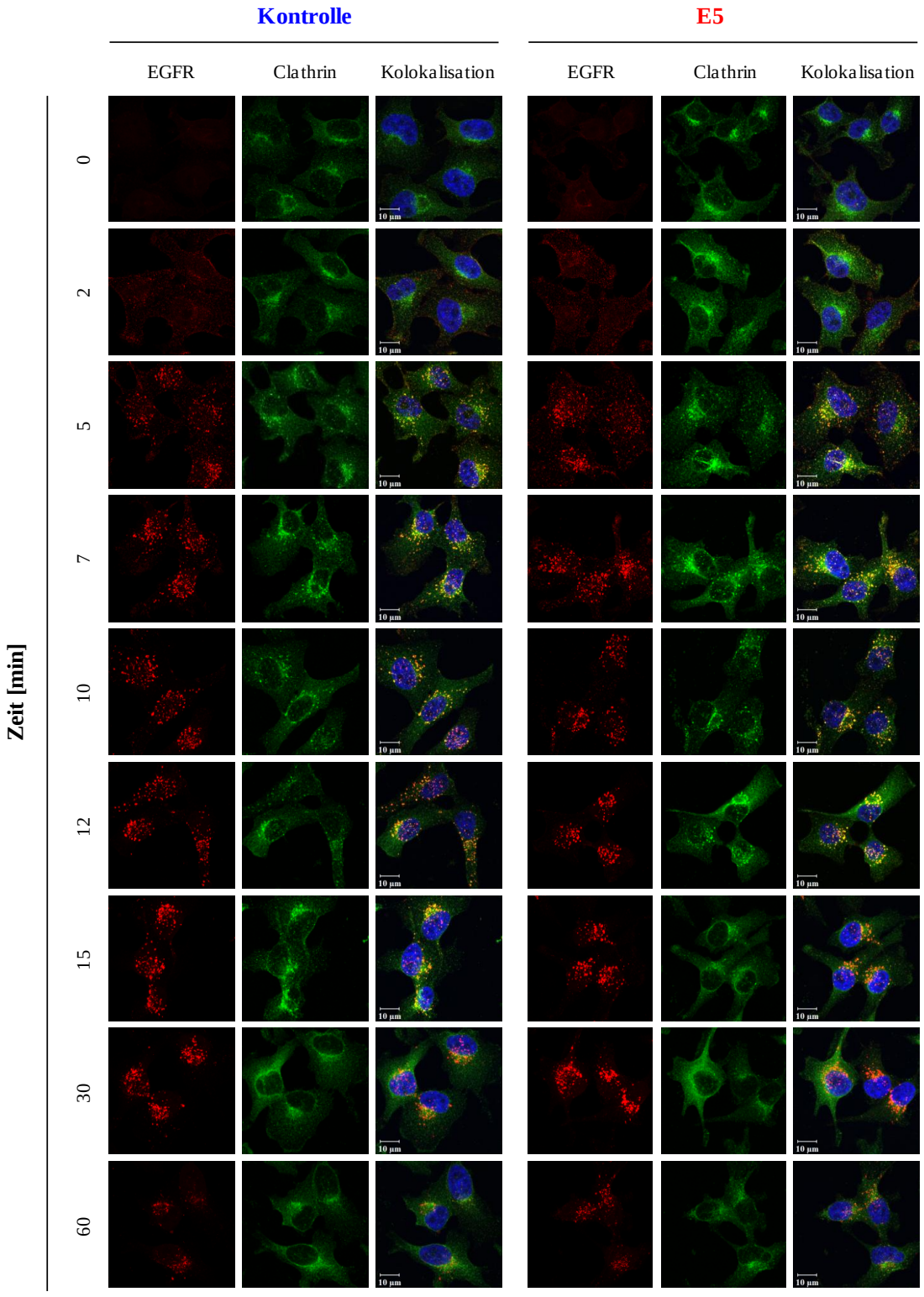


Abb. 4.2.6 3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Kolokalisation von Gesamt-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln in HeLa-Zellen. Retroviral transduzierte HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 16 h in serum-freies Medium überführt und anschließend für die oben aufgeführten Zeitintervalle mit EGF stimuliert. In einer Doppelimmunfluoreszenz und unter Verwendung von DAPI wurden EGFR- und Clathrin-haltige Vesikel sowie der Zellkern sichtbar gemacht. Dargestellt sind die maximalen Intensitätsprojektionen der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung für eine Aufnahme pro Zeitpunkt als Beispiel für die je 30 bis 50 am LSM710 aufgenommenen Zellen.

Verglichen mit den Kontroll-Zellen betrug die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel in Anwesenheit von E5 zum Zeitpunkt der Maxima das 1,8fache. In den Kontrollen stieg die mittlere Intensität der kolokalisierenden Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe zunächst auch relativ schnell an, war aber im Zeitintervall von t_7 bis t_{15} nahezu konstant (Abb. 4.2.7 A und B). Im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation konnte in den Kontrollen eine starke Abnahme der Intensität kolokalisierender Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe dokumentiert werden. Im Vergleich zum Plateau betrug die Intensität nach 30 min im Zytoplasma nur noch ein Sechstel, in Kernnähe etwa die Hälfte. Sowohl für die kolokalisierenden Vesikel im Zytoplasma, als auch in unmittelbarer Nähe zum Nukleus war nach 60 min in beiden Zellpopulationen schließlich das Ausgangslevel der mittleren Intensität erreicht.

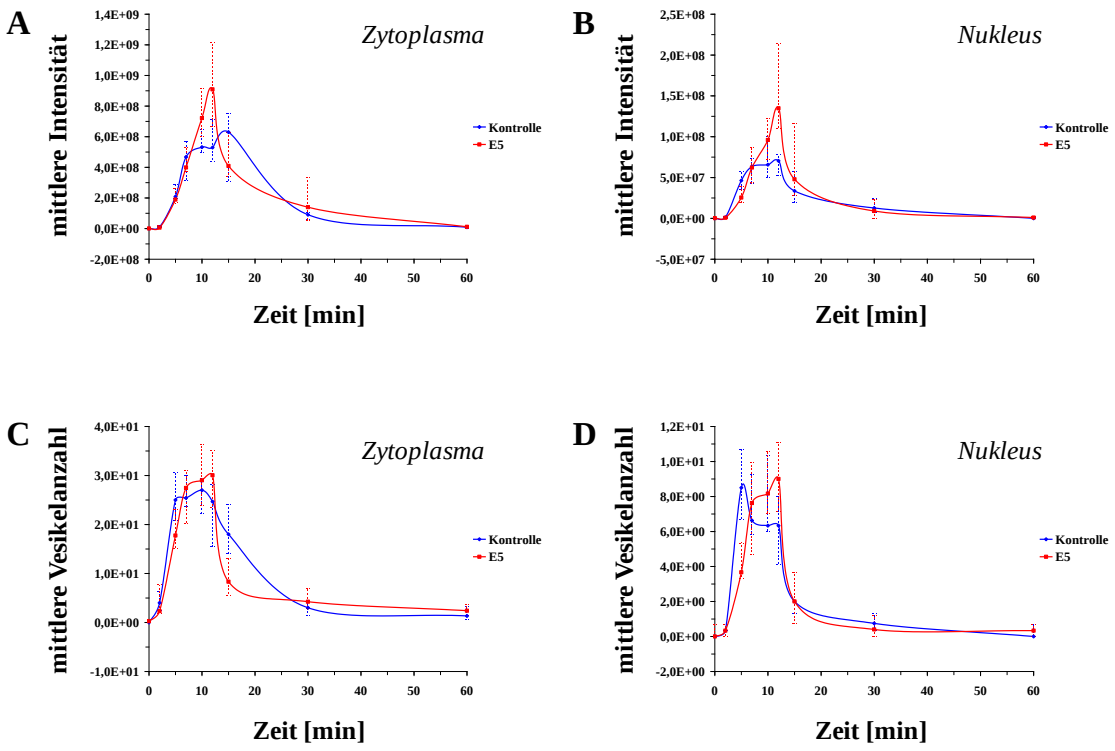


Abb. 4.2.7 Quantitative Analyse der Kolokalisation von Gesamt-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln im Zytoplasma und Kernnähe. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.2.6. Rhombus bzw. Quadrat stellen den Median dar, die Balken geben die Quartile an.

Für die mittlere Anzahl kolokalisierender Vesikel konnte im Zytoplasma beider Zellpopulationen innerhalb weniger Minuten eine starke Zunahme beobachtet werden (Abb. 4.2.7 C). Im Stimulationszeitraum von t_7 bis t_{12} konnte ein Plateau festgestellt werden. In den Kontrollen wurden im Mittel etwa 26 Vesikel pro Zelle detektiert. In Anwesenheit von E5 konnten im Durchschnitt ca. 30 kolokalisierende Vesikel pro Zelle dokumentiert werden. Nach 15 min wurde in den Kontroll-Zellen eine geringe Abnahme kolokalisierender Vesikel festgestellt, während in den E5-Zellen eine starke Reduktion der Vesikel verzeichnet werden konnte. Im Vergleich zu den E5-exprimierenden Zellen betrug die mittlere Anzahl kolokalisierender Vesikel in den Kontrollen das Doppelte. Nach 30 min war die Anzahl kolokalisierender Vesikel in beiden Zellpopulationen nahezu auf das Ausgangsniveau gesunken. In den E5-Zellen konnten im Durchschnitt fünf kolokalisierende Vesikel pro Zelle detektiert werden, in den Kontroll-Zellen etwa drei pro Zelle.

Anhand der Kolokalisationstudien von Gesamt-EGFR und Clathrin, konnte nachgewiesen werden, dass mehr als die Hälfte der EGF-Rezeptoren im inaktiven Zustand internalisiert werden. Verglichen mit den Leervektor-transduzierten Zellen war der Anteil nicht-phosphorylierter Rezeptoren in Clathrin-haltigen Vesikeln in Anwesenheit von E5 deutlich geringer.

Die Abb. 4.2.8 A zeigt die zusammengefassten Ergebnisse für mittlere Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel der einzelnen Kompartimente. Außerdem wurde der mittlere relative Anteil an kolokalisierenden Vesikeln zur Anzahl an Gesamt-EGFR-Vesikeln ermittelt. Die Resultate sind in Abb. 4.2.8 B dargestellt.

Bereits vor Beginn der EGF-Stimulation waren kolokalisierende Vesikel in E5-exprimierenden Zellen detektierbar (Abb. 4.2.8 A und B). Nach 2 min kolokalisierten etwa 8% der EGFR-Vesikel mit Clathrin-haltigen Vesikeln, während in den Kontroll-Zellen für 12% der EGFR-Vesikel eine Kolokalisation mit Clathrin nachgewiesen werden konnte. Auch für die absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel konnte in den Kontrollen das 1,5fache im Vergleich zu den E5-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Für die mittlere Intensität wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen dokumentiert. Verglichen mit t_0 hatte diese innerhalb der ersten beiden Minuten kaum zugenommen. Im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation stieg die

Intensität in Kontroll- und E5-Zellen gleichermaßen an. Zudem konnte in beiden Zellpopulationen eine Zunahme des relativen und absoluten Anteils kolokalisierender Vesikel detektiert werden. Nach 5 min betrug die absolute Vesikelanzahl in den Kontrollen das 1,5fache der Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen. Für den relativen Anteil konnte das 1,3fache nachgewiesen werden. Innerhalb der nächsten 2 min wuchs sowohl die relative, als auch absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen schneller an als in den Kontroll-Zellen. Während die relative Vesikelanzahl in beiden Zellpopulationen annähernd gleich war, konnte für die absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen eine leichte erhöhte Vesikelanzahl im zu den Kontroll-Zellen nachgewiesen werden. Verglichen mit den Leervektor-transduzierten Zellen waren zu den Zeitpunkten t_{10} und t_{12} die absolute und relative Anzahl sowie die Intensität kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen deutlich größer. Nach 10 min wurde in den E5-Zellen eine 1,3fache mittlere Vesikelintensität beobachtet, nach 12 min betrug diese sogar das 1,7fache. In Bezug auf die absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel konnte nach 10 min das 1,1fache zur Kontrolle detektiert werden, nach 12 min war das 1,4fache zu verzeichnen.

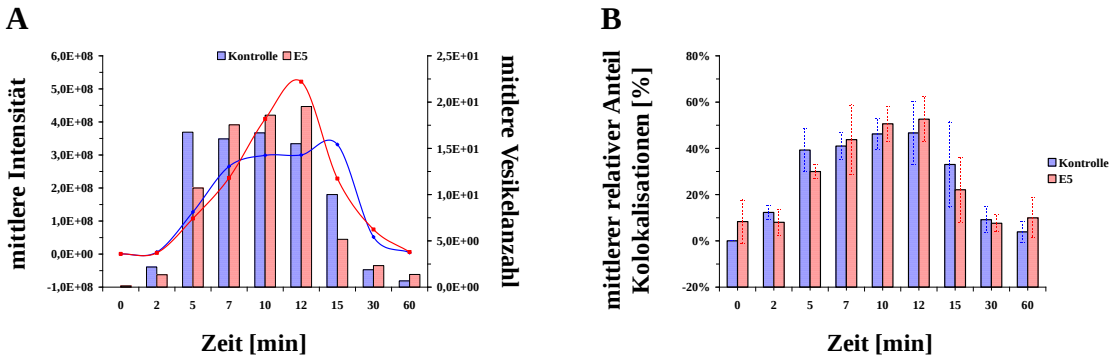


Abb. 4.2.8 Quantitative Analyse aller Gesamt-EGFR-Vesikel, die mit Clathrin-haltigen Vesikeln kolokalisieren und ohne Berücksichtigung ihrer zellulären Lokalisation. Die mittlere Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel wurden aus den Daten des in Abb. 4.2.6 dargestellten Experimentes bestimmt. **A:** Die Linien beschreiben die Kinetik der mittleren Intensität. Die Balken stehen für die mittlere Vesikelanzahl im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation. **B:** Quantitative Bestimmung des prozentualen Anteils kolokalisierender Vesikel im Vergleich zum Gesamt-EGFR-Anteil der Zelle.

Nach 15 minütiger EGF-Stimulation konnte für die Kolokalisation von Gesamt-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln ein Wendepunkt beobachtet werden. Für die Kolokalisation von aktivierten Rezeptoren und Clathrin wurde dieser Wendepunkt

bereits nach 12minütiger EGF-Behandlung dokumentiert. Mittlere Intensität, absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen fielen deutlich unter das Niveau der Kontroll-Zellen. Die mittlere Intensität in Anwesenheit von E5 betrug nur noch das 1,4fache der Vesikelintensität in den Kontroll-Zellen. In Hinsicht auf die absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel konnte in den E5-exprimierenden Zellen nur noch die Hälfte zur Vesikelanzahl der Kontrolle detektiert werden. Der relative Anteil an kolokalisierenden Vesikeln in Kontroll-Zellen war 1,5-mal so groß wie der in E5-Zellen. Nach 30 und 60minütiger EGF-Stimulation konnten in beiden Zellpopulationen nur noch wenige Rezeptoren, die mit Clathrin kolokalisierten, nachgewiesen werden. Sowohl Intensität, als auch absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel glichen sich in Kontroll- und E5-Zellen einander an und waren nahezu auf das Ausgangslevel gesunken.

Zusammenfassend kann aus der Analyse der Clathrin-abhängigen Internalisierung geschlussfolgert werden, dass in Anwesenheit von E5 die Aufnahme von aktivierten Rezeptoren in Clathrin-haltige Vesikel und die Internalisierung dieser Vesikel schneller und stärker erfolgte als in den Kontroll-Zellen. Zudem konnte die Clathrin-abhängige Internalisierung der aktivierten Rezeptoren in E5-Zellen nur zum Teil durch entsprechende Inhibitoren gehemmt werden, während in den Kontrollen nach Inhibitorbehandlung keine Internalisierung von aktivierten Rezeptoren nachweisbar war. Möglicherweise benutzen die E5-exprimierenden Zellen einen alternativen Weg zur Internalisierung von aktivierten EGF-Rezeptoren.

4.2.2 Kinetische Analyse der Clathrin-unabhängigen Internalisierung

Zum besseren Verständnis der EGFR-Internalisierung in E5- und Leervektor-transduzierten Zellen wurden zusätzlich zur Untersuchung der Clathrin-abhängigen Internalisierung kinetische Analysen bezüglich der Clathrin-unabhängigen Internalisierung vorgenommen. Dafür erfolgte zunächst eine Vorinkubation von retroviral transduzierten HaCaT-Zellen mit dem entsprechenden Inhibitor Nystatin oder Filipin, die eine Cholesterol-Sequestrierung und Zerstörung der *lipid raft*-Strukturen verursachen und dadurch den Clathrin-unabhängigen Internalisierungsweg hemmen. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart des Inhibitors für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30,

60 und 120 mit EGF stimuliert. Zur Untersuchung der EGFR-Aktivierung und Oberflächenrezeptor-Verteilung wurde wie in Abschnitt 3.4.10 beschrieben ein ICW bzw. OCW durchgeführt.

Die quantifizierten Daten aus zwei biologischen Replikaten zur Bestimmung des Verhältnisses aus phospho- und Gesamt-EGFR bzw. Oberflächen- und Gesamt-EGFR sind in Abb. 4.2.9 aufgeführt.

Nach Inhibierung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung mit Nystatin oder Filipin wurde in beiden Zellpopulation eine Aktivierung der EGF-Rezeptoren beobachtet, wobei in den E5-exprimierenden Zellen zu Beginn der EGF-Behandlung eine deutliche Überaktivierung der EGF-Rezeptoren detektiert werden konnte (Abb. 4.2.9 A und B).

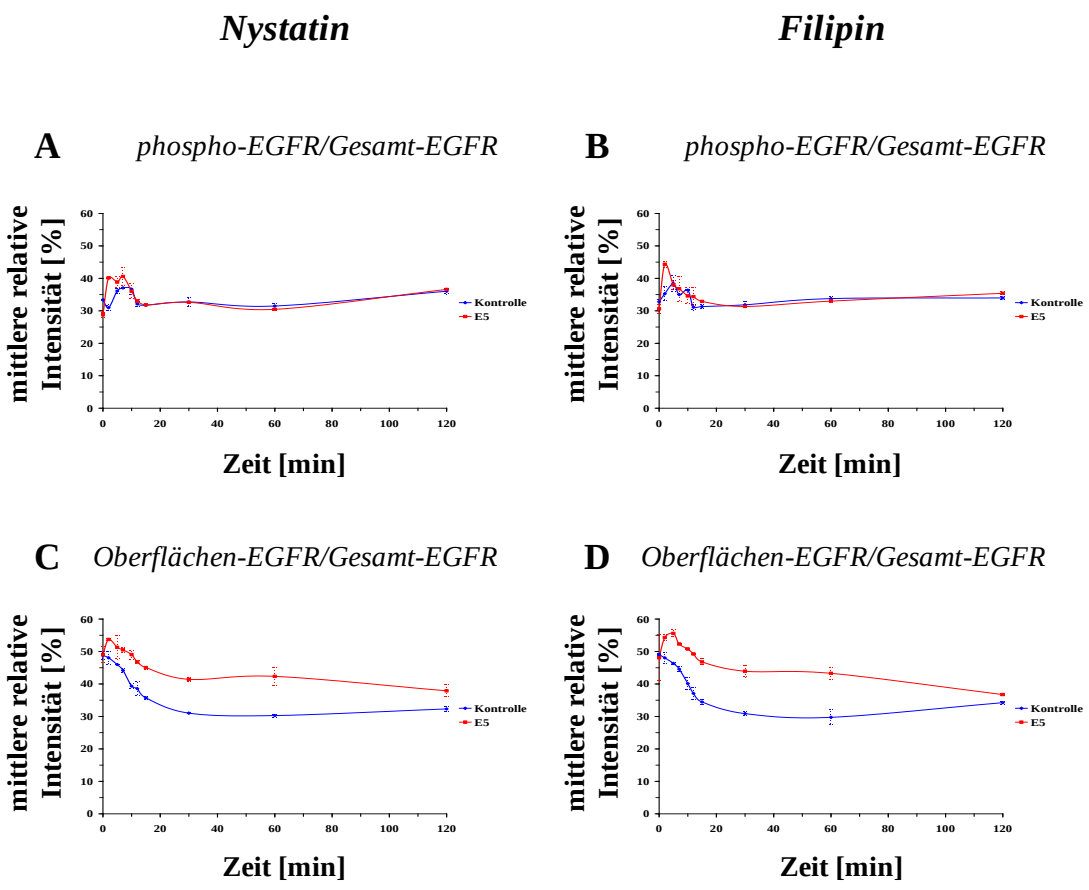


Abb. 4.2.9 Kinetische Analyse der EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach Inhibierung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung. Retroviral transduzierte HaCaT-Zellen wurden mit **A und C:** Nystatin oder **B und D:** Filipin vorinkubiert und anschließend für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min mit EGF stimuliert. Mittels In- bzw. On-Cell Western Blots wurden die Zellen bezüglich phospho-, Gesamt- und Oberflächen-EGFR untersucht. Die mittlere relative Intensität basiert auf zwei biologischen Replikaten.

Im Vergleich zur Inhibierung mit Filipin hielt die EGFR-Überaktivierung in den E5-Zellen nach Behandlung mit Nystatin länger an. Nach 2 min betrug die mittlere Intensität in Nystatin und Filipin behandelten E5-Zellen etwa das 1,3fache der Intensität in Kontroll-Zellen. Nach 5minütiger EGF-Stimulation war die mittlere Intensität der aktivierten Rezeptoren in den Filipin behandelten E5-Zellen bereits auf das Intensitätsniveau der Kontrolle gesunken. Hingegen zeigten die Nystatin behandelten Zellen in Gegenwart von E5 zu den Zeitpunkten t_5 und t_7 eine 1,1fache Intensität im Vergleich zur Kontrolle. Nach 12 min sank die Intensität auf das Level der Kontrolle. In den Filipin behandelten Zellen konnte zum Zeitpunkt t_{12} in Anwesenheit von E5 erneut eine schwache Überaktivierung festgestellt werden. Verglichen mit den Kontroll-Zellen betrug die Intensität das 1,1fache. Nach 15minütiger EGF-Stimulation hatte die mittlere Intensität in beiden Zellpopulationen bereits das Ausgangsniveau erreicht.

Diese Resultate zeigen, dass die Internalisierung nicht durch Nystatin und Filipin inhibiert werden konnte. Die Überaktivierung der EGF-Rezeptoren durch E5 zu den frühen Zeitpunkten der EGF-Stimulation wurde nicht beeinträchtigt. Jedoch konnte in den E5-exprimierenden Zellen keine langanhaltende Überaktivierung beobachtet werden. Spätestens nach 15 min waren die Rezeptoren deaktiviert. Daher kann vermutet werden, dass Caveolin keine Rolle bei der Internalisierung spielt, aber möglcigerweise beim endozytotischen Transport von Bedeutung ist.

Eine verminderte EGFR-Aktivierung, wie sie im Immunblot nach der Behandlung mit Filipin und Nystatin im Vergleich zu den Chlorpromazin und Methyl-β-cyclodextrin behandelten Zellen zu beobachten war, konnte mittels ICW nicht bestätigt werden.

In Bezug auf die Kinetik von Oberflächenrezeptoren konnten keine Unterschiede nach Nystatin- und Filipin-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen dokumentiert werden. Auch für die mittlere relative Intensität wurden innerhalb der ersten 7 bis 12 min der EGF-Behandlung keine Differenzen gefunden. Jedoch konnte nach 15minütiger EGF-Stimulation in den Inhibitor behandelten Kontroll-Zellen eine starke Abnahme der Oberflächenrezeptoren nachgewiesen werden. Die mittlere relative Intensität betrug nur noch 35%. In den unbehandelten Zellen konnte zum Zeitpunkt t_{12} eine mittlere relative Intensität von etwa 41% festgestellt werden. Nach 30 min war in den Inhibitor

behandelten Zellen eine mittlere relative Intensität von 31% zu verzeichnen, in den unbehandelten Kontrollen hingegen wurde eine mittlere relative Intensität von 35% detektiert. Die mittlere relative Intensität von Oberflächenrezeptoren der E5-exprimierenden Zellen war von diesem Phänomen weniger betroffen. Erst nach 60 min konnte eine Abnahme der Intensität in E5-Zellen beobachtet werden. Stattdessen waren in den Inhibitor behandelten Kontroll-Zellen keine Unterschiede zu unbehandelten Kontrollen hinsichtlich des Verhältnisses aus Oberflächen- und Gesamt-EGFR nach 60 min nachweisbar. Die Intensitäten der Kontrollen waren annähernd gleich.

Zur kinetischen Analyse der Clathrin-unabhängigen Internalisierung wurde zusätzlich eine 3D-Bildanalyse von retroviral transduzierten HeLa-Zellen durchgeführt, die nach verschiedenen Zeitintervallen der EGF-Stimulation zunächst fixiert wurden. Nach der anschließenden Permeabilisierung erfolgte die gleichzeitige Färbung von Caveolin und Gesamt-EGFR.

Im Fokus der 3D-Bildanalyse stand die Untersuchung der Lokalisation und Kolokalisation von Caveolin- und Gesamt-EGFR-Vesikeln. Anhand der Bilder aus Abb. 4.2.10, die als repräsentatives Beispiel für 30 bis 50 aufgenommene und analysierte Zellen pro Zeitpunkt stehen, konnte vor Beginn der EGF-Stimulation keine Kolokalisation von Gesamt- EGFR- und Caveolin-haltigen Vesikeln beobachtet werden. Auffällig war jedoch die große Anzahl an Cavoelin-haltigen Vesikeln in E5-exprimierenden Zellen. Nach 2 min konnten in den E5-Zellen erste kolokalisierende Vesikel in der Nähe der Plasmamembran dokumentiert werden. In den Kontrollen waren erst nach 5minütiger EGF-Behandlungen einige starke Kolokalisationen sichtbar. Die kolokalisierenden Vesikel wurden vor allem in Kernnähe detektiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten in den E5-Zellen ebenfalls wenige Kolokalisationen nachgewiesen werden. Die Anzahl und Intensität der kolokalisierenden Vesikel stieg im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation in beiden Zellpopulationen an. Während in den Kontroll-Zellen noch nach 30 min starke Kolokalisationen in Form von perinuklearen Clustern nachweisbar waren, konnten in den E5-Zellen nur noch wenige Kolokalisationen geringer Intensität beobachtet werden. Nach 60 min waren weder in den Kontrollen, noch in den E5-exprimierenden Zellen kolokalisierende Vesikel zu verzeichnen.

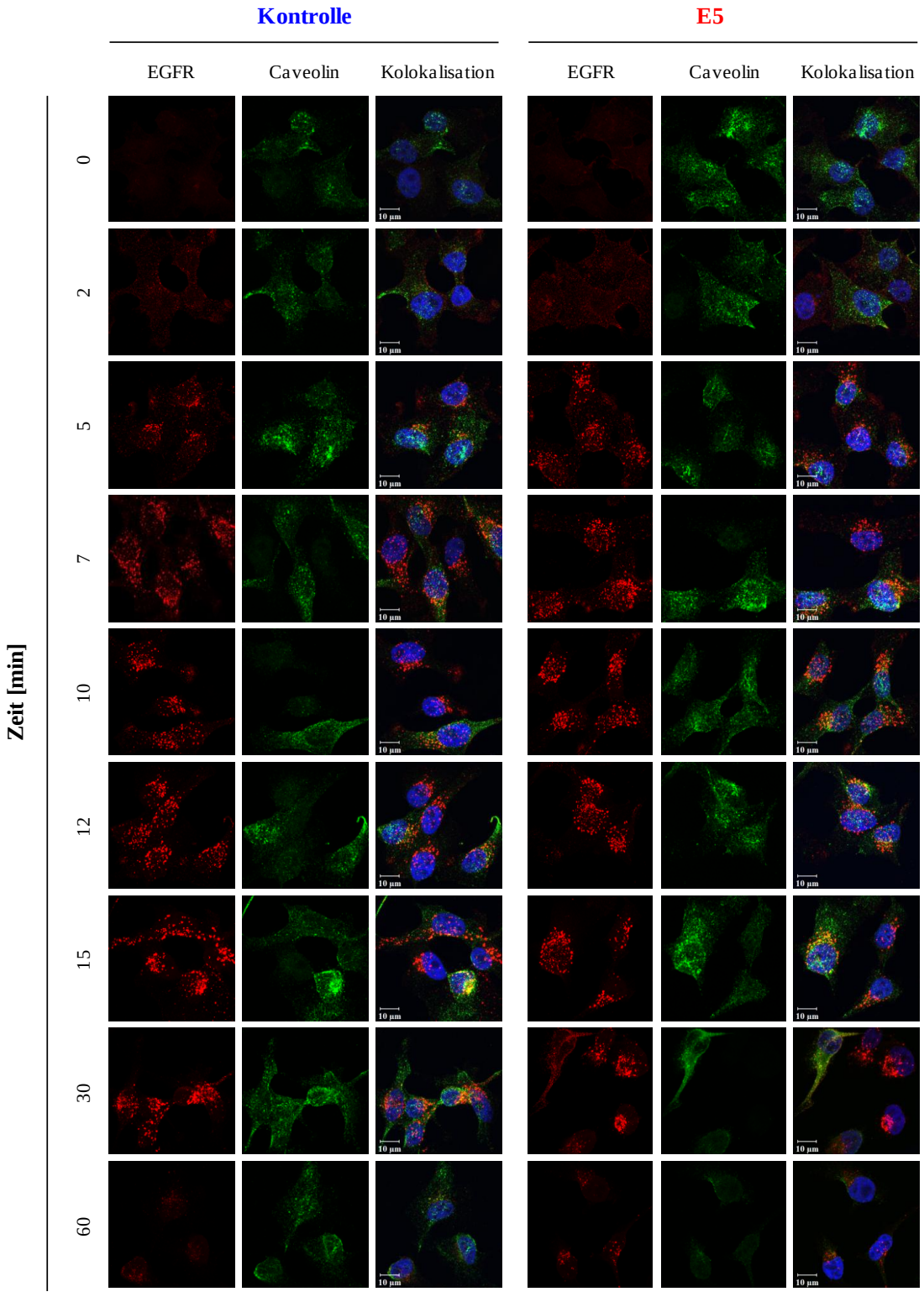


Abb. 4.2.10 3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung von EGFR in HeLa-Zellen. Retroviral transduzierte Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Medium mit EGF stimuliert und nach Fixierung/Permeabilisierung in einer Doppelimmunfluoreszenz Caveolin und Gesamt-EGFR angefärbt. Zusätzlich wurde der Nukleus mit DAPI sichtbar gemacht. Pro Zeitpunkt wurden etwa 30 bis 50 am LSM710 aufgenommen und analysiert. Die Bilder zeigen die maximale Intensitätsprojektion der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung.

Dennoch fiel auf, dass die Anzahl Caveolin-haltiger Vesikel in Leervektor-transduzierten Zellen deutlicher größer war als in den E5-Zellen.

Die Quantifizierung der 3D-Bilder erfolgte wie in Abschnitt 4.1.5 und Tabelle 4.1.1 ausführlich geschildert. Wie in den vorherigen Bildanalysen wurden zunächst die Kolokalisationen der beiden Kompartimente separat untersucht und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2.11 dargestellt.

Ein Vergleich der Kinetiken von mittlerer Intensität im Zytoplasma und mittlerer Intensität in Kernnähe zeigte nahezu identische Verläufe im gesamten EGF-Stimulationszeitraum (Abb. 4.2.11 A und B). In beiden Kompartimenten stieg die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel mit Beginn der EGF-Stimulation für beide Zellpopulationen mit Ausnahme von t_{10} gleich stark an. Zwischen den Zeitpunkten t_7 und t_{10} konnte in den E5-Zellen eine geringe Zunahme der Intensität beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle betrug die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel im Zytoplasma das 1,3fache, in Kernnähe etwa das 1,6fache. Die maximale Intensität konnte für beide Zellpopulationen zum Zeitpunkt t_{15} detektiert werden, wobei die mittlere Intensität der E5-Zellen um 10% geringer war als die der Kontroll-Zellen. Danach konnte in den E5-exprimierenden Zellen eine starke Reduktion der Intensität kolokalisierender Vesikel auf Ausgangsniveau nachgewiesen werden, während die Intensität in den Kontrollen deutlich langsamer abnahm. Nach 30 min betrug die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel in Kontroll-Zellen das 10fache der E5-Zellen. Nach 60 min war die Intensität der Kontrolle mit der zum Zeitpunkt t_0 vergleichbar.

In Bezug auf die Vesikelanzahl kolokalisierender Vesikel konnte eine ähnliche Kinetik wie die der mittleren Intensitäten beobachtet werden. Im Zytoplasma nahm die Zahl der kolokalisierende Vesikel zunächst in beiden Zellpopulationen gleichmäßig zu. Die maximale Anzahl kolokalisierender Vesikel konnte nach 15minütiger EGF-Stimulation detektiert werden. Danach fiel die Vesikelanzahl in den E5-exprimierenden Zellen stark ab und entsprach der Anzahl kolokalisierender Vesikel zu t_2. In den Kontrollen konnte hingegen eine langsame Abnahme der Vesikelanzahl dokumentiert werden. Zum Zeitpunkt t_{30} war die Anzahl kolokalisierender Vesikel in den Kontrollen etwa 3-mal so groß wie die Anzahl in den E5-Zellen. Nach 60 min konnten keine Unterschiede

zwischen Leervektor- und E5-transduzierten Zellen bezüglich der Anzahl kolokalisierender Vesikel nachgewiesen werden. Die Anzahl war schließlich auf das Level von t_2 gesunken.

