# **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

> vorgelegt von Diplom-Biologin Tanja Peiler aus Zweibrücken

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# Pseudovirionen zur Simulation von Infektionen mit humanpathogenen Papillomaviren

Gutachter:

Prof. Dr. Lutz Gissmann PD Dr. Gabriele Petersen Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann am Institut für Angewandte Tumorvirologie des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg in der Zeit vom April 2001 bis Juni 2004 ausgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgender Konferenz publiziert:

Peiler, T., Zentgraf, H. und Gissmann, L. 2004. The Density of *in Vitro* Generated HPV16 Pseudovirions Depends on the Physical Structure of the Associated Plasmid. 21<sup>st</sup> International Papillomavirus Conference. Mexico City, Mexico, 20.-26. Februar 2004.

#### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lutz Gissmann für das Ermöglichen dieser Arbeit und die Bereitstellung des Themas, sowie für die stete Unterstützung und umfangreiche wissenschaftliche Betreuung.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Pascal Tomakidi für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Mitarbeit in meinem PhD-Komitee und viele nützliche Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Gabriele Petersen für die Übernahme des Gutachtens und die wertvollen Ratschläge bedanken.

Für die Teilnahme an meinem PhD-Komitee danke ich sehr Herrn Dr. Jürgen Schweizer und Herrn PD Dr. Jürgen Kleinschmidt.

Bei Herrn PD Dr. Martin Müller und Frau Dipl.-Biol. Katja Parsche bedanke ich mich für die freundliche Einführung in das Arbeiten mit dem Hefe-Produktionssystem. Herrn PD Dr. Martin Müller bin ich außerdem sehr für die Bereitstellung vieler Materialen (Plasmide, Baculovirus- und Hefestämme, Antikörper) und zahlreiche experimentelle Ratschläge und Hilfestellungen dankbar.

Insbesondere bin ich Frau Birgit Aengeneyndt für die Herstellung von VLPs im Baculovirussystem und Frau Corinna Klein für eine ausgezeichnete technische Assistenz zu großem Dank verpflichtet. Frau Annette Kohl danke ich für die Einführung in die Keratinozyten-Zellkultur.

An Herrn Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf und Frau Birgit Hub geht mein Dank für die elektronenmikroskopische Analyse der Partikel.

Herrn Dr. Michael Pawlita danke ich für die Bereitstellung von Humanseren.

Herrn Dr. Rémy Poirey gebührt mein Dank für die freundliche Unterstützung bei der Arbeit mit Hefen.

Allen Mitarbeitern des Labors 2.121 möchte ich herzlichst für die freundliche Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft danken.

Für die liebevolle Unterstützung möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Meiner Familie und Stephan

# Inhalt

	Zusammenfassung			
	Summary			
1	Einleitung			
1.1	Papillomaviren und ihre Rolle bei der Karzinogenese			
1.1.1	Epidemiologie und klinische Bedeutung			
1.1.2	Historische Übersicht			
1.1.3	Klassifikation der Papillomaviren			
1.1.4	HPV-Infektion und Karzinogenese			
1.2	Struktur und genomische Organisation von Papillomaviren			
1.2.1	Kapsidstruktur			
1.2.2	Organisation des viralen Genoms			
1.3	Replikationszyklus			
1.4	Virusähnliche Partikel und Pseudovirionen			
1.4.1	Die Konstruktion von virusähnlichen Partikeln und Pseudovirionen			
1.4.2	Pseudovirionen sind VLPs als Papillomavirus-Modell überlegen			
1.5	Zielsetzung der Arbeit			
1.5.1	HPV16-Pseudovirionen-Produktion in der Hefe Saccharomyces cerevisiae			
1.5.2	In vitro-Pseudovirionen-Produktion durch Disassembly/Reassembly			
2	Material			
2.1	Chemikalien			
2.1.1	Salze			
2.1.2	Säuren und Basen			
2.1.3	Organische Lösungsmittel und Reagenzien			
2.2	Lösungen und Puffer			
2.2.1	Minipräparation von Plasmiden			
2.2.2	Elektrophorese			
2.2.2.1	DNA-Agarosegele			
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgele zur Proteinauftrennung			
2.2.3	Coomassiefärbung von Proteingelen			
2.2.4	Western-Blot und Detektion durch ECL (enhanced chemoluminescence)			
2.2.5	DNA-Protein-Bindungsnachweis			
2.2.6	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)			
2.2.7	Radioaktive Markierung einer Sonde			

2.2.8	Southern-Blot und Hybridisierung der Membran	24
2.2.9	Lösungen zu Arbeiten mit Hefen	25
2.2.10	Lösungen zur Herstellung von virusähnlichen Partikeln	26
2.2.11	Lösungen zur Herstellung von Pseudovirionen in vitro	26
2.2.12	Lösungen zu Zentrifugationen	26
2.2.13	Lösungen zur Analyse pseudoinfizierter Zellen	26
2.2.14	Sonstige Puffer und Lösungen	27
2.3	Enzyme und Kits	28
2.4	Radiochemikalien	28
2.5	Größen- und Konzentrationsstandards	28
2.6	Antikörper	29
2.6.1	Primärantikörper	29
2.6.2	Sekundärantikörper	30
2.7	Biologische Materialien	30
2.7.1	Kultur von Bakterien	30
2.7.1.1	Bakterienstämme	30
2.7.1.2	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	30
2.7.2	Kultur von Hefen	31
2.7.2.1	Hefestämme	31
2.7.2.2	Medien und Zusätze für die Hefekultur	31
2.7.3	Kultur von Säuger- und Insektenzellen	33
2.7.3.1	Zelllinien	33
2.7.3.2	Medien, Reagenzien und Zusätze für die Kultivierung eukaryontischer	
/	Zellen	33
2.7.3.2.1	Allgemeine Kultur	33
2.7.3.2.2	Spezielle Medien	34
2.7.4	Baculovirusstöcke	34
2.8	Nukleinsäuren	34
2.8.1	Träger-DNA	34
2.8.2	Plasmide	35
2.8.3	Oligonukleotidprimer	36
2.9	Säulen und Füllmaterial	36
2.10	Geräte und Anlagen	36
2.10.1	Zentrifugen und Zubehör	36
2.10.2	Sonstige Geräte	37
2.11	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	38

3	Methoden 4
3.1	Allgemeine molekular- und mikrobiologische Arbeiten 4
3.1.1	DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen 4
3.1.2	Restriktionsverdau von DNA 4
3.1.3	Herstellung von glatten Enden mit T4-DNA-Polymerase 4
3.1.4	Relaxation von superhelikaler Plasmid-DNA mit DNA-Topoisomerase I 4
3.1.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 4
3.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 4
3.1.7	Ligation 4
3.1.8	Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform-Extraktion 4
3.1.9	Präzipitation von Nukleinsäuren 4
3.1.10	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA 4
3.1.11	Random Prime-Methode zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde 4
3.1.12	DNA-Transfer durch Southern-Blot 4
3.1.13	DNA-Dot-Blot 4
3.1.14	Hybridisierung von DNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde 4
3.1.15	Kultivierung und Lagerung von Bakterien 4
3.1.16	Herstellung transformationskompetenter Bakterien 4
3.1.17	Transformation von Bakterien durch Elektroporation 4
3.1.18	Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse 4
3.1.19	Plasmid-Maxipräparation 4
3.2	Zellkultur-Arbeiten 5
3.2.1	Allgemeine Zellkultur-Methoden 5
3.2.2	Kryokonservierung von Zellen 5
3.2.3	Auftauen von kryokonservierten Zellen 5
3.2.4	Zellzahl- und Lebendzahlbestimmung 5
3.2.5	Transfektion eukaryontischer Zellen 5
3.3	Arbeiten mit Hefen 5
3.3.1	Aufbewahrung und Kultur von Hefen 5
3.3.2	Bestimmung der Zelldichte 5
3.3.3	Herstellung von kompetenten Hefezellen und Transformation mit Plasmid-
	DNA 5.
3.3.4	DNA-Extraktion aus Hefezellen 5.
3.3.5	Protein-Extraktion aus Hefezellen 5
3.3.6	Hefekultur zur Pseudovirionenproduktion 5
3.3.7	Aufarbeitung von Rohextrakten 5
3.3.8	Hefe-Immunfluoreszenz 5
3.4	Methoden zur Herstellung von virusähnlichen Partikeln (VLPs) und
2 4 1	Pseudovirionen 5
3.4.1	Herstellung virusahnlicher Partikel 5

3.4.1.1	Amplifikation rekombinanter Baculovirusstämme	54
3.4.1.2	Infektion von TN HIGH five Insektenzellen	54
3.4.1.3	Isolierung der VLPs aus Insektenzellen	54
3.4.2	Herstellung von Pseudovirionen durch in vitro Zerfall und	
	Zusammenlagerung in Anwesenheit von Plasmid-DNA	
	(Disassembly/Reassembly)	55
3 5	Methoden zur Analyse von VI Bs und anderen Proteinen	54
5.5 2.5.1	SDS Delyaerrylamid Calalettranhoraea (DACE)	5.
5.5.1 2.5.2	Western Dist Transformed Neckersis densk sedemend de ministration	52
3.3.2	(ECL)	51
252	(ECL)	50
3.5.5		57
3.5.4	Coomassie Brilliant Blue	57
3.5.5	Capture-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	57
3.5.6	Transmissionselektronenmikroskopie	58
3.5.7	Protein-Konzentrationsbestimmung	58
3.5.8	CsCl-Gleichgewichtszentrifugation	58
3.5.9	Zonensedimentation mit Sucrose	58
3.5.10	Partielle Aufreinigung von Hefe-Rohextrakten mittels Sucrosekissen	59
3.5.11	HPLC-Aufreinigung von Partikeln mittels Heparinsäule	59
3.5.12	Detektion "DNase-resistenter" DNA	59
3.5.13	Detektion des Plasmids innerhalb eines CsCl-Gradienten	6(
36	Methoden zur Pseudoinfektion von Zielzellen	6(
361	Pseudoinfektion von Zielzellen	60
362	Quantitative Analyse EGFP-fluoreszenter Zellen im Durchflusszytometer	6(
3.6.3	X-Gal-Färbung	61
4	Freebrices	67
4		02
4.1	HPV16-Pseudovirionen-Produktionssystem in der Hefe Saccharomyces	6
<i>A</i> 1 1	Klonierung des EGEP-Gens in das Zielnlasmid	62
4.1.1	Transformation und Salektion von Hefeklonen zur	02
4.1.2	Pseudovirionenproduktion	6/
113	Nach Induktion der Kansidnroteinavpression konnten Partikel isoliert	0-
4.1.3	werden	66
A 1 A	Detektion unterschiedlich dichter Partikel im CsCl Gradienten	6
т.1. <del>4</del> Л 1 5	Mit Hefe Rohevtrakten konnte keine Dseudoinfaktion von Zielzellen	03
4.1.3	nachgewiesen werden	7
116	Analyse der Hefelaltur auf Verbiet der Diegmide	ו   יר
4.1.0	Anaryse der nerekundr auf verfust der Pläsifiede	0
4.1./	Nachweis assozhenen DivA	0. 01
4.1.ð	versuch, die Kopienzahl des Zielpläsmids zu erhöhen	ð:

4.2	In vitro-Pseudovirionen-Produktion durch Disassembly/Reassembly	86
4.2.1	Konstruktion von HPV16 L1/L2 Pseudovirionen	86
4.2.2	Zielzellen können mit <i>Disassembly/Reassembly (D/R)</i> -Material pseudoinfiziert werden	93
4.2.2.1	Die Transgenexpression von EGFP oder β-Galaktosidase ist detektierbar	93
4.2.2.2	Der Gentransfer ist partikelabhängig	95
4.2.3	Die Pseudoinfektion mit <i>Disassembly/Reassembly</i> -Material folgt einer " <i>One-hit</i> -Kinetik"	101
4.2.4	Die Pseudoinfektiosität wird durch eine DNase-Behandlung aufgehoben	102
4.2.5	Alle getesteten SV40 T-Antigen-positiven Zelllinien konnten pseudoinfiziert werden	104
4.2.6	L2 ist nicht notwendig, um infektiöse Pseudovirionen zu erhalten, steigert aber die Effizienz	107
4.2.7	Pseudovirionen durch direkte Interaktion	108
4.2.8	Vergleich verschiedener Plasmid-Isoformen bei der <i>in vitro</i> -Herstellung von Pseudovirionen	109
5	Diskussion	120
5.1	HPV16-Pseudovirionen konnten in der Hefe Saccharomyces cerevisiae nicht hergestellt werden	120
5.1.1	Kritische Aspekte des Hefe-Produktionssystems	122
5.1.2	Ansätze zur Etablierung eines in vivo-Pseudovirionen-Produktionssystems	123
5.2	In vitro-Pseudovirionen-Produktion durch Disassembly/Reassembly	124
5.2.1	Charakterisierung der Pseudoinfektion	125
5.2.2	Tropismus der Papillomaviren	130
5.2.3	Die Rolle des Nebenkapsidproteins L2 bei der Herstellung infektiöser Partikel	133
5.2.4	Charakterisierung verschiedener Pseudovirionentypen	135
5.3	Perspektiven	137
6	Literatur	139
7	Abkürzungen und Symbole	156

Da es bislang kein effizientes *in vitro*-Replikationssystem für Papillomaviren gibt, sind viele molekulare Aspekte der Infektion noch unklar. Mit Hilfe von Pseudovirionen, die sich aus einem Kapsid und einem assoziierten Plasmid mit Reportergen zusammensetzen, können anhand dessen Expression eine erfolgreiche "Infektion" von Zielzellen detektiert und somit frühe Infektionsereignisse simuliert werden.

Rossi *et al.* (2000) entwickelten ein vielversprechendes Pseudovirionen-Produktionssystem in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, bei dem jedoch langfristig erhebliche Schwankungen bei der Ausbeute auftraten und zuletzt keine infektiösen Pseudovirionen mehr generiert werden konnten. In dieser Arbeit konnten mit dem Hefe-Produktionssystem zwar HPV16 L1/L2 VLPs isoliert werden, die auch teilweise mit dem EGFP-Zielplasmid assoziiert waren, doch konnte keine Pseudoinfektion von Zielzellen nachgewiesen werden. Mögliche Gründe für das Scheitern der Pseudovirionenproduktion in Hefe sind eine mangelhafte Verpackung des Reporterplasmids in die Partikel, ein Verlust der Infektiosität (z.B. durch die Aggregation mit zellulären Komponenten) oder eine zu geringe, nicht detektierbare Transgenexpression.

Um dennoch Pseudoinfektionsexperimente durchführen zu können, wurden mittels der in vitro Disassembly/Reassembly-Methode nach Kawana et al. (1998) aus in Insektenzellen produzierten HPV16 L1/L2 VLPs und einem EGFP-Reporterplasmid infektiöse Pseudovirionen konstruiert. Das Zerfallen der VLPs in Kapsomere und die erneute Zusammenlagerung in Gegenwart von Reporterplasmid wurde mittels Elektronenmikroskopie und Sedimentationsanalysen dokumentiert. Nach Inkubation von Zielzellen mit Disassembly/Reassembly-Material konnte ein partikelabhängiger Gentransfer nachgewiesen werden: Die Infektiosität fand sich in Partikelfraktionen, und durch die Hitzeinaktivierung Disassembly/Reassembly-Materials oder die Präinkubation des mit spezifischen neutralisierenden Antikörpern bzw. mit Heparin wurde der Gentransfer blockiert. Das Reporterplasmid scheint nur partiell enkapsidiert oder äußerlich mit dem Partikel assoziiert zu sein, denn es war nicht vor DNasen geschützt. Die Pseudoinfektion folgte einer one-hit-Kinetik. Es konnten Zelllinien verschiedener Spezies und Ursprungsgewebe pseudoinfiziert werden. Dabei schien die SV40 ori-Replikation des Reporterplasmids in der Zielzelle erforderlich für eine effiziente Detektion der Pseudoinfektion. HPV16 L1-Pseudovirionen in der Abwesenheit von L2 konnten ebenfalls konstruiert werden, zeigten aber eine verminderte Infektiosität. Auch VLPs, die lediglich mit dem Reporterplasmid koinkubiert wurden, waren zum Gentransfer befähigt. Die Plasmidkonformation (superhelikal, relaxiert oder linear) beeinflusste die Schwebedichte, nicht aber die Effizienz des Gentransfers, das Sedimentationsverhalten oder die DNase-Sensitivität der Pseudovirionen. Nur bei mit zirkulären Plasmid durch Disassembly/Reassembly hergestellten Pseudovirionen resultierte eine im Vergleich zu VLPs erhöhte Schwebedichte, nicht aber bei linearem Plasmid oder einer bloßen Koinkubation mit zirkulärem Plasmid.

Auch wenn das Reporterplasmid nicht vollständig enkapsidiert vorliegt, konnte mit den durch *in vitro-Disassembly/Reassembly* konstruierten Pseudovirionen ein partikelvermittelter Gentransfer in Zielzellen verschiedenen Ursprungs erzielt werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dieses System für Studien z.B. zur Papillomavirusinfektion einzusetzen.

Since there is no efficient *in vitro* replication system for papillomaviruses yet available, many molecular aspects of infection remain unclear. Pseudovirions are particles consisting of a capsid associated with a reporter gene. By monitoring reporter gene expression, successful pseudoinfection of target cells can be detected, allowing for the simulation of early infection events.

Rossi *et al.* (2000) developed a promising pseudovirion production system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. However over time, substantial variations in yield occured, and finally pseudovirion production was lost entirely. Although in this thesis HPV16 L1/L2 VLPs, which were partially associated with the EGFP target plasmid, could be isolated from the yeast production system, no pseudoinfection of target cells could be detected. Possible reasons for the failure of pseudovirion production are insufficient packaging of the reporter plasmid into the particle, loss of infectivity (*e.g.* through aggregation with cellular components), or transgene expression too low to be detectable.

In order to still be able to conduct pseudoinfection experiments, infectious pseudovirions were constructed by the *in vitro* disassembly/reassembly method described by Kawana et al. (1998), using HPV16 L1/L2 VLPs produced in insect cells and an EGFP reporter plasmid. The dissocation of VLPs into capsomers and the reassembly in the presence of reporter plasmid was documented by electron microscopy and sedimentation analysis. Following incubation of target cells with disassembly/reassembly material, a particle-mediated gene transfer could be detected: Infectivity was found in particle-containing fractions, and heat inactivation or preincubation of disassembly/reassembly material with specific neutralizing antibodies as well as heparin blocked gene transfer. The reporter plasmid seems to be only partially encapsidated or externally attached to the particle, since it was not protected from DNase treatment. Pseudoinfection followed one-hit kinetics. Cell lines of different species and tissue origin could be pseudoinfected. Apparently, SV40 ori-based replication of the reporter plasmid in the target cell was required for efficient detection of pseudoinfection. HPV16 L1 pseudovirions could be generated in the absence of L2, but exhibited reduced infectivity. VLPs only coincubated with the reporter plasmid were also capable of gene transfer. Plasmid conformation (supercoiled, relaxed or linear) influenced buoyant density, but not gene transfer efficiency, sedimentation or DNase-sensitivity of pseudovirions. Only when circular plasmid was used in the disassembly/reassembly process was the buoyant density of the pseudovirions higher than that of VLPs. This was not the case for pseudovirions with linear plasmid or pseudovirions generated by coincubation with circular plasmid.

Although the reporter plasmid is not completely packaged, particle-mediated gene transfer into target cells of different origin could be achieved with pseudovirions constructed by *in vitro* disassembly/reassembly. Thus, this system could be applied in studies on *e.g.* papillomavirus infection.

# 1 Einleitung

#### 1.1 Papillomaviren und ihre Rolle bei der Karzinogenese

#### 1.1.1 Epidemiologie und klinische Bedeutung

Bisher werden weltweit etwa 20 % der Krebserkrankungen mit einer infektiösen Ursache in Verbindung gebracht, davon etwa 15 % mit Tumorviren, denen auch die humanpathogenen Papillomaviren (HPV) zuzuordnen sind (zur Hausen, 2001). Zahlreiche epidemiologische Befunde stellen die in der Bevölkerung weit verbreiteten, meist subklinischen HPV-Infektionen in kausalen Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko verschiedener hyperproliferativer Läsionen (Schiffman *et al.*, 1993; Übersicht in zur Hausen, 1999). Für den Gebärmutterhalskrebs, bei dem in mehr als 99 % der Neoplasien HPV-DNA nachgewiesen werden konnte (Walboomers *et al.*, 1999), werden HPV-Infektionen sogar als die erste identifizierte, notwendige Ursache für eine menschliche Krebserkrankung diskutiert (Bosch *et al.*, 2002). Mit einer jährlichen Inzidenz von 471 000 Fällen ist das Zervixkarzinom weltweit die zweithäufigste Krebsform bei Frauen, wobei 80 % der Fälle in Entwicklungsländern auftreten (Parkin, 2001).

#### 1.1.2 Historische Übersicht

Ende des 19. Jahrhunderts wiesen McFadyan und Hobday (1898) erstmals ein infektiöses Agenz mit viralem Charakter für die Entstehung von Warzen nach, indem sie Warzen bei Hunden mittels eines zellfreien Extraktes übertrugen. Eine entsprechende zellfreie Übertragung humaner Warzen demonstrierte Ciuffo 1907. Die erste Beschreibung eines Papillomavirus erfolgte 1933 durch Shope, der das Cottontail-Rabbit-Papillomavirus als den infektiösen Erreger der kutanen Papillomatosis bei Kaninchen entdeckte. Rous und Beard (1934, 1935) beobachteten die Entstehung maligner Tumore bei Kaninchen, sowohl nach einer Transplantation von Warzenmaterial, wie nach einer Infektion mit dem Cottontail-Rabbit-Papillomavirus. Daraus entwickelte sich das erste experimentelle Tiermodell für virale Onkogenese-Prozesse, anhand dessen der multifaktorielle Charakter der Tumorigenese untersucht werden konnte. Die elektronenmikroskopische Aufklärung der Struktur und Zusammensetzung von Papillomavirus-Partikeln aus humanen Warzen gelang Strauss et al. 1949. 1963 folgte die Bestimmung physikalischer Eigenschaften des Virus-Genoms durch Crawford und Crawford. Mit dem Aufkommen molekularbiologischer Techniken in den siebziger Jahren wurde eine umfangreiche Erforschung der Papillomaviren möglich, die auch eine Rolle bestimmter HPV bei der Ätiologie mehrerer Tumorerkrankungen, darunter auch dem Zervixkarzinom (zur Hausen, 1976), aufdeckte. Unerwartet viele verschiedene Typen humanpathogener Papillomaviren wurden auf molekularer Ebene charakterisiert und mit hyperproliferativen Läsionen in Verbindung gebracht, und noch immer werden neue Genotypen entdeckt.

#### 1.1.3 Klassifikation der Papillomaviren

Papillomaviren bilden die Familie der Papillomaviridae (van Regenmortel, 2001) und stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, die ursächlich an der Entstehung verschiedener hyperproliferativer Läsionen in Epithelien der oralen und genitalen Schleimhäute und der Haut beteiligt sind. Sie infizieren mit hoher Wirts- und Gewebespezifität Säuger, Vögel und Amphibien (Sundberg, 1987). Die Klassifikation berücksichtigt zunächst die Wirtsspezifität und dann Sequenzhomologien im Bereich der E6/E7- und L1-Gene. Allein bei den humanpathogenen Papillomaviren sind bisher 85 Typen (Genotypen mit weniger als 90 % Homologie) identifiziert und sequenziert, und mehr als weitere 120 potenzielle Typen wurden bereits teilweise charakterisiert (zur Hausen, 2000; de Villiers, 1994). Wenn 90-98 % Sequenzhomologie vorliegt, handelt es sich um HPV-Subtypen, bei noch geringerer Abweichung um Varianten (Delius und Hoffman, 1994).

Es ist bislang nicht geklärt, durch welche Mechanismen die ausgeprägte Wirts- und Gewebespezifität von Papillomaviren zustande kommt. Hierfür können frühe Infektionsereignisse wie die Rezeptorbindung, aber auch späte Ereignisse des viralen Zyklus, etwa die Genomreplikation und die Regulation der viralen Genexpression durch zelluläre Faktoren, verantwortlich sein.

#### 1.1.4 HPV-Infektion und Karzinogenese

Humanpathogene Papillomaviren infizieren Haut- oder Schleimhautepithelien, wo sie hyperproliferative Läsionen induzieren (siehe Tab. 1.1). Im verhornenden Plattenepithel der Haut können gutartige Warzen mit spontaner Regression auftreten, so z.B. plantare Warzen bei HPV1 und 4. Aber auch bei der malignen Epidermodysplasia verruciformis kommen gehäuft bestimmte HPV-Typen vor, etwa HPV5 und 8. Bei mucosotropen HPV-Typen unterscheidet man "low risk"-Typen mit einem geringem Risiko einer malignen Entartung wie HPV6 und 11, die benigne Papillome im oralen und anogenitalen Bereich verursachen, und "high risk"-Typen wie HPV16 und 18, deren Infektion über Jahrzehnte persistieren und zu dysplastischen Transformationen bis hin zum Zervixkarzinom führen kann (Lorincz et al., 1992). In zervikalen Tumorbiopsien lässt sich in etwa 50 % der Fälle HPV16-DNA und in 10 % der Fälle HPV18-DNA nachweisen; in 80-95 % der Fälle findet man einen der HPV-Typen 16, 18, 45, 31, 33 oder 59 (Bosch et al., 2002). Die meisten der HPV-Primärinfektionen verschwinden nach 6-12 Monaten; weniger als 5 % führen nach einer jahrzehntelangen Latenzzeit zur Krebsentstehung (Goldie et al., 2003). Bei diesen Fällen verursacht die persistente Infektion die Entstehung einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) und schreitet über drei Stadien, je nach Schweregrad der Neoplasie CIN I-III genannt, bis zum invasiven Karzinom fort. Dabei ist die maligne Transformation durch eine Integration der zuvor episomal vorliegenden Virus-DNA ins Wirtsgenom gekennzeichnet (Dürst et al., 1985; Choo et al., 1987), bei der das offene Leseraster des regulatorischen E2-Proteins deletiert oder inaktiviert wird, was eine unkontrollierte Expression der Transformationsproteine E6 und E7 zur Folge hat. Als zusätzliche Risikofaktoren für das Zervixkarzinom werden dabei unter anderem Nikotinkonsum, hormonelle Kontrazeptiva oder Schwangerschaft und genetische Faktoren (Immunkompetenz, HLA-Genotyp) diskutiert (Kjellberg *et al.*, 2000; Mehal *et al.*, 1994; Schiffman und Brinton, 1995).

Manifestation HPV-Typen			
	Häufig	Seltener	
Hautwarzen			
Plantare Warzen	1	2,4,63	
Gemeine Warzen	2,27	1,4,7,26,28,29,57,60,65	
Flachwarzen	3,10	2,26,27,28,29,41,49	
Anogenitale Läsionen			
Condyloma acuminata	6,11	2,16,30,40,41,42,44,45,54,55,61	
CIN, VIN, VAIN, PIN,	16,18,31	6,11,30,34,35,39,40,42-45,51,52,	
PAIN		56-59,61,62,64,66,67,69	
Maligne Läsionen			
Zervixkarzinom	16,18,31,45	6,10,11,26,33,35,39,51,52,55,56,	
Andere anogenitale	6,16,18	58,59,66,68	
Karzinome	6,11	11,31,33	
Laryngeale Karzinome	16,18	16,18,3	
Orale Karzinome	3,6,57		
Subunguale digitale	16		
Karzinome			

**Tab. 1.1** Spezifität von HPV-Typen für epitheliale Gewebe unterschiedlichen Ursprungs. Persistente Infektionenfinden sich nur bei bestimmten Typen. Verändert nach www.arhp.org/CPMarch2001/types.htm - 25.06.01.

#### Die Entwicklung von HPV-Vakzinen

Zur Zeit befinden sich sowohl prophylaktische Vakzine zur Prävention einer HPV-Infektion als auch therapeutische Vakzine in der klinischen Erprobung (Übersicht in Frazer, 2004). In mehreren vielversprechenden Studien zur Infektionsprophylaxe erwiesen sich virusähnliche Partikel als sehr gut verträglich und stark immunogen (Emeny *et al.*, 2002; Harro *et al.*, 2001; Koutsky *et al.*, 2002). Um einen umfassenderen Schutz vor zervikalen Karzinomen zu erreichen, werden auch multivalente Vakzine entwickelt. Ob sich die bisherigen Immunisierungserfolge als dauerhaft genug erweisen, um langfristig Infektionen zu vermeiden, bleibt abzuwarten. Die therapeutische Vakzinierung zielt darauf ab, bei bereits vorhandenen Infektionen HPV-positive Zellen zu eliminieren und somit eine maligne Progression zu verhindern bzw. sogar die Regression bereits bestehender Läsionen auszulösen. Hierfür werden zur Zeit chimäre virusähnliche Partikel (Kaufmann *et al.*, 2001), Peptide (Muderspach *et al.*, 2000), (Fusions-) Proteine (de Jong *et al.*, 2002), verkapselte Plasmid-DNA (Klencke *et al.*, 2002; Sheets *et al.*, 2003), virale Vektoren (Kaufmann *et al.*, 2002; Baldwin *et al.*, 2003) und dendritische Zellen (Ferrara *et al.*, 2003) getestet.

#### 1.2 Struktur und genomische Organisation von Papillomaviren

#### 1.2.1 Kapsidstruktur

Papillomaviren sind kleine DNA-Viren ohne Lipoproteinhülle, mit einem ikosaedrischen Kapsid von 52-55 nm Durchmesser, das aus 72 Kapsomeren (Pentamere des Hauptstrukturproteins L1) zusammengesetzt ist (Crawford und Crawford, 1963). Diese Struktur enthält 60 Kapsomere, die von sechs Kapsomeren benachbart sind, und zwölf pentavalente Kapsomere. Dabei wird die Kapsidstruktur hauptsächlich durch Disulfidbrücken zwischen den Kapsomeren stabilisiert (McCarthy *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Da das

Nebenkapsidprotein L2 ein substöchiometrisches Verhältnis von 1:30 zu L1 aufweist (Kirnbauer *et al.*, 1993), wird eine Assoziation mit den pentavalenten Kapsomeren vorgeschlagen (Trus *et al.*, 1997). Obwohl sich L2 größtenteils im Kapsidlumen befindet, deuten L2-spezifische neutralisierende Antikörper (Kawana *et al.*, 1999) auf Proteindomänen hin, die durch die Virushülle penetrieren.

Das Virusgenom ist ein kovalent geschlossenes, zirkuläres doppelsträngiges DNA-Molekül von ca. 8000 bp Länge. Komplexiert mit zellulären Histonen liegt es in Nukleosomenähnlichen, superhelikalen Strukturen vor (Favre, 1975; Pfister *et al.*, 1977).



**Abb. 1.1** Das Papillomavirus-Kapsid. A) Gitter-Modell: die Kapsomere (L1-Pentamere) sitzen an den Eckpunkten eines T=7-Gitters im ikosaedrischen Kapsid (Modis *et al.*, 2002). B) Links ein gefärbtes EM-Bild, rechts eine computermodellierte Darstellung. Quelle: www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html - 25.06.01.

#### 1.2.2 Organisation des viralen Genoms

#### Genom

Die Organisation des Genoms ist bei verschiedenen HPV-Typen weitgehend konserviert. Alle offenen Leseraster sind auf dem kodogenen DNA-Strang (Abb. 1.2) lokalisiert, der aus einem regulatorischen Bereich, der URR (*upstream regulatory region*), sowie Abschnitten für die Expression früher und später Gene besteht. Die frühen Genprodukte E1-E7 (E von *early*) sind an der Virusreplikation und an der zellulären Transformation beteiligt, während die späten Strukturproteine L1 und L2 (L von *late*) das virale Kapsid bilden.



Abb. 1.2 Schematische, lineare Darstellung des zirkulären HPV-Typ 16-Genoms. Nach Tommasino (1997).

## URR

Die URR, auch als LCR (*long control region*) und NCR (*non-coding region*) bezeichnet, liegt als ca. 1000 bp langer Abschnitt zwischen der späten und frühen Region. Sie enthält den Replikationsursprung und Promotor- und Enhancer-Elemente mit Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren sowie für die viralen Proteine E1 und E2.

Protein	Funktion
E1	Virale Replikation
E2	Virale Replikation und Transkriptionsregulation
E4	Destabilisierung des Keratin-Zytoskeletts
E5	Zelluläre Transformation
E6	Zelluläre Transformation
E7	Zelluläre Transformation
L1	Hauptkapsidprotein
L2	Nebenkapsidprotein

Tab. 1.2 Funktionen der frühen und späten Genprodukte des HPV-Genoms.

#### Die frühen Gene E1-E5

Das hoch konservierte E1-Protein erkennt den Replikationsursprung, rekrutiert Komponenten der zellulären Replikationsmaschinerie und besitzt ATPase- und Helikase-Aktivität (DelVecchio *et al.*, 1992; Chiang *et al.*, 1992). Die Bindung von E1 an den Replikationsursprung wird zunächst durch eine vorübergehende Assoziation mit E2 verstärkt (Mohr *et al.*, 1990; Frattini und Laimins, 1994). Durch die Bindung der DNA-Polymerase  $\alpha$  (Masterson *et al.*, 1998) initiiert E1 die Replikation der viralen DNA.

Die E2-Sequenz enthält eine C-terminale DNA-bindende Domäne und eine N-terminale transaktivierende Domäne (Bouvard *et al.*, 1994). Neben der Bildung eines Initiationskomplexes mit E1 bindet E2 als Dimer an palindromische Sequenzmotive in den Promotoren, wobei sowohl ein Aktivieren als auch eine Repression der viralen Transkription die Folge sein kann (Übersicht in McBride *et al.*, 1991). Neuere Erkenntnisse deuten jedoch auf eine untergeordnete Bedeutung der transaktivierenden Eigenschaften von E2 im viralen Zyklus hin (Stubenrauch *et al.*, 1998). Bei episomalen Genomen reprimiert E2 nicht wie bei integrierten HPV-Genomen die Expression von E6 und E7, wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen Chromatinstruktur (Bechtold *et al.*, 2003).

Während der Reifung der Viruspartikel akkumuliert das eigentlich späte Protein E4 im Zytoplasma, wobei es 20-30 % des gesamten zellulären Proteingehalts ausmachen kann. E4 ist ein Spleissprodukt, das den N-Terminus von E1 enthält. Durch spezifische, destabilisierende Interaktionen mit Keratinfilamenten führt E4 zur Dissoziation des Keratinnetzwerks der Zelle und erleichtert so das Freisetzen der Viren (Doorbar *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1993).

Das kleine membranassoziierte E5-Protein boviner Papillomaviren ist hauptverantwortlich für die zelluläre Transformation (Burkhardt *et al.*, 1987). Bei HPV ist es hierbei gegenüber E6 und E7 eher von untergeordneter Bedeutung, denn in Zervixkarzinomzellen ist E5 oft deletiert (Schwarz *et al.*, 1985). Es scheint vor allem bei der Initiation der Transformation durch eine

erhöhte Transduktion mitogener Signale von Wachstumsfaktoren eine Rolle zu spielen. So unterstützt E5 E7 bei der Reprogrammierung differenzierender Keratinozyten und stimuliert die DNA-Synthese (Genther *et al.*, 2003). E5 verzögert den endosomalen pH-Abfall (Straight *et al.*, 1995), wahrscheinlich indem es an eine membrangebundene Untereinheit der vakuolären ATPase bindet und deren Zusammenlagerung behindert (Briggs *et al.*, 2001), was zu einem erhöhten EGF-Rezeptor-Recycling führt (Straight *et al.*, 1993). Weiterhin kann E5 mit EGF-, PDGFβ- und CSF-1-Rezeptoren komplexieren (Hwang *et al.*, 1995). Über Proteinkinase C-abhängige und -unabhängige Mechanismen aktiviert E5 membranassoziierte Proteinkinasen (Gu und Matlashewski, 1995; Crusius *et al.*, 1997). Auch ein antiapoptotischer Effekt nach DNA-Schäden wurde beschrieben (Zhang *et al.*, 2002).

#### Die frühen Onkoproteine E6 und E7 und ihre Rolle bei der zellulären Transformation

Bei der Virusreplikation sind Papillomaviren auf teilungsaktive Zellen angewiesen. Da die vegetative Vermehrung in Keratinozyten der äußeren Epithelschichten (siehe 1.3) stattfindet, haben Papillomaviren Pathogenitätsmechanismen entwickelt, die in den Differenzierungsprozess eingreifen und Zellzyklusbarrieren überwinden. Letztendlich kann die fortgesetzte Proliferation zu hyperproliferativen Läsionen führen. Die wichtigste Rolle bei der zellulären Transformation spielen dabei die frühen viralen Proteine E6 und E7, die auch bei Zervixkarzinomzellen konstitutiv exprimiert werden (Schwarz et al., 1985; Baker et al., 1987). Dabei korrelieren das Transformationspotenzial und die Fähigkeit zur Induktion chromosomaler Instabilität der beiden Onkoproteine mit der Einordnung von Papillomaviren in "low risk" und "high risk"-Typen (Storey et al., 1988; Barbosa et al., 1991). Bei verschiedenen HPV-Typen variieren die Transformations-Mechanismen (Übersichten in Mansur und Androphy, 1993; Barbosa, 1996). Die folgenden Beschreibungen der beiden Onkoproteine E6 und E7 beziehen sich auf "high risk"-Typen.

E6 bindet p53 (Werness *et al.*, 1990) und fördert dessen Degradierung (Scheffner *et al.*, 1990). Dabei hat das E6-assoziierte Protein E6-AP die Funktion einer Ubiquitin-Protein-Ligase, die p53 durch Ubiquitinierung für den Abbau durch das Proteasom markiert (Scheffner *et al.*, 1993). Der durch E6 hervorgerufene Ausfall des Tumorsuppressorproteins p53 resultiert in genomischer Instabilität (Reznikoff *et al.*, 1994; Reznikoff *et al.*, 1996) und mangelnder Apoptose (Pan und Griep, 1994). Kommt es zu DNA-Schäden durch z.B. mutagene Einflüsse oder einer Deregulierung des Zellzyklus, etwa bei einer viralen Infektion, steigert sich die Halbwertszeit von p53. Die erhöhte p53-Konzentration in der Zelle führt entweder zu einer Blockade des Zellzyklus im G<sub>1</sub>-Stadium (über den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21), während die zellulären Reparatursysteme die Defekte beheben können, oder zur Eliminierung von irreparabel geschädigten oder unkontrolliert wachsenden Zellen durch Apoptose. Der funktionelle Verlust von p53 führt also zu einer unkontrollierten Proliferation, bei der in Folge der genomischen Instabilität Mutationen akkumulieren können, die entscheidend zu einer malignen Progression beitragen.

Indirekt wirkt E6 auch über p21 und pRB proliferationsfördernd. Doch die Hauptfunktion von E6 besteht wahrscheinlich darin, die Apoptose der Wirtszelle zu verhindern, nachdem

hauptsächlich durch E7 eine Zellzyklus-Deregulierung ausgelöst wurde. Durch die Bindung und Destabilisierung von Bak wirkt E6 ebenfalls antiapoptotisch (Thomas und Banks, 1998; Jackson *et al.*, 2000). Zusätzlich aktiviert E6 die zelluläre Telomerase (Klingelhutz *et al.*, 1996), wodurch das Auftreten von Seneszenz verzögert oder verhindert werden könnte. Ebenfalls proliferationsfördernd könnte sich die Bindung und Destabilisierung von PDZ-Proteinen (Fehrmann und Laimins, 2003) und die Stabilisierung von Mitgliedern der Src-Kinasen (Oda *et al.*, 1999) auswirken. Außerdem wurden transaktivierende Funktionen (Desaintes *et al.*, 1992) und weitere Interaktionen mit zellulären Proteinen (Übersicht in zur Hausen, 2000) beschrieben, deren Bedeutung für die Transformation noch nicht genau geklärt ist.



Abb. 1.3 Die Rolle von p53 bei der Überwachung der Integrität der Zelle und die Konsequenzen der E6vermittelten p53-Degradation.

Der primäre Transformationsmechanismus von E7 beruht auf der Bindung und Destabilisierung von pRB, p107 und p130, den Mitgliedern der Retinoblastoma-Protein-Familie (Dyson *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 1993; Boyer *et al.*, 1996; Jones und Münger, 1997). Diese Proteine agieren über direkte Interaktionen mit diversen Transkriptionsfaktoren, insbesondere mit Heterodimeren aus den Mitgliedern der E2F-Familie (E2F 1-5) und der DP-Familie (Übersicht in La Thangue, 1994), deren transaktivierende Funktion dadurch blockiert wird (Weintraub *et al.*, 1995). Beim Übergang vom G<sub>1</sub>-Stadium zur S-Phase phosphorylieren Cyclin-abhängige Kinasen pRB, wodurch E2F/DP aus dem inaktiven pRB/E2F/DP-Komplex entlassen wird und die Transkription von essenziellen Genen für das Fortschreiten der S-Phase und die DNA-Replikation einleitet. Durch die Bindung der RB-Proteine an E7 wird E2F/DP ebenfalls freigesetzt und löst mittels der Aktivierung von Zellzyklus-Genen den Eintritt in die S-Phase aus (Übersicht in Tommasino und Crawford, 1995).

Ein Nebeneffekt dieser Zellzyklus-Deregulierung ist wahrscheinlich die Apoptoseinduktion durch E7. Dieser Effekt wurde *in vitro* (White *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1997a) und *in vivo* bei



der Entwicklung der murinen Augenlinse beobachtet (Pan und Griep, 1994; 1995), wobei E7 über p53-abhängige und -unabhängige Signalwege zur Apoptose führte.

Abb. 1.4 HPV16 E7 bindet und destabilisiert pRB, wodurch E2F die Expression von Genen, die zum Eintritt in die S-Phase führen, aktiviert.

Weitere Mechanismen, anhand derer E7 Zellzyklusbarrieren überwinden kann, sind z.B. die Induktion von Cyclin A und E (Arroyo *et al.*, 1993; Zerfass *et al.*, 1995) und die Inaktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 (Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997b) und p27 (Zerfass-Thome *et al.*, 1996). Aber auch direkte Wechselwirkungen zwischen E7 und Cyclin A/CDK- und Cyclin E/CDK-Komplexen wurden nachgewiesen (Tommasino *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1996). Außerdem interagiert E7 mit Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie und transaktiviert die Expression AP-1-regulierter Gene (Antinore *et al.*, 1996). Auch kann E7 das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und den TBP-assoziierten Faktor TAF 110 binden (Massimi *et al.*, 1996; Mazzarelli *et al.*, 1995), wobei noch unklar ist, welchen Einfluss E7 dadurch auf die Aktivität dieser basalen Transkriptionsfaktoren ausübt. Weiterhin konnte die Aktivierung des *c-fos*-Promotors durch E7 gezeigt werden (Morosov *et al.*, 1994). Indem es eine Amplifikation der Zentriolen auslöst, fördert E7 außerdem die Entstehung von Aneuploidien (Duensing *et al.*, 2001).

Tab. 1.3 Mechanismen	von E6 und	E7 der "hig	h risk"-HPV-Type	n bei der zellulärer	Transfomation	(verändert
nach zur Hausen, 2000).						

	Funktion	Referenz
E6	Immortalisierung der Zelle	Band et al., 1990
	Bindung von E6-AP und p53,	Werness et al., 1990; Scheffner et al., 1993
	dadurch Destabilisierung von p53	
	Antiapoptotischer Effekt	Werness et al., 1990; Thomas und Banks, 1998
	Chromosomale Destabilisierung	White <i>et al.</i> , 1994
	Förderung der Integration von Fremd-DNA und	Kessis et al., 1996; Havre et al., 1995
	Mutagenese	
	Telomerase-Aktivierung	Klingelhutz et al., 1996
	Blockade von Interferon-Funktionen (?)	Ronco et al., 1998
E7	Immortalisierung der Zelle	Münger und Phelps, 1993
	Inaktivierung von pRB, p107 und p130	Arroyo et al., 1993, Zerfass et al., 1995
	Aktivierung der Cycline E und A	Dyson et al., 1989; Dyson et al., 1992
	Apoptoseinduktion	Puthenveetil et al., 1996
	Inhibition Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitoren	Jones et al., 1997b; Funk et al., 1997
	Förderung der Integration von Fremd-DNA	Kessis et al., 1996; Reznikoff et al., 1996
	und Mutagenese	
	Degradierung der Tyrosinkinase Blk (?)	Oda et al., 1999

#### Die späten Gene L1 und L2

Wie bereits erwähnt, assemblieren die Strukturproteine zu einem ikosaedrischen Viruskapsid. Dabei stellt das hoch konservierte Hauptkapsidprotein L1 den Großteil des Kapsids und kann auch ohne die Anwesenheit von L2 virusähnliche Partikel (VLPs) bilden. Das Nebenkapsidprotein L2 wirkt jedoch stabilisierend und erhöht die Effizienz der Zusammenlagerung (Kirnbauer et al., 1993). Weiterhin scheint L2 an der Verpackung des viralen Genoms beteiligt zu sein (Zhou et al., 1994). Wahrscheinlich vermittelt L2 durch die Kolokalisation von L1 und E2-Genomkomplexen in distinkten nukleären Domänen, den **PODs** (promonocytic leukemia protein (PML) oncogenic domains), die Viruszusammenlagerung, vielleicht indem es so zu einer lokalen Konzentration oder einer bestimmten sterischen Anordnung der Virionbestandteile führt (Dav *et al.*, 1998).

#### 1.3 Replikationszyklus

Der virale Lebenszyklus ist auf die verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten im Epithel angewiesen (Laimins, 1993). Die basalen Keratinozyten sind die einzigen Zellen des Epithels, die teilungsaktiv sind. Ein Teil der Tochterzellen stellt die Zellteilung ein und beginnt eine progressive Differenzierung, während der die äußeren Epithelschichten (*Stratum spinosum*, *Stratum granulosum*, *Stratum corneum*) vertikal durchlaufen werden. Dabei lagern die Zellen zunehmend Keratin ein, sterben in der Hornschicht ab und werden in Form von Hautschüppchen abgeschilfert. Bei einer Verletzung des Epithels können Papillomaviren die proliferierenden Keratinozyten der Basalschicht erreichen, deren aktivierter Replikationsapparat zur Infektion benötigt wird.



Abb. 1.5 Der Lebenszyklus von Papillomaviren. Verändert nach zur Hausen, 2002.

In der ersten Infektionsphase regulieren ausschließlich zelluläre Transkriptionsfaktoren die frühe virale Genexpression, in späteren Phasen sind virusspezifische Proteine bei der Transkriptionskontrolle früher und später Genprodukte beteiligt. Bei suprabasalen Keratinozyten greift die Expression der frühen Proteine E6 und E7 in den Differenzierungsprozess ein, und die Zellen fahren mit der Proliferation fort. Während bei der Etablierung der Infektion im *Stratum basale* ca. zehn Virusgenome pro Zelle vorliegen, wechselt in der produktiven Phase in den suprabasalen Schichten die Replikation von einem bidirektionalem Mechanismus über Theta-Strukturen zu einem *Rolling circle*-Mechanismus und die Kopienzahl steigt auf 50-100 Genome/Zelle (Flores und Lambert, 1997).

Die vegetative Produktion von Virionen ist von einem fortgeschrittenem Differenzierungszustand abhängig und deshalb auf die äußeren Zellschichten beschränkt: im *Stratum spinosum* findet die virale DNA-Replikation sowie die Induktion später viraler Promotoren statt, und im *Stratum granulosum* läuft die Kapsidsynthese ab. Die Freisetzung infektiöser Viren erfolgt mit dem Abschilfern abgestorbener Zellen (siehe Abb. 1.5).

#### 1.4 Virusähnliche Partikel und Pseudovirionen

Leere Papillomaviruskapside bezeichnet man als virusähnliche Partikel (VLPs). Pseudovirionen sind Partikel, die sich aus einem Kapsid und einem assoziierten Plasmid mit Reportergen zusammensetzen. Konfrontiert man sie mit Zielzellen, kann man frühe Infektionsereignisse wie die Adsorption und Internalisierung der Partikel sowie die Freisetzung der DNA und ihren Transport in den Kern simulieren, denn anhand der Reportergenexpression kann eine erfolgreiche Pseudoinfektion von Zielzellen detektiert werden.



Abb. 1.6 Simulation einer Papillomavirusinfektion durch Pseudovirionen, anhand der Reportergenexpression detektierbar.

Da es bislang kein effizientes *in vitro*-Replikationssystem für Papillomaviren gibt, sind viele molekulare Aspekte der Infektion noch unklar. Zur näheren Untersuchung früher Infektionsereignisse bieten sich deshalb Pseudovirionen als praktikable Alternative zu authentischen Papillomavirionen an.

# Ein Beispiel für den Einsatz von VLPs und Pseudovirionen: Die Suche nach dem Papillomavirus-Rezeptor

Der Papillomavirus-Rezeptor ist noch nicht eindeutig identifiziert. Da Papillomavirus-Partikel an Zellen verschiedener Ursprungsgewebe und Spezies binden können, scheint der Rezeptor ein ubiquitäres Oberflächenmolekül zu sein. Dabei können auch Partikel, die nur aus L1 bestehen, effizient adsorbieren (Roden et al., 1994a; Volpers et al., 1995; Müller et al., 1995). Evander et al. schlugen α6β4-Integrin als Rezeptorkandidat für HPV6 vor (1997), wobei dies für BPV4 (Sibbet et al., 2000), HPV11 (Joyce et al., 1999) HPV16 sowie HPV33 (Giroglou et al., 2001a) nicht bestätigt werden konnte und für andere HPV-Typen unklar bleibt. Heparansulfate und Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane binden Virionen (Joyce et al., 1999) und vermitteln die Pseudoinfektion (Giroglou et al., 2001a). Bei einer natürlichen Infektion könnte eine weitere, spezifischere Wechselwirkung mit einem Sekundärrezeptor folgen, denn die Pseudoinfektion ist nur für die ersten 4 h durch Heparin zu blockieren, was auf einen Rezeptortransfer hindeuten könnte (Giroglou et al., 2001a). Verschiedene Viren nutzen Heparansulfat als Primärrezeptor in Verbindung mit spezifischen Folgerezeptoren, z.B. Herpesviren (Shieh et al., 1992), Humane Cytomegaloviren (Compton et al., 1993), HIV (Mondor et al., 1998) und Vacciniaviren (Chung et al., 1998). Solch ein Mechanismus deutet auf eine geringe Affinität oder Anzahl des Sekundärrezeptors oder eine geringe Anzahl von Rezeptorbindestellen auf der Virusoberfläche hin. Möglicherweise handelt es sich um eine Interaktion mit L2, das eine wesentliche Rolle für die Infektiosität von Pseudovirionen in vielen Systemen spielt (Kawana et al., 1998a; Kawana et al., 1999; Unckell et al., 1997), und für das es spezifische Rezeptoren zu geben scheint (Kawana et al., 2001). Weiterhin konnte der FcyRIII (CD16)-Rezeptor auf einer Reihe von Immunzellen als akzessorischer Rezeptor für HPV16-VLPs identifiziert werden, der wichtig für die antivirale Immunantwort sein könnte (Da Silva et al., 2001).