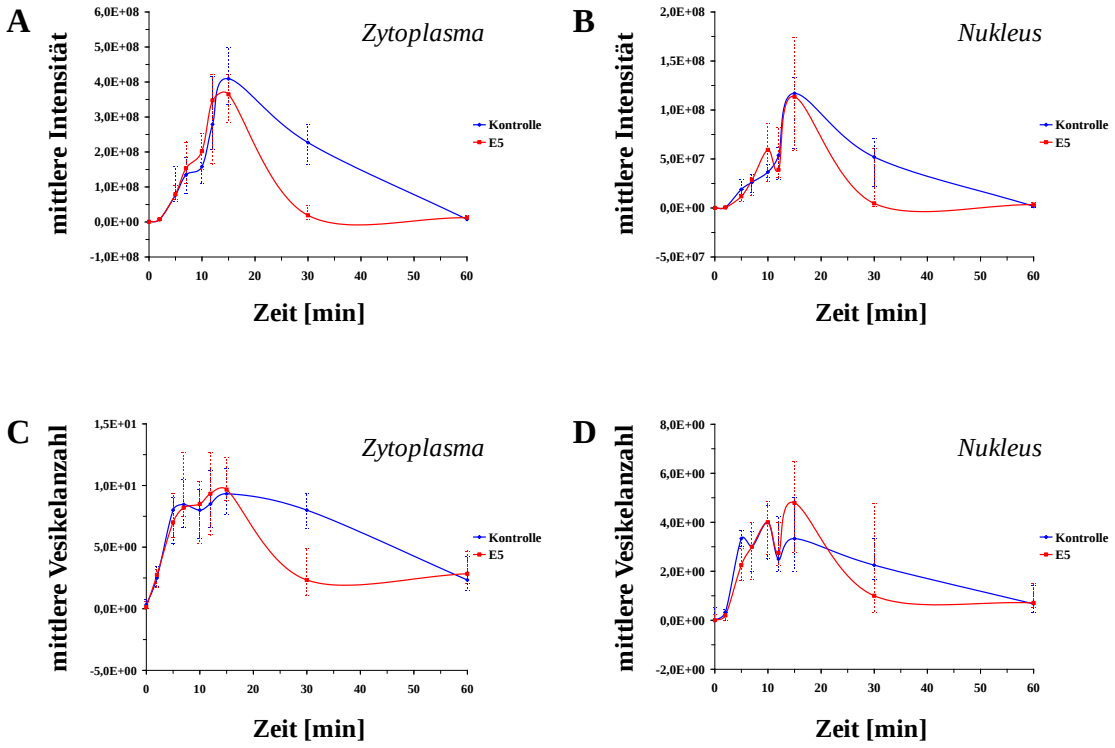


Abb. 4.2.11 Kolokalisationanalyse von Gesamt-EGFR- und Caveolin-haltigen Vesikeln im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus. Die Quantifizierung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.2.10. Die Anzahl aufgenommener und analysierter Zellen pro Zeitpunkt betrug zwischen 30-50. Der Median wird durch Rhombus bzw. Quadrat angezeigt, die Quartile sind als Balken wiedergegeben.

Im Vergleich zur Kinetik im Zytoplasma wies die Kinetik der Anzahl kolokalisierender Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Zellkern vor allem Unterschiede zu den Zeitpunkten t_5 und t_{15} auf. Nach 5 min konnte in den Kontrollen eine 1,5fache Anzahl kolokalisierender Vesikel im Vergleich zu den E5-Zellen beobachtet werden. Nach 15 min war die Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen 1,4-mal so groß wie die der Kontroll-Zellen.

Die Abb. 4.2.12 A gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die mittlere Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel der einzelnen Kompartimente wieder. In Abb. 4.2.12 B ist der relative Anteil kolokalisierender Vesikel zur Anzahl an Gesamt-EGFR dargestellt. Daraus kann geschlussfolgert werden, wie viel Prozent der Gesamt-EGFR- Vesikel sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in den Caveolin-haltigen Vesikeln befanden.

Bereits zum Zeitpunkt t_0 war in beiden Zellpopulationen eine geringe Anzahl kolokalisierender Vesikel nachweisbar. Im Vergleich zu den E5-exprimierenden Zellen war die absolute und relative Vesikelanzahl in den Kontrollen doppelt so groß. Zudem konnte für die Kontrollen zum Zeitpunkt t_0 die maximale relative Anzahl kolokalisierender Vesikel detektiert werden. Die Intensität dieser Vesikel war jedoch sehr gering.

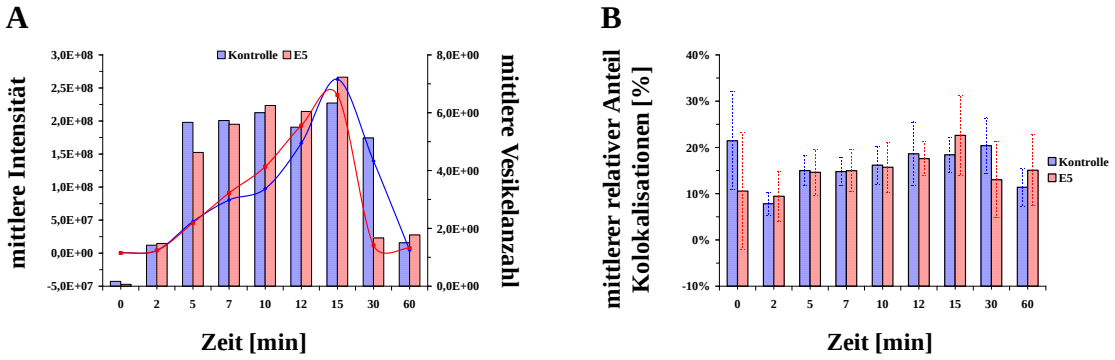


Abb. 4.2.12 Analyse aller Gesamt-EGFR-Vesikel, die mit Caveolin-haltigen Vesikeln kolokalisieren, in Unabhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel aus durchschnittlich 30-50 aufgenommen und analysierten Zellen basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.2.10. **A:** Die Linien geben die mittlere Intensität im zeitlichen Verlauf wieder. Die mittlere Vesikalanzahl der entsprechenden Zeitpunkte ist in Form von Balken dargestellt. **B:** Quantifizierung des prozentualen Anteils von kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zum Gesamt-EGFR-Anteil.

Im Laufe der EGF-Behandlung nahm sowohl die Intensität, als auch die absolute Vesikelanzahl zu. Die maximale Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel konnte für beide Zellpopulationen nach 15minütiger EGF-Stimulation nachgewiesen werden. Danach wurde für die mittlere Vesikelintensität und -anzahl eine Abnahme dokumentiert. Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen in Bezug auf die Anzahl

kolokalisierender Vesikel traten zu den Zeitpunkten t_5 und t_{30} auf. Nach 5 min betrug die mittlere absolute Vesikelanzahl in den Kontrollen das 1,2fache, zum Zeitpunkt t_{30} fast die 3fache Anzahl im Vergleich zu den E5-exprimierenden Zellen. Hinsichtlich der mittleren Intensität konnten Unterschiede nach 10, 15 und 30minütiger EGF-Stimulation beobachtet werden. Während nach 10 min die Intensität in den E5-Zellen 1,3-mal so groß war wie die der Kontroll-Zellen, konnte nach 15 und 30 min im Vergleich zur Kontrolle eine um 1,1 bzw. 10fach verringerte Intensität festgestellt werden. Die mittlere relative Anzahl kolokalisierender Vesikel war hingegen weniger Schwankungen unterlegen. Mit Ausnahme der Zeitpunkte t_{15}, t_{30} und t_{60} konnten für beide Zellpopulationen annähernd identische relative Vesikelzahlen von ca. 15% detektiert werden. Die Zeitpunkte t_{15} und t_{60} waren die einzigen Zeitpunkte, zu denen die relative Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen größer war als die der Kontroll-Zellen. Im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen konnten in Anwesenheit von E5 nach 15 min 1,3-mal und nach 60 min 1,4-mal so viele kolokalisierende Vesikel nachgewiesen werden. Nach 30 minütiger EGF-Stimulation wurde hingegen in den Kontroll-Zellen eine 1,5fache Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zu den E5-exprimierenden Zellen dokumentiert.

Die kinetische Analyse hat gezeigt, dass die Inhibierung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung mit Filipin und Nystatin keinen Einfluss auf die Internalisierung aktivierter Rezeptoren hatte. In beiden Zellpopulationen konnte eine EGFR-Aktivierung detektiert, die im Vergleich zur Rezeptorphosphorylierung nach Chlorpromazin-Behandlung zur Hemmung der Clathrin-abhängigen Internalisierung, stärker war. Daher lässt sich vermuten, dass Caveolin keine entscheidende Rolle bei der Internalisierung von aktivierten EGF-Rezeptoren spielt.

In Bezug auf die 3D-Bildanalyse konnten vor allem im Stimulationszeitraum von t_7 und t_{30} Unterschiede zwischen Kontroll- und E5-Zellen beobachtet werden. Während die Intensitäten in E5-Zellen zwischen den Zeitpunkten t_7 und t_{12} im Vergleich zur Kontrolle erhöht waren, konnte zu den späten Zeitpunkten das Gegenteil beobachtet werden. Zudem fiel auf, dass zum Zeitpunkt der maximalen Vesikelintensität und -anzahl (t_{15}), die Intensität der kolokalisierenden Vesikel in E5-Zellen im Vergleich zur

Kontrolle geringer, die Anzahl hingegen größer war. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass der Transport von EGFR in den E5-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle verändert ist. Zusätzlich zum ICW verdeutlicht die Bildanalyse, dass die Clathrin-unabhängige Internalisierung für die intrazelluläre Aufnahme aktivierter Rezeptoren nicht von Bedeutung ist. Möglicherweise spielt Caveolin eher im Zusammenhang mit dem intrazellulären Transport von EGF-Rezeptoren eine wichtige Rolle.

4.3 Intrazellulärer Transport von EGFR

Die Clathrin-abhängige und unabhängige Internalisierung der Rezeptoren endet in der Regel mit der Fusion von EGFR-haltigen Vesikeln und dem frühen Endosomen. Mit dem frühen Endosomen beginnt der endozytotische Transport von Rezeptoren. Dieser verläuft größtenteils über multivesikuläre Körperchen und späte Endosomen zum Lysosomen, dem Abbauort von Ligand und Rezeptor. Ein Teil des endozytotischen Transports erfolgt über Recycling-Endosomen zurück zur Plasmamembran, wo eine weitere Aktivierung der Rezeptoren durch den Liganden stattfinden kann.
Die folgenden Abschnitte dieser Arbeit sind dem endozytotischen Transport des EGFR gewidmet und in drei Teilabschnitte unterteilt: frühe Endosomen, multivesikuläre Körperchen und Recycling.

4.3.1 Frühe Endosomen

Zur kinetischen Analyse des endozytotischen Transports von aktivierten Rezeptoren in frühen Endosomen, wurden retroviral transduzierte HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Medium mit EGF stimuliert. In den fixierten Zellen erfolgte eine Doppelimmunfluoreszenz von frühen Endosomen und phospho- bzw. Gesamt-EGFR. Als Marker für frühe Endosomen ist das Protein EEA1 beschrieben.

In Abb. 4.3.1 ist pro Zeitpunkt eine Beispiel-Aufnahme der EEA1- und phospho-EGFR gefärbten Zellen gezeigt. Wie in den Abschnitten zuvor (Abschnitt 4.1.5; Abb. 4.1.10

und Abschnitt 4.2.1; Abb. 4.2.3), konnte auch hier eine langanhaltende Überaktivierung der EGF-Rezeptoren beobachtet werden und soll an dieser Stelle nicht weiter analysiert werden. Das Hauptaugenmerk ist auf die Untersuchung der Kolokalisation von EEA1 und phospho-EGFR und deren Lokalisation der Zelle gerichtet.

Weder zum Zeitpunkt t_0, noch nach 2minütiger EGF-Stimulation konnte mit bloßem Auge in beiden Zellpopulationen eine Kolokalisationen dokumentiert werden (Abb. 4.3.1). Nach 5 min wurden sowohl in den E5-Zellen, als auch in den Kontroll-Zellen phospho-EGFR-Vesikel detektiert, die mit EEA1-haltigen Vesikeln kolokalisierten. Während sich in den Kontrollen nach 7 min die Anzahl und Intensität kolokalisierender Vesikeln kaum zu ändern schien, nahmen Intensität und Anzahl in den E5-exprimierenden Zellen deutlich zu. Auch nach 10 min war die Anzahl und Intensität im Vergleich zur Kontrolle stärker. Nach 12minütiger EGF-Behandlung glichen sich Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel in beiden Zellpopulationen einander an. Im weiteren Verlauf nahmen Intensität und Anzahl deutlich ab, jedoch konnten im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen nach 60 min in Anwesenheit von E5 noch kleine kolokalisierende Vesikel schwacher Intensität nachgewiesen werden.

Die Quantifizierung der 3D-Bilder erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 4.1.5 und Tabelle 4.1.1 beschrieben. Die in Abb. 4.3.2 dargestellten Resultate zeigen die mittlere Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel im Zytoplasma und Kernnähe. Zum Zeitpunkt t_2 waren keine Unterschiede in E5- und Kontrollzellen bezüglich Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel nachweisbar, weder im Zytoplasma, noch in unmittelbarer Nähe zum Nukleus. Nach 5 min konnte im Zytoplasma die gleiche Anzahl an Vesikeln festgestellt werden, jedoch war die Intensität der Vesikel in E5-Zellen um das 1,7fache geringer als in den Kontrollen. In Kernnähe konnte genau das Gegenteil beobachtet werden. Die mittleren Vesikelintensitäten waren identisch, jedoch konnte in den E5-Zellen eine 1,4fache Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln detektiert werden. Im weiteren Verlauf der EGF-Behandlung stiegen mittlere Anzahl und Intensität für beide Zellpopulationen deutlich an. Zum Zeitpunkt t_7 konnte sowohl in Kernnähe, als auch im Zytoplasma eine größere Anzahl und Intensität kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen gegenüber den Kontroll-Zellen dokumentiert werden.

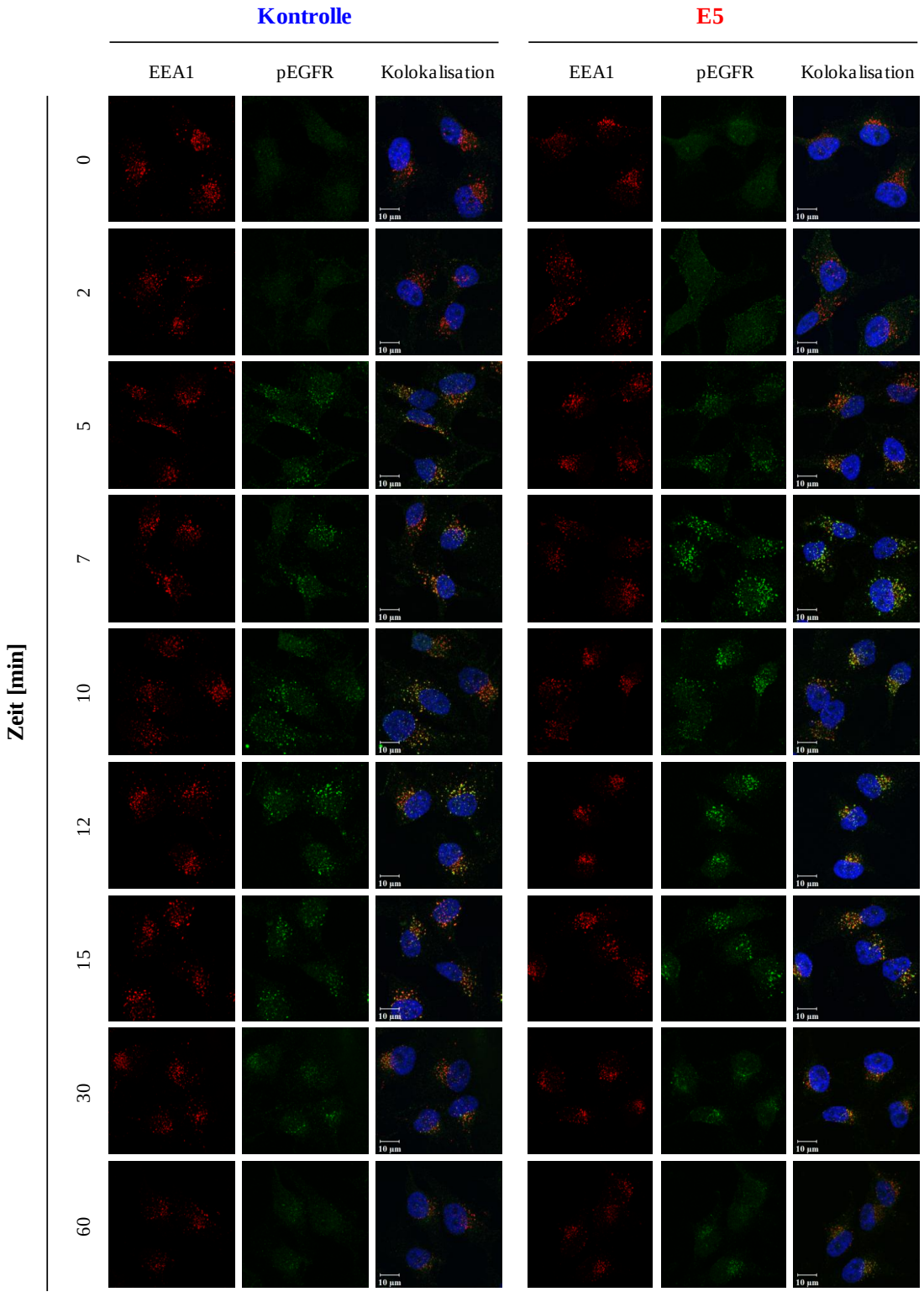


Abb. 4.3.1 3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung des intrazellulären Transports aktivierter EGF-Rezeptoren in HeLa-Zellen. Auf Deckgläschen ausgesäte Leervektor und E5 transduzierte HeLa-Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Medium für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30 und 60 min mit EGF behandelt und in einer Doppelimmunfluoreszenz frühe Endosomen (EEA1) und phospho-EGFR angefärbt. Der Nukleus wurde mit DAPI sichtbar gemacht und pro Zeitpunkt zwischen 30 und 50 Zellen am LSM710 aufgenommen. Die als Beispiel dargestellten Bilder sind die maximale Intensitätsprojektion der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung.

In beiden Kompartimenten betrugen die Intensitäten in Anwesenheit von E5 etwa das 1,5 bis 1,6fache. Die Vesikelanzahl war in Kernnähe ebenfalls 1,5-mal so groß wie die der Kontrollen. Hingegen wurde im Zytoplasma nur die leicht erhöhte Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln beobachtet. Nach 10 min nahmen Anzahl und Intensität in beiden Kompartimenten der E5-exprimierenden Zellen ab. In den Kontroll-Zellen galt dies nur für die kolokalisierenden Vesikel, die sich in unmittelbarer Nähe zum Nukleus aufhielten. Im Zytoplasma stieg Intensität und Anzahl im Vergleich zu t_7 weiter an. Während die Intensität jetzt nahezu identisch mit der in E5-Zellen war, betrug die Vesikelanzahl das 1,6fache im Vergleich zu E5. Die Vesikel der Kontrollen in Kernnähe wiesen nur noch die Hälfte der Intensität der E5-Zellen auf. Die Anzahl der kolokalisierenden Vesikel in Anwesenheit von E5 war etwa 1,5-mal so groß.

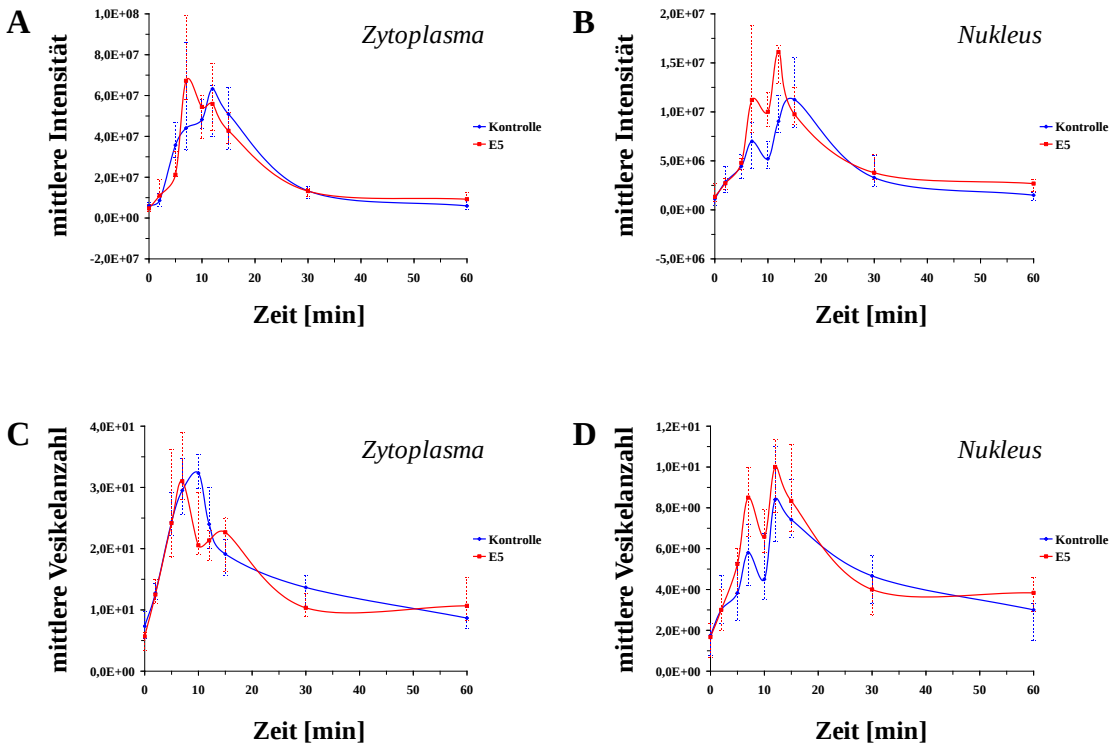


Abb. 4.3.2 Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit dem frühen Endosomen im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus kolokalisieren. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.3.1. Im Durschnitt wurden pro Zeitpunkt zwischen 30 und 50 Zellen aufgenommen und analysiert. Der Median ist durch Rhombus bzw. Quadrat wiedergegeben, die Quartile durch Balken.

Nach 12 minütiger EGF-Stimulation nahm die Anzahl der Vesikel in den Kontrollen wieder ab, während die Intensität in beiden Kompartimenten weiter anstieg. In den E5-Zellen konnten kaum Unterschiede zum Zeitpunkt t_{10} festgestellt werden. Die mittlere Vesikelintensität und -anzahl im Zytoplasma unterschieden sich in beiden Zellpopulationen nur wenig voneinander (Abb. 4.3.2 A und C). Dennoch waren sie in den Kontrollen größer als in den E5-exprimierenden Zellen. Die Vesikel der E5-Zellen in unmittelbarer Nähe zum Nukleus zeigten hingegen eine deutliche größere Intensität im Vergleich zur Kontrolle. Sie betrug etwa das 1,8fache (Abb. 4.3.2 B). Auch die Anzahl kolokalisierender Vesikel war in E5-exprimierenden Zellen 1,2-mal so groß wie in den Kontrollen. Der weitere Verlauf der EGF-Behandlung war in beiden Zellpopulationen und Kompartimenten durch eine Abnahme der Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel gekennzeichnet. Ausnahme war die zytoplasmatische Vesikelanzahl in den E5-Zellen, die eine leichte Zunahme zeigte. Während die Intensitäten der E5-exprimierenden Zellen in beiden Kompartimenten unterhalb der Intensitäten der Kontroll-Zellen blieb, war die Vesikelanzahl im Vergleich zur Kontrolle größer. Nach 30 min betrug die Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen nur noch ca. die 0,8fache Anzahl der Vesikel in Leervektor-transduzierten Zellen. In Bezug auf die Intensitäten konnten keine Unterschiede zwischen den Zellpopulationen und Kompartimenten beobachtet werden. Nach 60minütiger EGF-Stimulation wiesen die E5-Zellen im Vergleich zur Kontrolle in beiden Kompartimenten eine größere Anzahl und Intensität der kolokalisierenden Vesikel auf. Die mittlere Intensität im Zytoplasma war etwa 1,5-mal so groß, in Kernnähe betrug sie sogar das 1,8fache. In Hinsicht auf die mittlere Vesikelanzahl konnte in den E5-Zellen in beiden Kompartimenten ca. das 1,2fache gezählt werden. Sowohl die Intensität, als auch die Anzahl kolokalisierender Vesikel beider Zellpopulationen und Kompartimente erreichten nach 60 min in etwa wieder das Ausgangsniveau der EGF-Stimulation.

Die Ergebnisse der 3D-Bildanalyse spiegeln einen charakteristischen Teil der Endozytose wieder, bei dem die frühen Endosomen eine Art Referenzpunkt bilden. Zu Beginn der Stimulation fusionieren Vesikel mit den frühen Endosomen, d.h. die Anzahl der Vesikel nimmt ab, während sich die Intensität (bzw. das Volumen) der Vesikel vergrößert. Später hingegen reifen die frühen Endosomen zu multivesikulären Körperchen. Dieser Reifungsprozess ist in der Mikroskopie durch eine plötzliche starke Abnahme an Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel zu beobachten. Es konnte

anhand der Daten gezeigt werden, dass der endozytotische Transport zu den und weg von den frühen Endosomen in E5 beschleunigt war. Zudem konnten vor allem in den perinuklearen Bereichen eine stärkere Intensität der Vesikel detektiert werden.

Auch für die Analyse der Kolokalisation von phospho-EGFR und EEA1 wurden die mittlere Intensität und Vesikelanzahl der einzelnen Kompartimente zusammengefasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.3.3 A dargestellt. Des Weiteren erfolgte die Quantifizierung des prozentualen Anteils an kolokalisierenden Vesikeln zur Gesamtanzahl von phospho-EGFR-Vesikeln (Abb. 4.3.3 B), um Rückschlüsse auf die Verteilung von aktivierten Rezeptoren in Endosomen ziehen zu können.

Bereits vor Beginn der EGF-Behandlung konnten in beiden Zellpopulationen phospho-EGFR-Vesikel detektiert werden, die mit EEA1, also dem frühen Endosomen, kolokalisieren (Abb. 4.3.3). Jedoch war die Intensität der Vesikel sehr gering. Im Laufe der EGF-Behandlung nahmen Intensität, absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel zu. Erst nach 30 min konnte eine Abnahme der Vesikelintensität und -anzahl beobachtet werden. Die größten Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen konnten zu den Zeitpunkten t_7, t_{10} und t_{60} dokumentiert werden. Nach 7minütiger EGF-Stimulation war die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen etwa 1,6-mal so groß wie die Vesikelintensität der Kontrollen (Abb. 4.3.3 A). Auch die absolute Vesikelanzahl war zu diesem Zeitpunkt in E5-Zellen erhöht. Nach 10 min konnte hingegen eine starke Verringerung der Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-Zellen nachgewiesen werden. Sie betrug nur noch das 0,7fache der Vesikelanzahl der Kontrollen. Die mittlere Intensitäten der kolokalisierenden Vesikel in Anwesenheit von E5 waren hingegen 1,2-mal so groß wie die der Kontroll-Zellen. Bezüglich der relativen Anzahl kolokalisierender Vesikel konnten mit Ausnahme von t_{60} keine erheblichen Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen festgestellt werden (Abb. 4.3.3 B). Zum Zeitpunkt t_{60} waren im Vergleich zur Kontrolle sowohl Intensität, als auch Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen größer. Die mittlere Intensität und absolute Anzahl betrugen etwa das 1,6 bzw. 1,3fache (Abb. 4.3.3 A). Die relative Vesikelanzahl war ca. 1,5-mal so groß (Abb. 4.3.3 B).

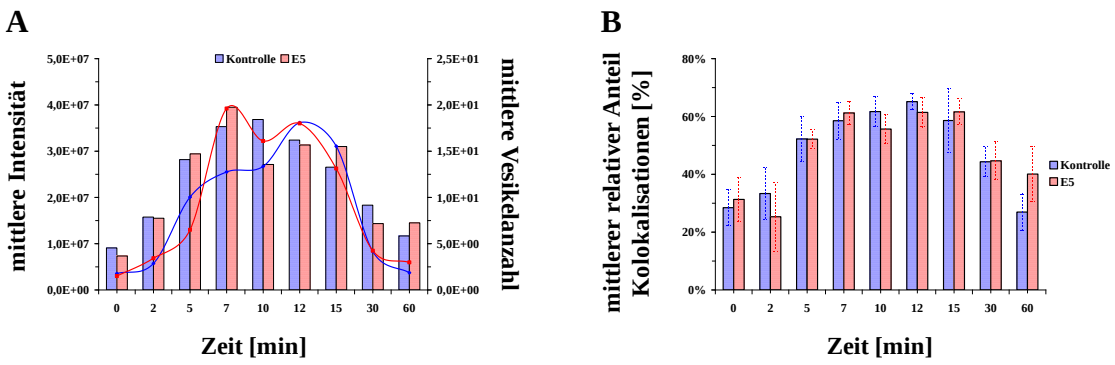


Abb. 4.3.3 Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation, die mit frühen Endosomen kolokalisieren. Die Quantifizierung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.3.1. Die Anzahl aufgenommener und analysierter Zellen pro Zeitpunkt betrug zwischen 30 und 50. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. **A:** Die Linien beschreiben die mittlere Intensität, die Balken die mittlere Anzahl kolokalisierender Vesikel im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation. **B:** Quantitative Bestimmung des relativen Anteils an kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zum gesamten phospho-EGFR-Anteil.

Zusätzlich wurde geprüft, wie die Anzahl und Verteilung von Gesamt-EGFR-Vesikeln waren, die mit EEA1-haltigen Vesikeln kolokalisierten. Die Abb. 4.3.4 zeigt pro Zeitpunkt jeweils ein Beispiel von dreizehn 3D-Aufnahmen. Auch hier ist der Fokus auf die Kolokalisation von EGF-Rezeptoren und frühen Endosomen gerichtet.

Vor und zu Beginn der EGF-Stimulation konnten in beiden Zellpopulationen mit bloßem Auge keine Kolokalisationen beobachtet werden. Ab dem Zeitpunkt t_5 waren sowohl in den Kontroll-Zellen, als auch in den E5-Zellen Kolokalisationen von EGFR und EEA1 nachweisbar. Nach 7minütiger EGF-Behandlung fielen deutliche Unterschiede bezüglich Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel zwischen E5- und Kontroll-Zellen auf. Verglichen mit der Kontrolle wiesen die E5-exprimierenden Zellen eine größere Anzahl kolokalisierender Vesikel auf, deren Intensität deutlich stärker war. Im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation unterschieden sich Anzahl und Intensität der Vesikel in E5- und Kontroll-Zellen kaum. Bis zum Zeitpunkt t_{30} konnten in beiden Zellpopulationen kolokalisierende Vesikel von starker Intensität detektiert werden. Jedoch nahm die Anzahl dieser Vesikel im Zeitintervall t_7 bis t_{30} deutlich ab.

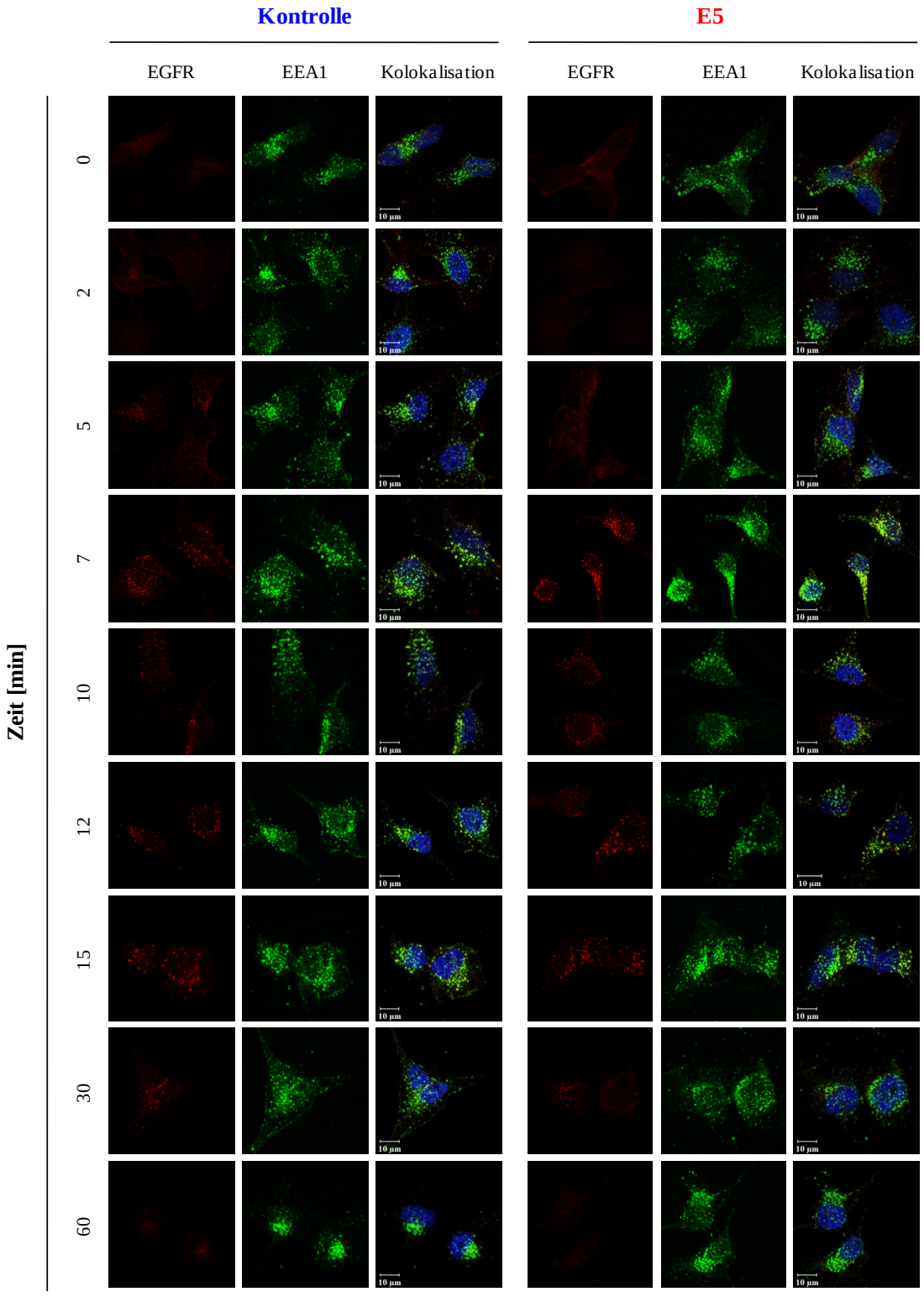


Abb. 4.3.4 Drei-dimensionale Bildanalyse zur Untersuchung der Kolokalisation von Gesamt-EGFR und frühen Endosomen in HeLa-Zellen. Retroviral transduzierte HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, für 16 h in serum-freies Medium überführt und anschließend für die oben aufgeführten Zeitintervalle mit EGF stimuliert. In einer Doppelimmunfluoreszenz und unter Verwendung von DAPI wurden EGFR- und EEA1-haltige Vesikel sowie der Zellkern sichtbar gemacht. Dargestellt sind die maximalen Intensitätsprojektionen der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung für eine Aufnahme pro Zeitpunkt als Beispiel für die je 30 bis 50 am LSM710 aufgenommenen Zellen.

Die quantitative Analyse der 3D-Bilder erfolgte wie zuvor beschrieben (Abschnitt 4.1.5 und Tabelle 4.1.1.). Die Ergebnisse sind durch Abb. 4.3.5 wiedergegeben. Zunächst wurden die Kompartimente Zytoplasma und Kernnähe separat betrachtet und die mittlere Intensität und Vesikelanzahl bestimmt.