#### 1.4.1 Die Konstruktion von virusähnlichen Partikeln und Pseudovirionen

Mit Ausnahme einiger weniger Typen wie z.B. HPV1 können Papillomavirus-Virionen nicht aus infiziertem Gewebe isoliert werden. Da auch die Kultivierung von Papillomaviren in xenotransplantierten Tiermodellen (Kreider *et al.*, 1987; Sterling *et al.*, 1990) und organotypischen Epithel-Kulturen (Meyers *et al.*, 1992) nur sehr aufwändig und mit geringer Virusproduktion durchzuführen ist, wurden eine Reihe von Strategien zur Herstellung von Viruspartikeln entwickelt.

#### Die Herstellung von virusähnlichen Partikeln (VLPs)

Durch die rekombinante Expression der Kapsidproteine in *E. coli* können große Mengen an korrekt gefalteten Kapsomeren isoliert werden, aus denen sich unter passenden *in vitro*-Bedingungen Partikel bilden können (Chen *et al.*, 2001). In anderen heterologen Expressionsystemen lagern sich die Strukturproteine L1 und L2 spontan zu VLPs zusammen: *in vitro* (Iyengar *et al.*, 1996), in Hefe (Hofmann *et al.*, 1995; Jansen *et al.*, 1995; Sasagawa *et al.*, 1995), in Insektenzellen (Hagensee *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1993) und in Säugerzellen (Zhou *et al.*, 1991; Ghim *et al.*, 1992). VLPs sind wegen eines fehlenden Genoms nicht infektiös, zeigen aber zu nativen Virionen weitgehend identische morphologische und immunogene Eigenschaften (Ghim *et al.*, 1992; Kirnbauer *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1993). Neben ihrer Bedeutung bei der Entwicklung prophylaktischer Vakzine (Breitburd, *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1994) und für diagnostische Assays (Kirnbauer, 1994; Rose *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1993) wurden sie auch in Bindungsstudien (Roden *et al.*, 1994; Sapp *et al.*, 1995) eingesetzt.

#### Die Herstellung von Pseudovirionen

Zur Produktion von Pseudovirionen wird nachträglich ein Reportergenkonstrukt chemisch an VLPs gekoppelt (Müller et al., 1995; Yeager et al., 2000) oder durch die Anwesenheit eines Pseudogenoms während der Kapsidsynthese in der Zelle eine Verpackung der DNA in die Partikel angestrebt. Roden et al. (1996a) schleusten mit Hilfe rekombinanter Semliki Forest-Viren Kapsidgene von BPV1 und HPV16 in BPHE-1-Zellen, in denen autonom replizierende Kopien des BPV1-Genoms vorliegen. Nach Inkubation von Fibroblasten mit Pseudovirionhaltigen Zellextrakten konnte anhand der Induktion transformierter Foci nach drei Wochen eine Pseudoinfektion detektiert werden. Rekombinante Vacciniaviren erwiesen sich ebenfalls als geeignete Vektoren zur Expression der Kapsidgene in Säugerzellen, wobei das Reporterplasmid nach Transfektion mit Hilfe der SV 40 ori-Replikation in episomalen Kopien vorliegt (Unckell et al., 1997; Zhao et al., 1998; Stauffer et al., 1998). Dabei wirkt sich die lytische Infektion mit dem Vaccinia-Vektor, bei der neben dem Plasmid auch degradierte nukleäre DNA enkapsidiert wird, nachteilig auf die Verpackungseffizienz aus: Nur ein Bruchteil der Partikel enthält das Reporterplasmid, und dies resultiert in einer geringen Infektiosität. Eine wesentliche Steigerung der Pseudovirionentiter gelang Buck et al. (2004) mit einem System, bei dem kodonoptimierte Kapsidgene in 293TT-Zellen transfiziert werden.

Rossi *et al.* (2000) entwickelten ein vielversprechendes Produktionssystem in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, das eine Erweiterung der Produktion in industriellem Maßstab ermöglichen sollte. Bei dieser Strategie enthalten die Hefezellen zwei Plasmide, ein Verpackungsplasmid und ein Zielplasmid oder Pseudogenom, die beide durch das 2µm-System episomal repliziert werden. Das Verpackungsplasmid kodiert für die HPV16-Kapsidproteine L1 und L2, deren Expression durch einen bidirektionalen *gal1/10*-Promotor induzierbar ist. Neben dem Reportergen GFP enthält das Zielplasmid die HPV16-URR und den offenen Leserahmen von HPV16-E2, wobei die diese beiden Elemente aufgrund ihrer

potenziellen Funktion bei der Verpackung des Genoms miteinbezogen wurden (Day et al., 1998).

System	VLPs/Vektor für Kapsidproteine	Papillomavirus- Typ der Kapsidproteine	Reportergen/ Detektionssystem	Referenz
<i>in vitro-</i> Kopplung	VLPs aus dem Baculovirus-System	HPV6, HPV11, HPV16	β-Galaktosidase	Müller et al., 1995
<i>in vitro-</i> Kopplung	VLPs aus Hefe	HPV6, HPV11, HPV16, HPV18	β-Laktamase	Yeager et al., 2000
BPHE-1	Semliki Forest-Virus	BPV1, HPV16	BPV1-Genom: Fokus- Formationsassay	Roden <i>et al.</i> , 1996a
COS7	Vacciniavirus	HPV33	β-Galaktosidase	Unckell et al., 1997
COS1	Vacciniavirus	BPV1	E. coli ori-Replikation	Zhao et al., 1998
293T	Vacciniavirus	HPV18	β-Galaktosidase, Puromycin	Stauffer et al., 1998
Sf-9	Baculovirus	BPV1	β-Galaktosidase	Zhao et al., 2000
293TT	DNA-Transfektion Lipofectamine Plus- (Invitrogen)	HPV16, BPV1, kodonoptimiert	GFP	Buck et al., 2004
Hefe	2µm-basiertes episomales Plasmid	HPV16	GFP	Rossi et al., 2000
In vitro	VLPs aus dem	HPV16	β-Galaktosidase	Kawana et al., 1998a
In vitro	Baculovirus-System	HPV16, kein L2		Touzé und Coursaget, 1998

Tab. 1.4 Systeme zur Herstellung von Pseudovirionen.

Nachdem optimale Bedingungen zu einer quantitativen in vitro-Disassembly/Reassembly von VLPs beschrieben wurden (McCarthy et al., 1998), ist eine weitere Strategie die in vitro-Konstruktion von Pseudovirionen in Anwesenheit von DNA (Kawana et al., 1998a). Im Baculovirus-Expressionssystem hergestellte, mittels CsCl-Gleichgewichtszentrifugation aufgereinigte Partikel werden hierbei während einer Inkubation mit β-Mercaptoethanol durch die Reduktion der Disulfidbrücken in Kapsomere dissoziiert (Disassembly). Nach Zugabe des Reporterplasmids wird das β-Mercaptoethanol durch Dialysieren entfernt, wodurch sich die Kapsomere erneut zu Partikeln zusammenlagern (Reassembly), die mit dem Plasmid assoziiert sind. Im Gegensatz zu Touzé und Coursaget (1998), die die Disassembly unter anderen Bedingungen, mit DTT statt mit β-Mercaptoethanol, durchführten, beobachteten Kawana et al. (1998a) einen Einfluss von L2 auf die Infektiosität der Pseudovirionen. Auch durch einen osmotischen Schock und sogar durch eine bloße Koinkubation ("direkte Interaktion") von L1-Partikeln mit Plasmid wurden infektiöse HPV-Pseudovirionen hergestellt, wobei die Ausbeute bei der Verwendung linearisierten Plasmids höher ausfiel (Boursaghin et al., 2002). In vitro-Systeme erlauben, mit bereits aufgereinigten, konzentrierten Partikelpräparationen und Plasmiden zu arbeiten. Aufwändige und verlustreiche Isolations- und Aufreinigungsschritte

entfallen. Allerdings folgt die Enkapsidierung des Reporterplasmids in Säuger- oder Hefezellen vermutlich anderen Mechanismen als *in vitro*. Allein das Vorliegen des Plasmids in Form von Chromatin und die Kernlokalisation sind Kriterien bei der natürlichen Virionsynthese, die in *Disassembly/Reassembly*-Systemen wegfallen. Generell ist bei Pseudovirionen aus verschiedenen Systemen zweifelhaft, ob es sich bei der Assoziation der DNA mit dem Partikel um eine zu natürlichen Virionen äquivalente Verpackung handelt, auch wenn das Plasmid vor DNasen geschützt ist.

In allen zellulären Systemen spielt L2 zumindest für die Infektiosität eine wesentliche Rolle, zur Effizienz der DNA-Verpackung fielen die Befunde unterschiedlich aus. Wie bereits in 1.2.2 beschrieben, könnte das frühe Protein E2 *in vivo* zur Spezifität der Genomverpackung beitragen (Day *et al.*, 1998). Für bestimmte heterologe Systeme scheint dies ebenso zuzutreffen (Zhao *et al.*, 2000), obwohl bei der Mehrzahl kein Einfluss von E2 festgestellt werden konnte.

#### 1.4.2 Pseudovirionen sind VLPs als Papillomavirus-Modell überlegen

#### Anwendungsbereiche

Mit Hilfe von Pseudovirionen aus verschiedenen Systemen wurde bereits eine Reihe von Infektionsmechanismen näher untersucht. So wurde Heparansulfat als notwendig für eine Pseudoinfektion identifiziert (Giroglou *et al.*, 2001a), der zytoplasmatische Transport der Virionen näher analysiert (Selinka *et al.*, 2002; Boursaghin *et al.*, 2003) und die Bedeutung von L2 anhand von Mutationsanalysen untersucht (Kawana *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003).

Außerdem werden Pseudovirionen verschiedener HPV-Typen in Neutralisationsassays eingesetzt, um Patientenseren auf spezifische Antikörper zu testen (Yeager *et al.*, 2000; Giroglou *et al.*, 2001b; Pastrana *et al.*, 2001; Boursaghin *et al.*, 2002). Neben der Begleitung von klinischen und epidemiologischen Studien lassen sich mit solchen Assays auch Antikörper näher charakterisieren.

Denkbar ist auch die Anwendung von Pseudovirionen als Genvektoren, beispielsweise für Vakzinierungen. Nach oraler Administration von Papillomavirus-Pseudovirionen an Mäusen wurde eine Reportergenexpression in Zellen der Peyerschen Plaques, der *Lamina propria*, des Rektums und der Milz detektiert, und es konnte eine systemische sowie eine protektive mucosale T-Zellantwort induziert werden (Shi *et al.*, 2001). Nach subkutaner Injektion wurde das Reportergen in Lymphknoten und Milz exprimiert und eine im Vergleich zur DNA-Immunisierung stärkere T-Zell-Antwort erzielt. Da intranasale Vakzinierungen mit VLPs bereits erfolgreich durchgeführt wurden (Balmelli *et al.*, 1998), könnten mit dieser Strategie durch Pseudovirionen neue Antigene eingesetzt werden. Nachdem ein an VLPs gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff partikelvermittelt in Ziellzellen geschleust werden konnte, schlagen die Autoren vor, modifizierte VLPs nicht nur als Vektoren für DNA, sondern auch als Vehikel, um niedermolekulare Substanzen *in vitro* und *in vivo* effizient in Zielzellen einzuführen, in Betracht zu ziehen (Bergsdorf *et al.*, 2003).

#### Pseudovirionen versus VLPs

Im Vergleich zu VLPs weisen Pseudovirionen einen höheren Anteil an interkapsomerischen Disulfidbrücken und damit eine höhere Trypsinresistenz auf (Fligge *et al.*, 2001). Auch die Bindung an unterschiedlich sulfatierte Glykosaminoglykane und die Kinetik der Aufnahme in die Zelle ist verschieden (Selinka *et al.*, 2003). Die Internalisierung von Pseudovirionen ist mit einer Halbwertszeit von 7,5 h wesentlich langsamer als bei VLPs (3 h Halbwertszeit), vielleicht aufgrund eines Transfers auf einen Sekundärrezeptor, verbunden mit einer Konformationsänderung (Selinka *et al.*, 2003). Diese Befunde suggerieren unterschiedliche Mechanismen der Partikelaufnahme, wobei Pseudovirionen in ihren Eigenschaften sicherlich eher nativen Virionen entsprechen.

#### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Intention dieser Arbeit war, HPV16-Pseudovirionen herzustellen, um ein Reportergen partikelvermittelt in Zielzellen einzuschleusen. Die Produktion sollte zunächst in einem *in vivo*-System versucht werden, da hier - eher als in einem *in vitro*-System - Pseudovirionen entstehen sollten, die in ihrer Struktur authentischen Virionen entsprechen (siehe auch 1.4.1). Die Pseudovirionen sollten hinsichtlich ihrer Struktur näher charakterisiert werden. Anhand von Pseudoinfektionsexperimenten wurden dann einige Fragestellungen bearbeitet.

#### 1.5.1 HPV16-Pseudovirionen-Produktion in der Hefe Saccharomyces cerevisiae

Obwohl bei dem Hefe-Produktionssystem von Rossi *et al.* (2000) zunächst hohe Titer an infektiösen Pseudovirionen gewonnen werden konnten (siehe auch Tab. 1.5), stellten sich langfristig erhebliche Schwankungen bei der Ausbeute und Infektiosität der Partikel ein. Deshalb sollte das System so weiterentwickelt werden, dass eine reproduzierbare Herstellung von Pseudovirionen erreicht wird. Hierfür sollten neue Hefeklone mit EGFP als Reportergen generiert und charakterisiert werden. Außerdem sollten die Kultivierungs- und Infektionsprotokolle optimiert werden.

System	Effizienz: Partikel/Infektiosität	Nachteil	Referenzen
Semliki Forest-Virus in BPHE-1	10 <sup>4</sup>	Langwierige, ungenaue Titer- bestimmung: Fokus-Formation	Roden et al., 1996a
Vacciniavirus in Säugerzellen	10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup>	Lytisches System: kompetitive Verpackung zellulärer DNA- Fragmente	Unckell <i>et al.</i> , 1997; Zhao <i>et al.</i> , 1998; Stauffer <i>et al.</i> , 1998
Baculovirus in Sf-9	$3 * 10^3$	Lytisches System: kompetitive Verpackung zellulärer DNA- Fragmente	Zhao et al., 2000
2µm-basierte episomale Plasmide in Hefe	10 <sup>2</sup>	Erhebliche Schwankungen bei Ausbeute und Infektiosität: Standardisierung notwendig	Rossi et al., 2000

Tab. 1.5 Effzienz der zu Beginn dieser Arbeit bestehenden in vivo-Pseudovirionen-Produktionssysteme.

Als auch nach Versuchen, durch zusätzliche Reinigungsschritte sauberere Pseudovirionpräparationen aus dem Rohextrakt zu isolieren, keinerlei Infektiosität detektiert werden konnte, sollte eine Fehleranalyse durchgeführt werden, um mögliche Ursachen für das Scheitern des Systems zu bestimmen.

#### 1.5.2 In vitro-Pseudovirionen-Produktion durch Disassembly/Reassembly

Um dennoch Pseudoinfektionsexperimente durchführen zu können, sollten mittels der *in vitro Disassembly/Reassembly*-Methode nach Kawana *et al.* (1998a) aus in Insektenzellen produzierten HPV16 L1/L2 VLPs und einem EGFP-Reporterplasmid infektiöse Pseudovirionen konstruiert werden. Nach der Charakterisierung des *Reassembly*-Materials sollten Pseudoinfektionsexperimente durchgeführt werden. Dabei sollten folgende Fragen untersucht werden:

- Wie gestaltet sich die Struktur der Partikel nach *Reassembly*? Weisen sie im Vergleich zu VLPs veränderte physikalische Eigenschaften auf?
- Ist der Transfer des Reportergens nach der Konfrontation von Zielzellen mit den Pseudovirionen partikelabhängig?
- Liegt eine lineare oder logarithmische Korrelation zwischen der eingesetzten Pseudovirionendosis und der Effizienz des Gentransfers vor?
- Wie ist das Reporterplasmid mit den Partikeln assoziiert? Ist es vollständig oder teilweise verpackt, oder ist es nur äußerlich assoziiert?
- Können Zelllinien verschiedener Spezies und verschiedenen Ursprungsgewebes mit Pseudovirionen aus diesem System erfolgreich pseudoinfiziert werden?
- Wie verhalten sich HPV16 L1-Pseudovirionen? Gibt es Unterschiede in der Infektiosität im Vergleich zu L1/L2-Pseudovirionen?
- Führt eine bloße Koinkubation von VLPs mit Reporterplasmid zur Bildung infektiöser Pseudovirionen?
- Welchen Einfluss hat die Konformation des Reporterplasmids auf die Effizienz des Gentransfers, die physikalischen Eigenschaften der resultierenden Pseudovirionen sowie die Art der Assoziation der DNA mit den Partikeln?

# 2 Material

## 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Salze

Ammoniumperoxodisulfat (APS,  $(NH_4)_2S_2O_8$ ) Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) 4`,6`-Diamino-2-phenyl-indoldihydrochlorid (DAPI) Cäsiumchlorid (CsCl) Kaliumchlorid (KCl) Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>) Natriumacetat (NaCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) Natriumchlorid (NaCl) Natriumcitrat (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>) Di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Natriumdihydrogenphosphat(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) Lithiumacetat (LiAc) Kaliumacetat (Kac) Kaliumhexacyanoferrat (II) (K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) Kaliumhexacyanoferrat (III) (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) Propidiumiodid

#### 2.1.2 Säuren und Basen

Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Fluka Chemie, Buchs, Schweiz Fluka Chemie, Buchs, Schweiz Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Roth, Karlsruhe Riedel-deHaën, Seelze Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma, Deisenhofen
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
37 % Salzsäure (HCl)	J. T. Baker, Deventer,
	Niederlande
Borsäure	J. T. Baker, Deventer,
	Niederlande
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylester)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> -2-ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Para-Hydroxy-Cumarsäure (trans)	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen

Trizma<sup>®</sup> Base Tris(hydroxylmethyl)-aminomethan (Tris)

Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.3 Organische Lösungsmittel und Reagenzien

β-Mercaptoethanol Aceton Acrylamidlösung rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1) Agarose Molecular Biology Grade Aminosäuren und Nukleotide Ampicillin bovines Serumalbumin (BSA) Bromphenolblau **Coomassie Brillant Blue** D-(+)-Galaktose D-(+)-Glucose Dextranblau Dimethylsulfoxid (DMSO) dNTPs **D-Sorbitol** Ethanol Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) Formaldehyd Formamid Glutaraldehyd Glycerin Glycin Heparin Isoamylalkohol Isopropanol Kanamycin Magermilchpulver Methanol Mowiol N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) Natriumdodecylsulfat (SDS) Natriumluminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4phthalazindion) Nonidet<sup>®</sup> P 40 (Ethylphenylpolyethylenglycol) Paraformaldehyd Polyethylenglycol (PEG) 3350

Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Roth, Karlsruhe

Eurogentech, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Serva, Heidelberg Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Boehringer, Mannheim Sigma, Deisenhofen Riedel-deHaën, Seelze Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt J. T. Baker, Deventer, Niederlande Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt Riedel-deHaën, Seelze Sigma, Deisenhofen Fluka Chemie, Buchs, Schweiz Riedel-deHaën, Seelze Calbiochem, La Jolla, CA, USA Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen

# Serva, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt Gerbu Biotechnik, Gaiberg Merck, Darmstadt Gerbu Biotechnik, Gaiberg Merck, Darmstadt Sigma, Deisenhofen

## 2.2 Lösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer mit H<sub>2</sub>O bidest angesetzt.

## Lösung I 50 mM Glucose 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 Lösung II 0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS 3 M Natriumacetat, pH 5,3 Lösung III 20 % (v/v) Essigsäure **RNase A-Lösung** 2 mg/ml RNase A 2.2.2 Elektrophorese 2.2.2.1 DNA-Agarosegele 1 % Agarosegel 1 % (w/v) Agarose in Elektrophorese-Puffer 1 μg/ml Ethidiumbromid-Lösung 0,8 % Agarosegel 0,8 % (w/v) Agarose in Elektrophorese-Puffer 1 μg/ml Ethidiumbromid-Lösung 6 x DNA-Ladepuffer 50 % (w/v) Sucrose 0,15 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) SDS

#### 2.2.1 Minipräparation von Plasmiden

Elektrophorese-Puffer für Agarosegele: Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

0,04 M Tris/HCl, pH 7,5 5 mM Naacetat 1 mM EDTA, pH 8,0

# 2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgele zur Proteinauftrennung

Laufpuffer für Proteingele	25 mM Tris/HCl, pH 8,0 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
2 x Proteingel-Ladepuffer	2 mM EDTA, pH 8,0 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % (w/v) APS
Tris/HCl-Puffer, pH 6,8	1 M Tris/HCl, pH 6,8
Tris/HCl-Puffer, pH 8,8	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
15 ml Trenngel, 12 %	6 ml Acrylamidlösung (30 %) 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 4,9 ml H <sub>2</sub> O 150 μl 10 % SDS 150 μl 10 % APS 6 μl TEMED
15 ml Trenngel, 8 %	4,0 ml Acrylamidlösung (30 %) 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 6,9 ml H <sub>2</sub> O 150 μl 10 % SDS 150 μl 10 % APS 9 μl TEMED
4 ml Sammelgel, 5 %	0,67 ml Acrylamidlösung (30 %) 0,5 ml 1,0 M Tris/HCl, pH 6,8 2,7 ml H <sub>2</sub> O 40 μl 10 % SDS 40 μl 10 % APS 4 μl TEMED

# 2.2.3 Coomassiefärbung von Proteingelen

Coomassie Blau-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Blau 45 % (v/v) Methanol
	45 % (v/v) H <sub>2</sub> O 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie Blau-Entfärbelösung	45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

# 2.2.4 Western-Blot und Detektion durch ECL (enhanced chemoluminescence)

1 x Transferpuffer (EMBL-Puffer)	40 mM Tris/HCl, pH 8,0 39 mM Glycin 1,3 mM SDS
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver 0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS
Waschlösung	0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS
Enhancer-Lösung	11 mg p-Cumarinsäure in 10 ml DMSO
Luminol-Lösung	1,25 mM Natriumluminol 2,7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,1 M Tris/HCl, pH 8,6
Detektionslösung	80 % (v/v) Luminol-Lösung 0,2 % (v/v) Enhancer-Lösung
2.2.5 DNA-Protein-Bindungsnachweis	
DNA-Protein-Transferpuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 50 mM NaCl
DNA-Protein-Blockierungspuffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 40 mM NaCl 8 % (v/v) Glycerin 1 mM EDTA 5 % (w/v) Magermilchpulver 1 % (v/v) tRNA-Lösung

#### DNA-Protein-Bindungspuffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5 40 mM NaCl 8 % (v/v) Glycerin 1 mM EDTA 0,125 % (w/v) Magermilchpulver 1 % (v/v) tRNA-Lösung

#### 2.2.6 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ABTS-Lösung	20 mg/ml ABTS in H <sub>2</sub> O
Färbelösung	9,5 ml ELISA-Puffer 0,5 ml ABTS-Lösung 4 μl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
ELISA-Puffer	100 mM NaAc 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit Essigsäure auf pH 4,2 einstellen

#### 2.2.7 Radioaktive Markierung einer Sonde

5 x Oligo-Markierungspuffer ( <i>Oligo-primed Labelling Buffer</i> OLB)	250 mM Tris/HCl, pH 8,0 25 mM MgCl <sub>2</sub> dNTPs, je Spezies 2 mM 5 mM β-Mercaptoethanol 1 M HEPES, pH 6,6 27 U Hexanukleotidprimer
2 x TNE-Farbpuffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 20 mM EDTA, pH 8,0 100 mM NaCl 0,5 % (w/v) Dextranblau 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Säulen-Laufpuffer	0,1 % (w/v) SDS in 1 x TE-Puffer

#### 2.2.8 Southern-Blot und Hybridisierung der Membran

1 M NAPP (Natriumphosphat-Puffer)	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Lösung und 1 M
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Lösung werden gemischt, bis
	sich ein pH-Wert von 6,6 ergibt.

Denhardts Reagenz	1 % (w/v) Ficoll 400 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) BSA
tRNA-Lösung	1 % (w/v) tRNA
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer	20 x SSC 0,5 M Tris/HCl, pH 7,0
Hybridisierungslösung	50 % (v/v) Formamid 0,1 % (w/v) tRNA 5 x SSC 0,1 % Denhardts Reagenz 20 mM NAPP 1 % (w/v) SDS
Waschlösung	2 x SSC 0,1 % (w/v) SDS
2.2.9 Lösungen zu Arbeiten mit Hefen	
1 M Lithiumacetatlösung (Transformation)	1 M LiAc
100 mM Lithiumacetatlösung (Transformation)	100 mM LiAc
Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)	5 % BSA in PBS
Hefe-Lysepuffer (Proteinextraktion)	1 % SDS 0,5 mM EDTA in PBS
HEPES-Puffer (Rohextraktgewinnung)	20 mM HEPES pH 7,0
Kaliumacetatlösung (DNA-Extraktion)	5 M KAc
Lyticaselösung (DNA-Extraktion)	5 mg/ml

PMSF-Lösung (Rohextraktgewinnung) 100 mM PMSF

Polyethylenglycol (PEG)-Lösung (Transformation) 50 % PEG

Sphäroblastenpuffer (Immunfluoreszenz)	1,2 M Sorbitol 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ssDNA-Lösung (Transformation)	2 mg/ml ssDNA (aus Heringssperma)
TCES (DNA-Extraktion)	200 mM Tris/HCl pH 9,5 80 mM EDTA 1 % SDS
TEM (DNA-Extraktion)	50 mM Tris/HCl pH 7,5 25 mM EDTA 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

#### 2.2.10 Lösungen zur Herstellung von virusähnlichen Partikeln

Extraktionspuffer	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 mM CaCl <sub>2</sub>
	150 mM NaCl
	0,01 % Triton X-100
	20 mM HEPES, pH 7,4
	1 mM PMSF
CsCl-Lösung (57,5 % (w/v))	4,7 g CsCl
	ad 8 ml Extraktionspuffer ohne Triton

#### 2.2.11 Lösungen zur Herstellung von Pseudovirionen in vitro

Reassembly-Puffer	500 mM NaCl	
	2 mM CaCl <sub>2</sub>	in PBS

#### 2.2.12 Lösungen zu Zentrifugationen

CsCl-Lösung (41,95 % (w/v))	4,195 g CsCl	
	ad 10 ml PBS	
50 % Sucroselösung	50 % (w/v) Sucrose in PBS	
10 % Sucroselösung	10 % (w/v) Sucrose in PBS	
30 % Sucroselösung	30 % (w/v) Sucrose	

#### 2.2.13 Lösungen zur Analyse pseudoinfizierter Zellen

FACS-Puffer	3 % FCS	
	0,02 % NaN <sub>3</sub>	
	in PBS, pH 7,5	
X-Gal-Färbelösung	1 mg/ml X-Gal 4 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 4 mMK <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 2 mM MgCl <sub>2</sub>	in PBS
--	--	------------
Fixierlösung	5,4 % Formaldehyd 1 % Glutaraldehyd	in PBS
2.2.14 Sonstige Puffer und Lösungen		
1 M Tris-Puffer	1 M Tris-Puffer, pH 8,0	
1 x PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH 7,3-7,4
1 x TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0	
20 % Ethanol-Lösung	20 % (v/v) Ethanol	
70 % Ethanol-Lösung	70 % (v/v) Ethanol	
CIA (Chloroform/Isoamylalkohol)	Chloroform/Isoamylalkohol 24:1	
DNase I-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 8,3 50 mM KCl 2 mM MgCl <sub>2</sub>	
EDTA-Lösung	500 mM EDTA, pH 8,0	
EGTA-Lösung	250 mM EGTA	
HPLC-Laufpuffer	50 mM MOPS pH 7,0 360 mM NaCl	
Mikrokokkus-Nuklease-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 2 mM CaCl <sub>2</sub>	
NaCl-Lösung	2 M NaCl	
Natriumacetat-Lösung	3 M NaCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> , pH 5,3	
Ponceau S-Lösung	10 % (v/v) Ponceau S-Kon	zentrat
Propidiumiodid-Lösung	0,5 % (w/v) Propidiumiodi	d
SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat-Lösung)	10 % (w/v) SDS	

#### Elvanol

#### 2.3 Enzyme und Kits

BCA \* Protein Assay Reagent A, B DNase I Grad II Effectene<sup>TM</sup> Transfection Reagent Lyticase Mikrokokkus-Nuklease Pfu-DNA-Polymerase Proteinase K QIAEX<sup>®</sup> II GEL EXTRACTION KIT QIAGEN Plasmid Maxi Kit Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer

RNase A T4-DNA-Ligase T4-DNA-Polymerase T4-DNA-Polymerase Klenow-Fragment Taq DNA-Polymerase Topoisomerase I

## 20 % (w/v) Mowiol 20 % (v/v) Glycerin in PBS

Pierce, Rockford, Illinois, USA Boehringer, Mannheim Quiagen, Düsseldorf Sigma, Deisenhofen MBI Fermentas, St. Leon-Rot Stratagene, Heidelberg Sigma, Deisenhofen Quiagen, Düsseldorf Quiagen, Düsseldorf NEBiolabs, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Rot Boehringer, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Rot NEBiolabs, Schwalbach NEBiolabs, Schwalbach Promega, Mannheim MBI Fermentas, St. Leon-Rot

#### 2.4 Radiochemikalien

 $[\alpha^{32}P]$ -dCTP, 250 Ci/mmol

Amersham, Braunschweig

#### 2.5 Größen- und Konzentrationsstandards

BSA-ProteinkonzentrationsstandardSigma, DeisenhofenLow Range Prestained SDS-PAGE-GrößenstandardBio-Rad, München

Tab 2.1 Proteine und Fragmentgrößen des Low Range Prestained SDS-PAGE-Größenmarkers.

Protein	Fragmentgröße [kD]
Phosphorylase B	113,0
bovines Serumalbumin	82,0
Ovalbumin	52,4
Carboanhydrase	36,2
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	29,6
Lysozym	20,3

SmartLadder DNA-Größen-/Konzentrationsstandard Eurogentech, Darmstadt

Fragmentgröße [bp]	DNA-Menge [ng]
10 000	100
8000	80
6000	60
5000	50
4000	40
3000	30
2500	25
2000	20
1500	15
1000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

Tab 2.2 Fragmentgrößen und DNA-Konzentrationen von 5 µl des SmartLadder-Größenmarkers.

## 2.6 Antikörper

## 2.6.1 Primärantikörper

Tab 2.3 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper.

Bezeichnung	д Тур	Spezifität	Konzen-	Anwendung in dieser	Bezugsquelle/Referenz
			tration	Arbeit	
CAMVIR1	Maus	α HPV16 L1	0,5 mg/ml	Western-Blot 1:5000	BD Pharmingen, San
	monoklonal,			Immunfluoreszenz:	Diego, CA, USA;
	CAMVIR1			1:400	McLean et al., 1990
Serum	Kaninchen	$\alpha$ MS2-HPV16	100 mg/ml	Western-Blot	Dr. M. Müller, DKFZ
# 20	polyklonal	L2		1:2000	Heidelberg
4543	Kaninchen	α HPV16 L1	100 mg/ml	ELISA 1:5000	Müller et al., 1997
	polyklonal			Neutralisierung	
1.3	Maus	α HPV16 L1	0,5 mg/ml	ELISA 1:1000	Müller et al., 1997
	monoklonal			Neutralisierung	
25/C	Maus	α HPV16 L1	2,5 mg/ml	Neutralisierung	Müller et al., 1997
	monoklonal				
H16.E70	Maus	α HPV16 L1	40 mg/ml	Neutralisierung	Dr. M. Müller, DKFZ
	monoklonal				Heidelberg;
					Christensen et al., 1996a
H16.U4	Maus	α HPV16 L1	40 mg/ml	Neutralisierung	Dr. M. Müller, DKFZ
	monoklonal				Heidelberg;
					Christensen et al., 1996a
H16.V5	Maus	α HPV16 L1	20 mg/ml	Neutralisierung	Dr. M. Müller, DKFZ
	monoklonal				Heidelberg;
					Christensen et al., 1996a
1.4	Maus	α HPV16 L1	20 mg/ml	Neutralisierung	Müller et al., 1997
	monoklonal,				
F1	Maus	α HPV11 L1	3 mg/ml	Neutralisierung	Christensen et al., 1990
	monoklonal				
Humane	Mensch	Verschiedene		Neutralisierung	Dr. M. Pawlita, DKFZ
Antiseren	polyklonal	Spezifitäten			Heidelberg

#### 2.6.2 Sekundärantikörper

Konjugat	Тур	Spezifität	Anwendung in dieser Arbeit	Bezugsquelle
Alexa 488	Ziege	α Maus-IgG	Immunfluoreszenz, 1:200	Molecular Probes,
				Eugene, OR, USA
Meerrettich-Peroxidase	Ziege	$\alpha$ Maus-IgG	Western-Blot, 1:5000	Dianova, Hamburg
Meerettich-Peroxidase	Ziege	$\alpha$ Kaninchen-IgG	ELISA, Western-Blot, 1:5000	Dianova, Hamburg

Tab 2.4 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.

## 2.7 Biologische Materialien

#### 2.7.1 Kultur von Bakterien

#### 2.7.1.1 Bakterienstämme

Tab 2.5 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Beschreibung		
Escherichia coli	Dieser Stamm ist besonders zum Klonieren von Sequenzen mit langen invertierten		
SURE	Wiederholungen geeignet. Genotyp: $e14^{-}(mcrA^{-})$ , $\Delta (mcrCB-hsdSMR-mrr)171$ , $endA1$ ,		
	supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac <sup>q</sup> $\Delta$ M15, recB, recJ, sbcC, umuC Tn5(Kan <sup>r</sup> ), uvrC, [F'		
	proAB, lacIqDM15, Tn10(Tet <sup>r</sup> ). Bezogen von Stratagene, La Jolla, CA, USA.		
Escherichia coli K12	Zur Amplifizierung unmethylierter DNA wurde dieser Dam Dcm Stamm verwendet.		
(GM2163)	Genotyp: F <sup>-</sup> , ara-14, leuB6, fhuA31, lacY1, tsx78, glnV44, galK2, galT22, mcrA, dcm-		
	6, hisG4, rfbD1, rpsL136(StR), dam13::Tn9 (CamR), xylA5, mtl-1, thi-1, mcrB1,		
	hsdR2. Bezogen von Invitrogen, Groningen, Niederlande.		
Escherichia coli	Mit diesem Stamm wurden Plasmide mit Kanamycin-Resistenzgen amplifiziert.		
DH5a	Genotyp: $supE44$ , $lacU169(\phi 80 lacZM15)$ , $hsdR17$ ( $r_{K} m_{K}^{+}$ ) $recA1$ , $endA1$ , $gyrA96$ ,		
	thi-1, relA1, deoR. Bezogen von Invitrogen, Groningen, Niederlande.		

#### 2.7.1.2 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7,5
LB-Platten	98,5 % (v/v) LB-Medium 1,5 % (w/v) Bacto-Agar
LB-Glucose-Medium	20 mM D-Glucose in LB-Medium

Bacto-Trypton

Bacto-Hefeextrakt

Difco, Hamburg Difco, Hamburg

#### 2.7.2 Kultur von Hefen

#### 2.7.2.1 Hefestämme

Tab 2.6 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.

Stamm	Beschreibung	Referenz
Saccharomyces cerevisiae	Dieser Stamm enthält keine Hefevektoren und auch keine	Dr. M. Müller, DKFZ
Stamm # 1699	2μm-Plasmide.	Heidelberg; Merck,
	Genotyp: MAT $\alpha$ <i>leu</i> 2-04 <i>ade</i> 1 <i>ura</i> 3 <i>pep</i> 4:: <i>ura</i> 3 cir <sup>0</sup>	Rahway, NJ, USA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stamm # 1699-pD125	Dieser Stamm enthält das 2µm-Konstrukt pD125 zur Expression von HPV16 L1 und L2. Genotyp: MAT $\alpha$ <i>leu</i> 2-04 <i>ade</i> 1 <i>ura3 pep</i> 4:: <i>ura</i> 3 cir <sup>0</sup>	Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg; Rossi <i>et al.</i> , 2000

## 2.7.2.2 Medien und Zusätze für die Hefekultur

40 mg/l Adenin 50 mg/l L-Tyrosin 2 % (w/v) Glucose 1,82 % (w/v) Sorbitol 100 x LEU <sup>-</sup> Medium 10 g/l Leucin 10 g/l L-Arginin 1 g/l L-Histidin 6 g/l L-Isoleucin 4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin	1 x URA <sup>-</sup> -Medium	0,67 % (w/v) aminosäurefreie Yeast Nitrogen Base	
50 mg/l L-Tyrosin2 % (w/v) Glucose1,82 % (w/v) Sorbitol100 x Leucinlösung10 g/l Leucin100 x LEU'-Medium2 g/l L-Arginin1 g/l L-Histidin6 g/l L-Isoleucin4 g/l L-Lysin1 g/l L-Methionin6 g/l L-Phenylalanin6 g/l L-Threonin4 g/l L-Tryptophan1,5 g/l L-Valin		40 mg/l Adenin	
2 % (w/v) Glucose 1,82 % (w/v) Sorbitol 100 x Leucinlösung 10 g/l Leucin 100 x LEU <sup>-</sup> Medium 2 g/l L-Arginin 1 g/l L-Histidin 6 g/l L-Isoleucin 4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		50 mg/l L-Tyrosin	
1,82 % (w/v) Sorbitol100 x Leucinlösung10 g/l Leucin100 x LEU <sup>-</sup> -Medium2 g/l L-Arginin 1 g/l L-Histidin 6 g/l L-Isoleucin 4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		2 % (w/v) Glucose	
100 x Leucinlösung10 g/l Leucin100 x LEU <sup>-</sup> -Medium2 g/l L-Arginin 1 g/l L-Histidin 6 g/l L-Isoleucin 4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		1,82 % (w/v) Sorbitol	
100 x LEU <sup>-</sup> -Medium2 g/l L-Arginin1 g/l L-Histidin6 g/l L-Isoleucin4 g/l L-Lysin1 g/l L-Methionin6 g/l L-Phenylalanin6 g/l L-Threonin4 g/l L-Tryptophan1,5 g/l L-Valin	100 x Leucinlösung	10 g/l Leucin	
1 g/l L-Histidin 6 g/l L-Isoleucin 4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin	100 x LEU <sup>-</sup> -Medium	2 g/l L-Arginin	
6 g/l L-Isoleucin 4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		1 g/l L-Histidin	
4 g/l L-Lysin 1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		6 g/l L-Isoleucin	
1 g/l L-Methionin 6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		4 g/l L-Lysin	
6 g/l L-Phenylalanin 6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		1 g/l L-Methionin	
6 g/l L-Threonin 4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		6 g/l L-Phenylalanin	
4 g/l L-Tryptophan 1,5 g/l L-Valin		6 g/l L-Threonin	
1,5 g/l L-Valin		4 g/l L-Tryptophan	
		1,5 g/l L-Valin	

100 x Uracillösung	0,2 g/l Uracil
20 % Galaktoselösung	20 % (w/v) Galaktose
40 % Glucoselösung	40 % (w/v) Glucose
Adeninlösung	100 mg/ml Adenin
LEU <sup>-</sup> -URA <sup>-</sup> -Selektionsmedium	99 % 1 x URA <sup>-</sup> -Medium 1 % 100 x LEU <sup>-</sup> -Medium
Platten mit Selektionsmedium	98 % Selektionsmedium 2 % (w/v) Bacto-Agar
YPD-Platten	98 % YPD-Vollmedium 2 % (w/v) Bacto-Agar
YPD-Vollmedium	1 % (w/v) Selected Yeast Extract 2 % (w/v) Selected Peptone mit HCl pH 5,8 einstellen 2 % Glucose
YPG-Vollmedium	1 % (w/v) Selected Yeast Extract 2 % (w/v) Selected Peptone mit HCl pH 5,8 einstellen 2 % Galaktose
Selected Peptone	Difco, Hamburg
Selected Yeast Extract	Difco, Hamburg
Yeast Nitrogen Base, aminosäurefrei	Difco, Hamburg

## 2.7.3 Kultur von Säuger- und Insektenzellen

## 2.7.3.1 Zelllinien

Bezeich	- Organismus	Gewebe	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz
nung					
CV1	Cercopithecus	Niere	Fibroblasten, SV40 T-Antigen	DMEM-	Gluzman,
	aethiops		negativ	Komplettmedium	1981
COS1	Cercopithecus	Niere	Fibroblasten, Parentalzelllinie	DMEM-	Gluzman,
	aethiops		CV1,	Komplettmedium	1981
			durch SV40 transformiert, T-		
			Antigen positiv		
COS7	Cercopithecus	Niere	Adhärent, Fibroblasten,	DMEM-	Gluzman,
	aethiops		Parentalzelllinie CV1, durch SV40	Komplettmedium	1981
			transformiert, T-Antigen positiv		
293	Homo sapiens	Niere,	Adhärent, epithelial, mit	DMEM-	Graham
		embryonal	Adenovirus 5 DNA transformiert	Komplettmedium	<i>et al.</i> , 1977
293T	Homo sapiens	Niere,	Adhärent, epithelial, mit	DMEM-	DuBridge
		embryonal	Adenovirus 5 DNA transformiert,	Komplettmedium	<i>et al.</i> , 1987
			SV40 T-Antigen positiv		
HaSV	Homo sapiens	Spalthaut	Keratinozyten, SV40 T-Antigen	KGM-	Fusenig
			positiv	Komplettmedium	<i>et al.</i> , 1987
Sf9	Spodoptera	Eierstock	Insektenzellen zur Amplifikation	TMN-FH-	Vaughn
	frugiperda		von Baculovirus	Komplettmedium	<i>et al.</i> , 1977
TN	Trichoplusia ni		Insektenzellen zur Expression von	Ex-cell 450-	Invitrogen,
HIGH			VLPs nach Baculovirusinfektion	Komplettmedium	Karlsruhe
five					

Tab 2.7 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

#### 2.7.3.2 Medien, Reagenzien und Zusätze für die Kultivierung eukaryontischer Zellen

#### 2.7.3.2.1 Allgemeine Kultur

100 x Antibiotic/Antimycotic	GibcoBRL, Eggenstein
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	GibcoBRL, Eggenstein
mit Glutamax-I	
Ex-cell 450	GibcoBRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Eggenstein
Keratinozyten-Wachstums-Medium (KGM)	Promocell, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	GibcoBRL, Eggenstein
SupplementMix für KGM	Promocell, Heidelberg
TMN-FH-Medium	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	0,25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA
	GibcoBRL, Eggenstein

## Zelldissoziationspuffer

Invitrogen, Groningen, Niederlande

#### 2.7.3.2.2 Spezielle Medien

Das FCS wurde 30 min bei 56 °C erhitzt, um das Komplement zu inaktivieren.

Einfrier-Medium	70 % (v/v) DMEM 20 % (v/v) FCS 10 % (v/v) DMSO
DMEM-Komplettmedium	10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin in DMEM
KGM-Komplettmedium	KGM SupplementMix (mit Wachstumsfaktoren und Antibiotika)
TNM-FH-Komplettmedium	TMN-FH-Medium 10 % FCS 1 x Antibiotic/Antimycotic
Ex-cell-Komplettmedium	Ex-cell 450 1 x Antibiotic/Antimycotic

#### 2.7.4 Baculovirusstöcke

Tab 2.8 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Baculovirusstöcke.

Bezeichnung	Expression von	Referenz
A194	HPV16 L1	Dr. M. Müller, DKFZ
		Heidelberg
A273	HPV16 L2	Dr. M. Müller, DKFZ
		Heidelberg

#### 2.8 Nukleinsäuren

#### 2.8.1 Träger-DNA

ssDNA aus Heringssperma

Promega, Mannheim

#### 2.8.2 Plasmide

Tab. 2.9 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Bezugsquelle/Referenz
ρϹϺVβ	N. Mossadegh, DKFZ Heidelberg, (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)
Der 7,2 kb umfassende Vektor	mit Ampicillin-Resistenz dient der eukaryontischen Expression von $\beta$ -
Galaktosidase, reguliert durch den wurde bei der <i>in vitro</i> -Produktion	CMV IE-Promotor. Außerdem ist die SV40 ori-Sequenz vorhanden. pCMVβ von Pseudovirionen verwendet.

#### pD125 Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg; Rossi et al., 2000

Das 15 kb große Verpackungsplasmid pD125 enthält die Kapsidgene HPV16 L1 und L2, reguliert durch einen bidirektionalen Galaktose-induzierbaren Hefepromotor (*gal1/10*), sowie den starken Selektionsmarker *leu*2-d, der neben der Leucinauxotrophie auch Elemente für die 2 $\mu$ m-Replikation von Hefevektoren mit 2 $\mu$ m-ori-Sequenz in *trans* kodiert.

**pEGFP-C3** Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg, (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) Dieser bei der *in vitro*-Produktion von Pseudovirionen verwendete eukaryontische Expressionsvektor von 4,7 kb enthält die SV40 ori-Sequenz. Er trägt neben dem Kanamycin-Resistenzgen ein durch den CMV IE-Promotor reguliertes EGFP-Gen, an das C-terminal vor dem Stopkodon eine multiple Klonierungssequenz von 81 bp angeschlossen ist, wodurch 26 zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus exprimiert werden.

#### pGEM-REC1-IRES Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg

Dieses 7,8 kb große Plasmid enthält die EGFP-Sequenz und wurde als Größenreferenz in EGFP-Southern-Blots verwendet.

#### pYES2\*-VP22-E7<sub>1-60</sub> Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg

Bei diesem Hefe-Bakterien-Shuttle-Vektor handelt es sich um ein von Herrn Tarek El Hindi, DKFZ Heidelberg, hergestelltes Konstrukt von 9,7 kb, das als Zielplasmid mit E7<sub>1-60</sub> als Reportergen bei der Pseudovirionenproduktion in Hefe dienen sollte. Das Plasmid wurde als Ausgangsvektor zur Herstellung eines Zielplasmids mit EGFP als Reportergen verwendet. Es kodiert für den Hefe-Selektionsmarker *ura*3 und das Ampicillin-Resistenzgen, wobei sämtliche Elemente, die für eine Amplifikation in Bakterien nötig sind, auf einem 1,9 kb langen, beiderseits von SwaI-Schnittstellen flankierten Bereich zu finden sind. Zusätzlich enthält das Plasmid das HPV16 URR-Element und das HPV16 E2-Gen, die als Verpackungselemente die Effizienz der DNA-Enkapsidierung erhöhen sollen.

#### 2.8.3 Oligonukleotidprimer

Primer	Sequenz	Tannealing
Hexanukleotidprimer	Zufällige Sequenz	
Zum Nachweis der gesamten EGFP- Sequenz.	Vorwärts: 5`-ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-3′ Rückwärts: 5`-CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3′	67 °C
Zum Nachweis von EGFP.	Vorwärts: 5`-GCA AGC TGA CCC TGA AGT TC-3' Rückwärts: 5`-TGA AGT CGA TGC CCT CCT TCA G-3'	55 °C
Zum Nachweis von L1.	Vorwärts: 5`-AAT CCA GGT GAT TGT CCA CC-3' Rückwärts: 5`-AAG CTG TCG CCA TAT GGT TC-3'	60 °C
Zum Nachweis von der Deletion der Sequenz mit bakteriellen Elementen im Zielneamid	Vorwärts: 5`-CGT TAC AGA AAA GCA GGC TGG G-3' Rückwärts: 5`-TCA CGC TTA CAT TCA CGC CCT C-3'	52 °C
Zuenplasmid. Zum Nachweis von der Deletion des <i>ura3</i> -Promotor-Elements im Zielplasmid	Vorwärts: 5`-GTT ACA CAT TTA CAA GCA AC-3' Rückwärts: 5`-ACA TGA TTT ATC TTC GTT TC-3'	39 °C
Zum Nachweis von rezirkularisiertem pEGFP-C3.	Vorwärts: 5`-CCC TGA ACC TGA AAC-3' Rückwärts: 5`-GAA CAA CAC TCA ACC-3'	60 °C
Primer zum Einfügen von EGFP in das Zielplasmid. Restriktionsschnittstellen (der Reihe nach: NotI, EcoRV, AflII) sind farbig gekennzeichet.	Vorwärts: 5`-TTT TGC GGC CGC CAC CAT GGT GAG CAA-3 Rückwärts: 5`-TTT GAT ATC CTT AAG TCT ATT CTT TTG ATT TAT AAG GGA TTT TG-3	60 °C
Primer zur homologen Rekombination des Zielplasmids (zur Rezirkularisierung) bei der Hefe- Transformation. SwaI-Schnittstellen sind rot gekennzeichnet.	Vorwärts: 5`-TCA GTT ATT ACC CGG GAT TTA AAT CCC GGG CCG CAA ATT A-3 Rückwärts: 5`-TAA TTT GCG GCC CGG GAT TTA AAT CCC GGG TAA TAA CTG A-3'	

Tab. 2.10 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer.

Alle Primer wurden im Labor Dr. A. Hunziker, Olinukleotid/DNA-Sequenzierung, DKFZ Heidelberg, synthetisiert.