Bei Betrachtung der Diagramme fiel als erstes auf, dass die Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel im Lauf der EGF-Stimulation starken Schwankungen unterlag. Zu Beginn der EGF-Behandlung konnte für beide Zellpopulationen bis zum Zeitpunkt t_7 eine starke Zunahme der mittleren Intensität kolokalisierender Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe beobachtet werden (Abb. 4.3.5 A und B). In den ersten 5 min stieg die mittlere Intensität in den E5-Zellen langsamer an als in den Kontrollen. Nach 7 min nahm die Intensität in den E5-exprimierenden Zellen deutlich stärker im Vergleich zur Kontrolle zu. Sie betrug im Zytoplasma etwa das 1,5fache, in unmittelbarer Nähe zum Zellkern das 1,1fache. Der Zeitpunkt t_{10} war durch einen starken Abfall gekennzeichnet. Jedoch blieb die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel im Zytoplasma von E5-Zellen um mehr als das Doppelte oberhalb der Intensität kolokalisierender Vesikel der Kontroll-Zellen, in Kernnähe etwa um das 1,5fache. Danach nahmen die Intensitäten erneut zu, wobei die zytoplasmatische Intensität in den Kontrollen etwa doppelt so groß war wie die der E5-exprimierenden Zellen. In Kernnähe betrug die mittlere Intensität ca. das 1,2fache. Nach 15 min konnte erneut eine Reduktion der Intensitäten dokumentiert werden. Jedoch nahmen die Intensitäten in den Kontrolle deutlich stärker ab als in den E5-Zellen. Im Zytoplasma konnte für die kolokalisierenden Vesikel der E5-Zellen die 3fache Intensität der Kontrollen beobachtet werden, während sie Kernnähe etwa das 2,4fache betrug. Nach 30 min glichen sich die mittleren Intensitäten beider Zellpopulationen einander an und erreichten schließlich Ausgangsniveau.

Die Kinetiken der mittleren Vesikelanzahl in den Kontrollen für kolokalisierende Vesikel im Zytoplasma und Kernnähe verliefen gleich und stiegen bzw. fielen mit der Intensität der Vesikel. In den E5-Zellen wurde keine Korrelation dieser Art vorgefunden.
In beiden Zellpopulationen nahm die Anzahl von kolokalisierenden Vesikeln zu Beginn der EGF-Stimulation zunächst in beiden Kompartimenten stark zu. Während die Vesikelanzahl der Kontrollen im Zytoplasma und in Kernnähe nach 10 min wieder

abfiel und nach 12 min wieder anstieg, blieb die Anzahl in E5-exprimierenden Zellen im Zytoplasma nahezu konstant. In unmittelbarer Nähe zum Nukleus nahm die Vesikelanzahl in E5-Zellen nach 7 min leicht ab und stieg anschließend auf maximale Anzahl kolokalisierender Vesikel im gesamten Stimulationszeitraum wieder an. Nach 10 min betrug die Anzahl kolokalisierender Vesikel in Anwesenheit von E5 etwa das 1,9fache im Zytoplasma und das 1,5fache in Kernnähe. Nach 12minütiger EGF-Stimulation konnte in den E5-Zellen nur noch die 0,6fache Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln in Kernnähe im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Im Zytoplasma wurde verglichen mit den Leervektor-transduzierten Zellen etwa die 0,9fache Anzahl dokumentiert.

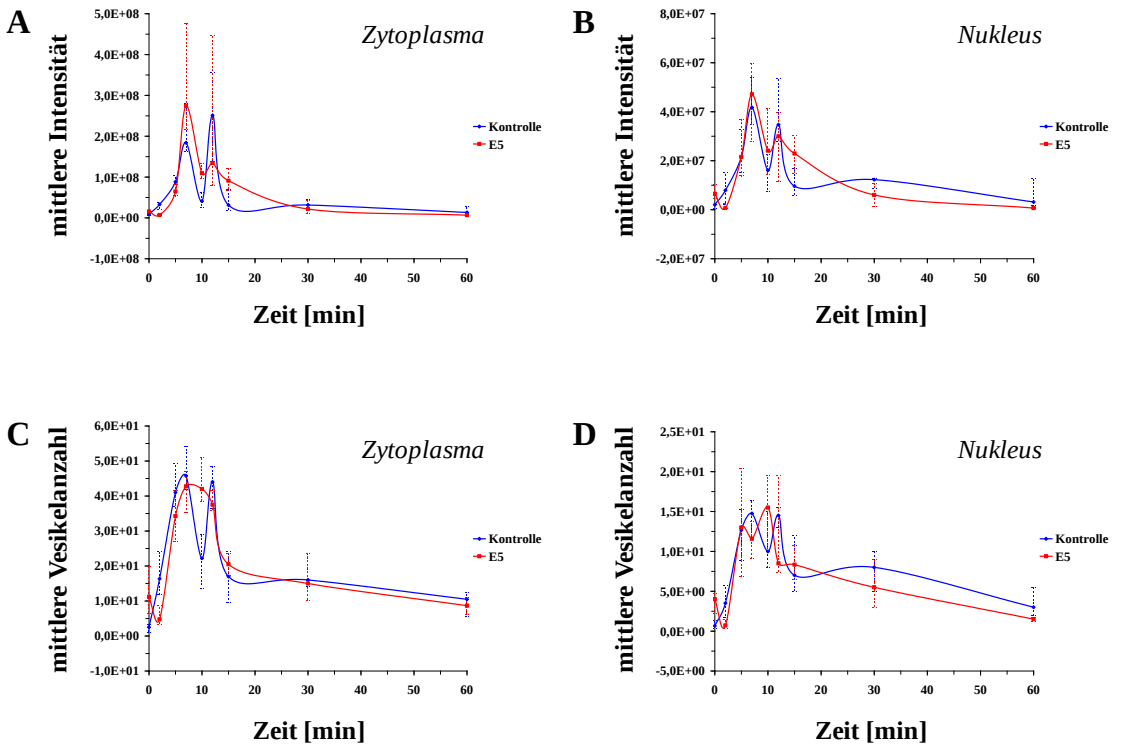


Abb. 4.3.5 Kolokalisation-Analyse von Gesamt-EGFR- und EEA1-Vesikeln im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus. Die Quantifizierung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.3.4. Die Anzahl aufgenommener und analysierter Zellen pro Zeitpunkt betrug zwischen 30-50. Der Median wird durch Rhombus bzw. Quadrat angezeigt, die Quartile sind als Balken wiedergegeben.

Nach 30 min war das Gegenteil der Fall. Im Vergleich zur Kontrolle betrug die mittlere Vesikelanzahl in beiden Kompartimenten der E5-Zellen das 1,2fache. Während sich die

mittlere Vesikelanzahl im Zytoplasma nach 30 und 60 min in beiden Zellpopulationen annähernd gleich verhielten, wiesen die Kontrollen im Vergleich zu E5 die 1,5fache bzw. 2fache Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln in unmittelbarer Nähe zum Nukleus auf.

Schließlich wurden die Ergebnisse der mittleren Intensität und Vesikelanzahl für die einzelnen Kompartimente zusammengefasst und in Abb. 4.3.6 A zum Vergleich in einem Diagramm wiedergegeben. Zusätzlich wurde der relative Anteil an kolokalisierenden Vesikeln zur Anzahl an Gesamt-EGFR-Vesikeln ermittelt. Die Resultate sind in Abb. 4.3.6 B dargestellt.

Bereits vor Beginn der EGF-Stimulation zeigten die E5-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine fast 5fache Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln (Abb. 4.3.6 A). Die mittlere Intensität dieser Vesikel unterschied sich jedoch nur geringfügig. Auch die relative Anzahl kolokalisierender Vesikel war in beiden Zellpopulationen annähernd gleich (Abb. 4.3.6 B). Während nach 2 min sowohl die Intensität, als auch die absolute und relative Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln in den Kontroll-Zellen anstieg, konnte in den E5-exprimierenden Zellen eine Abnahme der mittleren Intensität und absoluten Anzahl kolokalisierender Vesikel beobachtet werden. Die absolute Vesikelanzahl betrug im Vergleich zu Kontrolle weniger als ein Drittel. Die Intensität sogar nur ein Fünftel verglichen mit der Vesikelintensität der Kontroll-Zellen. Die relative Anzahl blieb im Vergleich zu t_0 nahezu konstant und betrug etwa 27% und war damit um das 1,8fache geringer als die relative Anzahl der Vesikel in den Kontroll-Zellen. Im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation stiegen die Intensität sowie absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel in beiden Zellpopulationen an. Nach 7 und 10 min konnten große Unterschiede bezüglich der mittleren Intensität dokumentiert werden (Abb. 4.3.6 A). Auch wenn die Intensitäten nach 10minütiger EGF-Behandlung im Vergleich zu t_7 in beiden Zellpopulationen abnahmen, betrug die Vesikelintensität der E5-transduzierten Zellen für t_7 etwa das 1,5fache bzw. für t_{10} mehr als das Doppelte der Vesikelintensität der Leervektor transduzierten Zellen. Während sich die relative Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln kaum voneinander unterschied (Abb. 4.3.6 B), konnte für die absolute Vesikelanzahl in E5-Zellen zum Zeitpunkt t_{10} das 1,8fache zur Kontrolle ermittelt werden (Abb. 4.3.6 A). Nach 12 min stieg die mittlere Intensität und absolute Anzahl kolokalisierender Vesikel in den Kontroll-Zellen im Gegensatz zu den

E5-Zellen stark an. Verglichen mit den E5-exprimierenden Zellen betrug nun die Intensität kolokalisierender Vesikel in Kontroll-Zellen etwa das 1,8fache, die absolute Anzahl ca. 1,3fache. Die relative Vesikelanzahl blieb nahezu konstant und wies keine Unterschiede zwischen den Zellpopulationen auf (Abb. 4.3.6 B).

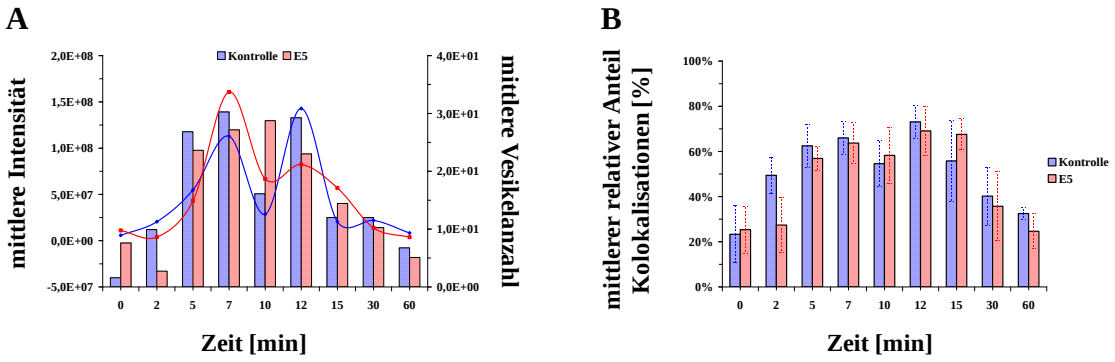


Abb. 4.3.6 Analyse aller Gesamt-EGFR-Vesikel, die mit dem frühen Endosomen kolokalisieren, in Unabhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel aus durchschnittlich 30-50 aufgenommen und analysierten Zellen basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.3.4. **A:** Die Linien geben die mittlere Intensität im zeitlichen Verlauf wieder. Die mittlere Vesikalanzahl der entsprechenden Zeitpunkte ist in Form von Balken dargestellt. **B:** Quantifizierung des prozentualen Anteils von kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zum Gesamt-EGFR-Anteil.

Nach 15minütiger EGF-Stimulation konnte in beiden Zellpopulationen eine Abnahme der Intensität und absoluten Vesikelzahl detektiert werden (Abb. 4.3.6 A), jedoch erfolgte diese in den E5-Zellen langsamer als in den Kontrollen. Zum Zeitpunkt t_{15} war die Intensität fast 3-mal so groß wie die der Leervektor-transduzierten Zellen. Für die absolute und relative Vesikelanzahl konnte in Anwesenheit von E5 etwa das 1,2fache beobachtet werden (Abb. 4.3.6 A und B). Nach 30 und 60 min glichen sich mittlere Intensität, absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel einander an, wobei auffiel, dass die Vesikelintensität und -anzahl in den Kontrolle oberhalb des Niveaus der E5-Zellen lag. Die absolute und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel in Kontroll-Zellen betrug nach 60 min das 1,3fache der Anzahl in E5-Zellen, die mittlere Intensität sogar mehr als das Doppelte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die aktivierten Rezeptoren vorwiegend im Zeitintervall von 7 bis 15 min mit EEA1 kolokalisieren. Während in den E5-exprimierenden Zellen die maximale Intensität und Anzahl von kolokalisierenden Vesikeln zum Zeitpunkt t_7 vorgefunden wurde, konnte die maximale Anzahl kolokalisierender Vesikel in Kontrollen zum Zeitpunkt t_{10}, die maximale Intensität jedoch erst nach 12 min detektiert. Zudem konnte im Verlauf der EGF-Behandlung beobachtet werden, dass die Anzahl und Intensität kolokalisierender Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Kern zunahm, während sich die Anzahl zytoplasmatischer Vesikel verringerte. Ein Indiz für das Fortschreiten des endozytotischen Transports. Es fiel auf, dass die Anzahl und Intensität der Vesikel in Kernnähe in E5-Zellen deutlich größer war. Auch nach 60 min konnte in den E5-Zellen eine erhöhte Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln sowohl im Zytoplasma, als auch in Kernnähe dokumentiert werden. Für die Kolokalisation von Gesamt-EGFR-Vesikeln mit EEA1-haltigen Vesikeln konnte ähnliches bezüglich der Anzahl und Intensitäten im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation festgestellt werden. Jedoch zeigte sich in den E5-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollen nach 60 min eine geringere Anzahl und Intensität kolokalisierender Vesikel. In Anlehnung an die Kolokalisation von phospho-EGFR mit EEA1 bedeutet dies, dass die Rezeptoren in E5-Zellen länger phosphoryliert bzw. aktiv waren und zum Zeitpunkt t_{60} 40% der phospho-EGFR-Vesikel mit dem frühen Endosomen kolokalisierten. Im Vergleich dazu betrug der relative Anteil von phospho-EGFR-Vesikel, die mit EEA1 nach 60 min noch kolokalisierten etwa 27%. Der Großteil der Rezeptoren, die zum Zeitpunkt t_{60} eine Kolokalisation mit EEA1 aufwiesen, lag inaktiviert vor.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die EGF-Rezeptoren in Anwesenheit von E5 in perinuklearen endosomen-ähnlichen Kompartimenten akkumulieren und zudem die Inaktivierung der Rezeptoren verzögert ist

4.3.2 Multivesikuläre Körperchen

Als nächstes erfolgte die kinetische Untersuchung des endozytotischen Transports von aktivierten Rezeptoren in multivesikulären Körperchen. MVBs sind perinukleare Endosomen, die durch Invagination der Membran aus den frühen Endosomen

heranreifen. Für die Mikroskopie-Analyse wurden retroviral transduzierte und auf Deckgläschen ausgesäte HeLa-Zellen für 16 h in serum-freies Medium überführt und anschließend für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30 und 60 min mit EGF behandelt. In einer Doppelimmunfluoreszenz wurden phospho-EGFR und multivesikuläre Körperchen angefärbt. Als Marker für multivesikuläre Körperchen wurde CD63 verwendet.

Die Abb. 4.3.7 stellt pro Zeitpunkt jeweils eine Beispiel-Aufnahme der CD63- und phospho-EGFR gefärbten und aufgenommenen Zellen dar. Ziel dieser 3D-Analyse war die Untersuchung der Lokalisation und Kinetik von phospho-EGFR-Vesikeln, die mit multivesikulären Körperchen kolokalisieren. Wie bereits mehrfach zuvor, konnte im Vergleich zu der Kontrolle in den E5-exprimierenden Zellen eine langanhaltende Überaktivierung der EGF-Rezeptoren dokumentiert werden, wird jedoch in diesem Zusammenhang nicht genauer analysiert. Im Vordergrund stand die kinetische Analyse kolokalisierender Vesikel.

Da das Signal für CD63 sehr diffus und weniger als vesikuläre Strukturen nachzuweisen waren, fiel es mit dem bloßen Auge schwer kolokalisierende Vesikel ausfindig zu machen. In beiden Zellpopulationen konnten schwache Kolokalisationen nach 5 min beobachtet werden. Im weiteren Verlauf konnten keine großen Unterschiede bezüglich der Anzahl kolokalisierender Vesikel detektiert werden. Jedoch zeigten sich Differenzen in Hinsicht auf die Intensität der Vesikel. Während in den E5-Zellen vor allem zu den Zeitpunkten t_7 bis t_{12} die Intensität der kolokalisierenden Vesikel am stärksten war, wurden in der Kontrolle die stärksten Vesikelintensitäten nach 12 und 15 min festgestellt. Die Intensitäten der kolokalisierenden Vesikel zu diesen Zeitpunkten waren zudem deutlich stärker als die Vesikelintensitäten in Anwesenheit von E5. Nach 30 min waren in beiden Zellpopulationen nur noch wenige kolokalisierenden Vesikel sichtbar und nach 60 min konnten keine Kolokalisationen dokumentiert werden.

Um auch die kolokalisierenden Vesikel zu erfassen, die mit bloßem Auge nicht direkt ersichtlich waren, wurde wie zuvor eine 3D-Bildanalyse durchgeführt. Die in Abb. 4.3.8 quantifizierten Daten der 3D-Bildanalyse zeigen die mittlere Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel der entsprechenden Kompartimente.

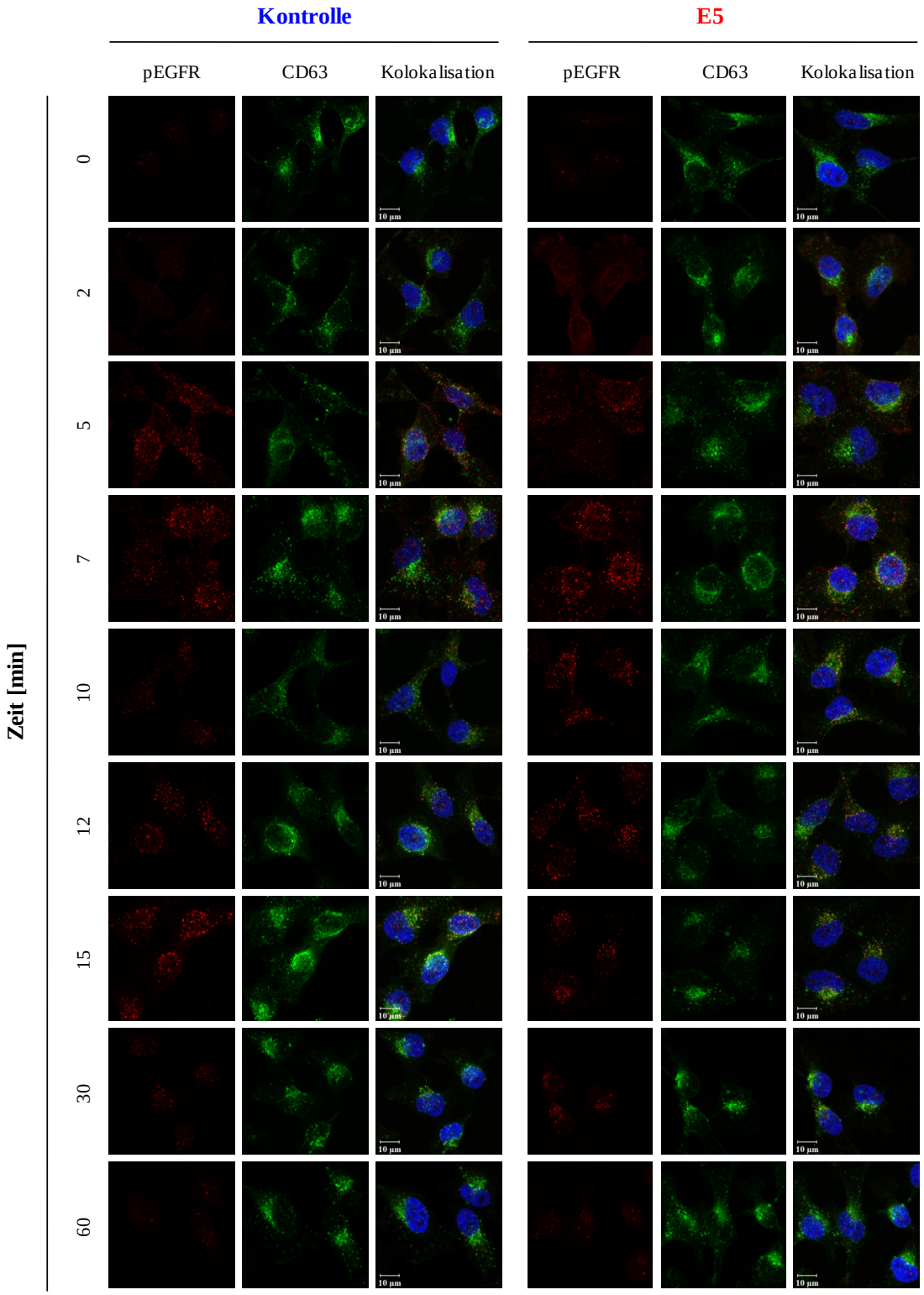


Abb. 4.3.7 3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Kolokalisation aktivierter EGF-Rezeptoren mit multivesikulären Körperchen in HeLa-Zellen. Auf Deckgläschen ausgesäte Leervektor- und E5-transduzierte HeLa-Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Medium mit EGF behandelt und in einer Doppelimmunfluoreszenz multivesikuläre Körperchen (CD63) und phospho-EGFR angefärbt. Der Nukleus wurde mit DAPI sichtbar gemacht und pro Zeitpunkt zwischen 30 und 50 Zellen am LSM710 aufgenommen und analysiert. Die als Beispiel dargestellten Bilder sind die maximale Intensitätsprojektion der einzelnen Kanäle und ihrer Überlappung.

Während die Kinetiken der mittleren Intensitäten von kolokalisierenden Vesikeln in Kontroll-Zellen zwischen Zytoplasma und Kernnähe annähernd gleich waren, konnten für E5-Zellen vor allem zu den späten Zeitpunkten Unterschiede beobachtet werden (Abb. 4.3.8 A und B). Zu Beginn der EGF-Behandlung konnte zunächst in beiden Zellpopulationen und Kompartimenten ein Anstieg der mittleren Intensität dokumentiert werden. Nach 7 und 10minütiger EGF-Stimulation war in den E5-exprimierenden Zellen eine stärkere mittlere Vesikelintensität nachweisbar. Zum Zeitpunkt t_7 betrug sie im Zytoplasma das 1,1fache, in Kernnähe das 1,4fache der Vesikelintensität in Kontroll-Zellen. Nach 10 min nahmen die mittleren Vesikelintensitäten in den Kontroll- und E5-Zellen zunächst wieder ab. Jedoch war die Abnahme in Anwesenheit von E5 nicht so stark ausgeprägt, so dass für die Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Nukleus zum Zeitpunkt t_{10} im Vergleich zur Kontrolle eine etwa 3-mal größere mittlere Intensität detektiert werden, im Zytoplasma war sie ca. doppelt so groß. Nach 12 und 15 min stiegen die mittlere Intensitäten in den Leervektor transduzierten Zellen erneut an, während in den E5-exprimierenden Zellen eine Abnahme der Intensitäten zu verzeichnen war. Die Vesikelintensität im Zytoplasma der Kontrollen betrug zu den Zeitpunkten t_{12} und t_{15} etwa das 1,3 bzw. 1,6fache der Intensität in E5-Zellen. Für die kolokalisierenden Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Zellkern konnte ca. die 1,8fache Intensität beobachtet werden. Während sich die Intensitäten der beiden Zellpopulationen nach 30 und 60 min einander anglichen und nahezu das Ausgangsniveau der EGF-Stimulation erreichten, konnte in Kernnähe für die E5-Zellen eine erneute Zunahme der mittleren Intensität kolokalisierender Vesikel zum Zeitpunkt t_{30} dokumentiert werden. Sie betrug das 1,4fache der Vesikelintensität von Kontroll-Zellen. Nach 60 min konnten jedoch für beide Zellpopulationen annähernd gleiche Vesikelintensitäten festgestellt werden, die in etwa dem Intensitätslevel zu Beginn der EGF-Behandlung entsprachen.

In Bezug auf die mittlere Vesikelanzahl konnte zunächst auch ein Anstieg im Zytoplasma und in Kernnähe beobachtet werden. Während für die kolokalisierenden Vesikel im Zytoplasma keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen in den ersten 10 min ersichtlich waren, konnten in Kernnähe bereits nach 7 min Differenzen in der Vesikelanzahl beobachtet werden (Abb. 4.3.8 A). Nach 7 und 10minütiger EGF-Stimulation betrug die Anzahl kolokalisierender Vesikel etwa das 1,4

bzw. 1,3fache der Kontrollen (Abb. 4.3.8 B). Die Anzahl kolokalisierender Vesikel in den Kontrollen nahm weiter zu. Hingegen konnte in den E5-Zellen eine kurzzeitige Abnahme der Vesikelanzahl detektiert werden. Nach 15 min stieg die Vesikelanzahl wieder deutlich an, konnte jedoch nicht annähernd die Anzahl kolokalisierender Vesikel in Kontroll-Zellen erreichen. Die mittlere Vesikelanzahl betrug zu den Zeitpunkten t_{15} und t_{30} das 1,6 bzw. 1,2fache der Anzahl kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen. Nach 60 min konnte in den Kontrollen mehr als das Doppelte gezählt werden. Zudem war die Anzahl kolokalisierender Vesikel in Kontroll-Zellen verglichen mit der Vesikelanzahl zu Beginn der EGF-Behandlung (t_2) 12-mal so groß. In den E5-Zellen betrug sie nach 60 min nur das 6,6fache im Vergleich zu t_2.

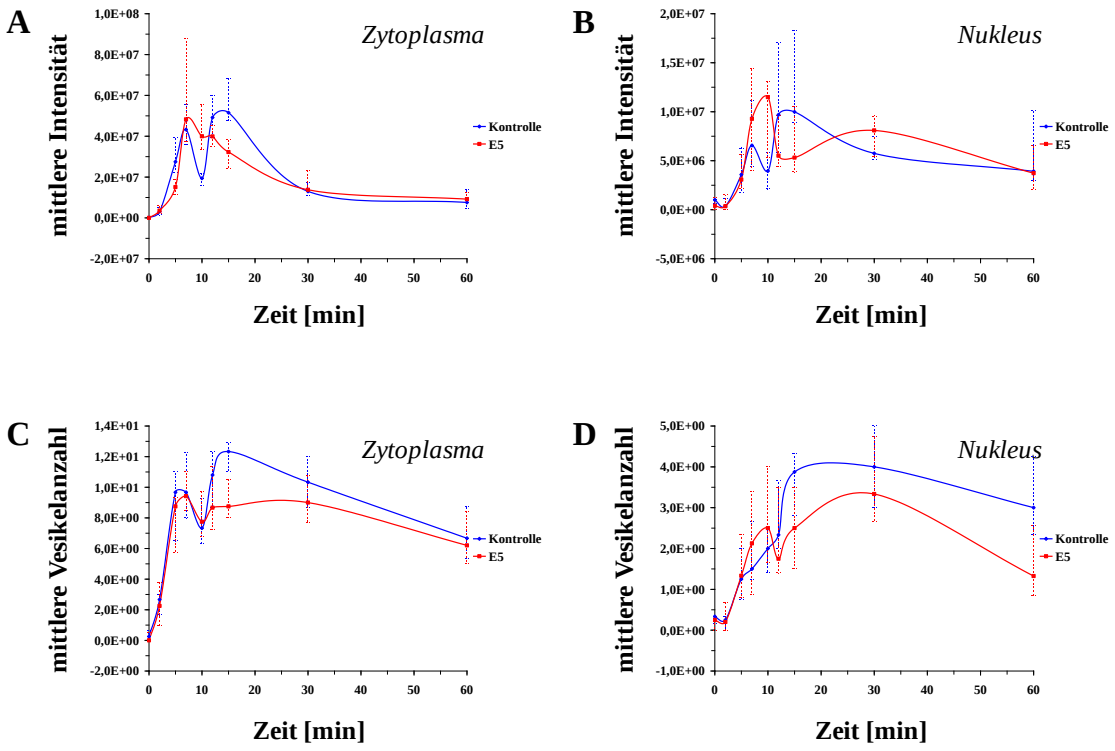


Abb. 4.3.8 Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit multivesikulären Körperchen im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus kolokalisieren. Die quantitative Bestimmung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel basiert auf dem Experiment aus Abb. 4.3.7. Im Durschnitt wurden pro Zeitpunkt zwischen 30 und 50 Zellen aufgenommen und analysiert. Der Median ist durch Rhombus bzw. Quadrat wiedergegeben, die Quartile durch Balken.

Für die Anzahl kolokalisierender Vesikel im Zytoplasma konnte Ähnliches beobachtet werden (Abb. 4.3.8 A). Nach 15minütiger EGF-Stimulation waren die größten

Unterschiede zwischen Kontroll- und E5-Zellen zu verzeichnen. Die mittlere Vesikelanzahl der Kontrollen war 1,4-mal so groß wie die der E5-exprimierenden Zellen. Im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation näherten sich die Anzahlen kolokalisierender Vesikel zunehmend mehr an. Nach 60 min war die mittlere Vesikelanzahl in beiden Zellpopulationen annähernd gleich und noch deutlich größer als zu Beginn der EGF-Stimulation. Im Vergleich zu t_2 betrug die Vesikelanzahl nach 60 min noch mehr als das Doppelte.

Auch für die kinetische Analyse der Kolokalisation von phospho-EGFR und CD63 erfolgte eine Untersuchung von mittlerer Intensität, absoluter und relativer Anzahl kolokalisierender Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation. In Abb. 4.3.9 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Zunächst konnte wie oben bereits beschrieben eine Zunahme der mittleren Intensität beobachtet werden, wobei die mittlere Vesikelintensität der Kontroll-Zellen nach 5 min stärker, nach 7 min langsamer anstieg als die der E5-Zellen (Abb. 4.3.9 A). Nach 10minütiger EGF-Stimulation nahm die Intensität kolokalisierender Vesikel in Kontroll-Zellen kurzzeitig stark ab und stieg erneut stark an. Während das Intensitätsmaximumin in den E5-exprimierenden bereits nach 7 min dokumentiert werden konnte, war die maximale mittlere Vesikelintensität in den Kontrollen erst nach 12 bzw. 15 min nachweisbar. Zu diesen Zeitpunkten war die mittlere Intensität im Vergleich zum Intensitätsmaximum bereits um das 1,3 bzw. 1,5fache gesunken. Nach 30 und 60 min waren die mittleren Intensitäten beider Zellpopulationen annähernd gleich. Die mittleren Intensitäten kolokalisierender Vesikel, ausgenommen für die Zeitpunkte t_7 und t_{10}, waren in den E5-exprimierenden Zellen geringer als die der Kontrollen. Die Vesikelintensität der E5-Zellen betrug nach 7 und 10 min im Vergleich zu den Kontroll-Zellen etwa das 1,2 bzw. 2fache. Auch für die mittlere absolute Vesikelanzahl konnte zu den Zeitpunkten t_7 und t_{10} in Anwesenheit von E5 eine geringfügige, aber nicht signifikante Zunahme gegenüber der Kontrolle beobachtet werden. Zudem schien in den Leervektor-transduzierten Zellen die Vesikelanzahl mit der Vesikelintensität zu korrelieren. Am stärksten war die Korrelation zu den späten Zeitpunkten der EGF-Behandlung. Mit Zunahme der absoluten Vesikelanzahl, konnte

auch eine Verstärkung der mittleren Intensität beobachtet werden, und umgekehrt. In den E5-Zellen konnte ähnliches nicht festgestellt werden.

Die relative Anzahl kolokalisierender Vesikel nahm im Laufe der EGF-Behandlung in beiden Zellpopulationen stark zu. Während zu Beginn der EGF-Stimulation eine mittlere relative Vesikelanzahl von etwa 5% detektiert werden konnte, betrug die relative Anzahl kolokalisierender Vesikel nach 60 min ca. 30%. Mit Ausnahme der Zeitpunkte t_2, t_{10} und t_{60} konnte im Vergleich zu den E5-Zellen in den Kontrollen im Verlauf der EGF-Behandlung ein größerer relativer Anteil kolokalisierender Vesikel nachgewiesen werden. Zu den Zeitpunkten t_2, t_{10} und t_{60} war die relative Vesikelanzahl in E5-exprimierenden Zellen geringfügig, aber dennoch nicht signifikant größer als die der Kontroll-Zellen.

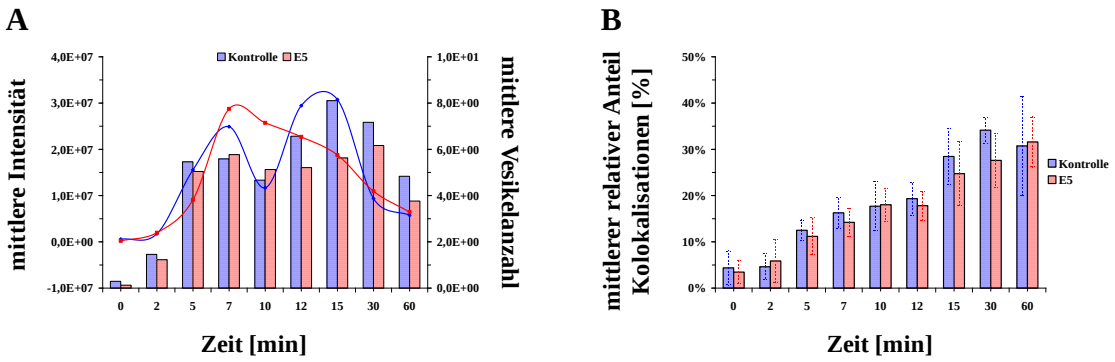


Abb. 4.3.9 Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation, die mit multivesikulären Körperchen kolokalisieren. Die Quantifizierung der mittleren Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel erfolgte anhand des Experimentes aus Abb. 4.3.7. Die Anzahl aufgenommener und analysierter Zellen pro Zeitpunkt betrug zwischen 30 und 50. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. **A:** Die Linien beschreiben die mittlere Intensität, die Balken die mittlere Anzahl kolokalisierender Vesikel im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation. **B:** Quantitative Bestimmung des relativen Anteils an kolokalisierenden Vesikeln im Vergleich zum gesamten phospho-EGFR-Anteil.

Die kinetische 3D-Bildanalyse zur Untersuchung der Kolokalisation aktivierter Rezeptoren mit multivesikulären Körperchen hat gezeigt, dass die mittlere Intensität kolokalisierender Vesikel in E5-exprimierenden Zellen vor allem zu Beginn der EGF-Stimulation größer war als die Vesikelintensität der Kontroll-Zellen, wobei sich die mittlere Vesikelanzahl in beiden Zellpopulationen kaum voneinander unterschied. Zu den späten Zeitpunkten (ab t_{12}) war sowohl die Intensität, als auch die Anzahl in E5-

Zellen deutlich geringer als die der Kontrollen. Erst nach 60 min konnte in beiden Zellpopulationen eine annähernd gleiche Intensität und relative Anzahl kolokalisierender Vesikel beobachtet werden, wobei die absolute Vesikelanzahl in Anwesenheit von E5 weiterhin geringer war als die der Kontroll-Zellen. Daraus schlussfolgernd konnten in den E5-Zellen auch Veränderungen im späten endozytotischen Transport von aktivierten EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden.