#### 2.9 Säulen und Füllmaterial

1 ml HiTrap-Heparinsäule	Sigma, Deisenhofen
Sephadex <sup>®</sup> G-50	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

#### 2.10 Geräte und Anlagen

#### 2.10.1 Zentrifugen und Zubehör

Biofuge B	Hera
Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Epp
Minifuge RF, Megafuge 1,0	Hera
Sorvall <sup>®</sup> RC-5B Refrigerated Superspeed	DuP
Centrifuge	

Heraeus Christ, Hanau Eppendorf, Hamburg Heraeus Sepatech, Hanau DuPont, Bad Homburg Sorvall<sup>®</sup> Discovery 90 SE Ultrazentrifuge Rotor 70 I Ti Rotor F-28/50 Rotor SLA-3000 Rotor SW 28 Rotor SW 41

#### 2.10.2 Sonstige Geräte

Analysenwaage 2002 MPI Bakterienschüttler, Typ SM 25 Bakterienschüttler, Typ TR 125 **Bead-Beater** Brutschrank für die Hefezellkultur Brutschrank für die Säugerzellkultur Brutschrank für die Insektenzellkultur Dot-Blot-Apparatur Durchflusszytometer FACSsort **Eismaschine AF-3** Elektronenmikroskop EM 10 Elektrophoresekammern für Agarosegele Elektrophoresekammern für Proteingele Elektroporationsgerät Capacitance Extender und Pulse Controller ELISA-Lesegerät Titertek Multiskan MKII Fluoreszenzmikroskop Leica DFC 350F Fraktionssammler French Press Geigerzähler Gelkamera, Computer und Monitor Geltrockner Modell 583 Gilson-Pipetten, 10 µl, 20µl, 200µl und 1000 µl Gilson, Abimed, Langenfeld Gradientenmischer Haubeninkubator HPLC-Anlage P-500 HPLC-Fraktionssammler Konfokal-Fluoreszenzmikroskop Leica TCS SP Leitz, Wetzlar Kühl- und Gefrierschränke

Laborwaage Lichtmikroskop Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 1600 CA

DuPont, Bad Homburg Beckman, München DuPont, Bad Homburg DuPont, Bad Homburg Beckman, München Beckman, München

Sartorius, Göttingen Edmund Bühler, Tübingen Infors, Bottmingen, Schweiz Roth, Karlsruhe WTC Binder, Tuttlingen Forma Scientific, Marietta, OH, USA New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA Schleicher & Schuell, Dassel Becton Dickinson, Heidelberg Scotsman, Glasgow, Schottland Zeiss, Oberkochen Renner, Darmstadt CTI. Idstein Bio-Rad, München

Labsystems, Turku, Finnland Leitz, Wetzlar DKFZ, Heidelberg Avestin, Ottawa, Kanada Berthold, Wildbach Herolab, Wiesloch Bio-Rad, München DKFZ, Heidelberg Infors, Einsbach Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden Liebherr, Ochsenhausen Forma Scientific, Marietta, OH, USA Sartorius, Göttingen Leitz, Wetzlar Canberrra-Packard, Frankfurt am Main

Magnetrührer, heizbar, RET Mikrowelle Mikromat Multikanalpipette Neubauer-Zählkammer Peristaltik-Pumpe P-1 pH-Meter InoLab pH Level 1

Pipetboy acu Refraktometer Schweißgerät für Re-Seal-Röhrchen Semi-Dry Transfer Cell Blot-Apparat Spannungsgerät PHEROstab 500 Spektrophotometer U-1100 Sterile Werkbank Biogard Hood Stickstofftank Thermocycler PCR-Maschine Thermomix 1460 Wasserbad Thermomixer 5436 Thermorührer IKA-COMBIMA RET Ultraschallgerät Sonifier B-12 UV-Leuchttisch, 366 nm UV-Leuchttisch, 254 nm UV-Stratalinker<sup>™</sup> 2400 Vortex-Gerät REAX 2000 Wärmerollerschrank Wasserbad Typ 3047 Wippe Tecnomara Rockomat

## 2.11 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Beschichtete Objektträger

Deckgläschen Dialyseklemmen Dialysemembran Typ VS, 0,025 µm Dialyseschlauch Einmalschutzhandschuhe Meditrade Gentle Skin Elektroporationsküvetten 0,2 cm ELISA-96-Loch-Platten Eppendorf-Röhrchen, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Filmkassette Kodak X-Omatic Cassette und Röntgenfilme, Kodak X Omat Blue XB-1 Frischhaltefolie

Janke&Kunkel, Staufen AEG, Nürnberg Abimed, Langenfeld Karl Hecht Assistent, Sondheim/Rhön Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim Integra Biosciences, Fernwald Schmidt-Haenisch, Berlin Beckman, München CTI, Idstein Biotec-Fischer, Reiskirchen Hitachi, Tokyo, Japan Baker Company, Sanford, Maine, USA Union Carbide, South Charleston, WV, USA Landgraf, Langenhagen Braun, Melsungen Eppendorf, Hamburg Janke & Kunkel, Staufen Branson, Danburry, CT, USA Vetter, Wiesloch Konrad Benda, Wiesloch Stratagene, Amsterdam, Niederlande Heidolph, Rust Bachhofer, Reutlingen Köttermann, Hänigsen Tecnomara, Zürich, Schweiz

Paul Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen Menzel-Gläser, Braunschweig Roth, Karlsruhe Millipore, Eschborn Roth, Karlsruhe Meditrade, Baxter, Thetford, England Invitrogen, Groningen, Niederlande Becton Dickinson, Heidelberg Eppendorf, Hamburg Eastman Kodak/NEN™ Life Science Products, Köln Toppits, Minden Geltrocken-Folie Glaskolben 25 ml-3 l Glaskugeln 0,5 mm Glaswannen Kanülen und Plastikspritzen Klebeband Kryokonservierungs-Röhrchen, 2 ml Micronic Polypropylen-Röhrchen 1,4 ml Nescofilm Objektträger Petrischalen für Bakterien und Hefen Pipettenspitzen Pipettenspitzen, gestopft Plastikküvetten Plastikköhrchen, 15 ml, 50 ml

Protran® Nitrocellulose-Membran GeneScreen Plus<sup>®</sup> (Nylon-Membran) Quartzküvetten Sterilfilter, 0,2 µm Whatman 3 MM-Papier Zellkultur-6-Loch-Platten Zellkulturflaschen 175 cm<sup>2</sup>, 80 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup> Zentrifugenröhrchen für 70.I Ti Re-Seal Polyallomer 16 x 76 mm Zentrifugenröhrchen für SW 28 PA, thinwall, 38,5 ml Zentrifugenröhrchen für SW 41 PA, thinwall, 14 ml Promega, Mannheim Fisher Scientific, Loughborough, England Biospec Products, Bartlesville, OK, USA Karl Hecht Assistent, Sondheim/Rhön Becton Dickinson, Heidelberg Tesa, Beiersdorf Nalgene, Rochester, NY, USA Integra Biosciences, Fernwald Nippon Shoji Kaisha, Osaka, Japan Langenbrinck, Emmendingen Greiner, Frickenhausen Greiner, Frickenhausen AGS, Heidelberg Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht Greiner, Frickenhausen Schleicher & Schuell, Dassel NEN™ Life Science Products, Köln Neolab, Heidelberg MembraPure, Bodenheim Schleicher & Schüll, Dassel Costar, Bodenheim Greiner, Frickenhausen SCI Science Services, München

Herolab, über Konrad Beranek, Weinheim

Herolab, über Konrad Beranek, Weinheim

# 3 Methoden

## 3.1 Allgemeine molekular- und mikrobiologische Arbeiten

## 3.1.1 DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen

Anhand der horizontalen Agarosegel-Elektrophorese lassen sich Nukleinsäuren zwischen 0,1 kb und 60 kb ihrer Größe nach auftrennen. Der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid macht die einzelnen Banden unter UV-Bestrahlung sichtbar. Aus präparativen Gelen kann dann ein gewünschtes Fragment ausgeschnitten werden, während das Bandenmuster analytischer Gele neben der Konzentrations- und Qualitätsabschätzung auch dazu dient, Aufschluss über das Gelingen z.B. eines Restriktionsverdaus, einer Ligation oder einer Polymerase-Ketten-Reaktion zu geben. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA und reichte von 0,5 % (Fragmente von 1-30 kb) bis 2 % (Fragmente von 0,05-2 kb). Hauptsächlich wurden 1 % Agarosegele (besonders gut für Fragmente von 0,5-10 kb geeignet) benutzt.

Für das Gießen eines Gels wurde die entsprechende Menge Agarose mit 1 x Elektrophorese-Puffer im Mikrowellengerät durch Aufkochen vollständig aufgelöst. Danach wurde die Lösung mit H<sub>2</sub>O bidest wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml zugegeben. Anschließend wurde die Agarose in einen mit Klebeband abgedichteten und einem Kamm versehenen Gelschlitten eingegossen. Nach Erstarren des Gels nach 30-60 min wurde es in eine mit 1 x Elektrophorese-Puffer gefüllte Laufapparatur überführt und konnte nun nach Entfernen des Kamms mit Proben beladen werden. Diese wurden zuvor im Verhältnis 5:1 mit 6 x Ladepuffer gemischt. Als Größen- und Konzentrationsreferenz diente der DNA-Längenmarker SmartLadder von Eurogentec. In Abhängigkeit von den Fragmentgrößen und der Agarose-Konzentration fand die Elektrophorese bei 50-90 V für 40 min bis 5 h statt. Analytische Gele wurden unter kurzwelligem UV-Licht (254 nm) betrachtet und fotografiert, während bei präparativen Gelen zuvor unter langwelligem UV-Licht (366 nm) zügig die DNA-Banden ausgeschnitten wurden, um durch UV-Strahlung induzierte Mutationen zu vermeiden.

## 3.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Reaktionspuffer stammten von MBI Fermentas sowie von NEB Biolabs und wurden entsprechend den zugehörigen Angaben verwendet, um zirkuläres Plasmid zu linearisieren, Mini- und Maxipräparations-DNA zu analysieren und um passende Fragmente beim Klonieren oder für Hybridisierungssonden zu erhalten.

Für eine analytische Restriktionsspaltung wurden 0,5-1  $\mu$ g DNA in einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 10  $\mu$ l für 1-2 h verdaut. Pufferbedingungen und Temperatur (meist 37 °C) richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers. Unter optimalen

Bedingungen katalysiert 1 U (internationale Enzymeinheit *unit*) Enzym in 1 h die Spaltung von 1  $\mu$ g DNA mit einer Schnittstelle. Die Restriktionsendonukleasen wurden jedoch stets im Überschuss eingesetzt. Weil die im Aufbewahrungspuffer mit 50 % Glycerin gelösten Enzyme bei Glycerinkonzentrationen unter 10 % eine optimale Aktivität aufweisen, wurden nie mehr als 1/5 des Ansatzvolumens eingesetzt, standardmäßig 10-20 U.

Bei einem präparativen Restriktionsverdau wurden 10-50 µg DNA in einem 100 µl-Ansatz mit entsprechend mehr Enzym (siehe Tab. 3.1) unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

Tab. 3.1 H	Pipettierschema.
------------	------------------

10 μl-Ansatz für eine analytische Spaltung	100 µl-Ansatz für eine präparative Spaltung
0,5-1 μg DNA	10-50 µg DNA
1-2 µl 10 x Reaktionspuffer	10-20 µl 10 x Reaktionspuffer
1 µl Restriktionsenzym 1 (10-20 U)	2,5-10 µl Restriktionsenzym 1 (50-100 U)
1 µl Restriktionsenzym 2 (10-20 U)	2,5-10 µl Restriktionsenzym 2 (50-100 U)
ad 10 µl H <sub>2</sub> O bidest	ad 100 µl H <sub>2</sub> O bidest

Durch die anschließende Zugabe von 1/5 Volumen 6 x Ladepuffer vor dem Auftragen auf ein Agarosegel wurde die Enzymreaktion gestoppt.

#### 3.1.3 Herstellung von glatten Enden mit T4-DNA-Polymerase

Um nach einem Restiktionsverdau überhängende Enden in glatte Enden für weitere Klonierungsschritte umzuwandeln, wurde die T4-DNA-Polymerase (NEBiolabs), die sowohl eine Polymerase-Aktivität als auch eine  $3' \rightarrow 5'$ -Exonuklease-Aktivität aufweist, verwendet.

Tab. 3.2 Pipettierschema.	
50 μl-Ansatz	
2 μg Vektor-DNA	
2,5 µl 1mg/ml BSA	
5 µl 10 x Reaktionspuffer	
2 µl dNTPs (je 2,5 mM)	
1 μl T4-DNA-Polymerase I (5 U/μl)	
ad 50 $\mu$ l H <sub>2</sub> O bidest	

Der Ansatz wurde 20 min bei 11 °C inkubiert und durch die Zugabe von 2  $\mu l$  EDTA-Lösung inaktiviert.

#### 3.1.4 Relaxation von superhelikaler Plasmid-DNA mit DNA-Topoisomerase I

DNA-Topoisomerase I (MBI Fermentas) aus Kälberthymus relaxiert ATP-unabhängig über eine vorübergehende Spaltung einer der beiden DNA-Stränge sowohl positiv als auch negativ superhelikale Strukturen in zirkulärer DNA. Der Ansatz wurde nach dem folgenden Schema zusammenpipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tab. 3.3 Pipettierschema.		
100 μl-Ansatz		
100 μg Vektor-DNA		
10 µl 1 mg/ml BSA		
10 µl 10 x Reaktionspuffer		
5 μl DNA-Topoisomerase I (10 U/μl)		
ad 100 µl H <sub>2</sub> O bidest		

#### 3.1.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion, abgekürzt PCR (polymerase chain reaction) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. In mehreren Zyklen folgt auf eine Hitzedenaturierung die Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotidprimer-Paars an komplementäre Sequenzen der Ausgangs- oder Template-DNA (annealing) mit anschließender DNA-Synthese (Kettenverlängerung) durch eine hitzestabile Polymerase. Somit wird der Abschnitt zwischen Vorwärts- und Rückprimer vervielfältigt. Die verwendeten Oligonukleotide können neben den komplementären Regionen zusätzlich weitere Sequenzen wie Restriktionsschnittstellen enthalten, die dann auch das amplifizierte Produkt flankieren. Auf diese Weise wurden mit der Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) mit für die folgenden Klonierungsschritte Insertsequenzen passenden Restriktionsschnittstellen hergestellt. Die analytische PCR mit Taq-Polymerase (Promega) diente als Nachweismethode für die spezifische Detektion geringer Mengen DNA.

Für die Modifikation von Insertfragmenten wurde nach folgendem Schema ein 100 µl-Ansatz pipettiert:

Tab. 3.4 Pipettierschema für eine präparative PCR.	Tab. 3.5 Pipettierschema für eine analytische PCR.
100 μl-PCR-Ansatz	50 µl-PCR-Ansatz
100 ng Ausgangs-DNA	1 μl Ausgangs-DNA
250 ng Vorwärtsprimer	250 ng Vorwärtsprimer
250 ng Rückprimer	250 ng Rückprimer
8 μl 0,1 x dNTPs (je 2,5 mM)	5 µl 0,1 x dNTPs (je 2,5 mM)
10 µl 10 x Reaktionspuffer	5 µl 10 x Reaktionspuffer
0,5 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
	3 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>
ad 100 µl H <sub>2</sub> O bidest	ad 100 µl H <sub>2</sub> O bidest

Die Ansätze wurden gemischt, mit 200 µl Mineralöl überschichtet und einem der folgenden PCR-Programme unterzogen:

-	1	•
Funktion	Bedingungen	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	4 min bei 94 °C	1 x
Denaturierung	1 min bei 94 °C	
Hybridisierung	2 min bei 58 °C	30 x
Synthese	3 min bei 72 °C	
Denaturierung	1 min bei 94 °C	
Hybridisierung	2 min bei 58 °C	1 x
Synthese	10 min bei 72 °C	
Aufbewahrung	über Nacht 4 °C	1 x

Tab. 3.6 PCR-Programm für die Amplifikation mit Pfu-Polymerase.

Funktion	Bedingungen	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	3 min bei 94 °C	1 x
Denaturierung	30 s bei 94 °C	
Hybridisierung	30 s bei T <sub>annealing*</sub>	35 x
Synthese	30 s bei 72 °C	
Denaturierung	30 s bei 94 °C	
Hybridisierung	30 s bei T <sub>annealing*</sub>	1 x
Synthese	10 min bei 72 °C	
Aufbewahrung	über Nacht 4 °C	1 x
* T — ontimolo II	heridiai arun aataren arat	ur (richo Tab 210)

\* T<sub>annealing</sub> = optimale Hybridisierungstemperatur (siehe Tab. 2.10)

Nach Ablauf des Programms und Abtrennen des Mineralöls konnten die PCR-Produkte durch eine elektrophoretische Auftrennung detektiert und eventuell durch eine anschließende Elution aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt werden.

#### 3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter langwelligem UV-Licht (366 nm) wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Mit Hilfe des QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kits wurde nun die Agarose aufgeschmolzen und die DNA durch eine reversible, von Ionenstärke und pH-Wert abhängige Bindung an Silica-Gel-Partikel isoliert.

Zunächst wurde je nach Größenordnung des DNA-Fragments eine zu der Masse des Gelstücks proportionale Menge des QX1-Puffers eingesetzt. Das Gelstück wurde zusammen mit dem Puffer und einem von der DNA-Menge abhängigen Volumen QIAEX<sup>®</sup> II-Partikeln für 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei letztere alle 2 min durch Vortexen in Suspension gehalten wurden.

Fragmentgröße [kb]	QX1-Puffer/100 mg Gel [µl]
< 0,1	600
0,1-4	300
> 4	300, zusätzlich 200 µl H2O bidest/100 mg Gel
Tab. 3.9 Bestimmung des benötigten Volumens Q DNA-Menge [µg]	PIAEX <sup>®</sup> II. Volumen QIAEX <sup>®</sup> ΙΙ [μl]
≤2	10
2-10	30
	50

 Tab. 3.8 Bestimmung des benötigten Volumens an QX1-Puffer.

Anschließend wurden die Partikel mit der adsorbierten DNA durch eine Zentrifugation von 1 min bei 14 000 rpm (Rotationen per Minute) in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert, einmal mit 500  $\mu$ l QX1-Puffer und zweimal mit 500  $\mu$ l PE-Puffer gewaschen und an der Luft getrocknet. Um die jetzt von Agarose, Ethidiumbromid und anderen Salzen befreite DNA zu eluieren, wurden die Partikel erst mit 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest inkubiert und gevortext. Inkubationszeit und Temperatur wurden durch die Fragmentgröße bedingt:

Tab. 3.10 Inkubationsbedingungen bei der Elution.

Fragmentgröße [kb]	Inkubationszeit [min]	Inkubationstemperatur [°C]
< 4	5	Raumtemperatur
4-10	5	50
> 10	10	50

Durch Zentrifugation für 1 min bei 14 000 rpm wurde der DNA-haltige Überstand von den Partikeln abgetrennt und konnte in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde der Elutionsschritt wiederholt. Im Agarosegel wurde die DNA-Konzentration des Eluats abgeschätzt.

#### 3.1.7 Ligation

Zur Verknüpfung von Restriktionsfragmenten bei der Herstellung neuer Plasmidkonstrukte wurde das Enzym T4-DNA-Ligase von MBI Fermentas verwendet.

In einem 10  $\mu$ l-Ansatz wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Reaktion verlief über Nacht bei 16 °C. Bevor mit 1-2  $\mu$ l der Ligation Bakterien transformiert wurden, wurden 2  $\mu$ l des Ansatzes auf einem Kontrollgel überprüft.

Tab. 3.11 Pipettierschema.		
10 μl-Ligationsansatz		
10-35 ng Vektor-DNA		
30-100 ng Insert-DNA		
1 μl 10 x Reaktionspuffer		
1 μl T4-DNA-Ligase (1 U/μl)		
ad 10 $\mu$ l H <sub>2</sub> O bidest		

#### 3.1.8 Aufreinigung von Nukleinsäuren durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion kann eine Nukleinsäurelösung von Proteinen und Lipiden gereinigt werden. Dazu wird die wässrige Nukleinsäurelösung in einem Mindestvolumen von 100 µl mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol durch Schütteln oder Vortexen gemischt. Bei einer fünfminütigen Zentrifugation bei 14 000 rpm in der Eppendorfzentrifuge trennt sich die obere, wässrige Phase mit den gelösten Nukleinsäuren von der organischen Phase, in der sich wie auch an der Grenzschicht die denaturierten Proteine befinden. Dieser Schritt kann mehrmals mit dem wässrigen Überstand wiederholt werden. Abschließend wird dieser durch Mischen mit Chloroform/Isoamylalkohol und erneutem Trennen durch Zentrifugation von Phenol-Resten befreit. Um diese Verunreinigungen vollständig zu entfernen und die Nukleinsäurelösung aufzukonzentrieren, kann im Anschluss eine Ethanolpräzipitation ausgeführt werden.

#### 3.1.9 Präzipitation von Nukleinsäuren

Durch die Inkubation bei -20 °C über Nacht nach Mischen mit dem 0,1 fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und dem 2,5 fachen Volumen 100 % Ethanol wurden die Nukleinsäuren gefällt und konnten durch 15 min Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4 °C in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert werden. Alternativ konnte diese Zentrifugation nach Zugabe des 0,7 fachen Volumens raumtemperierten Isopropanols und ohne eine vorherige Inkubation geschehen. Diese Methode bietet sich bei größeren Volumina an, bringt aber eine ineffizientere Fällung kleinerer Fragmente mit sich. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 min lang bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, luftgetrocknet und in einem passenden Volumen H<sub>2</sub>O bidest oder 1 x TE-Puffer aufgenommen.

#### 3.1.10 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Durch die spektrophotometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge können Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung ermittelt werden. Eine verlässliche Beziehung zwischen  $OD_{260 nm}$  und Konzentration erhält man im Bereich einer Extinktion von 0,1-1,0.

In einer Quarzküvette wurde eine 1:50 oder 1:100 Verdünnung der DNA-Lösung in H<sub>2</sub>O bidest vermessen. Als Referenz wurde die Extinktion des Lösungsmittels ermittelt und von den übrigen Werten subtrahiert. Die Konzentration aus der  $OD_{260 nm}$  erhält man durch Multiplikation mit dem Konversionsfaktor 50 µg/ml und dem Verdünnungsfaktor:

Konzentration = 
$$OD_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ }\mu\text{g/ml} \times Verdünnungsfaktor$$

Für Einzelstrang-DNA und RNA gilt der Konversionsfaktor 40  $\mu$ g/ml, für Oligonukleotide etwa 20  $\mu$ g/ml. Durch die Berechnung des Quotienten OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>, der im Bereich zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte, überprüft man die Reinheit der DNA-Lösung.

Proteinverunreinigungen verursachen niedrigere Werte, während Werte über 2,2 auf Phenolrückstände hinweisen können.

#### 3.1.11 Random Prime-Methode zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Die Methode beruht darauf, dass Hexanukleotide aus dem Oligo-Markierungspuffer als statistisch zufällige Primer (*random primers*) dienen, die an komplementären Sequenzen die denaturierte DNA binden und dem Klenow-Fragment der T4-DNA-Polymerase die DNA-Synthese der Sonde unter Einbau der  $\alpha^{32}$ P-markierten Radionukleotide ermöglichen.

Von der Ausgangs-DNA wurden 40 ng mit H<sub>2</sub>O bidest auf ein Volumen von 11,5 µl gebracht und 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurde die Probe kurz auf Eis gekühlt und 4 µl 5 x Oligo-Markierungspuffer, 1 µl 2 % BSA-Lösung, 1 µl Klenow-DNA-Polymerase (5 U/µl) von NEB und 2,5 µl  $\alpha^{32}$ P-dCTP (25 µCi) hinzupipettiert. Während der Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht fand die Synthese der Sonde statt, die dann durch Zugabe von 20 µl 2 x TNE-Farbpuffer gestoppt wurde. Mit Hilfe einer Sephadex G 50-Säule, die zuvor mit mindestens 5 ml Laufpuffer gewaschen wurde, wurde die markierte Sonde von freien Nukleotiden befreit. Dazu wurde der Ansatz auf die Säule aufgetragen und durch Zugabe von Laufpuffer chromatographisch aufgetrennt. Die radioaktiv markierte Fraktion wurde mit einem Zählrohr beim Lauf verfolgt und separat aufgefangen. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 2 µl der Sonde im Szintillationszähler als Cerenkov-Counts vermessen, wobei der Wert noch mit dem Faktor 3/2 multipliziert wurde, um die Anzahl der Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) bezogen auf 1 µl Sonde zu erhalten.

## 3.1.12 DNA-Transfer durch Southern-Blot

Vor dem Transfer wurde die GeneScreen Plus<sup>®</sup>-Nylonmembran 5 min in H<sub>2</sub>O bidest benetzt und anschließend 5 min in Denaturierungspuffer äquilibriert. Das fertig aufgetrennte Agarosegel wurde ebenfalls in Denaturierungspuffer 15 min lang geschwenkt, damit die DNA in Einzelstrangform vorlag. Der Blot wurde dann nach dem Schema in Abb. 3.1 aufgebaut, wobei einzelne Schichten mit einer Pipette geglättet wurden, um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden.



Abb. 3.1 Schematischer Aufbau eines Southern-Blots.

Mit Frischhaltefolie abgedichtet und mit einer Flasche beschwert, vollzog sich der Transfer über Nacht. Am folgendem Tag wurde die Membran 5 min lang in Neutralisationspuffer geschwenkt, auf 3 MM-Papier getrocknet und zweimal dem *Auto-Crosslink*-Programm eines Bestrahlungsgeräts ausgesetzt, um die DNA durch die kurzzeitige UV-Bestrahlung kovalent an die Membran zu fixieren.

## 3.1.13 DNA-Dot-Blot

Mit einer Dot-Blot-Kammer konnte ebenfalls DNA auf eine GeneScreen Plus<sup>®</sup>-Nylonmembran aufgebracht werden. Hierzu wurde die mit 20 x SSC benetzte Membran in die Apparatur eingespannt und die Proben durch den Sog einer Wasserstrahlpumpe aufgedottet. Um einzelsträngige DNA für die folgende Hybridisierung zu erhalten, wurde die Membran dreimal 5 min auf mit Denaturierungspuffer getränktes 3 MM-Papier gelegt, anschließend dreimal 5 min auf mit Neutralisierungspuffer getränktes 3 MM-Papier. Nach dem Trocknen wurde die DNA durch zweimaliges Bestrahlen mit dem *Auto-Crosslink*-Programm an die Membran fixiert.

## 3.1.14 Hybridisierung von DNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde

Um störende Hintergrundsignale zu vermeiden, fand eine Vorhybridisierung mit tRNA statt, die unspezifische Bindestellen der Nylonmembran abdecken soll. Die Hybridisierung selbst fand unter stringenten Bedingungen statt.

Für die Prähybridisierung wurden 10-20 ml Hybridisierungslösung frisch angesetzt, wobei Formamid und tRNA zur Denaturierung erst 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, bevor die restlichen Komponenten beigefügt wurden. In einer Glasröhre wurde die Membran mit der fertigen Lösung in einem Wärmeschrank bei 42 °C erst 3 h lang ohne Sonde gedreht. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde (3 x 10<sup>6</sup> cpm/ml Hybridisierungslösung) dazupipettiert, und die Inkubation bei 42 °C über Nacht fortgesetzt. Die Membran wurde dann dreimal 30 min lang bei 65 °C mit Waschlösung gewaschen, bevor sie auf 3 MM-Papier abgetropft, in Klarsichtfolie verpackt und zur Exposition von Röntgenfilmen in eine Filmkassette eingelegt wurde. In Abhängigkeit von Signalstärke und Aktivität der Sonde wurden die Filme einige Stunden bis einige Wochen lang bei –70 °C exponiert.

## 3.1.15 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

*E. coli*-Bakterien können entweder in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C kultiviert werden, bis die gewünschte Bakteriendichte bzw. Koloniegröße erreicht wird. Wenn nur Bakterien, die ein bestimmtes Plasmid enthalten, vermehrt werden sollten, wurde durch 100  $\mu$ g Ampicillin bzw. 20  $\mu$ g/ml Kanamycin pro ml Flüssig- oder Agarose-Medium auf die Präsenz des Resistenzgens selektioniert.

Das Anlegen von Bakterienkulturen und das Ausplattieren auf Agar geschah bei semisterilen Bedingungen unter Nutzung eines Bunsenbrenners. Beim Ausplattieren einer Bakteriensuspension auf Agarplatten erhält man Klone, die als distinkte Kolonien sichtbar sind. Mit einer solchen Einzelkolonie oder aus einer Glycerinkultur wurden Flüssigkulturen angeimpft, die der Amplifikation eines Klons dienten. Zur Aufbewahrung kann eine Flüssigkultur etwa drei Wochen bei 4 °C gelagert werden, mit Nescofilm abgedichtete Agarplatten etwa vier Wochen. Für eine längerfristige Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 1,7 ml einer 12-16 h alten Flüssigkultur mit 0,3 ml 86 %igem Glycerin in einem Kryokonservierungsröhrchen gemischt, bei -70 °C eingefroren und permanent bei dieser Temperatur aufbewahrt wurden.

#### 3.1.16 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Um effizient fremde DNA durch eine Elektroporation in *E. coli*-Bakterien einbringen zu können, müssen diese zuvor transformationskompetent gemacht werden.

Hierzu wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer frischen *E. coli*-Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C mit 220 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600 nm</sub> von 0,4-0,7 erreicht wurde. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde die Kultur 5 min lang bei 4000 rpm und 4 °C in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Danach wurde das Bakterienpellet in 500 ml kaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert, und die Inkubation auf Eis sowie die Zentrifugation wiederholt. Nach Aufnahme in 50 ml kaltem 10 %igem Glycerin wurde das Sediment erneut auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Schließlich folgte die Resuspendierung der Bakterien in 2 ml kaltem 10 %igem Glycerin und das Lagern von 40 µl-Aliquots bei -70 °C bis zur Transformation.

## 3.1.17 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Bei diesem Verfahren wird eine Bakteriensuspension mit beigefügter DNA kurzzeitig hohen elektrischen Spannungsfeldern ausgesetzt. Durch die temporäre Störung der Membranstruktur können einige DNA-Moleküle in die Bakterien gelangen.

Von auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden 40  $\mu$ l mit 1-2  $\mu$ l DNA-Lösung in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette vorsichtig gemischt. Mit Hilfe eines Elektroporationsgeräts, bei dem die Parameter auf 2,5 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$  eingestellt waren, wurde ein Spannungspuls angelegt. Unmittelbar nach dem Impuls wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Glucose-Medium aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30-60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l der Bakteriensuspension in den Verdünnungen 1:2, 1:10 und 1:100 auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C kultiviert, bis Einzelkolonien in geeigneter Größe gewachsen waren.

## 3.1.18 Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse

Die mit diesem Verfahren der Schnellaufbereitung gewonnene Plasmid-DNA kann im Restriktionsverdau analysiert und in Bakterien transformiert werden. Dabei ist eine Ausbeute von bis zu 10  $\mu$ g DNA möglich. Das Prinzip der alkalischen Lyse beruht darauf, dass erst ein alkalischer Lysepuffer mit Hilfe von SDS die Zellmembranen lysiert und DNA und Proteine

denaturiert. Die Lysedauer ist so gewählt, dass möglichst viele Plasmide, aber keine genomische DNA freigesetzt werden. Daraufhin bewirkt ein saurer Neutralisationspuffer mit hoher Salzkonzentration das Ausfallen von SDS, was zur Bildung unlöslicher Salz-Detergenz-Komplexe zusammen mit Zelldebris, denaturierten Proteinen und denaturierter genomischer DNA führt. Dagegen können die kleineren, kovalent assoziierten Plasmidstränge wieder renaturieren und bleiben in Lösung.

2 ml einer Übernachtkultur in LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin bzw. 20  $\mu$ g/ml Kanamycin, die von einer Einzelkolonie stammte, wurden 5 min bei 5000 rpm in der Heraeus-Zentrifuge zentrifugiert, um die Bakterien zu sedimentieren. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ l Lösung I vollständig resuspendiert, dann durch 10 min Inkubation auf Eis mit 200  $\mu$ l Lösung II lysiert, und schließlich mit 150  $\mu$ l Lösung III zur Fällung von SDS, Protein und genomischer DNA 10 min auf Eis inkubiert (zur Zusammensetzung der Lösungen I-III siehe 2.2.1). Danach wurde das Lysat 20 min lang in der Eppendorf-Zentrifuge bei 14 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, und der Überstand einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Durch die Zugabe des 2,5fachen Volumens an 100 % Ethanol und 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,3) zur wässrigen Phase wurde die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Sedimentation durch 15 min Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 5 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und an der Luft getrocknet, bevor es in 20-50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen wurde. Um restliche RNA zu verdauen, wurden die Proben noch mit 5  $\mu$ l RNase A-Lösung (2 mg/ml) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 3.1.19 Plasmid-Maxipräparation

Zur Gewinnung von reiner, für Zelltransfektionen geeigneter Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers genutzt. Auch hier wird ein modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse angewendet, gefolgt von der Isolation von Plasmid-DNA durch seine von Salz- und pH-Wert-Bedingungen abhängigen Bindung an Anionen-Austausch-Säulen des Kits.

12-16 h vor der Großaufarbeitung wurde eine 250 ml-Kultur (LB-Medium mit 100 μg/ml Ampicillin bzw. 20 μg/ml Kanamycin) mit einer Einzelkolonie oder 10-20 μl aufgetauter Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden dann in der Sorvall-Zentrifuge 15 min lang bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet erst in 10 ml P1-Puffer (mit 0,1 mg/ml RNase A) gründlich resuspendiert. Als nächstes erfolgte ein sanftes Mischen mit 10 ml P2-Puffer und 5 min Lyse bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 10 ml kaltem P3-Puffer fand eine Inkubation für 20 min auf Eis statt. Der Niederschlag wurde durch eine Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C abgetrennt. Durch einen Faltenfilter wurde der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-tip 500-Säule aufgetragen. Nachdem das Lysat die Säule durchlaufen hatte, wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Mit 15 ml QF-Puffer wurde die DNA dann eluiert, durch Zugabe von 10,5 ml (dem 0,7fachen Volumen) raumtemperiertem Isopropanol gefällt, und während 30 min bei 5000 rpm und 4 °C in einer Heraeus-Zentrifuge sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen, wieder 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrigugiert und luftgetrocknet. In 200-500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen, wurde per OD-Messung die Konzentration und die Reinheit der DNA ermittelt und die Integrität des Plasmids mit einem analytischem Restriktionsverdau überprüft.

#### 3.2 Zellkultur-Arbeiten

#### 3.2.1 Allgemeine Zellkultur-Methoden

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte an offenen eukaryontischen Zellkulturen an einer sterilen Werkbank und unter Beachtung von Vorsichtsmaßnahmen (z.B. das ausschließliche Verwenden steriler Lösungen, Abflammen von Gefäßen während des Öffnens und Schließens) durchgeführt.

Bei den genutzten Zelllinien handelte es sich um adhärente Zellen, die mit entsprechendem Kulturmedium (siehe Tab. 2.7) versorgt wurden. Sie wurden bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in einer 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Je nach Wachstum wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und für 1-2 min mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vom Kulturgefäßboden mechanisch gelöst und in 5-10 ml Komplettmedium resuspendiert. Das gewünschte Volumen Zellsuspension (Verdünnung 1:5-1:20) wurde in eine neue Schale überführt und mit Komplettmedium aufgefüllt.

#### 3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Nach Erreichen von 70-80 %iger Konfluenz wurden die Zellen von einer T75-Flasche abtrypsiniert. Anschließend erfolgte die Sedimentation in einer Heraeus-Zentrifuge (5 min bei 1200 rpm) und die Aufnahme der Zellen in 3 ml Einfrier-Medium (2.7.3.2.2). Nach Verteilung der Zellsuspension auf drei Kryokonservierungs-Röhrchen wurden diese, mit einer dicken Lage Papiertüchern verpackt, unter langsamem Abkühlen bis auf -70 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen in Flüssigstickstoff umgelagert.

#### 3.2.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Nach dem Auftauen in einem 37 °C-warmen Wasserbad wurden tropfenweise 10 ml vorgewärmtes Komplettmedium zu den Zellen gegeben. Gleich darauf wurde 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um die Zellen vom zytotoxischen DMSO zu trennen. Schließlich wurde das Zellpellet vorsichtig in 10 ml vorgewärmtem Komplettmedium aufgenommen, in eine Kulturflasche überführt und im Brutschrank kultiviert.

## 3.2.4 Zellzahl- und Lebendzahlbestimmung

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Zelldichte einer Zellsuspension bestimmt werden. Um die Vitalität zu ermitteln, konnte die Zellsuspension vor dem Auszählen in der Kammer 1:2-1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt werden. Dieser Farbstoff kann nur in abgestorbene Zellen eindringen und sie anfärben. Zunächst wurden die Zellen über 16 Zählquadranten gezählt, wobei der Wert zwischen 20 und 200 Zellen liegen sollte. Da diese Anzahl einem Volumen von 0,1  $\mu$ l entspricht, musste er noch mit dem Faktor 10<sup>4</sup> multipliziert werden, um die Zellzahl pro ml Suspension zu erhalten. Insgesamt sollten mindestens 200-300 Zellen gezählt werden.

## 3.2.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur Transfektion eukaryontischer Expressionsplasmide in Zellen wurde das Effectene Transfection Kit von Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet.

Am Vortag wurden Zellen in 6-Loch-Platten so ausgesät, dass bei der Transfektion eine 40-80 %ige Konfluenz erreicht wurde (bei CV1- und COS1-Zellen  $1-2*10^5$ ). Für die Transfektion wurde 0,4 µg Plasmid-DNA mit 100 µl EC-Puffer und 3,2 µl Enhancer durch 1 s Vortexen vermischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur zur DNA-Kondensation wurde 10 µl Effectene-Reagenz hinzugefügt, 10 s gevortext und weitere 10 min zur Bildung der kondensierten Lipid-DNA-Komplexe inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix mit 0,6 ml Medium gemischt und gleichmäßig über die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen getropft, die dann 48-72 h weiterkultiviert wurden.

## 3.3 Arbeiten mit Hefen

## 3.3.1 Aufbewahrung und Kultur von Hefen

Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen mit Bakterien oder anderen Hefen zu vermeiden. Zur Kultivierung wurden die Hefestöcke bei 30 °C Wachstumstemperatur in Flüssigmedium bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte geschüttelt oder auf Agarplatten zwei bis drei Tage kultiviert. Für mehrere Wochen waren Kolonien auf Agarplatten bei 4 °C haltbar, während zur längerfristigen Lagerung Glycerinkulturen aus 2/3 Volumenanteil Flüssigkultur und 1/3 Volumenanteil 86 %igem Glycerin bei –70 °C eingefroren wurden.

## 3.3.2 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Dichte einer Flüssigkultur wurde im Spektrophotometer die Absorption bei 600 nm Wellenlänge ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Dafür wurde die Kultur so verdünnt, dass sich die  $OD_{600}$  nach Abzug des Blindwerts im Bereich von 0,1-1,0 befand, und durch folgende Formel

die Zellkonzentration ermittelt:

Konzentration =  $OD_{600 \text{ nm}} \times Verdünnungsfaktor \times 3 * 10^7$ 

#### 3.3.3 Herstellung von kompetenten Hefezellen und Transformation mit Plasmid-DNA

Am Vortag wurde der Hefestock auf eine Vollmedium-Platte ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Hefezellen wurden mit einer Impföse gesammelt und in einem Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 50  $\mu$ l der Kultur in Röhrchen aliquotiert und 10 s bei 6000 rpm in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Um die Hefezellen kompetent zu machen, wurden sie mit 1 ml 100 mM Lithiumacetatlösung 5 min bei 30 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge hinzupipettiert:

Tab. 3.12 Zu den Hefezellen hinzugefügte Komponenten.

Transformationsansatz
1. 240 µl PEG-Lösung
2. 100-2000 ng Plasmid ad 50 $\mu$ l in H <sub>2</sub> O
3. 36 µl 1 M Lithiumacetatlösung
4. 25 µl ssDNA-Lösung (denaturiert)

Sollte in den Hefezellen eine homologe Rekombination zwischen einem linearen Plasmid und einem Insert-Fragment mit überlappenden homologen Enden stattfinden, so wurden die komplementären Oligonukleotide zusammen 10 min bei 95 °C aufgekocht und über mehrere Stunden langsam abgekühlt, damit sich ein doppelsträngiges Fragment bildete. In den Transformationsansatz wurden dann zusätzlich zu dem linearen Plasmid 14 µg hybridisierter Oligonukleotide hinzugefügt.

Danach wurde der Ansatz 1 min gevortext und 22 min bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert. Die Hefen wurden erneut sedimentiert, in 300  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Kultivierung im 30 °C-Brutschrank konnten Einzelkolonien gepickt werden.

#### 3.3.4 DNA-Extraktion aus Hefezellen

Für die DNA-Extraktion wurden 1,5 ml Hefekultur 30 s bei 6000 rpm in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert und in 200  $\mu$ l TEM resuspendiert. Um die Chitinzellwand zu verdauen, wurden die Zellen mit 7  $\mu$ l Lyticase (5  $\mu$ g/ml) 2,5 h bei 30 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l TCES folgte eine Inkubation von 30 min bei 65 °C. Danach wurden 100  $\mu$ l Kaliumacetatlösung hinzugefügt und das Lysat 45 min auf Eis gelagert. Durch eine Zentrifugation bei 14 000 rpm in der Eppendorfzentrifuge wurden die Zelltrümmer vom DNA-haltigen Überstand getrennt. Dieser wurde anschließend einer Ethanolpräzipitaion unterzogen und in 10  $\mu$ l TE-Puffer aufgenommen.

## 3.3.5 Protein-Extraktion aus Hefezellen

3 ml einer Hefekultur wurden 2 min bei 8000 rpm in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in 300  $\mu$ l SDS-haltigem Hefe-Lysepuffer aufgenommen und 10 min bei 95 °C aufgekocht. Danach wurde der Zelldebris durch 15 min Zentrifugation bei 14 000 rpm und 4 °C in der Eppendorfzentrifuge abgetrennt.

## 3.3.6 Hefekultur zur Pseudovirionenproduktion

Um den Hefestock zu amplifizieren, wurden zunächst 25 ml Selektionsmedium mit Glycerinkultur angeimpft und 48 h bei 30 °C und 130 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in 400 ml glucosefreiem Vollmedium weitere 72 h kultiviert, wobei täglich Galaktose (Endkonzentration 2 %) hinzugefügt wurde. Somit konnten die Hefezellen bei hoher Zelldichte und unter optimalen Expressionsbedingungen Galaktose-induziert die Kapsidproteine produzieren.

## 3.3.7 Aufarbeitung von Rohextrakten

Nach der fünftägigen Kultur wurden die Hefezellen 10 min bei 5000 rpm und 4 °C (Rotor SLA-3000) abzentrifugiert. Die folgende Aufarbeitung fand im Kühlraum bei 4 °C statt. Hierfür wurde das Sediment mit 10 ml HEPES-Puffer und 250 ml PMSF resuspendiert und zusammen mit 15 ml Glaskugeln im Bead-Beater gemixt. Dabei wurden die Zellen zweimal erst 1 min mechanisch aufgeschlossen und 2 min gekühlt. Danach wurden Debris und unaufgeschlossene Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 10 000 rpm und 4 °C im Rotor F28/50 vom Rohextrakt abgetrennt. Das Sediment wurde erneut in 10 ml HEPES aufgenommen und der Aufschlussprozedur unterzogen, wobei beim ersten Durchgang 90 s lang gemixt wurde. Der durch eine anschließende Zentrifugation geklärte Überstand wurde mit dem bereits gewonnenen Extrakt vereinigt und auf Eis maximal 14 Tage gelagert.

Tab. 3.13 Aufschlussprotokoll.		
15 ml Hefesuspension		
1 min bzw. 90 s Aufschluss im Mixer		
2 min Inkubation auf Eis		
1 min Aufschluss im Mixer		
2 min Inkubation auf Eis		

## 3.3.8 Hefe-Immunfluoreszenz

Aus einer Hefe-Übernachtkultur wurde eine neue 10 ml-Kultur angeimpft und bei 30 °C etwa 3 h lang mit 130 rpm geschüttelt, bis eine  $OD_{600}$  von 0,5 erreicht wurde. Zur Fixierung der Zellen erfolgte dann eine Inkubation mit 1 ml 37 %igem Formaldehyd für 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen bei 1500 rpm in der Heraeus-Zentrifuge pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in 0,5 ml Sphäroblastenpuffer aufgenommen wurden. Die fixierten Hefen konnten bei 4 °C für einige Tage gelagert werden.

200 μl der Zellen wurden dann mit 3,2 μl β-Mercaptoethanol und 15 μl Lyticase (5 μg/ml) für 30-90 min bei 30 °C inkubiert, bis zellwandlose Sphäroblasten vorlagen, wobei dies unter dem Mikroskop mitverfolgt wurde. Anschließend folgte ein Waschschritt mit Waschpuffer. Die Hefen wurden dann in 100 μl PBS resuspendiert und auf vorbeschichtete Objektträger in einer feuchten Kammer aufgetragen, wo sie sich für 30 min absetzen konnten. Danach wurden die Objektträger dreimal mit PBS gespült und die Hefen mit Blockierungslösung bedeckt. Nach 1 h bei 37 °C in der feuchten Kammer folgte ein erneutes Waschen und die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung (CAMVIR 1:400) für 1 h bei 37 °C. Der Sekundärantikörper, der zuvor für 1 h bei Raumtemperatur mit Hefeextrakt präinkubiert worden war, um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde nach einem weiteren Waschschritt in Blockierungslösung aufpipettiert. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurden die Präparate gründlich mit PBS gewaschen und mit Elvanol eingebettet.

## 3.4 Methoden zur Herstellung von virusähnlichen Partikeln (VLPs) und Pseudovirionen

## 3.4.1 Herstellung virusähnlicher Partikel

## 3.4.1.1 Amplifikation rekombinanter Baculovirusstämme

Zur Vermehrung rekombinanter Baculovirusstämme wurden 2 ml des Baculovirusstamms in eine T175-Zellkulturflasche mit 4\*10<sup>6</sup> Sf9-Zellen in 20 ml TMN-FH-Medium gegeben. Nach sechs Tagen Infektion und Amplifikation im 27 °C-Brutschrank wurde das Baculovirushaltige Medium 10 min bei 5000 rpm in einer Heraeuszentrifuge von Zellbestandteilen getrennt. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Überstand bei 4 °C gelagert.

## 3.4.1.2 Infektion von TN HIGH five Insektenzellen

Zur Produktion von VLPs wurden TN HIGH Insektenzellen mit 250 ml Ex-cell 450-Medium in einem 1 l-Kolben mit Schikane unter Schütteln bei 27 °C kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von  $2*10^6$ /ml wurden die Zellen 30 min bei 1500 rpm sedimentiert (Rotor SLA-3000), in 30 ml Medium aufgenommen und zusammen mit 8 ml Baculovirusstamm (moi: 2-5) in den 1 l-Kolben überführt. Daraufhin folgte erst 1 h Schütteln bei Raumtemperatur, dann wurde die Kultur mit Medium auf ein Volumen von 250 ml aufgefüllt und bei 27 °C geschüttelt. Nach drei Tagen wurden die Zellen 10 min bei 2000 rpm in einer Heraeuszentrifuge sedimentiert, mit PBS gewaschen und bis zum Aufschluss bei -70 °C aufbewahrt.

## 3.4.1.3 Isolierung der VLPs aus Insektenzellen

Der Aufschluss der Zellen mittels French Press erfolgte auf Eis. Dafür wurden die Zellen in 9 ml Extraktionspuffer und 200  $\mu$ l PMSF resuspendiert. Bevor die Zellsuspension mit 15 000-20 000 kPa behandelt wurde, wurde die French Press-Apparatur mit Ethanol, H<sub>2</sub>O und 7 ml Extraktionspuffer gespült, nach Zelldurchlauf mit 7 ml Extraktionspuffer. Nach Beenden der Aufarbeitung wurde das Gerät nochmals mit Ethanol gespült. Durch zweimaliges

Zentrifugieren für 10 min bei 10 000 rpm und 4 °C im Rotor F28/50 wurde der Zelldebris entfernt. Der Überstand wurde auf einen Zwei-Phasen-Gradienten aufgetragen. Dazu wurden zuvor 8 ml einer 57,5 % (w/v) CsCl-Lösung in ein 25 x 89 mm-Zentrifugenröhrchen pipettiert und vorsichtig mit einer 40 %igen Sucroselösung überschichtet. Nach 2 h Zentrifugation bei 24 000 rpm und 10 °C im Rotor SW28 sammelten sich die Partikel in der Interphase zwischen CsCl und Sucrosekissen. CsCl und Interphase wurden nun abgezogen und mit einer Dichte von 1.37 g/ml in ein Quickseal-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 16 h bei 48 000 rpm im Rotor 70.I Ti. Schließlich wurde der Dichtegradient in 1 ml-Fraktionen ausgetropft und im Refraktometer vermessen. Zur Detektion von VLPs wurden die Fraktionen im Western-Blot und im Transmissionselektronenmikroskop getestet, zur Konzentrationsbestimmung wurden Coomassie-Gele mit Proteinstandards und ELISA-Titrationen durchgeführt.

# 3.4.2 Herstellung von Pseudovirionen durch *in vitro* Zerfall und Zusammenlagerung in Anwesenheit von Plasmid-DNA (*Disassembly/Reassembly*)

Zunächst wurden mit dem Baculovirus-System produzierte, aufgereinigte VLPs ausführlich gegen PBS dialysiert, wobei mehrfach der Puffer ersetzt wurde. Nach Zugabe von β-Mercaptoethanol (Endkonzentration 5 %) folgte eine Inkubation für 16 h bei 4°C, um durch die Reduktion der Disulfidbrücken der Partikel den Zerfall in Kapsomere zu erzielen. Anschließend wurde Plasmid-DNA im Verhältnis ein Partikel/zehn DNA-Moleküle hinzugefügt und das β-Mercaptoethanol durch 24 h Dialyse gegen 4 l *Reassembly*-Puffer (vier bis fünf Pufferwechsel) bei 4 °C entfernt, wodurch sich die Kapsomere wieder zu Partikeln zusammenlagern und mit dem Plasmid assoziieren. Durch den hohen Salzgehalt des Puffers sind die so gewonnenen Pseudovirionen einige Wochen bei 4 °C lagerbar.

## 3.5 Methoden zur Analyse von VLPs und anderen Proteinen

## 3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der denaturierenden Gelelektrophorese werden aufgetragene Proteine annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt. SDS-beladene Proteine weisen im Verhältnis zu ihrer Masse fast identische Ladungen auf, liegen in entfalteter Konformation vor und wandern damit in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße durch die Gelmatrix. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) laufen die Proteinbanden erst durch ein großporiges Sammelgel mit niedrigem pH und werden durch einen abrupten pH-Anstieg an der Phasengrenze zum kleinporigen Trenngel (um ca. 2 Einheiten höherer pH-Wert) fokussiert, bevor sie aufgetrennt werden.

Beim Herstellen der Gele wurde zunächst das Trenngel bis ca. 3 cm unterhalb des oberen Glasrandes gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und mit H<sub>2</sub>O bidest nachgespült. Nun wurde das Sammelgel eingefüllt und ein Probenkamm eingeschoben. Der Kamm konnte nach erfolgter Polymerisation wieder entnommen werden, die Taschen wurden mit H<sub>2</sub>O bidest

gewaschen und das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Nach Einfüllen des Laufpuffers und Beladung der Taschen mit den mit Ladepuffer aufgekochten Proben und 5  $\mu$ l eines vorgefärbten Molekulargewichtsstandards (Low Range Prestained SDS-PAGE-Standard von Bio-Rad) erfolgte die Elektrophorese im Bereich des Sammelgels bei ca. 60 V, im Trenngel bei ca. 90 V.

#### 3.5.2 Western-Blot-Transfer und Nachweis durch enhanced chemoluminescence (ECL)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einem Halbtrocken-Blotting-Verfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert, um nachfolgend mit Hilfe von Antikörpern spezifisch detektiert zu werden. Dabei ermöglichte die Chemilumineszenz, die durch die Oxidation des Luminols entsteht, die autoradiographische Abbildung der Signale. Die Reaktion wird durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerettich-Peroxidase katalysiert.

Die Transfermembran wurde erst 5-10 min in Transferpuffer äquilibriert. Zum Aufbau des Blots wurden zunächst sechs Lagen mit Transferpuffer getränktes 3 MM-Papier auf die Anoden-Platte der Blot-Apparatur gelegt, gefolgt von der Membran und dann dem Polyacrylamidgel. Abschließend wurden sechs weitere Lagen getränktes 3 MM-Papier aufgelegt und eventuelle Luftblasen durch Rollen mit einer Pipette entfernt, bevor die Kathodenplatte aufgesetzt wurde.



Abb. 3.2 Schematischer Aufbau eines Western-Blots.

Der Transfer erfolgte für 60 min bei 180 mA. Zum Absättigen unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde die Membran mit den transferierten Proteinen für 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungslösung geschwenkt. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper, der in geeignetem Verhältnis (siehe Tab. 2.3) mit Blockierungslösung verdünnt wurde, für 60 min bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran dreimal für 15-30 min in Waschlösung geschüttelt worden war, folgten 60 min Inkubation mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Erneut wurde die Membran dreimal für 15-30 min in Waschlösung geschwenkt, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach 10 min Waschen in PBS-Puffer wurde die Membran für 1 min in frisch angesetzter Detektionslösung geschüttelt, anschließend kurz auf 3 MM-Papier abgetropft und in einer Klarsichthülle verpackt in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition der Röntgenfilme erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte 10 s bis 30 min.

#### 3.5.3 Protein-Dot-Blot

Bei dieser Methode wurde das Protein nicht durch elektrophoretischen Transfer, sondern mit Hilfe einer Dot-Blot-Kammer punktförmig auf die mit Transferpuffer befeuchtete Nitrocellulosemembran aufgetragen. Anschließend erfolgte die Detektion wie beim Western-Blot mit entsprechendem Primär- und Sekundärantikörper und ECL.

Um die Bindung von DNA an Kapsidprotein zu untersuchen, wurden VLPs unbehandelt, denaturiert durch 10 min Aufkochen mit SDS-haltigem Proteinladepuffer, disassembliert durch 5 % β-Mercaptoethanol und reassembliert aufgetragen, wobei eine mit DNA-Protein-Transferpuffer befeuchtete Nitrocellulosemembran verwendet wurde. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, folgten zweimal 15 min Schütteln der Membran in DNA-Protein-Blockierungspuffer (mit Milchpulver und tRNA) bei Raumtemperatur. Die <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonde wurde durch 10 min bei 95 °C und sofortiges Abkühlen auf Eis denaturiert und zu 15 ml DNA-Protein-Bindungspuffer pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde die Membran nun über Nacht mit der Sonde auf einer Wippe inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde der Blot viermal 10 min bei Raumtemperatur mit DNA-Protein-Transferpuffer gewaschen, auf 3 MM-Papier getrocknet und wie die Southern-Blots durch Autoradiographie ausgewertet.

## 3.5.4 Unspezifisches Anfärben der Proteinbanden im Polyacrylamidgel durch Coomassie Brilliant Blue

Mit dieser Methode lassen sich alle Banden ab etwa 400 ng Protein detektieren. Die in der Färbelösung enthaltene Essigsäure fällt und fixiert damit die Proteine im Gel. Zur Färbung wurde das Polyacrylamidgel 60 min lang in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Daraufhin wurde so lange in Entfärbelösung entfärbt, bis sich die Banden klar vom Hintergrund abhoben. Das Gel wurde nun auf 3 MM-Papier gelegt, mit Klarsichtfolie bedeckt und im Vakuum-Geltrockner 2 h lang bei 80 °C getrocknet.

#### 3.5.5 Capture-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Zur Detektion und Konzentrationsabschätzung von nativ gefaltetem HPV16 L1 (also Partikeln oder Kapsomeren) diente folgender *capture*-ELISA: Zunächst wurde eine 96-Loch-Platte mit 50  $\mu$ l/Vertiefung einer 1:1000 Verdünnung des HPV16 L1-spezifischen Antikörpers 1.3 in PBS 1 h bei 37 °C oder 16 h bei 4 °C gelagert. Nach 4 x Waschen mit Waschpuffer wurden durch 1 h bei 37 °C mit 50  $\mu$ l/Vertiefung Blockierungslösung unspezifische Bindestellen abgesättigt. Erneut wurde 4 x gewaschen und anschließend 50  $\mu$ l der einzelnen Proben aufgetragen, wobei diese zuvor teilweise mit Blockierungslösung verdünnt worden waren. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde weitere 4 x gewaschen und gebundene Partikel durch das HPV16 L1-spezifische Kaninchenserum 4543, 50  $\mu$ l/Vertiefung, 1:5000 in Blockpuffer verdünnt, detektiert (1 h bei 37 °C). Anschließend wurde nach 4 x Waschen 1 h bei 37 °C mit dem HRP-gekoppelten Ziege- $\alpha$ -Kaninchen-Sekundärantikörper (1:5000 in Blockierungslösung verdünnt) inkubiert, wieder 4 x gewaschen und schließlich 100  $\mu$ l/Vertiefung frisch angesetzte Substratlösung zugegeben.

Wenn die Farbreaktion ausreichend fortgeschritten war, wurde die Platte im ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen.

#### 3.5.6 Transmissionselektronenmikroskopie

10  $\mu$ l einer Probe wurden nach 30-60 min Dialyse gegen PBS auf ein mit Kohle beschichtetes Kupfernetz aufgetropft. Nach 2 min wurde das Netz vorsichtig abgetupft, mit H<sub>2</sub>O beträufelt und abgetupft. Anschließend wurde für 30-60 s 2 %iges Uranylacetat aufgetragen, um eine Negativkontrastierung zu erhalten. Nach Entfernen der Uranylacetatlösung wurde das Kupfernetz bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Betrachtung unter dem Mikroskop aufbewahrt.

#### 3.5.7 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung diente das BCA Protein Assay Reagent. Dafür wurde entsprechend den Angaben des Herstellers eine Reaktionslösung aus 2 % (v/v) Lösung B in Lösung A hergestellt, von der 2 ml mit 10  $\mu$ l Proteinlysat vermischt wurden. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion bei 562 nm im Spektrophotometer gemessen. Anhand bereits bekannter Standardwerte wurde so die Proteinkonzentration ermittelt.

## 3.5.8 CsCl-Gleichgewichtszentrifugation

Um zu analysieren, ob in einer Präparation Partikel mit der Dichte leerer VLPs (1,29-1,30 g/ml) oder auch mit DNA gefüllter Virionen (1,34-1,36 g/ml, Breedis *et al.*, 1962) vorliegen, wurde eine isopyknische Ultrazentrifugation mit CsCl durchgeführt.

Hierfür wurden 419,5 mg CsCl pro ml PBS gelöst. Die 41,95 %ige (w/v) CsCl-Lösung sollte einen Brechungsindex von 1,3675 aufweisen. 13,5 ml-Röhrchen wurden mit der CsCl-Lösung und der Probe gefüllt, austariert und zugeschweißt. Während einer Zentrifugation von mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti stellte sich ein kontinuierlicher Gradient ein, entlang dessen sich die Partikel entsprechend ihrer eigenen Schwebedichte ausrichteten. Das Röhrchen wurde mit einer Kanüle unten angestochen und ausgetropft, wobei in den ersten acht Fraktionen zehn Tropfen, in den folgenden fünf Tropfen gesammelt wurden. Mit einem Refraktometer wurde der Brechungsindex der einzelnen Fraktionen gemessen und anhand einer Tabelle die entsprechende Dichte ermittelt.

## **3.5.9 Zonensedimentation mit Sucrose**

Durch zonale Ultrazentrifugation in Sucrosegradienten werden die Komponenten einer Präparation entsprechend ihrer Sedimentationskoeffizienten separiert. Mit Hilfe dieser Methode wurden Partikel (168 S, Crawford und Crawford, 1963) von Aggregaten (~60 S) und Kapsomeren (11 S) unterschieden. Als S-Wert-Marker dienten AAV-Kapside (60 S), Thyreoglobulin (20 S) und Katalase (11 S).

Zum Erstellen der Gradienten wurden je 6 ml frisch angesetzte 10 % ige und 50 % ige Sucroselösung in die jeweilige Kammer (50 % in die Mischkammer) eines Gradientenmischers eingefüllt. Dann wurde das Verbindungsventil geöffnet und der Mischer angeschaltet. Ein Zentrifugenröhrchen wurde unter der Apparatur justiert und tropfenweise befüllt. Durch den kontinuierlichen Zulauf von 10 % iger Lösung in die Mischkammer entstand ein kontinuierlicher Gradient im Röhrchen, das anschließend noch 30-60 min aufrecht bei 4 °C gelagert wurde. Die Sucroselösung wurde vorsichtig mit 100-500 µl Probe überschichtet und für 3 h bei 36 000 rpm und 4 °C im Rotor SW 41 zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden mittels eines Fraktionssammlers und einer Peristaltikpumpe 600 µl-Fraktionen gesammelt, deren Sucrosekonzentration mit dem Refraktometer bestimmt wurde.

#### 3.5.10 Partielle Aufreinigung von Hefe-Rohextrakten mittels Sucrosekissen

Um einen Großteil der subzellulären Bestandteile von den VLPs im Rohextrakt zu entfernen, wurden 10 ml einer 40 %igen Sucroselösung vorsichtig mit 30 ml des Rohextrakts überschichtet. Nach 2 h Zentrifugation bei 27 000 rpm und 10 °C im Rotor SW 28 wurde der Überstand vosichtig abgenommen und die sedimentierten VLPs mit Hilfe von Ultraschall (2 x 20-30 Mal, *Output control 3, Duty cycle* 70 %) in HEPES-Lösung resuspendiert. Wenn sie nicht sofort mittels HPLC weiter aufgereinigt oder für eine Pseudoinfektion verwendet wurden, wurde der Salzgehalt mit 2 M NaCl-Lösung auf 500 mM erhöht, um die Partikel zu stabilisieren.

#### 3.5.11 HPLC-Aufreinigung von Partikeln mittels Heparinsäule

Die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie oder HPLC (*high-performance liquid chromatography*) erlaubt eine hochauflösende Auftrennung von Proteinen aufgrund von Größenausschluss, Ionenaustausch oder Adsorption. Um die Präparation weiter von zellulären Verunreinigungen zu befreien, wurden 500 µl mittels Sucrosegradient vorgereinigte Partikel mit HPLC-Laufpuffer auf eine mit einer Heparinmatrix gefüllte HiTrap-Säule geladen und mit 2 M NaCl-Lösung nach einem dreistufigen Protokoll (Programm KPNOCO04) eluiert. Während des automatischen Laufs wurde die UV-Absorption des Eluats registiert, das in 0,5 ml-Fraktionen aufgefangen wurde. Abschließend wurde die gesamte Apparatur erst mit HPLC-Laufpuffer und dann mit 20 % Ethanol gespült.

#### 3.5.12 Detektion "DNase-resistenter" DNA

Nachdem die einzelnen Fraktionen erst 1 h gegen DNase I-Puffer dialysiert wurden, wurden sie 2 h bei 37 °C mit 500  $\mu$ g DNase I verdaut, um extern assoziierte DNA zu beseitigen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von EDTA-Lösung (2,5 mM Endkonzentration) und 15 min bei 95 °C gestoppt. Danach erfolgte zur Entfernung der Partikel die Zugabe von 100  $\mu$ g Proteinase K und eine Inkubation für 45 min bei 56 °C, gefolgt von einer Inaktivierung von

15 min bei 95 °C. Die Proben konnten nun mit Hilfe von PCR oder Dot-Blot auf durch die Assoziation mit Partikeln vor DNase I geschützte DNA untersucht werden.

#### 3.5.13 Detektion des Plasmids innerhalb eines CsCl-Gradienten

Um zu analysieren, ob das Plasmid mit schweren oder leichten VLPs assoziiert ist, wurden 25-75  $\mu$ l der entsprechenden Fraktionen eines CsCl-Dichtgradienten mit Hilfe eines Southern-Blots untersucht. Zuvor wurden die Proben jedoch 30-60 min gegen Mikrokokkus-Nuklease-Puffer dialysiert und mit 1 U der Nuklease für 1 min bei Raumtemperatur verdaut. Dies war nötig, um störende Signale durch freie DNA zu beseitigen. Das Beenden der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu$ l 250 mM EGTA-Lösung. Die DNA wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt und auf das Agarosegel für den Southern-Nachweis aufgetragen.

#### 3.6 Methoden zur Pseudoinfektion von Zielzellen

#### 3.6.1 Pseudoinfektion von Zielzellen

Als Standard für Zielzellen wurden COS1-Zellen verwendet. Am Vortag wurden je nach Zelllinie  $4-20*10^4$  Zellen pro Vertiefung in 6-Loch-Platten ausgesät (15-30 % Konfluenz am Tag der Infektion), wobei kein Trypsin, sondern ein enzymfreier Zelldissoziationspuffer zum Ablösen der Zellen diente, um die Oberflächenrezeptoren nicht zu beeinträchtigen. Präparationen mit hohem Salzgehalt wurden erst 1-2 h bei Raumtemperatur gegen PBS dialysiert, während Hefe-Rohextrakte nicht vorbehandelt wurden. Für eine Neutralisierung der Pseudovirionen wurden die Präparationen dann 16 h bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur mit den Antikörpern präinkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese für 1-2 h bei Raumtemperatur mit 2 ml Hefe-Rohextrakt bzw. 200  $\mu$ l PBS und *in vitro* hergestellten Pseudovirionen auf einer Wippe inkubiert. Bei Verwendung von Hefe-Rohextrakten mussten diese durch mehrfaches gründliches Waschen mit PBS entfernt werden, während dies bei *Disassembly/Reassembly*-Präparationen nicht nötig war. Schließlich wurden die Zellen mit je 2 ml Medium versorgt und im Brutschrank weiterkultiviert.

Nach 48-72 h konnte die Expression des Reportergens untersucht werden, wobei EGFPpositive Zellen *in situ* mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop detektiert oder geerntet und im Durchflusszytometer quantifiziert wurden, während  $\beta$ -Galaktosidase-positive Zellen nach einer X-Gal-Färbung unter dem Mikroskop analysiert wurden.

#### 3.6.2 Quantitative Analyse EGFP-fluoreszenter Zellen im Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) genannt, erfasst die Größe, Granularität und Fluoreszenzintensität einzelner Zellen. Dabei werden die Zellen im Messgerät einzeln aufgereiht, mit einem Argon-Laser bestrahlt und ihre Lichtstreuung bzw. fluoresziertes Licht von Fotodioden detektiert. Da so eine große Anzahl Zellen pro Probe analysiert werden kann, lassen sich quantitative Aussagen über den Anteil

fluoreszierender Zellen in einer Gesamtpopulation treffen. Sowohl bei der Messung als auch der Auswertung wurde CellQuest-Software benutzt.

48-72 h nach Pseudoinfektion wurden die Zellen trypsiniert, durch einen Netzfilter pipettiert, einmal mit filtriertem PBS gewaschen und in 50  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Durch das Propidiumjodid im Puffer, das nur in tote Zellen eindringen kann, konnten diese von den Messungen ausgeschlossen werden. Es wurden also nur 10 000-100 000 lebende Zellen (im *living gate*) gespeichert.

Bei der anschließenden Auswertung wurde zusätzlich nur die Zellpopulation mit Größe und Granularität im Normbereich berücksichtigt. Zur Analyse der EGFP-Expression wurde die F1-Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen graphisch dargestellt. Dabei waren die Einstellungen bei der Messung so justiert, dass sich EGFP-negative Zellen im Fluoreszenzbereich bis 10 befanden, während EGFP-positive Zellen eine über dieser definierten Grenze liegende Fluoreszenzintensität aufwiesen. Als Parameter für die Effizienz einer Pseudoinfektion wurde entweder der prozentuale Anteil positiver Zellen oder der Y Geo Mean-Wert gewählt. Dieser beschreibt die Verteilung der Fluoreszenzintensität aller über dem Grenzwert liegenden Zellen und ermöglicht auch bei sehr wenigen positiven Zellen, eine EGFP-Expression nachzuweisen.

## 3.6.3 X-Gal-Färbung

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen *in situ* oder auf Objektträgern für 5 min bei 4 °C mit Fixierungslösung inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit der frisch angesetzten X-Gal-Färbelösung Substrat auf die Zellen gegeben. Nach 6-16 h bei 37 °C konnten  $\beta$ -Galaktosidase-positive Zellen anhand des blauen Präzipitats unter dem Mikroskop detektiert werden.

## 4 Ergebnisse

## 4.1 HPV16-Pseudovirionen-Produktionssystem in der Hefe Saccharomyces cerevisiae

Wie in 1.4.1 beschrieben, beruht das Produktionssystem von Rossi *et al.* (2000) auf Hefeklonen, die zwei 2µm-basierte Plasmide enthalten. Das Verpackungsplasmid, das für die Kapsidgene HPV16 L1 und L2 kodiert, trägt den *leu2-d*-Marker, der neben einem Selektionsmarker für Leucin-Auxotrophie *in trans* Replikationsfaktoren für die episomale Replikation von Plasmiden mit 2µm-ori-Sequenz liefert (Futcher, 1986). Sowohl das Verpackungsplasmid als auch das Zielplasmid enthalten diese 2µm-ori-Sequenz und liegen zusammen mit einer Kopienzahl von 60-100/Zelle vor. Das Zielplasmid soll in die Pseudovirionen verpackt werden: Es trägt das Reportergen, den *ura3*-Selektionsmarker und Elemente, die die Verpackungsplasmid die kritische Größe von 8 kb übersteigt, ist es zu groß für eine Enkapsidierung. Plasmide und Hefestämme wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Müller, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt.



Abb. 4.1 Prinzip der Pseudovirionenproduktion in Hefe. Erläuterung im Text.

## 4.1.1 Klonierung des EGFP-Gens in das Zielplasmid

Gegenüber dem GFP-Gen sind bei der EGFP-Variante die Kodons für eine effiziente Expression in Säugerzellen optimiert und zwei Aminosäuren ausgetauscht (Phe-64-Leu, Ser-65-Thr), woraus eine 35fach intensivere Fluoreszenz resultiert (Cormack *et al.*, 1996). Da pEGFP-C3 für die Konstruktion von Fusionsgenen entwickelt wurde, beendet ein Stopkodon erst 78 bp nach dem Ende der eigentlichen EGFP-Sequenz die Translation, was zu einer C-terminalen Verlängerung um folgende 26 Aminosäuren führt: Tyr-Ser-Asp-Leu-Glu-Leu-Lys-Leu-Arg-Ile-Leu-Gln-Ser-Thr-Val-Pro-Arg-Ala-Arg-Asp-Pro-Pro-Asp-Leu-Asp-Asn.

Zu Beginn dieser Arbeit lag bereits das 2µm-basierte Hefeplasmid pYES2\*-VP22-E7<sub>1-60</sub>bac vor, das abgesehen vom EGFP-Reportergen alle benötigten Sequenzen und die richtige Größe aufwies. Zur Konstruktion des EGFP-Zielplasmids pYES2\*-EGFPbac wurde bei pYES2\*-VP22-E7<sub>1-60</sub>bac das 1155 bp lange VP22-E7-Fusionsgen durch eine ebenso lange EGFP-MCS-Sequenz aus dem pEGFP-C3-Plasmid (Clontech) ersetzt (Abb. 4.2). Hierfür wurde zuvor die EGFP-Sequenz mittels PCR mit den benötigten Restriktionsschnittstellen NotI und AfIII amplifiziert.
Nach einer sequenzanalytischen Überprüfung wurde pYES2\*-EGFPbac in CV1-Zellen transfiziert. Nach zwei bis drei Tagen Zellkultur konnte eine EGFP-Fluoreszenz unter dem Mikroskop detektiert werden, wobei die quantitative FACS-Analyse eine im Vergleich zu pEGFP-C3 geringeren Anteil EGFP-positiver Zellen ergab (Abb. 4.3). Da pYES2\*-EGFPbac etwa doppelt so groß wie pEGFP-C3 ist und somit bei einer Transfektion von 0,4 µg DNA nur halb so viele Moleküle vorliegen, war dies zu erwarten.



**Abb. 4.2** Klonierungsschema zur Herstellung eines Zielplasmids mit EGFP-Reportergen. Zunächst wurde VP22-E7<sub>1-60</sub> durch EGFP ersetzt. Um ein 7906 bp großes Plasmid zu erhalten, wurden vor der Transformation in Hefe bakterielle Sequenzen mit SwaI entfernt.



**Abb. 4.3** EGFP-Expression nach Transfektion von pYES2\*-EGFPbac und pEGFP-C3 in CV1-Zellen: Quantitative FACS-Analyse (A), Durchlichtaufnahme (B) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (C). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment, bei dem die pEGFP-C3-Transfektion als 100 %-Standard gesetzt wurde (üblicherweise lag der absolute Wert bei etwa 30 % EGFP-positiver Zellen). Mit Hilfe des Effectene-Reagenz (Qiagen) wurden je 0,4 µg DNA zur Transfektion von zuvor in 6-Loch-Platten ausgesäten CV1-Zellen eingesetzt (Duplikate).

Vor der Transformation in Hefezellen wurde die bakteriell amplifizierte Plasmid-DNA durch den Verdau mit SwaI und eine anschließende Rezirkularisierung (Abb. 4.4) auf die Größe des HPV16-Genoms von 7906 bp verkleinert; dabei wurde ein Fragment mit nicht weiter benötigten bakteriellen Sequenzen wie der Ampicillin-Resistenz und dem *E. coli*-ori entfernt.



**Abb. 4.4** Ligation zur Rezirkularisierung des Zielplasmids. Obwohl Reaktionsbedingungen gewählt wurden, die eine Rezirkularisierung favorisieren sollten (50 ng DNA/ $\mu$ l in 600  $\mu$ l Gesamtvolumen, 25 h bei Raumtemperatur), kam es hauptsächlich zur Bildung von Konkatemeren.

# 4.1.2 Transformation und Selektion von Hefeklonen zur Pseudovirionenproduktion

Mittels Lithiumacetat-Hitzeschock-Methode (3.3.3) wurde das Zielplasmid in den Saccharomyces cerevisiae-Stamm # 1699-pD125 (kurz: pD125) eingeschleust. Dieser Stamm enthält bereits das Verpackungsplasmid pD125. Da sich die Rezirkularisierung des Zielplasmids nach Entfernen der bakteriellen Sequenzen als sehr ineffizient erwies und hauptsächlich Konkatemere vorlagen (Abb. 4.4), wurde neben dem Ligationsansatz auch lineares Zielplasmid zusammen mit Primern transformiert, die die Schnittstellen überlappen, um über homologe Rekombination in der Hefezelle zirkuläres Plasmid zu erhalten. Die durch Selektion auf Uracil- und Leucin-freiem Medium gewonnenen Kolonien wurden vor der Analyse mehrmals vereinzelt, um Mischklone auszuschließen. L1-exprimierende Klone wurden im Western-Blot (Abb. 4.5) identifiziert und mittels PCR auf die Anwesenheit von EGFP-DNA getestet, wobei Primer verwendet wurden, die die gesamte EGFP-Sequenz amplifizieren (Abb. 4.6). Zur Kontrolle der korrekten Plasmidgröße wurde die DNA der Transformanden im Southern-Blot analysiert (Abb. 4.7): Dabei zeigten viele Klone nicht das erwartete Bandenmuster (nur die Klone Nr. 4, 5, 8 und 12 in Abb. 4.7). Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung sind die Transformation von Konkatemeren und Veränderungen der episomalen Plasmide durch homologe Rekombinationsereignisse zwischen den Plasmiden.



**Abb. 4.5** Western-Blot zur Detektion L1-positiver Transformanden. Hierfür wurden Proteinlysate der Hefeklone nach Kultur in Galaktose-haltigem Medium in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt, geblottet und mit dem HPV16 L1-spezifischen Antikörper CAMVIR1 untersucht. Obwohl ein L1-positiver Klon transformiert worden war, zeigen nicht alle Transformanden eine gleich effiziente Expression.



**Abb. 4.6** PCR zur Detektion EGFP-positiver Transformanden. Hierfür wurden DNA-Lysate der Hefeklone einer PCR unterzogen, bei der ein 720 bp langes Amplifikationsprodukt, das die gesamte EGFP-Sequenz umfasst, generiert wird. Eine zusätzliche Bande ist bei ca. 400 bp zu sehen. NK = Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne DNA. PK = Positivkontrolle: pEGFP-C3.



**Abb. 4.7** Southern-Blot-Analyse der Größe des Zielplasmids in den Hefeklonen. Hefe-DNA-Extrakt wurde in einem 0,5 % Agarosegel aufgetrennt und mit einer EGFP-Sonde detektiert. Gezeigt werden Zwölf Hefe-Transformanden und Größenreferenzen. PK = Positivkontrolle: 7,8 kb großes, EGFP-kodierendes Plasmid pGEM-REC1-IRES. linear = lineares pYES2\*-EGFP: 7,9 kb. Zirkuläres pYES2\*-EGFPbac: 9,8 kb.

# 4.1.3 Nach Induktion der Kapsidproteinexpression konnten Partikel isoliert werden

Mehrere positive Klone aus verschiedenen Transformationen wurden zur Partikelproduktion eingesetzt. Das Kultivierungsprotokoll (Abb. 4.8) beginnt mit einer zweitägigen Vorkultur unter Selektionsbedingungen, der eine dreitägige Produktionsphase mit Galaktose-haltigen Vollmedium folgt. Unter den optimalen Wachstumsbedingungen können die Hefezellen eine sehr hohe Dichte erreichen (bis zu  $2 * 10^9$ /ml), und der Induktor Galaktose führt zur Expression der Kapsidproteine. Um die Partikel zu isolieren, wurden die Hefezellen mechanisch aufgeschlossen und die Rohextrakte durch Zentrifugation von Zelldebris befreit.



Abb. 4.8 Schema zur Pseudovirionenproduktion. L<sup>-</sup>U<sup>-</sup>-Medium = Selektionsmedium ohne Leucin und Uracil.

# Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die Rohextrakte wurden zunächst auf ihren Partikelgehalt untersucht. In einem *capture*-ELISA, der nur korrekt gefaltetes L1-Protein, also Partikel oder Kapsomere, erkennt (siehe 3.5.5), wurde die Konzentration der einzelnen Rohextrakte ermittelt. Abb. 4.9 zeigt eine beispielhafte Aufarbeitung: Generell wurden Konzentrationen von 10-100  $\mu$ g/ml erreicht; das entspricht 3 \*10<sup>11</sup>-10<sup>12</sup> Partikeln/ml.



**Abb. 4.9** L1-*capture*-ELISA von Hefe-Rohextraktion zur Konzentrationsabschätzung. Als Referenz dienten VLPs aus dem Baculovirus-System mit bekannter Konzentration. Der parentale Hefestamm 1699 ist im Gegensatz zu pD125 (10  $\mu$ g/ml) und zwei Transformanden (A und B; 90  $\mu$ g/ml) L1-negativ.

### Sedimentationsanalyse der Rohextrakte

Um nachzuweisen, dass die ELISA-Reaktivität tatsächlich auf Partikeln und nicht auf Kapsomeren beruht, wurden die Rohextrakte einer Sedimentationsanalyse mittels Sucrosegradienten unterzogen. Die gewählten Zentrifugationsbedingungen führen zu einer Auftrennung von Partikeln (168 S), unvollständig zusammengelagerten Partikeln oder Aggregaten (~60 S) und Kapsomeren (11 S). In Abb. 4.10 sind repräsentative Experimente gezeigt. Als Positivkontrolle dienten die Gradientenprofile von aufgereinigten VLPs aus dem Baculovirus-System. Um zu demonstrieren, dass auch bei der Produktion von VLPs in Insektenzellen nicht alle Präparationen eine homogene Population von VLPs enthalten (Abb. 4.10A, siehe Peak in Fraktionen 3-6), sondern dass manchmal auch viel aggregiertes, unvollständig assembliertes Material vorliegt (Abb. 4.10B, Fraktionen 7-13), sind die Gradientenprofile von zwei verschiedenen VLP-Aufarbeitungen aufgeführt. Die Profile von Hefe-Rohextrakten, sowohl des Kontrollklons pD125 als auch des Transformandenklons A, zeigen beide einen Peak, der im Vergleich zu den Kontroll-VLPs geringfügig in Richtung eines geringeren S-Werts verschoben ist (unter der Berücksichtigung der reduzierten Anzahl an Fraktionen). Kapsomermaterial ist kaum vorhanden. Bei Betrachtung mehrerer Peakfraktionen beider Gradienten unter dem Elektronenmikroskop (freundlicherweise von Frau B. Hub, DKFZ Heidelberg, durchgeführt) wurden VLPs gefunden, die zum Teil einzeln vorlagen, oft aber miteinander oder mit Debris aggregiert waren (Abb. 4.11), was vielleicht für die S-Wert-Verschiebung verantwortlich ist. Bei der Analyse der Sucrosegradienten konnten keine Unterschiede zwischen pD125 und Transformandenklonen festgestellt werden.



**Abb. 4.10** L1-*capture*-ELISA von Sucrosegradienten. 30-50 µg VLPs bzw. 1 ml Rohextrakt wurden auf einen Sucrosegradienten aufgetragen und 3 h bei 36 000 rpm im Rotor SW 41 bei 4 °C zentrifugiert. A) VLP-Präparation. B) VLP-Präparation. C) Rohextrakt von pD125. D) Rohextrakt von Hefeklon A.



Abb. 4.11 Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer Partikel-Fraktion eines Sucrosegradienten. Die Pfeile markieren VLPs.

# Kontrolle der L2-Expression

Um festzustellen, ob auch das Nebenkapsidprotein L2 in den Hefezellen exprimiert wird, wurden Proteinextrakte im Western-Blot überprüft (Abb. 4.12). Dabei konnte in allen Fällen eine L2-Expression nachgewiesen werden. Allerdings lässt diese Analyse nicht erkennen, ob L2 in die Partikel inkorporiert wurde. Hierfür wurden die Rohextrakte in CsCl-Gradienten aufgetrennt und die Fraktionen dann mittels Western-Blot parallel auf den Gehalt an L1 und L2 hin untersucht (siehe 4.1.4).



Abb. 4.12 L2-Western-Blot mit Hefeextrakten von drei Transformanden und pD125. Nach vier und fünf Tagen Kultur wurden Proteinextrakte hergestellt, in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und mit dem HPV16 L2-spezifischen Serum # 20 analysiert. a = nach vier Tagen Kultur. b = nach fünf Tagen Kultur.

# 4.1.4 Detektion unterschiedlich dichter Partikel im CsCl-Gradienten.

Die Auftrennung der Rohextrakte im CsCl-Gradienten ergab im L1-*capture*-ELISA einen breiten Peak im Bereich von 1,28-1,34 g/ml, und zwar bei Extrakten von Hefeklonen mit und ohne Zielplasmid (Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Dieser Bereich deckt sowohl die Schwebedichte

"leichter" VLPs (1,29-1,30 g/ml) als auch schwerer, also DNA-haltiger Partikel (1,34-1,36 g/ml) ab (Breedis *et al.*, 1962). Dabei lassen sich allerdings nicht zwei diskrete Peaks unterscheiden: Die meisten Partikel bandieren jeweils bei 1,30-1,32 g/ml Schwebedichte, was auch in den entsprechenden Western-Blots für L1 (55 kD) und L2 (72 kD) zu erkennen ist (Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Die Partikel bestehen also aus L1 und L2.

Obwohl diese Daten das Vorliegen von Plasmid-haltigen Partikeln oder Pseudovirionen nicht ausschließen, demonstrieren die Signale in den korrespondierenden Fraktionen der Negativkontrolle pD125, die kein Zielplasmid enthält, dass eine erhöhte Schwebedichte nicht auf der Verpackung des Zielplasmids beruhen muss. Möglicherweise kommt es in der Hefezelle zur Verpackung oder Anlagerung zellulärer DNA (wurde auch in Insektenzellen beobachtet; Fligge *et al.*, 2001) oder von Chromatin.

Die elektronenmikroskopische Analyse von einzelnen CsCl-Peakfraktionen wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Zentgraf, DKFZ Heidelberg, durchgeführt. Dabei waren in den Peakfraktionen Partikel zu sehen, die zum großen Teil mit zellulärem Debris assoziiert waren (Abb. 4.15), was möglicherweise das breite Spektrum der Schwebedichte erklärt.



**Abb. 4.13** CsCl-Gleichgewichtszentrifugation von Hefeextrakt (pD125): L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). 3 ml Rohextrakt wurden mit 10,5 ml CsCl-Lösung gemischt und mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Gradienten mit dem Refraktometer vermessen.



**Abb. 4.14** CsCl-Gleichgewichtszentrifugation von Hefeextrakten (Klon A und B): L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). Je 3 ml Rohextrakt wurden mit 10,5 ml CsCl-Lösung gemischt und mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Gradienten mit dem Refraktometer vermessen.



**Abb. 4.15** Elektronenmikroskopische Aufnahme von einer Peakfraktion eines CsCl-Gradienten mit Rohextrakt eines Hefeklons mit Zielplasmid. Die Pfeile markieren VLPs.

# 4.1.5 Mit Hefe-Rohextrakten konnte keine Pseudoinfektion von Zielzellen nachgewiesen werden.

Um eine Pseudoinfektion zu erzielen, wurden aus Hefekulturen hergestellte Rohextrakte mit CV1- und COS1-Zellen inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen konnte keine EGFP-Expression (bzw. keine über dem Hintergrund liegende Fluoreszenz) mittels FACS oder Mikroskop, also keine Pseudoinfektion, detektiert werden. Der manchmal beobachtete Anstieg der Fluoreszenz trat auch bei den Negativkontrollen (pD125- und 1699-Rohextrakt) auf. Mit neutralisierenden Antikörpern präinkubierte oder hitzeinaktivierte Extrakte führten nicht reproduzierbar zu einer verminderten Fluoreszenz. Besonders bei CV1-Zellen traten erhebliche Schwankungen der Autofluoreszenz nach einer Inkubation mit Hefeextrakt auf: Die gesamte Population zeigte einen moderaten Anstieg der Fluoreszenzintensität, und manchmal war eine stärker fluoreszierende Subpopulation vorhanden (siehe Pfeil in Abb. 4.16A), die den Anschein einer EGFP-Expression vermittelte. Allerdings erschien diese Subpopulation manchmal auch bei nur mit Medium inkubierten CV1-Zellen (Abb. 4.16B). Da diese sehr variablen Autofluoreszenzeigenschaften eine Auswertung anhand des prozentualen Anteils aller Zellen, deren Fluoreszenzintensität über einem Grenzwert liegt (EGFP-positive Zellen (%)), stark einschränkten, wurde der Y Geo Mean-Wert bevorzugt. Dieser Parameter beschreibt die Verteilung der Fluoreszenzintensität aller über dem Grenzwert liegenden Zellen. In Experimenten mit in vitro-generierten Pseudovirionen (siehe 4.2) erlaubte der Y Geo Mean-Wert auch trotz eines Hintergrunds moderat fluoreszierender Zellen, EGFP-positive Zellen anhand ihrer stärkeren Fluoreszenzintensität nachzuweisen, selbst wenn es sich um weniger als 0,1 % der Gesamtpopulation handelte. Abb. 4.17A zeigt ein Experiment, bei dem bei Transformanden-Klon A scheinbar eine Pseudoinfektion vorliegt; es ist sogar ein größerer Anteil der Zellen "EGFP-positiv" als bei der parallel durchgeführten, ineffizienten Transfektion. Der korrespondierende Y Geo-Mean-Wert impliziert allerdings, dass es sich

hier um Autofluoreszenz handelt, denn er liegt wie alle anderen Werte mit Ausnahme der Positivkontrolle (Transfektion) nicht signifikant über dem Hintergrund der Mediumkontrolle. Noch deutlicher ist dies bei dem parallel durchgeführten Experiment mit COS1-Zellen (Abb. 4.17B) zu erkennen, die wesentlich weniger starke Hintergrundabweichungen zeigten. Die Vermutung eines falsch positiven Ergebnisses konnte durch eine Western-Blot-Analyse bestätigt werden, bei der keine EGFP-Expression nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.16** FACS-Analyse von mit Hefe-Rohextrakten behandelten CV1-Zellen. Der Pfeil markiert eine autofluoreszierende Subpopulation. A) Histogramm. Blau: Medium-Kontrolle. Pink: 1699. Violett: Klon A. B) Dot-Blot der Medium-Kontrolle.



Abb. 4.17 FACS-Analyse von mit Hefe-Rohextrakten behandelten CV1- (A) und COS1-Zellen (B). Drei Tage nach 2 h Inkubation von 2 ml Rohextrakt/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium, mit Hefeextrakt ohne Partikel und EGFP-Plasmid (1699) und mit Hefeextrakt ohne EGFP-Plasmid (pD125). Außerdem wurden mit neutralisierenden Antikörpern präinkubierte (1.4 1:1000 über Nacht bei 4 °C) und durch 10 min bei 95 °C hitzeinaktivierte Extrakte getestet. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit 0,4  $\mu$ g pEGFP-C3. Es ist jeweils der Anteil an EGFP-positiven Zellen (%) bzw. der Y Geo Mean gezeigt.

### Modifikation der Kultur- und Infektionsbedingungen

Da zunächst nicht klar war, ob vielleicht eine ineffiziente Pseudoinfektion durch den hohen Hintergrund maskiert wurde, wurden einige Parameter der Inkubation verändert. Doch die Variation der Infektionstemperatur (4 °C statt Raumtemperatur), 4 h statt 2 h Inkubationsdauer oder unterschiedlich gründliches Waschen nach der Inkubation führten nicht zu einer nachweisbaren Pseudoinfektion (Abb. 4.18).



Abb. 4.18 FACS-Analyse von mit Hefe-Rohextrakten behandelten CV1-Zellen. Zwei Tage nach Inkubation von 2 ml Rohextrakt/6-Loch wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen wurde mit Medium bzw. mit Hefeextrakt ohne EGFP-Plasmid (pD125) inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 2 h bzw. 4 h; die Inkubationstemperatur lag bei 4 °C bzw. RT = Raumtemperatur. Bei den mit 5 h gekennzeichneten Proben wurden zunächst nur die Rohextrakte durch Medium ersetzt, und ein gründliches Waschen mit PBS erfolgte erst 5 h später.

Da episomale 2µm-Plasmide in Hefezellen ohne Selektionsdruck nicht sehr stabil sind, wurden die Hefezellen während der gesamten Zeit ohne Leucin (Auxotrophiemarker des Verpackungsplasmids) und ohne Uracil (Auxotrophiemarker des Zielplasmids) kultiviert. Dies resultierte jedoch in einem wesentlich schlechterem Wachstum als in Vollmedium (Abb. 4.19). In Abb. 4.20 ist zu sehen, dass auch eine ständige Selektion während der Kultur nicht zu einer nachweisbaren Pseudoinfektiosität führt.



**Abb. 4.19** Per OD-Messung ermittelte Zelldichte während der mehrtägigen Hefekultur. Während die Dichte in Vollmedium in den letzten beiden Tagen deutlich zunimmt, bleibt sie in Leucin- und Uracil-freiem Selektionsmedium (L<sup>-</sup>U<sup>-</sup>) auf niedrigem Niveau. L<sup>-</sup>U<sup>-</sup> = Selektionsmedium. YPG = Vollmedium.



Abb. 4.20 FACS-Analyse von mit Hefe-Rohextrakten behandelten COS1-Zellen. Zwei Tage nach 3,5 h Inkubation von 2 ml Rohextrakt/6-Loch bei 4 °C wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium und mit Hefeextrakt ohne EGFP-Plasmid (pD125). Zur Neutralisierung wurde der Extrakt mit 4345-Serum in der Verdünnung 1:1000 über Nacht bei 4 °C präinkubiert. Die hitzeinaktivierte Probe wurde 10 min gekocht. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit 0,5  $\mu$ g pEGFP-C3. Mit L<sup>-</sup>U<sup>-</sup> gekennzeichnete Extrakte stammen aus Selektionskultur, mit YPG gekennzeichnete Extrakt aus Kultur mit Vollmedium.

# Aufreinigung der Partikel durch Sucrosegradienten und Affinitäts-Chromatographie

Die elektronenmikroskopischen Analysen (siehe Abb. 4.11. 4.15) die und Hintergrundprobleme nach der Inkubation von Zellen implizieren, dass die Rohextrakte noch sehr viel zellulären Debris enthalten, der möglicherweise undefinierte Sekundäreffekte wie die erhöhte Autofluoreszenz verursacht und vielleicht die Infektiosität der Partikel inhibiert. Deshalb sollte durch weitere Aufreinigungsschritte versucht werden, nachweislich infektiöse Partikelpräparationen zu erhalten. Hierzu wurde der Rohextrakt über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die so von einem Großteil des Hefedebris befreiten Partikel konnten CV1-Zellen nicht pseudoinfizieren (Abb. 4.22A). Alternativ wurden die Partikel zur weiteren Aufreinigung auf eine Heparinsäule geladen und durch erhöhte Salzkonzentrationen (Abb. 4.21) eluiert, wobei drei Partikel-haltige Peakfraktionen gewonnen wurden, die aber im Vergleich zum Rohextrakt nicht angereichert waren (Abb. 4.22C, 4.22D). Auch nach dieser zusätzlichen Reinigung konnte keine Pseudoinfektion von CV1-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.22B).



**Abb. 4.21** Profil des HPLC-Laufs zur Partikelaufreinigung nach Programm kpnoco04. Um eine effiziente Elution der Heparin-gebundenen Partikel zu erreichen, wurde diese in drei Stufen mit den angegebenen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen durchgeführt.



Abb. 4.22 A), B) FACS-Analysen von mit aufgereinigten Partikeln behandelten CV1-Zellen. Zwei Tage nach 2 h Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium und mit Hefeextrakt ohne EGFP-Plasmid (pD125). Ein Teil der Extrakte wurde mit 4543 in der Verdünnung 1:5000 für 1 h bei Raumtemperatur präinkubiert oder durch 10 min bei 95 °C hitzeinaktiviert. A) FACS-Analyse von mit über einen Sucrosegradienten vorgereinigten Partikeln behandelten CV1-Zellen (pro 6-Loch wurden 200 μl von insgesamt 700 μl eingesetzt). B) FACS-Analyse von mit über Heparinsäulenchromatographie vorgereinigten Partikeln behandelten CV1-Zellen (pro 6-Loch wurde die 3 ml Rohextrakt entsprechende Menge eingesetzt). C) L1-*capture*-ELISA der Heparinsäulefraktionen. Die Proben wurden hierfür 1:50 verdünnt. D) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Partikelfraktion. Zwischen den drei Peakfraktionen waren unter dem EM keine Unterschiede erkennbar. Partikel sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das Foto wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Zentgraf, DKFZ Heidelberg, aufgenommen.

# 4.1.6 Analyse der Hefekultur auf Verlust der Plasmide

Episomale Hefeplasmide, die mit Hilfe des  $2\mu$ m-Systems in der Zelle repliziert werden, weisen ohne Selektionsdruck generell eine Verlustrate von  $10^{-2}$  oder mehr pro Generation auf; selbst unter Selektionsbedingungen gelten 5-40 % Verlust während der Kulturphase als realistisch (Jayaram *et al.*, 1983; Murray und Szostak, 1983). Deshalb sollte untersucht werden, ob ein massiver Verlust der Plasmide während der Hefekultur stattfindet, der für das Scheitern der Pseudovirionenproduktion verantwortlich sein könnte. Diese Überlegung ist wichtig, da während der Produktionsphase des Kultivierungsprotokolls zur Verbesserung des Wachstums und der Expression auf eine Selektion verzichtet wurde.

Während der fünftägigen Hefekultur (siehe auch Schema in Abb. 4.8) wurde täglich ein definiertes Volumen Kulturflüssigkeit sowohl auf Selektions-, als auch auf Vollmedium ausgestrichen und die Anzahl der Kolonien verglichen. In Abb. 4.23A ist zu sehen, dass bereits nach zwei Tagen Selektionskultur etwa doppelt so viele Kolonien auf Vollmedium wie auf Selektionsmedium wachsen konnten. Nach Kultur in Vollmedium traten sogar zwei- bis dreimal mehr Kolonien auf – dies wurde aber schon am ersten Tag nach Wegfall der Selektion beobachtet, und das Verhältnis verschlechterte sich während der weiteren Kultur in Vollmedium nicht (Abb. 4.23B, 4.23C). Offensichtlich enthielten also konstant nur ein Drittel bis die Hälfte aller Hefezellen beide Plasmide.











Abb. 4.23 Anzahl der Kolonien auf Selektions- (L<sup>-</sup>U<sup>-</sup>) und Vollmedium (YP). 30 µl einer 1:100-Verdünnung (A) bzw. einer 1:500-Verdünnung (B) wurden auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, nach drei Tagen wurden die Kolonien gezählt. Für ein Schema des Kulturprotokolls siehe Abb. 4.8. A) Nach zwei Tagen Selektion. B) Nach drei weiteren Tagen in Vollmedium. C) Verhältnis der Anzahl Kolonien auf Selektions- zu Vollmedium während der Kultur.

Weiterhin sollte überprüft werden, ob der Plasmidverlust in einer verminderten Kapsidproteinexpression und einem Mangel an Zielplasmid resultiert. Hierfür wurden während der Hefekultur täglich Aliquots entnommen und aus einem Volumen, das einer konstanten Zellzahl entspricht, Protein- und DNA-Extrakte hergestellt. Die Dot-Blots in Abb. 4.24A und 4.24B bestätigen, dass es zu keinem gravierenden Verlust der L1- und L2-Expression kommt, sondern sogar zu einer Akkumulierung der Proteine. Spalte a dient als Negativkontrolle (ohne Induktion der Kapsidproteinexpression) – die Signale bei L2 sind unspezifischer Hintergrund. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des vorigen Experiments ist die Kopienzahl des Zielplasmids zwar in Selektionsmedium um den Faktor zwei erhöht. Dennoch ist keine kontinuierliche Abnahme während der weiteren Kultur zu beobachten (Abb. 4.24C).



**Abb. 4.24** Dot-Blots zur L1- (A) und L2-Expression (B) sowie der Anwesenheit von EGFP-DNA (C) während der Kultur. Protein- und DNA-Extrakte aus je 4  $*10^8$  Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe aufgetragen. A) Detektion von L1-Protein mit CAMVIR1. B) Detektion von L2-Protein mit Serum # 20. C). DNA-Detektion mit radioaktiv markierter pEGFP-C3-Sonde. VF = Verdünnungsfaktor. a = zwei Tage Kultur. b = drei Tage Kultur. c = vier Tage Kultur. d = fünf Tage Kultur.

# 4.1.7 Nachweis assoziierter DNA

Die fehlende Infektiosität der Partikel könnte auf einer mangelnden Verpackung der DNA in den Hefezellen beruhen. Eine wesentliche Voraussetzung für die Enkapsidierung ist, dass die Zusammenlagerung der Partikel im Zellkern der Hefe stattfindet, wo sich auch das Zielplasmid befindet. Deshalb wurde eine L1-Immunfluoreszenz mit Hefezellen nach Galaktose-Induktion durchgeführt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 4.25 lassen vermuten, dass sich die Lokalisierung von L1 über die gesamte Hefezelle, also auch den Nukleus, erstreckt.



Abb. 4.25 Hefe-Immunfluoreszenz mit CAMVIR1 zur Lokalisierung der L1-Expression innerhalb der Hefezelle. Konfokalmikrospische Analyse. A) Fluoreszenzaufnahme. B) Durchlichtaufnahme. C) Überlagerung von A) und B).

Weiterhin sollte analysiert werden, ob Partikel aus dem Hefe-Rohextrakt mit dem Zielplasmid assoziiert sind. Um mit Pseudovirionen assoziiertes Zielplasmid nachzuweisen, wurden Heparinsäule-Fraktionen dialysiert, erst mit DNase I (zum Entfernen externer DNA) und dann mit Proteinase K (zum Freisetzen von durch Partikel geschützter DNA) behandelt, und mit einer EGFP-Sonde im Dot-Blot analysiert. Dabei zeigten die Partikel-haltigen Fraktionen tatsächlich schwache Signale (Abb. 4.26). Im Vergleich zum Mengenstandard liegen etwa 20-50 pg Plasmide vor. Daraus ergibt sich, dass umgerechnet weniger als 3 \* 10<sup>5</sup> mit Plasmid assoziierte Partikel pro ml Kultur (gegenüber 2,3 \*  $10^{10}$ - $10^{11}$  Partikel/ml Kultur gemäß ELISA; siehe auch 4.1.3) vorliegen.



Abb. 4.26 DNA-Dot-Blot zum Nachweis von mit Partikeln assoziiertem Zielplasmid. Mit je 100  $\mu$ l Heparinsäule-Fraktionen der Hefeklone A, D und E wurde nach DNase I- und anschließender Proteinase K-Behandlung ein DNA-Dot-Blot angefertigt. Die Detektion des Zielplasmids erfolgte mit einer EGFP-Sonde. Die Partikel-haltigen Peakfraktionen sind blau gekennzeichnet. Referenz-DNA wurde zur Abschätzung der Menge in den Fraktionen aufgetragen.