4.3.3 Recycling

Ein weiterer Abschnitt im endozytotischen Transport von EGF-Rezeptoren stellt das Recycling dar. Beim Rezeptorrecycling wird zwischen frühem und spätem Recycling unterschieden, wobei das frühe Recycling direkt nach der Internalisierung ausgehend von den frühen Endosomen erfolgt. Vesikel des späten Recyclings hingegen entstammen von den multivesikulären Körperchen bzw. späten Endosomen. Entweder findet das Recycling erst nach der Trennung von Ligand und Rezeptor statt oder die aktivierten EGF-EGFR-Komplexe werden direkt zur Plasmamembran zurück transportiert.
Zur Untersuchung des Recyclings in Leervektor und E5 transduzierten Zellen wurden diese zunächst mit Monensin vorbehandelt und anschließend in Gegenwart des Recycling-Inhibitors mit EGF stimuliert. Monensin ist ein Ionophor und bewirkt die Zerstörung der Protonengradienten über endosomale Membranen. Dies hat eine Erhöhung des pH-Wertes zur Folge. Dadurch wird wiederum der endozytotische Transport ausgehend vom frühen Endosomen gehemmt.

Zunächst wurde die Aktivierung der EGF-Rezeptoren nach Monensin-Behandlung in retroviral transduzierten HaCaT-Zellen im Immunblot analysiert. Die Färbung von phospho- und Gesamt-EGFR erfolgte in ein und demselben Immunblot. Die quantifizierten Ergebnisse der Immunblots aus einem von acht unabhängigen Experimenten sind in Abb. 4.3.10 dargestellt.

Wie aus der Abb. 4.3.10 A hervorgeht, konnte in beiden Zellpopulationen eine EGFR-Phosphorylierung nach Monensin-Behandlung nachgewiesen werden. Die maximale

Intensität für phospho-EGFR konnte in Kontroll-Zellen nach 30 min, in den E5-Zellen nach 45 min dokumentiert werden. Danach nahmen die Intensitäten in beiden Zellpopulationen wieder ab. Nach 150 min wurden in den Leervektor-transduzierten Zellen etwa die Hälfte der maximalen Intensität detektiert werden. In Anwesenheit von E5 betrug die Intensität zum Zeitpunkt t_{150} noch ca. 65% des Intensitätsmaximums.
In den E5-exprimierenden Zellen wurde nach 45 min eine Überaktivierung der EGFR beobachtet, die auch noch nach 150minütiger EGF-Stimulation vorhanden war. Im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation konnte etwa die 1,3fache Intensität für phospho-EGFR im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.

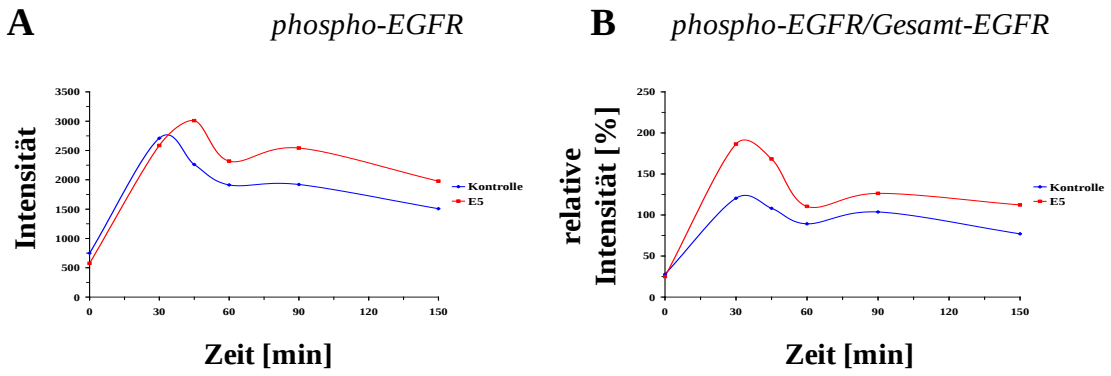


Abb. 4.3.10 Quantitative Analyse der EGFR-Aktivierung nach Inhibierung des Recyclings durch Monensin. Retroviral transduzierte HaCaT-Zellen wurden für 16 h im serum-freien Kulturmedium inkubiert und anschließend für 30 min mit Monensin vorbehandelt. Die Zellen wurden in Anwesenheit des Inhibitors mit EGF stimuliert und Gesamtproteinextrakte in M-PER-Puffer gewonnen, davon wurden 20 µg der Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunblot-Analyse erfolgte unter Verwendung von phospho-Tyrosin und Gesamt-EGFR spezifischen Primärantikörpern und IRDye konjugierten Sekundärantikörpern, um eine Detektion und Quantifizierung mit dem Odyssey Infrared Imaging System zu gewährleisten. Die gezeigten Resultate sind ein Beispiel von acht unabhängig durchgeführten Experimenten. **B:** Zur Normalisierung wurde die Intensität von phospho-EGFR (**A**) ins Verhältnis zur Intensität von Gesamt-EGFR (nicht gezeigt) gesetzt.

Auch nach der Normalisierung der Intensität von phospho-EGFR konnte in den E5-exprimierenden Zellen eine deutliche Überaktivierung der Rezeptoren im Vergleich zur Kontrolle dokumentiert werden (Abb. 4.3.10 B). In beiden Zellpopulationen konnte die maximale relative Intensität nach 30 min detektiert werden. Jedoch war die relative Intensität in Anwesenheit von E5 bereits zu diesem Zeitpunkt 1,5-mal so groß wie die der Kontroll-Zellen. Auch nach 45 min betrug die relative Intensität etwa das 1,5fache.

Nach 60 und 90minütiger EGF-Stimulation konnte für die E5-exprimierenden Zellen eine ca. 1,2fache Intensität im Vergleich zu Kontrolle beobachtet werden. Zum Zeitpunkt t_{150} wurde der Unterschied bezüglich der relativen Intensität in E5- und Kontroll-Zellen wieder deutlich größer. In Anwesenheit von E5 war die Intensität ca. 1,5-mal größer gegenüber der Intensität der Kontrolle. Nach 60 min betrug die relative Intensität in den Leervektor-transduzierten Zellen etwa 65% des Intensitätsmaximums, während in den E5-Zellen nur noch 60% der EGF-Rezeptoren des Zeitpunktes t_{30} phosphoryliert waren.

Um die vorherigen Ergebnisse zu untermauen, wurde eine Recycling-Analyse in E5- und Kontroll-Zellen zur Untersuchung der Anzahl von Oberflächen-EGFR sowie deren Internalisierung vor und nach Monensin-Behandlung mittels quantitativer Immunblots durchgeführt. In Abb. 4.3.11 sind die Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten gezeigt.

Im Vergleich zu t_0 schien die mittlere Intensität bzw. Menge an Oberflächen-EGFR mit Beginn der EGF-Stimulation zuzunehmen (Abb. 4.3.11 A). Während die Intensität in E5-exprimierenden Zellen nach 60 min immer noch konstant bei etwa 1600 pixels/mm^2 lag, konnte in den Kontrolle zum Zeitpunkt t_{60} eine Intensitätsabnahme der Oberflächen-EGFR beobachtet werden. Die mittlere Intensität in Anwesenheit von E5 betrug nach 60 min etwa das 1,2fache der Intensität für Oberflächen-EGFR in den Kontroll-Zellen. Im weiteren Verlauf der EGF-Behandlung nahm die Intensität in beiden Zellpopulationen stark ab. Nach 120 min betrug die mittlere Intensität in E5-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle ca. das 1,3fache. Die Menge an Oberflächen-EGFR war in den Kontrollen auf etwa 60% des Ausgangslevels gesunken. In den E5-exprimierenden konnten noch etwa 65% der Ausgangsmenge detektiert werden.
In den Monensin behandelten Zellen zeigte sich bereits vor Beginn der EGF-Stimulation eine deutlich erhöhte Intensität bzw. Menge an Oberflächen-EGFR in E5-exprimierenden Zellen verglichen mit der in den Kontroll-Zellen (Abb. 4.3.11 B). Sie betrug etwa das 1,3fache. Mit Beginn der EGF-Stimulation konnte keine Zunahme, sondern eine Abnahme der mittleren Intensität von Oberflächen-EGFR dokumentiert

werden. Jedoch blieb die Menge an Oberflächen-EGFR in Anwesenheit von E5 nach 30 min um das 1,3fache oberhalb der Menge in den Kontrollen. Erst nach 45 min verringerten sich die Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen, bis sie schließlich nach 60 min ganz verschwanden.

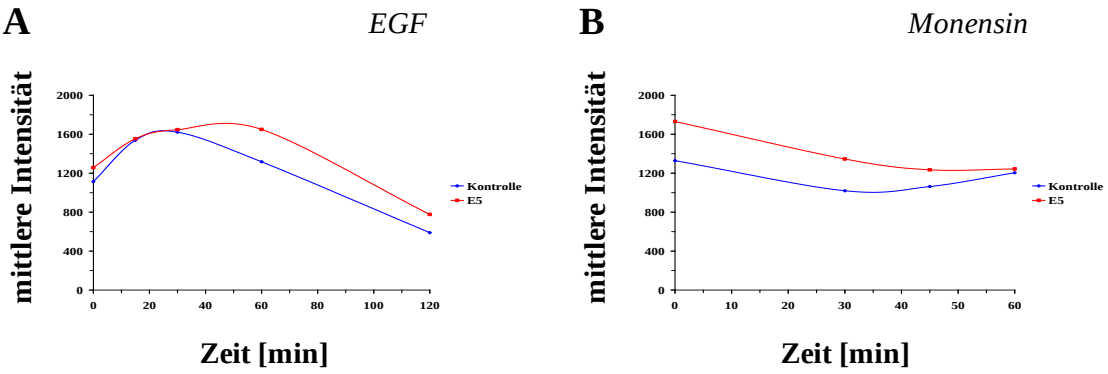


Abb. 4.3.11 Quantitative Analyse der Oberflächen-EGFR mit und ohne Inhibierung des Recyclings durch Monensin in HaCaT-Zellen. Leervektor und E5 transduzierte Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium für 15 min auf Eis **A:** mit EGF oder **B:** mit Monensin und EGF behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in vorgewärmtes, serum-freies Medium überführt. Für B enthielt das serum-freie Kulturmedium zusätzlich Monensin. Die Internalisierung erfolgt bei 37°C. Die Oberflächenproteine wurden biotinyliert und schließlich Gesamtproteinextrakte in M-PER-Puffer hergestellt. In einer SDS-PAGE wurden 20 µg der Proteine aufgetrennt und eine Immunoblot-Analyse mit Gesamt-EGFR spezifischen Primärantikörpern und IRDye konjugierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Die Detektion und Quantifizierung erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System. Die mittlere Intensität wurde jeweils aus drei biologischen Replikaten bestimmt.

Zur kinetischen Analyse des Recyclings von EGF-Rezeptoren wurden In- bzw. On-Cell Western Blots durchgeführt. Dazu wurden retroviral transduzierte HaCaT-Zellen mit Monensin vorbehandelt, schließlich für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min mit EGF stimuliert und fixiert. Die Untersuchung von phospho-, Gesamt- und Oberflächen-EGFR mittels ICW bzw. OCW ermöglichte nicht nur die Normalisierung der aktivierten Rezeptoren gegen Gesamt-EGFR, sondern auch die der Oberflächen-EGFR. Die Quantifizierung der mittleren Intensität bzw. der mittleren relativen Intensität erfolgte anhand von vier biologischen Replikaten. Die Resultate sind in Abb. 4.3.12 dargestellt und zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine deutliche Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in E5-exprimierenden Zellen (Abb. 4.3.12 A).

Die mittlere Intensität für phospho-EGFR betrug im Verlauf der EGF-Behandlung 8-18% mehr als die mittlere Intensität in Leervektor-transduzierten Zellen. Verglichen mit den unbehandelten Zellen konnte in den E5-Zellen nach Monensin-Behandlung, insbesondere zu den späteren Zeitpunkten der EGF-Stimulation (ab t_{30}), eine schwächere Phosphorylierung bzw. Aktivierung beobachtet werden (Abb. 4.1.6 A und Abb. 4.3.12 A). Für die mittlere Intensität der Kontrollen fiel vor allem ein Unterschied zwischen Monensin behandelten und unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt t_{30} auf. Die mittlere Intensität war nach Monensin-Behandlung und 30minütiger EGF-Stimulation leicht erhöht.

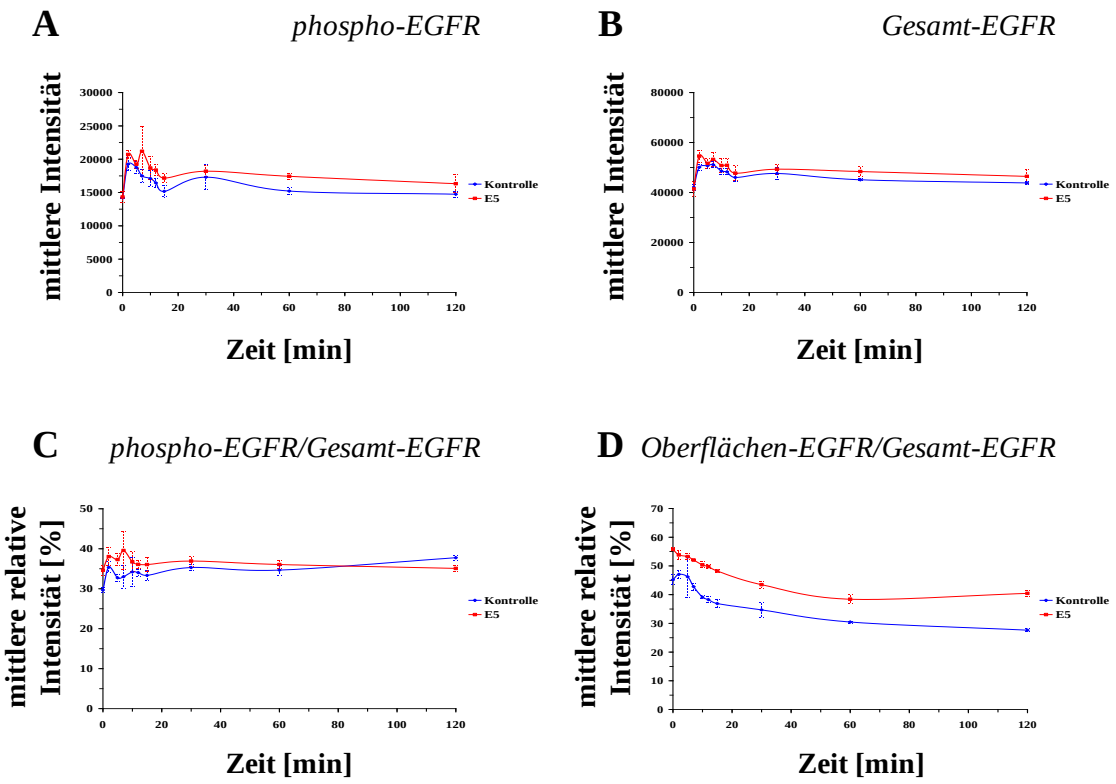


Abb. 4.3.12 Kinetik der EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach Inhibierung des Recyclings durch Monensin in HaCaT-Zellen. Leervektor und E5 transduzierte Zellen wurden nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium für mit Monensin vorbehandelt und anschließend in Anwesenheit des Inhibitors für 2, 5, 7, 10, 12, 15, 30, 60 und 120 min EGF stimuliert. Die Zellen wurden mit Hilfe des In- bzw. On-Cell Western Blots auf phospho-, Gesamt- und Oberflächen-EGFR analysiert. Die mittlere relative Intensität wurde anhand von vier biologischen Replikaten ermittelt.

Bezüglich der mittleren Intensitäten für Gesamt-EGFR konnte ein annähernd gleiches Level in Kontroll- und E5-Zellen dokumentiert werden (Abb. 4.3.12 B). Die

durchschnittliche Differenz betrug 4%. Weder in Bezug auf die Kinetik, noch auf die Menge an EGFR konnten Unterschiede zwischen unbehandelten und Monensin behandelten Zellen festgestellt werden.

Nach der Normalisierung von phospho-EGFR gegen Gesamt-EGFR fiel auf, dass die EGFR-Aktivierung von Monensin behandelten E5-Zellen vor Beginn der EGF-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle um 17% erhöht war. Dieses Phänomen wurde auch in den unbehandelten Zellen beobachtet und ist auf die bereits mehrtägige onkogene Wirkung von HPV16 E5 auf die Zellen vor Durchführung des Experimentes zurückzuführen. Verglichen mit den Kontroll-Zellen konnte im weiteren Verlauf der EGF-Stimulation eine deutliche Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in Anwesenheit von E5 nachgewiesen werden. In den ersten 7 min waren zwischen 8 und 20% mehr Rezeptoren in E5-exprimierenden Zellen phosphoryliert. Im weiteren Verlauf konnte in den E5-Zellen eine etwa 7% größere mittlere relative Intensität im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen detektiert werden. Zu den Zeitpunkten t_{30} und t_{60} unterschieden sich die Intensitäten der beiden Zellpopulationen nicht signifikant. Erst nach 120 min betrug die Anzahl aktivierter Rezeptoren in den Kontrollen 8% mehr als die Anzahl in E5-exprimierenden Zellen.
Die Kinetik der EGFR-Aktivierung in den Monensin behandelten E5-Zellen war nahezu identisch mit der in unbehandelten Zellen (Abb. 4.3.12 C und Abb. 4.1.6 C). Jedoch ein Unterschied konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen dokumentiert werden. Der zweite Aktivierungspeak in E5-Zellen nach Monensin-Behandlung war bereits nach 7 min nachweisbar und wies eine größere mittlere relative Intensität auf als der in den unbehandelten E5-Zellen. In den Monensin behandelten Kontroll-Zellen konnten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auch nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Nach Monensin-Behandlung konnte nach 2 und 30minütiger EGF-Stimulation eine stärke Aktivierung zu unbehandelten Leervektor-transduzierten Zellen beobachtet werden.

Wie die unbehandelten Zellen zeigte auch die Analyse der Oberflächen-Rezeptoren nach Monensin-Behandlung über den gesamten Stimulationszeitraum ein signifikant größeres Verhältnis aus Oberflächen- und Gesamt-EGFR in Gegenwart von HPV16 E5 (Abb. 4.1.6 D und Abb. 4.3.12 D). Verglichen mit den Kontroll-Zellen war die mittlere relative Intensität in den E5-Zellen im Verlauf der EGF-Behandlung durchschnittlich

etwa 1,3-mal so groß. Die Kinetiken waren in beiden Zellpopulationen und im Vergleich zu den unbehandelten Zellen annähernd identisch.

Die oben aufgeführten Ergebnisse aus den verschiedenen experimentellen Ansätzen zeigten auch nach Monensin-Behandlung eine stärkere und zum Teil länger anhaltende Phosphorylierung bzw. Aktivierung von EGFR in den E5-exprimierenden im Vergleich zur Kontrolle. Besonders auffallend in den Monensin behandelten E5-Zellen war die verstärkte Intensität des zweiten Aktivierungspeaks nach 7 min im Vergleich zu den unbehandelten E5-Zellen, die möglicherweise auf eine Akkumulation von aktivierten Rezeptoren in den Endosomen zurückzuführen ist. Bezüglich der Kinetik und Anzahl internalisierter Oberflächen-EGFR in Monensin behandelten Zellen konnten keine Veränderungen gegenüber unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein verstärktes Recycling allein nicht für die langanhaltende Überaktivierung in Anwesenheit von HPV16 E5 verantwortlich sein kann.

4.4 EGFR-Inaktivierung und -Abbau

Der letzte Schritt im endozytotischen Transport nach Aktivierung der EGFR-Signalkaskade kennzeichnet die Inaktivierung der EGFR durch Dephosphorylierung und anschließender Degradation von Ligand und Rezeptor. Die Dephosphorylierung von EGF-Rezeptoren kann durch sogenannte Protein-Tyrosinphosphatasen (PTPs) wie z.B. PTP1B erfolgen. Nur vollständig inaktivierte bzw. dephosphorylierte Rezeptoren gelangen über späte Endosomen zum Lysosomen, dem Abbauort der EGF-Rezeptoren.

4.4.1 Späte Endosomen und Lysosomen

Die späten Endosomen entstehen durch Reifung bzw. Differenzierung der multivesikulären Körperchen, indem letztere entweder mit sich selbst fusionieren oder mit bereits bestehenden späten Endosomen verschmelzen. Durch die Fusion mit Lipase-

und Protease-haltigen Vesikeln des *trans*-Golgi-Netzwerks und eine zunehmende Erniedrigung des pH-Wertes reifen die späten Endosomen zu Lysosomen heran.

Zur kinetischen Analyse der Dephosphorylierung und Degradation von EGF-Rezeptoren wurden Leervektor- und E5-transduzierte HaCaT-Zellen nach 16stündiger Inkubation im serum-freien Kulturmedium für 15 min auf Eis mit EGF behandelt, so dass die Liganden an die Rezeptoren binden konnten, aber nicht internalisiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in serum-freies Medium mit Tyrphostin überführt und für verschiedene Zeitintervalle bei 37°C inkubiert. Tyrphostin oder auch AG1478 ist ein spezifischer Inhibitor der Proteinkinase des EGF-Rezeptors. Unter Einsatz des Inhibitors sollte untersucht werden, ob die Überaktivierung in E5-Zellen auf eine modifizierte Dephosphorylierung und Inaktivierung der Rezeptoren zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der quantifizierten Immunblots zur Analyse der EGFR-Aktivierung nach AG1478-Behandlung sind in Abb. 4.4.1 dargestellt. Zur Detektion der Intensitäten von phospho- und Gesamt-EGFR wurde jeweils ein und dieselbe Membran verwendet. Die mittlere Intensität und das Verhältnis phospho- zu Gesamt-EGFR wurden anhand von drei technischen Replikaten mit jeweils drei biologischen Replikaten bestimmt.

In Gegenwart des Inhibitors konnte in beiden Zellpopulationen eine starke Abnahme der EGFR-Phosphorylierung beobachtet werden (Abb.4.4.1 A), die im Laufe der Inhibitorbehandlung nahezu konstant blieb. In den E5-exprimierenden Zellen konnte im Vergleich zur Kontrolle mit Ausnahme der Zeitpunkte t_{10}, t_{40} und t_{120} eine 11-23% stärkere Phosphorylierung nachgewiesen werden. Nach 10 und 40 min waren die mittleren Intensitäten in beiden Zellpopulationen annähernd gleich, während nach 120 min in den Kontrollen eine stärkere EGFR-Phosphorylierung detektiert werden konnte.

Die kinetische Analyse der Gesamt-EGFR-Level zeigte innerhalb der ersten 15 min der Behandlung mit AG1478 in beiden Zellpopulationen eine deutlich Zunahme der Gesamt-EGFR-Level (Abb. 4.4.1 B). Im Vergleich zu t_0 betrug die mittlere Intensität nach 15 min in E5-Zellen etwa das 1,4fache, in den Kontrolle ca. das 1,3fache. Im weiteren Verlauf der AG1478-Behandlung nahmen die mittleren Intensitäten wieder ab, blieben jedoch um das 1,2fache über dem Ausgangsniveau. Auffällig für die Gesamt-EGFR-Level in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen war eine 4-11% erhöhte mittlere Intensität in den Kontrollen im Vergleich zu den E5-Zellen.

Nach der Normalisierung von phospho-EGFR gegen Gesamt-EGFR wurden die Unterschiede bezüglich der EGFR-Phosphorylierung zwischen E5- und Kontroll-Zellen deutlicher (Abb. 4.4.1 C). Verglichen mit den Leervektor-transduzierten Zellen konnte mit Ausnahme des Zeitpunktes t_{120} in Anwesenheit von E5 eine stärkere und langanhaltende Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren festgestellt werden. Die mittlere relative Intensität betrug in den E5-Zellen das 1,1 bis 1,4fache der relativen Intensität in den Kontroll-Zellen.

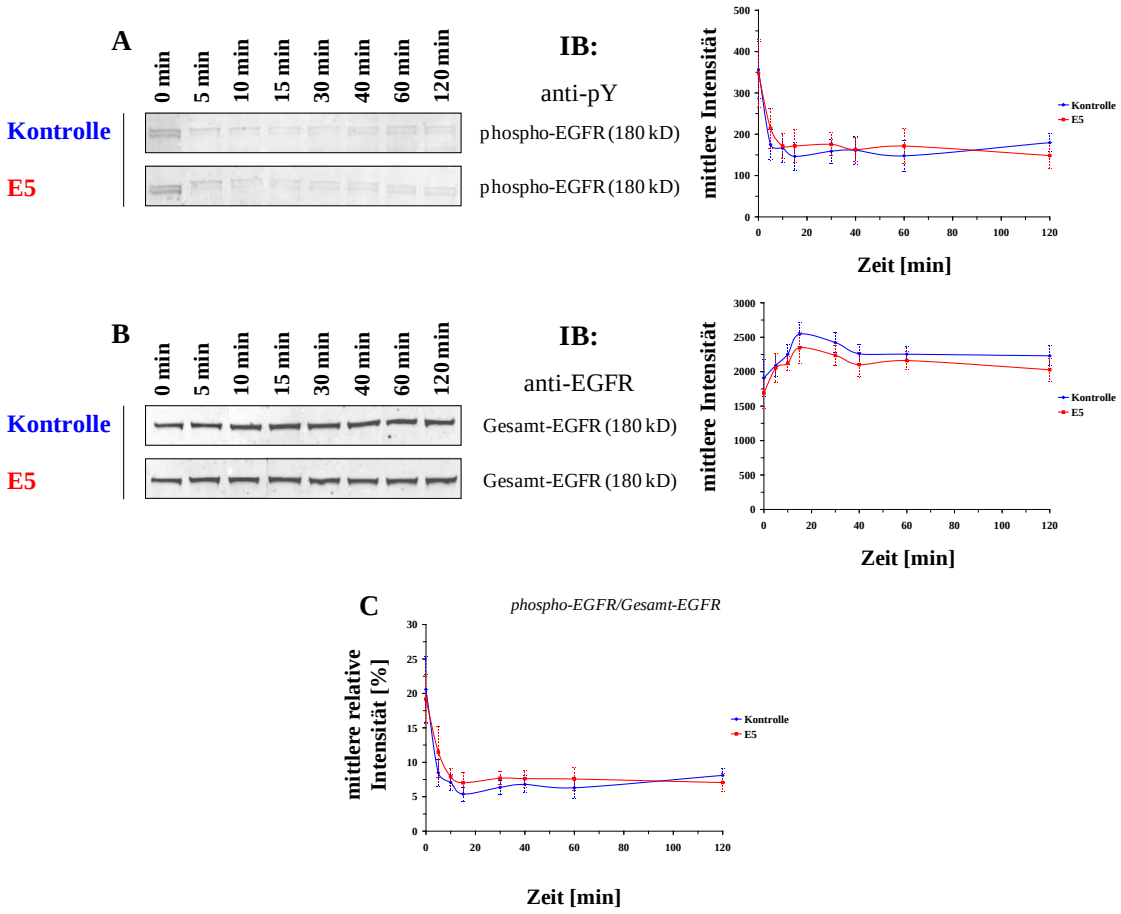


Abb. 4.4.1 Quantitative Immunblot-Analysen zur kinetischen Untersuchung der EGFR-Aktivierung nach Inhibierung der EGFR spezifischen Tyrosinkinase durch AG1478. Retroviral transduzierte HaCaT-Zellen wurden für 16 h in serum-freies Kulturmedium überführt und anschließend für 15 min auf Eis mit EGF behandelt. Nach mehrmaligen waschen wurden die Zellen mit vorgewärmtem, serum-freiem Medium und AG1478 für 5, 10, 15, 30, 40, 60 und 120 min bei 37°C inkubiert. Die Gesamtproteinextraktion erfolgte in M-PER. Zur Immunblot-Analyse wurden 20 µg der Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit phospho-Tyrosin und Gesamt-EGFR spezifischen Primärantikörpern gefärbt. Die Detektion und Quantifizierung von phospho-EGFR (**A**) und Gesamt-EGFR (**B**) wurde mit dem Odyssey Imaging Infrared System durchgeführt. Die mittlere Intensität wurde aus neun Replikaten bestimmt. Die mittlere relative Intensität spiegelt das Verhältnis von phosphorylierten EGFR zu Gesamt-EGFR wider und ist in Prozent angegeben (**C**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den E5 transduzierten Zellen die langanhaltende Überaktivierung der EGF-Rezeptoren nach Behandlung mit Tyrphostin bestehen blieb. Möglicherweise wird die Dephosphorylierung der EGFR in Anwesenheit von E5 modifiziert und erfolgt dadurch langsamer als in den Kontroll-Zellen.

4.5 Zusammenfassung der Effekte des HPV16 E5-Proteins auf die EGFR-Signaltransduktion

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in Anwesenheit von HPV16 E5 eine Überaktivierung der EGF-Rezeptoren ausgelöst wird. Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu klären, welche zell- und molekularbiologischen Mechanismen eine verstärkte und langanhaltende EGFR-Aktivierung verursachen. Dazu wurde die EGFR-Aktivierung in den einzelnen Abschnitten des endozytotischen Transports systematisch untersucht.

Die Abb. 4.5.1 fasst die wichtigsten Effekte von E5 auf die EGFR-Signaltransduktion zusammen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Clathrin-abhängige Internalisierung aktivierter Rezeptoren in Anwesenheit von E5 schneller und stärker vonstattenging als in den Kontrollen, während die Clathrin-unabhängige/ Caveolin-abhängige Internalisierung in beiden Zellpopulationen eine untergeordnete bzw. keine Rolle spielte und eher für den endozytotischen Transport von Bedeutung war (Abschnitt 4.2). Zum Beispiel konnten zum Zeitpunkt t_7 ein Viertel der phospho-EGFR in Clathrin-haltigen Vesikeln und fast zwei Drittel in frühen Endosomen detektiert werden. Die restlichen 14% waren bereits in multivesikulären Körperchen. Auch wenn sich die Anzahl aktivierter Rezeptoren in multivesikulären Körperchen zwischen E5- und Kontroll-Zellen kaum unterschied, so konnte in Anwesenheit von E5 eine deutlich stärkere Intensität kolokalisierender Vesikel nach 7 und 10 min beobachtet werden (Abschnitt 4.3.2). Die aktivierten Rezeptoren lagen in großen Clustern innerhalb der MVBs vor. Insgesamt befanden sich zum Zeitpunkt t_7 99% der aktivierten Rezeptoren in E5-Zellen in eines dieser Kompartimente, während es in den Kontrollen nur 91% waren. In den Kontrollen war dies hauptsächlich auf die geringere Anzahl von aktivierten Rezeptoren in Clathrin-haltigen Vesikeln zurückzuführen.

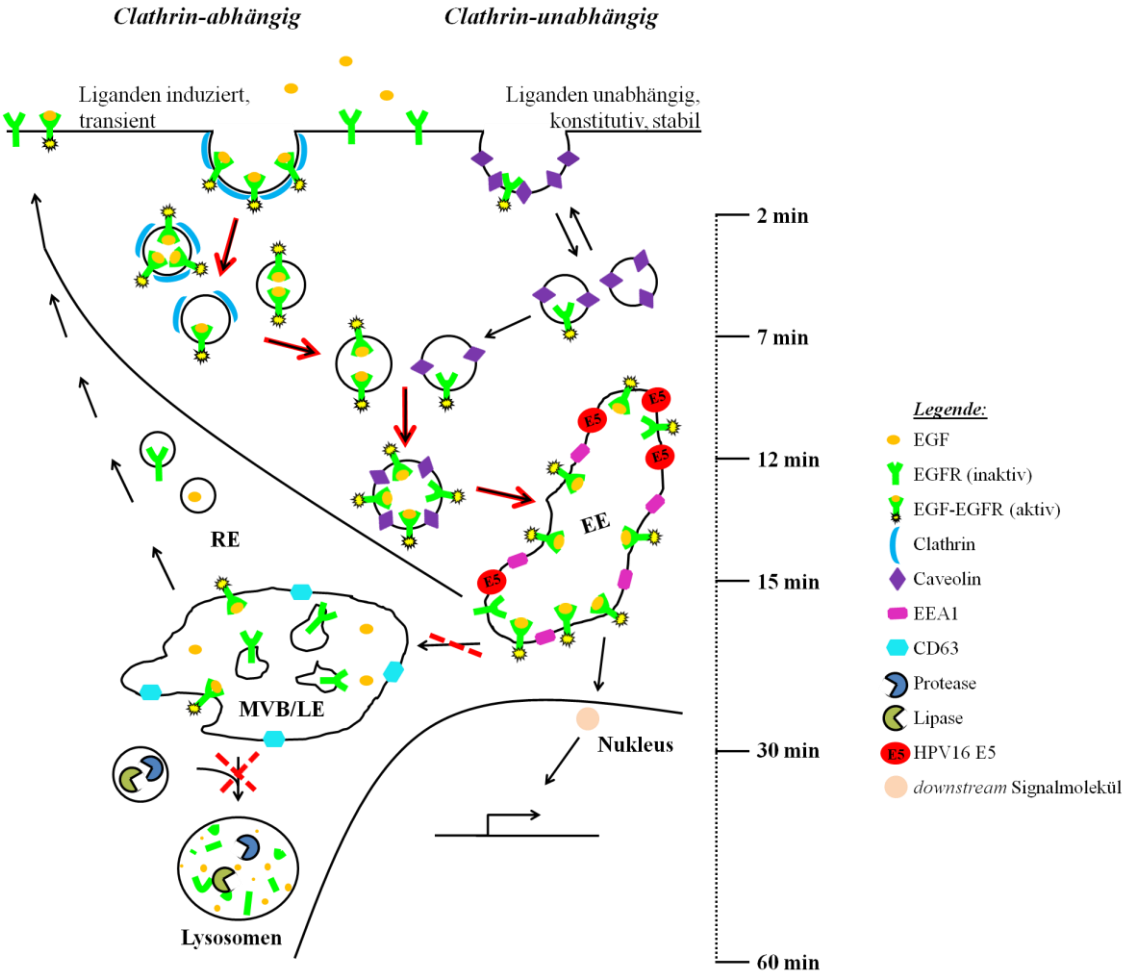


Abb. 4.5.1 Zusammenfassung der Effekte von HPV16 E5 auf die Aktivierung der EGFR in einem vereinfachten, schematischen Modell. Aus den experimentellen Daten kann geschlossen werden, dass der endozytotische Transport und die Dephosphorylierung der aktivierten Rezeptoren in E5-Zellen modifiziert ist. Möglicherweise ist der Transport von späten Endosomen zu den Lysosomen in Anwesenheit von E5 inhibiert.