Auch in Fraktionen von CsCl-Gradienten ließ sich mittels PCR und Southern-Blot DNase Iresistente EGFP-DNA detektieren (Abb. 4.27). Die weite Streuung der Signale bei der PCR kommt dadurch zustande, dass diese Methode sehr sensitiv ist. Mit den Southern-Blot-Daten lassen sich eher quantitative Aussagen treffen. Erwartunsgemäß treten die intensivsten Signale bei höheren Schwebedichten auf (1,33-1,36 g/ml), die zum Teil charakteristisch für mit DNA gefüllte Virionen sind. Allerdings sind diese Experimente kein eindeutiger Beweis für die Anwesenheit verpackter DNA, da die Effizienz des DNase I-Verdaus nicht kontrolliert wurde. Sie demonstrieren jedoch, dass die Partikel zumindest zum Teil mit dem Zielplasmid assoziiert vorliegen und dass diese DNA-Partikel-Komplexe eine höhere Schwebedichte aufweisen als leere VLPs.



**Abb. 4.27** L1-*capture*-ELISA und EGFP-Nachweis von CsCl-Gradientenfraktionen zum Nachweis von mit Partikeln assoziiertem Zielplasmid. Zuvor war ein Verdau mit DNase I und eine Proteinase K-Behandlung durchgeführt worden. A) EGFP-DNA-positive Fraktionen: Nachweis durch Southern-Blot (Originaldaten nicht gezeigt). B) EGFP-DNA-positive Fraktionen: Nachweis durch PCR (Originaldaten nicht gezeigt).

#### 4.1.8 Versuch, die Kopienzahl des Zielplasmids zu erhöhen

Nicht alle Selektionsmarker üben einen vergleichbaren Selektionsdruck aus. Besonders der *leu2-d*-Marker, bei dem stromaufwärts liegende regulatorische Sequenzen des Leucin-Gens deletiert sind, bewirkt eine hohe Kopienzahl des Trägerplasmids, da eine Leucin-Expression von weniger als 5 % im Vergleich zum Wildtyp kompensiert werden muss (Erhart und Hollenberg, 1983). Für das Pseudovirionen-Produktionssystem ist dies jedoch ein Nachteil, da auch das Zielplasmid von der 2µm-Replikation abhängig ist. Aufgrund der *leu2-d*-bedingten hohen Kopienzahl des Verpackungsplasmids liegt es vermutlich nur in geringer Kopienzahl vor, da die Zelle insgesamt nur 60-100 Kopien 2µm-Replikons aufrechterhalten kann (Rose und Broach, 1990).

Okkels publizierte 1996, dass eine vergleichbare Deletion im Bereich des Promotors des Hefe-Selektionsmarkers *ura3* zu einer ähnlich erhöhten Kopienzahl führt. Dieser Teil des *ura3*-Promotors wurde aus dem EGFP-Zielplasmid deletiert (restriktionsenzymatisch mit SbfI und ClaI), um eine ähnlich hohe Kopienzahl wie die des konkurrierenden L1/L2-Expressionsplasmids mit *leu2-d*-Marker zu erreichen.



Abb. 4.28 Deletion im Bereich des ura3-Promotors (siehe Pfeil) von pYES2\*-EGFPbac nach Okkels (1996).

Die EGFP-Expression des verkleinerten Plasmids pYES2\*-EGFPbac $\Delta P_{ura}$  wurde zunächst in Transfektionsexperimenten mit dem ursprünglichen Zielplasmid verglichen, wobei keine Unterschiede festgestellt werden konnten (Abb. 4.29). Nach der Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm # 1699-pD125 und der Selektion positiver Transformanden (Abb. 4.30) wurden einzelne Klone entsprechend dem Kulturprotokoll zur Pseudovirionenproduktion eingesetzt.



**Abb. 4.29** EGFP-Expression nach Transfektion von pYES2\*-EGFPbac, pYES2\*-EGFPbac $\Delta P_{ura}$  bzw. pEGFP-C3 in COS1- und CV1-Zellen: Quantitative FACS-Analyse (A) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen: B), C) pYES2\*-EGFPbac; D), E) pYES2\*-EGFPbac $\Delta P_{ura}$  (links jeweils Durchlichtaufnahmen, rechts korrespondierende Fluoreszenzaufnahmen). A): Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment (pEGFP-C3-Transfektion der COS1-Zellen als 100 %-Standard; üblicherweise lag der absolute Wert bei etwa 70 % EGFP-positiver Zellen). Mit Hilfe des Effectene-Reagenz (Qiagen) wurden je 0,4 µg DNA zur Transfektion von zuvor in 6-Loch-Platten ausgesäten CV1-Zellen eingesetzt (Duplikate).



**Abb. 4.30** PCR zur Detektion positiver Transformanden. PK = Positivkontrolle. PK<sup>+</sup> = Positivkontrolle, nach Deletion. PK<sup>-</sup> = Positivkontrolle, Ausgangssequenz ohne Deletion. NK = Negativkontrolle, PCR-Ansatz ohne DNA. M = Medium-Negativkontrolle (Mitgeführtes Medium ohne Hefen). A) Deletion des *ura3*-Promotors. Amplikonlänge ohne Deletion: 459 bp, mit Deletion: 241 bp. Die Klone 1-5 zeigen wie die Positivkontrolle PK<sup>+</sup> die 241 bp-Bande, aber auch Banden von ca. 1500 bp und 650 bp, die vermutlich durch die Amplifikation genomischer Sequenzen entstanden sind. B) Deletion der bakteriellen Sequenz. Amplikonlänge ohne Deletion: 2261 bp, mit Deletion: 384 bp. Bei den Klonen 1-5 ist wie bei der Positivkontrolle PK<sup>+</sup> die 384 bp-Bande zu sehen. Die größere Bande bei der Mediumkontrolle ist unspezifisch und beruht vermutlich auf einer Kontamination. C) L1-Nachweis. Amplikonlänge 197 bp. Alle gezeigten Klone sind L1-positiv. D) EGFP-Nachweis. Amplikonlänge: 237 bp. Alle gezeigten Klone sind EGFP-positiv. Das Signal bei der Mediumkontrolle stammt von den Primern im Ansatz; eine entsprechende, schwächere Bande liegt auch bei der Negativkontrolle vor.

Während der Kultur wurden Aliquots entnommen und aus dem einer konstanten Zellzahl entsprechendem Volumen DNA-Extrakte hergestellt, die in einer Dot-Blot-Hybridisierung mit einer EGFP-Sonde analysiert wurden. Im Vergleich zu einem Hefeklon, bei dem der *ura3*-Promotor nicht deletiert vorliegt, ist keine Zunahme der Kopienzahl bei dem Hefeklon mit Promotordeletion zu erkennen (Abb. 4.31). Offensichtlich konnte durch die Modifizierung des Selektionsmarkers keine erkennbare Erhöhung der Kopienzahl erreicht werden.



**Abb. 4.31** Dot-Blot zum Vergleich der Kopienzahl des Zielplasmids. DNA wurde aus Hefekultur an verschiedenen Tagen aus dem 2,4  $*10^8$  Zellen entsprechenden Volumen gewonnen. Die Hybridisierung wurde mit einer pEGFP-C3-Sonde durchgeführt. Als Negativkontrolle diente pD125 (ohne Zielplasmid). VF = Verdünnungsfaktor. a = zwei Tage Kultur. b = drei Tage Kultur. c = vier Tage Kultur. d = fünf Tage Kultur.

Deshalb ist auch nicht verwunderlich, dass auch mit den Promotor-deletierten Klonen keine infektiösen Pseudovirionen hergestellt werden konnten: Wurden CV1-Zellen mit Rohextrakten dieser Klone inkubiert, konnte keine detektierbare Pseudoinfektion erzielt werden (Abb. 4.32).



**Abb. 4.32** FACS-Analyse von mit Hefe-Rohextrakten behandelten CV1-Zellen (pD125; Klone 1, 2, 3). Zwei Tage nach 80 min Inkubation von 2 ml Rohextrakt/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium und mit Hefeextrakt ohne EGFP-Plasmid (pD125). Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit 0,5 µg pEGFP-C3.

In dieser Arbeit konnten mit dem Hefe-Produktionssystem HPV16 L1/L2 VLPs isoliert werden, die auch zumindest teilweise mit dem EGFP-Zielplasmid assoziiert waren, doch eine Pseudoinfektion von Zielzellen konnte nicht nachgewiesen werden. Um dennoch infektiöse HPV16 Pseudovirionen zu erhalten und Pseudoinfektionsexperimente durchführen zu können, wurde ein *in vitro*-Produktionssystem gewählt.

# 4.2 In vitro-Pseudovirionen-Produktion durch Disassembly/Reassembly

Abb. 4.33 stellt das bereits in 1.4.1 näher beschriebene Prinzip der *in vitro*-Konstruktion von Pseudovirionen nach Kawana *et al.* (1998a) dar. Diese Methode wurde als Alternative zum Hefe-Produktionssystem gewählt, da sie vergleichsweise unaufwändig durchzuführen ist.



Abb. 4.33 Konstruktion von Pseudovirionen durch *in vitro-Disassembly/Reassembly* nach Kawana *et al.* (1998a). Im Baculovirus-System hergestellte VLPs werden erst durch die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol dissoziiert, wobei sie in Kapsomere zerfallen. Durch das dialytische Entfernen des  $\beta$ -Mercaptoethanols in Gegenwart eines Reporterplasmids bilden sich wieder Partikel, die damit assoziiert sind.

# 4.2.1 Konstruktion von HPV16 L1/L2 Pseudovirionen

Die Herstellung der HPV16 L1/L2 VPLs in Insektenzellen wurde von Frau B. Aengeneyndt durchgeführt; die verwendeten Baculovirusstämme wurden von Herrn Dr. M. Müller zur

Verfügung gestellt. Transmissionselektronenmikroskopische Analysen machten Herr Prof. Dr. H. Zentgraf und Frau B. Hub. Nach der Dichtezentrifugation wurden die VLP-Fraktionen in L1- und L2-Western-Blots und unter dem Elektronenmikroskop überprüft sowie ihre Proteinkonzentration in einem Coomassie-Gel mit einem BSA-Standard ermittelt. Da sich mit EM-Bildern die Qualität einer Präparation nur bedingt beurteilen lässt, wurden die Präparationen in einem *capture*-ELISA, der nur L1 mit korrekter Konformation (also Partikel oder Kapsomere) detektiert, mit einer Referenz verglichen. Dabei traten bei den einzelnen Präparationen durchaus Qualitätsschwankungen auf, wie sich durch unterschiedliche ELISA-Reaktivitäten im Verhältnis zur L1-Proteinkonzentration zeigte. Manche Präparationen enthielten einen hohen Anteil an Intermediatformen (siehe Sucrosegradienten in Abb. 4.10A und 4.10B oder verklumpten Partikeln (zum Teil elektronenmikroskopisch erkennbar).

Ausgehend von der Konzentrationsabschätzung mittels ELISA wurden die Partikel bei der *Disassembly/Reassembly* (D/R) zusammen mit zehnfach molaren Mengen an dem Reporterplasmid pEGFP-C3 (Clontech) eingesetzt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dokumentieren das Zerfallen der Partikel in Kapsomere und die anschließende Zusammenlagerung, wobei auch das größtenteils freie, zum Teil aber auch mit den Partikeln assoziierte Plasmid zu sehen ist (Abb. 4.34).





# Zonensedimentation

Sedimentationsanalysen mit Sucrose-Gradienten sind ebenfalls geeignet, um den **Dissoziations-Reassoziations-Prozess** darzustellen. Die gewählten Zentrifugationsbedingungen führen zu einer Auftrennung von Partikeln (168 S), unvollständig rekonstituierten Partikeln oder Aggregaten (~60 S) und Kapsomeren (11 S). Nach der Fraktionierung wurden L1- und L2-Western-Blots sowie L1-ELISAs durchgeführt. In Abb. 4.35 und Abb. 4.36 sind repräsentative Gradientenprofile dargestellt. Abb. 4.35A) wurde bereits in 4.1.3 erläutert. Erwartungsgemäß ist nach Disassembly unter den gewählten Bedingungen der Partikel-Peak (Fraktionen 3-6 in Abb. 4.35B) verschwunden, und dafür liegen Kapsomere (Fraktionen 16-19) vor: Der Zerfall in die Kapsiduntereinheiten ist sehr effizient. Außerdem sind im ELISA noch schwache Signale im Bereich der Fraktionen 8-10 (~60 S) zu sehen, die vermutlich auf partiell zusammengelagerten Partikeln oder Intermediatformen beruhen (Abb. 4.35B). Nach Reassembly erscheint wieder ein PartikelPeak, wobei die Anwesenheit des Plasmids keinen Einfluss auf den S-Wert der neu gebildeten Kapside hat (Abb. 4.36A, 4.36B). Auch bei einer elektronenmikroskopischen Betrachtung einzelner Fraktionen (freundlicherweise von Frau B. Hub durchgeführt) waren keine Unterschiede (Abb. 4.37). nach morphologischen sichtbar Je Effizienz der Zusammenlagerung bleibt noch ein mehr oder weniger ausgeprägter Kapsomer-Peak erhalten, und ein variabler Anteil des Materials findet sich in den Fraktionen 7-12. Diese Intermediate oder "falsch" aggregierten Proteine sind aber auch in manchen VLP-Ausgangspräparationen zu finden (siehe Abb. 4.10A); manchmal reduziert sich ihr Anteil sogar nach einer Disassembly/Reassembly. Die Western-Blots entsprechen den ELISA-Profilen. Dies belegt, dass keine großen Mengen an denaturiertem L1 vorliegen und dass die Partikel und Kapsomere aus L1 und L2 bestehen.



Abb. 4.35 Sucrosegradienten: L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). 30-50 µg VLPs wurden auf einen Gradienten geladen und 3 h bei 36 000 rpm und 4 °C im Rotor SW 41 zentrifugiert. Danach wurden 600 µl-Fraktionen gewonnen und analysiert. A) VLP-Präparation vor *Disassembly*. B) Nach *Disassembly*. Dunkelblau: Sucrosekonzentration. Orange: ELISA-Werte.



**Abb. 4.36** Sucrosegradienten: L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). 30-50 µg VLPs wurden auf einen Gradienten geladen und 3 h bei 36 000 rpm und 4 °C im Rotor SW 41 zentrifugiert. Danach wurden 600 µl-Fraktionen gewonnen und analysiert. A) *Reassembly* ohne Plasmid. B) *Reassembly* mit Plasmid (pEGFP-C3). Dunkelblau: Sucrosekonzentration. Hellblau/Grün: ELISA-Werte.



**Abb. 4.37** Sucrosegradienten: TEM-Aufnahmen von Fraktionen eines Gradienten mit *Disassembly/Reassembly-*Material (mit Plasmid). A) Partikel, zum Teil miteinander assoziiert. B) Kapsomere.

#### Gleichgewichtszentrifugation

Im CsCl-Gradienten sammeln sich leere VLPs bei einer Schwebedichte von 1,29-1,30 g/ml, während mit DNA gefüllte Virionen bei 1,34-1,36 g/ml bandieren (Breedis *et al.*, 1962). Wie erwartet, sammeln sich rekonstituierte Partikel nach *Disassembly* bei der gleichen Schwebedichte wie das VLP-Ausgangsmaterial (Abb. 4.38A, 4.38B), nämlich bei 1,29-1,30 g/ml. Ist allerdings Plasmid bei dem *Reassembly*-Prozess anwesend (Abb. 4.39), formiert sich ein zweiter distinkter Peak im Dichtebereich DNA-haltiger Partikel (1,32-1,35 g/ml; siehe Markierung). Auch hier korrespondieren die Western-Blots mit den ELISA-Profilen. Diese Daten implizieren die Enstehung DNA-haltiger Pseudovirionen nach *Disassembly/Reassembly*.



B) VLPS D/R ohne Plasmid



**Abb. 4.38** CsCl-Gleichgewichtszentrifugation: L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). Je 15 µg Partikel wurden mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Gradienten mit dem Refraktometer vermessen. A) VLPs. B) *Reassembly* ohne Plasmid.



**Abb. 4.39** CsCl-Gleichgewichtszentrifugation: L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). *Reassembly* mit Plasmid (pEGFP-C3). 15 µg Partikel wurden mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurde der Gradient mit dem Refraktometer vermessen. Der zusätzliche Peak bei 1,32-1,35 g/ml ist markiert.

# 4.2.2 Zielzellen können mit *Disassembly/Reassembly (D/R)*-Material pseudoinfiziert werden

# 4.2.2.1 Die Transgenexpression von EGFP oder β-Galaktosidase ist detektierbar

Um einen Gentransfer mittels Pseudovirionen in Zielzellen zu detektieren, wurden EGFP und  $\beta$ -Galaktosidase als Reportergene verwendet. Hierfür wurden *Disassembly/Reassembly*-Präparationen mit einem je zehnfach molarem Überschuss an pEGFP-C3 oder pCMV $\beta$  (beide Plasmide von Clontech) hergestellt und mit COS1-Zellen inkubiert. Die Expression von EGFP wurde *in vivo* unter dem Invers-Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet. Für die Detektion von  $\beta$ -Galaktosidase wurden die Zellen fixiert und mit X-Gal-Färbelösung inkubiert, bis das blaue Präzipitat sichtbar wurde. In Abb. 4.40B) ist die resultierende Expression von  $\beta$ -Galaktosidase klar zu erkennen. Die Fluoreszenzen in Abb. 4.40F liegen ebenfalls eindeutig über dem Hintergrund. Zellen mit *D/R*-Material ohne DNA zeigten weder  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität noch Fluoreszenz.



**Abb. 4.40** Transgenexpression nach Inkubation von COS1-Zellen mit *D/R*-Material. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur mit 5  $\mu$ g *D/R*-Material/6-Loch wurde die Genexpression überprüft. Als Positivkontrolle dienten Transfektionen mit 0,5  $\mu$ g Plasmid. A) pCMV $\beta$ -Transfektion. B) *D/R* mit pCMV $\beta$  als Reporterplasmid. C) pEGFP-C3-Transfektion, Durchlicht-Aufnahme. D) pEGFP-C3-Transfektion, Fluoreszenz-Aufnahme. E) *D/R* mit pEGFP-C3 als Reporterplasmid, Durchlicht-Aufnahme. F) *D/R* mit pEGFP-C3 als Reporterplasmid, Fluoreszenz-Aufnahme. Die Pfeile markieren EGFP-positive Zellen.

Abb. 4.41 präsentiert die FACS-Analyse von mit EGFP-*D/R*-Material inkubierten COS1-Zellen (violette Kurve in Abb. 4.41A, Abb. 4.41C) gegenüber unbehandelten Zellen (blaue Kurve in Abb. 4. 41A, Abb. 4.41B) und einer pEGFP-C3-Transfektion (türkisfarbene Kurve in Abb. 4.41A, Abb. 4.41D). Verglichen mit der Transfektion weisen die EGFP-positiven Zellen nach Inkubation mit *D/R*-Material eine geringere Fluoreszenzintensität auf. Anscheinend werden durch diese Art des Gentransfers weniger Plasmide in eine einzelne Zelle geschleust als mit der Effectene-Transfektionsmethode über DNA-Lipidkomplexe – dennoch liegt die Anzahl EGFP-positiver Zellen und ihre Fluoreszenzintensität deutlich über dem Hintergrund.

Die Detektionsgrenze für eine FACS-Messung lag bei 4-8 ng *D/R*-Material pro 6-Loch (nach Konzentrationsbestimmung im L1-*capture*-ELISA). Insgesamt wurde beobachtet, dass der Gentransfer mit EGFP-*D/R*-Material effizienter ausfiel als mit  $\beta$ -Galaktosidase-*D/R*-Material. Dies könnte durch die unterschiedlichen Plasmidgrößen bedingt werden. Das kleinere pEGFP-C3 (4,7 kb) würde demnach effizienter mit den Partikeln assoziieren als pCMV $\beta$  (7,2 kb). Die im ELISA ermittelte Ausbeute an *D/R*-Material lag generell bei 40-80 % des eingesetzten VLP-Materials, wobei der L1-*capture*-ELISA nicht nur Partikel, sondern auch

Kapsomermaterial detektiert, und keine Aussage zum Anteil infektiöser Pseudovirionen getroffen werden kann. Der Verlust kann auf einer Adsorption der Kapside an den Dialyseschlauch oder auf Degradation während der Dialyse und *Disassembly/Reassembly* beruhen. Auch die Effizienz des Gentransfers durch mittels ELISA standardisierte Mengen an *D/R*-Material schwankte erheblich: Beim Einsatz von 3  $\mu$ g/6-Loch lag der Anteil EGFP-positiver Zellen öfter bei ca. 30 %; manchmal konnten aber auch nur weniger als 1 % detektiert werden. Dies wurde auf unterschiedliche Qualitäten des VLP-Ausgangsmaterials und die Effizienz des *Disassembly/Reassembly*-Prozesses zurückgeführt. Generell wurde *D/R*-Material innerhalb weniger Wochen nach der Herstellung verbraucht, da mit längerer Lagerung bei 4 °C die Infektiosität und der ELISA-Titer sanken.



Abb. 4.41 FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen und Kontrollen. A) Histogramm. Blau: Medium-Kontrolle. Violett: *D/R*-Material. Türkis: Transfektion. B) Dot-Blot: Medium-Negativkontrolle. C) Dot-Blot: *D/R*-Material. D) Dot-Blot: Transfektion.

#### 4.2.2.2 Der Gentransfer ist partikelabhängig

Die Reportergenexpression, die nach der Inkubation von Zielzellen mit *D/R*-Material detektiert werden kann, beweist noch nicht, dass der Gentransfer durch infektiöse Pseudovirionen vermittelt wird. Deshalb wurde in einer Reihe von Experimenten untersucht, ob der Gentransfer partikelabhängig stattfindet.

# Infektiosität von Sucrosegradient-Fraktionen

40 µg *D/R*-Material mit pEGFP-C3 als Reporterplasmid wurden in einem Sucrosegradient aufgetrennt. Die einzelnen Sucrosegradient-Fraktionen wurden auf ihre Kapazität zum Gentransfer getestet, indem sie nach Entfernen der Sucrose durch Dialyse mit COS1-Zellen konfrontiert wurden. Nach drei Tagen wurde die Transgenexpression im Durchflusszytometer

überprüft (Abb. 4.42). Dabei fand sich die Infektiosität in den Fraktionen, die vollständig reassemblierte Partikel enthalten (3-7). Aber auch mit den Kapsomerfraktionen (18-19) wurde ein Gentransfer beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass sich während der Dialyse die Kapsomere erneut zu Partikeln zusammenlagern. Andererseits ist eine Transfektion der Zellen durch Kapsomer-Plasmid-Aggregate nicht auszuschließen.

Das Sedimentationsverhalten des Zielplasmids pEGFP-C3 (4,7 kb) ist in Abb. 4.43 zu sehen. Je nach Konformation befindet es sich in den Fraktionen 13-18: Die relaxierte Isoform des zirkulären Plasmids ist hauptsächlich in Fraktion 14 zu erkennen, der Peak der kompakteren superhelikalen Isoform befindet sich in Fraktion 15, und lineares Plasmid bandiert in den Fraktionen 16 und 17. Der in Abb. 4.42 präsentierte Gentransfer beruht also nicht auf nackter DNA.



**Abb. 4.42** FACS-Analyse von mit Sucrosegradient-Fraktionen (40  $\mu$ g *D/R*-Material) behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 1,5 h Inkubation von 200  $\mu$ l Fraktion/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen diente eine Inkubation mit Medium (M).



Abb. 4.43 Sedimentationsverhalten von pEGFP-C3 im Sucrosegradient. Je 15  $\mu$ g DNA wurden im Sucrosegradient aufgetrennt (gleiche Bedingungen wie in Abb. 4.42). Je 15  $\mu$ l Fraktion wurden auf einem 0,8 % Agarosegel analysiert.

Spezifische Blockierung der Pseudoinfektion durch neutralisierende Antikörper und Heparin Ein weiterer Beleg für einen partikelvermittelten Gentransfer liefert das in Abb. 4.44 dargestellte Experiment: Hier wurde das *D/R*-Material hitzeinaktiviert bzw. mit verschiedenen HPV16 L1-neutralisierenden Antikörpern präinkubiert. Im Gegensatz zu einem unspezifischen Serum führten die spezifischen Antikörper in der eingesetzten Konzentration zu der Abnahme des Gentransfers um mindestens 70 %, und die Hitzeinaktivierung hob die Infektiosität komplett auf. DNA ohne Partikel gelangte offensichtlich nicht in die Zellen, denn hier war keine EGFP-Expression nachweisbar. Ebenso führte *D/R*-Material ohne pEGFP-C3 zu keiner Fluoreszenz (Abb. 4.45).



Abb. 4.44 FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Vor der Pseudoinfektion wurde ein Teil des *D/R*-Materials mit verschiedenen HPV 16 L1-spezifischen Antikörpern (1.3, H16.U4, H16.V5, H16.E70; 1.4) bzw. mit unspezifischem Serum in der Verdünnung 1:1000 über Nacht bei 4 °C präinkubiert. US = unspezifisches Serum einer nicht immunisierten Maus. Die hitzeinaktivierte Probe wurde 10 min gekocht. Drei Tage nach 1 h Inkubation von 3 µg Pseudovirionen/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium und eine äquivalente Menge Plasmid-DNA ohne Partikel, als Positivkontrolle eine Transfektion mit 0,5 µg pEGFP-C3.



Abb. 4.45 FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 1 h Inkubation von 3 µg *D/R*-Material/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Gezeigt sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten, das *D/R*-Material mit Plasmid wurde als 100 %-Standard gesetzt. Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium, eine äquivalente Menge Plasmid-DNA ohne Partikel, und eine äquivalente Menge *D/R*-Material ohne Plasmid.

Heparin bindet und blockiert HPV-Virionen (Siehe 1.4). Eine vollständige Blockierung von HPV16-Pseudovirionen aus COS7-Zellen erzielten Giroglou *et al.* (2001) mit 50  $\mu$ g/ml Heparin. Abb. 4.46 zeigt ein repräsentatives Experiment, bei dem schon ab einer Heparinkonzentration von 25  $\mu$ g/ml keine über dem Hintergrund liegende Fluoreszenz mehr detektierbar ist. Dieser Befund bestätigt, dass die durch *in vitro-Disassembly/Reassembly* hergestellten Pseudovirionen ebenfalls zur Pseudoinfektion die Bindung an Heparansulfat auf der Zelloberfläche benötigen.



**Abb. 4.46** Blockierung der Pseudoinfektion durch Heparin: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Vor der Pseudoinfektion wurden je 1  $\mu$ g *D/R*-Materials mit verschiedenen Heparinkonzentrationen über Nacht bei 4 °C präinkubiert. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Unbehandeltes *D/R*-Material wurde als 100 %-Standard gesetzt.

### Titrationen mit HPV-neutralisierenden Antikörpern

Sieben HPV16 L1-spezifische neutralisierende Antikörper und ein HPV11 L1-spezifischer neutralisierender Antikörper (F1) wurden in verschiedenen Konzentrationen bei der Präinkubation von Pseudovirionen eingesetzt. So wurde die jeweilige Mindestkonzentration für eine detektierbare Inhibition des Gentransfers ermittelt. Dabei erzielten alle getesteten HPV16-L1-spezifischen Antikörper eine dosisabhängige Blockierung der Pseudoinfektion (Abb. 4.47A-G), wobei die Mindestkonzentration bei den aufgereinigten Antikörpern zwischen 1-40  $\mu$ g/ml lag (Tab. 4.1). Dagegen waren für einen neutralisierenden Effekt bei dem polyklonalen Kaninchenserum 4543 mindestens 100  $\mu$ g Protein/ml erforderlich. Es konnte keine Kreuzneutralisierung mit dem HPV11-spezifischen Antikörper F1 beobachtet werden (Abb. 4.47H).


**Abb. 4.47** Blockierung der Pseudoinfektion durch neutralisierende Antikörper: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Vor der Pseudoinfektion wurde das *D/R*-Material mit verschiedenen Antikörper-Konzentrationen über Nacht bei 4 °C präinkubiert. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Gezeigt sind repräsentative Experimente, mit unbehandeltem *D/R*-Material als 100 %-Standard. HPV16-spezifische Antikörper: A) H16.E70. B) H16.U4. C) H16.V5. D) 25/C. E) 1.3. F) 1.4. G) 4543. HPV11-spezifischer Antikörper: H) F1.

Antikörper	Konzentration	Ein neutralisierender Effekt ist noch sichtbar bei		
		der Verdünnung	der Proteinkonzentration	
H16.E70	40 mg/ml	1:1000	40 µg/ml	
H16.U4	40 mg/ml	1:5000	8 µg/ml	
H16.V5	20 mg/ml	1:10 000	2 µg/ml	
<b>25/</b> C	2,5 mg/ml	1:500	5 µg/ml	
1.3	0,5 mg/ml	1:500	1 μg/ml	
1.4	20 mg/ml	1:20 000	1 µg/ml	
4543	100 mg/ml	1:1000	100 µg/ml	
F1	3 mg/ml	-	-	

Tab. 4.1 Auflistung der Konzentrationen der eingesetzten Antikörper.

### Analyse ausgewählter Humanseren

Weiterhin wurden zehn Humanseren (freundlicherweise von Herrn Dr. M. Pawlita, DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt) auf ihren Einfluss auf die Pseudoinfektion untersucht. Tab. 4.2 gibt eine Übersicht über die Seren und ihre im ELISA detektierte Spezifität.

**Tab. 4.2** Übersicht über die in Abb. 4.48 getesteten Humanseren. Die Seren stammen aus drei Quellen und wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Pawlita, DKFZ Heidelberg, ebenso wie die zugehörigen ELISA-Daten, zur Verfügung gestellt.

Bezeichnung	Herkunft	Reaktivität im ELISA	Neutralisierung von HPV16 Pseudovirionen
1010 0-Wochen	CVLP-Vakzinierungsstudie:	αHPV16 L1 negativ	nein
1010 4-Wochen	0 Wochen = Präimmunseren;	αHPV16 L1 positiv: 1156 mOD	nein
1015 0-Wochen	4 Wochen = nach	αHPV16 L1 negativ	nein
1015 4-Wochen	Immunisierung	αHPV16 L1 positiv: 1144 mOD	ja
10597		αHPV18 L1 positiv: 2153 mOD;	nein
	Zervixkarzinom-Patientinnen	αHPV16 L1 negativ	
10770		αHPV18 L1 positiv: 761 mOD;	nein
		αHPV16 L1 negativ	
M125		αHPV6b L1 positiv: 1237 mOD	nein
	Familien-Studie: gesunde	αHPV11 L1 positiv: 674 mOD	
	Männer (M), Frauen (F) und	$\alpha$ HPV16 und HPV18 L1 negativ	
M139	Kinder (K)	αHPV1 L1 positiv: 1729 mOD	nein
		$\alpha$ HPV16 und HPV18 L1 negativ	
F62		αHPV6b L1 positiv: 2011 mOD	nein
		αHPV11 L1 positiv: 1150 mOD	
		$\alpha$ HPV16 und HPV18 L1 negativ	
K_b_177		αHPV6b L1 positiv: 2248 mOD	nein
		αHPV11 L1 positiv: 1145 mOD	
		$\alpha$ HPV16 und HPV18 L1 negativ	

Wie vermutet, zeigt Serum 1015 4-Wochen in Übereinstimmung mit der ELISA-Reaktivität für HPV16 L1 im Gegensatz zu Serum 1015 0-Wochen eine neutralisierende Wirkung. Im Gegensatz dazu ist dies bei Serum 10104-Wochen nicht der Fall: Nicht alle ELISA-positiven Seren sind auch neutralisierend. Offensichtlich erkennen die HPV16-spezifischen Antikörper dieses Serums keine neutralisierenden Epitope.



**Abb. 4.48** Blockierung der Pseudoinfektion durch neutralisierende Antikörper: FACS-Analyse von mit D/R-Material behandelten COS1-Zellen. Vor der Pseudoinfektion wurden je 3 µg D/R-Material mit Serum in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 über Nacht bei 4 °C präinkubiert. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, mit unbehandeltem D/R-Material als 100 %-Standard.

Bei den anderen Seren, die im ELISA positiv für Antikörper mit Spezifität für HPV18, HPV6b, HPV11 und HPV1 reagierten, ist keinerlei Kreuzneutralisierung zu beobachten. Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Seren wirklich neutralisierende Antikörper enthalten.

Insgesamt konnte nach Inkubation des D/R-Materials mit Zielzellen ein partikelabhängiger Gentransfer nachgewiesen werden: Bei der Analyse von Sucrosegradienten fand sich die Infektiosität in den Partikelfraktionen, und der Gentransfer wurde durch die Hitzeinaktivierung oder die Präinkubation des D/R-Materials mit spezifischen neutralisierenden Antikörpern sowie Heparin blockiert. Die durch Disassembly/Reassembly hergestellten Pseudovirionen eignen sich auch zur Untersuchung von Humanseren auf HPV16-spezifische neutralisierende Antikörper.

# 4.2.3 Die Pseudoinfektion mit *Disassembly/Reassembly*-Material folgt einer "*One-hit*-Kinetik"

Bei einer Infektion mit *One-hit*-Kinetik ist die Anzahl der infizierten Zellen direkt proportional zur eingesetzten Viruskonzentration. Hingegen kommt es bei einer *Two-hit*-Kinetik mit steigender Konzentration zu einer logarithmischen Zunahme an Infektionsereignissen (Davis *et al.*, 1970). Während bei einer *One-hit*-Kinetik ein infektiöses Partikel pro Zelle ausreicht, um eine Infektion auszulösen, sind bei Viren mit *Two-hit*-Kinetik mindestens zwei infektiöse Virionen pro Zelle notwendig.



Abb. 4.49 One-hit- und Two-hit-Kinetik im Dosisdiagramm (Verändert nach Flint *et al.*, 2000). Die Anzahl der infektiösen Ereignisse (z.B. Plaques) ist gegen die relative Konzentration des Virus aufgetragen (lineare Skalen). Liegt ein One-hit-Mechanismus vor, resultiert eine Gerade. Bei einer Two-hit-Kinetik ist die Beziehung erst ab einer bestimmten Viruskonzentration direkt proportional.

Um die Kinetik der HPV16 L1/L2 Pseudovirionen zu charakterisieren, wurden COS1-Zellen mit linear sinkenden Konzentrationen von *Disassembly/Reassembly*-Präparation pseudoinfiziert. Die FACS-Messung in Abb. 4.50 zeigt: Der Gentransfer mit Pseudovirionen steht in einer linearen Korrelation zur Partikelmenge. Es liegt also eine *One-hit*-Kinetik vor.



**Abb. 4.50** Dosis-Antwort-Verhältnis: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 1,5 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

### 4.2.4 Die Pseudoinfektiosität wird durch eine DNase-Behandlung aufgehoben

Um Hinweise auf die Art der Assoziation des Reporterplasmids mit den Partikeln zu erhalten, wurde das *D/R*-Material vor der Pseudoinfektion einer Behandlung mit DNase I (Abb. 4.51A) oder Mikrokokkus-Nuklease (Abb. 4.51B) unterzogen. Hierfür wurden Bedingungen gewählt, die die Integrität der Partikel nicht beeinträchtigen, was zuvor mittels ELISA kontrolliert worden war. Beide Prozeduren führten zu einem Verlust der Infektiosität. Mit verschiedenen Methoden konnte keine DNase-resistente DNA nachgewiesen werden. Wurden sensitive Nachweismethoden wie die PCR angewendet, traten zwar manchmal Signale auf, die aber nicht reproduzierbar in den Partikelfraktionen zu finden waren (Daten nicht gezeigt). Es ist

deshalb anzunehmen, dass bei den Pseudovirionen das Reporterplasmid nicht vollständig in das Kapsid verpackt und damit vor einem enzymatischen Angriff geschützt vorliegt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die DNA nur teilweise enkapsidiert wird oder von außen an die Partikel adsorbiert ist.



Abb. 4.51 Infektiosität nach DNase-Behandlung: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Gezeigt sind repräsentative Experimente, mit unbehandeltem *D/R*-Material als 100 %-Standard. A) DNase I-Behandlung. 3  $\mu$ g Pseudovirionen wurden 30 min bei 37 °C mit 2 mg DNase I inkubiert. B) Mikrokokkus-Nuklease-Behandlung. 3  $\mu$ g Pseudovirionen wurden 1 min bei Raumtemperatur mit 1 U und 5 U Mikrokokkus-Nuklease inkubiert.

Um die Kapazität von HPV16-Kapsidprotein, DNA unspezifisch zu binden, zu untersuchen, wurden unbehandelte VLPs, denaturierte VLPs, VLPs nach *Disassembly* und VLPs nach *Disassembly/Reassembly* in einer Verdünnungsreihe auf drei Nitrocellulose-Membranen aufgetragen. Zur Kontrolle der Proteinmenge wurde je eine Membran mit dem Serum 4543 und CAMVIR1 analysiert. Während das Serum 4543 vor allem konformationelle Epitope erkennt (entsprechend ist das Signal bei hitzebehandeltem L1 geringer; Abb. 4.52A), detektiert der monoklonale CAMVIR1-Antikörper ein lineares Epitop in den denaturierten Partikeln (Abb. 4.52B). Eine der Membranen wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde inkubiert. In Abb. 4.52C ist zu erkennen, dass Kapsidproteine in nativer Konformation (VLPs, Kapsomere und rekonstituierte Partikel) effizient mit DNA auch ohne spezifische Verpackungssequenzen interagieren können, während dies nach Denaturierung nicht mehr der Fall ist. Für eine effiziente Bindung des Plasmids ist also die intakte Konformation der Kapsidproteine wichtig.



**Abb. 4.52** Dot-Blot-Analyse zur DNA-Bindefähigkeit von Kapsidprotein. Unbehandelte VLPs, denaturierte VLPs (zur Hitzedenaturierung 10 min mit Proteinladepuffer aufgekocht), VLPs nach *Disassembly* und VLPs nach *Disassembly/Reassembly* wurden mittels ELISA standardisiert und in einer Verdünnungsreihe auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen. A) Detektion von L1-Protein mit 4543. B) Detektion von L1-Protein mit CAMVIR1. C) DNA-Bindung nach Inkubation mit pEGFP-C3-Sonde.

# 4.2.5 Alle getesteten SV40 T-Antigen-positiven Zelllinien konnten pseudoinfiziert werden

Zur Untersuchung des Tropismus der durch *Disassembly/Reassembly* hergestellten Pseudovirionen wurden Zelllinien verschiedener Spezies und verschiedener Ursprungsgewebe als Zielzellen für eine Pseudoinfektion eingesetzt: COS1-, COS7- und die dazu parentalen CV1-Affennierenzellen; 293T- und 293-Zellen aus humanem Nierenepithel sowie HaSV-Zellen (humane Vorhautkeratinozyten). In Abb. 4.53 sind die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente zusammengefasst: Jede Zelllinie wurde mindestens zweimal mit dem Standard COS1-Zellen verglichen. Dargestellt sind der prozentuale Anteil EGFPpositiver Zellen (Abb. 4.53A) und Y Geo Mean-Werte (Abb. 4.53B), die die Verteilung der Fluoreszenzintensität aller über einem Grenzwert liegenden Zellen beschreiben (siehe auch 4.1.5). Als Negativkontrollen dienten jeweils Inkubationen mit Medium oder mit neutralisierenden Antikörpern präinkubierte Pseudovirionen. Wie bereits in 4.1.5 beschrieben, traten bei CV1-Zellen oft erhebliche Schwankungen der Autofluoreszenz auf (siehe auch Abb. 4.16). Dieser Effekt ist auch in Abb. 4.53A zu sehen, denn die entsprechenden Y Geo Mean-Werte in Abb. 4.53B demonstrieren, dass keine EGFP-positiven CV1-Zellen vorliegen, sondern lediglich ein größerer Anteil an autofluoreszenten Zellen: Nach der Inkubation mit D/R-Material liegt der Y Geo Mean-Wert nicht signifikant über dem Wert der Mediumkontrolle, und auch die Präinkubation zeigt keinen inhibitorischen Effekt. Unter dem Mikroskop konnten keine intensiv fluoreszierenden Einzelzellen detektiert werden, sondern lediglich ein allgemeiner moderater Anstieg der Fluoreszenzintensität (Daten nicht gezeigt). Während bei CV1-Zellen also keine Pseudoinfektion nachgewiesen werden konnte, waren COS1- und COS7-Zellen effizient pseudoinfizierbar: Sowohl der Anteil EGFP-positiver Zellen als auch die Y Geo Mean-Werte liegen nach der Inkubation mit Pseudovirionen über den Kontrollwerten. Das gleiche gilt für 293T-Zellen, und sogar bei den dazu parentalen 293-Zellen ohne SV40 T-Antigen fanden sich in zwei von drei Experimenten sehr wenige EGFPpositive Zellen, die auch unter dem Fluoreszenzmikroskop als solche zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt). HaSV-Zellen konnten zwar pseudoinfiziert werden, aber im Vergleich zu den anderen T-Antigen-positiven Zelllinien konnten bei der gleichen Menge an Pseudovirionen nur extrem wenig EGFP-positive Zellen detektiert werden. In Abb. 4.53C sind pseudoinfizierte HaSV-Zellen zu sehen. Aufgrund der eindeutigen EGFP-Expression besteht trotz der minimalen Veränderung des Y Geo Mean-Werts (Abb. 4.53B) kein Zweifel an der Pseudoinfektion.

Als Positivkontrolle und um die EGFP-Expression vergleichen zu können, wurden die einzelnen Zelllinien mit dem Reporterplasmid pEGFP-C3 mittels Effectene-Reagenz (Qiagen) transfiziert. Betrachtet man die Transfektionseffizienzen der verschiedenen Zelllinien in Abb. 4.54, so zeigen 293T- und 293-Zellen die höchsten Werte, gefolgt von COS1- und COS7-Zellen. Bei CV1-Zellen und HaSV-Zellen resultieren die Transfektionen in einem wesentlich geringeren prozentualen Anteil EGFP-positiver Zellen (Abb. 4.54A). Auch im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität, die durch das Expressionsniveau von EGFP in den einzelnen Zellen bestimmt wird, reichen CV1- und HaSV-Zellen nicht an die anderen Zelllinien heran (Abb. 4.54B).

Der Vorteil von COS1- und COS7-Zellen gegenüber CV1-Zellen beruht vermutlich auf der SV40 T-Antigen-abhängigen episomalen Replikation des transfizierten Plasmids in den abgeleiteten Zelllinien. Auch T-Antigen-positive 293T-Zellen, bei denen verglichen mit T-Antigen-negativen 293-Zellen nach Transfektion geringfügig mehr EGFP-positive Zellen detektierbar sind, sind deutlich besser zu pseudoinfizieren. Insgesamt erscheint die Amplifikation des SV40 ori-Plasmids in den meisten Zielzellen notwendig, um eine Pseudoinfektion effizient detektieren zu können. Die Ausnahme bilden 293-Zellen, die nach Transfektion über eine sehr hohe Transgenexpression verfügen. Demnach wäre für eine detektierbare Pseudoinfektion das Erreichen eines kritischen Expressionsniveaus entscheidend. Dafür spricht auch, dass bei HaSV-Zellen trotz SV40 T-Antigen nach Pseudoinfektion nur sehr wenige EGFP-positive Zellen nachzuweisen sind. Keratinozyten sind grundsätzlich schlecht transfizierbar (Lee und Taichmann, 1989; Dollard et al., 1993) und weisen in der Regel ein niedriges Expressionsniveau von Transgenen auf. Dagegen scheint der Gewebe- oder Zelltyp die Pseudoinfektion nicht einzuschränken.



**Abb. 4.53** Pseudoinfektion verschiedener Zelllinien: FACS-Analyse von mit D/R-Material behandelten Zellen. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Mittelwerte, mit pseudoinfizierten COS1-Zellen als 100 %-Standard. Als Negativkontrollen dienten eine Inkubation mit Medium bzw. mit präinkubierten Pseudovirionen (1 h bei Raumtemperatur mit H16.U4 in einer 1:1000-Verdünnung). D/R p.i. = mit neutralisierenden Antikörpern präinkubierte Pseudovirionen. A) EGFP-positive Zellen (%). B) Y Geo Mean. C) Pseudotransfizierte HaSV-Zellen: oben Durchlichtaufnahme, unten Fluoreszenzaufnahme.



**Abb. 4.54** Transfektionen verschiedener Zelllinien: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten Zellen. Drei Tage nach Transfektion von 0,4  $\mu$ g pEGFP-C3 wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Mittelwerte, mit pseudoinfizierten COS1-Zellen als 100 %-Standard. A) EGFP-positive Zellen (%). B) Y Geo Mean.

# 4.2.6 L2 ist nicht notwendig, um infektiöse Pseudovirionen zu erhalten, steigert aber die Effizienz

Die Rolle des Nebenkapsidproteins L2 für die Pseudoinfektion wurde untersucht, indem parallel HPV16 L1/L2 als auch HPV16 L1 VLPs bei der *Disassembly/Reassembly* eingesetzt wurden. Gleiche Mengen der resultierenden Pseudovirionen wurden nach der Quantifizierung mittels ELISA zur Pseudoinfektion von COS1-Zellen eingesetzt. In Abb. 4.55A ist zu sehen, dass Pseudovirionen ohne L2 weniger infektiös (~60 %) als L1/L2-Pseudovirionen sind. In einem Neutralisierungsassay mit L1- und L2-spezifischen Antiseren (Abb. 4.55B, 4.55C) wird deutlich, dass erwartungsgemäß beide Arten von Pseudovirionen auch durch ein L2-spezifisches Serum (# 20) blockiert werden.



**Abb. 4.55** HPV16 L1/L2- und HPV16 L1-Pseudovirionen: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 2 h Inkubation mit 3  $\mu$ g *D/R*-Material/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Zur Neutralisierung wurden die Proben bei 4 °C über Nacht mit Antikörper präinkubiert. Gezeigt sind repräsentative Experimente, mit unbehandeltem *D/R*-Material als 100 %-Standard. # 20:  $\alpha$ HPV16 L2. 1.3:  $\alpha$ HPV16 L1. A) Vergleich der Infektiosität. B) Neutralisierung von L1/L2-Partikeln. C) Neutralisierung von L1-Partikeln.

Diese Daten zeigen, dass L2 zwar nicht notwendig ist, um infektiöse Pseudovirionen mit diesem System zu erhalten, aber dennoch wesentlich zur Effizienz des Gentransfers beiträgt. Außerdem deutet die konzentrationsabhängige Neutralisierung von L1/L2-Partikeln durch einen L2-spezifischen Antikörper ebenfalls auf eine wichtige Funktion von L2 bei der Pseudoinfektion hin.

### 4.2.7 Pseudovirionen durch direkte Interaktion

Auch ohne *Disassembly/Reassembly* können Partikel mit einem Reporterplasmid assoziieren; die Wechselwirkung wurde als "direkte Interaktion" bezeichnet (Boursaghin *et al.*, 2002). Es sollte analysiert werden, ob durch die Koinkubation von VLPs mit Plasmid ein partikelvermittelter Gentransfer möglich ist. Dazu wurden VLPs dialysiert und zusammen mit der zehnfach molaren Menge an Reporterplasmid mit COS1-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie *D/R*-Pseudovirionen inkubiert. Es zeigte sich, dass keine vorherige Koinkubation von DNA und VLPs nötig war, um einen partikelabhängigen Gentransfer zu erhalten.

Meist erschienen diese Pseudovirionen sogar effizienter als entsprechende Mengen an *D/R*-Pseudovirionen (Abb. 4.56A). Dies könnte allerdings darauf beruhen, dass der L1-*capture*-ELISA nur die Konzentration an L1-Protein mit korrekter Konformation (also auch Kapsomere) anzeigt, und keine genaue Quantifizierung infektiöser Partikel ermöglicht. Nach dem *Disassembly/Reassembly*-Prozess liegt ein Teil des L1-Proteins noch in Form von Kapsomeren vor, und auch die reassemblierten Partikel könnten durch die Behandlung zum Teil in ihrer Infektiosität beeinträchtigt werden, ohne dass dies im ELISA zwingend zu erkennen wäre. In Vergleichen zwischen *D/R*-Pseudovirionen und ohne DNA dis- und reassemblierten Partikeln, die zusammen mit Plasmid eingesetzt wurden, lag die höhere Infektiosität bei den *D/R*-Pseudovirionen (Abb. 4.56A, siehe auch Abb. 4.59C). Die Verteilung der Fluoreszenzintensität (Y Geo Mean) bewegte sich jedoch im gleichen Bereich (Abb. 4.59B): Dies deutet an, dass sich die Zahl der eingeschleusten Reporterplasmide pro Zelle bei beiden Pseudovirionentypen nicht unterscheidet.

Die konzentrationsabhängige Blockierung des Gentransfers durch Präinkubation mit dem neutralisierenden Antikörper H16.U4 in Abb. 4.56B bestätigt, dass auch der Gentransfer von durch direkte Interaktion gebildeten Pseudovirionen partikelvermittelt ist.

Neben der *Disassembly/Reassembly* eignet sich auch die einfache und effiziente Methode der direkten Interaktion für die *in vitro*-Synthese von Pseudovirionen.



Abb. 4.56 Pseudovirionen durch direkte Interaktion: FACS-Analyse von mit Pseudovirionen behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). D/R superhelikal = D/R-Pseudovirionen. D/R + DNA = ohne DNA dis- und reassemblierte Partikel, zusammen mit DNA verabreicht. VLPs + DNA = VLPs, zusammen mit DNA verabreicht. A) Vergleich von durch mit und ohne D/R hergestellten Pseudovirionen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, mit D/R-Pseudovirionen mit superhelikalem Plasmid als 100 %-Standard. B) Neutralisierung mit H16.U4. Die Pseudovirionen wurden 45 min bei Raumtemperatur mit verschiedenen Antikörper-Verdünnungen präinkubiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, mit unbehandelten Pseudovirionen mit superhelikalem Plasmid als 100 %-Standard.

# 4.2.8 Vergleich verschiedener Plasmid-Isoformen bei der *in vitro*-Herstellung von Pseudovirionen

Da die Plasmidkonformation die Effizienz des Gentransfers beeinträchtigen könnte (Boursaghin *et al.*, 2002), sollten Pseudovirionen mit superhelikalem, relaxiertem und linearem Plasmid verglichen werden. Um relaxiertes Plasmid zu erhalten, wurde Maxipräparations-DNA, die hauptsächlich aus der superhelikalen Isoform bestand, mit eukaryontischer DNA-Topoisomerase I über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraus resultierte eine Population differenziell relaxierter bis hin zu vollständig relaxierter Plasmide (Abb. 4.57). Die Linearisierung von pEGFP-C3 erfolgte durch den Verdau mit MluI, wobei das EGFP-Gen nicht beschädigt wurde.



Abb. 4.57 Verschiedende Konformationen des pEGFP-C3-Plasmids. Je 1  $\mu$ g, 100 ng und 10 ng von superhelikalem, linearem und relaxiertem Plasmid wurden auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetrennt.

### Zonensedimentation und Vergleich der Infektiosität

Die physikalische Struktur des Plasmids hat keine Auswirkung auf den *Reassembly*-Prozess: Sucrosegradient-Profile von Präparationen, die nach Inkubation mit DNA verschiedener Konformationen hergestellt worden waren, ließen keine Unterschiede erkennen (Abb. 4.58). Nach der Standardisierung der Pseudovirionenkonzentrationen mittels L1-*capture*-ELISA wurde die Infektiosität von *D/R*-Pseudovirionen mit Plasmid verschiedener Konformationen und von durch direkte Interaktion hergestellten Pseudovirionen verglichen (Abb. 4.59). Während der prozentuale Anteil EGFP-positiver Zellen indirekt ein Maß für die Infektionseffizienz ist, gibt der Y Geo Mean-Wert die Verteilung der Fluoreszenzintensität an, die vom Expressionsniveau der Einzelzellen und somit von der Zahl der eingeschleusten Reporterplasmide pro Zelle abhängt. Interessanterweise konnten keine Unterschiede bei dem Anteil EGFP-positiver Zellen (Abb. 4.59A, 4.59C) oder bei der Fluoreszenzintensität (Abb. 4.59B) nachgewiesen werden. Alle Pseudovirionentypen konnten durch eine Präinkubation mit spezifischen Antikörpern neutralisiert werden (Abb. 4.59D).

Die Beobachtung, dass bei Pseudovirionen mit linearem Plasmid die Infektiosität nicht beeinträchtigt ist, scheint mit der Vermutung, dass eine SV40 ori-Replikation des Plasmids für eine detektierbare EGFP-Expression erforderlich ist, in Widerspruch zu stehen. Doch in SV40 T-Antigen-negativen CV1-Zellen konnte mit keiner der Pseudovirionen ein Gentransfer detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde mittels PCR getestet, ob mit linearer DNA hergestellte Pseudovirionen auch zirkuläres Plasmid enthalten (Abb. 4.60). Tatsächlich konnte zirkuläre DNA nachgewiesen werden, die vielleicht nach episomaler Replikation in SV40 T-Antigen-positiven Zellen die Detektion von EGFP ermöglicht. Vermutlich beruht dies auf einer unvollständigen Linearisierung. Denkbar ist aber auch, dass das lineare Plasmid zum Teil in der Zielzelle rezirkularisiert und somit der episomalen Replikation zugänglich wird.



**Abb. 4.58** Sucrosegradienten: L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1). 30  $\mu$ g VLPs wurden auf einen Gradienten geladen und 3 h bei 36 000 rpm und 4 °C im Rotor SW 41 zentrifugiert. Danach wurden 600  $\mu$ l-Fraktionen gewonnen und analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. A) *D/R* mit superhelikalem Plasmid. B) *D/R* mit relaxiertem Plasmid. C) *D/R* mit linearem Plasmid.



**Abb. 4.59** Vergleich der Infektiosität von Pseudovirionen mit verschiedenen Plasmidkonformationen: FACS-Analyse von mit Pseudovirionen behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). D/R = D/R-Pseudovirionen. D/R+ DNA = ohne DNA dis- und reassemblierte Partikel, Inkubation zusammen mit DNA. VLPs + DNA = VLPs, Inkubation zusammen mit DNA. A) Vergleich der verschiedenen Pseudovirionen: EGFP-positive Zellen (%). Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten, mit D/R-Pseudovirionen mit superhelikalem Plasmid als 100 %-Standard. B) Vergleich der verschiedenen Pseudovirionen: Y Geo Mean. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, mit D/R-Pseudovirionen mit superhelikalem Plasmid als 100 %-Standard. C) Repräsentatives Experiment, mit D/R-Pseudovirionen mit superhelikalem Plasmid als 100 %-Standard. D) Neutralisierung von durch direkte Interaktion hergestellten Pseudovirionen. Neutralisierung mit H16.U4 in der Verdünnung 1:1000 (4 °C über Nacht). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, mit unbehandelten Pseudovirionen als 100 %-Standard.



**Abb. 4.60** Nachweis zirkulären pEGFP-C3-Plasmids mittels PCR. Mit je 1 µl Sucrosegradient-Fraktion wurde eine PCR durchgeführt, bei der ein Fragment, das die MluI-Schnittstelle beinhaltet, amplifiziert wird (273 bp). Somit kann nur zirkuläres Plasmid als Matrize für eine PCR-Amplifikation dienen, nicht aber mit MluI linearisiertes Plasmid. NK = Negativkontrolle: PCR-Ansatz ohne Fraktion. PK = Positivkontrolle: pEGFP-C3.

### Gleichgewichtszentifugation

Die Analyse der Schwebedichte mittels CsCl-Gradienten, L1-*capture*-ELISA sowie L1- und L2-Western-Blots brachte bemerkenswerte Unterschiede in Abhängigkeit von der physikalischen Struktur des Plasmids hervor. In Anwesenheit von relaxiertem Plasmid reassemblierte Pseudovirionen zeigten zwei Peaks, die der Dichte leerer und gefüllter Partikel entsprachen (Abb. 4.61A), wobei letzterer im Vergleich zu Profilen von Pseudovirionen mit superhelikalem Plasmid (Abb. 4.39) stets besonders breit und ausgeprägt auftrat (1,33-1,36 g/ml, Kernbereich 1,33-1,34 g/ml). Im Gegensatz dazu findet sich bei *D/R*-Material mit linearem Plasmid nur ein "leichter" Peak mit der Schwebedichte leerer VLPs (1,29-1,30 g/ml, Abb. 4.61B), ebenso wenn zirkuläres Plasmid zusammen mit leeren VLPs (direkte Interaktion, Abb. 4.62) analysiert wird. Das Fehlen eines "schweren" Peaks, der für DNAhaltige Pseudovirionen zu erwarten wäre, widerspricht der Beobachtung, dass sowohl Pseudovirionen mit linearem Plasmid als auch mit Plasmid koinkubierte VLPs ähnlich "infektiös" sind wie Pseudovirionen mit zirkulärem Plasmid. Folglich ist die Verbindung von Partikeln mit DNA nicht immer an einer erhöhten Schwebedichte zu erkennen.

Auch hier stimmen die ELISA-Profile mit den Western-Blot-Signalen überein: Die Präparationen enthalten L1/L2-Partikel und keine größeren Mengen an denaturiertem L1-Protein. Die zusätzlichen Banden, die im L2-Blot in Abb. 4.61A zu sehen sind, beruhen auf durch längere Lagerung entstandene Degradationsprodukte von L2.



Abb. 4.61 CsCl-Gleichgewichtszentrifugation von verschiedenen Pseudovirionentypen: L1-*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). Je 100 µg Partikel wurden mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Gradienten mit dem Refraktometer vermessen. A) D/R mit relaxiertem Plasmid. B) D/R mit linearem Plasmid. Siehe Abb. 4.39 für einen Gradienten von mit superhelikalem Plasmid hergestellten Pseudovirionen.



**Abb. 4.62** CsCl-Gleichgewichtszentrifugation von durch direkte Interaktion entstandenen Pseudovirionen: L1*capture*-ELISA und Western-Blot (L1: CAMVIR1, L2: # 20). Je 100 µg Partikel wurden mindestens 40 h bei 48 000 rpm und 10 °C im Rotor 70.I Ti zentrifugiert. Nach der Fraktionierung wurden die Gradienten mit dem Refraktometer vermessen.

### DNase-Sensitivität des Reporterplasmids

Die verschiedenen Pseudovirionentypen (*D/R*-Pseudovirionen mit superhelikalen, relaxiertem und linearen Plasmid sowie durch direkte Interaktion mit superhelikalem Plasmid hergestellte Pseudovirionen) sollten nun hinsichtlich ihrer Assoziation mit dem Reporterplasmid näher untersucht werden. Zunächst wurde der Einfluss der Plasmidkonformation auf die DNase-Sensitivität der Pseudovirionen überprüft. Eine Behandlung mit DNase I oder Mikrokokkus-Nuklease vor der Pseudoinfektion führte bei allen Pseudovirionen zu einem substanziellen Verlust der Infektiosität (Abb. 4.63): Demnach bleibt das Plasmid unabhängig von seiner Konformation bei der *Reassembly* für DNasen zugänglich, scheint also in keinem Fall vollständig enkapsidiert zu sein.



**Abb. 4.63** DNase-Behandlung von Pseudovirionen mit unterschiedlichen Plasmidkonformationen: FACS-Analyse von mit *D/R*-Material behandelten COS1-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten, mit unbehandeltem *D/R*-Material (superhelikales Plasmid) als 100 %-Standard. Je 3 µg Partikel bzw. die äquivalente Menge DNA (4,5 µg) wurden mit DNase I (10 min mit 1 mg bei 37 °C) oder Mikrokokkus-Nuklease (10 min mit 5 U bei Raumtemperatur) inkubiert, unbehandelte Kontrollen wurden unter den gleichen Bedingungen ohne Enzym inkubiert. Zwei Tage nach 2 h Inkubation von 3 µg *D/R*-Material/6-Loch bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). *D/R* = *D/R*-Material ohne DNA. *D/R* + DNA = ohne DNA dis- und reassemblierte Partikel, zusammen mit DNA verabreicht. *D/R* relaxiert/superhelikal/linear = *D/R*-Material mit Plasmid der jeweiligen Konformation. DNA = Plasmid ohne Partikel. VLPs + DNA = VLPs, zusammen mit DNA verabreicht.

#### Detektion der Infektiosität in CsCl-Gradienten-Fraktionen

Um zu untersuchen, in welchem Dichtebereich sich die infektiösen Partikel befinden, wurden COS1-Zellen mit dialysierten CsCl-Gradienten-Fraktionen inkubiert und nach drei Tagen die EGFP-Fluoreszenz mittels FACS analysiert (Abb. 4.64). Bei Partikeln mit superhelikalem oder relaxiertem Plasmid wiesen die Fraktionen des Peaks bei höherer Schwebedichte unverkennbar den Hauptanteil der Infektiosität auf. Aber auch die Fraktionen des "leichten" Peaks zeigten, wenn auch wesentlich schwächer, eine spezifische Infektiosität. Bei den Gradienten mit linearem Plasmid erwiesen sich tatsächlich die Fraktionen des "leichten" Peaks als infektiös. Und auch bei den durch direkte Interaktion entstandenen Pseudovirionen war die Infektiostät den Fraktionen des "leichten" Peaks zugeordnet. Die "leichten" Partikel waren also keinesfalls "leer", sondern so mit DNA assoziiert, dass keine Veränderung der Schwebedichte resultierte.



Abb. 4.64 Infektiosität von CsCl-Fraktionen: FACS-Analyse von mit Pseudovirionen behandelten COS1-Zellen. Drei Tage nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert (Duplikate). Gezeigt sind repräsentative Experimente. A) superhelikales Plasmid. B) relaxiertes Plasmid. C) lineares Plasmid. D) durch direkte Interaktion entstandene Pseudovirionen (superhelikales Plasmid). M = Medium.

### Detektion partikelassoziierter DNA in CsCl-Gradienten-Fraktionen

Weiterhin wurde versucht, anhand von Southern-Blot-Analysen von Pseudovirionen-Gradientenfraktionen herauszufinden, in welchen Fraktionen partikelassoziierte DNA zu finden ist (Daten nicht gezeigt). Da bei der *Reassembly* ein im Verhältnis zu den Partikeln zehnfach molarer Überschuss Plasmidmoleküle eingesetzt wird, liegt bei *D/R*-Material die DNA größtenteils frei vor. Um störende Signale durch freies Plasmid zu entfernen, wurden die Fraktionen mit Mikrokokkus-Nuklease vorbehandelt. Hierfür orientierten sich die Bedingungen (1 U Enzym; 1 min Inkubation bei Raumtemperatur) an der bei der *Reassembly* eingesetzten DNA-Menge. Überraschenderweise waren bei allen Gradienten die DNA-Signale im Bereich des "leichten" Peaks angesiedelt: Zwar erschienen wie erwartet bei *D/R*-Pseudovirionen mit linearem Plasmid und durch direkte Interaktion entstandenen Pseudovirionen die DNA-Signale in den infektiösen Fraktionen im Bereich des "leichten" Peaks (Abb. 4.64C und 4.64D). Aber auch bei *D/R*-Pseudovirionen mit superhelikalem oder relaxiertem Plasmid, bei denen der Hauptanteil der Infektiosität ja eindeutig in den Fraktionen des "schweren" Peaks anzutreffen war (Abb. 4.64A und 4.64B), fanden sich die DNA-Signale nur in den Fraktionen des "leichten" Peaks.

Wie auch die geringe, aber spezifische Infektiosität dieser Fraktionen in Abb. 4.64A und 4.64B belegen die DNA-Signale, dass neben "schweren" Partikeln auch "leichte" Partikel, die die Schwebedichte leerer DNA aufweisen, nach *Disassembly/Reassembly* mit zirkulärem Plasmid assoziiert sind. Und offensichtlich ist die DNA, die mit den "schweren" Partikeln (mit höherer Kapazität zum Gentransfer) assoziiert ist, sogar DNase-sensitiver als die DNA, die mit den "leichten" Partikeln assoziiert ist.

	<i>D/R</i> mit superhelikalem Plasmid	<i>D/R</i> mit relaxiertem Plasmid	<i>D/R</i> mit linearem Plasmid	Direkte Interaktion mit superhelikalem Plasmid
Einfluss auf				
<b>Reassembly-Prozess</b>	nein	nein	nein	-
(Sucrosegradient)				
Infektiosität	+	+	+	+
Schwebedichte im CsCl-	"leichter" und	"leichter" und	"leichter" Peak	"leichter" Peak
Gradient	"schwerer" Peak	"schwerer" Peak		
Infektiosität nach DNase-Behandlung	aufgehoben	aufgehoben	aufgehoben	aufgehoben
Infektiosität im CsCl-	hauptsächlich	hauptsächlich	"leichter" Peak	"leichter" Peak
Gradient	"schwerer" Peak	"schwerer" Peak	**	
Partikelassoziierte DNA im CsCl-Gradient	"leichter" Peak	"leichter" Peak	"leichter" Peak	"leichter" Peak

Tah <b>13</b> Veraleich	verschiedener Pseudow	irionentunen Zucami	menfaccuna der F	Trachnicce in 1 2 8
1 ab. 4.5 Vergieren	verseniedener i seduov	monentypen. Zusann	memassung der I	ngcomssc m 4.2.0.

Zusammenfassend beeinflusste die physikalische Struktur des Plasmids bei D/R-Pseudovirionen weder die Zusammenlagerung der Partikel bei der *Reassembly*, noch spielte sie für die Infektiosität eine Rolle. Durch direkte Interaktion hergestellte Pseudovirionen zeigten eine höhere Infektiosität, doch wenn die Partikel vor der Konzentrationsbestimmung im ELISA einer *Disassembly/Reassembly* ohne Plasmid unterzogen worden waren, lag die Infektiosität unter jener der *D/R*-Pseudovirionen. Die CsCl-Gradientenprofile demonstrieren, dass die Schwebedichte der DNA-Partikelkomplexe von der Konformation des Plasmids bei der *Disassembly/Reassembly* abhängt. Im Gegensatz zu *D/R*-Pseudovirionen erfahren mittels direkter Interaktion hergestellte Pseudovirionen durch die Assoziation mit superhelikalem Plasmid keine Erhöhung der Schwebedichte. Bei allen Pseudovirionentypen geht die Infektiosität verloren, wenn sie mit DNase behandelt werden. Die nähere Untersuchung der "leichten" und "schweren" Partikel in den CsCl-Gradienten ordnete bei *D/R*-Pseudovirionen mit zirkulärem Plasmid die Infektiosität hauptsächlich den Fraktionen des "schweren" Peaks zu; partikelassoziierte DNA ließ sich jedoch nur in den Fraktionen des "leichten" Peaks nachweisen. Dagegen waren sowohl die Infektiosität als auch partikelassoziierte DNA bei "leichten" Partikeln zu finden, wenn *D/R*-Pseudovirionen mit linearem Plasmid oder durch direkte Interaktion hergestellte Pseudovirionen untersucht wurden.

Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche Formen der DNA-Partikelassoziation hin. Die DNase-Sensitivität der verschiedenen Pseudovirionentypen spricht jeweils gegen eine vollständige Enkapsidierung des Reporterplasmids in das Partikel. Möglich erscheint neben einer äußerlichen Anheftung eine partielle Verpackung. *Disassembly/Reassembly* und direkte Interaktion funktionieren über verschiedenartige Assoziationsmechanismen, denn sie führen bei gleicher Plasmid-Isoform zu Pseudovirionen mit unterschiedlicher Schwebedichte.

### **5** Diskussion

Angesichts der mittlerweile zweifelsfrei anerkannten kausalen Rolle von "high risk"-HPV-Infektionen bei der Entstehung des Zervixkarzinoms (Bosch *et al.*, 2002) und zunehmenden Hinweisen auf Zusammenhänge mit zahlreichen anderen hyperproliferativen Läsionen, ist eine detaillierte Kenntnis der molekularen Mechanismen einer Papillomavirusinfektion sehr hilfreich, um Immunisierungsstrategien und Therapien zu entwickeln. Besonders die Vielfalt der bisher identifizierten HPV-Typen und ihr ausgeprägter Wirts- und Gewebetropismus sowie unterschiedliche Persistenzeigenschaften werfen viele Fragen auf. Doch aufgrund des Fehlens eines effizienten *in vitro*-Replikationssystems für Papillomaviren beschränkten sich die experimentellen Ansätze zunächst weitgehend auf Bindungsstudien mit virusähnlichen Partikeln (VLPs). Die Etablierung von Systemen zur Herstellung von Pseudovirionen, also mit einem Reporterplasmid assoziierten Partikeln, macht auch frühe Infektionsereignisse wie die Partikelbindung und -aufnahme sowie der Transport der Reporter-DNA in den Kern einer experimentellen Untersuchung zugänglich.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war, HPV16-Pseudovirionen herzustellen, um ein Reportergen partikelvermittelt in Zielzellen einzuschleusen. Dies wurde mit zwei verschiedenen Methoden versucht: durch *in vivo*-Synthese in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und durch die nachträgliche Verbindung von VLPs mit dem Reporterplasmid mittels *in vitro-Disassembly/Reassembly*.

# 5.1 HPV16-Pseudovirionen konnten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht hergestellt werden

Das Hefesystem von Rossi *et al.* (2000; siehe auch Abb. 4.1) erwies sich trotz einer anfangs effizienten Pseudovirionenproduktion langfristig als sehr unzuverlässig. Zuletzt konnten keine infektiösen Pseudovirionen mehr isoliert werden. Deshalb sollte versucht werden, mit neuen Produzentenklonen optimale Bedingungen für eine standardisierte Pseudovirionenproduktion zu ermitteln. Hierfür wurden nach dem Austausch des GFP-Reportergens auf dem Zielplasmid durch die stärker fluoreszierende Variante EGFP (Cormack *et al.*, 1996) neue Hefeklone hergestellt, die sowohl das Verpackungs- als auch das Zielplasmid enthalten. Die induzierbare Expression der Kapsidproteine und die Anwesenheit des Zielplasmids in den Transformanden wurde mittels Western-Blot-Analyse und PCR überprüft.

Die Kultivierung dieser Hefeklone nach dem Pseudovirionen-Produktionsprotokoll von Rossi *et al.* (2000) führte zur Bildung von VLPs, die anhand von L1-*capture*-ELISA, Elektronenmikroskopie und Sedimentationsanalysen der Hefe-Rohextrakte nachgewiesen wurden. Bei der Untersuchung der Partikel mittels CsCl-Gradienten konnten die Ergebnisse von Rossi *et al.* (2000), die nur bei Anwesenheit des Zielplasmids neben einem "leichten" Peak einen Peak mit erhöhter Schwebedichte zeigten, nicht reproduziert werden. Zwar trat eine breite Streuung der Schwebedichte auf, die den Bereich für VLPs umfasst und den für DNA-haltige Partikel berührt, doch impliziert eine vergleichbare Verteilung der Partikel aus Kontrollklonen ohne Zielplasmid, dass die höhere Schwebedichte aus anderen Faktoren als

Diskussion

einer DNA-Enkapsidierung resultiert. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Verpackung oder Assoziation mit genomischer DNA oder anderen zellulären Bestandteilen in der Hefe. Fligge et al. (2001) demonstrierten die Verpackung zellulärer DNA in VLPs mit erhöhter Schwebedichte in Baculovirus-infizierten Insektenzellen, wobei jedoch nur in fortgeschrittenen Infektionsstadien ausreichend kleine DNA-Fragmente vorlagen. Da in den Hefezellen keine lytische Infektion stattfindet, sollten allerdings keine für eine Verpackung geeigneten DNA-Fragmente vorhanden sein. Die äußerliche Anlagerung von DNA oder anderen zellulären Komponenten an die Partikel ist aber durchaus denkbar, zumal die elektronenmikroskopische Betrachtung von Peakfraktionen der CsCl- und Sucrosegradienten zeigte, dass zumindest ein Teil der VLPs mit vesikulärem Debrismaterial assoziiert war.

Nach Inkubation der Zielzellen (CV1, COS1) mit den Hefe-Rohextrakten konnte keine EFGP-Expression und damit keine Pseudoinfektion detektiert werden. Daran änderten auch Modifikationen der Infektionsbedingungen oder eine ständige Selektion während der Hefekultur zur Minimierung eines Plasmidverlusts nichts. Aufgrund der hohen und sehr variablen Autofluoreszenz der Zielzellen nach Inkubation mit den Rohextrakten wurde nicht ausgeschlossen, dass eine ineffiziente Pseudoinfektion dadurch maskiert wird. Rossi *et al.* (2000) bevorzugten Rohextrakte für die Pseudoinfektion, weil nach CsCl-Gradienten-Aufreinigung eine etwa zehnfach geringere Infektiosität der Peudovirionen resultierte. Da sich in den Rohextrakten noch viel Debrismaterial befindet, können undefinierbare Sekundäreffekte durch zelluläre Komponenten auftreten, die die störenden Autofluoreszenzen auslösen. Deshalb sollten durch zusätzliche Schritte gereinigte Pseudovirionpräparationen gewonnen werden. Doch weder nach Sucrosesedimentation noch nach Heparin-Affinitätschromatographie konnten infektiöse Pseudovirionen isoliert werden.

Infolgedessen sollte eine Fehleranalyse mögliche Ursachen für das Scheitern des Systems bestimmen. Bei der Überprüfung der Plasmidstabilität im Verlauf der mehrtägigen Hefekultur war kein kontinuierlich zunehmender Verlust der Plasmide, aber eine Akkumulierung von Kapsidproteinen zu erkennen. Dabei enthielten konstant ein Drittel bis die Hälfte der Zellen beide Plasmide und erfüllten somit die Voraussetzung für eine Pseudovirionenproduktion. Auch wenn nur ein Teil der Hefepopulation als Produzentenzellen funktionieren würde, sollten Pseudovirionen isoliert und eine Pseudoinfektion nachgewiesen werden können. Um zu analysieren, ob die in den Hefen produzierten Partikel überhaupt mit dem Zielplasmid assoziiert vorliegen, wurden Heparinsäule- und CsCl-Fraktionen auf DNase-resistente Zielplasmid-DNA untersucht, die tatsächlich in den Partikelfraktionen nachgewiesen werden konnte. Zumindest ein Teil der Partikel lag also mit Zielplasmid assoziiert vor, wobei ungeklärt blieb, ob es sich um eine Enkapsidierung oder eine äußere Anheftung an das Partikel handelte. Die Mengenabschätzung deutete jedoch darauf hin, dass dieser Anteil extrem gering war. Da eine zu niedrige Kopienzahl des Zielplasmids in den Hefezellen vermutet wurde, sollte diese durch eine Deletion im Bereich des ura3-Promotors nach Okkels (1996) erhöht werden, um eine effizientere Verpackung bzw. Anlagerung zu erzielen. Doch auch diese Strategie führte nicht zur Gewinnung infektiöser Pseudovirionen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem Hefe-Produktionssystem zwar HPV16 L1/L2 VLPs isoliert werden konnten, die auch zumindest teilweise mit dem EGFP-Zielplasmid assoziiert waren, doch keine Pseudoinfektion von Zielzellen nachgewiesen werden konnte. Mögliche Gründe für das Scheitern des Systems sind in Abb. 5.1 aufgeführt. Indizien für eine zu ineffiziente Verpackung des Zielplasmids in die Kapside sind das Fehlen eines distinkten "schweren" Peaks in CsCl-Gradienten und die geringe Menge an Zielplasmid, die in Partikelfraktionen detektiert wurde. Es gibt mehrere mögliche Gründe, warum die "schweren" Partikel keinen Transfer des Reportergens bedingen. So ist nicht auszuschließen, dass durch unbekannte Interaktionen mit Komponenten aus der Hefezelle - z.B. einer funktionellen Neutralisierung durch die Blockierung bestimmter Kapsidproteindomänen - die Infektiosität aufgehoben wird. Schließlich könnte das Expressionsniveau des Reportergens EGFP nach einer erfolgreichen Pseudoinfektion zu niedrig ausfallen, um detektiert werden zu können. Bei in vitro konstruierten Pseudovirionen scheint die SV40 ori-abhängige Replikation in Affennierenzellen essenziell für eine detektierbare EGFP-Expression (4.2.5). Eine episomale Amplifikation des Zielplasmids in der Zielzelle findet bei Hefe-Pseudovirionen nicht statt, denn das Zielplasmid enthält keinen SV40-Replikationsursprung. Deshalb ist denkbar, dass bei diesem System ein potenzieller Gentransfer durch Pseudovirionen unter der Nachweisgrenze liegt.



**Abb. 5.1** Mögliche Gründe für das Scheitern der Pseudovirionenproduktion in Hefe: Mangelhafte Verpackung oder Assoziation des Reporterplasmids mit den Partikeln, fehlende Infektiosität der Pseudovirionen (z.B. durch die Aggregation mit zellulären Komponenten) oder eine zu geringe, nicht detektierbare Transgenexpression.

#### 5.1.1 Kritische Aspekte des Hefe-Produktionssystems

Hefezellen sind für die effiziente Expression und adäquate posttranslationelle Modifikation vieler heterologer Proteine geeignet. Ihre Kultur ist gegenüber Säugerzell-Systemen weit weniger aufwändig und im industriellen Maßstab möglich. Meist dienen 2µm-basierte Plasmide als Vektoren für die Transgene, denn sie erreichen hohe Kopienzahlen (60-100 Kopien/haploides Genom) und sind relativ stabil (Rose und Broach, 1990). Dabei kann eine hohe Variabilität der Kopienzahl unter den einzelnen Zellen einer Population auftreten. Unter

Selektionsbedingungen enthalten 60-95 % der Zellen das Plasmid, je nach Selektionsmarker, Vektortyp und exogener DNA (Jayaram *et al.*, 1983; Murray und Szostak, 1983).

Um den mitotischen Verlust der Plasmide zu minimieren, wäre ein Pseudovirionen-Kulturprotokoll, bei dem auch während der Produktionsphase nicht auf eine Selektion verzichtet wird, sinnvoll. Mit den Auxotrophie-Selektionsmarkern leu2-d und ura3 für das Verpackungs- und Zielplasmid könnte dann aber kein YPG-Vollmedium verwendet werden. Definierte Selektionsmedien bieten wesentlich schlechtere Wachstumsund Expressionsbedingungen; es wird nur etwa ein Zehntel der in YPG-Vollmedium möglichen Zelldichte erreicht (siehe auch 4.1.5). Der leu2-d-Marker kann nicht ohne weiteres durch einen anderen Marker ersetzt werden, denn dieses Plasmid kodiert, wie in 4.1 beschrieben, neben dem Leucin-Gen für Replikationsfaktoren, die in trans auch für den Erhalt des Zielplasmids, das nur den 2µm-Replikationsursprung enthält, essenziell sind.

Wenn mehrere 2µm-Vektoren gleichzeitig in der Hefezelle repliziert werden sollen, kommt es zu einem bestimmten Kopienzahl-Verhältnis, denn das 2µm-Replikationssystem ist so reguliert, dass insgesamt 60-100 Kopien vorliegen (Rose und Broach, 1990). Für das Pseudovirionen-System wäre optimal, wenn möglichst viele Zielplasmide zur Verpackung zur Verfügung stünden, während eine geringere Anzahl Verpackungsplasmide für eine ausreichende Expression der Kapsidproteine sorgen würde. Die Zuordnung der Selektionsmarker des vorliegenden Systems favorisiert aber gerade eine ungünstige Mengenverteilung. Da das Verpackungsplasmid den *leu2-d*-Marker trägt, bei dem die stark reduzierte Leucin-Expression durch eine hohe Kopienzahl kompensiert werden muss (Erhart und Hollenberg, 1983), liegt das Zielplasmid vermutlich nur in geringer Kopienzahl vor. Ein Austausch der Marker ist nicht ohne weiteres möglich, da die *leu2-d*-Sequenz mit 1092 bp zu groß für das Zielplasmid ist, welches für eine Verpackung in das Kapsid eine Größe von 8 kb nicht überschreiten darf.

Eine weiterer Nachteil des Systems ist, dass es in der Hefezelle zu Rekombinationsereignissen zwischen den Plasmiden kommen kann. Mitotische Rekombinationen treten in der Hefe generell mit einer Frequenz von  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  pro Lokus und Generation auf (Meeks-Wagner und Hartwell, 1986). Auch bei 2µm-basierten Plasmiden wurden homologe Rekombinationen beobachtet (Whiteway und Ahmed, 1984; Bruschi und Howe, 1988). So lange das Verpackungs- und das Zielplasmid homologe Sequenzen wie den 2µm-ori aufweisen, sind solche Rekombinationen nicht auszuschließen.

### 5.1.2 Ansätze zur Etablierung eines in vivo-Pseudovirionen-Produktionssystems

Um die Problematik zweier konkurrierender 2µm-Plasmide und mangelnder Plasmidstabilität zu umgehen, könnten die Kapsidgene und das E2-Gen in das Hefegenom integriert werden. Nur durch seltene homologe Rekombinationsereignisse können die Transgene, deren Kopienzahl im Bereich von einer bis fünf Kopien/Zelle liegt (Orr-Weaver und Szostak, 1983), wieder verloren gehen (Thomas und Rothstein, 1989). Allerdings müssten dann sehr starke Promotoren ausgewählt werden, um mit den wenigen Kopien eine ausreichende Expression

zu erhalten. Gleichzeitig aber sollte die Expression induzierbar sein, um zytotoxische Effekte durch die überexprimierten Fremdproteine zu vermeiden. Leider sind die effizientesten Hefe-Promotoren konstitutiv aktive Promotoren der Glykolyse, während die streng durch Galaktose kontrollierten Promotoren des Galaktose-Metabolismus nur zu einer moderaten Expression führen (Piper, 1994; Park *et al.*, 2000). Alternativ gibt es Vektoren, die mit hoher Kopienzahl (bis zu 140 Kopien/Zelle) in ribosomale Loci integrieren können, wobei jedoch die mitotische Stabilität durch das Einfügen eines heterologen Gens drastisch reduziert wird (Lopes *et al.*, 1996).

Weiterhin bieten sich episomale Plasmide an, die über ein ARS-Element repliziert werden, das von dem natürlichen Hefe-Replikationsursprung abgeleitet wurde. Allerdings sind diese Vektoren ohne Selektion mit einer Verlustrate von 10<sup>-2</sup>/Zellen pro Generation nicht stabil (Murray und Szostak, 1983; Futcher und Cox, 1984). Deshalb müssten Selektionsmarker gewählt werden, die eine produktive Hefekultur nicht einschränken.

In das Zielplasmid könnte eine SV40 ori-Sequenz eingefügt werden, wobei die maximal verpackbare Größe von 8 kb nicht überschritten werden darf. In SV40 T-Antigen-positiven Zielzellen wäre dann das EGFP-Expressionsniveau höher und eine Fluoreszenz eher zu detektieren. Um die EGFP-Fluoreszenz besser von Autofluoreszenz unterscheiden zu können, könnte das EGFP-Protein mit einem Kernlokalisationssignal ausgestattet werden.

Vielleicht unterscheiden sich die Bedingungen für die (Pseudo-)Virionsynthese in der Hefezelle in kritischen Punkten von denen der natürlichen Wirtszelle. Zwar bilden sich nach Expression der Kapsidproteine in *Saccharomyces cerevisiae* VLPs (Hofmann *et al.*, 1995; Neeper *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1999), erste Berichte über die Verpackung des BPV1-Genoms in Virionen (Zhao und Fraser, 2002) blieben jedoch bislang unbestätigt. Der natürlichen Papillomavirus-Replikation käme die Konstruktion von Pseudovirionen in Säugerzelllinien am nächsten. Kürzlich wurde ein System zur Produktion von Pseudovirionen verschiedener HPV-Typen in 293TT-Zellen publiziert, bei dem sehr hohe Ausbeuten erzielt wurden (Buck *et al.*, 2004; siehe auch 1.4.1). Da diese vielversprechende Strategie auf virale Vektoren verzichtet, sondern hier die Plasmide durch Transformation in die Produzentenzellen eingeführt werden, entfällt das Problem einer lytischen Infektion dieser Zellen und der damit einhergehende Effizienzverlust – der entscheidende Nachteil der bisherigen Produktionssysteme in Säugerzellen (Roden *et al.*, 1996a; Unckell *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998; Stauffer *et al.*, 1998).

### 5.2 In vitro-Pseudovirionen-Produktion durch Disassembly/Reassembly

Als Alternative zum Hefe-Produktionssystem wurde die *in vitro*-Herstellung von Pseudovirionen durch *Disassembly/Reassembly* (D/R) von HPV16 L1/L2 VLPs aus Insektenzellen (siehe auch 1.4.1 und Abb. 4.33) nach Kawana *et al.* (1998a) gewählt. Das Zerfallen der Partikel in Kapsomere und die erneute Zusammenlagerung in Gegenwart des Reporterplasmids konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie und Sedimentationsanalysen dokumentiert werden. Wie auch bei Kawana *et al.* (1998a) waren unter dem Elektronenmikroskop keine morphologischen Unterschiede zwischen den ursprünglichen VLPs und den rekonstituierten Partikeln sichtbar. Die Sucrosesedimentationen ließen keine S-Wert-Veränderung der Partikel nach Disassembly/Reassembly bemerken, und die im L1-capture-ELISA detektierten konformationellen Epitope blieben erhalten. Die Anwesenheit von Reporterplasmid beim *Reassembly* führte nicht zu erkennbaren Veränderungen der Partikelstruktur. Außerdem verringerten sich häufig die in unterschiedlichen VLP-Präparationen variablen Anteile an L1/L2-Aggregaten oder Intermediatformen nach Disassembly/Reassembly zugunsten korrekt zusammengelagerter Partikel. Dieser Effekt wurde auch von McCarthy et al. (1998) beschrieben: Reassemblierte Partikel zeigten eine homogenere S-Wert-Verteilung (im Bereich von 168 S) als das VLP-Ausgangsmaterial, das zum Teil verringerte S-Werte aufwies, und bei dem elektronenmikroskopisch auch variablere Kapsidgrößen zu sehen waren. Einen weiteren Hinweis auf eine für funktionelle Pseudovirionen essenzielle authentische Kapsidstruktur liefert die erfolgreiche Neutralisierung von HPV11-Virionen durch Antiseren, die von Immunisierungen mit reassemblierten Partikeln stammten (McCarthy et al., 1998).

Die Analyse des *D/R*-Materials mittels CsCl-Gleichgewichtszentrifugation ergab, dass sich bei in Gegenwart von Plasmid reassemblierten Partikeln neben dem für "leere" VLPs charakteristischen Peak ein zweiter bildete, der im Bereich der Schwebedichte für DNA-haltige Kapside angesiedelt war. Diese Beobachtung ist zuvor nicht nur bei *in vitro* konstruierten Pseudovirionen gemacht worden (Kawana *et al.*, 1998a; Touzé und Coursaget, 1998), sondern auch bei Pseudovirionen aus *in vivo*-Systemen (Unckell *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2000).

### 5.2.1 Charakterisierung der Pseudoinfektion

### Einfluss des Reporterplasmids

Nach Konfrontation von COS1-Zellen mit dem D/R-Material konnte der Transfer der andere Reportersysteme eingesetzt werden können, so lange das Reporterplasmid eine Maximalgröße nicht überschreitet - spezielle Verpackungselemente sind zumindest bei der in vitro-Herstellung nicht erforderlich (Kawana et al., 1998a; Touzé und Coursaget, 1998). Es ist anzunehmen, dass die Obergrenze für die Plasmidgröße bei der HPV-Genomgröße von 8 kb liegt. Bei der Produktion von Pseudovirionen in COS1-Zellen führte die schrittweise Vergrößerung des Zielplasmids über die Genomgröße hinaus zu einer kontinuierlichen Abnahme der Verpackungseffizienz, wobei ein maximal 10,2 kb großes Plasmid noch verpackt wurde (Zhao et al., 1998). Für in vitro-generierte Pseudovirionen gibt es ebenfalls eine Begrenzung: DNase-resistentes Plasmid konnte bei einer Größe von 7,2 kb, nicht aber bei 10,3 kb, detektiert werden (Touzé und Coursaget, 1998). Die Beobachtung, dass der Einsatz des kleineren Plasmids pEGFP-C3 (4,7 kb) zu einem effizienteren Gentransfer als bei der Verwendung von pCMVB (7,2 kb) führte, stimmt mit kürzlich veröffentlichten Ergebnissen für in Säugerzellen hergestellte Pseudovirionen überein (Buck et al., 2004): Die Effizienz der Pseudovirionenproduktion sinkt mit zunehmender Größe des Reporterplasmids. Demnach sind Plasmide, die kleiner als das HPV-Genom sind, besser für die Konstruktion von Pseudovirionen geeignet. Auch bei SV40-Viren gibt es Hinweise darauf, dass verkleinerte Genome effizienter verpackt werden (Yoshiike, 1968; Tai *et al.*, 1972).

### Partikelabhängigkeit des Gentransfers

Verschiedene im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente belegen, dass der Gentransfer mit D/R-Material tatsächlich durch infektiöse Pseudovirionen vermittelt wird. Die Analyse von Sucrosegradienten von D/R-Material zeigt, dass die Infektiosität in den Fraktionen mit korrekt rekonstituierten Partikeln, aber auch in den Kapsomerfraktionen zu finden war. Dies deutet neben einem Gentransfer durch Pseudovirionen auf Kapsomer-DNA-Komplexe hin, die ebenfalls das Reporterplasmid in die Zielzelle schleusen können. Es könnte sich aber auch um einen artifiziellen Effekt handeln, da sich während der Dialyse zur Entfernung der Sucrose aus den Kapsomeren erneut Partikel zusammenlagern können. Gegen einen Kapsomer-vermittelten DNA-Transport spricht zwar, dass Kapsomere nicht an den gleichen zellulären Rezeptor wie VLPs binden können (Volpers et al., 1995), doch könnte ein Transfer auch über andere Mechanismen stattfinden. Nachdem Boursaghin et al. (2003) L1und L2-Peptide mit der Fähigkeit zum Gentransfer in Zielzellen identifizierten, die neben DNA auch Heparin binden, erscheint ein Kapsomer-vermittelter Gentransfer durchaus möglich. Jedenfalls zeigten weitere Versuche in dieser Arbeit, dass DNA allein oder mit hitzedenaturiertem D/R-Material nicht in die Zielzellen gelangte. Demnach ist die intakte Konformation der Kapsidproteine notwendig für die Kapazität zum Gentransfer.

Heparansulfate und Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane vermitteln die Pseudoinfektion von Pseudovirionen aus Säugerzellen (Giroglou *et al.*, 2001a) und *in vitro*-Synthese (Combita *et al.*, 2001). Die Blockierung des Gentransfers durch die Präinkubation mit Heparin in dieser Arbeit demonstriert, dass es sich bei *D/R*-Material tatsächlich um Pseudovirionen handelt, die gleichermaßen über Heparansulfate in die Zelle gelangen. Ebenfalls auf einen partikelvermittelten Gentransfer weist die dosisabhängige Blockierung der Pseudoinfektion mit verschiedenen HPV16 L1-spezifischen neutralisierenden Antikörpern hin. Sowohl für ein neutralisierender Effekt detektiert: Die Pseudovirionen werden nur durch HPV16-spezifische Antikörper neutralisiert.

Daraus ergibt sich die mögliche Anwendung der Pseudovirionen zur Detektion neutralisierender Antikörper in Patientenseren z.B. für epidemiologische Studien. Infektionen mit genitalen HPV-Typen induzieren eine serologische Immunantwort gegen L1, die oft mehrere Jahre persistiert und meist HPV-Typ-spezifisch ist (Kirnbauer *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 1996; Carter *et al.*, 2000). Immunodominant wirken dabei konformationelle, oft neutralisierende Epitope (Christensen *et al.*, 1990; Konya und Dillner, 2001). Es sind auch lineare Epitope bekannt, die in der Regel nicht neutralisierend wirken und oft kreuzreaktiv sind (Christensen *et al.*, 1994; Heino *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996a). Diese Epitope befinden sich wahrscheinlich nicht an der Virusoberfläche (Christensen *et al.*, 1996b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden exemplarisch zehn Humanseren mit unterschiedlichen ELISA-Reaktivitäten für verschiedene HPV-Typen getestet. Dabei wurde keine

Kreuzneutralisierung durch HPV18-, HPV6b-, HPV11- und HPV1-positive Seren verzeichnet. Dies ist nicht erstaunlich, denn für Kreuzreaktionen mit HPV16-Kapsiden kommen in erster Linie HPV31-, HPV33- und HPV58-spezifische Antikörper in Frage (Combita *et al.*, 2002; Giroglou *et al.*, 2001). Diese HPV-Typen sind phylogenetisch eng mit HPV16 verwandt (Chan *et al.*, 1995). Nach einer HPV-Infektion werden hauptsächlich HPV-Typ-spezifische Antikörper induziert; generell kann für weniger als 10 % eine Kreuzneutralisierung nachgewiesen werden (Coursaget, 2003).

Interessanterweise wirkte eines der beiden im ELISA HPV16-positiven Seren nicht neutralisierend. Dies muss nicht bedeuten, dass der Neutralisierungsnachweis weniger sensitiv als der ELISA ist - insbesondere, da sich die ELISA-Reaktivität eines anderen, eindeutig als neutralisierend identifizierten Serums im gleichen Bereich befindet. Vielmehr liegt nahe, dass das Serum HPV16 L1-spezifische, aber nicht neutralisierend wirkende Antikörper enthält. Gegenüber VLP-basierten ELISAs haben Neutralisierungsassays den Vorteil, speziell die Antikörper zu detektieren, die auch wirklich eine Infektion verhindern können und deshalb relevant für z.B. Immunisierungsstudien sind. Dabei gibt es mittlerweile Systeme, die einen hohen Probendurchsatz erlauben und mit den ELISAs vergleichbare Spezifitäten und Sensivitäten erreichen (Pastrana *et al.*, 2004). Verglichen mit Assays, bei denen lediglich die Antikörper-vermittelte Bindungsinhibition von VLPs an Zellen gemessen wird, sind sie überlegen, denn auch durch andere Mechanismen wie das Blockieren der Internalisierung oder der Kapsid-Dissoziation (Roden *et al.*, 1996b; Booy *et al.*, 1998) können Antikörper eine Infektion unterbinden.

### Kinetik der Pseudoinfektion

Bei der Mehrzahl der animalen Viren reicht ein infektiöses Partikel aus, um eine Infektion der Wirtszelle auszulösen. Hier besteht eine lineare Korrelation zwischen der Anzahl infektiöser Virionen und der Infektionsereignisse: Die Infektion folgt einer *One-hit*-Kinetik. Im Gegensatz hierzu werden bei einer *Two-hit*-Infektionskinetik zwei infektiöse Partikel pro Zelle benötigt, damit es zu einer produktiven Virusreplikation kommen kann (siehe auch Abb. 4.49). Dies ist z.B. der Fall, wenn zwei verschiedene Viriontypen benötigt werden, wie bei manchen Pflanzenviren, bei denen sich Kapside mit segmentierten (+)-RNA-Genomen ergänzen müssen: Beispiele hierfür sind das *Cowpea*-Mosaik-Virus (van Kammen, 1968) und das Alfalfa-Mosaik-Virus (Bol und Lak-Kaashoek, 1974). Bestimmte Adenoviren weisen je nach Permissivität der Zielzellen eine *One-hit-*, *Two-hit-* oder *Multiple-hit*-Kinetik auf (Tiemessen *et al.*, 1990). Ähnliches wurde für ökotrope murine Leukämie-Viren und verschiedene Rattenzellen festgestellt (Okada und Watanabe, 1980). Die Infektionskinetik sagt nichts über das Verhältnis Viruspartikel/infektiöse Einheiten aus, das bei Papillomaviren mit ca.  $10^4$  sehr groß ist (Davis *et al.*, 1970).

Die Pseudoinfektion von COS1-Zellen mit linear sinkenden Pseudovirionenmengen zeigte eine direkt proportionale Beziehung zwischen Partikeldosis und infektiösen Ereignissen (dem Anteil EGFP-positiver Zellen) auf. Es genügt also ein infektiöses Pseudovirion, um eine Pseudoinfektion der Zielzelle detektieren zu können.

### Assoziation des Reporterplasmids mit dem Partikel

Wie in 1.2.1 erwähnt, weist das Papillomavirusgenom in nativen Virionen eine hochkompakte, Nukleosomen-ähnliche Struktur auf (Favre, 1975; Pfister *et al.*, 1977). Eine analoge Enkapsidierung des Reporterplasmids in Pseudovirionen ist daher am ehesten in *in vivo*-Produktionssystemen zu erwarten, in denen es chromatinisiert vorliegt. Dagegen erscheint schwer vorstellbar, dass das Histon-freie nackte Plasmid bei *in vitro*-Synthesen für eine Verpackung ausreichend kondensiert werden kann. Dennoch wurden auch für beide der bislang publizierten *in vitro*-Systeme Ergebnisse präsentiert, die auf eine Verpackung hindeuten (Kawana *et al.*, 1998a; Touzé und Coursaget, 1998). Schäfer *et al.* (2002) konnten bei einem Vergleich von *in vivo*- und *in vitro*-generierten Pseudovirionen keine Unterschiede im Grad der Disulfidvernetzung der Kapsidoberfläche feststellen, der bei einer DNA-Enkapsidierung in Pseudovirionen höher ist als bei VLPs (Fligge *et al.*, 2001). Um eine Enkapsidierung nachzuweisen, wird meist die durch eine Verpackung vor DNase geschützte DNA detektiert sowie die Infektiosität nach einer DNase-Behandlung analysiert (Übersicht in Tab. 5.1).

Produktionssystem	Detektion verpackter DNA	Referenz
Semliki Forest-Virus in BPHE-1-Zellen	Infektiosität nach DNase I-Behandlung der Zelllysate vor Partikelaufreinigung; Kryoelektronenmikroskopie: elektronendichter Kern bei der Mehrzahl der Partikel	Roden <i>et al.</i> , 1996a
Vacciniavirus in Säugerzellen	Infektiosität nach DNase I-Behandlung; Nachweis DNase-resistenter DNA durch PCR	Unckell et al., 1997
	Nachweis DNase-resistenter DNA durch Transformation in Bakterien	Zhao et al., 1998
	Infektiosität nach DNase I-Behandlung	Stauffer et al., 1998
Baculovirus in Sf-9-Zellen	Infektiosität nach DNase I-Behandlung; Nachweis DNase-resistenter DNA durch	Zhao et al., 2000
DNA-Transfektion in 293TT	Infektiosität nach DNase-Behandlung (Benzonase und Exonuklease)	Buck et al., 2004
2μm-basiertes episomales Plasmid in Hefe	Nachweis DNase-resistenter DNA durch PCR, gefolgt von Southern-Blot-Hybridisierung	Rossi et al., 2000
In vitro-Synthese	Infektiosität nach DNase I-Behandlung; Nachweis DNase I-resistenter DNA durch PCR und im Agarosegel	Kawana <i>et al.</i> , 1998a
	Infektiosität nach DNase-Behandlung (Benzonase); Nachweis DNase-resistenter DNA im Agarosegel	Touzé und Coursaget, 1998

Tab. 5.1 Die Detektion enkapsidierter DNA in verschiedenen Pseudovirion-Produktionssystemen.

Obwohl in dieser Arbeit Protokoll Kawana (1998a)das von et al. zur Pseudovirionenherstellung konnte angewendet wurde. keine Verpackung des Reporterplasmids nachgewiesen werden. Durch die Behandlung der Pseudovirionen mit DNase I oder Mikrokokkus-Nuklease ging die Infektiosität verloren. Verschiedene experimentelle Ansätze zum Nachweis DNase-resistenter DNA führten nicht zu reproduzierbaren Daten, die eine Verpackung belegen könnten. Bei der experimentellen Untersuchung der DNase-Protektion von enkapsidierter DNA gibt es mehrere kritische Aspekte. Zunächst müssen die Bedingungen für den DNase-Verdau so gewählt werden, dass die Partikel nicht beeinträchtigt werden und keine extern angeheftete DNA zurückbleibt letzteres ist schwer zu definieren, denn auch nur adsorbierte, eventuell dadurch kondensierte DNA ist einem enzymatischen Angriff schwerer zugänglich als freie DNA (Boursaghin et al., 2003). Außerdem sind die Nachweismethoden für "DNase-resistente" DNA meist sehr sensitiv, z.B. kann auch bei fast vollständig degradierter DNA noch ein PCR-Signal auftreten. Demnach konnten diese Ansätze nicht zweifelsfrei eine Verpackung beweisen, sondern deuteten vielmehr auf eine Art der Assoziation mit dem Kapsidprotein hin, die zu einem retardierten DNase-Verdau führt. Genau dies scheint auch bei "DNase-resistenten", mit Plasmid komplexierten L1- und L2-Peptiden der Fall zu sein (Boursaghin et al., 2003). Insbesondere in Hinsicht auf die Aufhebung der Infektiosität nach DNase-Behandlung der Pseudovirionen in dieser Arbeit ist es sehr wahrscheinlich, dass keine vollständige Enkapsidierung, sondern vielmehr eine partielle Enkapsidierung oder äußerliche Anheftung vorliegt.