Der endozytotische Transport war in beiden Zellpopulationen geprägt von einer Zunahme aktivierter Rezeptoren, die mit endosomalen Kompartimenten in unmittelbarer Nähe des Nukleus kolokalisierten (Abschnitt 4.3.1). Die Mehrheit (ca. zwei Drittel) der aktivierten Rezeptoren befand sich im frühen Endosomen. Vor allem nach 7 min konnte in den E5-Zellen nur eine geringfügig größere Anzahl aktivierter Rezeptoren in den frühen Endosomen detektiert werden, jedoch wiesen sie eine deutlich stärkere Intensität als die Kontrollen auf. Die aktivierten Rezeptoren bildeten auch in den frühen Endosomen Cluster. Ähnliches galt auch für die aktivierten EGFR in Clathrin-haltigen Vesikel zum Zeitpunkt t_{10}, wobei die Anzahl im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht war (Abschnitt 4.2.1). Nach 10 und 12 min waren in den E5-

Zellen deutlich weniger aktivierte Rezeptoren in den frühen Endosomen (t_{10}) bzw. Clathrin-haltigen Vesikeln (t_{12}) vorzufinden als in den Kontrollen. Auch die Intensitäten der kolokalisierenden Vesikel war deutlich geringer als zu den jeweils vorherigen Zeitpunkten.

Eine Zunahme des Recyclings konnte in E5-exprimierenden Zellen nicht verzeichnet werden (Abschnitt 4.3.3). Zudem wurde in Anwesenheit von E5 eine langsamere Dephosphorylierung der Rezeptoren beobachtet (Abschnitt 4.4).

Zu den späten Zeitpunkten konnten vor allem Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen in Bezug auf die Menge an aktivierten Rezeptoren in frühen Endosomen und multivesikulären Körperchen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.3.1 und 4.3.2). Während nach 30 min die Anzahl aktivierter Rezeptoren in multivesikulären Körperchen in Anwesenheit von E5 deutlich geringer war als die der Kontroll-Zellen, konnte nach 60 min verglichen mit der Kontrolle eine erheblich größere Anzahl an aktivierten Rezeptoren in frühen Endosomen dokumentiert werden.

Zusammenfassend kann aus den experimentellen Daten geschlussfolgert werden, dass der endozytotische Transport und die Dephosphorylierung der aktivierten Rezeptoren in E5-Zellen modifiziert ist und die Überaktivierung weniger auf ein erhöhtes Recycling zurückzuführen ist. Möglicherweise kommt es dadurch zu einer Inhibierung des Transports von MVBs über späte Endosomen zu den Lysosomen in Anwesenheit von HPV16 E5.

5. Diskussion

Die Malignisierung ist ein Multistufenprozess, d.h. für die Enstehung von Tumoren aus einer einzelnen Zelle sind mehrere Ereignisse notwendig. Während normale Zellen einer strengen Kontrolle von Zellwachstum, -teilung und -differenzierung unterliegen, scheinen diese Mechanismen in Tumorzellen infolge vererbbarer genetische und epigenetischer Veränderungen aus dem Gleichgewicht geraten zu sein. Im Zusammenhang mit den epigenetischen Veränderungen, d.h. bei dem veränderten Muster der Genexpression und gleichbleibender DNA-Sequenz, konnte gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung von Tumorzellen in ihrer Gesamtheit geringer ist als die von gesunden Zellen (Nguygen et al., 2001; Pfeifer & Rauch, 2009). Ursachen für die vererbbaren genetischen Veränderungen stellen chemische Karzinogene wie Benzopyren oder aromatsiche Amine, ionisierende Strahlung oder Viren wie HBV, EBV oder HPV dar. Letzteres ist an der Entwicklung des Zervixkarzinoms beteiligt, in dem es zu einer Deregulation von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose führt. Verantwortlich dafür sind die Interaktionen der viralen Onkoproteine E5, E6 und E7, insbesondere die der HR-HPV-Typen 16 und 18, mit zellulären Proteinen, wodurch die HPV-infizierten Zellen einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den gesunden Zellen erlangen (Bravo et al., 2004).

Die wichtigste transformierende Eigenschaft ist die verstärkte Aktivierung von EGFR. Eine Überaktivierung von ErbB-Rezeptoren, infolge einer Überexpression, Mutation, Deletion oder Produktion autokriner Liganden, konnte auch im Zusammenhang mit anderen Tumorerkrankungen wie z.B. Brust-, Hirn-, Dickdarm- und Eierstocktumoren beobachtet werden und ist oftmals mit einer schlechten Prognose verbunden (Badovinac-Crnjevic et al., 2010; Brennan et al., 2009; Rigopoulos et al., 2010; Nielson et al., 2004; Steffensen et al., 2008).

Im Kontext mit HPV16 E5 wurde für die EGFR-Überaktivierung eine Zunahme des Recyclings postuliert. E5 ist in der Lage an die 16kD-Untereinheit der vATPase zu binden und bewirkt eine Inhibierung der Azidifizierung endosomaler Kompartimente (Finbow & Harrison, 1997), welche mit einem verstärkten Recycling und einer gesteigerten Phosphorylierung des EGFR im Zellkulturmodell einhergeht (Faulkner-

Valle & Banks, 1995; Straight et al., 1995; Auvinen et al., 1997). Ein anderer Mechanismus, der mit einer Überaktivierung in Verbindung gebracht wird, ist die Interaktion von E5 mit dem EGF-Rezeptor und der damit hervorgerufenen Stabilisierung der EGFR-Phosphorylierung (Crusius et al., 1998). Folglich wird eine Degradation des Rezeptors verhindert (Rodriguez et al., 2000). Eine weitere These, die eine verminderte Degradation unterstützt, stellten Zhang und Mitarbeiter auf. Sie zeigten, dass in Anwesenheit von E5 die Ubiquitinligase c-Cbl inhibiert, welche beim Abbau des Rezeptors eine wichtige Rolle einnimmt (Zhang et al., 2005).
Bis heute hat sich keine dieser Theorien experimentell beweisen lassen, so dass die molekularen Mechanismen der E5-bedingten EGFR-Überaktivierung weiterhin unbekannt sind.

Beruhend auf diesen Daten sollten die Ursachen der EGFR-Überaktivierung intensiver untersucht werden. Daher wurde die Aktivierung der EGF-Rezeptoren zunächst mit Hilfe molekular- und zellbiologischer Methoden in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen kinetisch analysiert und mit den Ergebnissen aus den Inhibitorexperimenten verglichen (Kapitel 4).

5.1 Das Onkoprotein HPV16 E5 verursacht eine zellunspezifische, EGF-abhängige Überaktivierung von EGF-Rezeptoren

Zur Untersuchung der Aktivierung von EGF-Rezeptoren wurden HaCaT- und HeLa-Zellen verwendet. Wie bereits erwähnt, weisen beiden Zelllinien eine unterschiedliche Anzahl an Rezeptoren auf. Während in HaCaT-Zellen etwa $1x10^6$ EGFR pro Zelle vorzufinden sind, kommen in HeLa-Zellen ca. $5x10^4$ EGFR pro Zelle vor (Game et al., 1992; Berkers et al., 1991). Ein weiterer Unterschied ist der HPV-Status der Zelllinien. Im Gegensatz zu den HPV-negativen HaCaT-Zellen (Boukamp et al., 1988), sind die HeLa-Zellen HPV18-positiv und exprimieren die Onkogene E6 und E7 (Scherer et al., 1953; Pater et al., 1985). Daher bestand die Möglichkeit, den Einfluss und Effekt von E5 ohne und im Kontext einer HPV-Infektion zu untersuchen.

Molekularbioglich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der EGFR in HaCaT-Zellen durch die verschiedenen Liganden unterschiedlich stark erfolgte (Abschnitt

4.1.2, Abb. 4.1.3). Für beide untersuchten Zellpopulationen (E5- & Leervektor-transduzierte Zellen) wurde eine deutliche Rezeptoraktivierung nach EGF- und TGFα-Behandlung dokumentiert. Für Amphiregulin konnte auch eine Aktivierung beobachtet werden, jedoch war diese im Vergleich zu den beiden erstgenannten Liganden relativ schwach. Durch Heregulin konnte weder für Kontroll-, noch für E5-Zellen eine Aktivierung von EGFR hervorgerufen werden. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass die Liganden AR, EGF und TGFα vorwiegend für die EGFR(ErbB1)-Rezeptoren verantwortlich sind, während das Ziel von Heregulin die Aktivierung von ErbB3- und ErbB4-Rezeptoren ist (Klapper et al., 2000; Yarden & Sliwkowski, 2001).
Durch die hohe Selektivität der Liganden kann ein größeres Repertoire an Signalwegen spezifisch initiiert werden. So werden durch Hereguline vor allem die MAPK-, PI3K- und PLCγ-Signalwege induziert und dadurch das Überleben der Zellen, vorwiegend die des Nervensystem und Herzgewebes, gesichert (Crovello et al., 1998; Olayioye et al., 1999; Sweeney et al., 2000; Britsch, 2007; Talmage, 2008). Infolge der EGFR-Aktivierung durch AR, EGF und TGFα wird ein großes Netzwerk aus Signalkaskaden aktiviert, die u.a. in Zelladhäsion, -proliferation, -überleben, -differenzierung und -migration involviert sind (Li et al., 2001; Smith et al., 2004; Beeser et al., 2005; Haglund et al., 2005; Meng et al., 2005; Van Slyke et al., 2005; Ettinger, 2006; Immervoll et al., 2006). Während EGF in einem breiten Spektrum von ektodermalen und mesodermalen Zellen (z.B. Fibroblasten, Glia-Zellen, epitheliale und endotheliale Zellen, Chondrozyten) produziert wird und seine mitogenen Signale aussendet (Carpenter & Cohen, 1979; Carpenter, 1981; Urdea et al., 1983; Cohen, 1987; Alberts et al., 2004), übt TGFα vorwiegend in bzw. auf Keratinozyten, neuronalen Zellen und Makrophagen seine Wirkung aus (Fallon et al., 2000).

Es ist beschrieben worden, dass die mRNA-Expression der EGFR-Liganden AR, EGF und TGFα in Tumoren des Endometriums und der Zervix erhöht waren (Pfeiffer et al., 1997), jedoch geht aus der Literatur keine Zunahme der Liganden-Expression im Kontext mit der HPV16 E5-bedingten EGFR-Überaktivierung hervor. Die von uns nachgewiesene Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in Anwesenheit von HPV16 E5, welche bereits auch durch andere Gruppen gezeigt wurde (Abschnitt 4.1; Straight et al., 1993; Crusius et al., 1998; Zhang et al., 2002; Suprynowicz et al., 2010), konnte ausschließlich durch EGF induziert werden und war zu dem unabhängig von der

Konzentration des Liganden (Abschnitt 4.1.2, Abb. 4.1.3 und 4.1.3, Abb. 4.1.4). Im Gegensatz zu den hier dargestellten Resultaten wurde postuliert, dass TGFα auch eine Überaktivierung von EGFR durch E5 hervorruft (Crusius et al., 1998). Außerdem konnte durch experimentelle Analysen eine E5-bedingte Überaktivierung von ErbB2-EGFR-Heterodimere nachgewiesen werden. Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang bezüglich der Aktivierung von ErbB4-Rezeptor und dessen *downstream*-Signalmolekül c-jun durch HPV16 E5 (Chang et al., 2001; Chen et al., 2007). Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Ligandenkonzentration keinen Einfluss auf die E5-bedingte EGFR-Überaktivierung hat und waren somit konkordant zu beschrieben Daten aus der Literatur (Crusius et al., 1998). In Bezug auf die Aktivierung des PDGF-Rezeptors durch BPV1 E5 konnte ebenfalls eine Konzentrationsunabhängigkeit festgestellt werden, und somit unsere Ergebnisse zusätzlich bekräftigen (Drummond-Barbosa et al., 1995).

Durch kinetische Analysen konnte bewiesen werden, dass die langanhaltende Überaktivierung nicht nur in E5-transduzierten HaCaT-Zellen, sondern auch in E5-transduzierten HeLa-Zellen zu beobachten war (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.5; 4.1.6 und 4.1.7). In letzteren war dieser Effekt sogar deutlicher zu erkennen als in den E5-exprimierenden humanen Keratinozyten. Während im Immunblot die größten Differenzen zwischen Leervektor- und E5-transduzierten HaCaT-Zellen nur etwa das 1,2 bzw. 1,3fache (t_{40} und t_{120}) betrugen, wurde in den HeLa-Zellen ein maximaler Unterschied zwischen Kontrolle und E5 um mehr als das Doppelte (t_{15}) festgestellt. Selbst der minimale Unterschied betrug in HeLa-Zellen noch das 1,4fache (t_{60}). Im Durchschnitt ergab die Phosphorylierung in E5-exprimierenden HaCaT-Zellen etwa das 1,1fache der Kontrolle, in E5-exprimierenden HeLa-Zellen war die EGFR-Phosphorylierung im Vergleich zu den Leervektor-transduzierten Zellen 1,6-mal so groß (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.5 C und F). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für den ICW festgestellt werden (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.6 A-C). Damit konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Überaktivierung nicht zellspezifisch stattfindet (Leechanachai et al., 1992; Straight et al. 1993 und 1995; Crusius et al., 1998, 1999 und 2000; Zhang et al., 2005; Pedroza-Saavedra et al., 2010) und zudem im Kontext einer HPV-Infektion verstärkt wird. Diese Beobachtung konnte auch in Bezug auf andere transformierende

Eigenschaften gemacht werden (Stöppler et al., 1996; Boulenouar et al., 2010; Gao & Zheng, 2010; Maufort et al., 2010).

Die Untersuchung der Gesamt-EGFR-Menge mittels Immunblot und ICW ergab keine Unterschiede zwischen E5- und Leervektor-transduzierten Zellen. Diese Daten stehen im Einklang mit den Immunblot-Ergebnissen veröffentlichter Arbeiten, die ebenfalls keinen Einfluss von E5 auf die Gesamt-EGFR-Menge in HaCaT und primären Keratinozyten beweisen konnten (Crusius et al., 1998; Zhang et al., 2002). In Bezug auf diese Ergebnisse kann eine erhöhte Menge an endogenen EGF-Rezeptoren nicht für die Überaktivierung verantwortlich gemacht werden (Zhang et al., 2002).

Desweiteren wurde die Menge an Oberflächenrezeptoren im Verhältnis zu den Gesamtrezeptoren mittels OCW bzw. ICW quantifiziert (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.6 B und D). Diese Untersuchung wurde vorgenommen, um eine Aussage treffen zu können, in wie weit E5 die Internalisierung der Rezeptoren beeinflusst. Die Kinetik der Internalisierung von Oberflächen-EGFR war in beiden Zellpopulationen nahezu identisch und wurde somit nicht durch E5 beeinflusst. Bereits Straight und Mitarbeiter untersuchten indirekt die Kinetik und Menge von Oberflächen-EGFR in E5-exprimierenden und normalen Keratinozyten mit Hilfe von radioaktiven Liganden-Bindungsassays und konnten keine Unterschiede feststellen (Straight et al., 1993). Bezüglich der Menge an Oberflächen-EGFR konnten wir jedoch Differenzen zwischen den beiden Zellpopulationen aufzeigen. Verglichen mit den Kontrollen betrug das Oberflächen-EGFR/Gesamt-EGFR-Verhältnis in den E5-exprimierenden Zellen über dem gesamten Stimulationszeitraum etwa das 1,2 bis 1,3fache. Dies könnte möglicherweise auf eine Akkumulation von EGFR in E5-exprimierenden Zellen hindeuten. Auch Straight und Mitarbeiter detektierten eine verminderte Degradation der EGF-Rezeptoren. Noch nach 3stündiger EGF-Stimulation konnten Rezeptoren in Anwesenheit von E5 nachgewiesen werden, während in Kontroll-Zellen die EGF-Rezeptoren degradiert waren (Straight et al., 1993).

Beim Vergleich der Resultate aus Abb. 4.1.3, Abb. 4.1.5 und Abb. 4.1.6 fällt auf, dass die Standardfehler der kinetischen, quantitativen Immunblot-Analysen (Abb. 4.1.5) deutlich größer waren als die der ICW (Abb. 4.1.6) bzw. der Immunblots (Abb. 4.1.3). Da die zu untersuchenden Proteine aus Kontroll- und E5-Zellen von Abb. 4.1.3 in ein und demselben Gel bzw. ein und derselben Membran unter den gleichen

experimentellen Bedingungen durchgeführt und analysiert werden konnten, waren die Standardfehler der quantitativen Immunblot-Analysen vergleichsweise gering. Ähnlich verhielt es sich für die kinetische Analyse der Leervektor- und E5-exprimierenden Zellen im ICW. Indem mehrere biologische Replikate und Zeitpunkte auf ein und derselben 96-well Zellkulturplatte unter nahezu identischen Bedingungen untersucht werden konnten, fielen die Standardfehler relativ gering aus.
Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Standardfehler in E5-transduzierten Zellen größer waren als die der Kontrollen. Während bei den Kontrollen eine nahezu einheitliche Zellpopulation vorliegt, ist in Abhängigkeit von der Transduktionseffizienz eine stark heterogene Population ausfindig zu machen, wodurch die Abweichungen der Daten zunehmen.

Die quantitative Analyse der phopho- und Gesamt-EGFR mittels Durchflusszytometrie ergab bei Betrachtung der E5- und Leervektor-transduzierten Zellen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Aktivierung von EGFR. (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.7) Im Gegensatz zu den oben genannten Methoden ermöglichte die Untersuchung der EGFR-Phosphorylierung im FACS jedoch eine Differenzierung der E5-transduzierten Zellen in E5-positiv und -negativ, so dass die tatsächliche Menge an aktiviertem und Gesamt-EGFR in Anwesenheit von E5 gemessen und analysiert werden konnte (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.7). Bei einer mittleren Transduktionseffizienz zwischen 30-50% lag die Vermutung nah, dass die Anzahl an aktiviertem EGFR der E5-positiven Zellpopulation durch die Menge in E5-negativen Zellen relativiert wurde und dadurch der Effekt in der E5-Gesamtpopulation (bisher als E5-transduzierte, E5-exprimierende bzw. E5-Zellen bezeichnet) nicht mehr nachweisbar war. Dies konnte durch die FACS-Analyse bewiesen werden. Verglichen mit den Kontrollen und E5-negativen Zellen zeigte die FACS-Analyse der E5-positiven Zellen im Durchschnitt eine 1,3fache Menge an aktiviertem Rezeptor. Auch die Anzahl an Gesamt-EGFR-Rezeptoren betrug in E5-positiven Zellen etwa das 1,4fache, was auf eine Akkumulation von EGFR in Anwesenheit von E5 zurückzuführen sein könnte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Straight und Mitarbeiter, die mit Hilfe von radioaktiven Liganden-Bindungsassayseine 2-4fache Zunahme an endogenem EGFR in E5-exprimierenden Keratinozyten und einen verringerten Abbau von EGFR beobachten konnten (Straight et al., 1993).

Während für die EB- und HB-Viren eine verstärkte Expression des Rezeptors zur Überaktivierung führt, induzieren die DNA-Viren eher die Expression der Liganden durch autokrine Stimulation (Menzo et al., 1993; Miller et al., 1995; Opgenorth et al., 1993). Für das AE-Virus konnte hingegen eine verkürzte Version des Rezeptors beobachtet werden, der konstitutiv aktiv war (Adelsman et al., 1996).
Die bisher dargestellten und analysierten Ergebnisse zur Untersuchung der E5-bedingten EGFR-Überaktivierung haben gezeigt, dass diese weder durch einen mutierten Rezeptor, noch durch Überexpression von EGF, anderen Liganden oder EGFR verursacht wird, und zudem unabhängig von der Konzentration des Liganden war. Insbesondere die OCW- und FACS-Analyse, die in Anwesenheit von E5 eine Zunahme von Gesamt- und Oberflächen-EGFR beweisen, deuten darauf hin, dass die Überaktivierung der Rezeptoren auf eine Akkumulation des EGFR infolge eines verstärkten Recyclings und/ oder einer verminderten Degradation zurückzuführen ist (Straight et al., 1995; Auvinen et al., 1997; Zhang et al., 2005).

Mit den oben beschriebenen Methoden Immunblot, ICW bzw. OCW sowie der Durchflusszytometrie konnten unter wenig Zeitaufwand und im großen Maßstab Erkenntnisse zu Veränderungen in der EGFR-Aktivierung und -Menge gewonnen werden, jedoch bestand keine Möglichkeit, Aussagen bezüglich der zellulären Lokalisation der Rezeptoren nach Liganden-abhängiger Aktivierung zu treffen. Auch wenn eine Isolierung von verschiedenen Vesikeln bzw. Kompartimente mittels biochemischer Methoden durchführbar ist, sind diese Technologien nicht ausreichend ausgereift, um eine Charakterisierung des endozytotischen Transports nach Aktivierung der Rezeptoren zu ermöglichen. Daher mussten neue Ansätzen gefunden werden, die eine quantitative und spatio-temporäre Untersuchung der Internalisierung und Endozytose von Ligand, Rezeptor und aktiviertem Rezeptor erlauben (Kapitel 4). Mit Hilfe der automatisierten, quantitativen Analyse von 3D-Multikanalbildern konnte der endozytotische Transport von aktivierten und Gesamt-EGF-Rezeptoren in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen charakterisiert werden. Konfokale Aufnahmen zur kinetischen Analyse von Ligand, aktivierten und Gesamt-Rezeptoren und deren zellulären Lokalisation in Anwesenheit von HPV16 E5 wurden in dieser Art, wie sie hier dargestellt sind, bisher nicht publiziert.

Erste und einzige Konfokal-Mikroskopie-Aufnahmen von EGF und EGFR im Zusammenhang mit E5 nach verschiedenen Zeiten der EGF-Stimulation wurden von Straight und Mitarbeitern durchgeführt (Straight et al., 1993). Sie konnten zwei wichtige Unterschiede zwischen E5- und Kontroll-Zellen nachweisen. Ersten wurde beobachtet, dass die Anzahl an Oberflächen-Rezeptoren in Anwesenheit von E5 deutlich erhöht war. Während in den Kontrollen die EGF-Rezeptoren längst internalisiert und abgebaut waren, konnte in den E5-transfizierten Zellen noch Rezeptoren an der Zelloberfläche gefunden werden. Zweitens konnte eine verminderte Degradation von EGFR in E5-exprimierenden Zellen dokumentiert werden. Ein Teil der Rezeptoren persistierten in perinuklearen Kompartimenten. Zudem konnten durch die Doppelfärbungen differenzierte Ziele von internalisiertem Liganden und Rezeptoren in den E5-Zellen aufgezeigt werden. Der Ligand und ein Großteil der Rezeptoren wurden nach der Internalisierung in den Lysosomen abgebaut, hingegen wurde ein kleiner Teil der Rezeptoren zurück an die Plasmamembran transportiert. In den Kontrollen konnte diese Population nicht dokumentiert werden (Straight et al., 1993). Die Daten von Straight und Mitarbeitern konnten wir im Rahmen unserer Mikroskopie-Analysen zur Untersuchung des Liganden-Rezeptor-Transports weitestgehend bestätigen (Abschnitt 4.1.5, Abb. 4.1.8). Einen differenzierten Endozytoseweg von EGF und EGFR konnten wir mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie in E5-exprimierenden Zellen hingegen nicht beobachten. Wir fanden in Anwesenheit von E5 eine stärkere und länger anhaltende Kolokalisation von Ligand und Rezeptor. Noch nach 50 bis 60minütiger EGF-Behandlung waren EGF-EGFR-Komplexe, wie Straight es bereits für den EGFR beschrieben hatte, in großen, perinuklearen Clustern vorzufinden. Auch wenn diese Art der Mikroskopie-Analyse einen Einblick in die Endozytose von Ligand und Rezeptor geben konnte, ermöglichte sie keine Beschreibung des endozytotischen Transports von aktiviertem und Gesamt-EGFR im Zusammenhang mit den verschiedenen endosomalen Kompartimenten.

Aus diesem Grund wurden unter Verwendung spezifischer Marker zur Charakterisierung vesikulärer bzw. endosomaler Strukturen quantitative 3D-Bildanalysen durchgeführt, mit denen nicht nur die Lokalisation von Rezeptoren bestimmt werden konnte, sondern auch Intensität und Größe der Vesikel sowie deren Distanz zum Zellkern.

Im Vergleich zur Untersuchung des Liganden-Rezeptor-Transports erfolgte die 3D-Bildanalyse von aktivierten und Gesamt-EGFR in HeLa-Zellen. Diese Zellen stellen das perfekte System zur Untersuchung der E5-bedingten EGFR-Überaktivierung dar, da sie bereits die Onkogene E6 und E7 exprimieren und somit eine Analyse im Kontext einer HPV-Infektion erlauben. Im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen besitzen HeLa-Zellen 90-95% weniger EGF-Rezeptoren. Verglichen mit den Keratinozyten konnte sowohl im Immunblot als auch in der Mikroskopie-Analyse beobachtet werden, dass die Signaltransduktion und Herunterregulierung von EGFR in HeLa-Zellen deutlich schneller erfolgte. Auch Duex und Sorkin dokumentierten, dass die Halbwertszeit von Rezeptoren in Zellen mit geringerem endogenen Level kürzer ist als die von Rezeptoren in Zellen mit höherem EGFR-Level (Duex & Sorkin, 2009; Sorkin & Sorkin, 2010). Wie zuvor bereits im Zusammenhang mit der Immunblot-Analyse beschrieben, unterschieden sich die E5-bedingten Effekte auf die Überaktivierung jedoch nicht zwischen den beiden Zelllinien. Dies bestätigte sich auch in der 3D-Bildanalyse von phospho- und Gesamt-EGFR-Vesikeln. Es war ebenfalls eine langanhaltende Überaktivierung der Rezeptoren in Anwesenheit von E5 nachweisbar (Abschnitt 4.1.5; Abb. 4.1.11). Zudem konnte zu Beginn der EGF-Stimulation eine höhere relative Anzahl von phospho-EGFR-positiven Vesikeln dokumentiert werden. In diesem Zusammenhang stellten die Zeitpunkte t_7 und t_{15} die bedeutendsten Unterschiede dar. Nach 7 min waren 9% mehr EGFR-Rezeptoren in Anwesenheit von E5 aktiv, nach 15 min 7% (Abschnitt 4.1.5; Abb. 4.1.13). Die Untersuchung der Distanzen und Volumina kolokalisierender Vesikel zeigte teilweise eine negative Korrelation der beiden Faktoren zueinander, d.h. mit Zunahme des Vesikelvolumens verkürzte sich die Entfernung zum Zellkern (Abschnitt 4.1.5; Abb. 4.1.14 und 4.1.15). Zunächst fiel auf, dass das Volumen der kolokalierenden Vesikel in E5-exprimierenden Zellen zum Zeitpunkt t_0 und t_7 nur 72 bis 75% dem Volumen der Vesikel in den Leervektor-transduzierten Zellen maß. Jedoch wurde im Laufe der EGF-Behandlung eine stärkere Volumenzunahme in den E5-Zellen als in den Kontrollen detektiert. Im Stimulationszeitraum t_{10} bis t_{30} betrug das Volumen in E5-Zellen das 1,1 bis 1,4fache der Kontrollen. Die Zunahme der Vesikelgröße bei gleichbleibender bzw. abnehmender Vesikelanzahl ist ein Indiz für die Fusion von Vesikeln mit dem frühen Endosomen und schließlich der beginnenden Formation von multivesikulären Körperchen, die vor allem perinuklear lokalisiert sind. Während die wichtigste Funktion der frühen Endosomen die Aufrechterhaltung der

Signaltransduktion ist, erfolgt in den MVBs die Sortierung der Rezeptoren in Richtung Recycling oder Lysosomen. Unterschiede bezüglich der Vesikeldistanz in E5- und Leervektor-transduzierten Zellen konnten hauptsächlich zum Zeitpunkt t_7 und t_{12} festgestellt werden. Während die kolokalisierenden Vesikel in Anwesenheit von E5 nach 7 min um 0,87 µm weiter vom Zellkern entfernt waren als die Vesikel der Kontrolle, konnte nach 12 min eine um 0,55 µm kürzere Distanz der Vesikel zum Nukleus beobachtet werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Transport von aktivierten Rezeptoren in E5-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen verändert war. Zudem waren die aktivierten Rezeptoren in Anwesenheit von E5 vorwiegend als große Cluster in perinuklearen Kompartimenten lokalisiert. Im Vergleich zur Kontrolle waren in den E5-Zellen noch nach 60minütiger EGF-Stimulation eine kleine Population von aktivierten Rezeptoren im Zytoplasma, und auch in unmittelbarer Nähe des Nukleus vorzufinden. In Bezug auf den Gesamt-EGFR waren diese Unterschiede zwischen Kontroll- und E5-Zellen noch deutlicher zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der EGF-Rezeptor in Gegenwart von E5 langsamer inaktiviert und abgebaut wird.
Die 3D-Bildanalyse und auch andere Studien bekräftigen damit die Hypothese, dass die Überaktivierung mit einem veränderten endozytotischen Transport des Rezeptors einhergeht und mit einer perinuklearen Ansammlung von EGFR verbunden ist (Thomsen et al., 2000; Suprynowicz et al., 2010).

Daher erfolgte eine genaue Analyse von Internalisierung, Recycling und Inaktivierung bzw. Degradation der EGF-Rezeptoren unter Zuhilfenahme verschiedener chemischer Inhibitoren wurden die genannten Wege des EGF-Rezeptors gehemmt und die Aktivierung der Rezeptoren sowie die Menge an Oberflächen- und Gesamt-EGFR in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen nach Stimulation mit EGF quantitativ analysiert. Zudem wurde der endozytotische EGFR-Transport mittels 3D-Bildanalyse untersucht. Die charakteristische und spezifische Proteinzusammensetzung der einzelnen zellulären Kompartimente ermöglichte eine Differenzierung der verschiedenen zellulären Strukturen. Durch die gleichzeitige Färbung von aktivierten oder Gesamt-EGFR und den Markern eines entsprechenden Kompartiments (Clathrin, Caveolin, EEA1 oder CD63) konnte nicht nur die Aktivierung und Inaktivierung der Rezeptoren analysiert werden, sondern auch deren zelluläre Lokalisation zu den verschiedenen Zeitpunkt des endozytotischen Transports.

5.2 Die Anwesenheit von HPV16 E5 verändert den endozytotischen Transport des EGF-Rezeptors

Die Internalisierung von aktivierten Rezeptoren infolge der Invagination der Plasmamembran kann über Clathrin-haltige Vesikel (Clathrin-abhängige Internalisierung) oder Caveolin-haltige Vesikel (Clathrin-unabhängige/Caveolin-abhängige Internalisierung) erfolgen. Inwiefern HPV16 E5 die EGFR-Internalisierung beeinflusst, sollte mit Hilfe von Immunblot- und ICW-Analysen untersucht werden. Dazu wurden die retroviral transduzierten HaCaT-Zellen mit Chlorpromazin oder Methyl-β-cyclodextrin, zur Inhibierung der Clathrin-abhängigen Internalisierung, bzw. mit Nystatin oder Filipin, zur Hemmung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung, behandelt (Abschnitt 4.2).

Die Untersuchung der EGFR-Aktivierung nach 15minütiger EGF-Stimulation mittels Immunnblot-Analyse sollte zunächst klären, ob die Internalisierung aktivierter Rezeptoren durch die genannten Inhibitoren gehemmt werden kann und ob Unterschiede, im Allgemeinen und in Bezug auf HPV16 E5, zwischen Clathrin-abhängiger und -unabhängiger Internalisierung existieren. Im Immunblot konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Rezeptoren zum Zeitpunkt t_{15} nach Inhibierung mit Filipin und Nystatin deutlich stärker gehemmt wurde als durch die Behandlung mit Chlorpromazin und Methyl-β-cyclodextrin (Abschnitt 4.2, Abb. 4.2.1). Eine Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in E5-exprimierenden Zellen wurde jedoch für keinen experimentellen Ansatz mehr detektiert. Das Level der aktivierten Rezeptoren in Anwesenheit von E5 war auf das Niveau der Kontroll-Zellen, zum Teil sogar unterhalb des Phosphorylierungslevels der Kontrolle gesunken.

Die Inhibierung mit Chlorpromazin führte in den Leervektor-transduzierten Zellen verglichen mit unbehandelten Zellen zu einer 70%igen Reduktion der EGFR-Phosphorylierung (Abschnitt 4.1.4; Abb. 4.1.3; Abschnitt 4.2, Abb. 4.2.1). In den E5-exprimierenden Zellen konnte eine Verringerung von über 80% detektiert werden. Chlorpromazin hemmt die Zusammenlagerung von Clathrin und infolge dessen die Ausbildung von Clathrin-beschichteten Vesikel an der Plasmamembran, gleichzeitig verhindert es den Zerfall der Clathrinhülle bereits vorhandener Vesikel und die

Verschmelzung der Vesikel mit den frühen Endosomen (Wang et al., 1993; Stuart & Brown, 2006; Ivanov, 2008). Infolge der Inhibierung mit Chlorpromazin kommt es zur Hemmung der Clathrin-abhängigen Internalisierung und des endozytotischen Transports von EGF-Rezeptoren.

Für Methyl-β-cyclodextrin konnte in den Kontrollen im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine Abnahme der Phosphorylierung von etwa 60% beobachtet werden, in den E5-Zellen betrug diese ca. 75% (Abschnitt 4.1.4; Abb. 4.1.3; Abschnitt 4.2, Abb. 4.2.1). Methyl-β-cyclodextrin bildet Komplexe mit Cholesterol und bewirkt die Auflösung von sogenannten *lipid rafts*. In hohen Konzentrationen beeinträchtigt es zudem die Ausbildung von Clathrin-beschichteten Vesikel (Rodal et al., 1999). Die Entfernung von Cholesterol ist im Vergleich zur Sequestrierung durch Filipin effektiver, jedoch wird dadurch die Spezifität der Wirkung von Methyl-β-cyclodextrin beeinträchtigt (Simons & Toomre, 2000). Nicht nur der Clathrin-abhängige Weg wird inhibiert, sondern auch die Makropinozytose und der Clathrin-unabhängige/Caveolin-abhängige Weg. Im Zusammenhang mit der Inhibierung durch Methyl-β-cyclodextrin konnte gezeigt werden, dass die Bindung von EGF an den Rezeptor verstärkt wird und dies wiederum zu einer Zunahme der Rezeptor-Tyrosinkinaseaktivität führt (Kazazic et al., 2006). Chen und Resh beobachteten desweiteren in Cos-1-Zellen eine Liganden-unabhängige Verstärkung der EGFR-Phosphorylierung nach Methyl-β-cyclodextrin-Behandlung (Chen & Resh, 2002). Möglicherweise ist die um 1,4fach erhöhte Phosphorylierung im Vergleich zu Chlorpromazin behandelten Zellen auf eines dieser beiden oder auch auf beide Phänomene zurückzuführen.