Obwohl in einigen Systemen Verpackungssequenzen als für eine Enkapsidierung erforderlich oder zumindest förderlich beschrieben sind (Zhao et al., 1998; Zhao et al., 1999), funktioniert die Mehrzahl der Systeme ohne spezifische DNA-Sequenzen des Reporterplasmids. Dies gilt sowohl für in vitro-Methoden (Kawana et al., 1998a; Touzé und Coursaget, 1998), als auch für in vivo-Systeme (Unckell et al., 1997; Stauffer et al., 1998; Buck et al., 2004). Auch wenn bei einer natürlichen Infektion die Wechselwirkung zwischen Verpackungssequenzen, der URR-Sequenz des HPV-Genoms und E2 möglicherweise bei der Virusmorphogenese von Bedeutung ist (Day et al., 1998; Zhao et al., 2000), erlauben in in vivo-Systemen E2- und Sequenz-unabhängige Mechanismen die Produktion von Pseudovirionen (Buck et al., 2004). Die Hypothese, dass die Bindung des SV40 T-Antigens an das SV40 ori-Element des Reporterplasmids eine E2/URR-Interaktion bei der Virionsynthese ersetzt (Stauffer et al., 1998), konnte nicht bestätigt werden (Buck et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls keine HPV-Verpackungssequenzen verwendet. Die unspezifische Adsorption des Reporterplasmids an Kapsomere und VLPs in einem Bindungsassay demonstrierte, dass insbesondere die intakte Konformation der Kapsidproteine eine effiziente Anlagerung erlaubt. Es sind Domänen zur unspezifischen DNA-Bindung von L1 und L2 beschrieben (Li et al., 1997; Zhou et al., 1994; Touzé et al., 2000), wobei der C-Terminus von L1 essenziell für die Enkapsidierung von DNA in vitro (Touzé et al., 2000) und in Säugerzellen ist (Schäfer et al., 2002). El Mehdaoui et al. (2000) erreichten durch die Fusion des C-Terminus von HPV16 L1 an das Kapsidprotein des Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche die in vitro-Verpackung von Plasmid-DNA in infektiöse chimäre VLPs. Im Gegensatz dazu scheinen potenzielle DNA-Bindedomänen von L2 keine direkte Rolle bei der DNA-Enkapsidierung zu spielen (Roden et al., 2001).

### 5.2.2 Tropismus der Papillomaviren

Bislang ist nicht bekannt, was den ausgeprägten Wirts- und Gewebetropismus von Papillomaviren bedingt (siehe auch 1.1.3 und 1.1.4). Hierfür kommen sowohl frühe als auch späte Infektionsereignisse in Frage (Abb. 5.2), wobei erstere durch Pseudovirionen simuliert werden können.



Abb. 5.2 Frühe und späte Mechanismen der Papillomavirusinfektion können für Gewebe- und Wirtsspezifität eine Rolle spielen.

Wie in 1.4 beschrieben. vermitteln Heparansulfate Heparin-ähnliche und HPV-Pseudoinfektion, Glykosaminoglykane die wobei Interaktionen mit einem spezifischeren Sekundärrezeptor - möglicherweise über das Nebenkapsidprotein L2 diskutiert werden (Giroglou et al., 2001a). Kawana et al. (2001) fanden Hinweise auf ein potenzielles L2-spezifisches Rezeptorprotein, das auf Zervixkarzinomzelllinien in größerer Menge vorhanden zu sein schien als auf Zellen anderer Herkunft. Die Primärrezeptoren scheinen ubiquitär zu sein: Heparansulfate sind auf der Oberfläche aller adhärenten Zellen zu finden (Bernfield et al., 1999). Eine genauere Untersuchung der Rezeptorfunktion von unterschiedlichen Heparansulfat-Proteoglykanen deutet auf spezifische Strukturmerkmale der Seitenketten für die Wechselwirkung mit Partikeln hin, wobei diese für VLPs und Pseudovirionen nicht identisch sind (Selinka et al., 2003). Für murine Polyomavirus-Pseudovirionen wurde gezeigt, dass neben der natürlichen Endozytose auch eine Rezeptorunabhängige Internalisierung möglich ist, die aber nicht zu einer viralen DNA-Transkription führt (Krauzewicz et al., 2000). Uneinheitliche Infektionskinetiken von Papillomaviruslassen die Interpretation zu, dass auch Papillomaviren mehrere Virionen für Aufnahmemechanismen existieren, die nicht alle zu einer Infektion führen (Culp und Christensen, 2004). Ereignisse der frühen Infektion könnten also durchaus eine Rolle für den Tropismus von Papillomaviren spielen.

Dagegen spricht allerdings, dass HPV-Pseudovirionen aus verschiedenen Systemen – und auch in dieser Arbeit – Zelllinien von unterschiedlichen Spezies und Geweben infizieren können (siehe Übersicht in Tab. 5.2 und Tab. 5.3). Sogar bei Hefezellen wurde die Bindung und Aufnahme von BPV1-Virionen beobachtet (Zhao und Frazer, 2002). Somit erscheinen spätere Infektionsereignisse als die Bindung und Internalisierung der Virionen von größerer Bedeutung für die Spezifität von Papillomaviren, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich natürliche Papillomavirusinfektionen anderer, spezifischerer Aufnahmemechanismen als Pseudovirionen bedienen.

Auch die Replikation des Papillomavirus-Genoms scheint nicht zelltypspezifisch: HPV und BPV URR-Sequenzen verhelfen in Gegenwart von E1- und E2-Proteinen zu einer transienten episomalen Replikation von Plasmiden in humanen, Affen- und Hamsterzellen (Chiang et al., 1992). Selbst in zellfreien Systemen mit murinen oder humanen Zellextrakten ist die Replikation mit Papillomavirus-oris möglich (Yang et al., 1991; Kuo et al., 1994), ebenso wie in der Hefe Saccharomyces cerevisiae (Zhao und Frazer, 2002), wobei sogar eine E2unabhängige Replikation beobachtet wurde (Angeletti et al., 2002). Trotzdem ist bei einer natürlichen HPV-Infektion die Genomamplifikation streng reguliert und eine produktive Replikation auf Keratinozyten mit einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium beschränkt (Chow und Broker, 1994; siehe auch 1.3). Deshalb kann ein Einfluss der Regulationsmechanismen der HPV-Genom-Replikation für den Tropismus nicht ausgeschlossen werden.

Ebenso wird die virale Genexpression wesentlich durch den Differenzierungsstatus der Wirtszelle gesteuert und unterliegt dabei komplexen zellulären und viralen Kontrollen (Fuchs und Pfister, 1994; Frattini *et al.*, 1996; Ruesch *et al.*, 1998). So liegen für Papillomaviren Publikationen zu differenzierungsabhängigen Promotoren (Grassmann *et al.*, 1996), alternativem Spleissen (Barksdale und Baker, 1995), RNA-Prozessierung (Kennedy *et al.*, 1990), destabilisierenden mRNA-Sequenzen (Sokolowski *et al.*, 1997), der Blockierung der Transkription durch Repressorproteine (Stubenrauch *et al.*, 1996) sowie der Einschränkung der Translation durch inhibitorische mRNA-Sequenzen (Schwartz, 1998) und durch die Auswahl der Kodons (Zhou *et al.*, 1999) vor. Die Vielzahl der zelltypspezifischen und differenzierungsabhängigen Mechanismen zur Regulation der viralen Transkription und Translation könnte entscheidend am Tropismus von Papillomaviren beteiligt sein.

Produktionssystem	Reporter- plasmid	Permissive Zelllinien	Ursprungsspezies und Ursprungsgewebe	Referenz
In vitro-Synthese	SV40 ori	COS1	Affen-Nierenepithel-Zellen	vorliegende
		COS7	Affen-Nierenepithel-Zellen	Arbeit
		293	humane Nierenepithel-Zellen	
		293T	humane Nierenepithel-Zellen	
		HaSV	humane Vorhaut-Keratinozyten	

**Tab. 5.2** In dieser Arbeit erfolgreich pseudoinfizierte Zelllinien. SV40 T-Antigen-positive Zelllinien sind mit Fettdruck hervorgehoben.

Produktions-	Reporter-	Permissive	e Ursprungsspezies und	Referenz
system	plasmid	Zelllinien	Ursprungsgewebe	
in vitro-	SV40 ori	143B	humane Knochen-Fibroblasten	Müller et al., 1995
Kopplung		RK13	Kaninchen-Nierenepithel-Zellen	
		CV1	Affen-Nierenepithel-Zellen	
		3T3	Murine Embryo-Fibroblasten	
		HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	
		НаСаТ	humane Haut-Keratinozyten	
		PC-3	humane Prostata-Epithel-Zellen	
		DBT	humane Gliozyten	
		MDCK	Hunde-Nierenepithel-Zellen	
		293	humane Nierenepithel-Zellen	
		BHK	Hamster-Nieren-Fibroblasten	
		FR	Ratten-Haut-Fibroblasten	
		SW480	humane Darmepithel-Zellen	
		WES	Affen-Fibroblasten	
		A549	humane Lungenepithel-Zellen	
	Kein SV40 ori	C33A	Zervixkarzinomzellen	Yeager et al., 2000
Semliki Forest- Virus in BPHE-1	Kein SV40 ori; BPV1-Genom	C127	murine Fibroblasten	Roden et al., 1996a
Vacciniavirus in	SV40 ori	COS7	Affen-Nierenepithel-Zellen	Unckell et al., 1997
Säugerzellen	SV40 ori	C127	murine Fibroblasten	Stauffer et al., 1998
		HeLa	humane Haut-Keratinozyten	
		НаСаТ	humane Haut-Keratinozyten	
		293T	humane Nierenepithel-Zellen	
DNA-	SV40 ori	293H	humane Nierenepithel-Zellen	Buck et al., 2004
Transfektion in	SV40 ori	C127	murine Fibroblasten	Pastrana et al., 2004
293TT		НаСаТ	humane Haut-Keratinozyten	
		293TT	humane Nierenepithel-Zellen	
2µm-basiertes	Kein SV40 ori	ID13	murine Brustepithel-Zellen	Rossi et al., 2000
episomales		C127	murine Fibroblasten	
Plasmid in Hefe		NIH3T3	murine Embryo-Fibroblasten	
		COS7	Affen-Nierenepithel-Zellen	
		НаСаТ	humane Haut-Keratinozyten	
		HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	
		293T	humane Nierenepithel-Zellen	
		Raji	humane B-Lymphozyten	
		SiHa	humane Zervixkarzinomzellen	
In vitro-Synthese	SV40 ori	COS1	Affen-Nierenepithel-Zellen	Kawana <i>et al.</i> , 1998a
		CV1	Affen-Nierenepithel-Zellen	
	SV40 ori	MRC5	humane Lungen-Fibroblasten	Touzé und
		HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	Coursaget, 1998
		CaCo2	humane Darmepithel-Zellen	
		HuH-7	numane Hepatomzellen	
		NIH313	Murine Embryo-Fibroblasten	
		UUS/	Aften Nierenepithel-Zellen	
		vero MDCV	Allen-Interenepithel-Zellen	
		MDCK	Hometen Overen ithel Zellen	
		СНО	Hamster-Ovarepithel-Zellen	

**Tab. 5.3** Erfolgreich pseudoinfizierte Zelllinien (verschiedene Pseudovirionen-Produktionssysteme). SV40 T-Antigen-positive Zelllinien sind mit Fettdruck hervorgehoben.

In dieser Arbeit konnte keine Pseudoinfektion in den SV40 T-Antigen-negativen CV1-Zellen, wohl aber in den SV40 T-Antigen-positiven Tochterzelllinien COS1 und COS7 detektiert werden. Auch bei Kawana et al. (1998a) wurde für eine effiziente Detektion das SV40 T-Antigen benötigt: Die Effizienz lag bei CV1-Zellen bei weniger als 10 % im Vergleich zu COS1-Zellen. Pastrana et al. (2004) fanden nach Pseudoinfektion bei den T-Antigenpositiven 293TT-Zellen eine 30-40fach höhere Transgenexpression als bei den T-Antigennegativen 293H-Zellen. Als einzige Zelllinie ohne SV40 T-Antigen konnten in dieser Arbeit 293-Zellen pseudoinfiziert werden (Tab. 5.2), die auch nach DNA-Transfektion eine sehr effiziente Transgenexpression aufweisen. Offensichtlich erreichte in unserem System die Expression in Affenzellen erst nach einer episomalen SV40 ori-Replikation des Reporterplasmids die Nachweisgrenze. Dagegen war dies bei 293-Zellen nicht nötig, da entweder die Pseudoinfektion oder die Transgenexpression effizienter als bei Affenzellen ausfiel. Demnach hängt die messbare "Effizienz" der Pseudoinfektion in erster Linie vom Expressionsniveau des Reportergens ab, und die Detektionsmethoden sind nicht sensitiv genug, um jede pseudoinfizierte Zelle identifizieren zu können. Andere, sensitivere Pseudovirionen-Systeme belegen, dass fast alle der getesteten T-Antigen-negativen Zellinien pseudoinfizierbar sind (siehe Tab. 5.3).

### 5.2.3 Die Rolle des Nebenkapsidproteins L2 bei der Herstellung infektiöser Partikel

Die genaue Rolle von L2 für die Infektiosität von Papillomaviren ist umstritten. In Expressionssystemen kann sich das Hauptkapsidprotein L1 zwar auch ohne die Anwesenheit des Nebenkapsidproteins L2 zu VLPs zusammenlagern, doch mit L2 vervielfacht sich die Partikel-Ausbeute (Kirnbauer et al., 1993). Bei der Herstellung von Pseudovirionen stellte sich L2 oft als unentbehrlich für die Enkapsidierung eines Zielplasmids heraus (Roden et al., 1996a; Stauffer et al., 1998; Buck et al., 2004). Stauffer et al. (1998) demonstrierten, dass in Plasmide Säugerzellen L2 an chromatinisierte bindet. Doch nicht in allen Produktionssystemen ist das Nebenkapsidprotein L2 essenziell für die Infektiosität (Unckell et al., 1997; Kawana et al., 1998a; Touzé und Coursaget, 1998). Kawana et al. (1998a; 2001) erzielten allerdings eine wesentliche Zunahme der Infektiosität, wenn L1/L2-VLPs verwendet wurden. Ebenso steigerten Unckell et al. (1997) durch die Koexpression von L1 und L2 bei der Pseudovirionsynthese in Säugerzellen die Infektiosität deutlich. Auch in dieser Arbeit konnten Pseudovirionen ohne L2 hergestellt werden, wobei diese gegenüber L1/L2-Pseudovirionen ebenfalls eine geringere Infektiosität (~60 %) aufwiesen.

Zhou *et al.* (1994) identifizierten eine sequenzunabhängige DNA-bindende L2-Domäne und schlugen eine Funktion bei der Verpackung des Genoms in das Kapsid vor. Zwar beinträchtigten Deletionen in diesem Bereich die Infektiosität, nicht aber die Enkapsidierung eines Reporterplasmids in Säugerzellen (Roden *et al.*, 2001). Dennoch könnte L2 bei natürlichen HPV-Infektionen an der spezifischen Genomverpackung beteiligt sein, denn es löst die Restrukturierung von PODs (*promonocytic leukemia protein (PML) oncogenic domains*) aus (Florin *et al.*, 2002a) und rekrutiert möglicherweise L1 und E2-Genomkomplexe in diese distinkten nukleären Domänen (Day *et al.*, 1998). Dort erfolgen die

Genomreplikation und die Virionmorphogenese (Swindle *et al.*, 1999). Allerdings deutet die Beobachtung, dass die Expression und der Kerntransport von L2 der L1-Synthese vorausgehen, auf eine Translokation von L1-Pentameren in PODs hin, die nur indirekt durch L2 über die Reorganisation der nukleären Domänen vermittelt wird (Florin *et al.*, 2002b). Erst im Zellkern kommt es zu einer direkten L1-L2-Interaktion und dem Einbau von L2 in das Kapsid (Becker *et al.*, 2004). Auch in diesem Stadium könnte L2 an der Enkapsidierung des viralen Genoms beteiligt sein: Die Deletion L1-bindender Domänen von L2 behindert die Genomverpackung, aber nicht die Rekrutierung von L1 und E2 in PODs (Okun *et al.*, 2001).

Einen weiteren Beleg für eine kritische Funktion von L2 bei der Infektion liefert die auch in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Pseudoinfektion durch L2-spezifische Antikörper neutralisiert werden kann (Roden et al., 2000; Kawana et al., 1999). Die Inhibition einer Papillomavirusinfektion durch L2-spezifische Antikörper wurde ebenfalls mehrfach demonstriert (Christensen et al., 1991; Gaukroger et al., 1996; Roden et al., 1994b). Es wurden L2-Epitope identifiziert, wovon ein lineares, an der Kapsidoberfläche lokalisiertes Epitop bei genitalen HPV-Typen hochkonserviert ist und sowohl HPV16- als auch HPV6-Pseudovirionen neutralisiert (Kawana et al., 1998b; Kawana et al., 1999). Die Inkubation von Zielzellen mit einem Peptid, das diese Epitop-Sequenz enthält, führte zu einer rezeptorvermittelten Bindung und Internalisierung und blockierte die Pseudoinfektion (Kawana et al., 2001). Gegen eine Rolle bei der Partikeladsorption an die Zelloberfläche spricht jedoch, dass L1-Kapside mit gleicher Effizienz wie L1/L2-Kapside an Zellen binden können (Roden et al., 1994a; Müller et al., 1995; Volpers et al.; 1995), und dass BPV1 L2-spezifische Antiseren als nicht neutralisierende bindungsinhibitorisch charakterisiert wurden (Roden et al., 1994a). Diese Befunde passen allerdings zu der Hypothese eines L2-spezifischen Sekundärrezeptors für Papillomaviren, auf den das Kapsid nach einer vorausgehenden L1/Heparansulfat-Wechselwirkung übertragen werden könnte (siehe auch 1.4). Solch ein Rezeptortransfer könnte, verglichen mit einer nur durch L1 vermittelten Pseudoinfektion, in einer erhöhten Effizienz der Aufnahme resultieren. Die Untersuchung von BPV1 L2-Domänen, die an die Zelloberfläche binden können, lieferte ebenfalls Hinweise auf einen L2-spezifischen Sekundärrezeptor (Yang et al., 2003).

Weiterhin könnte der neutralisierende Effekt L2-spezifischer Antikörper auf der Blockierung von Infektionsschritten wie der Partikelaufnahme in die Zelle oder der Freisetzung des viralen Genoms beruhen (Roden *et al.*, 1994a; Roden *et al.*, 1996b). Kürzlich wurden Hinweise auf eine weitere potenzielle Funktion von L2 in der Zelle gefunden (Kämper *et al.*, 2004): Ein L2-Peptid mit antibiotischer Aktivität integriert in zelluläre Membranen und permeabilisiert sie für niedermolekulare Farbstoffe. Über einen ähnlichen Mechanismus könnte L2 den Austritt des viralen Genoms aus dem Endosom ermöglichen. Dabei ist die Peptidsequenz wichtig für die Pseudoinfektion, denn Pseudovirionen mit Punktmutationen in dieser Region sind erheblich in ihrer Infektiosität beeinträchtigt.
#### 5.2.4 Charakterisierung verschiedener Pseudovirionentypen

#### Direkte Interaktion

Eine Alternative zur *in vitro-Disassembly/Reassembly* zur Herstellung von Pseudovirionen ist die "direkte Interaktion" (Combita *et al.*, 2001). Während der Koinkubation von VLPs mit Reporterplasmid formieren sich DNA-Partikelkomplexe, die wie *D/R*-Pseudovirionen zu einem partikelvermittelten Gentransfer in der Lage sind. Boursaghin *et al.* (2002) zeigten: Die Effzienz des Gentransfers war, gemessen in einem quantitativen Luciferase-Expressionsassay, um ein Vielfaches höher als bei *D/R*-Pseudovirionen. Außerdem konnte selbst für Plasmide, die 1,1 kb bzw. 1,7 kb größer als das HPV-Genom sind, nach direkter Interaktion eine gewisse DNase-Protektion festgestellt werden, nicht aber nach einer *Disassembly/Reassembly* (siehe auch 5.2.1). Unter dem Elektronenmikroskop konnte die Assoziation je eines verkürzten Plasmidmoleküls mit einem Partikel beobachtet werden, wobei dies mit einer partiellen Enkapsidierung oder einer Kondensation der DNA erklärt wurde.

In dieser Arbeit wurde auch ohne eine vorherige Koinkubation der Partikel mit dem Reporterplasmid ein partikelvermittelter Gentransfer erzielt, wenn Zellen mit unbehandelten VLPs und DNA unter den gleichen Bedingungen wie für D/R-Pseudovirionen inkubiert wurden. Dabei erschien die Effizienz gegenüber D/R-Pseudovirionen zwar zwei- bis zehnfach erhöht, aber nicht in der gleichen Größenordnung wie bei Boursaghin et al. (2002), die unter optimierten Bedingungen eine hundertfache Effizienzsteigerung feststellten. Wurden dagegen zuvor einer Disassembly/Reassembly ohne Plasmid unterzogene Partikel für die direkte Interaktion eingesetzt, und mit parallel hergestellten und im ELISA quantifizierten D/R-Pseudovirionen verglichen, lag die höhere Infektiosität bei den D/R-Pseudovirionen. Diese widersprüchlichen Befunde könnten darauf beruhen, dass die Standardisierung der Pseudovirionenkonzentrationen mittels L1-capture-ELISA eventuell unzureichend ist, da neben den Partikeln auch Kapsomere im D/R-Material detektiert werden. Andererseits könnte die Ausbeute an infektiösen Pseudovirionen tatsächlich effizienter sein, wenn sie durch direkte Interaktion und nicht durch Disassembly/Reassembly hergestellt werden. Mit einem vergleichbaren Partikelverlust wie bei der Disassembly/Reassembly (durch Adsorption an Dialyseschläuche und Degradierung während der langwierigen Dialyseschritte) ist bei der direkten Interaktion schließlich nicht zu rechnen. Boursaghin et al. (2002) fanden, dass die Koinkubationsbedingungen, insbesondere die Salzkonzentration und der pH-Wert, einen wesentlichen Einfluss auf die Effizienz des Gentransfers ausübten. Der Verzicht auf eine Koinkubation unter optimalen Bedingungen in der vorliegenden Arbeit könnte die niedrigere Effizienzsteigerung begründen. Auch die geringe Infektiosität bei Verwendung von D/R-Material für die direkte Interaktion ist möglicherweise durch die CaCl<sub>2</sub>-Konzentration des Reassembly-Puffers (2 mM) zu erklären, denn schon bei geringeren CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen beobachteten Boursaghin et al. (2002) eine Inhibition des Gentransfers. Keine Unterschiede waren in der Verteilung der Fluoreszenzintensität zu finden, die von der Zahl der eingeschleusten Plasmide pro Zelle abhängt.

## Einfluss verschiedener Plasmid-Isoformen bei der Disassembly/Reassembly

Auch mit linearisiertem Plasmid konnten durch *Disassembly/Reassembly* Pseudovirionen hergestellt werden, die sogar zu einem effizienteren Gentransfer als Pseudovirionen mit zirkulärem Plasmid führten (Boursaghin *et al.*, 2002). Kawana *et al.* (1998a) setzten bei der *Reassembly* zwar superhelikales Plasmid ein, isolierten aber die relaxierte Isoform aus den resultierenden Pseudovirionen. Bei der DNA-Extraktion aus in Säugerzellen hergestellten Pseudovirionen fanden sich superhelikales, lineares und relaxiertes Plasmid (Stauffer *et al.*, 1998). Diese Befunde werfen die Frage auf, welche Rolle die physikalische Struktur der DNA bei der Formierung von Pseudovirionen spielt.

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Plasmidtopologien zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit parallel *D/R*-Pseudovirionen mit superhelikalem, relaxiertem und linearem Plasmid hergestellt. Es fanden sich allerdings keine Unterschiede bei der Effizienz der *Reassembly* oder der Infektiosität. Die verschiedenen Pseudovirionentypen zeigten gleiche Effizienzen beim partikelvermittelten Gentransfer, sowohl bei dem Anteil der pseudoinfizierten Zellen als auch der Fluoreszenzintensität, die von der Anzahl der eingeschleusten Plasmide pro Zelle abängt. Dabei scheinen Pseudovirionen mit linearem Plasmid, für die eine episomale SV40 ori-abhängige Plasmidreplikation in den Zielzellen nur nach einer Rezirkularisierung des Plasmids möglich ist, nicht benachteiligt. Dies wurde auch schon von Boursaghin *et al.* (2002) beobachtet, die bei Verwendung eines SV40 ori-Reporterplasmids in den SV40 T-Antigen-positiven Zielzellen (COS7) mit der linearen Isoform sogar eine zwei- bis dreifach höhere Reportergenexpression als mit der zirkulären Isoform detektierten.

### Unterschiedliche Formen der DNA-Partikelassoziation

Die Schwebedichte von mit DNA gefüllten Virionen (1,34-1,36 g/ml) ist höher als die leerer VLPs (1,29-1,30 g/ml; Breedis *et al.*, 1962). Bei Pseudovirionen aus *in vivo*-Systemen und *Disassembly/Reassembly* wurde eine gegenüber VLPs erhöhte Schwebedichte detektiert (Roden *et al.*, 1996a; Unckell, 1997; Stauffer *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2000; Kawana *et al.*, 1998; Touzé und Coursaget, 1998). Zhao *et al.* (1998; 2000) fanden neben "schweren" Partikeln (1,34 g/ml), die das gesamte 8 kb-lange Reporterplasmid verpackt hatten, auch "leichte" Partikel (1,30 g/ml), die zu einem geringen Teil das vollständige Plasmid, mehrheitlich aber Fragmente davon verpackt hatten.

Bei der Analyse der Schwebedichte der in dieser Arbeit hergestellten Pseudovirionentypen fanden sich bei *D/R*-Pseudovirionen mit linearem Plasmid und durch direkte Interaktion hergestellten Pseudovirionen im Gegensatz zu *D/R*-Pseudovirionen mit superhelikalem oder relaxiertem Plasmid nur "leichte" Partikel (mit der Dichte leerer VLPs), aber keine "schweren" Partikel. Die Untersuchung der einzelnen CsCl-Fraktionen ergab, dass bei *D/R*-Pseudovirionen mit zirkulärem Plasmid die Infektiosität hauptsächlich in den Partikelfraktionen mit höherer Schwebedichte lokalisiert war. Bei *D/R*-Pseudovirionen mit linearem Plasmid und durch direkte Interaktion hergestellten Pseudovirionen dagegen waren die "leichten" Partikel infektiös. Auch die Detektion partikelassoziierter DNA in "leichten" Partikelfraktionen belegt, dass die Anlagerung des Reporterplasmids nicht in allen Fällen zu einer Erhöhung der Schwebedichte des Partikels führt. Nicht alle infektiösen Pseudovirionen

weisen die Schwebedichte von mit DNA gefüllten Kapsiden auf - sie können durchaus mit der Dichte leerer VLPs vorliegen. Solche "leichten", mit vorwiegend ~ 5 kb großen Plasmidfragmenten gefüllte Partikel wurden bereits von Zhao *et al.* (2000) beschrieben. Die Schwebedichte wurde also durch die physikalische Struktur des Plamids (zirkulär versus linear) und die Produktionsmethode (*Disassembly/Reassembly* versus direkte Interaktion) bestimmt, die möglicherweise zu unterschiedlichen Formen und Volumina der DNA-Partikel-Komplexe führen.

Demnach wäre die DNA bei D/R-Pseudovirionen anders mit dem Partikel assoziiert als nach der direkten Interaktion. Dabei wurde bei allen Pseudovirionentypen, unabhängig von Plasmid-Isoform und Herstellungsmethode, die Infektiosität durch eine DNase-Behandlung aufgehoben, was bei Kawana et al. (1998) und Boursaghin et al. (2002) nicht auftrat. Wie in 5.2.1 erläutert, ist der Nachweis verpackter DNA problematisch, denn auch lediglich mit Protein komplexierte DNA kann vor DNasen geschützt sein (Boursaghin et al., 2003). Vielleicht beruhen die unterschiedlichen Befunde auch auf Abweichungen bei den experimentellen Bedingungen. In dieser Arbeit konnte eine vollständige Verpackung weder bei Pseudovirionen aus Disassembly/Reassembly noch aus direkter Interaktion nachgewiesen werden. Deshalb erscheint eine partielle Enkapsidierung oder äußerliche Anheftung plausibel, wobei die Art der Assoziation bei der direkten Interaktion anders ist als bei D/R-Pseudovirionen, wie sich aus der unterschiedlichen Schwebedichte ableiten lässt. Auf eine bei auch unvollständige Verpackung der direkten Interaction weisen die elektronenmikroskopischen Analysen von Boursaghin et al. (2002) hin, die Partikel mit je einem verkürzten Plasmidmolekül assoziiert zeigten.

Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass sich bei der Aus den Disassembly/Reassembly mit zirkulärem Plasmid ein Teil der DNA derartig mit den Partikeln verbindet, dass eine erhöhte Schwebedichte resultiert. Es gibt aber auch DNA-Partikelkomplexe, die die gleiche Schwebedichte wie leere VLPs aufweisen. Diese findet man ausschließlich bei durch direkte Interaktion hergestellten Pseudovirionen und D/R-Pseudovirionen, wenn lineares Plasmid verwendet wurde. Sowohl "schwere" als auch "leichte" Partikel sind infektiös, aber nicht DNase-resistent. Die Pseudovirionen weisen also in Abhängigkeit von der Produktionsmethode und der physikalischen Struktur des Plasmids unterschiedliche Schwebedichten auf. Dies deutet auf unterschiedliche Formen der DNA-Partikelassoziation hin, bei denen das Plamid nicht vollständig in das Kapsid verpackt wird, sondern partiell enkapsidiert oder von außen adsorbiert vorliegt.

### 5.3 Perspektiven

Auch wenn die in dieser Arbeit hergestellten Pseudovirionen keine vollständige Verpackung des Reporterplasmids aufweisen, sind sie zum partikelvermittelten Gentransfer fähig und deshalb für eine Vielzahl von Versuchsansätzen geeignet. *Disassembly/Reassembly* und direkte Interaktion sind vergleichsweise wenig aufwändige Methoden zur Pseudovirionenproduktion, bei denen beliebige Reportersysteme wie z.B. GFP (Buck *et al.*, 2004),  $\beta$ -Galaktosidase (Kawana *et al.*, 1998a), Puromycin (Stauffer *et al.*, 1998), sezernierte

alkaline Phosphatase (Pastrana et al., 2004) oder Luciferase (Combita et al., 2001) eingesetzt werden können, so lange eine kritische Plasmidgröße nicht überschritten wird (Buck et al., 2004). Yeager et al. (2000) führten mit Pseudovirionen, bei denen das Reportergen chemisch an VLPs gekoppelt worden war, Neutralisationsassays durch. Die Verwendbarkeit der in der vorliegenden Arbeit hergestellten Pseudovirionen für die Analyse von Seren wurde experimentell belegt (4.2.2.2). Aber auch in weiteren Studien zur Partikelbindung und -Aufnahme könnten sie eingesetzt werden. Besonders interessant wäre die Pseudoinfektion von organotypischen Epithelkulturen, bei denen die horizontale Strukturierung, insbesondere die fortschreitenden Differenzierungsstadien des natürlichen Wirtsgewebes nachgebildet sind (Als Keratinozyten bieten sich z.B. SV40 T-Antigen-positive HaSV-Zellen an, in denen die Transgenexpression durch die episomale Replikation des Reporterplasmids erhöht ist). Eine weitere Möglichkeit ist die Konstruktion von Pseudovirionen verschiedener HPV-Typen für vergleichende Studien. Combita et al. (2001) publizierten bereits die in vitro-Synthese von Pseudovirionen der HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 39, 45, 58, 59 und 68. Der breite Tropismus der Pseudovirionen (5.2.2) ermöglicht die Herstellung von DNA-Vektoren, die für viele verschiedene Zielzellen eingesetzt werden können. Dabei könnten Pseudovirionen sogar für gentherapeutische Ansätze oder Vakzinierungen sicher genug sein, da ihnen sämtliche viralen Genomsequenzen fehlen. Im Mausmodell wurde bereits eine Immunisierung mit D/R-Pseudovirionen durchgeführt, bei der mucosale und systemische T-Zell-Antworten erzielt wurden (Shi et al., 2001). Dabei wurde auch ein adjuvanter Effekt von Pseudovirionen für DNA-Vakzinierungen demonstriert (Shi et al., 2001), der vermutlich auf der Aktivierung dendritischer Zellen durch die Kapside beruht (Rudolf et al., 2001). Für mehrteilige Immunisierungsprotokolle könnten Pseudovirionen verschiedener HPV-Typen verwendet werden.

# 6 Literatur

- Angeletti, P. C., Kim, K., Fernandes, F. J. und Lambert, P. F. 2002. Stable Replication of Papillomavirus Genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Virol. 76, 3350-3358.
- Antinore, M. J., Birrer, M. J., Patel, D., Nader, L. und McCance, D. J. 1996. The Human Papillomavirus Type 16 E7 Gene Product Interacts with and Trans-Activates the AP1 Family of Transcription Factors. *EMBO J.* 15, 1950-1960.
- Arroyo., M, Bagchi, S. und Raychaudhuri, P. 1993. Association of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein with the S-Phase-Specific E2F-Cyclin A Complex. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6537-6546.
- Baker, C. C., Phelps, W. C., Lindgren, V., Braun, M. J., Gonda, M. A. und Howley, P. M. 1987. Structural and Transcriptional Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Sequences in Cervical Carcinoma Cell Lines. J. Virol. 61, 962-971.
- Baldwin, P. J., van der Burg, S. H., Boswell, C. M., Offringa, R., Hickling, J. K., Dobson, J., Roberts, J. S., Latimer, J.A., Moseley, R. P., Coleman, N., Stanley, M. A. und Sterling, J.C. 2003. Vaccinia-Expressed Human Papillomavirus 16 and 18 E6 and E7 as a Therapeutic Vaccination for Vulval and Vaginal Intraepithelial Neoplasia. *Clin. Cancer Res.* 9, 5205-5213.
- Balmelli, C., Roden, R., Potts, A., Schiller, J., De Grandi, P. und Nardelli-Haefliger, D. 1998. Nasal Immunization of Mice with Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particles Elicits Neutralizing Antibodies in Mucosal Secretions. J. Virol. 72, 8220-8229.
- Band, V., Zajchowski, D., Kulesa, V. und Sager, R. 1990. Human Papilloma Virus DNAs Immortalize Normal Human Mammary Epithelial Cells and Reduce their Growth Factor Requirements. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 463-467.
- Barbosa, M. S., Vass, W. C., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1991. In vitro Biological Activities of the E6 and E7 Genes Vary among Human Papillomaviruses of Different Oncogenic Potential. J. Virol. 65, 292-298.
- Barbosa, M. S. 1996. The Oncogenic Role of Human Papillomavirus Proteins. Crit. Rev. Oncog. 7, 1-18.
- Barksdale, S. und Baker, C. C. 1995. Differentiation-Specific Alternative Splicing of Bovine Papillomavirus Late mRNAs. J. Virol. 69, 6553-6556.
- Bechtold, V., Beard, P. und Raj, K. 2003. Human Papillomavirus Type 16 E2 Protein Has No Effect on Transcription from Episomal Viral DNA. J. Virol. 77, 2021-2028.
- Becker, K. A., Florin, L., Sapp, C., Maul, G. G. und Sapp, M. 2004. Nuclear Localization but Not PML Protein Is Required for Incorporation of the Papillomavirus Minor Capsid Protein L2 into Virus-Like Particles. J. Virol. 78, 1121-1128.
- Bedell, M. A., Jones, K. H., Grossman, S. R. und Laimins, L. A. 1989. Identification of Human Papillomavirus Type 18 Transforming Genes in Immortalized and Primary Cells. J. Virol. 63, 1247-1255.
- Bell, J. A., Sundberg, J. P., Ghim, S. J., Newsome, J., Jenson, A. B. und Schlegel, R. 1994. A Formalin-Inactivated Vaccine Protects against Mucosal Papillomavirus Infection: A Canine Model. *Pathobiology* 62, 194-198.
- Benton, C., Shahidulah H. und Hunter J. A. 1992. Human Papillomavirus in the Immunosuppressed. *Papillomavirus Rep.* **3**, 23-26.
- Bergsdorf, C., Beyer, C., Umansky, V., Werr, M. und Sapp, M. 2003. Highly Efficient Transport of Carboxyfluorescein Diacetate Succinidyl Ester into COS7 Cells Using Human Papillomavirus-Like Particles. 2003. FEBS Letters 536, 120-124.

- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. und Zako, M. 1999. Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 729-777.
- Bol, J. F. und Lak-Kaashoek, M. 1974. Composition of Alfalfa Mosaic Virus Ribonucleoproteins. *Virology* **60**, 476-484.
- Booy, F. P., Roden, R. B., Greenstone, H. I., Schiller, J. T. und Trus, B. L. 1998. Two Antibodies that Neutralize Papillomavirus by Different Mechanisms Show Distinct Binding Patterns at 13 Å Resolution. J. Mol. Biol. 281, 95-106.
- Borysiewicz, L. K., Fiander, A., Nimako, M., Man, S., Wilkinson, G. W., Westmoreland, D., Evans, A. S., Adams, M., Stacey, S. N., Boursnell, M. E., Rutherford, E., Hickling, J. K. und Inglis, S. C. 1996. A Recombinant Vaccinia Virus Encoding Human Papillomavirus Types 16 and 18, E6 and E7 Proteins as Immunotherapy for Cervical Cancer. *Lancet* 347, 1523-1527.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J. und Shah, K. V. 2002. The Causal Relation between Human Papillomavirus and Cervical Cancer. J. Clin. Pathol. 55, 244-265.
- Boursaghin, L., Combita-Rojas, A.-L., Touzé, A., El Mehdaoui, S., Sizaret, P.-Y., Bravo, M.-M. und Coursaget, P. 2002. Detection of Neutralizing Antibodies against Human Papillomaviruses (HPV) by Inhibition of Gene Transfer Mediated by HPV Pseudovirions. J. Clin. Microbiol. 40, 926-932.
- Boursaghin, L., Touzé, A., Sizaret, P.-Y. und Coursaget, P. 2003. Human Papillomavirus Types 16, 31, and 58 Use Different Endocytosis Pathways to Enter Cells. J. Virol. 77, 3846-3850.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. und Band, V. 1996. E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cancer Res.* 56, 4620-4624.
- Breedis, C., Berwick, L. und Anderson, T. F. 1962. Fractionation of Shope Papilloma Virus in Cesium Chloride Density Gradients. *Virol.* 17, 84-94.
- Breitburd, F., Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Nonnenmacher, B., Trin-Dinh-Desmarquet, C., Orth, G., Schiller, J. T. und Lowy, D. R. 1995. Immunization with Virus-Like Particles from Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) Can Protect against Experimental CRPV Infection. J. Virol. 69, 3959-3963.
- Briggs, M. W., Adam, J. L. und McCance, D. J. 2001. The Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Alters Vacuolar H(+)ATPase Function and Stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 280,169-175.
- Bruschi, C. V., und Howe, G. A. 1988. High Frequency FLP-Independent Homologous DNA Recombination of 2 Mu Plasmid in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 14, 191-199.
- Buck, C. B., Pastrana, D. V., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 2004. Efficient Intracellular Assembly of Papillomaviral Vectors. J. Virol. 78, 751-757.
- Burkhardt, A., DiMaio, D. und Schlegel, R. 1987. Genetic and Biochemical Definition of the Bovine Papillomavirus E5 Transforming Protein. *EMBO J.* 6, 2381-2385.
- Carter, J. J., Hagensee, M., Taflin, M. C., Lee, S. K., Koutsky, L. A. und Galloway, D. A. 1993. HPV-1 Capsids Expressed *in vitro* Detect Human Serum Antibodies Associated with Foot Warts. *Virology* 195, 456-462.
- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Wipf, G. C., Christensen, N. D., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N. und Galloway, D. A. 1996. The Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Capsid Antibodies among a Cohort of University Women. J. Infect. Dis. 174, 927-936.

- Carter, J. J., Koutsky, L. A., Hughes, J. P., Lee, S. K., Kuypers, J., Kiviat, N. und Galloway, D.
   A. 2000. Comparison of Human Papillomavirus Types 16, 18, and 6 Capsid Antibody Responses Following Incident Infection. J. Infect. Dis. 181, 1911-1919.
- Chan, S. Y., Delius, H., Halpern, H. L. und Bernard, H. U. 1995. Analysis of Genomic Sequences of 95 Papillomavirus Types: Uniting Typing, Phylogeny and Taxonomy. J. Virol. 69, 3074-3083.
- Chen, J. J., Reid, C. E., Band, V. und Androphy, E. J. 1995. Interaction of Papillomavirus E6 Oncoproteins with a Putative Calcium-Binding Protein. *Science* 269, 529-531.
- Chen, X. S., Casini, G., Harrison, S. C. und Garcea, R. L. 2001. Papillomavirus Capsid Protein Expression in *Escherichia coli*: Purification and Assembly of HPV11 and HPV16. J. Mol. Biol. 307, 173-182.
- Chiang, C.-M., Ustav, M., Stenlund, A., Ho, T. F., Broker, T. R. und Chow, L. T. 1992. Viral E1 and E2 Proteins Support Replication of Homologous and Heterologous Papillomavirus Origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5799-5803.
- Choo, K. B., Pan, C. C. und Han, S. H. 1987. Integration of Human Papillomavirus Type 16 into Cellular DNA of Cervical Carcinoma: Preferential Deletion of the E2 Gene and Invariable Retention of the Long Control Region and the E6/E7 Open Reading Frames. *Virology* 161, 259-261.
- Chow, L. T. und Broker, T. R. 1994. Papillomavirus DNA Replication. Intervirology 37, 150-158.
- Christensen, N. D., Kreider, J. W., Cladel, N. M., Patrick, S., D. und Welsh, P. A. 1990. Monoclonal Antibody-Mediated Neutralization of Infectious Human Papillomavirus Type 11. J. Virol. 64, 5678-5681.
- Christensen, N. D., Kreider, J. W., Kan, N. C. und DiAngelo, S. L. 1991. The Open Reading Frame L2 of Cottontail Rabbit Papillomavirus Contains Antibody-Inducing Neutralizing Epitopes. *Virology* 181, 572-579.
- Christensen, N. D., Kirnbauer, R., Schiller, J. T., Ghim, S. J., Schlegel, R., Jenson, A. B. und Kreider, J. W. 1994. Human Papillomavirus Types 6 and 11 Have Antigenically Distinct Strongly Immunogenic Conformationally Dependent Epitopes. *Virology* 205, 329-335.
- Christensen, N. D., Dillner, J., Eklund, C., Carter, J. J., Wipf, G. C., Reed, C. A., Cladel, N. M. und Galloways, D. A. 1996a. Surface Conformational and Linear Epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 Virus-like Particles as Defined by Monoclonal Antibodies. *Virology* 223, 174-184.
- Christensen, N. D., Reed, C. A., Cladel, N. M., Hall, K. und Leiserowitz, G. S. 1996b. Monoclonal Antibodies to HPV-6 L1 Virus-Like Particles Identify Conformational and Linear Neutralizing Epitopes on HPV-11 in Addition to Type-Specific Epitopes on HPV-6. *Virology* 224, 477-486.
- Chung, C. S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S. und Chang, W. 1998. A27L Protein Mediates Vaccinia Virus Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Virol.* **72**, 1577-1585.
- Ciuffo, G. 1907. Innesto positivo con filtrado di verrucae volgare. G. Ital. Mal. Venereol. 48, 12-18.
- Combita, A. L., Touzé, A., Boursaghin, A., Sizaret, P.-Y., Munoz, N. und Coursaget, P. 2001. Gene Transfer Using Human Papillomavirus Pseudovirions Varies According to Virus Genotype and Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 183-188.
- Combita, A. L., Bravo, M.-M., Touzé, A., Orozco, O. und Coursaget, P. 2002. Serologic Response to Human Oncogenic Papillomaviruses Types 16, 18, 31, 33, 39, 58 and 59 Virus-Like Particles in Colombian Women with Invasive Cervical Cancer. *Int. J. Cancer* 97, 796-804.

- Cook, J. C., Joyce, J. G., George, H. A., Schultz, L. D., Hurni, W. M., Jansen, K. U., Hepler, R. W., Ip, C., Lowe, R. S., Keller, P. M. und Lehman, E. D. 1999. Purification of Virus-Like Particles of Recombinant Human Papillomavirus Type 11 Major Capsid Protein L1 from *Saccharomyces cerevisiae. Prot. Expr. Purif.* 17, 477-484.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. und Falkow, S. 1996. FACS-Optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Coursaget, P. 2003. Serology for Human Papillomavirus. Salud Pub. Mex. 45, 361-366.
- Crawford L. V. und Crawford E. M. 1963. A Comparative Study of Polyoma and Papilloma Viruses. *Virology* 21, 258-263.
- Crusius, K., Auvinen, E. und Alonso, A. 1997. Enhancement of EGF- and PMA-Mediated MAP Kinase Activation in Cells Expressing the Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein. *Oncogene* **15**, 1437-1444.
- Culp, T. D. und Christensen, N. D. 2004. Kinetics of *in Vitro* Adsorption and Entry of Papillomavirus Virions. *Virology* **319**, 152-161.
- Da Silva, D. M., Velders, M. P., Nieland, J. D., Schiller, J. T., Nickoloff, B. J. und Kast, W. M. 2001. Physical Interaction of Human Papillomavirus Virus-Like Particles with Immune Cells. *Int. Immunol.* 13, 633-541.
- **Davies, R., Hicks, R., Crook, T., Morris, J. und Vousden, K.** 1993. Human Papillomavirus Type 16 E7 Associates with a Histone H1 Kinase and with p107 through Sequences Necessary for Transformation. *J. Virol.* **67**, 2521-2528.
- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. und Wood, W. B. (Hrsg.). 1970. *Microbiology*. Hoeber Medical Divisions Harper & Row Publishers, New York.
- Day, P. M., Roden, R. B. S., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1998. The Papillomavirus Minor Capsid Protein, L2, Induces Localization of the Major Capsid Protein, L1, and the Viral Transcription/Replication Protein, E2, to PML Oncogenic Domains. J. Virol. 72, 142-150.
- de Jong, A., O'Neill, T., Khan, A. Y., Kwappenberg, K. M., Chisholm, S. E., Whittle, N. R., Dobson, J. A., Jack, L. C., St Clair Roberts, J. A., Offringa, R., van der Burg, S. H. und Hickling, J. K. 2002. Enhancement of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 E6 and E7-Specific T-Cell Immunity in Healthy Volunteers through Vaccination with TA-CIN, an HPV16 L2E7E6 Fusion Protein Vaccine. *Vaccine*. 20, 3456-3464.
- de Villiers, E.-M. 1994. Human Pathogenic Papillomavirus Types: an Update. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**, 1-12.
- Delius, H. und Hoffman, B. 1994. Primer-Directed Sequencing of Human Papillomavirus Types. In: zur Hausen, H. (Hrsg.). *Current Topics in Microbiology and Immunology* 186 Springer-Verlag, Heidelberg. 13-31.
- DelVecchio, A. M., Romanczuk, H., Howley, P. M. und Baker, C. C. 1992. Transient Replication of Human Papillomavirus DNAs. J. Virol. 66, 5949-5958.
- Desaintes, C., Hallez, S., Van Alphen, P. und Burny, A. 1992. Transcriptional Activation of Several Heterologous Promoters by the E6 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* 66, 325-333.
- **Dollard, S. C., Broker, T. R. und Chow, L. T.** 1993. Regulation of the Human Papillomavirus Type 11 E6 Promoter by Viral Host Transcription Factors in Primary Human Keratinocytes. *J. Virol.* **67**, 1721-1726.

- Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. und Crawford, L. 1991. Specific Interaction between HPV-16 E1-E4 and Cytokeratins Results in Collapse of the Epithelial Cell Intermediate Filament Network. *Nature* 352, 824-827.
- DuBridge, R., B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong P. M., Miller, J. H. und Calos, M. P. 1987. Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. *Mol. Cell Biol.* 7, 379-87.
- **Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P. und Münger, K.** 2001. Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein-Induced Abnormal Centrosome Synthesis is an Early Event in the Evolving Malignant Phenotype. *Cancer Res.* **61**, 2356-2360.
- Dürst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M. und Gissmann, L. 1985. The Physical State of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Benign and Malignant Genital Tumours. *J. Gen. Virol.* 66, 1515-1522.
- Dürst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R. T., Boukamp, P., Fusenig, N. E. und Gissmann, L. 1987. Molecular and Cytogenetic Analysis of Immortalized Human Primary Keratinocytes Obtained after Transfection with Human Papillomavirus Type 16 DNA. *Oncogene* **1**, 251-256.
- Dürst, M., Seagon, S., Wanschura, S., zur Hausen, H. und Bullerdiek, J. 1995. Malignant Progression of an HPV 16-Immortalized Human Keratinocyte Cell Line (HPKIA) in Vitro. Cancer Genet. Cytogenet. 85, 105-112.
- **Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. und Harlow, E.** 1989. The Human Papilloma Virus-16 E7 Oncoprotein Is Able to Bind to the Retinoblastoma Gene Product. *Science* **243**, 934-937.
- **Dyson, N., Guida, P., Münger, K. und Harlow, E.** 1992. Homologous Sequences in Adenovirus E1A and Human Papillomavirus E7 Proteins Mediate Interaction with the Same Set of Cellular Proteins. *J. Virol.* **66**, 6893-6902.
- **El Mehdaoui, S., Touzé, A., Laurent, S., Sizaret, P.-Y., Rasschaert, D. und Coursaget, P.** 2000. Gene Transfer Using Recombinant Rabbit Hemorrhagic Disease Virus Capsids with Genetically Modified DNA Encapsidation Capacity by Addition of Packaging Sequences from the L1 or L2 Protein of Human Papillomavirus Type 16. *J. Virol.* **74**, 10332-10340.
- Emeny, R. T., Wheeler, C. M., Jansen, K. U., Hunt, W. C., Fu, T. M., Smith, J. F., MacMullen, S., Esser, M. T. und Paliard, X. 2002. Priming of Human Papillomavirus Type 11-Specific Humoral and Cellular Immune Responses in College-Aged Women with a Virus-Like Particle Vaccine. J. Virol. 76, 7832-7842.
- Erhart, E. und Hollenberg, C. P. 1983. The Presence of a Defective LEU2 Gene on 2µ DNA Recombinant Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* Is Responsible for Curing and High Copy Number. J. Bacteriol. 156, 625-635.
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K. und McMillan, N. A. 1997. Identification of the  $\alpha_6$  Integrin as a Candidate Receptor for Papillomaviruses. *J. Virol.* **71**, 2449-2456.
- Favre, M. 1975. Structural Polypeptides of Rabbit, Bovine and Human Papillomaviruses. J. Virol. 15, 1239-1247.
- Fehrmann, F. und Laimins, L. A. 2003. Human Papillomaviruses: Targeting Differentiating Cells for Malignant Transformation. Oncogene 22, 5201-5207.
- Ferrara, A, Nonn, M., Sehr, P., Schreckenberger, C., Pawlita, M., Dürst, M., Schneider, A. und Kaufmann, A. M. 2003. Dendritic Cell-Based Tumor Vaccine for Cervical Cancer II: Results of a Clinical Pilot Study in 15 Individual Patients. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 129, 521-530.
- Fligge, C., Schäfer, F., Selinka, H.-C., Sapp, C. und Sapp, M. 2001. DNA-Induced Structural Changes in the Papillomavirus Capsid. J. Virol. 75, 7727-7731.

- Flint, S. J., Racaniello, V. R., Enquist, L. W., Skalka, A. M. und Krug, R. M. (Hrsg.). 2000. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control.* ASM Press, Washington.
- Flores, E. R. und Lambert, P. F. 1997. Evidence for a Switch in the Mode of Human Papillomavirus Type 16 DNA Replication during the Viral Life Cycle. J. Virol. 71, 7167-7179.
- Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E. und Sapp, M. 2002a. Reorganization of Nuclear Domain 10 Induced by Papillomavirus Capsid Protein L2. *Virology* 295, 97-107.
- Florin, L., Sapp, C., Streeck, R. E. und Sapp, M. 2002b. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. J. Virol. 76, 10009-10014.
- Frattini, M. G. und Laimins, L. A. 1994. Binding of Human Papillomavirus E1 Origin-Recognition Protein Is Regulated through Complex Formation with the E2 Enhancer-Binding Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12398-12402.
- Frattini, M. G., Lim, H. B. und Laimins, L. A. 1996. *In Vitro* Synthesis of Oncogenic Human Papillomaviruses Requires Episomal Genomes for Differentiation-Dependent Late Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3062-3067.
- Frazer, I. H. 2004. Prevention of Cervical Cancer through Papillomavirus Vaccination. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 46-54.
- Fuchs, P. G. und Pfister, H. 1994. Transcription of Papillomavirus Genomes. *Intervirology* 37, 159-167.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B. und Galloway, D. A. 1997. Inhibition of CDK Activity and PCNA-Dependent DNA Replication by p21 is Blocked by Interaction with the HPV 16 E7 Oncoprotein. *Genes Dev.* 11, 2090-2100.
- Fusenig, N. E., Boukamp, P., Breitkreuz, D., Karjetta, S. und Petrusevska, R. T. 1987. Oncogenes and Malignant Transformation of Human Keratinocytes. In: Cerrutti, P. A., Nygaard, O. F. und Simic, M. G. (Hrsg.). *Anticarcinogenesis and Radiation Protection*. Plenum Publishing Corporation, New York. 227-231.
- **Futcher, A. B. und Cox, B. S.** 1984. Copy Number and the Stability of 2-μm Circle-Based Artificial Plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **157**, 283-290.
- **Futcher, A. B.** 1986. Copy Number Amplification of the 2 μm Circle Plasmid of *Saccharomyces cerevisiae. J. Theor. Biol.* **119**, 197-204.
- Gaukroger, J. M., Chandrachud, L. M., O'Neil, B. W., Grindlay, G. J., Knowles, G. und Campo, M. S. 1996. Vaccination of Cattle with Bovine Papillomavirus Type 4 L2 Elicits the Production of Virus-Neutralizing Antibodies. J. Gen. Virol. 77, 1577-1583.
- Genther, S. M., Sterling, S., Duensing, S., Münger, K., Sattler, C. und Lambert, P. F. 2002. Quantitative Role of the Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene during the Productive Stage of the Viral Life Cycle. J. Virol. 77, 2832-2842.
- Ghim, S. J., Jenson, A. B. und Schlegel, R. 1992. HPV-1 L1 Protein Expressed in COS Cells Displays Conformational Epitopes Found on Intact Virions. *Virology* **190**, 548-52.
- Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E. und Sapp, M. 2001a. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. J. Virol. 75, 1565-1570.
- Giroglou, T., Sapp, M., Lane C., Fligge C., Christensen N. D., Streeck, R. E. und Rose, R. C. 2001b. Immunological Analyses of Human Papillomavirus Capsids. *Vaccine* **19**, 1783-1793.
- **Gluzman, Y.** 1981. SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell* **23**,175-182.

- Goldie, S. J., Grima, D., Kohli, M., Wright, T. C., Weinstein, M. und Franco, E. 2003. A Comprehensive Natural History Model of HPV Infection and Cervical Cancer to Estimate the Clinical Impact of a Prophylactic HPV-16/18 Vaccine. *Int. J. Cancer* **106**, 896-904.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R. 1977. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- Grassmann, K., Rapp, B., Maschek, H., Petry, K. U. und Iftner, T. 1996. Identification of a Differentiation-Inducible-Promoter in the E7 Open Reading Frame of Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) in Raft Cultures of a New Cell Line Containing High Copy Numbers of Episomal HPV-16 DNA. J. Virol. 70, 2339-2349.
- Gu, Z. und Matlashewski, G. 1995. Effect of Human Papillomavirus Type 16 Oncogenes on MAP Kinase Activity. J. Virol. 69, 8051-8056.
- Hagensee, M. E., Yaegashi, N. und Galloway, D. A. 1993. Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 1 Capsids by Expression of the L1 Protein Alone or by Coexpression of the L1 and L2 Capsid Proteins. J. Virol. 67, 315-322.
- Hagensee, M. E., Olson, N. H., Baker, T. S. und Galloway, D. A. 1994. Three-Dimensional Structure of Vaccinia-Produced Human Papillomavirus Type 1 Capsids. J. Virol. 68, 4503-4505.
- Halbert, C. L., Demers, G. W. und Galloway, D. A. 1991. The E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16 Is Sufficient for Immortalization of Human Epithelial Cells. J. Virol. 65, 473-478.
- Harro, C. D., Pang, Y. Y., Roden, R. B., Hildesheim, A., Wang, Z., Reynolds, M. J., Mast, T. C., Robinson, R., Murphy, B. R., Karron, R. A., Dillner, J., Schiller, J. T. und Lowy, D. R. 2001. Safety and Immunogenicity Trial in Adult Volunteers of a Human Papillomavirus 16 L1 Virus-Like Particle Vaccine. J. Natl. Cancer Inst. 93, 284-292.
- Havre, P. A., Yuan, J., Hedrick, L., Cho, K. R. und Glazer, P. M. 1995. p53 Inactivation by HPV 16 E6 Results in Increased Mutagenesis in Human Cells. *Cancer Res.* 55, 4420-4424.
- Heino, P., Skyldberg, B., Lehtinen, M., Rantala, I., Hagmar, B., Kreider, J. V., Kirnbauer, R. und Dillner, J. 1995. Human Papillomavirus Type 16 Capsids Expose Multiple Type-Restricted and Type-Common Antigenic Epitopes. J. Gen. Virol. 76, 1141-1153.
- Hofmann, K. J., Cook, J. C., Joyce, J. G., Brown, D. R., Schultz, L. D., George, H. A., Rosolowsky, M., Fife, K. H. und Jansen, K. U. 1995. Sequence Determination of Human Papillomavirus Type 6a and Assembly of Virus-Like Particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* 209, 506-518.
- Howley, P. M. 1996. Papillomavirinae: The Viruses and their Replication. In: Fields, B. N., Knipe, D. M. und Howley, P. M. (Hrsg.). *Fields Virology*. Raven Press, New York. 2045-2076.
- Hwang, E. S., Nottoli, T. und DiMao, D. 1995. The HPV 16 E5 Protein: Expression, Detection, and Stable Complex Formation with Transmembrane Proteins in COS Cells. *Virology* 211, 227-233.
- Iyengar, S., Shah, K. V., Kotloff, K. L., Ghim, S. J. und Viscidi, R. P. 1996. Self-Assembly of *in Vitro*-Translated Human Papillomavirus Type 16 L1 Capsid Protein into Virus-Like Particles and Antigenic Reactivity of the Protein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 733-739.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L. und Storey, A. 2000. Role of Bak in UV-Induced Apoptosis in Skin Cancer and Abrogation by HPV E6 Proteins. *Genes Dev.* 14, 3065-3073.
- Jansen, K. U., Rosolowsky, M., Schultz, L. D., Markus, H. Z., Cook, J. C., Donnelly, J. J., Martinez, D., Ellis, R. W. und Shaw, A. R. 1995. Vaccination with Yeast-Expressed Cottontail Rabbit Papillomavirus (CRPV) Virus-Like Particles Protects Rabbits from CRPV-Induced Papilloma Formation. *Vaccine* 13, 1509-14.

- Jayaram, M., Li, Y. Y. und Broach, J. R. 1983. The Yeast Plasmid 2mu Circle Encodes Components Required for its High Copy Propagation. *Cell* 34, 95-104.
- **Jones, D. L. und Münger, K.** 1997. Analysis of the p53-Mediated G<sub>1</sub> Growth Arrest Pathway in Cells Expressing the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein. *J. Virol.* **71**, 2905-2912.
- Jones, D. L., Thompson, D. A. und Münger, K. 1997a. Destabilization of the RB Tumor Suppressor Protein and Stabilization of p53 Contribute to HPV Type 16 E7-Induced Apoptosis. *Virology* 239, 97-107.
- Jones, D. L., Alani, R. M. und Münger, K. 1997b. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Can Uncouple Cellular Differentiation and Proliferation in Human Keratinocytes by Abrogating p21CIP1-Mediated Inhibition of cdk2. *Genes Dev.* **11**, 2101-2131.
- Joyce, J. G., Tung, J. S., Przysiecki, C. T., Cook, J. C., Lehman, E. D., Sands, J. A., Jansen, K. U. und Keller, P. M. 1999. The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-Like Particles Interacts with Heparin and Cell-Surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. J. Biol. Chem. 274, 5810-22.
- Kämper, N., Nowak, T., Selinka, H.-C., Bolscher, J., vant Hof, W. und Sapp, M. 2004. A Membrane-Destabilizing Peptide in Capsid Protein L2 Is Essential for Efficient Human Papillomavirus Infection. Abstract Nr. 336 in: 21<sup>st</sup> International Papillomavirus Conference Final Program. Mexico City. 255.
- Kaufmann, A. M., Nieland, J., Schinz, M., Nonn, M., Gabelsberger, J., Meissner, H., Müller, R. T., Jochmus, I., Gissmann, L., Schneider, A. und Dürst, M. 2001. HPV16 L1E7 Chimeric Virus-Like Particles Induce Specific HLA-Restricted T Cells in Humans after *in Vitro* Vaccination. *Int. J. Cancer.* 92, 285-293.
- Kaufmann, A. M., Stern, P. L., Rankin, E. M., Sommer, H., Nuessler, V., Schneider, A., Adams, M., Onon, T. S., Bauknecht, T., Wagner, U., Kroon, K., Hickling, J., Boswell, C. M., Stacey, S. N., Kitchener, H. C., Gillard, J., Wanders, J., Roberts, J. S. und Zwierzina, H. 2002. Safety and Immunogenicity of TA-HPV, a Recombinant Vaccinia Virus Expressing Modified Human Papillomavirus (HPV)-16 and HPV-18 E6 and E7 Genes, in Women with Progressive Cervical Cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 3676-3685.
- Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. und Kanda, T. 1998a. In Vitro Construction of Pseudovirions of Human Papillomavirus Type 16: Incorporation of Plasmid DNA into Reassembled L1/L2 Capsids. J. Virol. 72, 10298-10300.
- Kawana, K., Matsumoto, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kawana, T., Yoshiike, K. und Kanda, T. 1998b. A Surface Immunodeterminant of Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Protein L2. *Virology*, 353-359.
- Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. und Kanda, T. 1999. Common Neutralization Epitope in Minor Capsid Protein L2 of Human Papillomavirus Types 16 and 6. J. Virol. 73, 6188-6190.
- Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K. und Kanda, T. 2001. Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Protein L2 N-Terminal Region Containing a Common Neutralization Epitope Binds to the Cell Surface and Enters the Cytoplasm. J. Virol. 75, 2331-2336.
- Keen, N., Elston, R. und Crawford, L. 1994. Interaction of the E6 Protein of Human Papillomavirus with Cellular Proteins. Oncogene 9, 1493-1499.
- Kennedy, I. M., Haddow, J. K. und Clements, J. B. 1990. Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Late mRNA 3'Processing Signals *in Vitro* and *in Vivo*. J. Virol. 64, 1825-1829.

- Kessis, T. D., Conolly, D. C., Hedrick, L. und Cho, K. R. 1996. Expression of HPV 16 E6 or E7 Increases Integration of Foreign DNA. *Oncogene* 13, 427-431.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1992. Papillomavirus L1 Major Capsid Protein Self-Assembles into Virus-Like Particles that are Highly Immunogenic. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12180-12184.
- Kirnbauer, R., Taub, J., Greenstone, H., Roden, R. B., Dürst, M., Gissmann, L., Lowy, D. R. und Schiller J. T. 1993. Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus-Like Particles. J. Virol. 67, 6929-6936.
- Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Wheeler, C. M., Becker, T. M., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1994. A Virus-Like Particle Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detects Serum Antibodies in a Majority of Women Infected with Human Papillomavirus Type 16. J. Natl. Cancer Inst. 86, 494-499.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L. M., O'Neil, B. W., Wagner, E. R., Grindlay, G. J., Armstrong, A., McGarvie, G. M., Schiller, J. T., Lowy, D. R. und Campo, M. S. 1996. Virus-Like Particles of Bovine Papillomavirus Type 4 in Prophylactic and Therapeutic Immunization. *Virology* 219, 37-44.
- Kjellberg, L., Hallmans, G., Ahren, A. M., Johansson, R., Bergman, F., Wadell, G., Angstrom, T. und Dillner, J. 2000. Smoking, Diet, Pregnancy and Oral Contraceptive Use as Risk Factors for Cervical Intra-Epithelial Neoplasia in Relation to Human Papillomavirus Infection. *Br. J. Cancer* 82, 1332-1338.
- Klencke, B., Matijevic, M., Urban, R. G., Lathey, J. L., Hedley, M. L., Berry, M., Thatcher, J., Weinberg, V., Wilson, J., Darragh, T., Jay, N., Da Costa, M. und Palefsky, J. M. 2002. Encapsulated Plasmid DNA Treatment for Human Papillomavirus 16-Associated Anal Dysplasia: a Phase I Study of ZYC101. *Clin. Cancer Res.* 8, 1028-1037.
- Klingelhutz, A. J., Foster, S. A. und McDougall, J. K. 1996. Telomerase Activation by the E6 Gene Product of Human Papillomavirus Type 16. *Nature* **380**, 79-82.
- Konya, J. und Dillner, J. 2001. Immunity to Oncogenic Papillomaviruses. Adv. Cancer Res. 82, 205-238.
- Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M., Jansen, K. U.; Proof of Principle Study Investigators. 2002. A Controlled Trial of a Human Papillomavirus Type 16 Vaccine. N. Engl. J. Med. 347, 1645-1651.
- Krauzewicz, N., Stokrova, J., Jenkins, C., Elliott, M., Higgins, C. F. und Griffin, B. E. 2000. Virus-Like Gene Transfer into Cells Mediated by Poloyoma Virus Pseudocapsids. *Gene Ther.* 7, 2122-2131.
- Kreider, J. W., Howett, M. K., Leure-Dupree, A. E., Zaino, R. J. und Weber, J. A. 1987. Laboratory Production *in Vivo* of Infectious Human Papillomavirus Type 11. *J. Virol.* **61**, 590-593.
- Kuo, S. R., Liu, J. S., Broker, T. R. und Chow, L. T. 1994. Cell-Free Replication of the Human Papillomavirus DNA with Homologous Viral E1 and E2 Proteins and Human Cell Extracts. J. Biol. Chem. 269, 24058-24065.
- La Thangue, N. B. 1994. DP and E2F Proteins: Components of a Heterodimeric Transcription Factor Implicated in Cell Cycle Control. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 443-450.
- Laimins, L. A. 1993. The Biology of Human Papillomaviruses: From Warts to Cancer. Infect. Agents Dis. 2, 74-86.
- Lämmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lee, J. I. und Taichmann, L. B. 1989. Transient Expression of a Transfected Gene in Cultured Epidermal Keratinocytes: Implications for Future Studies. J. Invest. Dermatol. 92, 267-271.
- Li, M., Cripe, T. P., Estes, P. A., Lyon, M. K., Rose, R. C. und Garcea, R. L. 1997. Expression of the Human Papillomavirus Type 11 Capsid Protein in *Escherichia coli*: Characterization of Protein Domains Involved in DNA Binding and Capsid Assembly. J. Virol. 71, 2988-2995.
- Li, M., Beard, P., Estes, P. A., Lyon, M. K. und Garcea, R. L. 1998. Intercapsomeric Disulfide Bonds in Papillomavirus Assembly and Disasssembly. J. Virol. 72, 2160-2167.
- Lopes, T. S., DeWijs, I. J., Steenhauer, S. I., Verbakel, J. und Planta, R. J. 1996. Factors Affecting the Mitotic Stability of High-Copy-Number Integration into the Ribosomal DNA of Saccharomyces cerevisiae. Yeast 12, 467-477.
- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W. und Kurman R. J. 1992. Human Papillomavirus Infection of the Cervix: Relative Risk Associations of 15 Common Anogenital Types. *Obstet. Gynecol.* **79**, 328-337.
- Mansur, C. P. und Androphy, E. J. 1993. Cellular Transformation by Papillomavirus Oncoproteins. Biochim. Biophys. Acta 1155, 323-345.
- Massimi, P., Pim, D., Storey, A. und Banks, L. 1996. HPV-16 E7 and Adenovirus E1a Complex Formation with TATA Box Binding Protein Is Enhanced by Casein Kinase II Phosphorylation. *Oncogene* 12, 2325-2330.
- Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P. und Romanos, M. A. 1998. A C-Terminal Helicase Domain of the Human Papillomavirus E1 Protein Binds E2 and the Polymerase Alpha Primase p68. J. Virol. 72, 7404-7419.
- Mazzarelli, J. M., Atkins, G. B., Geisberg, J. V. und Ricciardi, R. P. 1995. The Viral Oncoproteins Ad5 E1A, HPV16 E7 and SV40 TAg Bind a Common Region of the TBP-Associated Factor-110. *Oncogene* 11, 1859-1864.
- McBride, A. A., Romanczuk, H. und Howley, P. M. 1991. The Papillomavirus E2 Regulatory Proteins. J. Biol. Chem. 266, 18411-18414.
- McCarthy, M. P., White, W. I., Palmer-Hill, F., Koenig, S. und Suzich, J. A. 1998. Quantitative Disassembly and Reassembly of Human Papillomavirus Type 11 Viruslike Particles *in Vitro*. J. Virol. 72, 32-41.
- McFadyan, J. und Hobday, F. 1898. Note on the Experimental "Transmission of Warts in the Dog". *J. Comp. Pathol. Ther.* 11, 341-349.
- McIntyre, M. C., Ruesch, M. N. und Laimins, L. A. 1996. Human Papillomavirus E7 Oncoproteins Bind a Single Form of Cyclin E in a Complex with Cdk2 and p107. *Virology* **215**, 73-82.
- McLean, C. S., Churcher, M. J., Meinke, J., Smith, G. L., Higgins, G., Stanley, M. und Mison,
   A. C. 1990. Production and Characterization of a Monoclonal Antibody to Human Papillomavirus Type 16 Using Recombinant Vaccinia Virus. J. Clin. Pathol. 43, 488-492.
- Meeks-Wagner, D. und Hartwell, L. H. 1986. Normal Stoichiometry of Histone Dimer Sets Is Necessary for High Fidelity of Mitotic Chromosome Transmission. *Cell* 44, 43-52.
- Mehal, W. Z., Lo, Y. M., Herrington, C. S., Evans, M. F., Papadopoulos, M. C., Odunis, K., Ganesan, T. S., McGee, J. O., Bell, J. I. und Fleming, K. A. 1994. Role of Human Papillomavirus in Determining the HLA Associated Risk of Cervical Carcinogenesis. J. Clin. Pathol. 47, 1077-1081.
- Melnick, J. L., Allison, A. C., Butel, J. S., Eckhart, W., Eddy, B. E., Kit, S., Levine, A. J., Miles, J. A., Pagano, J. S., Sachs, L. und Vonka, V. 1974. Papovaviridae. *Intervirology* 3, 106-120.

- Meyers, C., Frattini, M. G., Hudson, J. B. und Laimins, L. A. 1992. Biosynthesis of Human Papillomavirus from a Continuous Cell Line upon Epithelial Differentiation. *Science* 257, 971-973.
- Modis, Y., Trus, B. L. und Harrison, S. C. 2002. Atomic Model of the Papillomavirus Capsid. *EMBO J.* 21, 4754-4762.
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P. und Botchan, M. R. 1990. Targeting the E1 Replication Protein to the Papillomavirus Origin of Replication by Complex Formation with the E2 Transactivator. *Science* **250**, 1694-1699.
- Mondor, I., Ugolini, S. und Sattentau, Q. J. 1998. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment to HeLa CD4 Cells Is CD4 Independent and gp120 Dependent and Requires Cell Surface Heparans. J. Virol. 72, 3623-3634.
- Morosov, A., Phelps, W. C. und Raychandhuri, P. 1994. Activation of the *c-fos* Gene by the HPV 16 Oncoproteins Depends on the cAMP-Responsive Element a-60. *J. Biol. Chem.* 269, 18434-18440.
- Muderspach, L., Wilczynski, S., Roman, L., Bade, L., Felix, J., Small, L. A., Kast, W. M., Fascio, G., Marty, V. und Weber, J. 2000. A Phase I Trial of a Human Papillomavirus (HPV) Peptide Vaccine for Women with High-Grade Cervical and Vulvar Intraepithelial Neoplasia who Are HPV 16 Positive. *Clin. Cancer Res.* 6, 3406-3416.
- Müller, M., Gissmann, L., Christiano, R. J., Sun, X. Y., Frazer, I. H., Jenson, A. B., Alonso, A., Zentgraf, W. und Zhou, J. 1995. Papillomavirus Capsid Binding and Uptake by Cells from Different Tissues and Species. J. Virol. 69, 948-954.
- Müller, M., Zhou, J., Reed, T. D., Rittmüller, C., Burger, A., Gabelsberger, J., Braspenning, J. und Gissmann, L. 1997. Chimeric Papillomavirus-Like Particles. *Virology* 234, 93-111.
- Münger, K. und Phelps, W. C. 1993. The Human Papillomavirus E7 Protein as a Transforming and Transactivating Factor. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 111-123.
- Murray, A. W. und Szostak, J. W. 1983. Pedigree Analysis of Plasmid Segregation in Yeast. Cell 34, 961-970.
- Neeper, M. P., Hofmann, K. J. und Jansen, K. U. 1996. Expression of the Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **180**,1-6.
- Oda, H., Kumar, S. und Howley, P. M. 1999. Regulation of the Src Family Tyrosine Kinase Blk through E6AP-Mediated Ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9557-9562.
- Okada, Y. S. und Watanabe, I. 1980. Different Sensitivities of Rat Cells to Infection by Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Gann.* 71, 721-723.
- Okkels, J. S. 1996. A URA3-Promoter Deletion in a pYES Vector Increases the Expression Level of a Fungal Lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 782, 202-207.
- Okun, M. M., Day, P. M., Greenstone, H. L., Booy, F. P., Lowy, D. R., Schiller, J. T. und Roden,
  R. B. S. 2001. L1 Interaction Domains of Papillomavirus L2 Necessary for Viral Genome Encapsidation. J. Virol. 75, 4332-4342.
- Orr-Weaver, T. C. und Szostak, J. W. 1983. Multiple, Tandem Plasmid Integration in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.* **3**, 747-749.
- Pan, H. und Griep, A. E. 1994. Altered Cell Cycle Regulation in the Lens of HPV-16 E6 or E7 Transgenic Mice: Implications for Tumor Suppressor Gene Function in Development. *Genes Dev.* 8, 1285-1299.
- Pan, H. und Griep, A. E. 1995. Temporally Distinct Patterns of p53-Dependent and p53-Independent Apoptosis during Mouse Lens Development. *Genes Dev.* 9, 1257-1269.

- Park, E.-H., Shin, Y.-M., Lim, Y.-Y., Kwon, T.-H., Kim, D.-H. und Yang, M.-S. 2000. Expression of Glucose Oxidase by Using Recombinant Yeast. J. Biotechnol. 81, 35-44.
- Parkin, D. M. 2001. Global Cancer Statistics in the Year 2000. Lancet Oncol. 2, 533-543.
- Pastrana, D. V., Vass, W. C., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 2001. NHPV16 VLP Vaccine Induces Human Antibodies that Neutralize Divergent Variants of HPV16. *Virololy* 279, 361-369.
- Pastrana, D. V., Buck, C. B., Pang, Y.-Y. S., Thompson, C. D., Castle, P. E., FitzGerald, P. C., Krüger Kjaer, S., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 2004. Reactivity of Human Sera in a Sensitive, High-Throughput Pseudovirus-Based Papillomavirus Neutralization Assay for HPV16 and HPV18. *Virology* 321, 205-216.
- Pfister, H., Gissmann, L. und zur Hausen, H. 1977. Partial Characterization of Proteins of Human Papilloma Viruses (HPV) 1-3. *Virology* 83, 131-137.
- Pfister, H. und Fuchs, P. G. 1987. Papillomaviruses: Particles, Genome Organisation and Proteins. In: Syrjänen, K., Gissmann, L. und Koss, L. G. (Hrsg.). *Papillomaviruses and Human Disease*. Springer-Verlag, Heidelberg. 1-18.
- Piper, P. W. 1994. Measurement of Transcription. In: Johnston, J. R. (Hrsg). *Molecular Genetics of Yeast: a Practical Approach*. Oxford University Press, New York. 135-146.
- Puthenveettil, J. A., Frederickson, S. M. und Reznikoff, C. A. 1996. Apoptosis in Human Papillomavirus 16 E7-, but not E6-Immortalized Human Uroepithelial Cells. Oncogene 13, 1123-1131.
- Reznikoff, C. A., Belair, C., Savelieva, E., Zhai, Y., Pfeifer, K., Yeager, T., Thompson, K. J., DeVries, S., Bindley, C., Newton, M. A., et al. 1994. Long-Term Genome Stability and Minimal Genotypic and Phenotypic Alterations in HPV16 E7-, but not E6-, Immortalized Human Uroepithelial Cells. Genes Dev. 8, 2227-2240.
- Reznikoff, C. A., Yeager, T. R., Belair, C. D., Savelieva, E., Puthenveettil, J. A. und Stadler, J. M. 1996. Elevated p16 at Senescence and Loss of p16 at Immortalization in Human Papillomavirus 16 E6, but not E7, Transformed Human Epithelial Cells. *Cancer Res.* 56, 2886-2890.
- Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G. D., Kreider, J. W. und Gallimore, P. H. 1993. Cutaneous and Mucosal Human Papillomavirus E4 Proteins Form Intermediate Filament-Like Structures in Epithelial Cells. *Virology* 197, 176-187.
- Roden, R. B. S., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1994a. Interaction of Human Papillomaviruses with the Cell Surface. *J. Virol.* 68, 7260-7266.
- Roden, R. B. S., Weissinger, E. M., Henderson, D. W., Booy, F., Kirnbauer, R., Mushinski, J. F., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1994b. Neutralization of Bovine Papillomavirus by Antibodies to L1 and L2 Capsid Proteins. J. Virol. 68, 7570-7574.
- Roden, R. B. S., Greenstone, H. L., Kirnbauer, R., Booy, F. P., Jessie, J., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1996a. *In Vitro* Generation and Type-Specific Neutralization of a Human Papillomavirus Type 16 Virion Pseudotype. *J. Virol.* **70**, 5875-5883.
- Roden, R. B. S., Hubbert, N. L., Kirnbauer, R., Christensen, N. D., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1996b. Assessment of the Serological Relatedness of Genital Human Papillomaviruses by Hemagglutination Inhibition. J. Virol. 70, 3298-3301.
- Roden, R. B. S., Yutzy IV, W. H., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 2000. Minor Capsid Protein of Human Papillomaviruses Contains Subdominant, Cross-Neutralizing Epitopes. *Virology* 270, 254-257.

- Roden, R. B. S., Day, P. M., Bronzo, B. K., Yutzy, W. H. T., Yang, Y., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 2001. Positively Charged Termini of the L2 Minor Capsid Protein Are Necessary for Papillomavirus Infection. J. Virol. 75, 10493-10497.
- Ronco, L. V., Karpova, A. Y., Vidal, M. und Howley, P. M. 1998. Human Papillomavirus 16 E6 Oncoprotein Binds to Interferon Regulatory Factor-3 and Inhibits its Transcriptional Activity. *Genes Dev.* 12, 2061-2072.
- **Rose, A. B. und Broach, J. R.** 1990. Propagation and Expression of Cloned Genes in Yeast: 2-μm Circle-Based Vectors. *Methods Enzymol.* **185**, 22-279.
- Rose, R. C., Bonnez, W., Reichmann, R. C. und Garcea, R. L. 1993. Expression of Human Papillomavirus Type 11 Protein in Insect Cells: *In Vivo* and *in Vitro* Assembly of Virus-Like Particles. *J. Virol.* 67, 1936-1944.
- Rossi, J. L., Gissmann, L., Jansen, K. und Müller, M. 2000. Assembly of Papillomavirus Type 16 Pseudovirions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1165-1176.
- Rous, P. und Beard, J. W. 1934. Carcinomatous Changes in Virus-Induced Papillomas of the Skin of the Rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **32**, 578-580.
- Rous, P. und Beard, J. W. 1935. The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papilloma (Shope). J. Exp. Med. 62, 523-548.
- Rudolf, M. P., Fausch, S. C., Da Silva, D. M. und Kast, W. M. 2001. Human Dendritic Cells Are Activated by Chimeric Human Papillomavirus Type-16 Virus-Like Particles and Induce Epitope-Specific Human T Cell Responses *in Vitro*. J. Immunol. 166, 5917-5924.
- Ruesch, M. N., Stubenrauch, F. und Laimins, L. A. 1998. Activation of Papillomavirus Late Gene Transcription and Genome Amplification upon Differentiation in Semisolid Medium Is Coincident with Expression of Involucrin and Transglutaminase but Not Keratin-10. J. Virol. 72, 5016-5024.
- Sapp, M., Volpers, C., Müller, M. und Streeck, R. E. 1995. Organization of the Major and Minor Capsid Proteins in Human Papillomavirus Type 33 Virus-Like Particles. J. Gen. Virol. 76, 2407-2412.
- Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S. E., Hajibagheri, M. A. N., Finch, J., Crawford, L. und Tommasino, M. 1995. Synthesis and Assembly of Virus-Like Particles of Human Papillomaviruses Type 6 and Type 16 in Fission Yeast Schizosaccharomyces pombe. Virology 206, 126-135.
- Schäfer, F., Florin, L. und Sapp, M. 2002. DNA Binding of L1 Is Required for Human Papillomavirus Morphogenesis *in Vivo. Virology*, **295**, 172-181.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. und Howley, P. M. 1990. The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53. *Cell* 63,1129-1136.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. und Howley, P. M. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin-Protein Ligase in the Ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Schiffman, M. H., Bauer, H. M., Hoover, R. N., Glass, A. G., Cadell, D. M., Rush, B. B., Scott, D. R., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Wacholder, S. et al. 1993. Epidemiologic Evidence Showing that Human Papillomavirus Infection Causes Most Cervical Intraepithelial Neoplasia. J. Natl. Cancer Inst. 85, 958-964.
- Schiffman, M. H. und Brinton, L. A. 1995. The Epidemiology of Cervical Carcinogenesis. *Cancer* 76, 1988-1901.
- Schwartz, S. 1998. Cis-Acting Negative RNA Elements on Papillomavirus Late mRNAs. Sem. Virol. 8, 291-300.

- Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. und zur Hausen, H. 1985. Structure and Transcription of Human Papillomavirus Sequences in Cervical Carcinoma Cells. *Nature* 314, 111-114.
- Seavey, S. E., Holubar, M., Saucedo, L. J. und Perry, M. E. 1999. The E7 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Stabilizes p53 through a Mechanism Independent of p19 (ARF). J. Virol. 73, 7590-7598.
- Sedman, S. A., Barbosa, M. S., Vass, W. C., Hubbert, N. L., Haas, J. A., Lowy, D. R. und Schiller, J. T. 1991. The Full-Length E6 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Has Transforming and Trans-Activating Activities and Cooperates with E7 to Immortalize Keratinocytes in Culture. J. Virol. 65, 4860-4866.
- Seedorf, K., Oltersdorf, T., Krämmer, G. und Röwekamp W. 1987. Identification of Early Proteins of the Human Papilloma Viruses Type 16 (HPV 16) and Type 18 (HPV 18) in Cervical Carcinoma Cells. *EMBO J.* 6, 139-144.
- Selinka, H.-C., Giroglou, T. und Sapp, M. 2002. Analysis of the Infectious Entry Pathway of Human Papillomavirus Type 33 Pseudovirions. *Virology* 299, 279-287.
- Selinka, H.-C., Giroglou, T., Nowak, T., Christensen, N. D. und Sapp, M. 2003. Further Evidence that Papillomavirus Capsids Exist in Two Distinct Conformations. J. Virol. 77, 12961-12967.
- Sheets, E. E., Urban, R. G., Crum, C. P., Hedley, M. L., Politch, J. A., Gold, M. A., Muderspach, L. I., Cole, G. A. und Crowley-Nowick, P. A. 2003. Immunotherapy of Human Cervical High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia with Microparticle-Delivered Human Papillomavirus 16 E7 Plasmid DNA. Am. J. Obstet. Gynecol. 188, 916-926.
- Shi, W., Liu, J., Huang, Y. und Qiao, L. 2001. Papillomavirus Pseudovirus: a Novel Vaccine to Induce Mucosal and Systemic Cytotoxic T-Lymphocyte Responses. J. Virol. 75, 10139-10148.
- Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J. D. und Spear, P. G. 1992. Cell Surface Receptors for Herpes Simplex Virus are Heparan Sulfate Proteoglycans. J. Cell Biol. 116, 1273-1281.
- Shope, R. E. 1933. Infectious Papillomatosis of Rabbits. J. Exp. Med. 58, 607-627.
- Sibbet, G., Romero-Graillet, C., Meneguzzi, G. und Campo, M. S. 2000. Alpha6 Integrin Is Not the Obligatory Cell Receptor for Bovine Papillomavirus Type 4. J. Gen. Virol. 81, 327-334.
- Sokolowski, M., Zhao, C. P., Tan, W. und Schwartz, S. 1997. MRNA Instability Elements in the Human Papillomavirus Type 16 L2 Coding Region. J. Virol. 72, 1504-1515.
- Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K. und Beard, P. 1998. Infectious Human Papillomavirus Type 18 Pseudovirions. J. Mol. Biol. 283, 529-536.
- Sterling, J., Stanley, M., Gatward, G. und Minson, T. 1990. Production of Human Papillomavirus Type 16 Virions in a Keratinocyte Cell Line. J. Virol. 64, 6305-6307.
- Storey, A., Pim, D., Murray, A., Osborn, K., Banks, L. und Crawford, L. 1988. Comparison of the *in Vitro* Transforming Activities of Human Papillomavirus Types. *EMBO J.* 7, 1815-1820.
- Straight, S. W., Hinkle, P. M., Jewers, R. J. und McCance, D. J. 1993. The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Transforms Fibroblasts and Effects the Downregulation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes. J. Virol. 67, 4521-4532.
- Straight, S. W., Herman, B. und McCance, D. J. 1995. The E5 Oncoprotein of Human Papillomavirus Type 16 Inhibits the Acidification of Endosomes in Human Keratinocytes. J. Virol. 69, 3185-3192.
- Strauss, M. J., Shaw, E. W., Bunting H. et al. 1949. "Crystalline" Virus-Like Particles from Skin Papillomas Characterized by Intranuclear Inclusion Bodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 46-50.

- Stubenrauch, F., Leigh, I. M. und Pfister, H. 1996. E2 Represses the Late Gene Promoter of Human Papillomavirus Type 8 at High Concentrations by Interfering with Cellular Factors. J. Virol. 70, 119-126.
- Stubenrauch, F., Colbert, A. M. E. und Laimins, L. A. 1998. Transactivation by the E2 Protein of Oncogenic Human Papillomavirus Type 31 Is Not Essential for Early and Late Viral Functions. J. Virol. 72, 8115-8123.
- Sundberg, J. P. 1987. Papillomavirus Infections in Animals. In: Syrjänen, K., Gissmann, L. und Koss, L. G. (Hrsg.). *Papillomaviruses and Human Disease*. Springer-Verlag, Heidelberg. 40-103.
- Swindle, C. S., Zou, N., van Tine, B. A., Shaw, G. M., Engler, J. A. und Chow, L. T. 1999. Human Papillomavirus DNA Replication Compartments in a Transient DNA Replication System. *J. Virol.* **73**, 1001-1009.
- Tai, H. T., Smith, C. A., Sharp, P. A. und Vinograd, J. 1972. Sequence Heterogeneity in Closed Simian Virus 40 Deoxyribonucleic Acid. J. Virol. 9, 317-325.
- Thomas, B. J. und Rothstein, R. 1989. Elevated Recombination Rates in Transcriptionally Active DNA. *Cell* 56, 619-630.
- Thomas, M. und Banks, L. 1998. Inhibition of Bak-Induced Apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene 10, 2943-2954.
- Tiemessen, C. T. und Kidd, A. H. 1990. Adenovirus 41 Growth in Semi-Permissive Cells Shows Multiple-Hit Kinetics. *Arch. Virol.* **110**, 239-245.
- Tommasino, M., Adamczewski, J. P., Carlotti, F., Barth, C. F., Manetti, R., Contorni, M., Cavalieri, F., Hunt, T. und Crawford, L. 1993. HPV16 E7 Protein Associates with the Protein Kinase p33CDK2 and Cyclin A. *Oncogene* 8, 195-202.
- Tommasino, M. und Crawford, L. 1995. Human Papillomavirus E6 and E7: Proteins which Deregulate the Cell Cycle. *Bioessays* 17, 509-518.
- **Tommasino, M.** 1997. (Hrsg.). *Papillomaviruses in Human Cancer: The Role of E6 and E7 Oncoproteins*. Landes Bioscience, Austin.
- Touzé, A. und Coursaget, P. 1998. *In Vitro* Gene Transfer Using Human Papillomavirus-Like Particles. *Nuc. Acids Res.* 26, 1317-1323.
- Touzé, A., Mahe, D., El Mehdaoui, S., Dupuy, C., Combita-Rojas, A. L., Boursaghin, L., Sizaret, P. Y. und Coursaget, P. 2000. The Nine C-Terminal Amino Acids of the Major Capsid Protein of the Human Papillomavirus Type 16 Are Essential for DNA Binding and Gene Transfer Capacity. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 121-127.
- Trus, B. L., Roden, R. B. S., Greenstone, H. L., Vrel, M., Schiller, J. T. und Booy, F. P. 1997. Novel Structural Features of Bovine Papillomavirus Capsid Revealed by a Three-Dimensional Reconstruction to 9 Å Resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 413-420.
- Unckell, F., Streeck, R. E. und Sapp, M. 1997. Generation and Neutralization of Pseudovirions of Human Papillomavirus Type 33. J. Virol. 71, 2934-2939.
- Van Kammen, A. 1968. The Relationship between the Components of Cowpea Mosaic Virus. I. Two Ribonucleoprotein Particles Necessary for the Infectivity of CPMV. *Virology* 34, 312-318.
- Van Regenmortel, M. H. 2001. Perspectives on Binomial Names of Virus Species. Arch. Virol. 146, 1637-1640.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. und McCawley, P. 1977. The Establishment of Two Cell Lines from the Insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). In Vitro. 13, 213-217.

- Volpers, C., Unckell, F., Schirmacher, P., Streeck, R. E. und Sapp, M. 1995. Binding and Internalization of Human Papillomavirus Type 33 Virus-Like Particles by Eukaryotic Cells. J. Virol. 69, 3258-3264.
- Vousden, K. H., Doniger, J., DiPaolo, J. A. und Lowy, D. R. 1988. The E7 Open Reading Frame of Human Papillomavirus Type 16 Encodes a Transforming Gene. *Oncogene Res.* **3**, 167-175.
- Wadzinski, B. E., Eisfelder, B. J., Peruski, L. F., Mumby, M. C. und Johnson, G. L. 1992. NH2-Terminal Modification of the Phosphatase 2A Catalytic Subunit Allows Functional Expression in Mammalian Cells. J. Biol. Chem. 267, 16883-16888.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. und Munoz, N. 1999. Human Papillomavirus Is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. J. Pathol. 189, 12-19.
- Watanabe, S., Kanda, T. und Yoshiike, K. 1989. Human Papillomavirus Type 16 Transformation of Primary Human Embryonic Fibroblasts Requires Expression of Open Reading Frames E6 and E7. J. Virol. 63, 965-969.
- Weintraub, S. J., Chow, K. N., Luo, R. X., Zhang, S. H., He, S. und Dean, D. C. 1995. Mechanism of Active Transcriptional Repression by the Retinoblastoma Protein. *Nature* 375, 812-815.
- Werness, B. A., Levine, A. J. und Howley, P. M. 1990. Association of Human Papillomavirus Types 16 and 18 E6 Proteins with p53. *Science* 248, 76-79.
- White, A. E., Livanos, E. M. und Tlsty, T. D. 1994. Differential Disruption of Genomic Integrity and Cell Cycle Regulation in Normal Human Fibroblasts by the HPV Oncoproteins. *Genes Dev.* 8, 666-677.
- Whiteway, M. S. und Ahmed, A. 1984. Recombinational Instability of a Chimeric Plasmid in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.* 4, 195-198.
- Yang, L., Li, R., Mohr, I. J., Clark, R. und Botchan, M. 1991. Activation of BPV-1 Replication in Vitro by the Transcription Factor E2. Nature 353, 628-632.
- Yang, R., Day, P. M., Yutzy IV, W. H., Lin, K.-Y., Hung, C.-F. und Roden, R. B. S. 2003. Cell-Surface-Binding Motifs of L2 That Facilitate Papillomavirus Infection. J. Virol. 77, 3531-3541.
- Yeager, M. D., Aste-Amezaga, M., Brown, D. R., Martin, M. M., Shah, M. J., Cook, J. C., Christensen, N. D., Ackerson, C., Lowe, R. S., Smith, J. F., Keller, P. und Jansen, K. U. 2000. Neutralization of Human Papillomavirus (HPV) Pseudovirions: A Novel and Efficient Approach to Detect and Characterize HPV Neutralizing Antibodies. *Virol.* 278, 570-577.
- Yoshiike, K. 1968. Studies on DNA from Low-Density Particles of SV40. I. Heterogeneous Defective Virions Produced by Successive Undiluted Passages. *Virology* 34, 391-401.
- Zerfass, K., Schulze, A., Spitkovsky, D., Friedman, V., Henglein, B. und Jansen-Dürr, P. 1995. Sequential Activation of Cyclin E and Cyclin A Gene Expression by Human Papillomavirus Type 16 E7 through Sequences Necessary for Transformation. *J. Virol.* **69**, 6389-6399.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. und Jansen-Dürr, P. 1996. Inactivation of the Cdk Inhibitor p27KIP1 by the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323-2330.
- Zhang, B., Spandau, D. F. und Roman, A. S. 2002. E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. J. Virol. 76, 220-231.
- Zhao, K.-N., Sun, X.-Y., Frazer, I. H. und Zhou, J. 1998. DNA Packaging by L1 and L2 Capsid Proteins of Bovine Papillomavirus Type 1. *Virology* 243, 482-491.

- Zhao, K.-N., Frazer, I. H., Liu, W. J., Williams, M. und Zhou, J. 1999. Nucleotides 1506-1625 of Bovine Papillomavirus Type 1 Genome Can Enhance DNA Packaging by L1/L2 Capsids. *Virology* 259, 211-218.
- Zhao, K.-N., Hengst, K., Liu, W.-J., Liu, Y. H., Liu, X. S., McMillan, N. A. J. und Frazer, I. A. 2000. BPV1 E2 Protein Enhances Packaging of Full-Length Plasmid DNA in BPV1 Pseudovirions. *Virology* 272, 382-393.
- Zhao, K.-N. und Frazer, I. H. 2002. Replication of Bovine Papillomavirus Type 1 (BPV-1) DNA in *Saccharomyces cerevisiae* Following Infection with BPV-1 Virions. J. Virol. 76, 3359-3364.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Stenzel, D. J. und Frazer, I. H. 1991. Expression of Vaccinia Recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF Proteins in Epithelial Cells is Sufficient for Assembly of HPV Virion-Like Particles. *Virology* 185, 251-257.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Louis, K. und Frazer, I. H. 1994. Interaction of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 Capsid Proteins with HPV DNA Requires an Intact L2 N-Terminal Sequence. J. Virol. 68, 619-625.
- Zhou, J., Gissmann, L., Zentgraf, H., Müller, H., Picken, M. und Müller, M. 1995. Early Phase in the Infection of Cultured Cells with Papillomavirus Virions. *Virology* **214**, 167-176.
- Zhou, J., Liu, W. J., Peng, S. W., Sun, X. Y. und Frazer, I. H. 1999. Papillomavirus Capsid Protein Expression Level Depends on the Match between Codon Usage and tRNA Availability. J. Virol. 73, 4972-4982.
- zur Hausen, H. 1976. Condylomata acuminata and Human Genital Cancer. Cancer Res. 36, 749.
- zur Hausen, H. 1999. Papillomaviruses in Human Cancers. Proc. Assoc. Am. Physicians 111, 581-587.
- zur Hausen, H. 2000. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst. 92, 690-698.
- zur Hausen, H. 2001. Oncogenic DNA Viruses. Oncogene. 20, 7820-7823.
- zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and Cancer: from Basic Studies to Clinical Application. Nat. Rev. Cancer 2, 342-350.

# 7 Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Ω	Ohm
α	anti
γ-Bestrahlung	Röntgen- (Gamma-) Bestrahlung
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
aa	Aminosäure (amino acid)
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ala	Alanin
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bak	bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma-2 protein
bidest	bidestilliert
Blk	B lymphoid tyrosine kinase
bp	Basenpaare
BPV	bovines Papillomavirus
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
cDNA	copyDNA
c-fos	zelluläres FBJ-Osteosarkomvirus-Gen
Ci	Curie
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (cervical intraepithelial neoplasia)
CIP1	CDK-interacting protein 1
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV IE	cytomegalovirus immediate early
CpG	Cytidin-Guanidin-Dinukleotidfolge

cpm CS CsCl	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> ) Kälberserum ( <i>calf serum</i> ) Cäsiumchlorid
CSF C terminal	colony stimulating factor
C-terminal	Carboxy-terminar
CUL	chimäre virusähnliche Partikel ( <i>chimaric virus lika particlas</i> )
C V LI	eminare virusammene i artikel (chimerie virus-tike purticles)
d	Tag ( <i>day</i> )
D/R	Disassembly/Reassembly
DAPI	4,6-Diamino-2-phenyl-indoldihydrochlorid
dCTP	Deoxycytidinphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco s Modified Eagle s Medium
DMSO	Dimetnylsultoxia
DNA	Desoxyribonukleinsaure ( <i>aesoxyribonucleic acia</i> )
DINASE	Desoxynloonuklease
	E2E dimensization partner, dutil polypoptide
Dr	E2F aimerization partner, ariji-polypeptiae
E. coli	Escherichia coli
E1-E7	early proteins 1-7
E2F	(Adenovirus-) E2-Faktor
E6-AP	E6 associated protein
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Elektronenmikroskopie
et al.	und andere ( <i>et alia</i> )
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
FcγRIII	constant fragment $\gamma$ receptor III
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
σ	Gramm
$G_{0}$ $G_{1}$ $G_{2}$	Gan-Phasen des Zellzyklus
$\sigma_{0}, \sigma_{1}, \sigma_{2}$	Galaktose-1/10-Promotor
GEP	areen fluorescent protein
Gln	Glutamin
Ghu	Glutaminsäure
GST	Glutathinsaure
h HDC	Stunde
HB2	HEPES-geputterte Salzlösung (hepes buffered saline)
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> -2-ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen

HPLC	high-performance liquid chromatography
HPV	humanpathogenes Papillomavirus
IgG	Immunoglobulin G
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropylthio-β-D-galaktosid
kb	Kilobasenpaare
kPa	Kilopascal
kD	Kilodalton
KV	Kilovolt
l	Liter
L1, L2	<i>late proteins 1, 2</i>
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LCR	lange Kontrollregion ( <i>long control region</i> )
Leu	Leucin
<i>leu2-d</i>	Leucin-Auxotrophiemarker mit 2 μm-Elementen
Lys	Lysin
M	Molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOPS	3-[ <i>N</i> -Morpholino]propansulfonsäure
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
NAPP	Natriumphosphat-Puffer
NCR	nichtkodierende Region ( <i>noncoding region</i> )
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
OLB	oligo-primed labelling buffer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
p.i.	präinkubiert
PK	Positivkontrolle

PML	promonocytic leukemia protein
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PODs	promonocytic leukemia protein (PML) oncogenic domains
Poly-A	Poly-Adenylierungs-Stelle
pRB	Retinoblastoma-Protein
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PZD	PSD-95/discs-large/ZO-1
	Roosevell Park Memorial Institute
KNA DNasa	Ribonukienisaure ( <i>ribonucieic acia</i> )
KNase	Ribonuklease
rpm DNA	
rkna	ribosomale KNA
	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
S	Svedberg
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Ser	Serin
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer (sodium chloride-sodium citrate)
ssDNA	single-stranded DNA
SV40 ori	simian vacuolating virus 40 origin of replication
SV40 Tag	simian vacuolating virus 40 large tumor antigen
Т	Triangulationszahl
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAF 110	TBP-assoziierter Faktor 110
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikrosskopie
TEMED	N. N. N'. N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TNE	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
Tris	Trishvdroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tyr	Tyrosin
II	Finheit ( <i>unit</i> )
Ura	Uracil
LIRR	unstream regulatory region
UN	upsi can regulatory region ultraviolett
V	Volt
Val	Valın

VF	Verdünnungsfaktor
VLP	virusähnlicher Partikel (virus-like particle)
VP22	viral protein 22 (des Herpes simplex-Virus 1)
W	Watt
x	-fach (Menge)
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-β-D-galaktosid
Y Geo Mean YPD	<i>geometrical mean of fluorescence</i> (bezogen auf Abschnitt der Y-Achse) <i>yeast extract peptone dextrose</i>
YPG	yeast extract peptone galactose