Nach Behandlung von Leervektor-transduzierten Zellen mit Nystatin und Filipin konnte zum Zeitpunkt t_{15} eine etwa 80%ige Verringerung der Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1.4; Abb. 4.1.3; Abschnitt 4.2, Abb. 4.2.1). Für die E5-exprimierenden Zellen wurde eine durchschnittliche Reduktion von etwa 90% dokumentiert. Die Inhibitoren Nystatin und Filipin verursachen wie Methyl-β-cyclodextrin eine Reduktion des freien Cholesterol in der Plasmamembran, indem sie Cholesterol binden. Jedoch verbleiben die Komplexe in der Membran. Als Folge der Sequestrierung wird die Clathrin-unabhängige

Internalisierung bzw. *lipid raft*-abhängige Endozytose inhibiert (Simsons & Toomre, 2000; Pelkmans et al., 2002; Kazazic et al., 2006).

Zusammenfassend kann bezüglich dieser Daten geschlussfolgert werden, dass keine 100%ige Inhibierung der Endozytosewege durch Chlorpromazin, Methyl-β-cyclodextrin, Nystatin und Filipin stattfindet. Zudem sind sowohl Clathrin, als auch Caveolin an der Internalisierung und/oder dem endozytotischen Transport der EGF-Rezeptoren beteiligt. Welcher der beiden Wege dominiert, hängt von der Konzentration des Liganden ab (Sigismund et al., 2005). Es wurde festgestellt, dass vor allem bei hohen EGF-Konzentrationen die Endozytose in HeLa-Zellen über Caveolin stattfindet(Sigismund et al., 2005). Durch FRAP-Analyse konnte wiederum keine Beteiligung von Caveolin an der Internalisierung nachweisen (Kazazic et al., 2006). Möglicherweise sind die Rezeptoren in Caveolae lokalisiert, wobei die Internalisierung von EGFR über Clathrin-beschichtete Vesikel erfolgt (Grandal & Madshus, 2008).
In Hinsicht auf den Verlust der EGFR-Überaktivierung in Anwesenheit von E5 nach Inhibitor-Behandlung deuten die Ergebnisse an, dass die verstärkte Rezeptor-Aktivierung durch eine Veränderung in der Internalisierung und/oder dem endozytotischen Transport hervorgerufen wird. Jedoch konnte anhand des Immunblots nicht gezeigt werden, inwiefern die E5 bedingte EGFR-Überaktivierung durch einen dieser Wege, oder beide, verursacht wird. Das heißt, ob die Internalisierung verstärkt diese evtl. unter Beteiligung alternative Wege sogar umgegangen wird und/oder ob möglicherweise eine Störung des endozytotischen Transports verantwortlich ist.

Im Rahmen der kinetischen Analyse wurden aktivierter, Gesamt- und Oberflächen-EGFR nach Behandlung mit Chlorpromazin oder Methyl-β-cyclodextrin bzw. Nystatin oder Filipin im OCW bzw. ICW quantitativ untersucht (Abschnitt 4.2, Abb. 4.2.2 und 4.2.9). Während die Zunahme und anschließende Abnahme der EGFR-Phosphorylierung nur indirekt die Internalisierung und den endozytotischen Transport des Rezeptors reflektiert, konnte mit Hilfe der quantitativen Analyse von Oberflächen-EGFR die Internalisierung direkt überprüft werden. Dabei ist jedoch eine Unterscheidung zwischen aktivierten und inaktivierten Rezeptoren nicht möglich. Da die Mehrheit der beschriebenen Studien die Internalisierung anhand von radioaktiv

gebundenem Liganden bestimmte, sind die Ergebnisse nur indirekt mit denen unserer Methode vergleichbar und Parallelen schwer zu finden.

Die Behandlung mit Chlorpromazin führte in beiden Zellpopulationen, ausgenommen in einer kleinen Population von E5-transduzierten Zellen zum Zeitpunkt t_2, zu einer Inhibierung der Phosphorylierung (Abschnitt 4.2.1, Abb. 4.2.2 A). Auch andere Arbeiten konnten durch Hemmung der Clathrin-abhängigen Internalisierung infolge einer Überexpression einer dominant-negativen K44A-Dynamin-Mutante zeigen, dass die Aktivierung bzw. Phosphorylierung der Rezeptoren stark reduziert war (Ringerike et al., 1998). Die Analyse der Menge an Oberflächen-EGFR, zur Überprüfung der EGFR-Internalisierung, zeigte in Bezug auf die Kinetik keine Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.6; Abschnitt 4.2.1, Abb. 4.2.2 C). Während das Level an Oberflächen-EGFR in den Kontrollen ebenfalls unverändert blieb, konnte in Anwesenheit von E5 verglichen mit unbehandelten Zellen eine deutliche Abnahme nach Chlorpromazin-Behandlung registriert werden.
Die Ergebnisse zeigen (Abschnitt 4.2.1), dass sowohl die Phosphorylierung, als auch die Internalisierung von EGFR durch Chlorpromazin beeinträchtigt wurden. Dieser Effekt war vor allem in den E5-exprimierenden Zellen zu verzeichnen. Für eine Clathrin-abhängige Internalisierung sind Phosphorylierungen und eine aktive Tyrosinkinase notwendig, und möglicherweise auch umgekehrt ist die Ausbildung von Clathrin-beschichteten Einstülpungen der Membran für die Tyrosinkinaseaktivität und Phosphorylierung entscheidend (Wiley et al., 1991; Felder et al., 1992; Lamaze &Schmid, 1995; Sorkina et al., 2002; Johannessen et al., 2006). Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Internalisierung aktivierter Rezeptoren sowohl in Leervektor-, als auch in E5-transduzierten Zellen über Clathrin-haltige Vesikel erfolgt. Eine vollständige Inhibierung der Internalisierung konnte jedoch nicht hervorgerufen werden (Feugaing et al., 2007). Das ist darauf zurückzuführen, dass neben der Clathrin-abhängigen Internalisierung zusätzliche Endozytosewege wie Makropinozytose oder Caveolin-abhängige Internalisierung existieren, die nicht durch Chlorpromazin inhibiert werden und den Internalisierungsprozess aufrecht erhalten können. Durch einen Clathrin-unabhängigen Mechanismus erfolgte möglicherweise auch die Aktivierung und Internalisierung der Rezeptorpopulation zum Zeitpunkt t_2 in E5-transduzierten Zellen

(Chinkers et al., 1979; Haigler et al., 1979; Yamazaki et al., 2002; Sigismund et al., 2005 und 2008).

Im Vergleich zur Inhibierung mit Chlorpromazin konnte weder durch die Behandlung mit Methyl-β-cyclodextrin, noch durch die mit Nystatin oder Filipin eine Hemmung der EGFR-Phosphorylierung zu Beginn der EGF-Stimulation hervorgerufen werden (Hanover et al., 1985; Kazazic et al., 2006; Rappoport & Simon, 2009). Die Kinetiken der Leervektor und E5-transduzierten Zellen nach Inhibitor-Behandlung waren nahezu identisch mit denen der unbehandelten Zellen. Zudem konnte in Anwesenheit von E5 eine Überaktivierung nachgewiesen werden, die im Vergleich zu den unbehandelten Zellen jedoch nur von kurzer Dauer war (Abschnitt 4.1.4, Abb. 4.1.6; Abschnitt 4.2, Abb. 4.2.2 und 4.2.9).

Im Zusammenhang mit Methyl-β-cyclodextrin konnte in den E5-exprimierenden Zellen eine Verstärkung der Phosphorylierung im Vergleich zu unbehandelten E5-Zellen nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.1; Abb. 4.2.2 B). Wie bereits zuvor beschrieben, wird durch Methyl-β-cyclodextrin die Ligandenbindung an den EGF-Rezeptor sowie die Kinaseaktivität des Rezeptors erhöht (Chen & Resh, 2002; Pike & Casey, 2002; Kazazic et al., 2006). Andere Arbeiten postulierten hingegen eine Liganden-unabhängige Aktivierung des EGFR und seiner Tyrosinkinase (Lambert et al., 2006 und 2008). Die Beobachtung, dass Nystatin die Bindung von EGF an den Rezeptor und damit die Liganden-abhängige EGFR-Aktivierung unterdrückt (Kazazic et al., 2006), konnten wir nicht bestätigen. Eher das Gegenteil war der Fall. Untersuchungen ergaben, dass die Abnahme der Cholesterol-Konzentration in der Plasmamembran durch Methyl-β-cyclodextrin zur Freilassung in *lipid rafts* gebunden Rezeptoren führt, dadurch die Bindung des Liganden erleichtert und schließlich die Repression der Kinaseaktivität aufgehoben wird (Pike & Casey, 2002). Da Filipin und Nystatin ebenfalls eine Sequestrierung von Cholesterol und Zerstörung der *lipid rafts* verursachen, könnte dies auch die Zunahme der Rezeptorphosphorylierung von Nystatin- und Filipin-behandelten Kontroll- und E5-Zellen erklären (Abschnitt 4.2.2, Abb. 4.2.9; Chen & Resh, 2002; Lambert et al., 2006).

Die Analyse der Internalisierung von Oberflächen-EGFR verdeutlichte eine langsamere Abnahme bzw. Internalisierung von EGFR infolge der Methyl-β-cyclodextrin-Behandlung verglichen mit der in unbehandelten Zellen (Abschnitt 4.2.1; Abb. 4.2.2 D). Die Menge an Oberflächen-EGFR war im Verlauf der EGF-Stimulation nahezu konstant. Während die Phosphorylierung kaum dem inhibitorischen Einfluss von Methyl-β-cyclodextrin unterlag, wurde die Internalisierung stark inhibiert. Die mögliche Ursache liegt in der unpsezifischen Wirkung von Methyl-β-cyclodextrin (Simons & Toomre, 2000). So bewirkt es nicht nur die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose, sondern auch die der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege (Rodal et al., 1999; Lambert et al., 2006; Kazazic et al., 2006). Es ist bekannt, dass Methyl-β-cyclodextrin sowohl die Cholesterol-Zusammensetzung der Plasmamembran verändert, als auch die der intrazellulären Kompartimente (Ohtani et al., 1989; Kilsdonk et al., 1995; Klein et al., 1995; Fukasawa et al., 2000; Xing et al., 2010). Somit hemmt es sowohl die Internalisierung, als auch den endozytotischen Transport von EGFR. Nur wenige Rezeptoren entkommen der Inhibierung durch Methyl-β-cyclodextrin und internalisieren. Leervektor- und E5-transduzierte Zellen sind gleichermaßen davon betroffen. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren in Anwesenheit von E5 bleibt nach der Methyl-β-cyclodextrin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht.

Die 3D-Bildanalyse von phospho-EGFR- und Gesamt-EGFR-Vesikeln, die mit Clathrin-haltigen Vesikeln kolokalisierten, wiesen deutliche Unterschiede zwischen Leervektor- und E5-transduzierten Zellen in Bezug auf Intensität, Anzahl und Lokalisation auf (Abschnitt 4.2.1, Abb. 4.2.3 bis 4.2.8). Zunächst konnte jedoch gezeigt werden, dass in beiden Zellpopulationen etwa ein Drittel der mit Markern analysierten EGFR-Gesamtpopulation mit Clathrin kolokalisierte, von denen wiederum im Durchschnitt nur etwa ein Drittel aktiviert. Jedoch war der Anteil an aktivierten Rezeptoren der phospho-EGFR-Gesamt-Population, die in Clathrin-haltigen Vesikeln lokalisiert waren, in den ersten 10 min der EGF-Behandlung in E5-Zellen etwa 1,5-mal so groß wie der in den Kontrollen. Anhand der Bildanalyse wurde deutlich, dass die Internalisierung von EGFR in beiden Zellpopulationen weitestgehend über Clathrin-haltige Vesikel erfolgte. Auffällig war, dass in den Kontroll-Zellen die Mehrheit der internalisierten Vesikel dephosphoryliert vorlagen, während in Anwesenheit von E5, das Verhältnis aktiviert zu inaktiviert ausgewogen war. Auch Wang und Mitarbeiter

konnten eine Internalisierung von inaktiven Rezeptoren zeigen, deren spätere Aktivierung schließlich in den frühen Endosomen stattfand (Wang et al., 2002a und 2002b). Charakteristisch im kinetischen Verlauf war ein Wendepunkt um den Zeitpunkt t_{12}. Während in den ersten 12 min die Anzahl und Intensität kolokalisierender Vesikel in Anwesenheit von E5 deutlich größer waren als die der Kontrollen, konnten nach diesem Zeitpunkt erheblich kleinere Level beobachtet werden. In beiden Zellpopulationen befand sich die Mehrheit der kolokalisierenden Vesikel im Zytoplasma. Nur wenige Vesikel konnten in Kernnähe dokumentiert werden, wobei in den E5-Zellen jeweils nach 7 und 15 min eine Vesikelpopulation auffiel, die mehr als Doppelt so groß und von deutlich stärkerer Intensität (mehr als das 1,5fache) war wie die der Kontrollen. Umgekehrt konnte eine ähnliche Population kolokalisierender Vesikel in den Leervektor-transduzierten Zellen nach 12minütiger EGF-Stimulation detektiert werden, deren Anzahl und Intensität verglichen mit den E5-Zellen das 2 bzw. 1,3fache betrug. Die Clathrin-abhängige Internalisierung von Rezeptoren in E5-exprimierenden Zellen setzte deutlich früher und stärker ein als in den Kontrollen. Ähnliches konnte auch für den endozytotischen Transport in Anwesenheit von E5 festgestellt werden. Ein Teil der aktivierten Rezeptoren in Clathrin-haltigen Vesikeln erreichte schneller die perinuklearen Kompartimente. Während in den Kontrollen nach 30 min vor allem im Zytoplasma noch kolokalisierende Vesikel nachgewiesen werden konnten, waren in Anwesenheit von E5 nahezu keine Kolokalisation von aktivierten EGFR-Vesikeln mit Clathrin-haltigen Vesikeln nachweisbar. Es schien, als wäre die Clathrin-abhängige Endozytose von aktivierten Rezeptoren durch HPV16 E5 inhibiert. Die Ursache könnte ein Weitertransport von aktivierten Rezeptoren in andere Kompartimente sein, die sich möglicherweise sogar von denen der Kontrolle unterschieden, und/ oder ein vermindertes Recycling von EGF-Rezeptoren. Dies würde wiederum auch die Hypothese der Rezeptor-Akkumulation in perinuklearen Kompartimenten bestärken (Abschnitt 5.1).

Im Zusammenhang mit der Behandlung von Nystatin und Filipin konnte beobachtet werden, dass die Internalisierung der Oberflächen-Rezeptoren nicht gehemmt wurde, weder die in den Kontroll-Zellen, noch die in Anwesenheit von E5 (Abschnitt 4.2.2, Abb. 4.2.9 C und D). Im weiteren Verlauf unterschied sich die Endozytose von Oberflächen-EGFR in E5-transduzierten Zellen nicht von der in unbehandelten E5-

Zellen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Internalisierung und endozytotischer Transport von EGFR nicht über Caveolin-haltige Vesikel erfolgen. Hingegen konnte für die Kontrolle nach Nystatin- und Filipin-Behandlung eine Reduktion der Menge an Oberflächen-EGFR ab dem Zeitpunkt t_{12} dokumentiert werden, d.h. ein Teil der EGFR-Endozytose findet in Caveolin-haltigen Vesikeln statt.

Aus zeitlichen Gründen war eine 3D-Bildanalyse zur Untersuchung der Kolokalisation von aktivierten Rezeptoren und Caveolin-haltigen Vesikeln leider nicht mehr möglich (Abschnitt 4.2.2, Abb. 4.2.10 bis 4.2.12). Daher können aus den Daten der Kolokalisationsanalyse von Gesamt-EGFR und Caveolin-haltigen Vesikeln nur indirekt Schlussfolgerungen bezüglich der Internalisierung und Endozytose von aktivierten Rezeptoren getroffen werden. Es fiel zunächst auf, dass die Menge an EGFR, die mit Caveolin-haltigen Vesikeln kolokalisierten in beiden Zellpopulationen vor allem zu den frühen Zeitpunkten der EGF-Behandlung sehr gering war. Nur etwa ein Siebtel bis ein Achtel der mit Markern untersuchten Gesamt-EGFR-Population war in Caveolin-haltigen Vesikeln lokalisiert, von denen sich etwa zwei Drittel im Zytoplasma und ein Drittel in unmittelbarer Nähe zum Nukleus befanden. Die Ergebnisse der 3D-Bildanalyse bekräftigen damit die untergeordnete Rolle von Caveolin hinsichtlich der Internalisierung von EGFR. Erst im Verlauf der EGF-Stimulation kristallisierten sich erhebliche Unterschiede zwischen Kontroll- und E5-Zellen heraus. Während in den E5-transduzierten Zellen nach 30 min nur noch vereinzelt kolokalisierende Vesikel nachgewiesen werden konnten, waren die Vesikelintensität und -anzahl in den Kontrollen im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten nur geringfügig reduziert. Die Intensität kolokalisierender Vesikel betrug das 10fache der Vesikelintensität in Anwesenheit von E5. Die Vesikelanzahl war verglichen mit der in E5-exprimierenden Zellen etwa 3-mal so groß. Weiterhin konnte nach 30 und 60minütiger EGF-Stimulation beobachtet werden, dass etwa ein Drittel bis ein Viertel der mit Markern analysierten EGFR-Gesamtpopulation mit Caveolin kolokalisierte und damit der Anteil im Vergleich zum Anfang der EGF-Stimulation um das 2fache anstieg. Hingegen konnte für die EGFR-Clathrin-haltigen Vesikel, wie zuvor beschrieben, eine Abnahme der relativen Anzahl im Verlauf der EGF-Behandlung dokumentiert werden. Während der Caveolin-abhängige endozytotische Transport von EGFR zunehmend an Bedeutung gewann,

verringerte sich hingegegn der Stellenwert der Clathrin-abhängigen Endozytose im Laufe der EGF-Stimulation.
Im Rahmen von si-RNA-Experimenten zum *knockdown* von Caveolin-1 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in HeLa-Zellen Caveolin keine Rolle bei der Internalisierung von EGF und EGFR spielt, aber beim endozytotischen Transport von Ligand und Rezeptor von Bedeutung ist (Schmidt-Glenewinkel, Reinz, Bulashevska, Beaudouin, Legewie, Alonso & Eils, Veröffentlichung in Vorbereitung). Durch die Überexpression der dominant-negativen Mutante AP180 konnte für Clathrin als Hauptfunktion die Internalisierung von EGF und EGFR nachgewiesen werden (Schmidt-Glenewinkel, Reinz, Bulashevska, Beaudouin, Legewie, Alonso & Eils, Veröffentlichung in Vorbereitung).

Zusammenfassend konnte anhand der Daten bewiesen werden, dass die Internalisierung von Rezeptoren infolge einer Liganden-abhängigen Stimulation in Clathrin-haltigen Vesikeln stattfindet (Anderson et al., 1978; Kazazic et al., 2006; Rappoport & Simon, 2009), während der endozytotische Transport ausgehend von den frühen Endosomen zum Teil über Caveolin-haltige Vesikel erfolgt. In Bezug auf HPV16 E5 wurde ebenfalls gezeigt, dass die aktivierten EGFR vorwiegend über Clathrin-beschichtete Vesikel internalisiert werden. Ein geringfügiger Anteil aktivierter Rezeptoren wurde jedoch über einen alternativen Internalisierungsweg, der Clathrin- und Caveolin-unabhängig zu sein scheint, endozytiert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Caveolin in E5-exprimierenden Zellen erst nach 60 min im intrazellulären Transport von EGFR involviert ist. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Anwesenheit von E5 eine Veränderung des endozytotischen Transports bewirkt. Grund dafür könnte die HPV16 E5-bedingte Veränderung der Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen sein (Bravo et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte insbesondere eine Zunahme an freiem Cholesterol in der Plasmamembran nachgewiesen werden, während die globale Menge an Cholesterol unverändert blieb. Cholesterol ist maßgeblich an der Struktur von *lipid rafts* beteiligt. *Lipid rafts* zeichnen sich durch eine reduziert Fluidität aus und ermöglichen die Konzentrierung von aktivierten Rezeptoren (Brown & London, 1998; Chamberlain, 2004; Schmitz & Grandl, 2008). In dieser Umgebung sind die Rezeptoren weitestgehend vor Phosphatasen geschützt und sichern

dadurch eine langanhaltende Signaltransduktion (Brown & London, 1998; Simsons & Toomre, 2000). Auch ein erheblicher Anteil an Liganden-aktivierter EGF-Rezeptoren bedient sich diesem Mechanismus, wodurch u.a. die Bindung von Tyrosinkinase-Inhibitoren verhindert bzw. die Interaktion mit Grb2 oder Shc begünstigt wird (Balbis et al., 2007; Irwin et al., 2010). In der Literatur wurde beschrieben, dass es sich dabei hauptsächlich um Rezeptoren handelt, die im frühen Endosomen lokalisiert sind (Balbis et al., 2007). Möglicherweise ist die verstärkte Anreicherung von aktivierten Rezeptoren in *lipid rafts* in der E5-bedingten Überaktivierung involviert. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Studie, die im Zusammenhang mit dem IGF2-Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-Komplex für verschiedene Krankheiten wie das Niemann-Pick-TypC- und anti-Phosholipid-Syndrom zeigen konnten, dass eine Akkumulation von Cholesterol in späten Endosomen zu einem defekten endosomalen Sortier- und Transportmechanismus des Rezeptors führt (Kobayashi et al., 1999). Desweiteren konnten Schlegel und Mitarbeiter in Gegenwart von HPV16 E5 ein verstärktes Vorkommen an Caveolin-1 und GM1 in der Plasmamembran feststellen, welche ebenfalls Bestandteile von *lipid rafts* sind (Suprynowicz et al., 2008).

5.3 Die E5-bedingte EGFR-Überaktivierung kann nicht auf ein verstärktes Recycling zurückgeführt werden

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in Anwesenheit von HPV16 E5 der Haupt-Internalisierungsweg von EGFR unverändert ist, dafür aber der endozytotische Transport über Caveolin-Vesikel durch E5 beeinträchtigt wird, stellte sich die Frage, ob das Recycling ebenfalls unter Einfluss von E5 im Vergleich zur Kontrolle variiert.
Zur Untersuchung des Recyclings von EGF-Rezeptoren wurden retroviral transduzierte HaCaT-Zellen vor und während der EGF-Stimulation mit Monensin behandelt. Mit Hilfe von Immunblot-, FACS- und ICW-Analysen wurden die Aktivierung des Rezeptors sowie die Menge an Gesamt- und Oberflächen-EGFR quantitativ bestimmt.

Nach der Behandlung mit Monensin konnte zunächst in beiden Zellpopulationen eine starke Aktivierung bzw. Phosphorylierung mittels Immunblot und ICW beobachtet werden, die im Verlauf der EGF-Stimulation deutlich langsamer abnahm als in den

unbehandelten Zellen (Abschnitt 4.3.3; Abb. 4.3.10). Das ist darauf zurückzuführen, dass Monensin den gesamten endozytotischen Transport ausgehend vom frühen Endosomen inhibiert. Dies betrifft nicht nur das frühe/schnelle und späte/langsame Recycling der Rezeptoren (Basu et al., 1981; Murthy et al., 1986), sondern auch den intrazellulären Transport zum späten Endosomen und den Lysosomen. Das heißt, die Inaktivierung und der Abbau von EGFR werden ebenfalls gehemmt (Goldhaug & Christoffersen, 1988; Wang et al., 2002b). Trotz der Behandlung mit Monensin konnte eine langanhaltende Überaktivierung der EGF-Rezeptoren in Anwesenheit von E5 im Immunblot und ICW detektiert werden.

In Bezug auf die Oberflächen-EGFR konnte mittels Immunblot festgestellt werden, dass die Rezeptorenanzahl an der Zelloberfläche in beiden Zellpopulationen nach Monensin-Behandlung deutlich geringer war als die der unbehandelten Zellen (Abschnitt 4.3.3; Abb. 4.3.12). Diese Differenz spiegelt die Menge an rezyklierten Rezeptoren wider. Während die Anzahl der frühen rezyklierten Rezeptoren (bis t_{30}) in E5-exprimierenden Zellen deutlich kleiner (bzw. zum Zeitpunkt t_{15} nahezu nicht vorhanden) war als die der Kontrolle, konnte nach 60 min das Gegenteil beobachtet werden. Im ICW kamen diese Unterschiede weniger zum Vorschein. Die Kinetik und Menge an Oberflächen-EGFR in Monensin behandelten Zellen waren annähernd identisch zu denen unbehandelter Zellen. Die deutlich größere Oberflächen-EGFR-Menge in Anwesenheit von E5 konnte sowohl im Immunblot, als auch im ICW nachgewiesen werden.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung und Phosphorylierung zu Beginn der EGF-Stimulation durch Monensin nicht beeinflusst wurde. Im weiteren Kurvenverlauf glich sich jedoch die EGFR-Aktivierung von Monensin-behandelten Kontroll-Zellen dem der E5-Zellen an, während deren Aktivierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen insgesamt unverändert war. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die EGF-Rezeptoren in den frühen Endosomen akkumulieren, von dort aus nicht weitertransportiert werden und möglicherweise dadurch länger überaktiv sind.

5.4 In Gegenwart von HPV16 E5 wird eine Inhibierung des endozytotischen Transports zum späten Endosomen hervorgerufen

Ob tatsächlich eine Akkumulation von EGFR in den frühen Endosomen die Ursache für die langanhaltende EGFR-Überaktivierung ist, sollte mit Hilfe von 3D-Bildanalysen geklärt werden. Dazu wurden in retroviral transduzierten HeLa-Zellen Doppelimmunfluoreszenzen von aktivierten oder Gesamt-EGFR und EEA1 bzw. CD63 durchgeführt. Das Protein EEA1 ist in der Literatur als Marker für frühe Endosomen beschrieben (Mu et al., 1995; van Dam & Stoorvogel, 2002; Toy et al., 2010). CD63 ist charakteristisch für die multivesikulären Körperchen und deren Übergang zu den späten Endosomen (Voorhout et al., 1992; Heijnen et al., 1998; Stuffers et al., 2009).

Die Kolokalisationsanalyse von phospho- bzw. Gesamt-EGFR mit EEA1 ergab, dass die Rezeptoren, wie auch in der Literatur beschrieben, vorwiegend im Stimulationsintervall von 7 bis 15 min in den frühen Endosomen lokalisiert waren (Levkowitz et al. 1998; Abschnitt 4.3.1, Abb. 4.3.1 bis 4.3.6). Während in den E5-exprimierenden Zellen die maximale Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel bereits nach 7 min zu verzeichnen war, konnte in den Kontrollen die maximale Anzahl nach 10 min, das Intensitätsmaximum erst nach 12 min erreicht werden. Zudem fiel auf, dass die maximalen Intensitäten von phospho-EGFR- und Gesamt-EGFR-Vesikeln, die mit den frühen Endosomen kolokalisierten, in Anwesenheit von E5 größer waren als die der Kontrollen. Es konnte gezeigt werden, dass in den Kontroll-Zellen etwa ein Fünftel der aktivierten Rezeptoren in perinuklearen frühen Endosomen lokalisiert waren, in E5-exprimierenden Zellen waren es ca. ein Viertel der kolokalisierenden Vesikel. Diese Resultate spiegeln die Fusion von internalisierten EGFR-Vesikeln mit dem frühen Endosomen wider. Die stärkste Internalisierung von aktivierten EGF-Rezeptoren über Clathrin-haltige Vesikel erfolgte ebenfalls innerhalb der ersten 12 min. Nur ein Teil der Clathrin-haltigen Vesikel erreicht die frühen Endosomen mit bereits aktivierten Rezeptoren, die Mehrheit der Rezeptoren wurden inaktiviert endozytiert und erst im frühen Endosomen phosphoryliert (Wang et al. 2002a und 2002b). In beiden Zellpopulationen war der weitere Verlauf der EGF-Stimulation von einer Zunahme der Intensität und Anzahl kolokalisierender Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Nukleus geprägt, während Anzahl und Intensität der im Zytoplasma lokalisierten Vesikel

gleichzeitig abnahm. Damit konnte ein Fortschreiten des endozytotischen Transports nachgewiesen werden.

In Anwesenheit von E5 waren zu Beginn der EGF-Stimulation deutlich mehr Clathrin-haltige Vesikel mit phosphorylierten Rezeptoren vorhanden, die mit dem frühen Endosomen fusionieren konnten. Dies erklärt, warum in E5-Zellen die frühen Endosomen ihre maximale Intensität und Anzahl deutlich früher erreicht haben als die in den Kontrollen. Nach 10 min konnte in Anwesenheit von E5 eine starke Abnahme der Anzahl von phospho-EGFR-EEA1-Vesikeln beobachtet werden. Entweder wurden die Rezeptoren zurück an die Plasmamembran transportiert oder unterlagen dem perinuklearen endozytotischen Transport und sind zu multivesikulären Körperchen herangereift (Dunn & Hubbard, 1984; Miller et al., 1986; Carpentier et al., 1987; Levkowitz et al., 1998). Unter Berücksichtigung des weiteren Kurvenverlaufs, der ein weiteres Maximum von deutlich geringerem Ausmaß aufzeigte, kann geschlussfolgert werden, dass nur ein kleiner Teil der Rezeptoren das Recycling antraten. Der Großteil der Endosomen mit aktivierten Rezeptoren unterlag dem Reifungsprozess.

Auffällig war, dass in den E5-exprimierenden Zellen die Anzahl an kolokalisierenden Vesikeln nach 30 und 60 min stagnierte und zudem das 1,3fache der Vesikelanzahl in Kontrollen betrug. Nach 60 min waren in Anwesenheit von E5 noch 40% der aktivierten Rezeptoren in frühen Endosomen lokalisiert (entspricht 16% der Gesamt-EGFR-Population), in den Kontrollen konnten nur 27% der aktivierten Rezeptoren in frühen Endosomen nachgewiesen werden (11% der Gesamt-EGFR-Population). Während in den Leervektor-transduzierten Zellen die Mehrheit der Rezeptoren inaktiviert vorlag, waren nahezu alle Rezeptoren in den frühen Endosomen phosphoryliert. Mit Hilfe der 3D-Bildanalyse konnte nicht nur eine Akkumulation von EGF-Rezeptoren in den frühen Endosomen bewiesen werden, sondern auch dass diese länger aktiv waren. Damit verdichten sich zunehmend die Hinweise, dass das Onkoprotein HPV16 E5 eine Inhibierung des endozytotischen Transports bewirkt.

Wie bereits beschrieben erfolgt die Endozytose aktivierter Rezeptoren von frühen zu späten Endosomen über multivesikuläre Körperchen (MVB). MVBs befinden sich im perinuklearen Zellbereich und sind charakterisiert durch die Akkumulation von EGF und EGFR in intralumenalen Membranen (Dunn & Hubbard, 1984; Miller et al., 1986; Carpentier et al., 1987).

Die 3D-Bildanalyse zur Untersuchung der Kolokalisation von phospho-EGFR und CD63 ergab in beiden Zellpopulationen eine kontinuierliche Zunahme an kolokalisierenden Vesikeln im Verlauf der EGF-Stimulation, wobei sich die Anzahl in den Kontroll-Zellen deutlich schneller und stärker vergrößerte, als die in den E5-exprimierenden Zellen. Zum Zeitpunkt t_{15} wurden in den Kontroll-Zellen die 1,6fache Intensität und Anzahl im Vergleich zu den E5-Zellen detektiert. Während sich die Anzahl im Zytoplasma zu den späten Zeitpunkten der Stimulation nur wenig unterschied, konnten in Bezug auf die Anzahl kolokalisierender Vesikel in Kernnähe große Differenzen beobachtet werden. Verglichen mit den E5-transduzierten Zellen betrug sie in den Leervektor-transduzierten Zellen das Doppelte. Nach 60 min befanden sich in den Kontrollen etwa ein Drittel der kolokalisierten Vesikel in unmittelbarer Nähe zum Nukleus. In den E5-Zellen sind nur ca. ein Fünftel der Vesikel perinuklear lokalisiert. Die Resultate zeigen, dass der endozytotische Transport und die Reifung der multivesikulären Körperchen zu späten Endosomen in Anwesenheit von E5 gestört sind. Folglich kommt es zu einer verminderten Dephosphorylierung und Inaktivierung der EGF-Rezeptoren. Dies führt schließlich zu einem verminderten Abbau von EGFR, was wiederum die endosomale Akkumulation von Rezeptoren erklärt. Damit konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Überaktivierung durch eine E5-bedingte Inhibierung des endozytotischen Transports von EGF-Rezeptoren verursacht wird. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit publizierten experimentellen Daten, die eine Beteiligung der intrazellulären Membranen in der E5-bedingten Modulation der EGFR-Aktivierung suggeriert (Thomsen et al., 2000; Suprynowicz et al., 2010).

Entgegen früherer Meinungen, dass die E5-bedingte Inhibierung der Endosomen-Azidifizierung durch Bindung an die vATPase für die Überaktivierung von EGFR verantwortlich ist, konnte belegt werden, dass die Hemmung des endozytotischen Transports unabhängig von der Azidifizierung der Endosomen ist (Suprynowicz et al., 2010). Desweiteren wurde festgestellt, dass E5 die Reifung von Endosomen inhibiert, in dem es die Fusion von Endosomen und Vesikeln unterbindet. Die Hemmung der Vesikelfusion konnte nicht auf eine Zerstörung von Aktin, Tubulin, Vimentin oder Zytokeratin-Filamenten zurückgeführt werden. Daher wurde angenommen, dass weniger der Transport und eher die Fusion von Membran beeinträchtigt wurde (Suprynowicz et al., 2010).

Interessant war die Beobachtung, dass nach 7 und 10minütiger EGF-Stimulation in den perinuklearen multivesikulären Körperchen eine deutlich erhöhte Anzahl an phospho-EGFR-Vesikeln im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden konnte, die zudem eine bis zu 3fach stärkere Intensität aufwiesen. Mit dieser Population von kolokalisierenden Vesikeln konnte bewiesen werden, dass die phospho-EGFR-EEA1-Vesikel bereits nach 7 min begannen zu multivesikulären Körperchen zu reifen. Für einen Großteil der aktivierten Rezeptoren war dieser Reifeprozess mit der Lokalisation in perinuklearen multivesikulären Körperchen nach 10 min abgeschlossen. Im Vergleich zur Kontrolle kam es in den E5-exprimierenden Zellen nach 12 min zu einer Abnahme an kolokalisierenden Vesikeln in Kernnähe. Ein Indiz, dass die Zellen in ein anderes, möglicherweise auch perinukleares Kompartiment endozytiert wurden. Ein Weitertransport zu späten Endosomen bzw. Lysosomen ist zu diesen frühen Zeitpunkten der EGF-Stimulation unwahrscheinlich. Eine andere Möglichkeit könnte das Recycling der Rezeptoren zurück an die Plasmamembran darstellen und damit eine erneute Aktivierung der Rezeptoren durch den Liganden erlauben, wodurch die Signaltransduktion ebenfalls verlängert wird. Studien zeigen, dass die Lokalisation in perinunklearen Kompartimenten durch eine langanhaltende Signaltransduktion gekennzeichnet ist, und bekräftigen somit unsere Hypothese der Inhibierung des endozytotischen EGFR-Transports und der Akkumulation von aktivierten Rezeptoren in perinuklearen Endosomen oder endosomen-ähnlichen Kompartimenten (Khan et al., 2006). Ausgehend von den perinuklearen Kompartimenten ist eine Translokation von EGFR aus dem Zytoplasma in den Zellkern möglich (Lin et al., 2001; Lo et al., 2005 und 2006), welche aller Wahrscheinlichkeit nach über den Sec61-Komplex stattfindet (Liao & Carpenter, 2007)

5.5 Die Inaktivierung der EGF-Rezeptoren wird durch HPV16 E5 gehemmt

Während des Maturationsprozesses von frühen Endosomen zu multivesikulären Körperchen und späten Endosomen werden die internalisierten Rezeptoren zielgerichtet in verschiedene Kompartimente sortiert. Ein kleiner Teil der EGF-Rezeptoren unterliegt dem Recycling, eine weitere Population wird zum Proteasomen geleitet, die Mehrheit wird jedoch zum Lysosomen transportiert.

Voraussetzung für die Herunterregulation und Degradation von EGF-Rezeptoren ist deren vollständige Dephosphorylierung und Inaktivierung durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) wie PTP1B oder PTPκ. Zur vergleichenden Analyse der Rezeptordephosphorylierung und -inaktivierung in Leervektor- und E5-transduzierten Zellen wurden mit Hilfe des Inhibitors Tyrphostin AG1478 die Tyrosinkinasen des EGF-Rezeptors spezifisch gehemmt und die Aktivierung der Rezeptoren im Immunblot untersucht. Die Behandlung mit AG1478 verhindert eine Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase und damit eine Phosphorylierung der Tyrosine (Daub et al., 1996; Crusius et al., 2000; Gan et al., 2006). Dadurch konnte analysiert werden, ob die E5-bedingte Überaktivierung möglicherweise aus einer verstärkten Phosphorylierung der Rezeptoren infolge einer gesteigerten Kinaseaktivität resultiert oder ob eine inhibierte Inaktivierung verantwortlich ist.

In beiden Zellpopulationen resultierte die Behandlung mit AG1478 in einer starken Abnahme der EGFR-Phosphorylierung im Verlauf der EGF-Stimulation (Abschnitt 4.4, Abb. 4.4.1). Die Quantifizierung der Banden ergab in Anwesenheit von E5 eine 1,1 bis 1,4fach stärkere Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren. Die langanhaltende EGFR-Überaktivierung konnte durch die Behandlung mit AG1478 nicht unterbunden werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Überaktivierung auf eine Inhibierung der Dephosphorylierung und Inaktivierung von EGFR durch HPV16 E5 hervorgerufen wird. Bereits 1993 wurde postuliert, dass die Degradation des EGF-Rezeptors in Anwesenheit des Onkoproteins gehemmt wird (Straight et al., 1993 und 1995). Die ursprüngliche Meinung, dass E5 die Degradation des EGFR durch die Bindung an die vATPase und Inhibierung der Endosomen-Azidifizierung vermindert wird (Conrad et al., 1993; Straight et al., 1995), konnte neuesten Untersuchungen zufolge revidiert werden (Crusius et al., 1998; Thomsen et al. 2000; Supyrnowicz et al., 2010). Hingegen wurde gezeigt, dass die Ubiquitinierung des Rezeptors in Anwesenheit von E5 signifikant verringert war. Die reduzierte Ubiquitinierung ging mit einer starken Abnahme von EGFR gebundenem c-Cbl einher (Zhang et al., 2005). Möglicherweise wird infolge dessen die Herunterregulation des EGF-Rezeptors vermindert.

5.6 Zusammenfassung der spatio-temporären Mechanismen der E5-bedingten EGFR-Überaktivierung

In Anbetracht aller in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ergibt sich für die EGF-vermittelte EGFR-Signaltransduktion in Anwesenheit von HPV16 E5 folgendes Bild (Abb. 5.6.1):

1. Die Anzahl an Oberflächenrezeptoren ist signifikant erhöht.
2. Dadurch werden deutlich mehr aktivierte Rezeptoren internalisiert.
3. Infolge dessen kommt es zu einer stärkeren und schnelleren Fusion von Vesikeln mit dem frühen Endosomen.
4. Ein Teil aktivierter Rezeptoren erreicht frühzeitig die perinuklearen multivesikulären Körperchen, ohne die zytoplasmatischen MVBs zu passieren.
5. Der endozytotische Transport von EGFR über Caveolin-haltige Vesikel ist zu den späteren Zeitpunkten der Stimulation reduziert (im Bild nicht dargestellt).
6. Die Endozytose zu den späten Endosomen ist teilweise inhibiert.
7. Eine Population aktivierter Rezeptoren akkumuliert in einem perinuklearen Endosomen-ähnlichen Kompartiment heterogener Struktur. Dadurch umgehen die Rezeptoren die Dephosphorylierung und den Abbau in den Lysosomen. Es kommt schließlich zu einer langanhaltenden Überaktivierung von EGF-Rezeptoren.
8. In der Regel streben Zellen im unstimulierten Zustand ein Gleichgewicht an, dass eine erhöhte Anzahl an Oberflächen-EGFR im Vergleich zum zytoplasmatischen EGFR-Anteil aufweist. Durch den Verlust des mitogenen Signals (wie z.B. die Inkubation im serum-freien Medium) kommt es zur Verlagerung des Gleichgewichts wie oben beschrieben. Das heißt, die zuvor akkumulierten Rezeptoren des perinuklearen Kompartiments werden möglicherweise an die Plasmamembran zurücktransportiert und bewirken dort eine Erhöhung der Anzahl an Oberflächen-assoziierten EGF-Rezeptoren wie wir sie zum Zeitpunkt t_0 beobachten konnten .

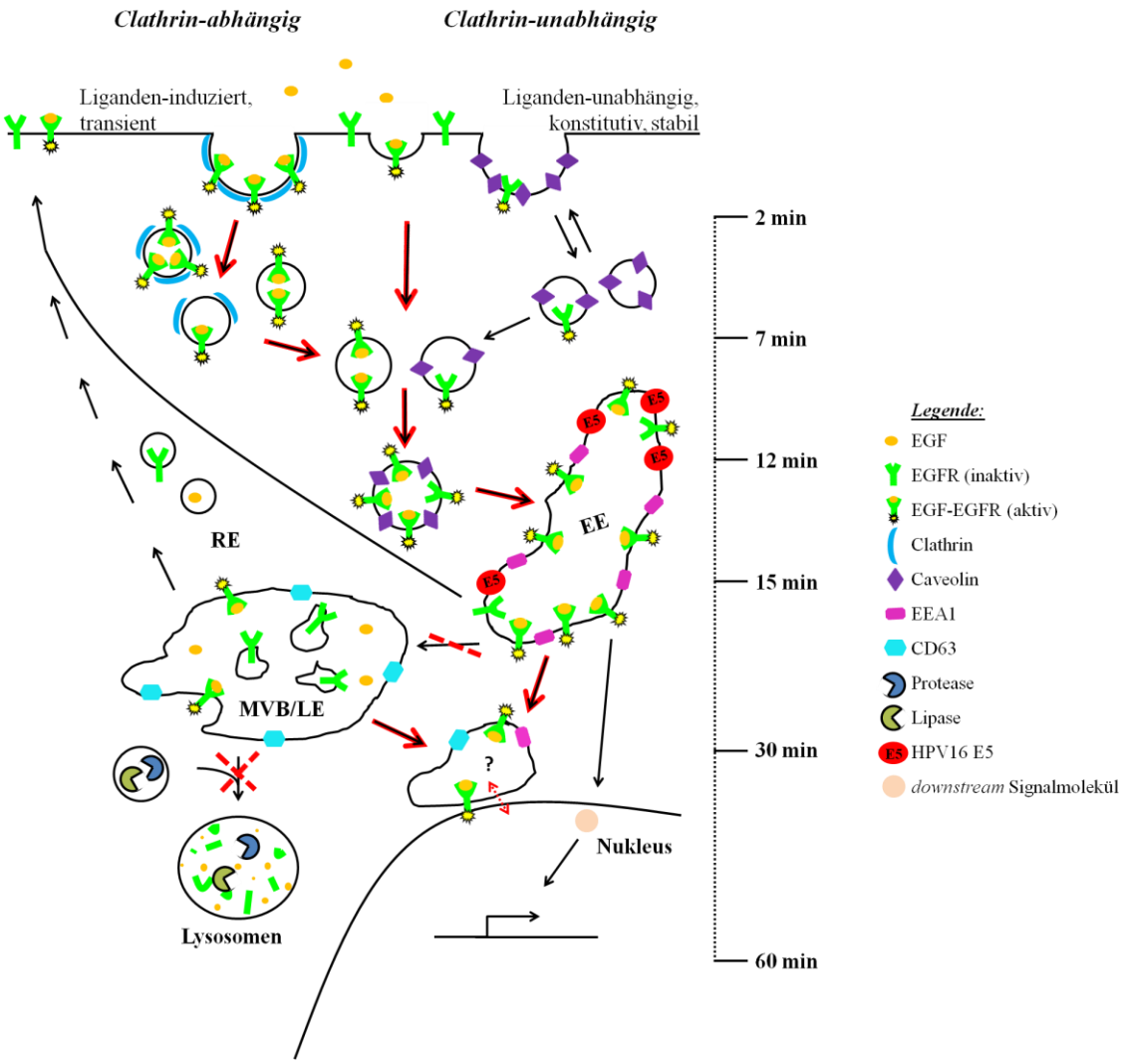


Abb. 5.6.1 Spatio-temporäre Mechanismen der E5-bedingten EGFR-Überaktivierung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Onkoprotein HPV16 E5 zu einer inhibitorischen Modifikation des endozytotischen Transports zwischen frühen und späten Endosomen führt und dadurch eine langanhaltende Überaktivierung der EGF-Rezeptoren verursacht.

Literaturverzeichnis

Adelsman MA, Huntley BK, Maihle NJ.
Ligand-independent dimerization of oncogenic v-erbB products involves covalent interactions.
J Virol. 1996 Apr;70(4):2533-44.

Adjei AA.
Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy.
J Natl Cancer Inst. 2001 Jul 18;93(14):1062-74.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.
Molekularbiologie der Zelle, 4. Auflage
Willey-VCH 2004

Alonso A, Reed J.
Modelling of the human papillomavirus type 16 E5 protein.
Biochim Biophys Acta. 2002 Nov 19;1601(1):9-18.

Alonso A.
The E5 Proteins of the Human papillomaviruses
Zellbiologie aktuell 2007; 33. Jahrgang Ausgabe 3/2007.

Alroy I, Yarden Y.
The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions.
FEBS Lett. 1997 Jun 23;410(1):83-6.

Alwan HA, van Leeuwen JE.
UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation.
J Biol Chem. 2007 Jan 19;282(3):1658-69.

Anderson RG, Vasile E, Mello RJ, Brown MS, Goldstein JL.
Immunocytochemical visualization of coated pits and vesicles in human fibroblasts: relation to low density lipoprotein receptor distribution.
Cell. 1978 Nov;15(3):919-33.

Arbeit JM, Münger K, Howley PM, Hanahan D.
Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice.
J Virol. 1994 Jul;68(7):4358-68.

Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS.
E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain.
Int J Cancer. 2006 Nov 1;119(9):2105-12.

Auger, KR., Serunian, LA., Soltoff, SP., Libby, P., and Cantley, LC.
PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells.
Cell 57(1): 167-75 (1989)

Auvinen E, Crusius K, Steuer B. , Alonso, A.
Human papilloma virus type 16 E5 protein.
Int. J. Onkol 1997; 11: 1297-1304. Review.

Auvinen E, Alonso A, Auvinen P.
Human papillomavirus type 16 E5 protein colocalizes with the antiapoptotic Bcl-2 protein. Arch Virol. 2004 Sep;149(9):1745-59.

Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H.
Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes.
J Cell Biol. 2003 Aug 4;162(3):435-42.

Bache KG, Stuffers S, Malerød L, Slagsvold T, Raiborg C, Lechardeur D, Wälchli S, Lukacs GL, Brech A, Stenmark H.
The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor.
Mol Biol Cell. 2006 Jun;17(6):2513-23.

Badovinac-Crnjevic T, Jakic-Razumovic J, Podolski P, Pleština S, Sarčević B, Munjas R, Vrbanec D.
Significance of epidermal growth factor receptor expression in breast cancer.
Med Oncol. 2010 Nov 23.

Balbis A, Parmar A, Wang Y, Baquiran G, Posner BI.
Compartmentalization of signaling-competent epidermal growth factor receptors in endosomes.
Endocrinology. 2007 Jun;148(6):2944-54.

Barbacci EG, Guarino BC, Stroh JG, Singleton DH, Rosnack KJ, Moyer JD, Andrews GC.
The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding.
J Biol Chem. 1995 Apr 21;270(16):9585-9.
Erratum in: J Biol Chem 1995 Nov 24;270(47):28494.

Basu SK, Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS.
Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts.
Cell. 1981 May;24(2):493-502.

Beeser A, Jaffer ZM, Hofmann C, Chernoff J.
Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors.
J Biol Chem. 2005 Nov 4;280(44):36609-15.

Berkers JA, van Bergen en Henegouwen PM, Boonstra J.
Three classes of epidermal growth factor receptors on HeLa cells.
J Biol Chem. 1991 Jan 15;266(2):922-7.

Blume-Jensen P, Hunter T.
Oncogenic kinase signalling.
Nature. 2001 May 17;411(6835):355-65.

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 Mar;106(3):761-71.

Boulenouar S, Weyn C, Van Noppen M, Moussa Ali M, Favre M, Delvenne PO, Bex F, Noël A, Englert Y, Fontaine V.
Effects of HPV-16 E5, E6 and E7 proteins on survival, adhesion, migration and invasion of trophoblastic cells.
Carcinogenesis. 2010 Mar;31(3):473-80.

Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L.
The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression.
Virology. 1994 Aug 15;203(1):73-80.

Bravo IG, Alonso A.
Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth.
J Virol. 2004 Dec;78(24):13613-26.

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T.
Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.
Nature. 1998 Feb 5;391(6667):597-601.

Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D, Ozawa T, Tandon A, Pedraza A, Holland E.
Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations.
PLoS One. 2009 Nov 13;4(11):e7752.

Britsch S.
The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease.
Adv Anat Embryol Cell Biol. 2007;190:1-65.

Broker, TR. & Botchan, M.
Papillomaviruses: retrospectives and prospective.
Cancer Cells 4:17 (1986)

Brown DA, London E.
Functions of lipid rafts in biological membranes.
Annu Rev Cell Dev Biol. 1998;14:111-36.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.
Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.
Cell. 1999 Mar 19;96(6):857-68.

Bubb V, McCance DJ, Schlegel R.
DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein.
Virology. 1988 Mar;163(1):243-6.

Burke P, Schooler K, Wiley HS.
Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking.
Mol Biol Cell. 2001 Jun;12(6):1897-910.

Burkhardt A, DiMaio D, Schlegel R.
Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein.
EMBO J. 1987 Aug;6(8):2381-5.

Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R.
The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes.
Virology. 1989 May;170(1):334-9.

Cantley, LC; Auger, KR., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S.
Oncogenes and signal transduction.
Cell 64(2): 281-302 (1991)

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC.
Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation.
Science. 1998 Nov 13;282(5392):1318-21.

Carpenter G, Cohen S.
Human epidermal growth factor: binding of the polypeptide to human fibroblasts and stimulation of cell proliferation.
Natl Cancer Inst Monogr. 1978 May;(48):149-56.

Carpenter G.
Vanadate, epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis.
Biochem Biophys Res Commun. 1981 Oct 30;102(4):1115-21.

Carpentier JL, White MF, Orci L, Kahn RC.
Direct visualization of the phosphorylated epidermal growth factor receptor during its internalization in A-431 cells.
J Cell Biol. 1987 Dec;105(6 Pt 1):2751-62.

Cartin W, Alonso A.
The human papillomavirus HPV2a E5 protein localizes to the Golgi apparatus and modulates signal transduction.
Virology. 2003 Sep 30;314(2):572-9.

Cerione RA.
Fluorescence assays for G-protein interactions.
Methods Enzymol. 1994;237:409-23.

Chamberlain LH.
Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts.
FEBS Lett. 2004 Feb 13;559(1-3):1-5.

Chang JL, Tsao YP, Liu DW, Huang SJ, Lee WH, Chen SL.
The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix.
J Biomed Sci. 2001 Mar-Apr;8(2):206-13.

Chen G, Baez JM, Steinberg ML.
Integration of the SV40 promoter/enhancer sequences in an anchorage-independent clonal subline of SV40-infected human keratinocytes.
Gene. 1996 Dec 12;183(1-2):41-5.

Chen X, Resh MD.
Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem. 2002 Dec 20;277(51):49631-7.

Chen SL, Lin ST, Tsai TC, Hsiao WC, Tsao YP. ErbB4 (JM-b/CYT-1)-induced expression and phosphorylation of c-Jun is abrogated by human papillomavirus type 16 E5 protein.
Oncogene. 2007 Jan 4;26(1):42-53. Epub 2006 Jul 3.

Chinkers M, McKanna JA, Cohen S.
Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors.
J Cell Biol. 1979 Oct;83(1):260-5

Choo KB, Pan CC, Liu MS, Ng HT, Chen CP, Lee YN, Chao CF, Meng CL, Yeh MY, HanSH.
Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma.
J Med Virol. 1987 Feb;21(2):101-7.

Clague MJ, Urbé S.
The interface of receptor trafficking and signalling.
J Cell Sci. 2001 Sep;114(Pt 17):3075-81.

Conrad M, Bubb VJ, Schlegel R.
The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein.
J Virol. 1993 Oct;67(10):6170-8.

Cohen S, Fava RA.
Internalization of functional epidermal growth factor:receptor/kinase complexes in A-431 cells.
J Biol Chem. 1985 Oct 5;260(22):12351-8.

Cohen S.
Epidermal growth factor.
In Vitro Cell Dev Biol. 1987 Apr;23(4):239-46.

Cohen BD, Goldstein DJ, Rutledge L, Vass WC, Lowy DR, Schlegel R, Schiller JT.
Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain.
J Virol. 1993 Sep;67(9):5303-11.

Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG.
The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma.
Mol Pathol. 1999 Oct;52(5):275-82.

Crovello CS, Lai C, Cantley LC, Carraway KL 3rd.
Differential signaling by the epidermal growth factor-like growth factors neuregulin-1 and neuregulin-2.
J Biol Chem. 1998 Oct 9;273(41):26954-61.

Crusius K, Auvinen E, Alonso A.
Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein.
Oncogene. 1997 Sep 18;15(12):1437-44.

Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A.
The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT.
Exp Cell Res. 1998 May 25;241(1):76-83.

Crusius K, Kaszkin M, Kinzel V, Alonso A.
The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates phospholipase C-gamma-1 activity and phosphatidyl inositol turnover in mouse fibroblasts.
Oncogene. 1999 Nov 18;18(48):6714-8.

Crusius K, Rodriguez I, Alonso A.
The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes.
Virus Genes. 2000;20(1):65-9.

Darai G, Handermann M, Sonntag H, Tidona CA, Zöller L.
Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen, 3.Auflage.
Springer-Verlag 2009.

Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D.
Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis.
J Biol Chem. 1997 Aug 15;272(33):20317-20.

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A.
Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors.
Nature. 1996 Feb 8;379(6565):557-60.

Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human
papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation.
J Virol. 1993 May;67(5):2521-8.

de Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H, Borst J.
c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route.
J Cell Sci. 2001 Jun;114(Pt 11):2167-78.

De Larco JE, Reynolds R, Carlberg K, Engle C, Todaro GJ.
Sarcoma growth factor from mouse sarcoma virus-transformed cells. Purification by binding and elution from epidermal growth factor receptor-rich cells.
J Biol Chem. 1980 Apr 25;255(8):3685-90.

de Villiers EM.
Heterogeneity of the human papillomavirus group.
J Virol. 1989 Nov;63(11):4898-903.

Dickson RB, Beguinot L, Hanover JA, Richert ND, Willingham MC, Pastan I.
Isolation and characterization of a highly enriched preparation of receptosomes (endosomes) from a human cell line.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Sep;80(17):5335-9.

Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ
Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma.
EMBO J. 1994 Sep 15;13(18):4269-77.

Di Maio D, Mattoon D.
Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins.
Oncogene. 2001 Nov 26;20(54):7866-73.

Dittmann K, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP.
Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK.
Mol Cancer. 2008 Sep 12;7:69.

Dobashi Y, Suzuki S, Sato E, Hamada Y, Yanagawa T, Ooi A.
EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors.
Mod Pathol. 2009 Oct;22(10):1328-40.

Doorbar J.
Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.
Clin Sci (Lond). 2006 May;110(5):525-41.

Drummond-Barbosa DA, Vaillancourt RR, Kazlauskas A, DiMaio D.
Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling.
Mol Cell Biol. 1995 May;15(5):2570-81.

Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L.
The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours.
J Gen Virol. 1985 Jul;66 (Pt 7):1515-22.

Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H.
Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization.
Virology. 1992 Jul;189(1):132-40.

Dürst M, Backsch C, Kaufmann AM and Schneider A.
DER GYNÄKOLOGE: Ätiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms.
Springer-Verlag 2003 Volume 36, Number 4, 282-288.

Duex JE, Sorkin A.
RNA interference screen identifies Usp18 as a regulator of epidermal growth factor receptor synthesis.
Mol Biol Cell. 2009 Mar;20(6):1833-44.

Dunn WA, Hubbard AL.
Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor by hepatocytes in the perfused rat liver: ligand and receptor dynamics.
J Cell Biol. 1984 Jun;98(6):2148-59.

Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E.
The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.
Science. 1989 Feb 17;243(4893):934-7.

Eden ER, White IJ, Futter CE.
Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies.
Biochem Soc Trans. 2009 Feb;37(Pt 1):173-7.

Elleman TC, Domagala T, McKern NM, Nerrie M, Lönnqvist B, Adams TE, Lewis J, Lovrecz GO, Hoyne PA, Richards KM, Howlett GJ, Rothacker J, Jorissen RN, Lou M, Garrett TP, Burgess AW, Nice EC, Ward CW.
Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain.
Biochemistry. 2001 Jul 31;40(30):8930-9.

Escher C, Cymer F, Schneider D.
Two GxxxG-like motifs facilitate promiscuous interactions of the human ErbB transmembrane domains.
J Mol Biol. 2009 May 29;389(1):10-6.

Ettinger DS.
Clinical implications of EGFR expression in the development and progression of solid tumors: focus on non-small cell lung cancer.
Oncologist. 2006 Apr;11(4):358-73.

Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo TL, Duong A, Nguyen G, Karkehabadhi M, Twardzik D, Patel S, Loughlin S.
In vivoinduction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 19;97(26):14686-91. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Jul 3;98(14):8157.

Falls DL.
Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. Exp Cell Res. 2003 Mar 10;284(1):14-30. Review.

Faulkner-Valle G, Banks L.
The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins co-operate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells.
J Gen Virol. 1995 May;76 (Pt 5):1239-45.

Fehrmann F, Laimins LA.
Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation.
Oncogene. 2003 Aug 11;22(33):5201-7.

Felder S, LaVin J, Ullrich A, Schlessinger J.
Kinetics of binding, endocytosis, and recycling of EGF receptor mutants.
J Cell Biol. 1992 Apr;117(1):203-12.

Feugaing DD, Tammi R, Echtermeyer FG, Stenmark H, Kresse H, Smollich M, Schönherr E, Kiesel L, Götte M.
Endocytosis of the dermatan sulfate proteoglycan decorin utilizes multiple pathways and is modulated by epidermal growth factor receptor signaling.
Biochimie. 2007 May;89(5):637-57.

Finbow ME, Harrison MA.
The vacuolar H+-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes.
Biochem J. 1997 Jun 15;324 (Pt 3):697-712.

Fuchs PG, Girardi F, Pfister H.
Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases?
Int J Cancer. 1989 Jan 15;43(1):41-4.

Fukasawa M, Nishijima M, Itabe H, Takano T, Hanada K.
Reduction of sphingomyelin level without accumulation of ceramide in Chinese hamster ovary cells affects detergent-resistant membrane domains and enhances cellular cholesterol efflux to methyl-beta -cyclodextrin.
J Biol Chem. 2000 Nov 3;275(44):34028-34.

Fukazawa T, Miyake S, Band V, Band H.
Tyrosine phosphorylation of Cbl upon epidermal growth factor (EGF) stimulation and its association with EGF receptor and downstream signaling proteins.
J Biol Chem. 1996 Jun 14;271(24):14554-9.

Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA.
Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein.
Genes Dev. 1997 Aug 15;11(16):2090-100.

Game SM, Huelsen A, Patel V, Donnelly M, Yeudall WA, Stone A, Fusenig NE, Prime SS.
Progressive abrogation of TGF-beta 1 and EGF growth control is associated with tumour progression in ras-transfected human keratinocytes.
Int J Cancer. 1992 Sep 30;52(3):461-70.

Gan HK, Walker F, Burgess AW, Rigopoulos A, Scott AM, Johns TG.
The epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor AG1478 increases the formation of inactive untethered EGFR dimers. Implications for combination therapy with monoclonal antibody 806.
J Biol Chem. 2007 Feb 2;282(5):2840-50. Epub 2006 Nov 8.

Gao P, Zheng J.
High-risk HPV E5-induced cell fusion: a critical initiating event in the early stage of HPV-associated cervical cancer.
Virol J. 2010 Sep 16;7:238.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW.
Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular Domain bound to transforming growth factor alpha.
Cell. 2002 Sep 20;110(6):763-73.

Genther Williams SM, Disbrow GL, Schlegel R, Lee D, Threadgill DW, Lambert PF.
Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene.
Cancer Res. 2005 Aug 1;65(15):6534-42.

Gerber D, Sal-Man N, Shai Y.
Two motifs within a transmembrane domain, one forhomodimerization and the other for heterodimerization.
J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):21177-82.

Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB.
Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release.
Cancer Res. 2002 Jan 15;62(2):488-96.

Giroglou T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M.
Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate.
J Virol. 2001 Feb;75(3):1565-70.

Gladhaug IP, Christoffersen T.
Rapid constitutive internalization andexternalization of epidermal growth factor receptors in isolated rat hepatocytes. Monensin inhibits receptor externalization and reduces the capacity for continued endocytosis of epidermal growth factor.
J Biol Chem. 1988 Sep 5;263(25):12199-203.

Goldstein DJ, Schlegel R.
The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus binds to a 16 kd cellular protein.
EMBO J. 1990 Jan;9(1):137-45.

Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T, McLean P, Smith K, Bubb V, Schlegel R.
Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H(+)-ATPases.
Nature. 1991 Jul 25;352(6333):347-9.

Goldstein DJ, Li W, Wang LM, Heidaran MA, Aaronson S, Shinn R, Schlegel R, Pierce JH.
The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the beta-type receptor for the platelet-derived growth factor but not other related tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation.
J Virol. 1994 Jul;68(7):4432-41.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB.
E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas.
Cancer Res. 1995 Nov 15;55(22):5195-9.

Grandal MV, Madshus IH.
Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signalling by endocytosis.
J Cell Mol Med. 2008 Sep-Oct;12(5A):1527-34.

Gu Z, Matlashewski G.
Effect of human papillomavirus type 16 oncogenes on MAP kinase activity.
J Virol. 1995 Dec;69(12):8051-6.

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd.
Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 16;91(17):8132-6.

Haglund K, Schmidt MH, Wong ES, Guy GR, Dikic I.
Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation.
EMBO Rep. 2005 Jul;6(7):635-41.

Haigler HT, McKanna JA, Cohen S.
Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor.
J Cell Biol. 1979 Oct;83(1):82-90.

Hanover JA, Beguinot L, Willingham MC, Pastan IH.
Transit of receptors for epidermal growth factor and transferrin through clathrin-coated pits. Analysis of the kinetics of receptor entry.
J Biol Chem. 1985 Dec 15;260(29):15938-45.

Heijnen HF, Debili N, Vainchencker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ.
Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules.
Blood. 1998 Apr 1;91(7):2313-25.

Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M.
A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF.
Science. 1991 Feb 22;251(4996):936-9.

Holbro T, Hynes NE.
ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:195-217.

Hopkins CR.
Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter.
Trends Biochem Sci. 1992 Jan;17(1):27-32.

Hopkins CR, Trowbridge IS.
Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells.
J Cell Biol. 1983 Aug;97(2):508-21.

Hopkins CR, Miller K, Beardmore JM.
Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake.
J Cell Sci Suppl. 1985;3:173-86.

Hu L, Plafker K, Vorozhko V, Zuna RE, Hanigan MH, Gorbsky GJ, Plafker SM, Angeletti PC, Ceresa BP.
Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion.
Virology. 2009 Feb 5;384(1):125-34.

Hu L, Ceresa BP.
Characterization of the plasma membrane localization and orientation of HPV16 E5 for cell-cell fusion.
Virology. 2009 Oct 10;393(1):135-43.

Hu L, Potapova TA, Li S, Rankin S, Gorbsky GJ, Angeletti PC, Ceresa BP.
Expression of HPV16 E5 produces enlarged nuclei and polyploidy through endoreplication.
Virology. 2010 Sep 30;405(2):342-51.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM.
A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18.
EMBO J.1991 Dec;10(13):4129-35.

Immervoll H, Hoem D, Kugarajh K, Steine SJ, Molven A.
Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes.
Virchows Arch. 2006 Jun;448(6):788-96.

Ivanov AI.
Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful?
Methods Mol Biol. 2008;440:15-33.

Irwin ME, Mueller KL, Bohin N, Ge Y, Boerner JL.
Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib.
J Cell Physiol. 2010 Dec 7.

Jansen KU, Shaw AR.
Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer.
Annu Rev Med. 2004;55:319-31.

Johannessen LE, Pedersen NM, Pedersen KW, Madshus IH, Stang E.
Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits.
Mol Cell Biol. 2006 Jan;26(2):389-401.

Kabsch K, Alonso A.
The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms.
J Virol. 2002 Dec;76(23):12162-72.

Kabsch K, Mossadegh N, Kohl A, Komposch G, Schenkel J, Alonso A, Tomakidi P.
The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures.
Intervirology. 2004;47(1):48-56.

Kapeller, R. & Cantley, LC.:
Phosphatidylinositol 3-kinase.
Bioessays 16(8): 565-76 (1994)

Kawana Y, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T.
Human papillomavirus type 16 minor capsid protein l2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. J Virol. 2001 Mar;75(5):2331-6

Kay DG, Lai WH, Uchihashi M, Khan MN, Posner BI, Bergeron JJ.
Epidermal growth factor receptor kinase translocation and activation in vivo.
J Biol Chem. 1986 Jun 25;261(18):8473-80.

Kazazic M, Roepstorff K, Johannessen LE, Pedersen NM, van Deurs B, Stang E, Madshus IH.
EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae.
Traffic. 2006 Nov;7(11):1518-27.

Kell B, Jewers RJ, Cason J, Pakarian F, Kaye JN, Best JM.
Detection of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides.
J Gen Virol. 1994 Sep;75 (Pt 9):2451-6.

Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT,Hedrick L, Cho KR.
Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 May 1;90(9):3988-92.

Khan EM, Heidinger JM, Levy M, Lisanti MP, Ravid T, Goldkorn T.
Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src-And caveolin-1-dependent perinuclear trafficking.
J Biol Chem. 2006 May 19;281(20):14486-93.

Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH.
Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins.
J Biol Chem. 1995 Jul 21;270(29):17250-6.

Kim HH, Vijapurkar U, Hellyer NJ, Bravo D, Koland JG.
Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein.
Biochem J. 1998 Aug 15;334 (Pt 1):189-95.

Kim MJ, Kim E, Ryu SH, Suh PG.
The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation.
Exp Mol Med. 2000 Sep 30;32(3):101-9.

Kinugasa Y, Ishiguro H, Tokita Y, Oohira A, Ohmoto H, Higashiyama S.
Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family.
Biochem Biophys Res Commun. 2004 Sep 3;321(4):1045-9.

Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, Yarden Y.
Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors.
Adv Cancer Res. 2000;77:25-79. Review.

Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F.
Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor.
Biochemistry. 1995 Oct 24;34(42):13784-93.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK.
Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16.
Nature.1996 Mar 7;380(6569):79-82

Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, Frias S, Palmiter RD, Sakuraba H, Parton RG, Gruenberg J.
Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport.
Nat Cell Biol. 1999 Jun;1(2):113-8.

Kohda D, Odaka M, Lax I, Kawasaki H, Suzuki K, Ullrich A, Schlessinger J, Inagaki F.
A 40-kDa epidermal growth factor/transforming growth factor alpha-binding domain produced by limited proteolysis of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem. 1993 Jan 25;268(3):1976-81.

Kokai Y, Myers JN, Wada T, Brown VI, LeVea CM, Davis JG, Dobashi K, Greene MI.
Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts.
Cell. 1989 Jul 28;58(2):287-92.

Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P.
The role of Raf kinases in malignant transformation.
Expert Rev Mol Med. 2002 Apr 25;4(8):1-18.

Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB.
A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection.
N Engl J Med. 1992 Oct 29;327(18):1272-8.

Krawczyk E, Suprynowicz FA, Sudarshan SR, Schlegel R.
Membrane orientation of the human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein.
J Virol. 2010 Feb;84(4):1696-703.

Lai WH, Cameron PH, Wada I, Doherty JJ 2nd, Kay DG, Posner BI, Bergeron JJ.
Ligand-mediated internalization, recycling, and downregulation of the epidermal growth factor receptor in vivo.
J Cell Biol. 1989 Dec;109(6 Pt 1):2741-9.

Lamaze C, Schmid SL.
The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways.
Curr Opin Cell Biol. 1995 Aug;7(4):573-80.

Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S, Gniadecki R.
Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption.
J Invest Dermatol. 2006 May;126(5):954-62.

Lambert S, Ameels H, Gniadecki R, Hérin M, Poumay Y.
Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependent on p38 MAPK activation.
J Cell Physiol. 2008 Dec;217(3):834-45.

Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ, Johnson GL.
A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf.
Science. 1993 Apr 16;260(5106):315-9.

Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J.
Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules.
EMBO J. 1989 Feb;8(2):421-7.

Lechner MS, Laimins LA.
Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins.
J Virol. 1994 Jul;68(7):4262-73.

Lee SS, Glaunsinger B, Mantovani F, Banks L, Javier RT.
Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins.
J Virol. 2000 Oct;74(20):9680-93.

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 Jan;7(1):19-25.

Lemmon MA, Schlessinger J.
Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization.
Trends Biochem Sci. 1994 Nov;19(11):459-63.

Leptak C, Ramon y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Riese DJ 2nd, Dotto GP, DiMaio D.
Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of Bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16.
J Virol. 1991Dec;65(12):7078-83.

Levkowitz G, Waterman H, Zamir E, Kam Z, Oved S, Langdon WY, Beguinot L, Geiger B, Yarden Y.
c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor.
Genes Dev. 1998 Dec 1;12(23):3663-74.

Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y.
Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1.
Mol Cell. 1999 Dec;4(6):1029-40.

Lewis C, Baro MF, Marques M, Grüner M, Alonso A, Bravo IG.
The first hydrophobic region of the HPV16 E5 protein determines protein cellular location and facilitates anchorage-independent growth.
Virol J. 2008 Feb 26;5:30.

Li F, Mandal M, Barnes CJ, Vadlamudi RK, Kumar R.
Growth factor regulation of the molecular chaperone calnexin. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Dec 7;289(3):725-32.

Li B, Antonyak MA, Druso JE, Cheng L, Nikitin AY, Cerione RA.
EGF potentiated oncogenesis requires a tissue transglutaminase-dependent signaling pathway leading to Src activation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 26;107(4):1408-13. Epub 2010 Jan 4.

Liao HJ, Carpenter G.
Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression.
Mol Biol Cell. 2007 Mar;18(3):1064-72.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC.
Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor.
Nat Cell Biol. 2001 Sep;3(9):802-8.

Liu F, Chernoff J.
Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with and is tyrosine phosphorylated by the epidermal growth factor receptor.
Biochem J. 1997 Oct 1;327 (Pt 1):139-45.

Lo HW, Hsu SC, Hung MC.
EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization. Breast Cancer Res Treat. 2006a Feb;95(3):211-8.

Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, Bartholomeusz G, Hsu SC, Hung MC.
Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1.
J Cell Biochem. 2006b Aug 15;98(6):1570-83.

Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE, Madshus IH.
Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies.
J Cell Biol. 2002 Mar 4;156(5):843-54.

Lottspeich F, Engels JW.
Bioanalytik 2. Auflage.
Spektrum-Verlag, 2006.

Lowy DR, Schiller JT.
Prophylactic human papillomavirus vaccines.
J Clin Invest. 2006 May;116(5):1167-73. Review.

Maffucci T, Falasca M.
Phosphoinositide 3-kinase-dependent regulation of phospholipase Cgamma.
Biochem Soc Trans. 2007 Apr;35(Pt 2):229-30.

Maufort JP, Shai A, Pitot HC, Lambert PF.
A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis.
Cancer Res. 2010 Apr 1;70(7):2924-31.

Martin P, Vass WC, Schiller JT, Lowy DR, Velu TJ.
The bovine papillomavirus E5 transforming protein can stimulate the transforming activity of EGF and CSF-1receptors.
Cell. 1989 Oct 6;59(1):21-32.

Matsukura T, Koi S, Sugase M.
Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers.
Virology. 1989 Sep;172(1):63-72.

Meng S, Chen Z, Munoz-Antonia T, Wu J.
Participation of both Gab1 and Gab2 in the activation of the ERK/MAPK pathway by epidermal growth factor.
Biochem J. 2005 Oct 1;391(Pt 1):143-51.

Menzo S, Clementi M, Alfani E, Bagnarelli P, Iacovacci S, Manzin A, Dandri M, Natoli G, Levrero M, Carloni G.
Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product. Virology. 1993 Oct;196(2):878-82.

Miller K, Beardmore J, Kanety H, Schlessinger J, Hopkins CR.
Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells.
J Cell Biol. 1986 Feb;102(2):500-9.

Miller WE, Earp HS, Raab-Traub N. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor.
J Virol. 1995 Jul;69(7):4390-8.

Mosesson Y, Shtiegman K, Katz M, Zwang Y, Vereb G, Szollosi J, Yarden Y.
Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation.
J Biol Chem. 2003 Jun 13;278(24):21323-6.

Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH.
EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif.
J Biol Chem. 1995 Jun 2;270(22):13503-11.

Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R.
The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes.
J Virol.1989 Oct;63(10):4417-21.

Münger K, Howley PM.
Human papillomavirus immortalization and transformation functions.
Virus Res. 2002 Nov;89(2):213-28.

Mukhopadhyay D, Riezman H.
Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling.
Science. 2007 Jan 12;315(5809):201-5.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group.
Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.
N Engl J Med. 2003 Feb 6;348(6):518-27.

Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L.
Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer.
Vaccine. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/1-10.

Murthy U, Basu M, Sen-Majumdar A,
Das M. Perinuclear location and recycling of epidermal growth factor receptor kinase: immunofluorescent visualization using antibodies directed to kinase and extracellular domains.
J Cell Biol. 1986 Aug;103(2):333-42.

Nakagawa S, Huibregtse JM.
Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase.
Mol Cell Biol. 2000 Nov;20(21):8244-53.

Nevins JR.
The Rb/E2F pathway and cancer.
Hum Mol Genet. 2001 Apr;10(7):699-703.

Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF.
The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo.
J Virol. 2003 Jun;77(12):6957-64.

Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA.
Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation.
Nucleic Acids Res. 2001 Nov15;29(22):4598-606.

Nielsen JS, Jakobsen E, Hølund B, Bertelsen K, Jakobsen A.
Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer.
Int J Gynecol Cancer. 2004 Nov-Dec;14(6):1086-96.

Oates J, Hicks M, Dafforn TR, DiMaio D, Dixon AM.
In vitro dimerization of the bovine papillomavirus
E5 protein transmembrane domain.
Biochemistry. 2008 Aug 26;47(34):8985-92.

O'Brien V, Grindlay GJ, Campo MS.
Cell transformation by the E5/E8 protein of bovine papillomavirus type 4. p27(Kip1), Elevated through increased protein synthesis is sequestered by cyclin D1-CDK4 complexes.
J Biol Chem. 2001 Sep 7;276(36):33861-8.

Oelze I, Kartenbeck J, Crusius K, Alonso A.
Human papillomavirus type 16 E5 protein affects cell-cell communication in an epithelial cell line.
J Virol. 1995 Jul;69(7):4489-94.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S.
Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains.
Cell. 2002 Sep 20;110(6):775-87.

Oh JM, Kim SH, Cho EA, Song YS, Kim WH, Juhnn YS.
Human papillomavirus type 16 E5 protein inhibits hydrogen-peroxide-induced apoptosis by stimulating ubiquitin-proteasome-mediated degradation of Bax in human cervical cancer cells.
Carcinogenesis. 2010 Mar;31(3):402-10.

Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J.
Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes.
Eur J Biochem. 1989 Dec 8;186(1-2):17-22.

Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K, Daly JM, Hynes NE.
ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. J
Biol Chem. 1999 Jun 11;274(24):17209-18.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE.
The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.
EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3159-67.

Opgenorth A, Nation N, Graham K, McFadden G.
Transforming growth factor alpha, Shope fibroma growth factor, and vaccinia growth factor can replace myxoma growth factor in the induction of myxomatosis in rabbits.
Virology. 1993 Feb;192(2):701-9.

Ostör AG.
Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review.
Int J Gynecol Pathol. 1993 Apr;12(2):186-92.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.
Global cancer statistics, 2002.
CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

Parton RG, Simons K.
The multiple faces of caveolae.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2007 Mar;8(3):185-94.

Pater MM, Pater A.
Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix.
Virology. 1985 Sep;145(2):313-8.

Pawson, T., Schlessinger, J.
SH2 and SH3 domains.
Curr.Biol. 3 (1993) 434-442

Pedroza-Saavedra A, Lam EW, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L.
The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-Receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27(Kip1).
Virology. 2010 Apr 25;400(1):44-52.

Pelkmans L, Püntener D, Helenius A.
Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae.
Science. 2002 Apr 19;296(5567):535-9.

Petti L, Nilson LA, DiMaio D.
Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein.
EMBO J. 1991 Apr;10(4):845-55.

Pfeifer GP, Rauch TA.
DNA methylation patterns in lung carcinomas.
Semin Cancer Biol. 2009 Jun;19(3):181-7. Epub 2009 Feb 20. Review.

Pfeiffer D, Spranger J, Al-Deiri M, Kimmig R, Fisseler-Eckhoff A, Scheidel P, Schatz H, Jensen A, Pfeiffer A.
mRNA expression of ligands of the epidermal-growth-factor-receptor in the uterus.
Int J Cancer. 1997 Aug 7;72(4):581-6.

Pfister H.
Biology and biochemistry of papillomaviruses.
Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1984;99:111-81.

Pike LJ, Casey L.
Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking.
Biochemistry. 2002 Aug 13;41(32):10315-22.

Pim D, Collins M, Banks L.
Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor.
Oncogene. 1992 Jan;7(1):27-32.

Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y.
Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions.
EMBO J. 1996 May 15;15(10):2452-67.

Pirami L, Giachè V, Becciolini A.
Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix.
J Clin Pathol. 1997 Jul;50(7):600-4.

Plowman GD, Green JM, McDonald VL, Neubauer MG, Disteche CM, Todaro GJ, Shoyab M.
The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity.
Mol Cell Biol. 1990 May;10(5):1969-81.

Rappoport JZ, Simon SM.
Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots.
J Cell Sci. 2009 May 1;122(Pt 9):1301-5.

Rhee SG.
Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C.
Annu Rev Biochem. 2001;70:281-312.

Richart RM.
Cervical intraepithelial neoplasia.
Pathol Annu. 1973;8:301-28.

Richart RM.
A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia.
Obstet Gynecol. 1990 Jan;75(1):131-3.

Riese DJ 2nd, van Raaij TM, Plowman GD, Andrews GC, Stern DF.
The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family.
Mol Cell Biol. 1995 Oct;15(10):5770-6.
Erratum in: Mol Cell Biol 1996 Feb;16(2):735.

Rigopoulos DN, Tsiambas E, Lazaris AC, Kavantzas N, Papazachariou I, Kravvaritis C, Tsounis D, Koliopoulou A, Athanasiou AE, Karameris A, Manaios L, Sergentanis TN, Patsouris E.
Deregulation of EGFR/VEGF/HIF-1a signaling pathway in colon adenocarcinoma based on tissue microarrays analysis.
J BUON. 2010 Jan-Mar;15(1):107-15.

Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF, Arbeit JM.
Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis.
Cancer Res. 2003 Aug 15;63(16):4862-71.

Ringerike T, Stang E, Johannessen LE, Sandnes D, Levy FO, Madshus IH.
High-affinity binding of epidermal growth factor (EGF) to EGF receptor is disrupted by overexpression of mutant dynamin (K44A).
J Biol Chem. 1998 Jul 3;273(27):16639-42.

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K.
Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles.
Mol Biol Cell. 1999 Apr;10(4):961-74.

Rodríguez MI, Finbow ME, Alonso A.
Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H+-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation.
Oncogene. 2000 Aug 3;19(33):3727-32.

Salomon DS, Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Shoyab M, Todaro GJ.
The role of amphiregulin in breast cancer.
Breast Cancer Res Treat. 1995;33(2):103-14.

Saltiel AR, Ohmichi M.
Pleiotropic signaling from receptor tyrosine kinases.
Curr Opin Neurobiol. 1993 Jun;3(3):352-9.

Sanderson MP, Dempsey PJ, Dunbar AJ.
Control of ErbB signaling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors.
Growth Factors. 2006 Jun;24(2):121-36.

Scher HI, Sarkis A, Reuter V, Cohen D, Netto G, Petrylak D, Lianes P, Fuks Z, Mendelsohn J, Cordon-Cardo C.
Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms.
Clin Cancer Res. 1995 May;1(5):545-50.

SCHERER WF, SYVERTON JT, GEY GO.
Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix.
J Exp Med. 1953 May;97(5):695-710.

Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Hildesheim A, Wacholder S, Rodriguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Morales J, Guillen D, Alfaro M, Hutchinson M, Wright TC, Solomon D, Chen Z, Schussler J, Castle PE, Burk RD.
The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution.
Virology. 2005 Jun 20;337(1):76-84.

Schlegel R, Wade-Glass M, Rabson MS, Yang YC.
The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide.
Science. 1986 Jul 25;233(4762):464-7.

Schmitz G, Grandl M.
Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation.
Antioxid Redox Signal. 2007 Sep;9(9):1499-518.

Schneider A, Dürst M, Kaufmann AM.
[HPV infection and cervical carcinoma--epidemiology, detection and immunology].
Zentralbl Gynakol. 2001 Apr;123(4):179-85.

Schneider-Gädicke A, Schwarz E.
Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes.
EMBO J. 1986 Sep;5(9):2285-92.

Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H.
Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells.
Nature. 1985 Mar 7-13;314(6006):111-4.

Shah KV, Howley PM.
Papillomaviruses in Fields Virology 3rd Edition
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996

Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K, Folkman J.
Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors.
Science. 1993 Mar 12;259(5101):1604-7.

Shoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ.
Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Sep;85(17):6528-32.

Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S.
Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):2760-5.

Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP.
Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation.
Dev Cell. 2008 Aug;15(2):209-19.

Slagsvold T, Aasland R, Hirano S, Bache KG, Raiborg C, Trambaiolo D, Wakatsuki S, Stenmark H.
Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain.
J Biol Chem. 2005 May 20;280(20):19600-6.

Simons K, Toomre D.
Lipid rafts and signal transduction.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Oct;1(1):31-9.

Smith BL, Chin D, Maltzman W, Crosby K, Hortobagyi GN, Bacus SS.
The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins.
Br J Cancer. 2004 Sep 13;91(6):1190-4.

Sorkin AD, Teslenko LV, Nikolsky NN.
The endocytosis of epidermal growth factor in A431 cells: a pH of microenvironment and the dynamics of receptor complex dissociation.
Exp Cell Res. 1988 Mar;175(1):192-205.

Sorkin A, Krolenko S, Kudrjavtceva N, Lazebnik J, Teslenko L, Soderquist AM, Nikolsky N.
Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells: identification of dual pathways.
J Cell Biol. 1991 Jan;112(1):55-63.

Sorkin A.
Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling.
Biochem Soc Trans. 2001 Aug;29(Pt 4):480-4.

Sorkina T, Huang F, Beguinot L, Sorkin A.
Effect of tyrosine kinase inhibitors on clathrin-coated pit recruitment and internalization of epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):27433-41.

Sorkin A, Duex JE.
Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor.
Curr Protoc Cell Biol. 2010 Mar;Chapter 15:Unit 15.14.

Steffensen KD, Waldstrøm M, Andersen RF, Olsen DA, Jeppesen U, Knudsen HJ, Brandslund I, Jakobsen A.
Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors.
Int J Oncol. 2008 Jul;33(1):195-204.

Stöppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ.
The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA.
Virology. 1996 Sep 1;223(1):251-4.

Stoke, D., Mac Donald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., Hancock, J.F.
Activation of Ras as aresult of recruitment to the plasma membrane.
Science. 1994, 264, 1463-1467

Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL.
Late endosomes derive from early endosomes by maturation.
Cell. 1991 May 3;65(3):417-27.

Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD.
Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily.
J Biol Chem. 2001 May 25;276(21):18265-71.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ.
The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes.
J Virol. 1993 Aug;67(8):4521-32.

Straight SW, Herman B, McCance DJ.
The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes.
J Virol. 1995 May;69(5):3185-92.

Stuart AD, Brown TD.
Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes.
J Virol. 2006 Aug;80(15):7500-9.

Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A.
Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs.
Traffic. 2009 Jul;10(7):925-37.

Suprynowicz FA, Disbrow GL, Krawczyk E, Simic V, Lantzky K, Schlegel R.
HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1at the plasma membrane of cervical cells.
Oncogene. 2008 Feb 14;27(8):1071-8. Epub 2007 Aug 20.
Erratum in: Oncogene. 2008 Nov 6;27(49):6396.

Suprynowicz FA, Krawczyk E, Hebert JD, Sudarshan SR, Simic V, Kamonjoh CM, Schlegel R.
The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein inhibits epidermal growth factor trafficking independently of endosome acidification.
J Virol. 2010 Oct; 84(20):10619-29.

Surti T, Klein O, Aschheim K, DiMaio D, Smith SO.
Structural models of the bovine papillomavirus E5 protein.
Proteins. 1998 Dec 1;33(4):601-12.

Sweeney C, Lai C, Riese DJ 2nd, Diamonti AJ, Cantley LC, Carraway KL 3rd.
Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer.
J BiolChem. 2000 Jun 30;275(26):19803-7.

Talmage DA.
Mechanisms of neuregulin action.
Novartis Found Symp. 2008;289:74-84; discussion 84-93. Review.

Thien CB, Langdon WY.
Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosinekinases.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Apr;2(4):294-307.

Thomsen P, van Deurs B, Norrild B, Kayser L.
The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking.
Oncogene. 2000 Dec 7;19(52):6023-32.

Toy W, Lim SK, Loh MC, Lim YP.
EGF-induced tyrosine phosphorylation of Endofin is dependent on PI3K activity and proper localization to endosomes.
Cell Signal. 2010 Mar;22(3):437-46.

Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Takayama Y, Isobe T, Okuyama T, Hanada K.
Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes.
J Biol Chem. 1995 Mar 31;270(13):7495-500.

Uchida T, Wada K, Akamatsu T, Yonezawa M, Noguchi H, Mizoguchi A, Kasuga M, Sakamoto C.
A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1999 Dec 20;266(2):593-602.

Ullman CG, Haris PI, Kell B, Cason J, Jewers RJ, Best JM, Emery VC, Perkins SJ.
Hypothetical structure of the membrane-associated E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16.
Biochem Soc Trans. 1994 Nov;22(4):439S.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al.
Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.
Nature. 1984 May 31-Jun 6;309(5967):418-25.

Umebayashi K.
The roles of ubiquitin and lipids in protein sorting along the endocytic pathway.
Cell Struct Funct. 2003 Oct;28(5):443-53.

Umebayashi K, Stenmark H, Yoshimori T.
Ubc4/5 and c-Cbl continue to ubiquitinate EGF receptor after internalization to facilitate polyubiquitination and degradation.
Mol Biol Cell. 2008 Aug;19(8):3454-62.

Urdea MS, Merryweather JP, Mullenbach GT, Coit D, Heberlein U, Valenzuela P, Barr PJ.
Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in yeast.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Dec;80(24):7461-5.

Ushiro H, Cohen S.
Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes.
J Biol Chem. 1980 Sep 25;255(18):8363-5.

van Dam EM, Stoorvogel W.
Dynamin-dependent transferrin receptor recycling by endosome-derived clathrin-coated vesicles.
Mol Biol Cell. 2002 Jan;13(1):169-82.

Van Slyke P, Coll ML, Master Z, Kim H, Filmus J, Dumont DJ.
Dok-R mediates attenuation of epidermal growth factor-dependent mitogen-activated protein kinase and Akt activation through processive recruitment of c-Src and Csk.
Mol Cell Biol. 2005 May;25(9):3831-41.

Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R.
Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8211-6.

Voorhout WF, Veenendaal T, Haagsman HP, Weaver TE, Whitsett JA, van Golde LM, Geuze HJ.
Intracellular processing of pulmonary surfactant protein B in an endosomal/lysosomal compartment.
Am J Physiol. 1992 Oct;263(4 Pt 1):L479-86.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ,Peto J, Meijer CJ, Muñoz N.
Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.
J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.

Walker F, Orchard SG, Jorissen RN, Hall NE, Zhang HH, Hoyne PA, Adams TE, Johns TG, Ward C, Garrett TP, Zhu HJ, Nerrie M, Scott AM, Nice EC, Burgess AW.
CR1/CR2 interactions modulate the functions of the cell surface epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem. 2004 May 21;279(21):22387-98.

Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG.
Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.
J Cell Biol. 1993Dec;123(5):1107-17

Wang Z, Tung PS, Moran MF.
Association of p120 ras GAP with endocytic components and colocalization with epidermal growth factor (EGF) receptor in response to EGF stimulation.
Cell Growth Differ. 1996 Jan;7(1):123-33.

Wang XJ, Liao HJ, Chattopadhyay A, Carpenter G.
EGF-dependent translocation of green fluorescent protein-tagged PLC-gamma1 to the plasma membrane and endosomes.
Exp Cell Res. 2001 Jul 1;267(1):28-36.

Wang J, Sampath A, Raychaudhuri P, Bagchi S.
Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells.
Oncogene. 2001 Aug 2;20(34):4740-9.

Wang Y, Pennock S, Chen X, Wang Z.
Internalization of inactive EGF receptor into endosomes and the subsequent activation of endosome-associated EGF receptors. Epidermal growth factor.
Sci STKE. 2002a Dec 3;2002(161):pl17.

Wang Y, Pennock S, Chen X, Wang Z.
Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival.
Mol Cell Biol. 2002b Oct;22(20):7279-90.

Warren CM, Landgraf R.
Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control.
Cell Signal. 2006 Jul;18(7):923-33.

Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC.
Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein.
Nature. 1995 Jun 29;375(6534):812-5.

Wiley HS, Herbst JJ, Walsh BJ, Lauffenburger DA, Rosenfeld MG, Gill GN.
The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem. 1991 Jun 15;266(17):11083-94.

Wiley HS.
Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling.
Exp Cell Res. 2003 Mar 10;284(1):78-88.

Wilson, C.
Recepter tyrosine kinase signaling: not so complex after all?
Trends Cell Biol. 56: 1-7 (1991)

Wörz S, Sander P, Pfannmöller M, Rieker RJ, Joos S, Mechtersheimer G, Boukamp P, Lichter P, Rohr K.
3D geometry-based quantification of colocalizations in multichannel 3D microscopy images of human soft tissue tumors.
IEEE Trans Med Imaging. 2010 Aug;29(8):1474-84. Epub 2010 Jun 17.

Xing Y, Gu Y, Xu LC, Siedlecki CA, Donahue HJ, You J.
Effects of membrane cholesterol depletion and GPI-anchored protein reduction on osteoblastic mechanotransduction.
J Cell Physiol. 2010 Dec 9.

Xu Y, Tan LJ, Grachtchouk V, Voorhees JJ, Fisher GJ.
Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function.
J Biol Chem. 2005 Dec 30;280(52):42694-700.

Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Buchler M, Beger HG, Korc M.
Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness.
Anticancer Res. 1993 May-Jun;13(3):565-9.

Yamazaki T, Zaal K, Hailey D, Presley J, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE.
Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization.
J Cell Sci. 2002 May 1;115(Pt 9):1791-802.

Yarden Y, Sliwkowski MX.
Untangling the ErbB signalling network.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Feb;2(2):127-37.

Yarden O, Ebbole DJ, Freeman S, Rodriguez RJ, Dickman MB.
Fungal biology and agriculture: revisiting the field.
Mol Plant Microbe Interact. 2003 Oct;16(10):859-66.

Yokouchi M, Kondo T, Houghton A, Bartkiewicz M, Horne WC, Zhang H, Yoshimura A, Baron R.
Ligand-induced ubiquitination of the epidermal growth factor receptor involves the interaction of the c-Cbl RING finger and UbcH7.
J Biol Chem. 1999 Oct 29;274(44):31707-12.

Zago M, Campo MS, O'Brien V.
Cyclin A expression and growth in suspension can be uncoupled from p27 deregulation and extracellular signal-regulated kinase activity in cells transformed by bovine papillomavirus type 4 E5.
J Gen Virol. 2004 Dec;85(Pt 12):3585-95.

Zhang B, Spandau DF, Roman A.
E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis.
J Virol. 2002 Jan;76(1):220-31.

Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, Roman A.
The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma.
Virology. 2003 May 25;310(1):100-8.

Zhang B, Srirangam A, Potter DA, Roman A.
HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes.
Oncogene. 2005 Apr 7;24(15):2585-8.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J.
An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor.
Cell. 2006 Jun 16;125(6):1137-49.

Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B.
EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology.
Oncotarget. 2010 Oct 25;1(7):497-514.

Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ.
The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300.
J Virol. 1999 Aug;73(8):6209-19.

zur Hausen H.
Condylomata acuminata and human genital cancer.
Cancer Res. 1976 Feb;36(2 pt 2):794.

zur Hausen H, Richart RM
IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
Human papillomaviruses. 1995;64

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
%	Prozent
°C	Grad Celsius (0°C = 273,15 K [Kelvin])
µ	Mikro
3D	Drei-Dimensional
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaar
BPV1	Bovines Papillomavirus 1
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
Ch00/01/02	Kanal 0/1/2
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	Double-stranded DNA
DTT	Dithiothreitol
EB-Virus	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
FCS/FKS	Fetal Calf/Kälber Serum
g	Gramm
GDP /GTP	Guanin-di/triphosphat
GFP	Green fluorescent protein
ggf.	gegebenenfalls
Glc	Glucose

Gln	Glutamin
h	Stunde
HB-Virus	Hepatitis-B-Virus
IRDye	Infrared-Dye
k	Kilo
kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
KGM-2	Keratinocyte Growth Media-2
L	Liter
m	Milli
M	Molar
m	Meter
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLV	Moloney murine leukemia virus
min	Minuten
mm^2	Quadratmillimeter
MMTV	Mouse mammary tumor virus
MOPS	Morpholinopropanesulfonic acid
mRNA	Messenger-RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
n	Nano
PKC	Proteinkinase C
PBS	Phosphate buffered saline
pTyr	phospho-Tyrosin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute/ Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunden
SH2	Src-homology 2
ssDNA	Single- stranded DNA

t_{0-n}	Zeitpunkt 0 bis n Minuten
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
U	Units
u.a.	unter anderem
UBD	Ubiquitin-Bindedomäne
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis
w/v	Massen-Volumen-Verhältnis
WHO	World Health Organisation
x	mal
z.B.	zum Beispiel

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1.1	Schematische Darstellung der Genomordnung von HPV.	13
Abb. 1.1.2	Infektionszyklus der humanen Papillomaviren.	14
Abb. 1.1.3	Zervixkarzinogenese. Histologische Entwicklung des Epithels von leichtgradigen Läsionen bis hin zum invasiven Karzinom.	16
Abb. 1.1.4	Hydrophobizitätsprofil des HPV16 E5-Proteins.	20
Abb. 1.2.1	ErbB-Rezeptorfamilie und Rezeptor-Aufbau.	26
Abb. 1.2.2	Schema der EGFR-Aktivierung.	28
Abb. 1.2.3	Phosphorylierungsstellen am zytoplasmatischen C-Terminus des ErbB-Rezeptors.	29
Abb. 1.2.4	Modell des Liganden-abhängigen Transports von EGFR im zeitlichen Verlauf der EGF-Stimulation.	32
Abb. 1.2.5	Schematische Darstellung der EGFR-Endozytose nach Liganden abhängiger und unabhängiger Aktivierung.	34
Abb. 4.1.1	Nachweis der E5-Transkription mittels RT-PCR in HPV16 E5 retroviral transduzierten HaCaT-Zellen.	80
Abb. 4.1.2	FACS-Analyse in HaCaT-Zellen zur Kontrolle von Transduktionseffizienz und E5-Expression.	81
Abb. 4.1.3	Quantitative Immunblot-Analysen zur Aktivierung von EGFR in HaCaT-Zellen.	83
Abb. 4.1.4	Quantitatifizierung eines Immunblots zur Untersuchung der Abhängigkeit der EGFR-Phosphorylierung von der EGF-Konzentration.	86
Abb. 4.1.5	Quantitativer Immunblot zur kinetischen Analyse der EGFR-Aktivierung in A-C: HaCaT-Zellen und D-F: HeLa-Zellen.	88
Abb. 4.1.6	Quantifizierung von In-Cell und On-Cell Western Blot zur Untersuchung von EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach EGF-Behandlung in HaCaT-Zellen.	91

Abb. 4.1.7	Quantitative Durchflusszytometrie zur Analyse der phospho- und Gesamt-EGFR-Level.	93
Abb. 4.1.8	Internalisierung und intrazellulärer Transport von EGF und EGFR in HaCaT-Zellen.	95
Abb. 4.1.9	Beispielhafte Darstellung zur Abfolge der 3D-Bildanalyse.	98
Abb. 4.1.10	3D-Bildanalyse zur Untersuchung der Rezeptoraktivierung in HeLa-Zellen.	100
Abb. 4.1.11	Mittlere Intensität und Anzahl von phospho-EGFR-positiven Vesikeln im Zytoplasma und in Kernnähe.	101
Abb. 4.1.12	Mittlere Intensität und Anzahl von Gesamt-EGFR-positiven Vesikeln im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus.	103
Abb. 4.1.13	Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel im Zytoplasma und in Kernnähe kolokalisieren.	105
Abb. 4.1.14	Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel kolokalisieren.	106
Abb. 4.1.15	Distanzen und Volumina von phospho-EGFR-Vesikeln, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel kolokalisieren.	109
Abb. 4.1.16	Volumen-Distanz-Korrelationsdiagramm von phospho-EGFR-Vesikeln, die mit Gesamt-EGFR-Vesikel kolokalisieren.	112
Abb. 4.1.17	Analyse der mittleren Intensität und Vesikelanzahl in Bezug zur Distanz bzw. zum Volumen kolokalisierender Vesikel.	113
Abb. 4.1.18	Vereinfachte Darstellung des EGFR-Transports nach seiner Aktivierung an der Plasmamembran und die bisher postulierten Effekte von HPV16 E5 auf die EGFR-Aktivierung.	116

Abb. 4.2.1	Quantitative Immunblots zur Analyse der Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Internalisierung von aktivierten EGF-Rezeptoren.	118
Abb. 4.2.2	Kinetik der EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach Inhibierung der Clathrin-abhängigen Internalisierung.	121
Abb. 4.2.3	Drei-dimensionale Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Clathrin-abhängigen Internalisierung nach Rezeptoraktivierung in HeLa-Zellen.	124
Abb. 4.2.4	Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit Clathrin-Vesikel im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus kolokalisieren.	125
Abb. 4.2.5	Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel, die mit Clathrin-haltigen Vesikeln kolokalisieren in Unabhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle.	127
Abb. 4.2.6	3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Kolokalisation von Gesamt-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln in HeLa-Zellen.	130
Abb. 4.2.7	Quantitative Analyse der Kolokalisation von Gesamt-EGFR- und Clathrin-haltigen Vesikeln im Zytoplasma und Kernnähe.	131
Abb. 4.2.8	Quantitative Analyse aller Gesamt-EGFR-Vesikel, die mit Clathrin-haltigen Vesikeln kolokalisieren und ohne Berücksichtigung ihrer zellulären Lokalisation.	133
Abb. 4.2.9	Kinetische Analyse der EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach Inhibierung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung.	135
Abb. 4.2.10	3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Clathrin-unabhängigen Internalisierung von EGFR in HeLa-Zellen.	138
Abb. 4.2.11	Kolokalisationanalyse von Gesamt-EGFR- und Caveolin-haltigen Vesikeln im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus.	140

Abb. 4.2.12	Analyse aller Gesamt-EGFR-Vesikel, die mit Caveolin-haltigen Vesikeln kolokalisieren, in Unabhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle.	141
Abb. 4.3.1	3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung des intrazellulären Transports aktivierter EGF-Rezeptoren in HeLa-Zellen.	145
Abb. 4.3.2	Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit dem frühen Endosomen im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus kolokalisieren.	146
Abb. 4.3.3	Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation, die mit frühen Endosomen kolokalisieren.	149
Abb. 4.3.4	Drei-dimensionale Bildanalyse zur Untersuchung der Kolokalisation von Gesamt-EGFR und frühen Endosomen in HeLa-Zellen.	150
Abb. 4.3.5	Kolokalisation-Analyse von Gesamt-EGFR- und EEA1-Vesikeln im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus.	152
Abb. 4.3.6	Analyse aller Gesamt-EGFR-Vesikel, die mit dem frühen Endosomen kolokalisieren, in Unabhängigkeit von ihrer Lokalisation in der Zelle.	154
Abb. 4.3.7	3D-Bildanalyse zur kinetischen Untersuchung der Kolokalisation aktivierter EGF-Rezeptoren mit Multivesikulären Körperchen in HeLa-Zellen.	157
Abb. 4.3.8	Analyse der phospho-EGFR-Vesikel, die mit multivesikulären Körperchen im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Nukleus kolokalisieren.	159
Abb. 4.3.9	Analyse aller phospho-EGFR-Vesikel unabhängig von ihrer zellulären Lokalisation, die mit multivesikulären Körperchen kolokalisieren.	161
Abb. 4.3.10	Quantitative Analyse der EGFR-Aktivierung nach Inhibierung des Recyclings durch Monensin.	163

Abb. 4.3.11	Quantitative Analyse der Oberflächen-EGFR mit und ohne Inhibierung des Recyclings durch Monensin in HaCaT-Zellen.	165
Abb. 4.3.12	Kinetik der EGFR-Aktivierung und Oberflächen-EGFR nach Inhibierung des Recyclings durch Monensin in HaCaT-Zellen.	166
Abb. 4.4.1	Quantitative Immunblot-Analysen zur kinetischen Untersuchung der EGFR-Aktivierung nach Inhibierung der EGFR-spezifischen Tyrosinkinase durch AG1478.	170
Abb. 4.5.1	Zusammenfassung der Effekte von HPV16 E5 auf die Aktivierung der EGFR in einem vereinfachten, schematischen Modell.	172
Abb. 5.6.1	Spatio-temporäre Mechanismen der E5-bedingten Überaktivierung	201
Tabelle 3.3.1	Liganden und deren Endkonzentrationen zur EGFR-Stimulation von HaCaT- und HeLa-Zellen.	63
Tabelle 4.1.1	Beispiel zur Berechnung der Intensität in Bezug auf Kolokalisationen.	104

Mein besonderer Dank gilt…

...Prof. Dr. A. Alonso für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, seinem Interesse und Engagement am Fortgang dieser Arbeit und vor allem für die außergewöhnliche wissenschaftliche und persönliche Betreuung während der gesamten Zeit.

…PD Dr. M. Müller für die Übernahme des Erstgutachtens aus der Fakultät für Biowissenschaften.

Weiterhin danke ich…

…Dr. L. Kaderali für die stets fachliche und auch persönliche Unterstützung sowie für seine Bereitschaft der Prüfungskommission beizuwohnen.

…Prof. K. Rohr und Dr. S. Wörz für die kooperative und unterstützende Zusammenarbeit im Rahmen der quantitativen 3D-Bildanalyse.

…G. Suryavanshi für die fruchtbaren Diskussionen und seine Geduld mir mathematische Problemstellung zu erklären.

…allen Kollegen der ATV, insbesondere Corinna Becki, Birgit Aengeneyndt, Torsten Hechler und Madeleine Sporleder, für die hilfreiche Unterstützung jeglicher Art und das äußerst angenehme Arbeitsklima.

… Dr. H. Schmidt-Glenewinkel sowie allen ehemaligen Mitarbeitern des Labors 2.112, für die praktischen Hinweise und Hilfestellungen.

Ein herzliches Dankeschön…

…möchte ich meiner Familie und meinem Freund Christian für die liebevolle Unterstützung während meines bisherigen Lebensweges aussprechen, die immer an mich glauben und auch in stressigen Zeiten nie müde werden, mir wieder Mut zuzusprechen.

…gilt außerdem meinen Freunden, insbesondere Silvana und ihrem kleinem Fynni, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir bei kleinen und größeren Problemen beistanden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, 23. Dezember 2010 _____

(Eileen Reinz)